

Aus dem Zentrum für Kardiologie  
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vergleich der funktionellen und biochemischen Auswirkungen von inhalierten  
Nano- und Mikropartikeln im Mausmodell mit Schwerpunkt auf die räumliche  
Verteilung und Unterschiede in der Toxizität je nach Partikelgröße

Inauguraldissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades der  
Medizin  
der Universitätsmedizin  
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

David Nußbaum  
aus Bonn

Mainz, 2025

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. med. Philipp Drees

1.Gutachter: Univ.-Prof. Dr. Andreas Daiber

2.Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Huige Li

Tag der Promotion: 12.11.2025

Nachnutzungslizenz: Namensnennung (CC-BY-4.0)

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	I-II
Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
1 Einleitung.....	1
2 Literaturdiskussion.....	2
2.1 Oxidativer Stress.....	2
2.1.1 NADPH-Oxidasen.....	3
2.2 Funktionen des Endothels.....	5
2.2.1 Vasokonstriktion.....	5
2.2.2 Vasodilatation.....	6
2.3 Endotheliale Dysfunktion.....	8
2.3.1 Endotheliale 'NO-Synthase und oxidativer Stress.....	8
2.4 Feinstaub.....	10
2.4.1 Ursprung und Zusammensetzung von Feinstaub.....	10
2.4.2 Gesetzliche Regulierungen.....	12
2.4.3 Einfluss von Feinstaub auf die Gesundheit.....	15
2.4.3.1 Auswirkungen von Feinstaub aus globaler Perspektive.....	15
2.4.3.2 Organspezifische Auswirkungen von Feinstaub.....	16
2.4.3.2.1 Auswirkungen auf das pulmonale System.....	17
2.4.3.2.2 Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System.....	18
2.4.3.2.3 Auswirkungen auf das zentrale Nervensystem und Hirnstrukturen...	19
2.4.3.3 Unterschiede zwischen PM <sub>2,5</sub> und PM <sub>0,1</sub> .....	21
2.4.3.3.1 Weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit.....	24
3 Materialien.....	26
3.1 Feinstaubpartikel.....	26
3.1.1 Mikropartikel.....	26
3.1.2 Nanopartikel.....	26
3.2 Chemikalien und Reagentien.....	27
3.3 Puffer und Lösungen.....	29
3.4 Verbrauchsmaterialien.....	30
3.5 Technische Hilfsmittel und Geräte.....	31
3.6 Software.....	31
3.7 Antikörper.....	32

3.7.1 Primäre Antikörper.....	32
3.7.2 Sekundäre Antikörper.....	32
4 Methoden.....	33
4.1 Versuchstiere und Durchführung.....	33
4.2 Westernblot.....	34
4.2.1 Extraktion der Proteine aus Gewebe.....	34
4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	34
4.2.3 Protein-Gelelektrophorese / SDS-PAGE.....	35
4.2.4 Blotting.....	36
4.2.5 PonceauS-Färbung.....	37
4.2.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen.....	38
4.2.7 Strippen – Entfernen von Antikörpern.....	39
4.3 Detektion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Geweben .....	39
4.4 Statistische Methoden .....	41
5 Ergebnisse.....	42
5.1 Nachweis Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS).....	42
5.2 Nachweis von Proteinen in Lungengewebe.....	44
5.3 Nachweis von Proteinen in Herzgewebe.....	46
5.4 Vaskuläre Funktions- und Inflammationsmarker .....	48
6 Diskussion.....	49
6.1 Pulmonale Inflammationsmarker.....	49
6.2 Vaskuläre und kardiale Funktions- und Inflammationsmarker.....	51
6.3 Hirnorganische Auswirkungen.....	54
6.4 Relevanz für die Exposition der Bevölkerung mit UFP.....	55
6.5 Schlussfolgerungen und Ausblick .....	56
6.6 Einschränkungen der Studie .....	57
7 Zusammenfassung.....	59
8 Danksagung.....	60
9 Tabellarischer Lebenslauf.....	61
10 Literaturangaben.....	62

## Abkürzungsverzeichnis

*NO	Stickstoffmonoxid
*NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
*OH	Hydroxid-Ion
ACh	Acetylcholin
Aβ	Beta-Amyloid
BH <sub>2</sub>	Dihydrobiopterin
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
Br	Brom
C <sub>6</sub> H <sub>6</sub>	Benzol
caM	Calmodulin
Cd	Cadmium
CD68	Cluster of differentiation 68
cGKI	cyclisches Guanosinmonophosphat-abhängige Proteinkinase I
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CI	Konfidenzintervall
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung
COX-1	Cyclooxygenase 1
COX-2	Cyclooxygenase 2
CRP	C-reaktives Protein
Cu-Zn-SOD	Kupfer-Zink-Superoxid-Dismutase
CVD	Kardiovaskuläre Erkrankungen
DAG	Diacylglycerol
DALY	disability-adjusted life years
DHE	Dihydroethidium
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DUOX1	Duale Oxidase 1
DUOX2	Duale Oxidase 2
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
ET-1	Endothelin 1
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FEV <sub>1</sub>	Einsekundenkapazität
FMN	Flavinmononukleotid
FVC	Forcierte Vitalkapazität
GTP	Guanosintriphosphat
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HO-1	Hämoxygenase 1
HR	Hazard Ratio
IL-18,1β,6,8	Interleukin 18,1β,6,8

iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
IP3	Inositol-1,4,5-trisphosphat
LPS	Lipopolysaccharide
MCP-1	Monocyte Chemoattractant Protein-1
MLCK/MLKK	Myosin-leichte-Ketten-Kinase
MLCP/MLKP	Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase
Mn-SOD	Mangan-Superoxid-Dismutase
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NCF-1	Neutrophil cytosol factor 1
NF- $\kappa$ B	nuclear factor k-light-chain-enhancer of activated B cells
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
Ni	Nickel
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOX 1-5	NADPH-oxidase 1-5
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superoxidradikal
O <sub>3</sub>	Ozon
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PET	Positronen-Emissions-Tomographie
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PKC	Proteinkinase C
PKC $\alpha$ 1	Proteinkinase C alpha 1
PLC	Phospholipase C
PM	Feinstaub
PM <sub>0,1</sub>	Feinstaub bis 0.1 $\mu$ m Durchmesser
PM <sub>10</sub>	Feinstaub bis 10 $\mu$ m Durchmesser
PM <sub>2,5</sub>	Feinstaub bis 2.5 $\mu$ m Durchmesser
P-MARCKS	phosphoryliertes myristoyliertes Alanin-reiches C-Kinase-Substrat
RAC	Rho-GTPase
RNS	Reaktive Stickstoff-Spezies
RONS	Reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RR	Relatives Risiko
sGC	lösliche Guanylatzyklase
SO <sub>2</sub>	Schwefeldioxid
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	Sulfat
SPM	Synthetischer Feinstaub
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor Alpha
UFP	Ultrafeiner Feinstaub (bis 0.1 $\mu$ m Durchmesser)

## Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 2.1 Aufbau der NADPH-Oxidasen NOX1 und NOX2
- Abbildung 2.2 Aktivierung der NADPH-Oxidase NOX2
- Abbildung 2.3 Kontraktion glatter Muskulatur durch Noradrenalin
- Abbildung 2.4 Mechanismus der Abspaltung von  $\text{NO}$  aus L-Arginin durch die eNOS
- Abbildung 2.5 Mechanismus der Relaxation glatter Muskulatur
- Abbildung 2.6 Strukturschema und physiologische Funktion des Homodimers eNOS
- Abbildung 2.7 Schema des Elektronenflusses von gekoppelter und entkoppelter eNOS
- Abbildung 2.8 Überblick über häufige Quellen von Feinstaub
- Abbildung 2.9 Trend der  $\text{PM}_{10}$  Jahresmittelwerte in Deutschland von 1995-2023
- Abbildung 2.10 Belastung der EU-Bevölkerung durch  $\text{PM}_{10}$  und  $\text{PM}_{2.5}$  nach EU-Standards und WHO guidelines
- Abbildung 2.11 Entwicklung der häufigsten Ursachen für DALYs über alle Altersgruppen von 2000-2021
- Abbildung 2.12 Luftverschmutzungsabhängige DALYS aus globaler Perspektive
- Abbildung 2.13 Schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen und Auswirkungen von Feinstaub und reaktiven Gasen auf Lunge, Gehirn und das kardiovaskuläre System
- Abbildung 2.14 Wege des Feinstaubes in das Gehirn
- Abbildung 2.15 Vergleich von  $\text{PM}_{2.5}$  und  $\text{PM}_{0.1}$
- Abbildung 2.16 Korrelation der Konzentration von Nanopartikeln in der Luft mit kardiovaskulärer und respiratorischer Mortalität
- Abbildung 2.17 Auswirkungen von synthetischen Feinstaubpartikeln auf die Gefäßfunktion
- Abbildung 2.18 Fluoreszenzaufnahme der Verteilung von Mikro- und Nanopartikeln in der Lunge
- Abbildung 3.1 Massen- und Mengenverteilung der verwendeten Feinstaubpartikel
- Abbildung 4.1 Aufbau der Blotting-Kassette für die SDS-PAGE
- Abbildung 4.2 Beispiel für eine Membranfärbung mit PonceauS
- Abbildung 4.3 Oxidation von Dihydroethidium (DHE)
- Abbildung 5.1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von ROS in Aorta und Cortex nach Exposition gegenüber fluoreszierenden Partikeln
- Abbildung 5.2 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von ROS in Aorta, Cortex und Lunge nach Exposition gegenüber magnetischen Partikeln
- Abbildung 5.3 Pulmonale Proteinexpression nach Exposition gegenüber Mikro- und Nanopartikeln
- Abbildung 5.4 Kardiale Proteinexpression nach Exposition gegenüber Mikro- und Nanopartikeln
- Abbildung 5.5 Aortale Proteinexpression nach Exposition gegenüber Mikro- und Nanopartikeln
- Abbildung 6.1 Inzidenz der jährlichen kardiovaskulären Erkrankungen, die UFP zugeschrieben werden

## **Tabellenverzeichnis**

- Tabelle 3.1 Chemikalien und Reagenzien
- Tabelle 3.2 Puffer und Lösungen
- Tabelle 3.3 Verbrauchsmaterialien
- Tabelle 3.4 Technische Hilfsmittel und Geräte
- Tabelle 3.5 Verwendete Software
- Tabelle 3.6 Verwendete Primäre Antikörper
- Tabelle 3.7 Verwendete Sekundäre Antikörper
- Tabelle 4.1 Zusammensetzung der Gele für die Elektrophorese

## 1 Einleitung

„Die Leute wurden von den Straßen krank hereingebracht und sie starben an der schrecklichen Luftverschmutzung“ [1]. „Es waren einfach zu viele betroffen. Viele schafften es nicht mehr ins Krankenhaus hinein und starben draußen“ [2]. Diese Zitate des Arztes Robert Waller, der im Jahre 1952 die Katastrophe des „Great Smog“ in London miterlebt hat, verdeutlichen, welche Auswirkungen ein Höchstmaß an akuter Luftverschmutzung haben kann. Damals verloren innerhalb von 5 Tagen alleine in London ca. 12.000 Menschen ihr Leben [3]. Solche Extreme sind glücklicherweise selten, jedoch rangiert die Luftverschmutzung laut der Global Burden of Disease-Studie von 2021 weltweit auf Platz 1 der Ursachen für krankheitsbelastete oder verlorene Lebensjahre („disability-adjusted life years“ (DALYs)) [4] und ist jährlich für ca. 7-8,3 Millionen vorzeitige Todesfälle verantwortlich [5,6]. Dabei erhält Feinstaub in der Luft eine entscheidende Bedeutung für die Luftverschmutzung [7]. Anhand der Partikelgröße lässt sich Feinstaub, oder auch englisch „Particulate matter“ (PM) in drei Klassen unterteilen:  $PM_{10}$  schließt alle Partikel zu einem Durchmesser von 10  $\mu m$  ein,  $PM_{2,5}$  bis zu 2,5  $\mu m$  und  $PM_{0,1}$  umfasst alle Teilchen mit einem Durchmesser bis zu 100nm [8]. Aktuelle Richtlinien und Bestimmungen für die Schwellenwerte von Feinstaub in der Luft richten sich nach den gemessenen Konzentrationen von  $PM_{10}$  und  $PM_{2,5}$  [9][10], da aktuell in Messstationen diese Werte erhoben werden und große epidemiologische Studien auf ihnen basieren. Es konnte jedoch bereits gezeigt werden, dass besonders  $PM_{0,1}$  durch seinen geringen Durchmesser die Luft-Blut-Schranke der Alveolen passieren und in den Blutkreislauf gelangen kann [11]. Somit können neben der Lunge auch weitere Organe von Feinstaub und seinen Auswirkungen betroffen sein, was beispielsweise kardiovaskuläre Erkrankungen, Diabetes oder auch Demenz begünstigt [12]. In vorherigen Studien konnten Daiber et al. und Kuntic et al. bereits ablaufende pathophysiologische Mechanismen nach Feinstaubexposition und Effekte von Mikropartikeln und Nanopartikeln auf das kardiovaskuläre System [13–17] und neurodegenerative Erkrankungen [15–18] nachweisen, sowie die Krankheitslast in Deutschland durch  $PM_{2,5}$  ermitteln [19].

Ziel dieser Arbeit ist es nun zu untersuchen, ob die Luft-Blut-Schranke der Alveolen unterschiedlich gut von den einzelnen Fraktionen der Mikro- und Nanopartikel überwunden werden kann und ob ein Unterschied in der Pathogenität der verschiedenen großen Partikel zu erkennen ist. Hierzu wird die Lunge, als auch weitere Organe auf

das Vorhandensein der fluoreszierenden oder magnetischen Partikel untersucht, die Gewebe werden auf oxidativen Stress hin analysiert und es werden funktionelle, sowie molekulare Parameter herangezogen, die auf einen Unterschied in pulmonaler und kardiovaskulärer Schädigung durch die verschiedenen Partikelgrößen hinweisen können.

## **2 Literaturdiskussion**

### **2.1 Oxidativer Stress**

Oxidativer Stress ist die Bezeichnung für einen Zustand des Stoffwechsels, in dem die Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und/oder reaktiven Stickstoffspezies (RNS) die Leistungsfähigkeit der zellulären antioxidativen Mechanismen für deren Inaktivierung übersteigt [20]. Das so entstandene Ungleichgewicht zugunsten der oxidativen Mechanismen kann zur Oxidation und somit zu Schäden und Funktionsverlust von Nukleinsäuren, Lipiden und Proteinen führen [21]. Diese Schädigungen können akkumulieren und zu einer Vielzahl systemischer und neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson, sowie kardiovaskulären Erkrankungen wie Atherosklerose und Hypertonie, oder auch metabolischen Erkrankungen wie Diabetes Mellitus und sogar Krebs führen [22–24]. Zu den bedeutungsvollen ROS zählen das Hydroxylradikal ( $\cdot\text{OH}$ ), das Superoxidradikal ( $\text{O}_2^-$ ), sowie Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). Bei den RNS sind Stickstoffdioxid ( $\cdot\text{NO}_2$ ) und vor allem Stickstoffmonoxid ( $\cdot\text{NO}$ ) zu nennen. Jedoch sind diese RONS nicht nur ein unerwünschtes Nebenprodukt, beispielsweise des aeroben Stoffwechsels der mitochondrialen Atmungskette, der Xanthinoxidase [25], oder gelangen über exogene Zufuhr wie durch Feinstaub in den Organismus, sondern werden von Zellen gezielt produziert, um diverse Funktionen zu erfüllen. Die membranständige NADPH-Oxidase (NOX) in Endothel und neutrophilen Granulozyten beispielsweise katalysiert die Reduktion von  $\text{O}_2$  zum Superoxidradikal  $\text{O}_2^-$ . In Granulozyten wird das Radikal zur Abwehr von Bakterien und Viren eingesetzt, während es am Endothel eher Schäden verursacht und als Antagonist des  $\cdot\text{NO}$  wirkt [26,27]. Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) katalysiert die Abspaltung des  $\cdot\text{NO}$  von Arginin, um nachfolgend durch Aktivierung der zytosolischen Guanylatzyklase eine Vasodilatation zu bewirken [28]. Ebenfalls die Modulation der Aktivität der

Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1 und COX-2) und damit die Produktion von Prostaglandinen wird durch redox-regulierte Proteine gesteuert [29]. Als Schutz vor diesen hochreaktiven Molekülen besitzt der Organismus diverse Mechanismen. Die Superoxiddismutasen, wie die mitochondriale Mangan-SOD (Mn-SOD) und die zytosolische Kupfer/Zink-SOD (Cu,Zn-SOD) katalysieren zunächst die Reaktion, in der Superoxid-Anionen zu Wasserstoffperoxid umgewandelt werden [30]. Anschließend können Glutathion-Peroxidasen und Katalasen das  $H_2O_2$  zu  $H_2O$  reduzieren. Weitere Mechanismen inkludieren die Vitamine C und E, Carotinoide und Flavonoide [31]. Werden diese Mechanismen ausgereizt und die zugehörigen Systeme in ihre oxidierte Form verschoben, spricht man von oxidativem Stress.

### 2.1.1 NADPH-Oxidasen

Die NADPH-Oxidasen (NOX) sind membrangebundene Enzymkomplexe, die durch Generierung von  $O_2^{\cdot-}$  oder  $H_2O_2$  vorwiegend immunologische Funktionen erfüllen, wie die Abwehr von Bakterien, Parasiten und Viren. Sie lassen sich in phagozytäre und nicht-phagozytäre Formen unterscheiden. Ebenso gibt es einige Isoformen (NOX1, NOX2, NOX3, NOX4, NOX5, DUOX1, DUOX2), deren Aufbau sich unterscheidet. Für vaskuläre Erkrankungen von besonderer Bedeutung sind die Unterformen NOX1 und NOX2 [32]. Die NOX1 wird von vaskulärem Endothel, glatter Muskulatur und Kardiomyozyten exprimiert, während sich NOX2 auf dem Endothel, als auch auf Leukozyten findet [33]. Der Aufbau von NOX1 und NOX2 wird in Abb. 2.1 dargestellt.

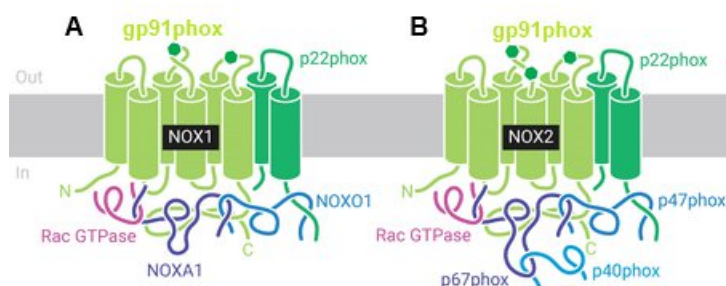


Abb. 2.1 – Aufbau der NADPH-Oxidasen NOX1 (A) und NOX2 (B). Abgebildet sind die beiden Isoformen des Enzyms mit ihren Untereinheiten. – Abbildung modifiziert aus [34].

Die Relevanz der NOX2 und ihrer Funktion wird deutlich, wenn die Folgen ihres Ausfalls betrachtet werden. In diesem Fall kommt es zur Chronischen Granulomatose (CGD), einer Erkrankung beruhend auf einem Gendefekt, die mit gehäuften Infekten,

Granulombildung und oft letalem Verlauf einhergeht [35]. Die NOX2 wird auch als gp91<sup>phox</sup> bezeichnet, was im engeren Sinne eine ihrer Untereinheiten beschreibt. Im inaktivierten Zustand befinden sich die gp91<sup>phox</sup>, sowie die p22<sup>phox</sup> Untereinheiten, die den katalytischen Kern des Enzyms repräsentieren, in der Zellmembran gebunden. Gemeinsam werden sie auch als Flavo-Hämprotein-Komplex (Cytochrom b558) bezeichnet. Die regulatorischen Untereinheiten p40<sup>phox</sup>, p47<sup>phox</sup>, p67<sup>phox</sup>, sowie die Rac (Rho-GTPase) befinden sich dissoziiert im Zytosol. Aktivierend wirken externe Stimuli, wie beispielsweise Toxine oder PAMPS (Pathogen-assoziierte Muster), zu denen Bestandteile aus bakteriellen Membranen (Lipopolysaccharide = LPS) gehören. Außerdem Entzündungsmediatoren wie der Tumornekrosefaktor Alpha (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  oder die Protein-Kinase C (PKC). Diese bewirken eine Phosphorylierung und Konformationsänderung von p47<sup>phox</sup>. Dies bildet nun mit p40<sup>phox</sup> und p67<sup>phox</sup> einen Komplex, der zur Membran der Zelle wandert und mit den dort membranständigen Bestandteilen des Enzymkomplexes interagiert, was seine enzymatische Aktivität bewirkt. Rac wirkt stabilisierend auf den Komplex. In ihrer aktivierten Form ist die NADPH-Oxidase nun dazu in der Lage, Elektronen von NADPH auf molekularen Sauerstoff zu übertragen, was zur Bildung von Superoxid (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) führt (Abb. 2.2) [36]. Diese Reaktion in großer Zahl wird auch als „oxidativer Burst“ bezeichnet, wie er in phagozytierenden Zellen wie Neutrophilen oder Makrophagen beobachtet wird.

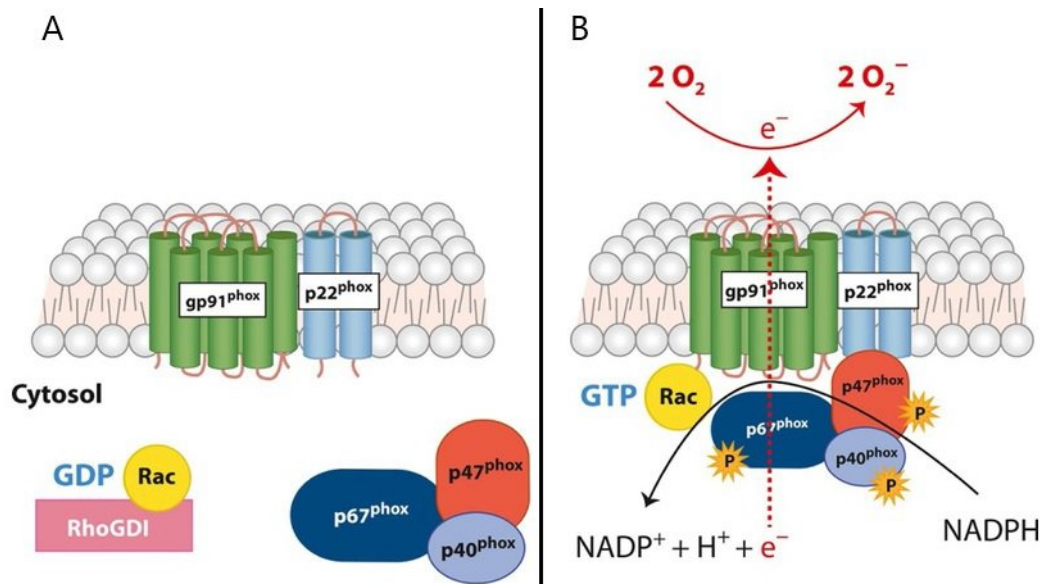


Abb. 2.2 – Aktivierung der NADPH-Oxidase NOX2. Abbildung A zeigt die inaktive Form des Enzyms mit membranständigen Anteilen, sowie den freien zytosolischen Untereinheiten. Abbildung B zeigt die aktive Form des Enzyms mit den gekoppelten Untereinheiten, sowie der superoxidbildenden Reaktion. Abbildung modifiziert aus [36].

Das gebildete  $O_2^{\cdot-}$  kann nun einerseits der zellulären Abwehr dienen, indem es meist zu  $H_2O_2$  weiter prozessiert wird, andererseits ist es als ROS auch in der Lage, körpereigene zelluläre Strukturen zu schädigen, oder mit  $\cdot NO$  zu Peroxynitrit zu reagieren. Folgen können endotheliale Dysfunktion (Kapitel 2.3) mit Begünstigung einer Hypertonie und/oder Atherosklerose sein [37,38].

## **2.2 Funktionen des Endothels**

Bereits 1865 wurde der Begriff des „Endothels“ von dem Anatomen Wilhelm His geprägt. Annähernd 100 Jahre lang wurde die mono-zelluläre Schicht in Blut- und Lymphgefäßen lediglich als eine schützende Diffusionsbarriere zwischen Blut bzw. Lymphe und Gefäßmatrix betrachtet [39]. Tatsächlich jedoch ist das Endothel eine Zellschicht mit hoher Stoffwechselaktivität und erfüllt eine Vielzahl wichtiger Aufgaben. Dazu zählen die Blutgerinnung, die Regulation des Gefäßtonus, die Angiogenese, Thermoregulation, sowie die Adhäsion und Transmigration von Zellen aus dem Gefäß heraus. Ebenfalls an inflammatorischen Prozessen ist das Endothel beteiligt [40].

Der Mechanismus der Vasokonstriktion und Vasodilatation umfasst eine Vielzahl von konstringierenden und dilatierenden Mediatoren. Zu den Vasokonstriktoren zählen beispielsweise Noradrenalin, Endothelin-1 und Angiotensin II, Noradrenalin oder auch Dehnungskräfte, die auf die Endothelzelle wirken. Als wichtigster Vasodilatator ist  $\cdot NO$  zu nennen, aber auch Prostazyklin und die natriuretischen Peptide.

### **2.2.1 Vasokonstriktion**

Die Vasokonstriktion der glatten Muskulatur wird im Folgenden am Beispiel von Noradrenalin erläutert: Nach Bindung von Noradrenalin an den Adrenorezeptor wird über G-Proteine die Phospholipase C (PLC) aktiviert. Diese spaltet Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) in Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP<sub>3</sub>) und 1,2-Diacylglycerol (DAG). Das DAG aktiviert nun die Proteinkinase C, während IP<sub>3</sub> zu einer Calciumfreisetzung aus dem sarkoplasmatischen Retikulum in das Zytosol führt. Nun wird über die Bildung eines Calcium-Calmodulin-Komplexes die Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLKK) aktiviert und über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC) die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLKP) gehemmt. Somit kann die MLKK die leichten Ketten des Myosinfilaments phosphorylieren und der Muskel kontrahiert [41] (Abb. 2.3).

## Kontraktion glatter Muskulatur am Beispiel von Noradrenalin

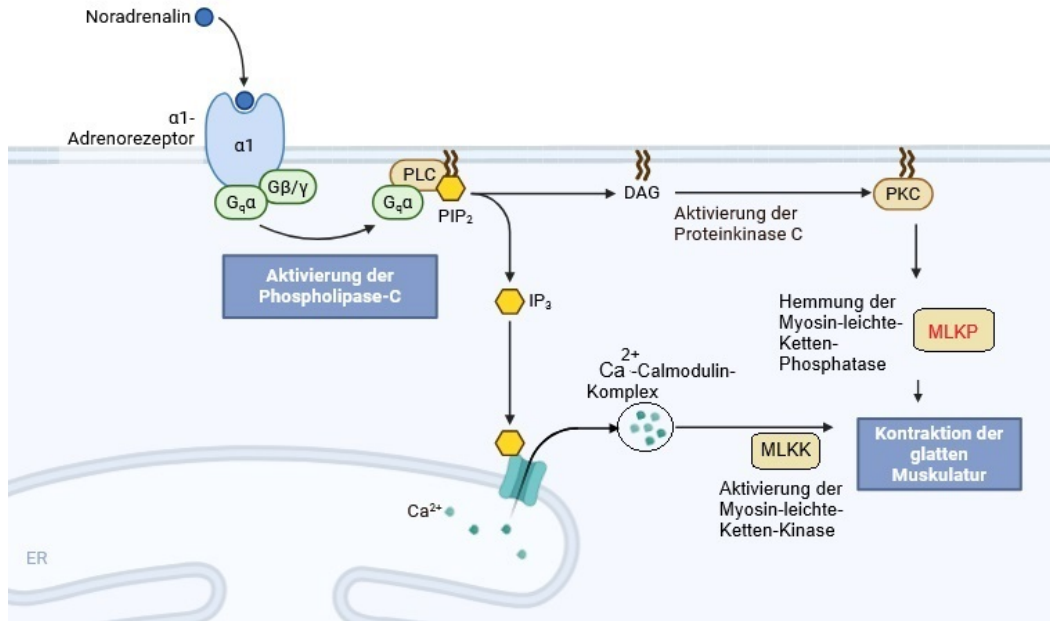


Abb.2.3 – Kontraktion glatter Muskulatur durch Noradrenalin. Diese Abbildung wurde mit BioRender nach [41] erstellt.

### 2.2.2 Vasodilatation

Zur Vasodilatation kommt es durch eine Desensitisierung der Filamente und durch eine Verringerung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration.

Essentiell für die Senkung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration ist die Bildung von Stickstoffmonoxid ( $\cdot NO$ ).  $\cdot NO$  ist eines der kleinsten endogen gebildeten bioaktiven Moleküle (neben den anderen Gasotransmittern CO und  $H_2S$ ) und wird von der endothelialen  $\cdot NO$ -Synthase (eNOS) aus L-Arginin abgespalten (Abb. 2.4)

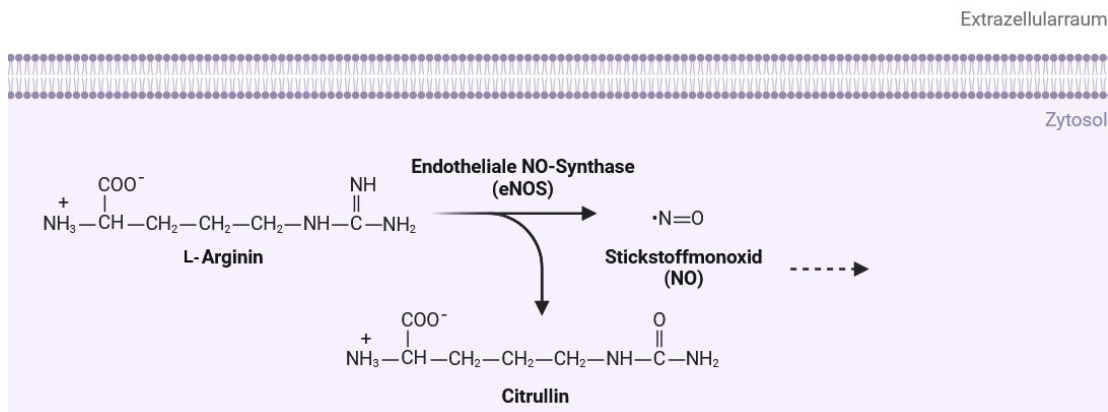


Abb.2.4 – Die endotheliale NO-Synthase (eNOS) spaltet  $\cdot NO$  von L-Arginin ab. Hierbei entsteht Citrullin. Diese Abbildung wurde mit BioRender erstellt.

Das in Endothelzellen gebildete  $\cdot\text{NO}$  diffundiert in die glatten Muskelzellen und stimuliert dort die lösliche Guanylatzyklase (sGC) zur Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus GTP. cGMP seinerseits aktiviert die cGMP-abhängige Proteinkinase I (cGKI). Diese Kinase nimmt nun über mehrere Mechanismen Einfluss auf die zytosolische Calciumkonzentration. cGKI inhibiert die über  $\text{IP}_3$  geöffneten Calciumkanäle des sarkoplasmatischen Retikulums, wodurch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom unterbrochen wird. Zudem öffnet sie Kaliumkanäle in der Zellmembran, die über eine Hyperpolarisation zum Verschließen von Calciumkanälen in der Zellmembran führen, was ebenfalls eine Senkung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zur Folge hat. Das einströmende  $\text{K}^+$  aktiviert außerdem die Calciumpumpen des sarkoplasmatischen Retikulums, wodurch zytosolisches  $\text{Ca}^{2+}$  wieder aufgenommen wird. Durch die Senkung des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels wird die Phosphorylierung der leichten Ketten des Myosinfilaments verringert und somit die Kontraktilität der Sarkomere verringert, was eine Vasodilatation zur Folge hat [42]. Durch den  $\cdot\text{NO}$ -cGMP-Signalweg wird ebenfalls die Myosin-leichte-Ketten-Phosphatase (MLCP/MLKP) aktiviert, die als Gegenspieler zur Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK/MLKK) fungiert [43].

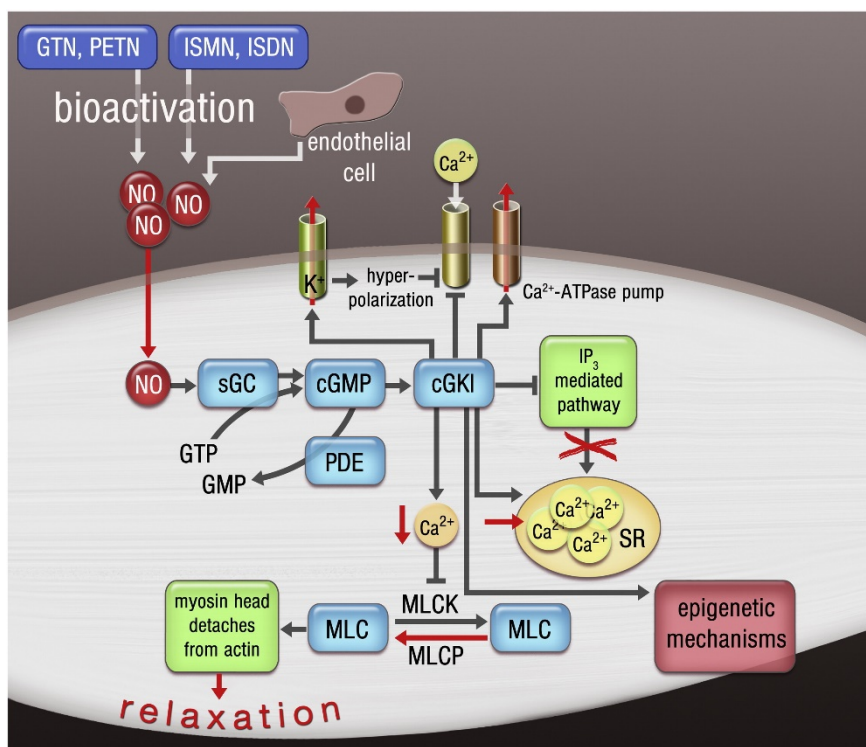


Abb. 2.5 – Mechanismus der Relaxation glatter Muskulatur, beschrieben in Abschnitt 2.2.2. Abbildung aus [42].

## **2.3 Endotheliale Dysfunktion**

Ein intaktes Endothel ist für die bereits genannten Funktionen wie die Regulation des Gefäßtonus, Blutgerinnung, Angiogenese, Thermoregulation und immunologische Aufgaben unerlässlich [40]. Schäden am Endothel und/oder Beeinträchtigungen seiner Stoffwechselwege bringen das empfindliche Gleichgewicht durcheinander und es erfolgt eine Verschiebung hin zu proliferativen, proinflammatorischen und prothrombotischen Prozessen, die in Atherosklerose, Plaquebildung und verminderter Fähigkeit zur Relaxation der Gefäße resultieren. Daraus folgend ergeben sich systemische Erkrankungen wie Hypertonie, Koronare Herzerkrankungen, Diabetes und Nierenversagen [44–47].

Ursächlich besonders relevant für ein Voranschreiten dieser Prozesse ist die Beeinträchtigung des Metabolismus von  $\cdot\text{NO}$  und seinem bildenden Enzym, der endothelialen  $\cdot\text{NO}$ -Synthase (eNOS). Wie bereits besprochen, wirkt  $\cdot\text{NO}$  als bedeutsamer Vasodilatator, zusätzlich hat es jedoch auch wichtige antiinflammatorische und antioxidative Eigenschaften [48]. Neben der Regulation von Makrophagen beeinflusst  $\cdot\text{NO}$  die Aktivität und die Proliferation von T-Lymphozyten, neutrophilen Lymphozyten und weiteren Immunzellen. Dabei führen hohe Konzentrationen von  $\cdot\text{NO}$  zu einer Apoptose dieser Zellen und zu einer verminderten Möglichkeit der Adhäsion und Transmigration, was eine überschießende Immunantwort verhindert [49]. Fehlt  $\cdot\text{NO}$ , so führen erhöhte Level an T-Lymphozyten und die von ihnen produzierten Zytokine zu Inflammation und Zellschädigung [50]. Ebenfalls regulierend wirkt  $\cdot\text{NO}$  bei der Aggregation von Thrombozyten und der Proliferation von glatten Muskelzellen der Gefäße [51].

### **2.3.1 Endotheliale $\cdot\text{NO}$ -Synthase und oxidativer Stress**

Wichtigste Quelle für  $\cdot\text{NO}$  und eine homöostatische Endothelfunktion ist die endotheliale  $\cdot\text{NO}$ -Synthase (eNOS). Dieses Enzym besteht aus einem Homodimer und kommt in 3 Isoformen (nNOS, iNOS, eNOS) im Organismus vor. Es katalysiert nach der Bindung von L-Arginin über mehrere Schritte und mittels Cofaktoren wie NADPH und Tetrahydrobiopterin ( $\text{BH}_4$ ) dessen Oxidation in Gegenwart von molekularem Sauerstoff, wobei Citrullin und  $\cdot\text{NO}$  entstehen [52]. Dieser Prozess wird in Abb. 2.6 verdeutlicht.

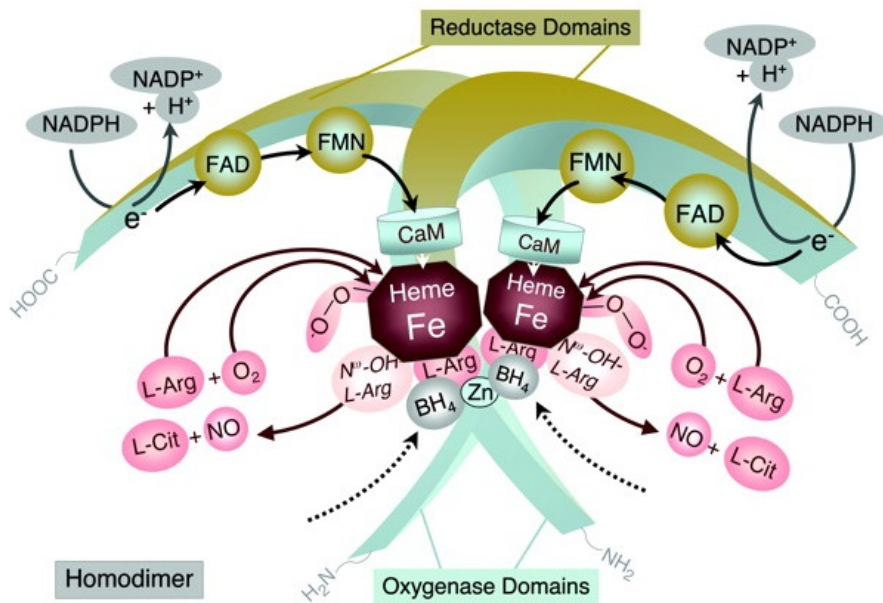


Abb. 2.6 – Schema der Struktur und physiologische Funktion des Homodimers eNOS. – Abbildung aus [51]

Die einzelnen Untereinheiten bestehen jeweils aus einer Reduktase- und einer Oxygenasedomäne. Die Reduktasedomänen übertragen Elektronen von NADPH auf Flavinadenindinukleotid (FAD), weiter zu Flavimononukleotid (FMN) und leiten sie zur Oxygenasedomäne weiter. Calmodulin (caM) wirkt dabei als struktureller Faktor, der die autoinhibitorische Gruppe der eNOS neutralisiert. Molekularer Sauerstoff wird in der Häm-Gruppe als Empfänger der Elektronen genutzt. Folgend wird der Sauerstoff reduziert und reagiert mit L-Arginin, wodurch zunächst N $\omega$ -Hydroxy-L-Arginin entsteht. In einem weiteren Schritt wird  $\cdot$ NO abgespalten und es verbleibt L-Citrullin. Tetrahydrobiopterin (BH $_4$ ) ist neben Häm als wichtiger Cofaktor für die Kopplung der Monomere zuständig und direkt an den Elektronentransferprozessen im aktiven Zentrum beteiligt.

Die eNOS ist ein Enzym, das besonders empfindlich auf oxidativen Stress reagiert. Oxidative Prozesse und Substanzen, wie beispielsweise Sauerstoffradikale, beeinträchtigen vor allem den Cofaktor BH $_4$ , der für die Dimerisierung der einzelnen eNOS-Monomere unerlässlich ist. Können sich diese Monomere nicht koppeln, so spricht man von einer Entkopplung der eNOS. Folgend endet die Übertragung der Elektronen beim molekularen Sauerstoff anstatt beim L-Arginin, wodurch das O $_2^{\cdot-}$  gebildet wird (Abb. 2.7). O $_2^{\cdot-}$  selbst hat nun die Möglichkeit weiteres BH $_4$  zu BH $_2$  zu oxidieren und damit weitere eNOS an der strukturell optimalen Dimerisierung zu hindern. Neben diesem Mechanismus kann O $_2^{\cdot-}$  auch direkt mit  $\cdot$ NO zu Peroxynitrit

(ONOO<sup>-</sup>) reagieren, oder Zellen Schädigen. Peroxynitrit selbst ist ebenfalls ein hochreaktives Molekül und kann mit G-Protein-abhängigen und Tyrosinkinase-abhängigen Signalwegen durch Nitrierung und Oxidierung interferieren [53]. So entsteht ein sich selbst verstärkender Kreislauf, der zu einer Verminderung des <sup>•</sup>NO und einer Erhöhung von oxidativem Stress führt [54].

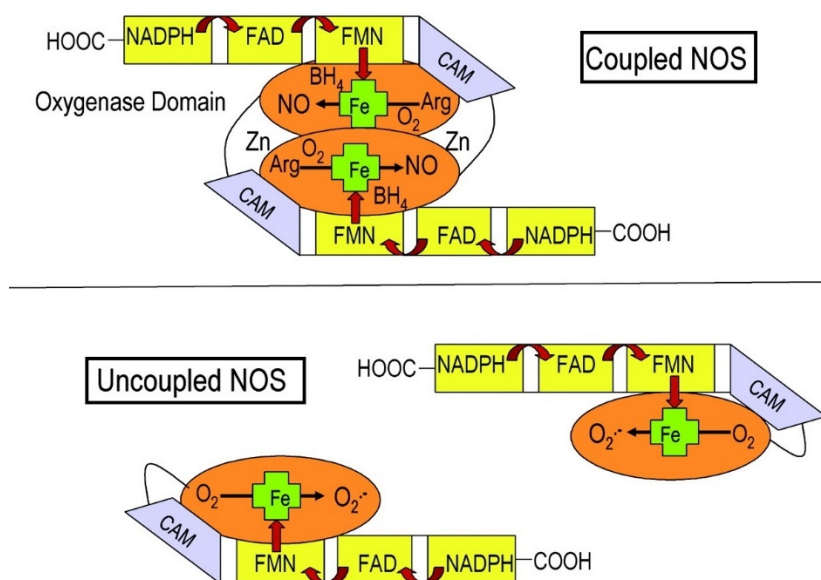


Abb. 2.7 – Schema des Elektronenflusses von gekoppelter und entkoppelter eNOS. Bei der gekoppelten eNOS erfolgt der Elektronenfluss regelrecht und führt zur Bildung von <sup>•</sup>NO. Ist die eNOS entkoppelt, endet die Elektronenübertragung beim Sauerstoff, wodurch das Superoxidradikal O<sub>2</sub><sup>•-</sup> gebildet wird. Schema aus [54].

## 2.4 Feinstaub

### 2.4.1 Ursprung und Zusammensetzung von Feinstaub

Zunächst lässt sich Feinstaub (PM) anhand seiner Partikelgröße einteilen. Bis zu einer Größe von 10 µm im Durchmesser spricht man von „PM<sub>10</sub>“, bis 2,5 µm von „PM<sub>2,5</sub>“ und Partikel mit einer Größe von lediglich 0,1 µm oder kleiner werden als „PM<sub>0,1</sub>“ bezeichnet [8].

Anders als die Einteilung nach der Größe der Partikel, ist die chemische Charakterisierung von Feinstaub nicht so leicht, da er keine homogene Substanz an sich darstellt, sondern ein Gemisch aus Feststoffen, Flüssigkeiten und Gasen ist, die sich in der Luft fein verteilt haben [55][56]. Ein Grund für die Heterogenität des Feinstaubes ist dessen Ursprung. Neben von Menschen geschaffenen Quellen wie Autos, Flugzeugen, Fabriken, Tabakrauch, Heizungen, gedüngten Feldern oder Verbrennungsanlagen (Heizungen in Haushalten) finden sich ebenfalls

Feinstaubquellen natürlichen Ursprungs, wie beispielsweise gelöste Partikel von Böden (Stäube aus Sand und Erde), Waldbrände, tierische Ausscheidungen oder auch Vulkanausbrüche [57].

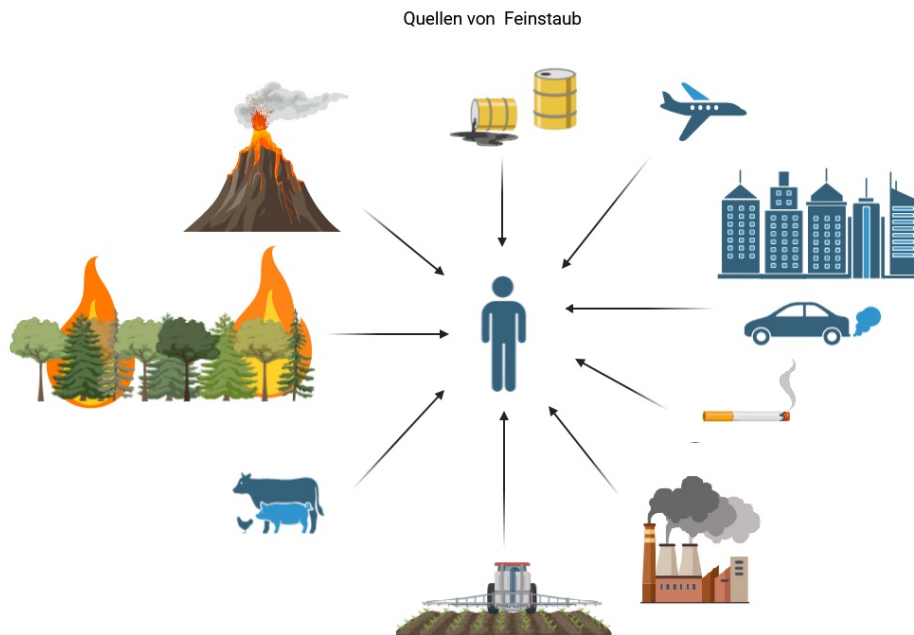


Abb. 2.8 – Überblick über häufige Quellen von Feinstaub. Diese Grafik wurde mit BioRender.com erstellt.

Somit ist die Zusammensetzung stark von der Umgebung und der in ihr vorhandenen Feinstaubquellen abhängig. Dabei gibt es deutliche Unterschiede zwischen Stadt und Land, aber auch innerstädtisch sind Unterschiede zu verzeichnen. Selbst die Jahreszeit, sowie aktuelle Wetterlagen beeinflussen seine Konzentration und Zusammensetzung [58,59]. Die aktuell bedeutsamste Quelle von Feinstaub ist die Nutzung fossiler Brennstoffe. Hierbei wird zunächst direkt Feinstaub freigesetzt, zusätzlich werden durch die Verbrennung gasförmige Bestandteile frei, die ihrerseits mit anderen Stoffen reagieren können und zusätzlich sekundäre Aerosole erzeugen [60]. Auf molekularer Ebene lässt sich feststellen, dass beispielsweise  $PM_{2.5}$  zu 30%-50% aus wasserlöslichen anorganischen Ionen wie Natrium ( $Na^+$ ), Kalium ( $K^+$ ), Nitrat ( $NO_3^-$ ), Calcium ( $Ca^{2+}$ ), Magnesium ( $Mg^{2+}$ ), Chlor ( $Cl^-$ ), Fluor ( $F^-$ ) und Brom ( $Br^-$ ) besteht. Ebenfalls finden sich Sulfat ( $SO_4^{2-}$ ) und Ammonium ( $NH_4^+$ ) in ambienten Feinstäuben [61]. Weitere Bestandteile sind Schwefeldioxid ( $SO_2$ ), Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ), Kohlenstoffmonoxid (CO), Arsen (As), die Schwermetalle wie Cadmium (Cd), Blei (Pb) und Nickel (Ni), sowie redox-aktive Übergangsmetalle wie Eisen (Fe) und Kupfer (Cu), die vor allem zur Bildung von  $\cdot OH$  Radikalen (durch die Fenton Reaktion) nach Aufnahme in den Organismus beitragen. Polyzyklische aromatische

Kohlenwasserstoffe (PAK) und Ozon ( $O_3$ ) finden sich ebenfalls. Diese Stoffe sind besonders aus gesundheitlicher Perspektive bedeutsam. Ebenfalls relevant für Feinstaub und seine biologisch-chemischen Eigenschaften ist seine Veränderung über die Zeit, die auch als Alterung, englisch = „aging“, bezeichnet wird. Dieser Begriff beschreibt die chemischen Modifikationen, die Feinstaub mit der Zeit in der Atmosphäre oder generell in der Umwelt durchläuft und dadurch auch seine Eigenschaften verändert. Beispielsweise wurde beobachtet, dass mit der Zeit durch die Reaktion mit reaktiven Gasen wie Stickstoffdioxid oder Ozon auf der Oberfläche der Partikel reaktive Kohlenwasserstoffverbindungen entstehen, was wiederum die chemischen Eigenschaften und Gesundheitsauswirkungen des Feinstaubes verändert [55]. Auch hochenergetische UV-Strahlung in den höheren Schichten der Atmosphäre können die Oberflächenmoleküle der Partikel verändern und ihre Reaktivität und damit gesundheitsschädliche Wirkung erhöhen. Die Beladung der Partikel mit Pyrogenen aus Pilzen oder bakteriellen Endotoxinen während ihres Aufenthalts in der Umwelt erhöhen ebenfalls die biologische Toxizität der Partikel [62].

Die Art und Zusammensetzung des Feinstaubes, dem wir gegenüber exponiert sind, hängt zwar stark von lokalen Quellen ab, jedoch wurde für  $PM_{2,5}$  bereits gezeigt, dass sich dieser innerhalb weniger Tage über eine Distanz von 2.000 km ausbreiten kann. Somit können lokale Quellen auch einen deutlich weitreichenderen Einfluss auf die Feinstaubbelastung haben [63]. Regelmäßig werden Schwermetall-belastete Partikel aus Südostasien an der US-amerikanischen Westküste gemessen.

#### **2.4.2 Gesetzliche Regulierungen**

Bereits seit den 1980er Jahren werden in der EU Richtlinien für eine Verbesserung der Luftqualität erarbeitet und deren Umsetzung überwacht [64]. In Deutschland wird dafür durch Messstationen flächendeckend die Belastung durch Feinstaubpartikel erfasst. Bis zum Jahr 2008 wurde dies durch Messungen von  $PM_{10}$ , seitdem zusätzlich auch durch die Erfassung von  $PM_{2,5}$  realisiert. Im Trend ist hierbei zu erkennen, dass sich die mittlere Konzentration von  $PM_{10}$  seitdem bereits deutlich verringert hat (Abb.2.9) [65].

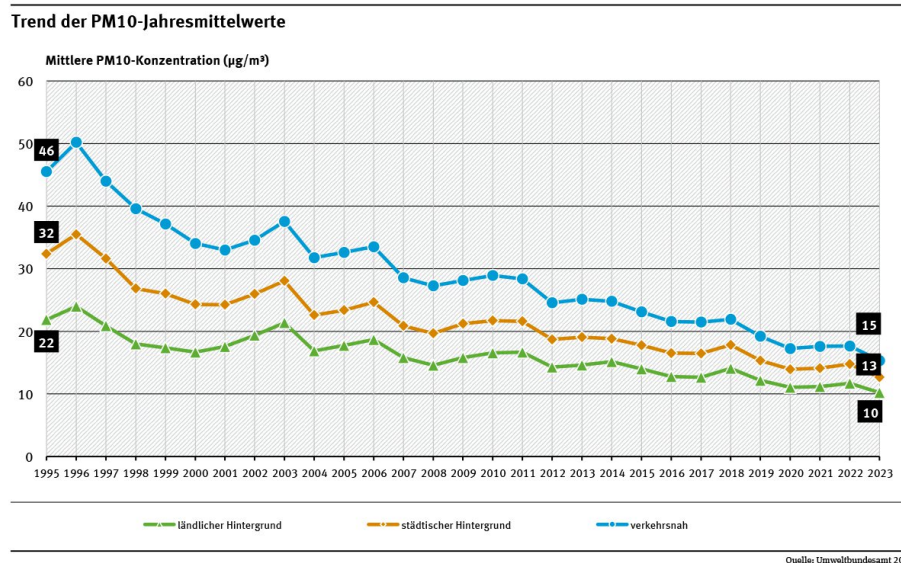


Abb.2.9 – Trend der Jahresmittelwerte von  $\text{PM}_{10}$  in Deutschland von 1995-2023, gemessen in  $\mu\text{g}/\text{m}^3$ . Es werden Messungen im ländlichen Raum (grün), städtischen Hintergrund (orange) und verkehrsnahe Messungsdaten (blau) unterschieden. Die Grafik wurde der Website des Umweltbundesamtes entnommen [65].

Neben den Feinstaubpartikeln  $\text{PM}_{10}$  und  $\text{PM}_{2,5}$  werden weiterhin die Schadstoffe Blei (Pb), Kohlenstoffmonoxid (CO), Benzol als Stammverbindung aromatischer Kohlenwasserstoffe ( $\text{C}_6\text{H}_6$ ), Ozon ( $\text{O}_3$ ), Arsen (As), Cadmium (Cd) und Nickel (Ni) gemessen.

Die Standards der EU und die Richtlinien der WHO zeigten dabei bislang eine deutliche Diskrepanz der Schwellenwerte. Demnach war nach EU-Richtlinien die städtische Bevölkerung in 2022 zu 9% einer Überexposition von  $\text{PM}_{10}$  ausgesetzt, während es laut den Richtlinien der WHO 83% der Menschen waren. Bei  $\text{PM}_{2,5}$  fällt der Unterschied noch drastischer aus. Laut EU-Standards waren hier <1% der Menschen überexponiert, die WHO spricht dagegen von 96% (Abb. 2.10) [66]. Dies liegt vor allem an den unterschiedlichen Grenzwerten, die nachfolgend erläutert werden.



Abb. 2.10 - Belastung über EU-Grenzwerten: Die städtische Bevölkerung der EU ist an mehr als 35 Tagen im Jahr PM<sub>2,5</sub>-Konzentrationen von über 25 µg/m<sup>3</sup> pro Jahr und PM<sub>10</sub>-Konzentrationen von über 50 µg/m<sup>3</sup> pro Tag ausgesetzt. Belastung über den WHO-Richtlinien: Die städtische Bevölkerung der EU ist jährlichen PM<sub>2,5</sub>-Konzentrationen über 5 µg/m<sup>3</sup> und jährlichen PM<sub>10</sub>-Konzentrationen über 15 µg/m<sup>3</sup> ausgesetzt. Abbildung entnommen aus [66].

Erklärbar sind diese deutlichen Unterschiede dadurch, dass die WHO mit ihren Richtlinien keine rechtlich verbindlichen Gesetze verabschiedet, sondern vielmehr Empfehlungen ausspricht, die einen hohen Standard darstellen, an dem sich die Nationen mit ihren Gesetzen orientieren sollten. Das eine Reduktion der Feinstaubwerte deutliche Auswirkungen auf die Gesundheit und Lebenserwartung hat, wurde bereits in einer amerikanischen Studie gezeigt, nach der eine Senkung der PM<sub>2,5</sub>-Werte um 10 µg/m<sup>3</sup> eine Verlängerung der Lebenserwartung um durchschnittlich 0,35 Jahre bewirkt [67].

Um dieser Diskrepanz entgegenzuwirken wurden am 10.12.2024 neue EU-Richtlinien festgelegt, die eine schrittweise Verbesserung der Luftqualität bis 2030 als Ziel haben. Hierbei wurden die erlaubten Grenzwerte von PM<sub>10</sub>, PM<sub>2,5</sub>, NO<sub>2</sub>, SO<sub>2</sub>, O<sub>3</sub>, CO, Benzol, Benzo(a)pyren, Arsen, Cadmium, Nickel und Blei angepasst. Für den dabei besonders relevanten Wert PM<sub>2,5</sub> werden beispielsweise die erlaubten jährlichen Grenzwerte von aktuell 25 µg/m<sup>3</sup> im Mittel pro Jahr auf 10 µg/m<sup>3</sup> gesenkt und damit mehr als halbiert, für PM<sub>10</sub> wurden die Grenzwerte von aktuell 40 µg/m<sup>3</sup> im Mittel pro Jahr auf 20 µg/m<sup>3</sup> gesenkt. Zudem soll sichergestellt werden, dass, im Falle einer Verletzung der Luftqualitätsvorschriften, Geschädigte einen Anspruch auf Entschädigung haben („polluter liability“) [68]. Interessant ist, dass bislang nur Richtwerte für PM<sub>10</sub> und PM<sub>2,5</sub> festgelegt wurden. PM<sub>0,1</sub> wurde bislang in gesetzlichen Regulierungen nicht berücksichtigt, was zum größten Teil an mangelnden Standards seiner Messung liegt, obwohl es bereits zahlreiche Hinweise auf seine besonders hohe Toxizität gibt [8,11,69].

### 2.4.3 Einfluss von Feinstaub auf die Gesundheit

Der schädigende Einfluss von Feinstaub auf die Gesundheit ist bereits lange bekannt. Während jedoch aus den 80-er Jahren jährlich noch unter 10 neue Publikationen auf Pubmed zu finden sind, so ist deren Zahl stetig steigend und seit den 2020-er Jahren sind es über 1.000 wissenschaftliche Artikel pro Jahr zum Suchbegriff „particulate matter impact on health“. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Untersuchung der Gewebe von Lunge, Herz und Kortex auf Feinstaubpartikel (Nano- und Mikrometer Durchmesser) und seine Auswirkungen auf die Gesundheit, weshalb neben epidemiologischen Daten ein Fokus auf Erkrankungen dieser Organe gelegt wird.

#### 2.4.3.1 Auswirkungen von Feinstaub aus globaler Perspektive

Die Abkürzung „DALY“ steht für „Disability-adjusted life years“ und ist ein Werkzeug, um verlorene Lebensjahre zu messen. Dabei zählen die verlorenen Jahre durch vorzeitigen Tod, als auch verlorene Jahre durch Krankheitsbelastung mit schweren Einschränkungen oder Behinderung bis zum Tod oder der Genesung [70]. DALYs werden oft verwendet, um den Einfluss von Krankheiten oder Risikofaktoren zu ermitteln.

In der Global Burden of Disease-Studie von 2021 wurden die häufigsten Risikofaktoren ermittelt, die zu DALYs beitragen und deren Entwicklung beobachtet. Fasst man die Feinstaubbelastung der Umwelt und der Innenräume zusammen, so zeigt sich, dass im Jahr 2000 der Feinstaub mit einem Beitrag von 10,6% auf Platz 1 der Ursachen für DALYs steht. Im Jahr 2021 hat sich sein Beitrag zwar um 2,6% auf 8% verringert, jedoch belegt er immer noch Platz 1 der Ursachen für verlorene Lebensjahre durch Krankheit, Behinderung oder Tod (Abb. 2.11) [4].

Leading risks 2000	Percentage of total DALYs, 2000	Leading risks 2021	95% UI for Ranking	Percentage of total DALYs, 2021	Percentage change in number of DALYs, 2000-2021	Percentage change in age-standardised rate of DALYs, 2000-2021
1 Particulate matter pollution	10.6 (8.5 to 12.3)	1 Particulate matter pollution	(1 to 2)	8.0 (6.7 to 9.4)	-17.2 (-25.9 to -6.2)	-41.9 (-47.2 to -35.6)
2 Child growth failure	9.3 (6.4 to 11.1)	2 High systolic blood pressure	(1 to 2)	7.8 (6.4 to 9.2)	34.3 (26.7 to 42.3)	-24.3 (-28.4 to -20.0)
3 Low birthweight and short gestation	8.9 (8.3 to 9.6)	3 Smoking	(3 to 6)	5.7 (4.7 to 6.8)	10.8 (3.2 to 19.9)	-34.8 (-39.2 to -29.7)
4 High systolic blood pressure	6.3 (5.2 to 7.4)	4 Low birthweight and short gestation	(3 to 6)	5.6 (4.8 to 6.3)	-32.4 (-41.2 to -22.3)	-33.0 (-41.6 to -22.8)
5 Smoking	5.6 (4.7 to 6.5)	5 High fasting plasma glucose	(3 to 6)	5.4 (4.8 to 6.0)	88.2 (80.5 to 96.4)	7.9 (3.3 to 12.9)
6 Unsafe water source	4.0 (2.3 to 5.2)	6 High body-mass index	(3 to 10)	4.5 (1.9 to 6.8)	96.5 (87.1 to 105.8)	15.7 (9.9 to 21.7)
7 Unsafe sanitation	3.3 (2.7 to 3.9)	7 High LDL cholesterol	(7 to 10)	3.0 (1.9 to 4.2)	27.0 (20.8 to 33.6)	-26.1 (-29.6 to -22.4)
8 High fasting plasma glucose	3.1 (2.8 to 3.5)	8 Kidney dysfunction	(6 to 10)	3.0 (2.6 to 3.4)	49.5 (42.7 to 57.0)	-12.4 (-16.5 to -7.9)
9 High LDL cholesterol	2.6 (1.6 to 3.6)	9 Child growth failure	(6 to 14)	2.6 (1.4 to 3.5)	-69.8 (-77.5 to -62.4)	-71.5 (-78.8 to -64.4)
10 Unsafe sex	2.6 (2.1 to 3.2)	10 High alcohol use	(7 to 11)	2.5 (2.1 to 3.1)	12.4 (2.6 to 20.9)	-25.8 (-32.0 to -20.4)

■ Environmental and occupational risks  
■ Behavioural risks  
■ Metabolic risks

Abb. 2.11 – Entwicklung der häufigsten Ursachen für DALYs über alle Altersgruppen von 2000-2021. Die anrechenbare Belastung durch Feinstaub ist hier rot umrandet. Abbildung entnommen und bearbeitet von [4].

Diese Zahlen geben zwar einen guten Anhaltspunkt für die Gesamtlast der Luftverschmutzung, spiegeln jedoch keine räumlichen Unterschiede aus globaler Perspektive wider. Dabei zeigen sich hier deutliche regionale Unterschiede und der Einfluss von ökonomischen Ungleichgewichten zwischen einzelnen Staaten. So trägt die Luftverschmutzung in Westeuropa und im amerikanischen Raum zu zwischen <670 bis <1546 DALYS pro 100.000 Einwohnern bei, im zentralafrikanischen und südasiatischen Raum führt sie jedoch zu einem Verlust von bis zu > 6332 gesunden Lebensjahren pro 100.000 Einwohnern. (Abb. 2.12) [4].

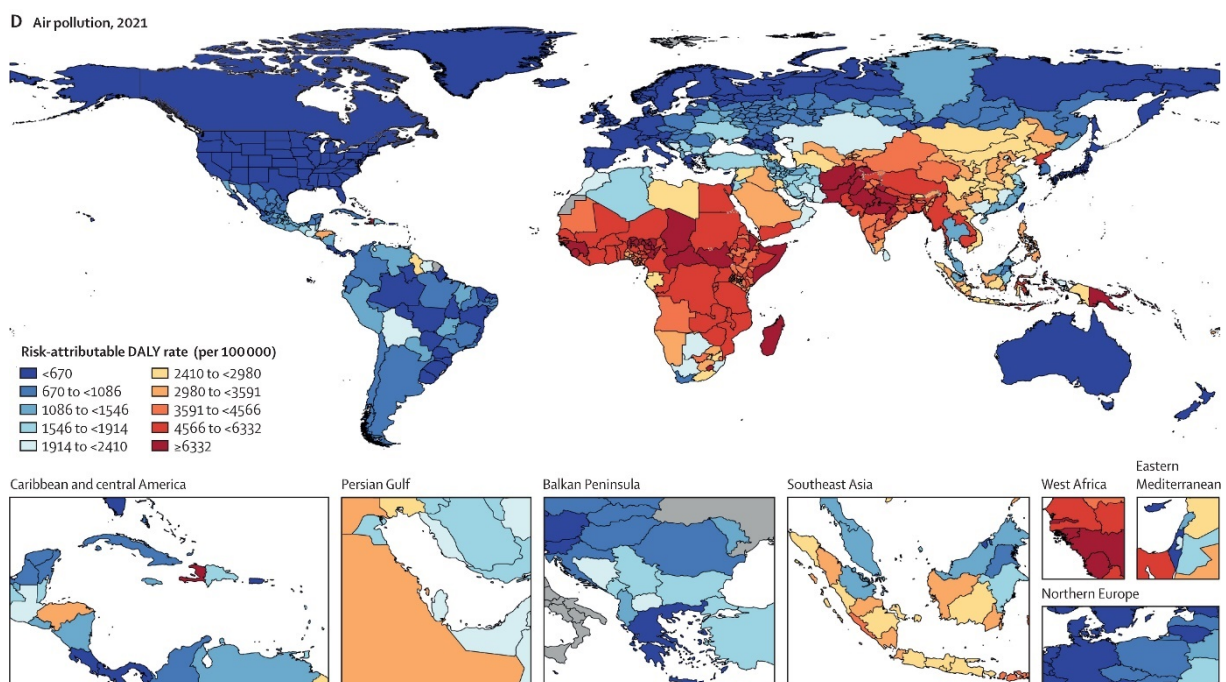


Abb. 2.12 – Abbildung über die weltweiten DALYs, die auf Luftverschmutzung zurückzuführen sind. Hierbei zeigen sich regional deutliche Unterschiede. Abbildung modifiziert aus [4].

#### 2.4.3.2 Organspezifische Auswirkungen von Feinstaub

Die Haupteintrittspforten für Feinstaub in den Organismus sind Mund und Nase. Hier wird der Feinstaub mit der Luft eingeatmet und gelangt durch den Rachen über die Trachea schließlich in die Lunge. Auf diesem Weg werden die meisten Partikel mit einer Größe >10 µm bereits vor Erreichen der Bronchiolen durch Flimmerhärchen und Schleim aufgehalten, gebunden und durch Husten oder Niesen ausgestoßen. Kleinere Partikel mit einer Größe zwischen PM<sub>10</sub> bis PM<sub>2.5</sub> gelangen bis in die Bronchien und PM<sub>2.5</sub> gelangt bis in die Alveolen [71]. Die aller kleinsten Partikel, die einen Teil der Fraktion PM<sub>0.1</sub> darstellen, besitzen sogar die Fähigkeit, die Luft-Blut-Schranke zu überwinden und Schäden an weiteren Organen zu verursachen.

#### **2.4.3.2.1 Auswirkungen auf das pulmonale System**

Wie einleitend bereits beschrieben, haben Partikel der Größe bis  $2,5\mu\text{m}$  die Fähigkeit, bis in die Alveolen vorzudringen. Dort lagern sie sich zunächst ab und können die Wände der Alveolen reizen und damit deren Funktion beeinträchtigen [72]. Die Partikel erhöhen hauptsächlich durch direkte und indirekte Generierung von ROS und den Shift von Alveolarmakrophagen zu einem inflammatorischen Typ die alveoläre Freisetzung von Interleukinen (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18), sowie TNF $\alpha$  und NF- $\kappa$ B [73–76]. Dieser Transkriptionsfaktor reguliert ebenfalls die Immunantwort nach oben [77,78]. Diese Entzündungsreaktion kann chronifizieren und zur Entwicklung von Asthma, sowie COPD beitragen [79,80]. Zudem führt Inflammation zu einem Umbau des alveolären Gewebes, was als Remodeling oder Fibrosierung bezeichnet wird [81]. Hierbei werden die Pneumozyten durch Bindegewebe und Kollagenfasern ersetzt, die nicht suffizient am Gasaustausch teilnehmen können. Messbar ist eine Einschränkung der Lungenfunktion durch eine Verminderung des Tiffeneau-Index ( $\text{FEV}_1/\text{FVC}$ ), der sich in einer Studie an 20 jungen und gesunden Erwachsenen bereits eine Stunde nach Exposition gegenüber  $\text{PM}_{2.5}$  als vermindert darstellte. Eine Erhöhung des systemischen Entzündungsmarkers CRP wurde hier ebenfalls gemessen [82]. Diese Messungen passen zu den Beobachtungen, dass alveoläre Makrophagen eine sehr hohe Potenz in der Bildung von inflammatorischen Mediatoren aufweisen, die nicht nur lokal, sondern auch systemisch messbar sind [83]. Zudem wird eine pulmonale Neuinfektion durch  $\text{PM}_{2.5}$  begünstigt, als auch bereits bestehende pulmonale Erkrankungen wie COPD verstärkt [84,85]. Ebenfalls die Entwicklung von Lungenkrebs durch Feinstaub in der Umwelt wurde bereits beschrieben. Die Global Burden of Disease-Studie spricht von 19% aller Fälle von Lungenkrebs, die aufgrund von Luftverschmutzung entstehen [86]. In einer Metaanalyse von 18 Studien wurde ein Zusammenhang von  $\text{PM}_{2.5}$  aus der Luft und der Entwicklung von Lungenkrebs festgestellt (relatives Risiko: 1.09 (95% CI: 1.04, 1.14)). Auch für größere Partikel der Klasse  $\text{PM}_{10}$ , die meist nicht bis in die Alveolen vordringen wurde ein erhöhtes, sogar ähnliches Krebsrisiko ermittelt (relatives Risiko: 1.08 (95% CI: 1.00, 1.17)) [87]. Ursächlich für die Entwicklung von Krebs können feinstaubinduzierte epigenetische Veränderungen sein [88], oder die direkte kanzerogene Wirkung von Stoffen, die dem Feinstaub aufgelagert sind. Besonders sind hier die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe und Schwermetalle zu nennen [89].

### 2.4.3.2.2 Auswirkungen auf das kardiovaskuläre System

Die schädigenden Mechanismen des Feinstaubes und reaktiver Gase aus der Luft werden als Übersicht in Abb. 2.13 dargestellt. Hierbei wird dem oxidativen Stress, wie er in Abschnitt 2.1 beschrieben wird, eine pathophysiologisch vordergründige Bedeutung zugesprochen. Er generiert ROS, sorgt für die Entkopplung der eNOS und reagiert direkt mit  $\cdot\text{NO}$ , wodurch weiterer oxidativer Stress generiert wird und die Relaxationsfähigkeit der Gefäße abnimmt (siehe Abschnitt 2.3). Zudem werden proinflammatorische und prothrombotische Prozesse gefördert [90]. ROS oxidieren zudem Enzyme, die normalerweise Funktionen in der Atmungskette der Mitochondrien haben. Durch deren Funktionsverlust wird somit die Funktion der mitochondrialen Atmungskette beeinträchtigt und die zelluläre ATP-Gewinnung vermindert [91].

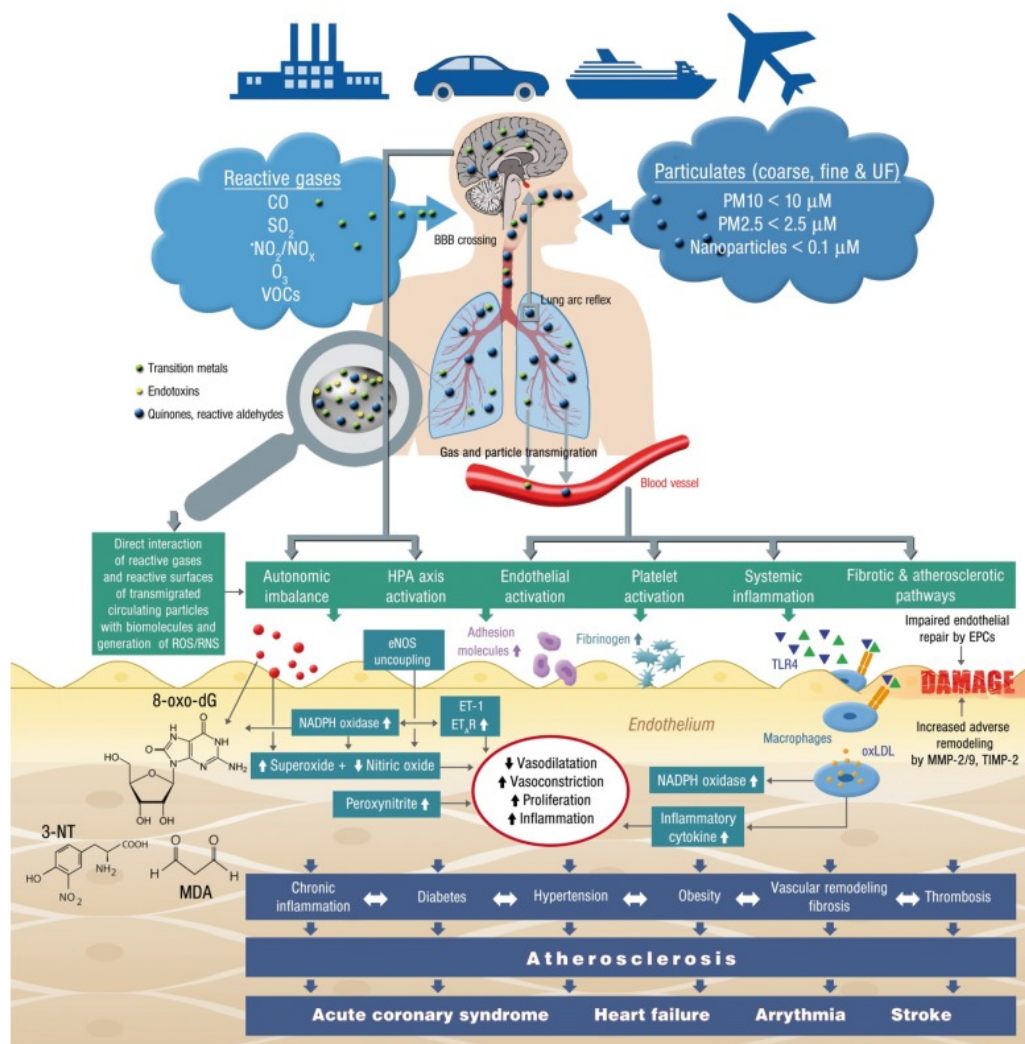


Abb.2.13 – Schematische Darstellung der pathophysiologischen Mechanismen und Auswirkungen von Feinstaub und reaktiven Gasen auf Lunge, Gehirn und das kardiovaskuläre System – Abbildung aus [92].

Die Folgen der geschädigten Endothelfunktion begünstigen die Entstehung von Herz-Kreislauf-Erkrankungen wie Arteriosklerose, Hypertonie und Koronare Herzkrankheit. Folgen können ischämische Schlaganfälle, das Akute Koronarsyndrom, Arrhythmien und Herzinsuffizienz sein. Auch die Entstehung von Diabetes mellitus II wird gefördert [93]. Epidemiologische Daten untermauern diese Kausalitäten. Analysen der Daten von 53 Millionen Amerikanern im Medicare-Programm zeigten für  $PM_{2.5}$  pro Erhöhung um  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  im Jahresdurchschnitt eine gesteigerte kardiovaskuläre Mortalität von 8,8% (RR = 1,088; CI = 1.078, 1.098) und Mortalität aus respiratorischer Ursache von 5,6% (RR = 1.056; CI = 1.038, 1.074) [94]. Auch für den akuten Einfluss von  $PM_{2.5}$  gibt es Daten aus dieser Studie. Dafür wurden die täglichen Schwankungen der  $PM_{2.5}$ -Werte mit den Krankenhausaufenthalten wegen kardiovaskulärer Ursache verglichen. Hier zeigte sich für einen Anstieg von  $PM_{2.5}$  um  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  ein statistisch signifikanter Anstieg der Krankenhausaufenthalte um 0,63% (95% PI: 0.38, 0.88) [95]. Das ELAPSE Project beschäftigt sich mit der europäischen Morbidität und Mortalität durch Feinstaubexposition in niedrigem Konzentrationsbereich. Hier wurde für 325.000 Menschen eine  $PM_{2.5}$ -assoziierte HR von 1.135 (CI = 1.095, 1.176) für kardiovaskuläre Erkrankungen ermittelt. Die HR für ischämische Herzerkrankungen betrug 1.111 (CI = 1.056, 1.169) und für cerebrovaskuläre Erkrankungen wurde eine HR von 1.128 (CI = 1.048, 1.214) festgestellt [96]. Eine weitere europäische Kohortenstudie, ESCAPE, beschäftigt sich mit den langfristigen Auswirkungen der Luftverschmutzung. Hier konnte in einer 14-jährigen Nachverfolgung von 370.000 Teilnehmern festgestellt werden, dass ein Zusammenhang zwischen einem Anstieg von  $PM_{2.5}$  um  $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$  und der Gesamtmortalität besteht (HR = 1.14 (CI = 1.04, 1.26)) [97].

**2.4.3.2.3 Auswirkungen auf das zentrale Nervensystem und Hirnstrukturen** Die Fraktion der Nanopartikel im Feinstaub ist nicht nur in der Lage, die Luft-Blut-Schranke der Alveolen zu überwinden und so in den Blutkreislauf zu gelangen, sondern vermag es ebenso die Bluthirnschranke zu durchdringen und ihre Funktion zu beeinträchtigen [98,99]. Neben dem humoralen Weg ins Gehirn wurde ebenfalls beschrieben, dass Feinstaub durch mukosale Ablagerung in der Nase entlang des N. olfactorius bis in den Bulbus olfactorius wandert und sich vor dort in den Cortex,

Hippocampus, das Cerebellum und den Hirnstamm verteilt [100]. Die Wege des Feinstaubs sind schematisch in Abb. 2.14 dargestellt.

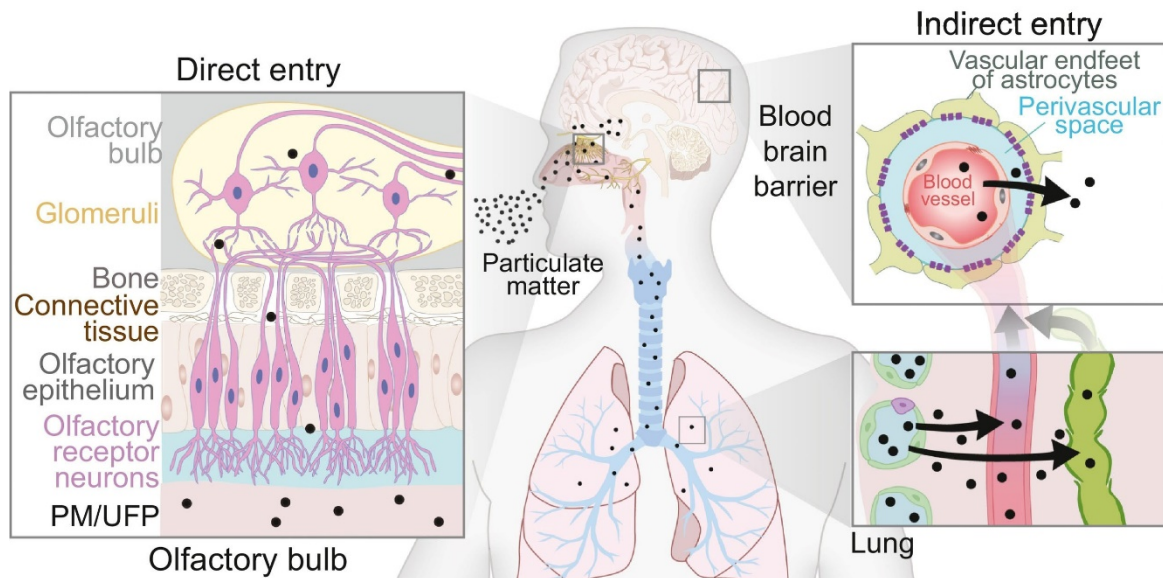


Abb. 2.14 – Wege des Feinstaubs in das Gehirn. Neben der humoralen Aufnahme über die Bluthirnschranke wird ebenfalls eine Migration der Partikel entlang olfaktorischer Neurone in den Bulbus olfactorius und weiter in das Hirn dargestellt. Abbildung modifiziert aus [101].

Ein Kennzeichen neurodegenerativer Erkrankungen ist die Bildung und Ablagerung von Proteinkomplexen im Gehirn [102]. Inflammation verstärkt die Bildung dieser Proteinkomplexe und ist somit oft an neurodegenerativen Prozessen beteiligt [103,104]. Ebenfalls wurde bereits in vielen Studien gezeigt, dass oxidativer Stress und Prozesse der Inflammation eng miteinander verknüpft sind [90,105]. Tritt Feinstaub über die Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn über, aktiviert er das neuronale Immunsystem, wodurch große Mengen an ROS gebildet werden, die oxidativen Stress verursachen und neuronale Inflammation fördern. Die Nanopartikel können zudem an andere Strukturen wie Neurotransmitter oder metabolische Abfallprodukte binden und so deren Löslichkeit und weitere Prozessierung verändern, was in Ablagerungen dieser Komplexe resultiert [106]. Die Fibrillisierung und Ablagerung von  $\alpha$ -Synuclein ist ein pathophysiologisches Merkmal der Parkinsonerkrankung. Epidemiologische Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen der Exposition von  $PM_{2.5}$  und dem Auftreten, sowie der Verschlechterung der Parkinsonerkrankung gezeigt [107,108]. Im Zellmodell konnte  $PM_{2.5}$  als ein Auslöser dieser Prozesse identifiziert werden [109]. Ein Hauptauslöser für Morbus Alzheimer ist die Ablagerung von Beta-Amyloid ( $A\beta$ ) im Gehirn. In einer Querschnittsstudie von 18.000 durchschnittlich 76-jährigen Erwachsenen wurde ein Amyloid-PET durchgeführt, um Hinweise auf die Akkumulation von neuronalem  $A\beta$  zu erhalten. Die Daten zeigten eine Korrelation

zwischen der Höhe der jährlichen  $PM_{2.5}$ -Exposition und der Menge an abgelagertem Aß [110]. Eine amerikanische Langzeitstudie wertete die Daten von 10 Millionen Patienten aus und ergab, dass ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Exposition gegenüber  $PM_{2.5}$  und dem Auftreten verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen besteht. Für die Erhöhung der jährlichen durchschnittlichen  $PM_{2.5}$ -Konzentration um  $1\text{-}\mu\text{g}/\text{m}^3$  ergab sich für das Neuauftreten von Demenz eine HR von 1.08 (95% CI: 1.05, 1.11), für Alzheimer eine HR von 1.15 (95% CI: 1.11, 1.19) und für Parkinson von 1.08 (95% CI: 1.04, 1.12) [111]. Eine weitere amerikanische Kohortenstudie zeigte für die Erhöhung der jährlichen  $PM_{2.5}$ -Konzentration um  $5\text{ }\mu\text{g}/\text{m}^3$  für das Neuauftreten von Alzheimer eine HR von 1.13 (CI: 1.12-1.14) und für Parkinson von ebenfalls 1.13 (CI:1.12-1.14) [112].

#### **2.4.3.3 Unterschiede zwischen $PM_{2.5}$ und $PM_{0.2}$**

In dieser Arbeit wurden die Versuchstiere entweder  $PM_{2.5}$  oder  $PM_{0.2}$  ausgesetzt, um einen möglichen Unterschied in deren räumlicher Verteilung und/oder Toxizität zu untersuchen. Auffällig ist, dass sich die meisten Studien, vor allem epidemiologische Untersuchungen, bislang auf  $PM_{10}$  und besonders auf  $PM_{2.5}$  fokussieren. Nanopartikel wie  $PM_{0.1}$  als einzelne Fraktion an sich ist bislang deutlich unterrepräsentiert. Dabei ist natürlich wichtig zu erinnern, dass  $PM_{0.1}$  einen Teil von  $PM_{2.5}$  darstellt und die dort ermittelten Risiken und Folgen der Feinstaubexposition auch der Fraktion  $PM_{0.1}$  zuzusprechen sind. Begründet liegt dies darin, dass  $PM_{0.1}$  zwar technisch gemessen werden kann, es jedoch noch keine internationalen Standards gibt [113]. Normalerweise wird Feinstaub nach der Größe im Durchmesser gefiltert und in  $\mu\text{g}/\text{m}^3$  die Masse ermittelt. Diese Art der Messung bestimmt somit das Gewicht, wozu Nanopartikel im Vergleich zu ihrer Anzahl nur einen kleinen Beitrag leisten. Dabei ist bei gleicher Masse ihre Anzahl 15.625-mal größer. Die Oberfläche ist 25-mal größer und bietet somit mehr Fläche für die Anlagerung toxischer Substanzen (Abb. 2.15).

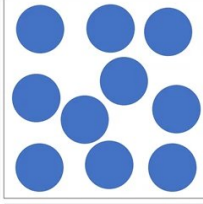
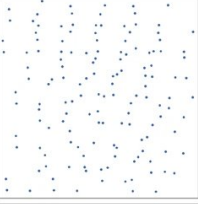
	2.5 $\mu\text{m}$ (Fine)	0.1 $\mu\text{m}$ (Ultrafine)
		
<b>Total mass</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Particle number</b>	<b>64</b>	<b>1,000,000</b>
<b>Surface area per particle</b>	<b>0.0625</b>	<b>0.0001</b>
<b>Total surface area per mass</b>	<b>4</b>	<b>100</b>
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reaches peripheral airway</li> <li>• Cannot enter systemic circulation</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Higher adsorbed toxic material on surface</li> <li>• May enter systemic circulation</li> </ul>

Abb. 2.15 – Vergleich von  $\text{PM}_{2.5}$  (Fine) und  $\text{PM}_{0.1}$  (Ultrafine). Bei gleicher Masse ist die Anzahl der  $\text{PM}_{0.1}$  15.625-mal größer, die gesamte Oberfläche 25-mal größer als die von  $\text{PM}_{2.5}$  – Grafik modifiziert aus [8].

$\text{PM}_{0.1}$  hat zudem im Gegensatz zu  $\text{PM}_{2.5}$  die Fähigkeit, die Luft-Blut-Schranke zu überwinden und über das Blut und Makrophagen weitere Organe direkt zu erreichen, sogar die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden und dort schädigende Effekte zu induzieren [8,11,12,98]. Mikropartikel entfalten ihr schädigendes Potential eher in der Lunge und lösen hier eine systemische Inflammation aus [82]. Eine Studie aus Mexiko-Stadt konnte in Hirnproben von Hunden vor allem kleine Partikel der Größen 16–36 nm nachweisen [114]. Eine Tierstudie mit Ratten zeigte beispielsweise, dass kleinere Partikel sich eher in Organen wie Herz, Leber, Niere und Lunge ablagern und dort toxischere Effekte aufweisen, als Partikel  $> 1\mu\text{m}$  [115]. Ein Vergleich der Zytotoxizität von  $\text{PM}_{0.1}$  und  $\text{PM}_{2.5}$  zeigte für  $\text{PM}_{0.1}$  bereits bei geringerer Konzentration eine Veränderung im mitochondrialen Metabolismus und DNA-Schädigung [116]. Eine deutsche Studie erhob Daten über den Zusammenhang von Partikelzahl, Massenkonzentration und die Sterblichkeit durch kardio-pulmonale Ursachen. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Zahl an  $\text{PM}_{0.1}$  mit einer erhöhten kardiovaskulären Sterblichkeit einherging (RR=1.031, 95% CI: 1.003-1.060). Für  $\text{PM}_{2.5}$  wurde dies nicht statistisch signifikant nachgewiesen. Gezeigt wurde hier unter anderem auch, dass die Effekte durch  $\text{PM}_{0.1}$  nicht unmittelbar, sondern zeitlich versetzt auftreten [117]. Eine chinesische Studie stellte für  $\text{PM}_{0.1}$  fest, dass diese umso mehr zu erhöhter kardiovaskulärer Mortalität beitragen, je kleiner sie sind. Zu Mortalität aus pulmonaler Ursache wurde für  $\text{PM}_{0.1}$  kein Zusammenhang festgestellt [118]. Eine dänische Studie konnte für  $\text{PM}_{0.1}$  eine positive Korrelation mit kardiovaskulärer

Mortalität nachweisen, während kein Zusammenhang zwischen  $PM_{0.1}$  und respiratorischer Mortalität zu erkennen war (Abb. 2.16) [119].

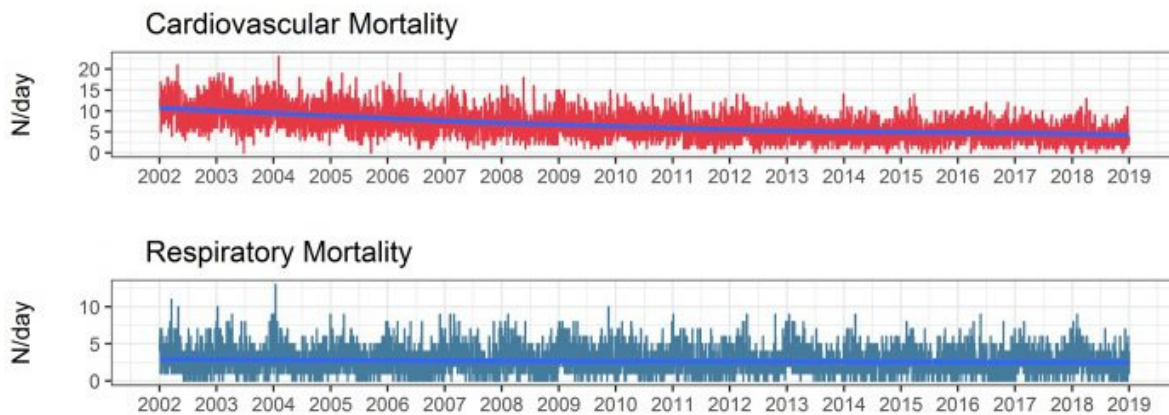


Abb.2.16 – Korrelation der Konzentration von  $PM_{0.1}$  in der Luft mit kardiovaskulärer und respiratorischer Mortalität. Die Konzentration von  $PM_{0.1}$  wird als blaue Linie horizontal dargestellt, während die Ereignisse senkrecht als rot (kardial, oben) oder blau (respiratorisch, unten) illustriert werden. Darstellung modifiziert aus [119].

In einer bislang einzigartigen niederländischen Kohortenstudie wurden über 1 Jahr Konzentrationen von  $PM_{0.1}$  in der Luft gemessen und mit den räumlich korrelierenden Messwerten von  $PM_{2.5}$  bezüglich des Auftretens kardiovaskulärer Erkrankungen verglichen. Es zeigte sich, dass eine Erhöhung der Menge an  $PM_{0.1}$  um  $10.000/cm^3$  zu einem gehäuftem Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen führte (HR 1.18 (95% CI: 1.03, 1.34)), während bei einer Erhöhung der Konzentration von  $PM_{2.5}$  um  $5 \mu g/m^3$  kein Anstieg zu verzeichnen war [120]. Dieses anrechenbare Risiko für  $PM_{0.1}$  wurde in Kuntic et al. mit globalen Expositionsdaten verknüpft. Bei Annahme ihrer Repräsentanz für die EU-Bevölkerung sind demnach jährlich ca. 419.000 kardiovaskuläre Erkrankung der Exposition gegenüber der Fraktion der  $PM_{0.1}$  im Feinstaub zuzuschreiben [121]. Allerdings sind nicht alle Ergebnisse eindeutig. Eine deutsche Studie verglich die täglichen Partikelkonzentrationen in drei Städten unter anderem mit den neuen Krankenhausaufenthalten aus kardialen und respiratorischen Ursachen. Hier konnte für die Erhöhung der Konzentration von  $PM_{0.1}$  in der Luft ein zeitlich verzögerter Anstieg von Atemwegserkrankungen, allerdings nur andeutungsweise ein Anstieg kardialer Krankenhausaufenthalte ermittelt werden. Dagegen zeigte der Anstieg von  $PM_{2.5}$  die deutlichste Korrelation mit neu auftretenden kardiorespiratorischen Ereignissen [122].

#### **2.4.3.3.1 Weitere Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit**

Neben den in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnissen der Organuntersuchungen, wurden Ringe der Aorten der gleichen Versuchstiere auf vaskuläre Funktionseinschränkungen hin untersucht. Die hier verwendeten synthetischen Mikro- und Nanopartikel (SPM) werden in ihrer Zusammensetzung in Abschnitt 3.1 beschrieben. Der systolische Blutdruck der Versuchstiere zeigte sich nach der Exposition gegenüber fluoreszierenden und magnetischen Nano-SPM erhöht (Abbildung 2.17 A, C), wohingegen nach der Exposition gegenüber fluoreszierenden und magnetischen Mikro-SPM keine Veränderung messbar war. Die endothelabhängige Gefäßrelaxation durch ACh-Titration zeigte eine Rechtsverschiebung nach der Exposition gegenüber fluoreszierenden Nano-SPM, aber nicht nach der Exposition gegenüber fluoreszierenden Mikro-SPM (Abbildung 2.17 B). Die endothelunabhängige Gefäßrelaxation mittels Nitroglycerin wurde durch die Exposition gegenüber fluoreszierenden SPM nicht verändert. Die Exposition gegenüber magnetischen Nano- und Mikro-SPM verursachte tendenziell eine Rechtsverschiebung in der endothelabhängigen Relaxationskurve, es zeigte sich jedoch kein klares Muster (Abbildung 2.17 D). Die Exposition gegenüber magnetischen SPM hatte auch keinen Einfluss auf die endothelunabhängige Gefäßrelaxation als Reaktion auf Nitroglycerin. Bei den molekularen Biomarkern stellte sich für die magnetischen Nano-SPM, Endothelin-1 (ET-1), ein vorwiegend vasokonstriktiv wirkendes Peptidhormon, welches bei oxidativem Stress vermehrt gebildet wird [123], als erhöht dar. Die endotheliale  $\text{NO}$ -Synthase (eNOS) präsentierte sich bei den magnetischen Nanopartikeln im Trend vermindert (Abb. 2.17 E,F) [121].

### Fluorescent PM

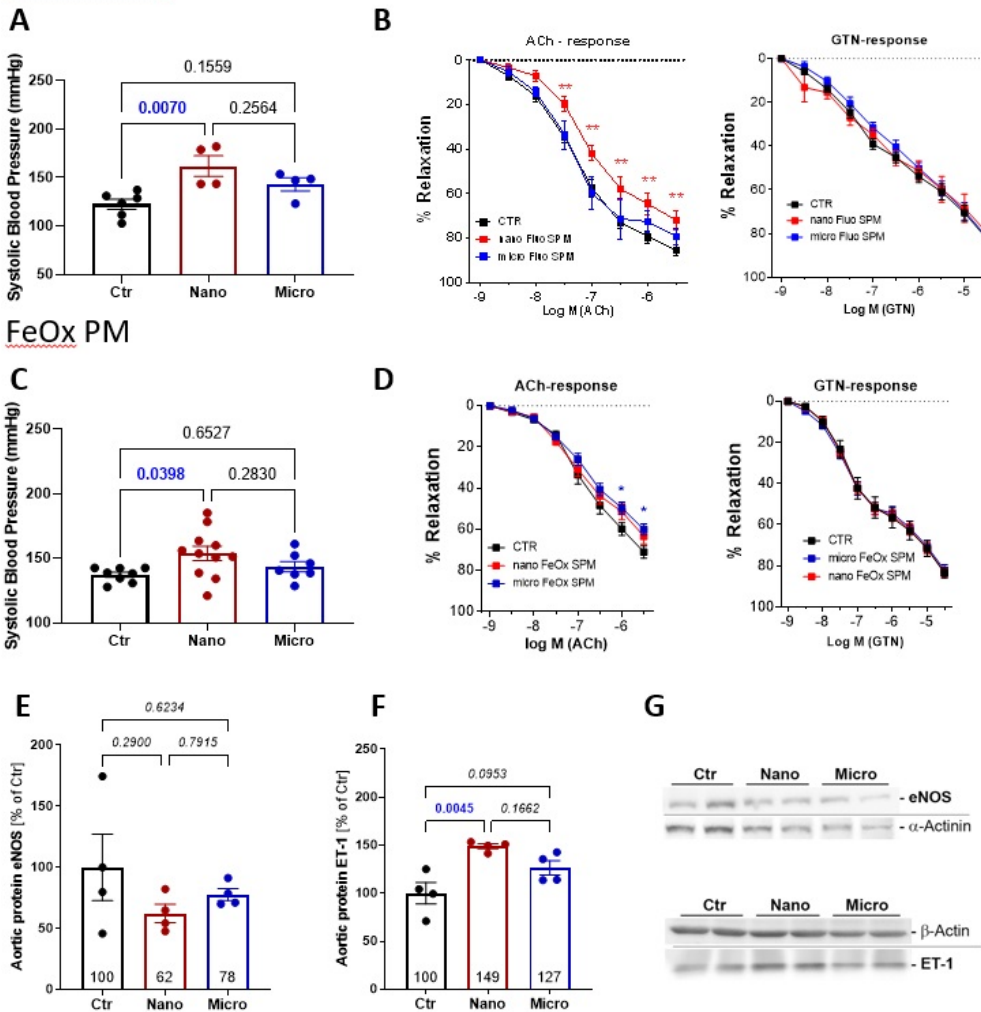


Abb. 2.17 - Auswirkungen von synthetischen Feinstaubpartikeln (SPM) unterschiedlicher Größe auf die Gefäßfunktion. Die Daten sind als Mittelwert  $\pm$  SEM von Aortenringen von  $n = 4-9$  Mäusen pro Gruppe (B, D) dargestellt, oder die Anzahl der Mäuse wird durch Jitter-Plots für andere Parameter ( $n = 4-11$  Mäuse pro Gruppe) dargestellt. P-Werte für einzelne Vergleiche werden angezeigt, was auf statistische Signifikanz hinweist, oder es werden Sternchen verwendet: \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) durch Einweg-ANOVA mit Tukey-Mehrfachvergleichsanalyse für A, C, E und F und durch Zweiweg-ANOVA mit Tukey-Mehrfachvergleichstest für B und D Abbildung aus [121].

Ebenfalls von Versuchstieren dieser Arbeit, die fluoreszierenden Partikeln ausgesetzt waren, wurden Schnitte der Lunge mit einem Fluoreszenzbildgebungsgerät untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Proben der Versuchstiere, die Mikropartikeln gegenüber exponiert waren, einen deutlichen Anstieg in der Fluoreszenz präsentierten, während die Fluoreszenz in der Nano-Gruppe nur wenig gegenüber der Kontrollgruppe erhöht war. Dies deutet auf eine Transmigration der Nanopartikel durch die Luft-Blut-Schranke in den systemischen Kreislauf hin, während die größeren Mikropartikel in der Lunge akkumulieren (Abb.2.18) [121].

## Fluorescent SPM

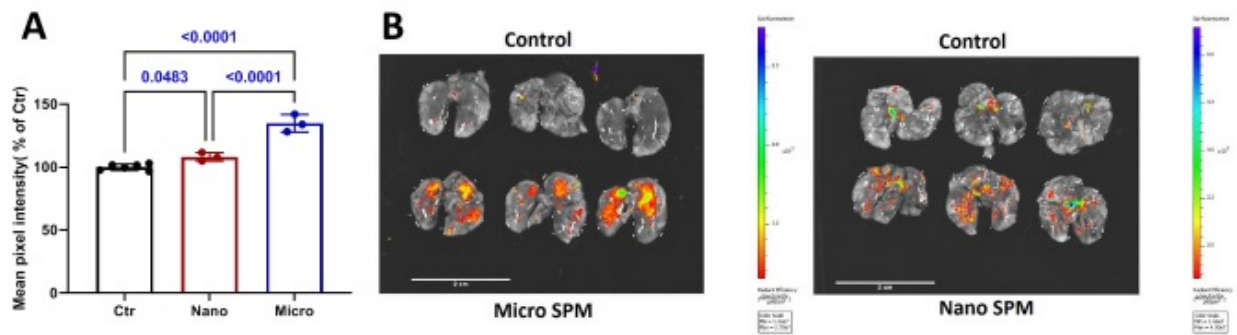


Abbildung 2.18 - Verteilung von Partikeln unterschiedlicher Größe nach Inhalation. Die Lungen von Tieren, die fluoreszierenden Nano- und Mikro-SPM ausgesetzt waren, wurden einer Fluoreszenzbildgebung unterzogen (B), und die mittlere Pixelintensität wurde aufgezeichnet (A). Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM von  $n = 3-7$  Tieren pro Gruppe dargestellt. Die P-Werte für einzelne Vergleiche zeigen die statistische Signifikanz an, die durch eine einfache Varianzanalyse mit Tukey-Mehrfachvergleichsanalyse erzielt wurde [121].

## 3 Materialien

### 3.1 Feinstaubpartikel

#### 3.1.1 Mikropartikel

Fluoreszierende Partikel:

Micro-SPM (FP-2065-2, Nile Blue,  $2.16 \mu\text{m}$ , aus Polyesterol), Spherotec (Lake Forest, IL, US)

Magentische Partikel:

Micro-SPM (PM4.5, in magnetischem Polyesterol eingekapselt,  $4.13 \mu\text{m}$ ), Kisker Biotech GmbH (Steinfurt, Germany)

#### 3.1.2 Nanopartikel

Fluoreszierende Partikel:

Nano-SPM (FP-0256-2, Nile Red,  $0.25 \mu\text{m}$ , aus Polystyrol), Spherotec (Lake Forest, IL, US)



Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Hamburg	324626
Ethanol	Sigma, Hamburg	32205
Glycerin	AppliChem, Darmstadt	131339.1211
Glycin	Carl Roth, Karlsruhe	3790.2
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt	A3465
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe	16788-57-1
KCl	AppliChem, Darmstadt	7447-40-7
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Hamburg	L0649
Methanol 99,8%	Sigma-Aldrich, Hamburg	322415
MgSO <sub>4</sub>	Carl Roth, Karlsruhe	7487-88-9
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe	T145.2
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	AppliChem, Darmstadt	131679
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Hamburg	450243
NaCl	Carl Roth, Karlsruhe	7647-14-5
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sigma-Aldrich, Hamburg	S5011
NaHCO <sub>3</sub>	Carl Roth, Karlsruhe	6885.1
Na-Hepes	Carl Roth, Karlsruhe	75277-39-3
Pepstatin A	Sigma-Aldrich, Hamburg	P5318
Phosphatase Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Hamburg	P2850
Pierce ECL Western Blotting Substrate	Thermo Scientific	32106
Protease Inhibitor Cocktail	Sigma-Aldrich, Hamburg	P8340
Phenylmethansulfonyl-fluorid (PMFS)	Sigma, Hamburg	P7626
Roti®-Quant	Carl Roth, Karlsruhe	K015.1
Saccharose	Sigma-Aldrich, Hamburg	57-50-1
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Merck, Darmstadt	822050
Super Signal West Dura Substrat	ThermoFisher, USA	34076
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Hamburg	M6250
N,N,N,N-Tetramethylethylen-diamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Hamburg	T9281
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	Sakura Finetek, USA	4583
Tris ultra pure	AppliChem	A1086,1000
Tris-Base	Sigma-Aldrich, Hamburg	252859
Tris-HCL	Carl Roth, Karlsruhe	9090.1
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Hamburg	X100
Tween-20	SERVA, Heidelberg	P2287

Tabelle 3.1 – Verwendete Chemikalien und Reagenzien mit entsprechendem Hersteller und Produktnummer



3.2.13 <b>BSA-Blockmedien 3% und 5%</b> BSA 3 g / 5 g auf 100 mL TBS-T / PBS-T	3.2.14 <b>MILK-Blockmedien 3% und 5%</b> Milchpulver 3 g / 5 g auf 100 mL TBS-T / PBS-T
--	---

Tabelle 3.2 – Verwendete Puffer und Lösungen mit Mengenangaben der einzelnen Bestandteile

### 3.4 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Firma, Sitz	Produktnummer
-------------	-------------	---------------

Bezeichnung	Firma, Sitz	Produktnummer
Zellkulturschälchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen	632181
Safe-Lock Tubes Reaktionsgefäße 0.5mL	Eppendorf, Hamburg	0030121023
Safe-Lock Tubes Reaktionsgefäße 1.5mL	Eppendorf, Hamburg	0030120086
Safe-Lock Tubes Reaktionsgefäße 2.0mL	Eppendorf, Hamburg	0030120094
Gel Blotting Papier BG 002	Whatman, Dassel	9057077
Injektionskanüle Gr.18	Braun, Melsungen	4657683
Mini-Trans-Blot Filterpapier	BIORAD, München	1703932EDU
Nitrocellulose Blotting Membran	GE Healthcare	GE10600002
Objektträger SuperFrost®	VWR International, Darmstadt	HECH42408060
Pipettenspitzen 200µL gelb	SARSTEDT, Nümbrecht	70.3030.020
Pipettenspitzen 1000µL blau	SARSTEDT, Nümbrecht	70.3050.020
Pipettenspitzen epT.I.P.S® 0.1-10µL	Eppendorf, Hamburg	0030000811
Pipettenspitzen epT.I.P.S® 2-200µL	Eppendorf, Hamburg	0030000889
Pipettenspitzen epT.I.P.S® 50-1000µL	Eppendorf, Hamburg	0030000927
Pipettenspitzen + Filter 1-20µL	STARLAB, Ahrensburg	S1120-1810
Pipettenspitzen + Filter 200µL	STARLAB, Ahrensburg	S1120-8810
Pipettenspitzen + Filter 100-1000µL	STARLAB, Ahrensburg	S1126-7810
96-Well Mikroplatten, flacher Boden	Thermo Fisher	243656
CELLSTAR® Zentrifugenröhrchen 15mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen	188271
CELLSTAR® Zentrifugenröhrchen 50mL	Greiner Bio-One, Frickenhausen	227261

Tabelle 3.3 Verwendete Verbrauchsmaterialien mit entsprechendem Hersteller und Produktnummer

### 3.5 Technische Hilfsmittel und Geräte

#### Bezeichnung

#### Firma, Sitz

Blotting – Mini Trans-Blot® Cell	BioRad, München
Chemilux Imager	Intas, Göttingen
Cryostat CM3050 S	Leica Biosystems, Nußloch
Elektrophorese - Mini Protean™ System 3 Cell	BioRad, München
Expositionssystem mit Partikeldetektor	TSE Systems, Hochtaunuskreis
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40CFL	Zeiss, Oberkochen
Heizrührer MR 3001	Heidolph, Schwabach
Kühlzentrifuge Mikro22R Typ 1110	Hettich, Tuttlingen
Pipette Eppendorf Research 0,1-2,5 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 0,5-10 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 2-20 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 10-100 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 20-200 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research 100-1000 µL	Eppendorf, Hamburg
Pipette Eppendorf Research plus 8-Kanal 30-300 µL	Eppendorf, Hamburg
Plate reader MRXII	Dynex Technologies, Berlin
Power Pack Basic	BioRad, München
Präparierbesteck	Carl Roth, Karlsruhe
Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex-Genie 2 G560, 120V	Scientific Industries, New York
Western Blot Imager, CHEMICAM HR 16	Intas, Göttingen
TissueLyser QIAGEN	Retsch, Haan

Tabelle 3.4 – Verwendete technische Hilfsmittel und Geräte mit entsprechenden Herstellerangaben

### 3.6 Software

#### Bezeichnung des Programms

#### Firma, Sitz

Adobe Photoshop CS2	Adobe Systems GmbH, München
Axiovision Rel 4.3	Zeiss, Oberkochen
BioRender (Illustrationen)	BioRender, Kanada
Gel-Pro Analyzer 6.0	Media Cybernetics, Bethesda, MD
Image ProPlus 7.0	Media Cybernetics, Rockville, MD
ImageJ	Wayne Rasband (NIH), Public Domain
GraphPad Prism 8	GraphPad Software, California
Microsoft Office Professional Plus 2021	Microsoft, Washington USA
Revelation 4.25	Dynex Technologies, Chantilly, VA

Tabelle 3.5 – Verwendete Software mit entsprechenden Herstellerangaben

### 3.7 Antikörper

#### 3.7.1 Primäre Antikörper

Bezeichnung	Firma	Produktnummer
monoclonal anti-gp91phox (NOX2) (mouse, 1:500 in 5% BSA/TBS)	BD Bioscience	#611415
polyclonal NOX1 (rabbit, 1:500 in 3% BSA/TBS)	Abcam	#ab131088
monoclonal anti-CD68 (mouse, 1:1000 in 5% BSA/PBS)	Abcam	#31630
monoclonal anti-p67phox (rabbit, 1:500 in 3% BSA/TBS)	BD Bioscience	#610913
polyclonal pMARCKS (Ser152/156) (rabbit, 1:1000 in 5% BSA/TBS)	Cell Signaling	#2741
monoclonal PKC $\alpha$ 1 (mouse, 1:5000 in 3% BSA/PBS)	BD Bioscience	#610107
polyclonal anti-p47phox (NCF-1) (rabbit, 1:1000 in 3% milk/PBS)	Assay Biotech	#A1161
polyclonal anti-MCP-1 (rabbit, 0.4 $\mu$ g/mL in 3% BSA/PBS)	BIORAD	#AAM43
monoclonal anti-HO-1 (rabbit, 1:1000 in 3% BSA/PBS)	Cell Signaling	#43966
monoclonal e-NOS (mouse, 1:1000 in 3% BSA/TBS)	BD Bioscience	#610297 !!!
monoclonal anti-DHFR (mouse, 1:1000 in 5% milk/PBS)	Abnova	#H00001719-M01
monoclonal ET-1 (mouse 1:1000 in 3% BSA/TBS)	SantaCruz	#sc-517436
monoclonal $\alpha$ -actinin (mouse, 1:2500 in 3% BSA/TBS)	Sigma-Aldrich	#A5044
monoclonal $\beta$ -actin (rabbit, 1:2500 in 3% BSA/TBS)	Sigma-Aldrich	#A5060

Tabelle 3.6 – Verwendete Primäre Antikörper mit entsprechender Verdünnung, Hersteller und Produktnummer

#### 3.7.2 Sekundäre Antikörper

Bezeichnung	Firma	Produktnummer
anti-rabbit-IgG	VectorLabs	#PI-1000
anti-mouse-IgG	VectorLabs	#PI-2000

Tabelle 3.7 – Verwendete Sekundäre Antikörper mit entsprechender Verdünnung, Hersteller und Produktnummer

## 4 Methoden

### 4.1 Versuchstiere und Durchführung

Alle Versuchstiere wurden gemäß den Bestimmungen des Leitfadens für die Pflege und Verwendung von Labortieren des „National Research Council (US) Committee for the update of the guide for the care and use for laboratory animals“ [124] behandelt. Zudem wurden die geplanten Experimente durch die Ethikkommission der Johannes-Gutenberg Universität Mainz, als auch vom Landesuntersuchungsamt Rheinland-Pfalz (Koblenz, Deutschland; Zulassungsnummer: 23 177-07/G 20-1-055) geprüft und freigegeben. Die Mäuse im Alter von 8-12 Wochen wurden in ventilierten Käfigen gehalten, hatten uneingeschränkten Zugang zu Nahrung und Wasser und wurden einem 12-stündigen Licht- Dunkelheitszyklus ausgesetzt. Die männlichen C57BL/6-Mäuse wurden entweder gegenüber synthetischen fluoreszierenden oder magnetischen Partikeln (synthetic particulate matter “SPM”) in jeweils 2 verschiedenen Größen exponiert (siehe Abb. 3.1). Hierbei betrug der mittlere Durchmesser der fluoreszierenden Mikropartikel 2,1µm, bei den magnetischen Mikropartikeln 4,1µm. Die Nanopartikel wiesen einen mittleren Durchmesser von 250nm auf. Die mittlere Konzentration während der Exposition lag bei  $230 \pm 46 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Weitere Mäuse wurden nur Frischluft ausgesetzt und dienten als Kontrollgruppe. Die Exposition wurde an 3 aufeinander folgenden Tagen für jeweils 6 Stunden durchgeführt. Dabei wurden die Partikel in Wasser gelöst und über einen Kollisionszerstäuber in die Expositionskammern eingeleitet. Am Tag nach dem 3. Expositionszyklus wurden die Tiere mit einer Kombinationsanästhesie aus Xylazin und Ketamin narkotisiert, das Abdomen mittels Präparationsschere eröffnet und das Diaphragma inzidiert. Folgend konnte Blut aus den Ventrikeln des noch schlagenden Herzens entnommen werden, sowie das Herz selbst proximal an den Gefäßen abgetrennt und in 4°C kalten KH-Puffer überführt werden. Ebenfalls wurden die Nieren, Lungen, das Pankreas, die Aorta, die Leber, Milz, Großhirn und Urin gewonnen. Im weiteren Verlauf wurden die Organe in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C für weitere Untersuchungen gelagert.

## **4.2 Western-Blot**

Das Western-Blotting ist eine Methode zur Identifikation und zum semi-quantitativen Nachweis von spezifischen Proteinen aus Proteingemischen [125], deren einzelne Schritte im Folgenden beschrieben werden.

### **4.2.1 Extraktion der Proteine aus Gewebe**

Die gewonnenen Organe wurden unter Zusatz von flüssigem Stickstoff zu einem Pulver gemörsert und mit einer Homogenisierungslösung im Volumenverhältnis von 1:1 in ein Eppendorfgefäß überführt. In den folgenden 60 Minuten wurden die Proben auf Eis gelagert und mehrfach mittels Vortex durchmischt, sodass das zugesetzte Detergens Triton-X (1%) die Zellmembranen lysieren und somit die Proteine herauslösen konnte. Beigesetzte Protease- und Phosphataseinhibitoren verhinderten währenddessen einen Abbau sowie Dephosphorylierung der Proteine durch freiwerdende zelleigene Enzyme. Nach einer abschließenden 10-minütigen Zentrifugation bei 4 °C und 10.000x g wurde der Überstand abpipettiert und als Proteinhomogenat in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

### **4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung des Homogenats wurde photometrisch nach Bradford durchgeführt [126]. Hierbei werden die Eigenschaften des Farbstoffs „Coomassie Brilliant Blue-G250“ genutzt. Dieser liegt zunächst in seiner freien, kationischen, Form vor und weist ein Absorptionsmaximum bei 465nm auf, wodurch er rot erscheint. Durch die Komplexbildung mit Seitenketten von Proteinen wird der Farbstoff allerdings in seiner anionischen Form stabilisiert und es findet eine Verschiebung des Absorptionsspektrums statt, welches sein neues Maximum bei 595nm erhält und den Farbstoff blau erscheinen lässt. Zudem ist der Extinktionskoeffizient ebenfalls deutlich höher und lässt somit eine hochempfindliche Messung gegenüber des freien Farbreagenz zu [127]. Um aus den gemessenen Extinktionswerten Proteinkonzentrationen ableiten zu können, wurden 6 bekannte Konzentrationen (1, 5, 10, 20, 30, 50 µg/ml) von Rinderserumalbumin erstellt und eine Eichgerade ermittelt. Die unbekanntenen Proben wurden in jeweils 2 Eppendorfgefäße 1:200 mit destilliertem Wasser verdünnt und anschließend aus jedem Gefäß jeweils

2x 80µL auf eine 96-well Platte pipettiert, um eine 4-fach Bestimmung der jeweiligen Probe zu ermöglichen. Als Leerwert wurde die entsprechende Menge Aqua bidest. verwendet, sowie die zuvor hergestellten BSA-Konzentrationen als Referenzen. Anschließend wurde als Bradford-Reagenz 200µl 1:5 verdünntes Roti-Quant zugegeben und in einem MRX II-Photometer die Extinktionswerte gemessen. Mittels des Programms Revelation wurde die Auswertung vorgenommen. Abschließend wurde der Mittelwert der 4-fach Bestimmung errechnet und als Konzentration der jeweiligen Probe festgelegt.

#### **4.2.3 Protein-Gelelektrophorese / SDS-PAGE**

Durch die SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) lassen sich Proteingemische auftrennen [128]. Hierbei bewirkt das SDS eine einheitlich negative Ladung der Proteine, sodass diese unter Spannung in Richtung des Pluspols wandern. Das verwendete Polyacrylamid-Gel weist eine Porung auf, die je nach Konzentration variiert, die Bewegung der Proteine im elektrischen Feld bremst und somit zu einer Auftrennung anhand der Molekulargröße führt [129].

Nach der Konzentrationsbestimmung der Proteingemische, wie in 4.2.2 beschrieben, wurden diese im Verhältnis von 2:1 mit 3-fachem Lämmli-Puffer versetzt und bei 95°C für 5 Minuten erhitzt. Die Temperatur führte zu einer Denaturierung der Proteine, das enthaltene β-Mercaptoethanol zur Spaltung der Disulfidbrücken und das SDS zu einer einheitlichen Ladung. Folgend wurde bei den Proben eine Konzentration von 1µg/µl eingestellt. Die Gelelektrophorese wurde mit einem Mini-PROTEAN 3 System der Firma BIORAD durchgeführt. Zunächst wurden die Trenngele wie in Tab. 4.1 beschrieben angefertigt. Dabei wurden die Trenngele bis zu ihrer Polymerisation (20 Minuten bei Raumtemperatur) mit Isopropanol überschichtet, um eine glatte Kante zu erhalten. Nach der Entfernung des Isopropanol wurde das Sammelgel auf das Trenngel gegossen, die Probenkämme (1,5mm) eingesetzt und ebenfalls bis zur Polymerisation gewartet. Anschließend konnten die Gele in den Elektrophorese-Tank eingesetzt und der auf 4°C gekühlte SDS-Laufpuffer eingefüllt werden. Es wurde eine Spannung von 60V angelegt und zur Equilibrierung zunächst eine Leer-Vorlaufzeit von 10 Minuten gegeben. Dann wurden die Slots mit den Proben, sowie mit einem Marker für das Molekulargewicht (Benchmark-Ladder) und einem prestained-Maker (Dual Color, sichtbar im Gel) beladen. Dieser erlaubte die visuelle Kontrolle des

Fortschreitens der Elektrophorese. Nach dem Beladen wurde zunächst eine Spannung von 60V angelegt, bis die Proben ins Trenngel eingetreten waren, bevor die Spannung für ca. 1½-2 Stunden auf 120V erhöht wurde, bis die gewünschte Auftrennung der Proteine im Trenngel erreicht wurde.

Gele für die Proteinanalytik							
		Trenngele				Sammelgel	
		10%		12%		4%	
		1x	2x	1x	2x	1x	2x
H <sub>2</sub> O bidest.	[ml]	4,8	9,6	4,3	8,6	3,2	6,4
Trenn-Puffer (1,5M Tris pH 8,8)	[ml]	2,5	5	2,5	5	0	0
Sammel-Puffer (0,5M Tris pH 6,6)	[ml]	0	0	0	0	1,2	2,4
Acrylamide/Bis (40% BioRad)	[ml]	2,5	5	3	6	0,5	1
10% SDS	[µl]	100	200	100	200	50	100
10% APS	[µl]	100	200	100	200	50	100
TEMED	[µl]	10	20	10	20	5	10
Endvolumen	[ml]	10	20	10	20	5	10

Tabelle 4.1 - Zusammensetzung der Gele für die Elektrophorese mit entsprechenden Mengenangaben der einzelnen Komponenten

#### 4.2.4 Blotting

Der Blot ist ein elektrophoretischer Transfer von Proteinen auf eine Membran aus Nitrozellulose. Dabei wird senkrecht zu den Polyacrylamidgelen ein elektrisches Feld angelegt, welches zur Lösung der Proteine aus dem Gel dient. Aufgrund hydrophober Wechselwirkungen mit der Membran aus Nitrozellulose, bleiben diese dann daran haften. Somit wird das Auftrennungsmuster der SDS-PAGE auf die Nitrozellulosemembran übertragen [130].

Der Transfer wurde mittels Mini Trans-Blot® Cell von BIORAD durchgeführt. Bereits kurz vor Ende der SDS-PAGE wurden die hierfür benötigten Schwämme, Filterpapiere und die Nitrozellulosemembran in -20°C kalten Transferpuffer gelegt. Das Polyacrylamidgel mit den nun aufgetrennten Proteinproben wurde wie in Abbildung 4.1 in das „Blotting-Sandwich“ eingebaut. Dieser Vorgang fand gänzlich unter der Oberfläche des Transferpuffers statt, um den Einschluss von Luftblasen zu verhindern. Anschließend wurde das Sandwich in die Halterung eingesetzt, mit der

Membran in Richtung der Anode ausgerichtet und der Transfertank mit Transferpuffer, sowie einem Kühlpack befüllt. Die gesamte Vorrichtung dann in einen Kühlschrank gestellt und für 4 Stunden eine Stromstärke von 250mA angelegt.

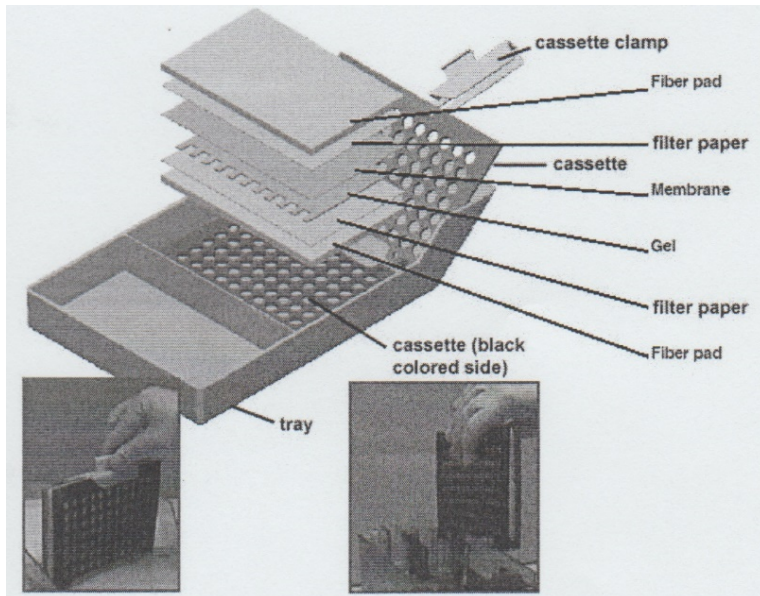


Abbildung 4.1 – Aufbau der Blotting-Kassette für die SDS-PAGE

#### 4.2.5 PonceauS-Färbung

Nach Beendigung des Blots wurde die Kassette aus der Anlage entfernt und die Nitrozellulosemembran entnommen. Der erfolgreiche Transfer der Proteine wurde mittels Ponceauroffärbung (10 Minuten bei Raumtemperatur) überprüft. Dabei bindet der Farbstoff reversibel an die positiv geladenen Aminogruppen der Proteine [131]. Anhand der Banden mit Markerproteinen, die bei der SDS-PAGE ebenfalls in eine Gelspur gegeben wurden, konnte nun die Membran außerhalb der Probenbanden nach kDA-Größen markiert und in passende Streifen geschnitten werden, sodass die Proben zur gleichen Zeit auf mehrere Antikörper getestet werden konnten (Abb. 4.2).

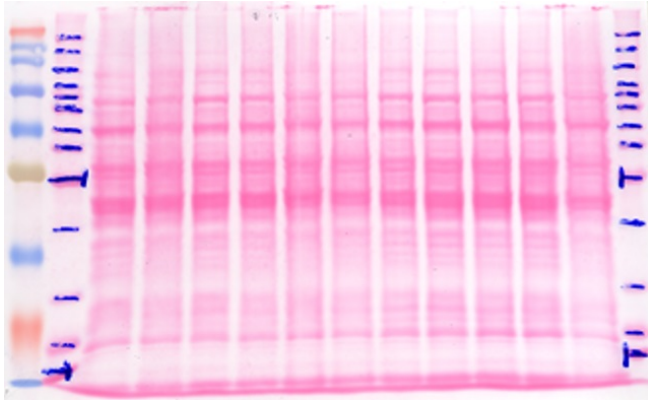


Abb. 4.2 - Beispiel für eine Membranfärbung mit PonceauS – Hierbei werden die 11 Lanes der Proben beidseits von einem Marker in 10k-DA Schritten eingefasst. Links wurde zudem ein Prestained-Marker aufgetragen. Die grüne Bande markiert die Höhe von ca 52 kDA.

#### 4.2.6 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

Proteine oder Proteinmodifikationen lassen sich über passende Antikörper nachweisen. Diese Primärantikörper binden an Epitope, die für das gesuchte Protein kennzeichnend sind [132]. In einem weiteren Schritt werden gegen die Primärantikörper speziesspezifische Sekundärantikörper zugegeben, die mit einer Peroxidase gekoppelt sind. Somit kann durch die Spaltung von Wasserstoffperoxid eine Chemilumineszenz bewirkt werden, die detektiert und quantifiziert werden kann.

Dazu wurde nach dem Entfärben der Membranstreifen mit Waschpuffer die freien Bindungsstellen der Nitrozellulose durch Inkubation mit einem BSA- bzw. Milchpulver-Blockmedium blockiert (1h bei Raumtemperatur), um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers an noch proteinfreie Membranabschnitte zu verhindern. Anschließend wurden die Primärantikörper entsprechend der Verdünnung in Tab. 3.6 zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden durch 3x Waschen von jeweils 10 Minuten mit entsprechendem Waschpuffer überschüssige und ungebundene Primärantikörper entfernt. Folgend wurde der mit Peroxidase beladene Sekundärantikörper, welcher sich spezifisch gegen den Primärantikörper richtet, zugegeben und für 120 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Membranen erneut 3x für jeweils 10 Minuten mit Puffer gewaschen und auf eine Glasplatte gelegt. Durch Zugabe der ECL-Lösung, die als Substrat für die Peroxidase diente, konnte die nun entstehende Chemilumineszenz in einer Dunkelkammer mit gekoppelter Kamera (ChemiLux Imager) detektiert und aufgezeichnet werden. Die Bilder konnten dann densitometrisch mit dem Programm Gel-Pro Analyzer ausgewertet werden. Die erhaltenen Werte wurden gegenüber  $\alpha$ -

actinin bzw.  $\beta$ -actin bezüglich Ladung und Transfer der Proteine normalisiert. Da die Bilder mit unterschiedlichen Belichtungszeiten aufgenommen wurden, konnten Über- oder Unterbelichtungen in der Densiometrie ausgegrenzt werden.

#### **4.2.7 Strippen – Entfernen der Antikörper von der Membran**

Da die Membranstreifen zu einem Zeitpunkt nur mit jeweils einem Antikörper inkubiert werden können, jedoch manche Zielproteine eine ähnliche Molekülmasse aufweisen, müssen die Komplexe aus Primär- und Sekundärantikörper entfernt werden. Dieser Vorgang lässt sich durch einen Puffer mit SDS,  $\beta$ -Mercaptoethanol und Tris ultra pure realisieren und wird auch als „Stripping“ bezeichnet [133].

Dabei werden die Membranstreifen mit dem Strippingpuffer in ein Behältnis gegeben und bei 55°C für 45 Minuten erwärmt. Anschließend wurden die gelösten Komplexe in mehreren Waschschritten (3x 15 Minuten) mit entsprechendem Waschpuffer entfernt und die Proteine auf den Membranen konnten erneut untersucht werden.

#### **4.3 Detektion reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) in Geweben**

Der Nachweis von ROS in Geweben ist mittels Fluoreszenz möglich. Hierbei wird Dihydroethidium (DHE) entweder spezifisch durch Superoxid ( $\cdot\text{O}_2^-$ ) zu 2-hydroxyethidium (2-OH-E<sup>+</sup>) oder unspezifisch durch andere ROS zu Ethidium (E<sup>+</sup>) oxidiert. Beide Produkte fügen sich in die nukleäre DNA ein und lassen sich mit Wellenlängen um 500-530nm energetisch anregen, wodurch sie Licht um 600nm aussenden [134] (Abb. 4.3). Mittels Fluoreszenzmikroskop lässt sich diese Emission erfassen und kann anschließend in den erhaltenen Bildern quantitativ über eine Densiometrie ausgewertet werden.

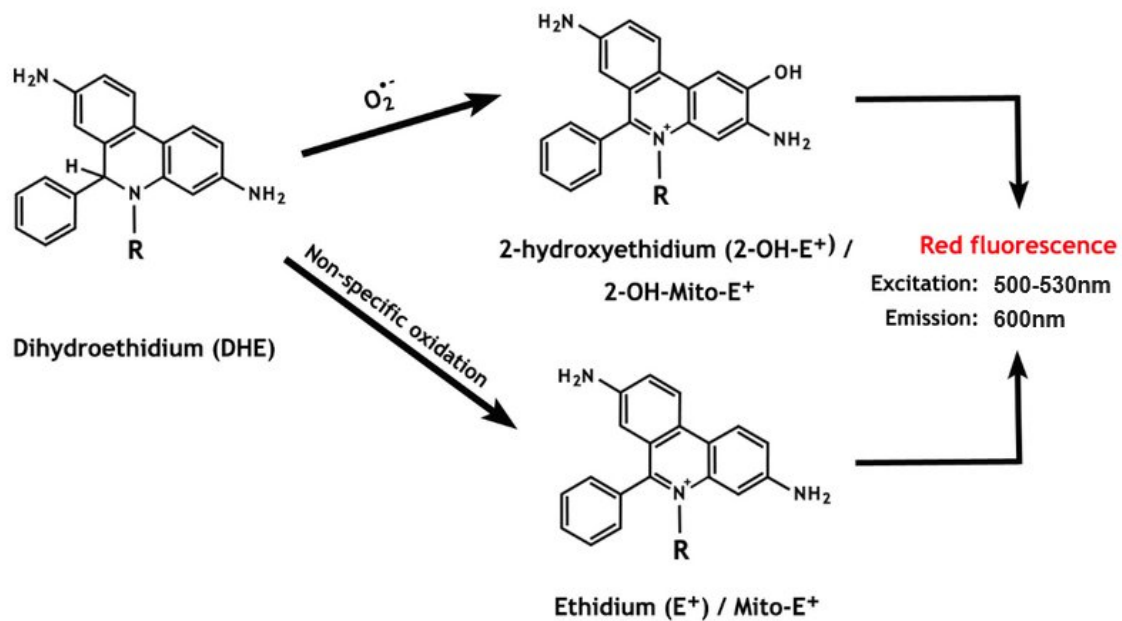


Abbildung 4.3 - Oxidation von DHE mittels Superoxid und anderen Oxidantien, verändert nach [135]

Dazu wurden nach der Entnahme der Organe, diese zur Konservierung in Tissue-Tek® O.C.T. Compound eingeschlossen und eingefroren. Mittels Cryostat CM3050 S konnten die Proben bei  $-25^{\circ}\text{C}$  in 8  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten und auf SuperFrost® Objektträger überführt werden. Anschließend wurden die Objektträger bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert, oder auf Eis transportiert und direkt weiterverwendet. Bei  $37^{\circ}\text{C}$  wurden die Proben für 30 Minuten in PBS-Puffer mit  $1\mu\text{M}$  DHE und 0,5% DMSO inkubiert. Der Überschuss der Lösung wurde vorsichtig entfernt und die Probe mit einem an den Rändern eingefetteten Deckglas fixiert. Anschließend wurde der Objektträger zum Stoppen der Reaktion erneut kurz auf Eis gelegt (5 Minuten). Nun konnten die Gewebeproben bei Dunkelheit unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden, indem die Probe in Gänze angeschaut und dann repräsentative Bilder aus homogen fluoreszierenden Bereichen aufgenommen wurden.

#### **4.4 Statistische Methoden**

Alle statistischen Analysen wurden in Prism Version 9, für Windows, durchgeführt. Die Ergebnisse werden als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (SEM) dargestellt. Die Varianzanalyse wurde durch One-way ANOVA mit anschließendem Tukey's post-hoc Test durchgeführt. In der One-way ANOVA wurden zunächst die Streuung der Daten innerhalb jeder Gruppe und die Streuung zwischen den Gruppen ermittelt. In Tukey's post-hoc Test wurden dann die Gruppen paarweise miteinander verglichen, um Unterschiede festzustellen. Der numerische Wert des p-Wertes wird direkt dargestellt. Gemäß der Definition wurden nur p-Werte  $<0,05$  als statistisch signifikant bezeichnet. Die Anzahl der biologischen Proben kann variieren, da nicht alle Tiere in allen Versuchen verwendet wurden.

## 5 Ergebnisse

### 5.1 Nachweis Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS)

Wie in 4.3 beschrieben, wurden Gewebeproben von Lunge, Cortex und Aorta mittels fluoreszenzmikroskopischer Detektion von oxidiertem Dihydroethidium auf das Vorhandensein reaktiver Sauerstoffspezies und damit auf oxidativen Stress hin untersucht.

Hierbei zeigte sich in den mit fluoreszierenden nano-SPM ausgesetzten Gewebeproben von Cortex und Aorta ein signifikanter Anstieg der Fluoreszenz durch oxidiertes DHE, die Proben der fluoreszierenden mikro-SPM zeigten hier keinen signifikanten Anstieg von Fluoreszenz gegenüber der Kontrollgruppe. Diese Ergebnisse stützen die Annahme der Transmigration der Nanopartikel in den Kreislauf und ihre Ablagerung in Organen, während die größeren Mikropartikel in der Lunge zurückgehalten werden (Abb. 5.1 A, B). Die Proben des Lungengewebes der fluoreszierenden Partikel ließen durch starke Akkumulation der Partikel und die damit verbundene übermäßige Fluoreszenz keine Auswertung zu.

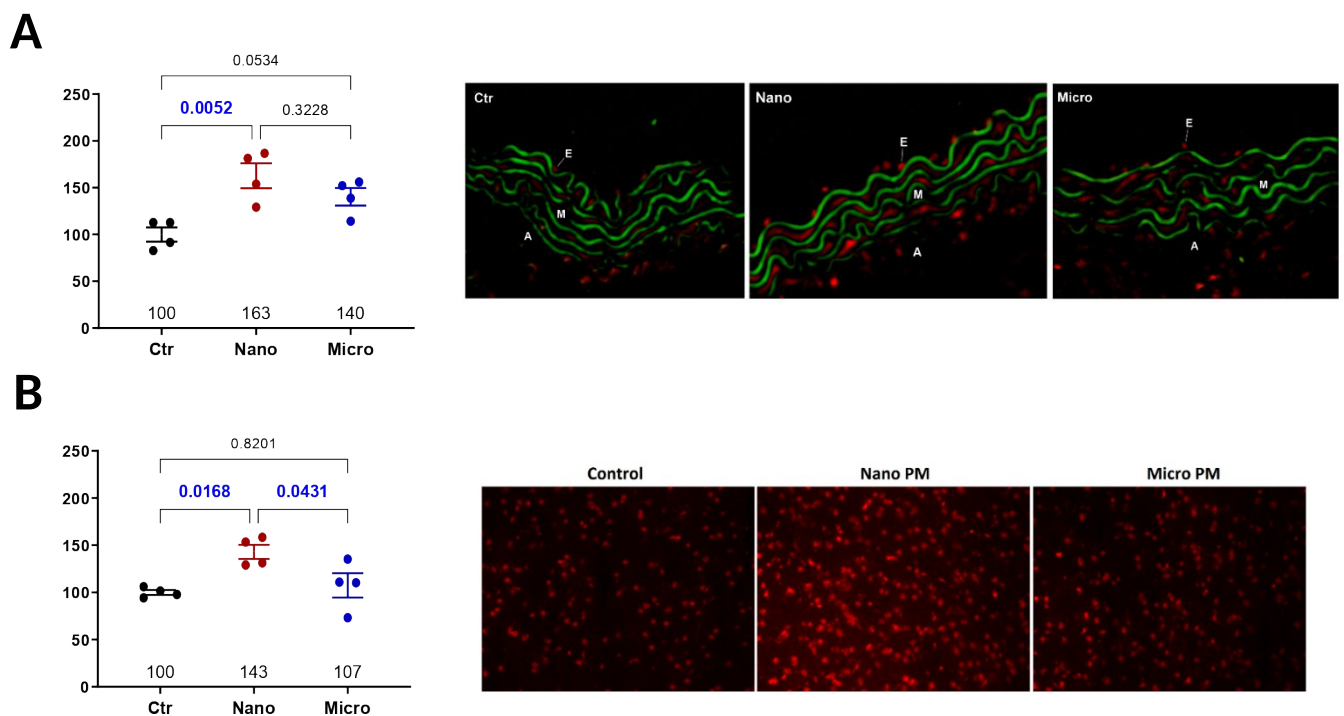


Abb. 5.1 – Quantitative fluoreszenzmikroskopische Darstellung von ROS mittels DHE in Aorta (A) und Cortex (B) von Versuchstieren, die gegenüber synthetischen fluoreszierenden Partikeln exponiert waren. Grüne Bereiche in A stellen zeigen eine Autofluoreszenz der Basallamina der Aorta. Die Daten aus der Densitometrie der roten Fluoreszenz werden links als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, und die Anzahl der Mäuse wird durch Jitter-Diagramme angezeigt ( $n = 3 - 4$  Mäuse pro Gruppe). P-Werte für einzelne Vergleiche werden über den Graphen angezeigt und Werte  $< 0.05$  zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied.

Die untersuchten Gewebeproben von Aorta und Cortex aus den mit magnetischen nano-SPM exponierten Mäusen zeigten ebenfalls einen Anstieg der durch oxidiertes DHE-vermittelten Fluoreszenz gegenüber der Kontrollgruppe, wohingegen die magnetischen mikro-SPM in diesen Geweben keine signifikant erhöhte Fluoreszenz aufwiesen (Abb. 5.2 A, B), was zu den Ergebnissen der fluoreszierenden Partikel (Abb. 5.1) passt. Das Lungengewebe hingegen zeigte sowohl bei den magnetischen nano- als auch bei den mikro-SPM eine statistisch signifikant erhöhte Fluoreszenz und damit ein erhöhtes Vorkommen von ROS (Abb. 5.2 C).

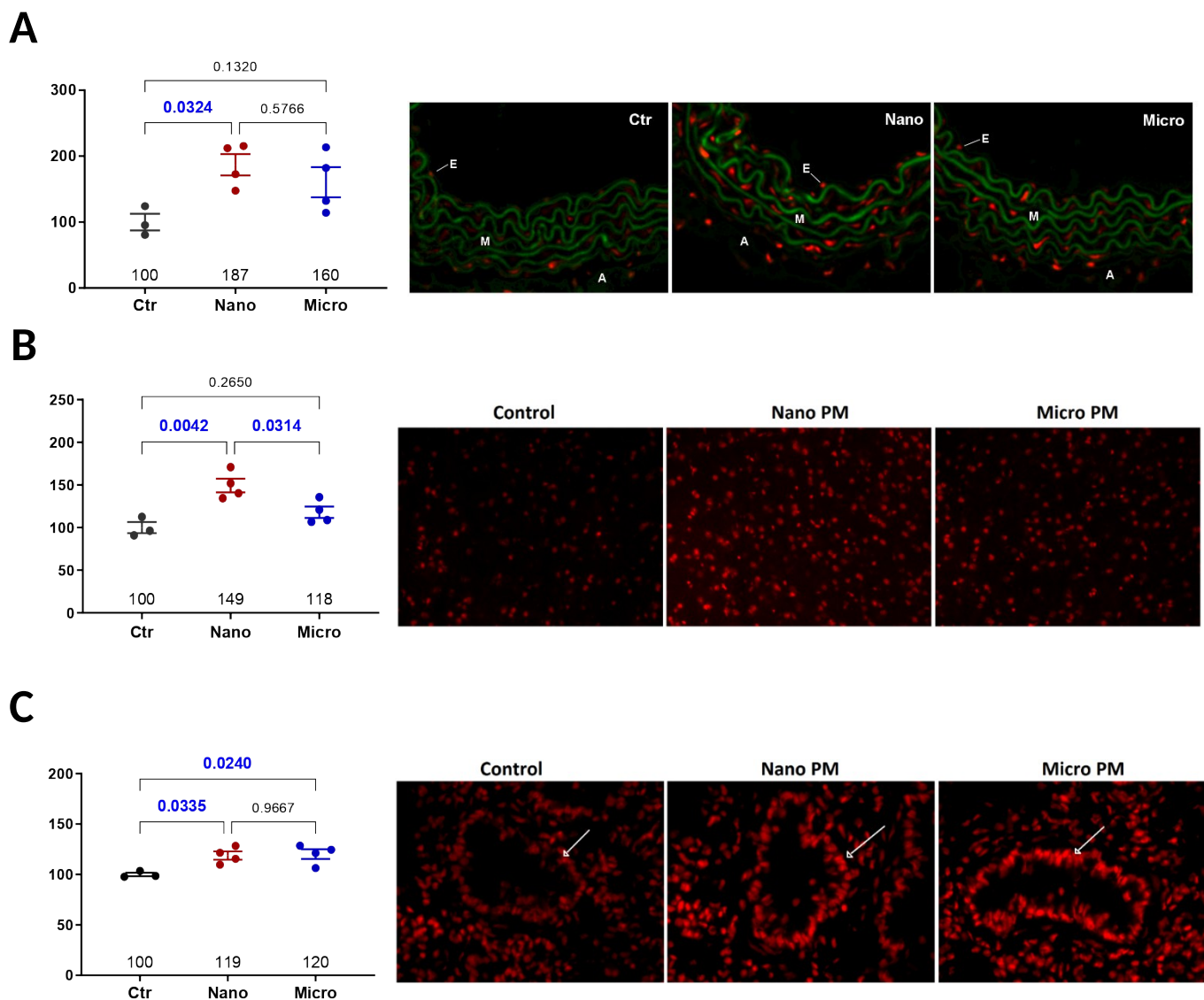


Abb. 5.2 - Quantitative fluoreszenzmikroskopische Darstellung von ROS mittels DHE in Aorta (A), Cortex (B) und Lunge (C) von Versuchstieren, die synthetischen magnetischen Partikeln gegenüber exponiert waren. Grüne Bereiche in A zeigen hierbei die Autofluoreszenz der Basallamina der Aorta, die mit Pfeilen markierten Strukturen in C zeigen quer geschnittene Bronchiolen. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, und die Anzahl der Mäuse wird durch Jitter-Diagramme angezeigt ( $n = 3 - 4$  Mäuse pro Gruppe). P-Werte für einzelne Vergleiche werden über den Graphen angezeigt und Werte  $< 0.05$  zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied.

## 5.2 Nachweis von Proteinen in Lungengewebe

Das Lungengewebe der Versuchstiere wurde, wie in 4.2 beschrieben, mittels der Westernblot-Methode auf molekulare Marker für oxidativen Stress und Inflammation hin untersucht. Dabei zeigte sich für die NADPH-Oxidase Untereinheiten NOX1 und NOX2 eine signifikant erhöhte Expression bei den mikro-SPM, jedoch nicht bei der Gruppe der nano-SPM (Abb. 5.3A, 5.3B). Dies lässt auf eine Erhöhung der zellulären Abwehr durch Retention der Mikropartikel schließen. Für die regulatorische Untereinheit von NOX2, p67phox, konnte in der mikro- als auch in der nano-SPM-Expositionsgruppe nur eine tendenzielle Erhöhung gemessen werden (Abb. 5.3.C). Die Proteinkinase C alpha 1 (PKC $\alpha$ 1) fördert die Aktivierung des NADPH-Oxidase-Komplexes und ihre Erhöhung konnte in der Gruppe der mikro-SPM gemessen werden, was ebenfalls zu einer Erhöhung der zellulären Abwehr des Lungengewebes gegenüber der Mikropartikel passt (Abb. 5.3.E). Jedoch zeigte das phosphorylierte myristoylierte Alanin-reiche C-Kinase-Substrat (P-MARCKS), ein Marker für die PKC $\alpha$ 1-Aktivität, keine Erhöhung (Abb. 5.3.D). CD68, ein Marker für die Aktivität von Makrophagen und Monozyten, zeigte sich in der Gruppe der mikro-SPM gegenüber den nano-SPM signifikant erhöht, was auf lokale Inflammation und Immunreaktion hindeutet (Abb. 5.3.F)

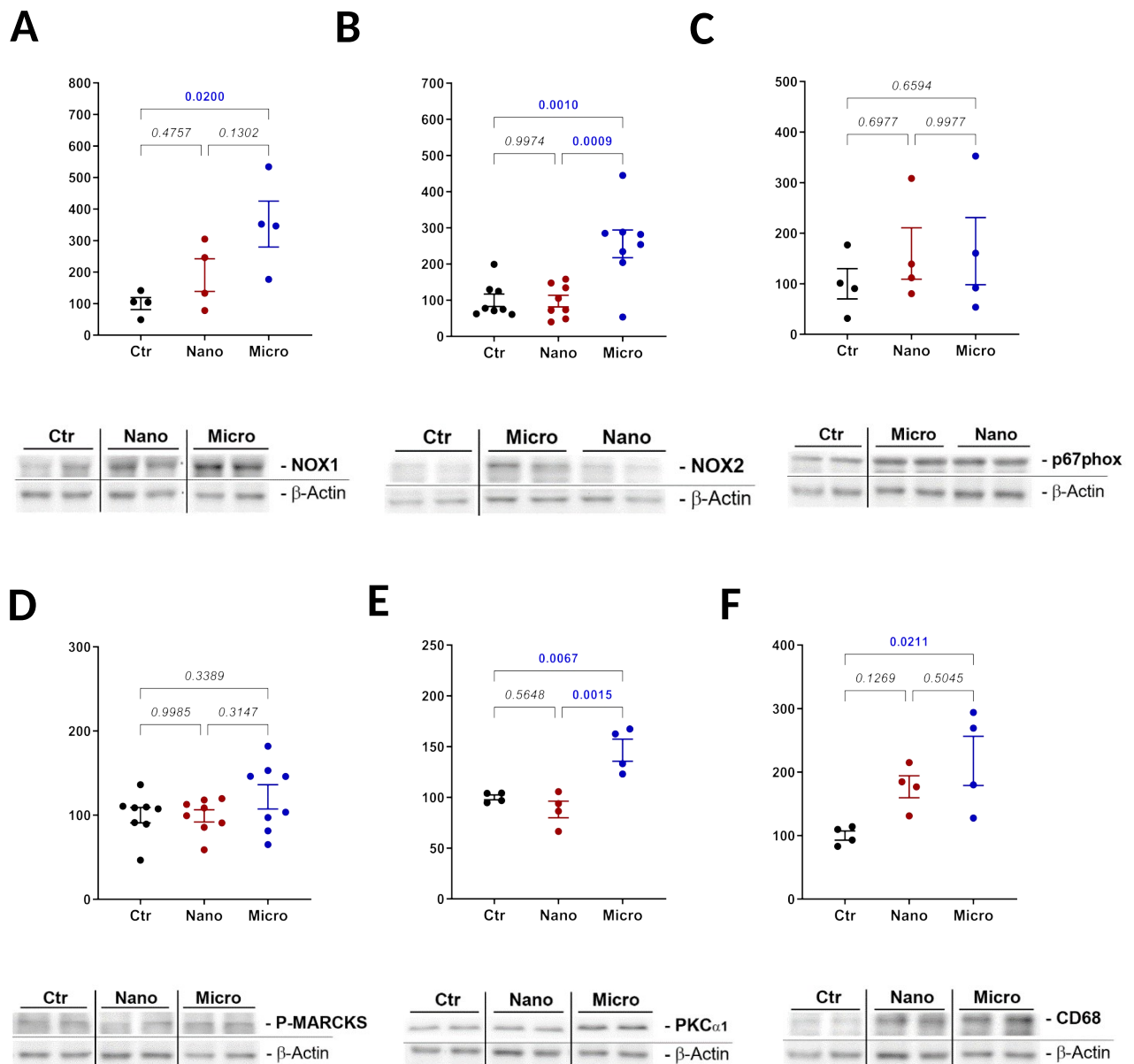


Abbildung 5.3 - Auswirkungen magnetischer Mikro- und Nanopartikel auf die pulmonale Proteinexpression. Die Western-Blot-Analyse der pulmonalen NADPH-Oxidase-Untereinheiten NOX1 (A), NOX2 (B) und p67phox (C), des phosphorylierten myristoylierten Alanin-reichen C-Kinase-Substrats (P-MARCKS) (D), der Proteinkinase C alpha (PKC $\alpha$ 1) (E) und des Differenzierungsclusters 68 (CD68) (F) wird für die Mäuse gezeigt, die den magnetischen Feinstaubpartikeln ausgesetzt waren. Unter den Graphen werden repräsentativ Beispiele von entsprechenden Membranabschnitten während der Analyse der Proteinbanden abgebildet. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt und die Anzahl der Mäuse wird durch Jitter-Plots angezeigt (n = 4–8 Mäuse pro Gruppe). P-Werte für einzelne Vergleiche werden über den Graphen angezeigt und Werte < 0.05 zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied.

### 5.3 Nachweis von Proteinen in Herzgewebe

Das Herzgewebe der Versuchstiere wurde ebenfalls, wie in 4.2 beschrieben, mittels der Westernblot-Methode auf molekulare Marker für oxidativen Stress und Inflammation hin untersucht. Die Exposition der Tiere gegenüber mikro-SPM zeigte für die meisten gemessenen Marker keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrollgruppe, während die nano-SPM deutliche Effekte erzielten. Die NADPH-Oxidase-Untereinheit NOX2, sowie ihre phosphorylierte regulatorische Untereinheit p47<sup>phox</sup> (NCF-1) zeigten eine signifikante Zunahme bei den nano-SPM, was auf eine Aktivierung des ROS-generierenden Komplexes hindeutet (Abb. 5.4 A, B). Passend dazu zeigte sich das phosphorylierte myristoylierte Alanin-reiche C-Kinase-Substrat (P-MARCKS) ebenfalls in dieser Gruppe erhöht, was auf Kinaseaktivität schließen lässt (Abb. 5.4 D). Das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), ein regulierendes Chemokin für die Migration und Infiltration von Monozyten und Makrophagen, stellte sich in der Gruppe der nano-SPM ebenfalls erhöht dar (Abb. 5.4 C). Durch oxidativen Stress wird die zelluläre Expression der Hämoxxygenase-1 (HO-1) zur zellulären Abwehr erhöht, was sich hier sowohl in der Gruppe der nano-SPM, als auch bei den mikro-SPM messen ließ (Abb. 5.4 E). Bei der Expression der Dihydrofolatreduktase (DHFR) ließ sich bei keiner der beiden Gruppen eine signifikante Änderung messen (Abb. 5.4 F)

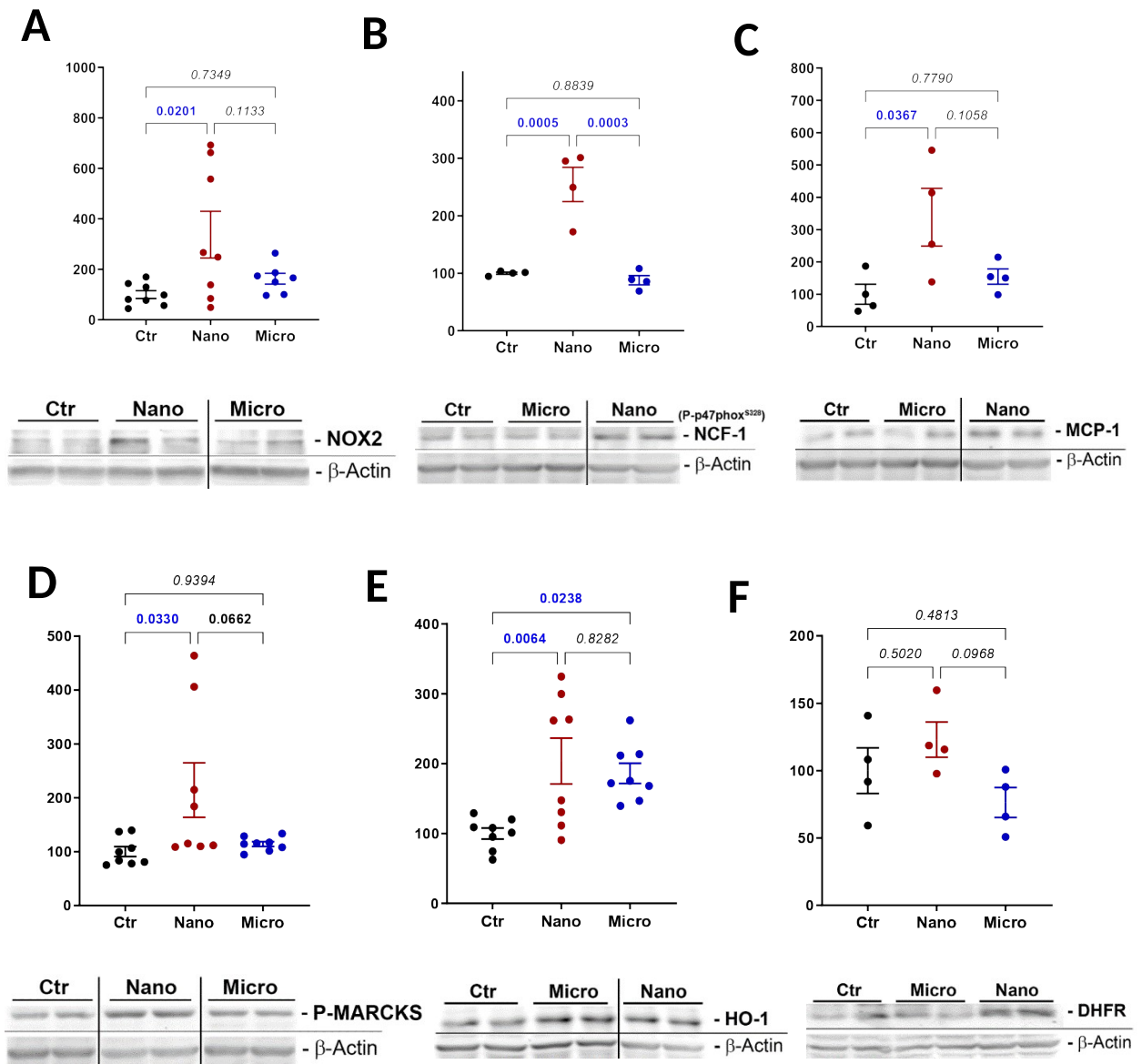


Abbildung 5.4 Auswirkungen magnetischer Mikro- und Nanopartikel auf die Expression von Herzproteinen. Die Western-Blot-Analyse der pulmonalen NADPH-Oxidase-Untereinheiten NOX2 (A) und phosphoryliertes p47phox (NCF-1) (B), Monozyten-Chemoattraktionsprotein-1 (MCP-1) (C), phosphoryliertes myristoyliertes Alanin-reiches C-Kinasesubstrat (P-MARCKS) (D), Hämoxxygenase-1 (HO-1) (E) und Dihydrofolatreduktase (DHFR) (F) wird für die Mäuse gezeigt, die den magnetischen Feinstaubpartikeln ausgesetzt waren. Unter den Graphen werden repräsentativ Beispiele von entsprechenden Membranabschnitten während der Analyse der Proteinbanden abgebildet. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, und die Anzahl der Mäuse wird durch Jitter-Plots angezeigt ( $n = 4-8$  Mäuse pro Gruppe). P-Werte für einzelne Vergleiche werden über den Graphen angezeigt und Werte  $< 0.05$  zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied.

## 5.4 Vaskuläre Funktions- und Inflammationsmarker

Mittels Western-Blot wurde, wie in 4.2 beschrieben, eine quantitative Bestimmung des Endothelin-1 (ET-1) und der endothelialen  $\cdot$ NO-Synthase (eNOS) in Aortengewebe von Mäusen durchgeführt, die mikro- und nano-SPM gegenüber exponiert waren. Hierbei ließ sich bei Proben der nano-SPM eine statistisch signifikante Erhöhung des ET-1 gegenüber der Kontrollgruppe ermitteln (Abb. 5.5 A). ET-1 als vasokonstriktiv wirkendes Molekül wird bei oxidativem Stress hochreguliert [123], was mit den erhöhten Werten an ROS vereinbar ist, die ebenfalls in dieser Gruppe gemessen wurden (siehe 4.1). Eine Verringerung von eNOS und damit eine mögliche Erniedrigung von vasodilatativ wirkendem  $\cdot$ NO ist hier als Trend zu verzeichnen (Abb. 5.5 B).

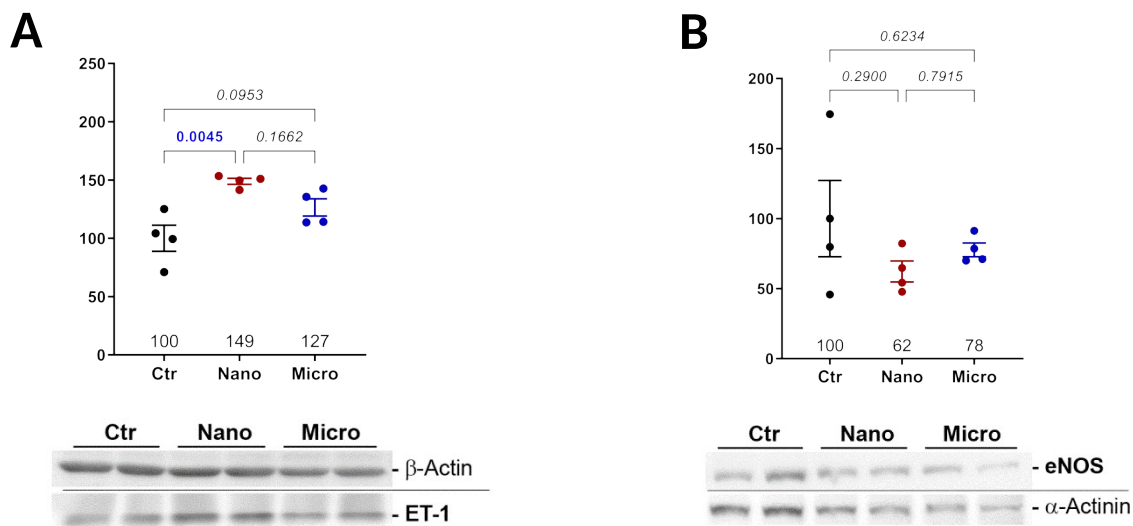


Abbildung. 5.5 - Die Western-Blot-Quantifizierungen für Endothelin-1 (ET-1) (A) und die endotheliale-NO-Synthase (eNOS) (B). Expression in der Aorta von Mäusen, die magnetischen synthetischen Partikeln ausgesetzt wurden, sind zusammen mit den repräsentativen Blots dargestellt. Unter den Graphen werden repräsentativ Beispiele von endsprechenden Membranabschnitten während der Analyse der Proteinbanden abgebildet. Die Daten werden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt, und die Anzahl der Mäuse wird durch Jitter-Diagramme angezeigt (n = 4 – 11 Mäuse pro Gruppe). P-Werte für einzelne Vergleiche werden über den Graphen angezeigt und Werte < 0.05 zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied.

## 6 Diskussion

Die gesundheitsschädigende Wirkung des Feinstaubes in der Luft ist bereits lange bekannt und es wurden zahlreiche Studien zu den relevanten pathophysiologischen Mechanismen durchgeführt. Dabei stellte sich vor allem heraus, dass die kleineren Partikel  $PM_{2.5}$  eine gesundheitsschädlichere Wirkung erzielen, als die größeren Partikel  $PM_{10}$ . Noch größere Partikel werden in der Regel von Cilien und Schleim abgefangen, bevor sie in tiefere Bereiche der Lunge vordringen können. Bislang relativ vernachlässigt wurden die kleinsten Partikel,  $PM_{0.1}$ , die zwar ebenfalls in  $PM_{2.5}$  enthalten sind, aber als einzelne Fraktion noch wenig erforscht wurden. Selbst in den aktuellen nationalen und internationalen Richtlinien für Luftqualität werden Nanopartikel noch nicht berücksichtigt. Dies liegt einerseits an fehlenden Standards in der Erfassung von  $PM_{0.1}$ , andererseits aber auch an der geringen Zahl von Kohortenstudien zu dieser Partikelgröße, die Aufschluss über ihre gesundheitsschädigenden Langzeitfolgen geben könnten. Dabei zeigen einige, vor allem präklinische, Studien bereits, dass gerade die kleinsten Partikel eine enorme Pathogenität besitzen. Ziel dieser Arbeit war es, die Nanopartikel  $PM_{0.1}$  vergleichend mit  $PM_{2.5}$  ohne Nanopartikel zu betrachten, um mögliche Unterschiede in der Verteilung im Organismus festzustellen, sowie anhand biologischer Marker die Pathogenität der einzelnen Fraktionen vergleichend zu betrachten.

### 6.1 Pulmonale Inflammationsmarker

Durch Inhalation gelangt Feinstaub üblicherweise über Mund und Nase in den Organismus. Auf dem Weg zur Lunge werden die meisten Partikel mit einer Größe von  $> 10 \mu m$  bereits von Schleim und Flimmerhärchen aufgehalten, während die kleineren Partikel von  $PM_{10}$  bis  $>PM_{2.5}$  bis in die Bronchiolen gelangen und Partikel  $<PM_{2.5}$  die Alveolen erreichen [71]. Oxidativer Stress (Kapitel 2.1) spielt eine große Rolle, wenn man Feinstaub und seine pathophysiologischen Folgen betrachtet. Er beschreibt eine Imbalance zugunsten der oxidativen Mechanismen, was bedeutet, dass ROS und RNS zelluläre Strukturen oxidieren und schädigen können, was wiederum zu einer Vielzahl systemischer und neurodegenerativer Erkrankungen führen kann. Einerseits können ROS bereits auf den Feinstaubpartikeln selbst vorkommen [55], andererseits führen die Partikel als Fremdkörper zur Aktivierung des Immunsystems, was die Bildung von ROS als zellulären Abwehrmechanismus zur

Folge hat. Beteiligt daran sind vor allem die membranständigen NADPH-Oxidasen (Kapitel 2.1.1), die Superoxid ( $O_2^-$ ), oder Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) generieren. Besonders relevant sind hier vor allem die  $O_2^-$  bildenden Isoformen NOX1 und NOX2. NOX1 findet sich auf dem Endothel, glatter Muskulatur und Kardiomyozyten, während NOX2 auf dem Endothel und auf Leukozyten zu finden ist [32,33]. In unseren Untersuchungen der Proteinexpression in Lungengewebe von Mäusen, die magnetischen Partikeln gegenüber exponiert waren, wurden diese Oxidasen und ihre regulatorischen Untereinheiten quantitativ gemessen. Es konnte festgestellt werden, dass die NADPH-Oxidase Untereinheiten NOX1 und NOX2 in der Gruppe der Mikropartikel eine signifikant erhöhte Expression zeigten. Die Gruppe der Nanopartikel zeigte diese nicht (Kapitel 5.2, Abb. 5.3A, B). Diese Beobachtungen lassen auf eine Erhöhung der zellulären Abwehr durch die Mikropartikel schließen, die Nanopartikel riefen hier keine signifikante Immunreaktion hervor. Die Proteinkinase C alpha 1 (PKC $\alpha$ 1) fördert die Bildung des NADPH-Oxidase-Komplexes und ihre Erhöhung konnte ebenfalls in der Gruppe der Mikropartikel gemessen werden, was zu einer Erhöhung der zellulären Abwehr des Lungengewebes gegenüber der Mikropartikel passt (Kapitel 5.2, Abb. 5.3E). p67phox, eine regulatorische Untereinheit von NOX2, zeigte sich in keiner der beiden Gruppen erhöht, ebenso wie P-MARCKS, ein Marker für PKC $\alpha$ 1-Aktivität (Kapitel 5.2 Abb. 5.3C, E). Ebenso konnte für die Gruppe der Mikropartikel PM<sub>2.5</sub> eine deutliche Erhöhung von CD68, einem Marker für die Aktivität von Makrophagen, gemessen werden. Diese Beobachtungen werden durch viele Studien bestätigt, die in vitro und in vivo feststellen, dass durch Feinstaubexposition eine Aktivierung und ein Shift der Alveolarmakrophagen zu einem inflammatorischen Typ erfolgt, der mit einer Freisetzung von entzündungsfördernden Interleukinen (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-18), sowie TNF $\alpha$  und NF- $\kappa$ B einhergeht [73–76,136]. Für die Nanopartikel konnten wir eine Erhöhung im Trend, aber nicht statistisch signifikant beobachten.

Das Lungengewebe der magnetischen und fluoreszierenden Partikel wurde ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 4.3) auf durch ROS oxidiertes DHE hin untersucht. Dabei ließ das Lungengewebe der fluoreszierenden Partikel wegen zu starker Fluoreszenz keine Auswertung zu. Bei den magnetischen Partikeln zeigte sich sowohl bei den Mikropartikeln, als auch bei den Nanopartikeln eine erhöhte Fluoreszenz, was auf ein erhöhtes Vorkommen von ROS schließen lässt (Kapitel 5.1, Abb. 5.2C).

Diese Ergebnisse deuten in der Zusammenschau auf eine kürzere Verweildauer der Nanopartikel gegenüber den Mikropartikeln in der Lunge hin, sodass zwar ROS gebildet werden, aber keine deutliche lokale Immunreaktion mit einer Erhöhung der Inflamationsparameter stattfindet. Dies kann durch deren Transmigration durch die Luft-Blut-Schranke in den Organismus erklärt werden. Diese Eigenschaft der Nanopartikel ist bereits beobachtet worden [8,11,12,69] und wird bei den folgenden Ergebnissen der Studie immer wieder deutlich. Die hohe pulmonale Pathogenität von Mikropartikeln mit lokaler Inflammation wird ebenfalls anhand der erhöhten Inflamationsmarker deutlich und ist bereits bekanntermaßen für Fibrosierung des Lungengewebes, sowie die Entwicklung und Verstärkung von Asthma und COPD, sowie pulmonale Krebserkrankungen mit verantwortlich [72,79–81,84–87,89].

## **6.2 Vaskuläre und kardiale Funktions- und Inflamationsmarker**

Feinstaub wirkt sich schädigend auf das kardiovaskuläre System aus, indem er oxidativen Stress auslöst, Inflammation verursacht und zu einer endothelialen Dysfunktion führt. Das Endothel spielt hierbei eine wichtige Rolle, da es nicht nur als Diffusionsbarriere dient, sondern maßgeblich an der Blutgerinnung, der Regulation des Gefäßtonus, der Angiogenese, Thermoregulation, sowie an der Adhäsion und Transmigration von Immunzellen aus dem Gefäß heraus beteiligt ist [40]. Für einen physiologischen Ablauf der endothelialen Prozesse ist besonders das Molekül  $\cdot\text{NO}$  relevant, welches von der endothelialen  $\cdot\text{NO}$ -Synthase, eNOS, gebildet wird.  $\cdot\text{NO}$  ist maßgeblich an der Vasodilatation beteiligt (Kapitel 2.2.2) und wirkt regulierend in der Immunantwort, sowie bei der Thrombozytenaggregation [49–51]. Kann das Endothel seine Funktionen nicht mehr erfüllen, kommt es zu proliferativen, prothrombotischen und proinflammatorischen Prozessen, die in Atherosklerose, Plaquebildung und verminderter Fähigkeit zur Relaxation der Gefäße resultieren. Daraus folgend ergeben sich wiederum systemische Erkrankungen wie Hypertonie, Koronare Herzerkrankungen, Diabetes und Nierenversagen [44–47]. Oxidativer Stress (Kapitel 2.1), wie er von Feinstaub ausgelöst wird, trägt maßgeblich zu einer Reduktion von  $\cdot\text{NO}$  bei. ROS können direkt mit  $\cdot\text{NO}$  zu Peroxynitrit reagieren, oder zu einer Entkopplung der eNOS führen, wodurch weitere ROS anstatt  $\cdot\text{NO}$  gebildet werden, was den Kreislauf weiter verstärkt. (Kapitel 2.3.1).

Die meisten epidemiologischen Studien, die sich mit den Auswirkungen von Feinstaub auf das kardiovaskuläre System beschäftigen, untersuchen die Auswirkungen von PM<sub>2.5</sub>. Hier wird eindeutig herausgestellt, dass eine Erhöhung der PM<sub>2.5</sub>-Werte kurz- und langfristig zu einer signifikanten Steigerung von Krankenhauseinweisungen aus kardialen Ursachen und zu gesteigerter kardiovaskulärer Mortalität führt [94–97]. Ob dabei die Nanopartikel hauptsächlich schädigend wirken, oder doch die größeren Mikropartikel, bleibt unklar.

In unseren Untersuchungen wurden die Aorten der Versuchstiere mittels Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 4.3) auf durch ROS oxidiertes DHE hin untersucht. Es präsentierte sich sowohl bei den fluoreszierenden, als auch den magnetischen Nanopartikeln eine statistisch signifikant erhöhte Fluoreszenz gegenüber der Kontrollgruppe, während die Mikropartikel eine Erhöhung im Trend zeigten (Kapitel 5.1, Abb. 5.1A, 5.2A). Ebenfalls wurde die aortale Proteinexpression in der Gruppe der magnetischen Partikel gemessen. Hier zeigte sich für die Nanopartikel eine signifikant erhöhte Expression des vasokonstriktiv wirkenden ET-1, bei den Mikropartikeln war diese nur im Trend messbar. Die eNOS dagegen stellte sich bei den Nanopartikeln im Trend vermindert dar, was auf eine mögliche Entkopplung und damit verminderte Werte für  $\cdot\text{NO}$  schließen lässt (Kapitel 5.4, Abb. 5.5 B, A).

Betrachtet man die hier gemessenen unterschiedlichen Ergebnisse der Mikro- und Nanopartikel für die Untersuchungen der Aorten, so wird ein signifikant deutlicherer Einfluss der Nanopartikel auf oxidativen Stress und die Proteinexpression deutlich, was mit stärkeren negativen Effekten der Nanopartikel auf das Gefäßsystem einhergeht. Neben den oben beschriebenen Untersuchungen wurden Ringe der Aorten der gleichen Versuchstiere auf vaskuläre Funktionseinschränkungen untersucht. Messbar war bei sowohl den fluoreszierenden, als auch den magnetischen Nanopartikeln eine signifikante Erhöhung des Blutdrucks, der bei Mikropartikeln nicht signifikant erhöht war. Funktionseinschränkungen in der endothelabhängigen Relaxation durch Acetylcholin zeigten sich signifikant bei den fluoreszierenden Nanopartikeln, während die Mikropartikel diese nicht zeigten. Die endothelunabhängige Relaxation zeigte sich dagegen unverändert, was im Vergleich auf eine Endothelschädigung durch fluoreszierende Nanopartikel hindeutet (Kapitel 2.4.3.3.1, Abb. 2.17).

Um den Einfluss der Partikel auf das kardiovaskuläre System noch besser beurteilen zu können, wurde das Herzgewebe der Versuchstiere auf Veränderung der Proteinexpression durch oxidativen Stress und Inflammation untersucht. Hier zeigte sich deutlich der Effekt der Nanopartikel, während die Mikropartikel wenig Einfluss auf die Proteinexpression zeigten. Die Nanopartikel zeigten eine deutlich gesteigerte Expression der ROS-generierenden Komplexe in Form von NOX2 und der regulatorischen Untereinheit p47<sup>phox</sup>, sowie P-MARCKS, was auf gesteigerte Kinaseaktivität schließen lässt (Kapitel 5.3, Abb. 5.4 A, B, D). Zusammen mit der signifikanten Erhöhung von MCP-1, einem regulierenden Chemokin für die Migration und Infiltration von Monozyten und Makrophagen, weist dies auf eine deutlich gesteigerte Immunaktivität und Inflammation hin (Kapitel 5.3, Abb. 5.4C). In der Gruppe der Mikropartikel zeigte sich für keinen der genannten Parameter eine Erhöhung. Jedoch konnte sowohl bei den Nano- als auch bei den Mikropartikeln eine gesteigerte Expression der HO-1, einem Marker der zellulären Abwehr, gemessen werden (Kapitel 5.3, Abb. 5.4E).

Somit werden in unseren Untersuchungen große Unterschiede zwischen Nano- und Mikropartikeln deutlich, die auf eine signifikant stärkere Ausprägung von oxidativem Stress und einer deutlich erhöhten Immunantwort gegenüber den Mikropartikeln hinweisen. Erklärt wird dies durch die bereits in Kapitel 6.1 genannte Transmigration der Nanopartikel in den systemischen Kreislauf, während die Mikropartikel in der Lunge verbleiben und dort über die Induktion einer systemischen Inflammation ihre schädigenden Eigenschaften auf das kardiovaskuläre System ausüben.

Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Studien, die Nano- und Mikropartikel verglichen. Hier wurde gezeigt, dass Nanopartikel umso mehr zu kardiovaskulärer Mortalität beitragen, desto kleiner sie sind. Außerdem konnte im Gegensatz zu den Nanopartikeln für Mikropartikel dort keine erhöhte kardiovaskuläre Mortalität nachgewiesen werden. Dafür zeigten die Mikropartikel einen Anstieg der respiratorischen Mortalität, den die Nanopartikel nicht zeigten [117–119].

### 6.3 Hirnorganische Auswirkungen

Neben der Fähigkeit die Luft-Blut-Schranke der Alveolen zu passieren, können Nanopartikel ebenfalls die Blut-Hirn-Schranke überwinden und ihre Funktion beeinträchtigen, oder durch Migration entlang des N. olfactorius bis in das Gehirn vordringen. Dabei besteht die Annahme, dass lediglich die Nanopartikel in der Lage sind, die Blut-Hirn-Schranke zu überwinden [98–100]. Vor allem kleine Nanopartikel konnten hier bereits in tierischen Hirnproben identifiziert werden [114]. Im Gehirn angelangt induzieren die Feinstaubpartikel immunologische Reaktionen, die mit oxidativem Stress und Inflammation einhergehen, wodurch es zu Ablagerungen von Proteinen kommt, was ein Merkmal der neurodegenerativen Erkrankungen ist [90,102–105]. Dennoch betrachten die meisten Studien, die sich mit den Auswirkungen von Feinstaub auf neurodegenerative Erkrankungen befassen, lediglich die Fraktion  $PM_{2.5}$ , die aber natürlich auch die Partikel der Größe  $PM_{0.1}$  in sich beinhaltet. Epidemiologische Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen der Exposition von  $PM_{2.5}$  und dem Auftreten, sowie der Verschlechterung der Parkinsonerkrankung gezeigt [107,108]. Im Zellmodell konnte  $PM_{2.5}$  als ein Auslöser dieser Prozesse identifiziert werden, die zur Ablagerung von  $\alpha$ -Synuclein führen [109]. Ein Hauptauslöser für Morbus Alzheimer ist die Ablagerung von Beta-Amyloid (A $\beta$ ) im Gehirn. Daten einer Querschnittsstudie zeigten eine Korrelation zwischen der Höhe der jährlichen  $PM_{2.5}$ -Exposition und der Menge an abgelagertem A $\beta$  [110]. Ebenfalls epidemiologisch bestätigt wurde für einen Anstieg der  $PM_{2.5}$ -Konzentration das häufigere Auftreten von Demenz und Alzheimer [111,112].

In unseren Untersuchungen wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie (Kapitel 4.3) Gewebe des Kortex der Versuchstiere auf durch ROS oxidiertes DHE hin untersucht. Dabei wurde für beide Gruppen der Nanopartikel eine signifikante Erhöhung der Fluoreszenz gemessen, die sich in der Gruppe der Mikropartikel nicht zeigte (Kapitel 5.1 Abb. 5.1C, 5.2B). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit der Annahme, dass lediglich die Nanopartikel die Blut-Hirn-Schranke überwinden können und dort zu oxidativem Stress und einer Immunantwort führen.

## 6.4 Relevanz für die Exposition der Bevölkerung mit UFP

Bezüglich der epidemiologischen Auswirkungen von UFP gibt es bislang nur sehr wenige Daten, die einen Rückschluss auf gesundheitliche Folgen zulassen. In einer niederländischen Kohortenstudie wurden über 1 Jahr Konzentrationen von  $PM_{0,1}$  und  $PM_{2,5}$  in der Luft gemessen und im räumlichen Zusammenhang bzgl. dem Auftreten kardiovaskulärer Erkrankungen verglichen. Hier ergab sich für UFP eine Hazard Ratio von 1.18 (95% CI: 1.03, 1.34), während eine Erhöhung der Konzentration von  $PM_{2,5}$  keinen signifikanten Anstieg der kardiovaskulären Erkrankungen zeigte [120]. Um die Relevanz der Exposition der Bevölkerung gegenüber UFP zu betrachten, wurde die ermittelte Hazard Ratio dieser Studie von Kuntic et al. mit einem Expositionsmodell gegenüber Luftschadstoffen verknüpft. Die globalen UFP-Expositionsdaten wurden herunterskaliert und mit der Hazard Ratio der niederländischen Studie verknüpft. Hierbei wurde angenommen, dass die in den Niederlanden gewonnenen Ergebnisse repräsentativ für Europa sind. Die Analysen deuten darauf hin, dass das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen aufgrund von UFP-Exposition vor allem eine Folge der Luftverschmutzung in städtischen Zentren ist. Für die 27 Länder der Europäischen Union konnte den UFP bei einer Gesamtbevölkerung von 446 Millionen eine zurechenbare Inzidenz von 419 (95% CI: 78-712) Tausend pro Jahr zuschreiben. Dabei verzeichnet Deutschland mit 82 (95% CI: 15-142) Tausend Toten die höchste Anzahl der UFP zurechenbaren Todesfälle, während Italien mit 67 (95% CI: 13-115) und Frankreich mit 42 (95% CI: 7-71) Tausend Toten auf Platz 2 u 3 landen. Diese Zahlen ändern sich, sobald die Inzidenz mit der Einwohnerdichte korreliert wird. Pro 100.000 Einwohner gerechnet belegt hier Griechenland mit 171 (95% CI: 37-256) jährlichen Todesfällen durch UFP Platz 1, Ungarn mit 165 (95% CI: 34-253) Platz 2 und Bulgarien verzeichnet mit 159 (95% CI: 30-267) Todesfällen die dritthöchste Anzahl. Die geringste Zahl der zurechenbaren Todesfälle verzeichnen Irland mit 33 (95% CI: 7-53) und Finnland mit 43 (95% CI: 8-74) pro 100.000 Einwohner. Nimmt man in Ermangelung weiterer epidemiologischer Studien an, dass die hier genannte niederländische Studie und ihre Hazard Ratio weltweit repräsentativ sind, so ergibt sich eine jährliche globale Inzidenz für kardiovaskuläre Erkrankungen von 5,6 (95% CI: 1,1-9,3) Millionen, die auf die Exposition gegenüber UFP zurückzuführen sind (Abb.6.1). Bei einer Gesamtinzidenz von 47,1 (95% UI: 40,9-53,9) Millionen jährlichen CVD, wird der Exposition gegenüber UFP hier ein Anteil von 11%-22% der Gesamtinzidenz zugerechnet [121].

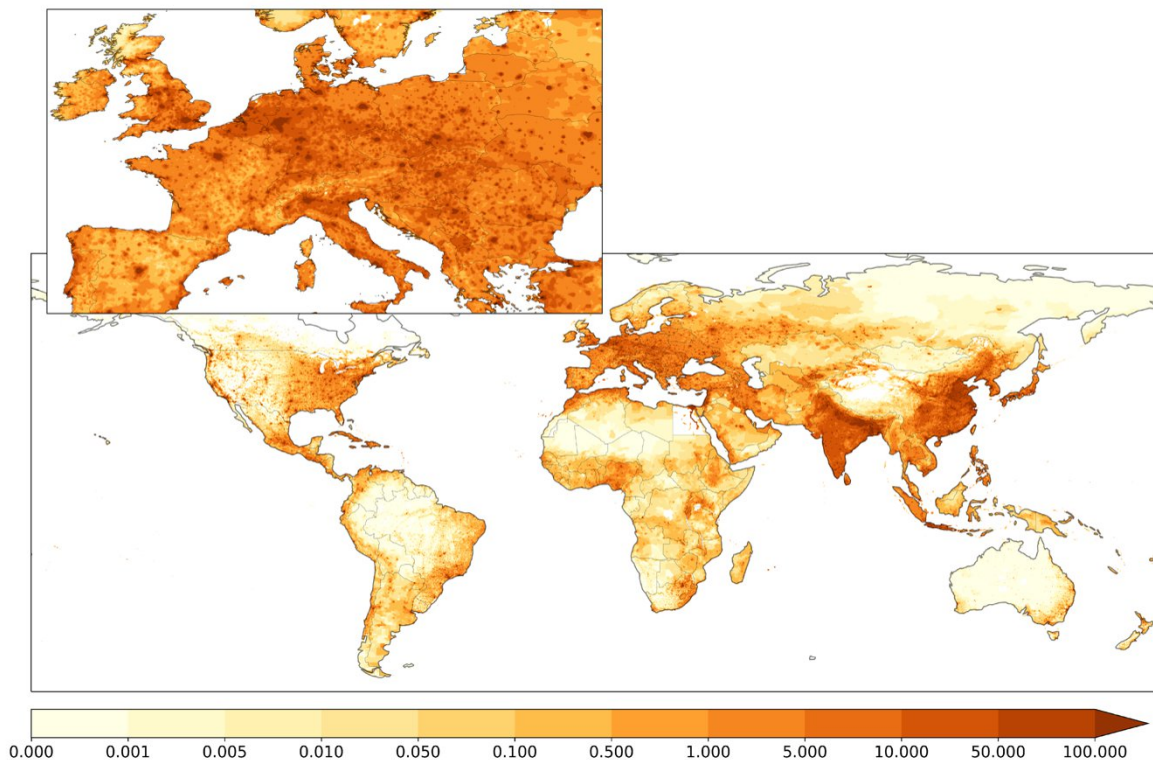


Abbildung 6.1 – Inzidenz der jährlichen kardiovaskulären Erkrankungen (CVD), die UFP zugeschrieben werden. Die Einheiten sind die Anzahl der Fälle pro Fläche von 10kmx10km. Die Ergebnisse legen nahe, dass die Exposition gegenüber UFP und die Auswirkungen von CVD vor allem in städtischen Gebieten auftreten.

## 6.5 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Ergebnisse der Studie verdeutlichen, dass Mikro- und Nanopartikel erhebliche Auswirkungen auf oxidativen Stress und inflammatorische Prozesse in den Versuchstieren haben, was auf potenziell gravierende Folgen für die menschliche Gesundheit hindeutet. Des Weiteren scheint eine Differenzierung zwischen Mikro- und Nanopartikeln von großer Wichtigkeit zu sein, wenn über die gesundheitlichen Auswirkungen von Feinstaub gesprochen und geforscht wird. Während Mikropartikel in der Lunge akkumulieren und vor allem dort für lokale Inflammation sorgen, die sich jedoch von dort ausgehend auch systemisch manifestieren kann, besitzen Nanopartikel die Fähigkeit, die Luft-Blut-Schranke zu überwinden und so in den systemischen Kreislauf zu gelangen. Auf diesem Weg erreichen sie die Blutgefäße und beeinflussen noch deutlicher, als die größeren Mikropartikel, auch weitere Organe, wie das Herz und das Gehirn. Somit wird bei der Betrachtung von Erkrankungen der Lunge und Atemwege vermehrt ein Blick auf Mikropartikel, bei Herz-Kreislauf-

Erkrankungen und weiteren Organmanifestationen eher der Blick auf Nanopartikel gerichtet sein. Erste klinische und eher regionale epidemiologische Studien bestätigen diese Zusammenhänge bereits und verdeutlichen die Notwendigkeit einer standardisierten und flächendeckenden Messung von Nanopartikeln in unserer Umwelt. Somit könnten weitere und weitreichendere epidemiologische Erkenntnisse gewonnen werden und die Wichtigkeit einer Überarbeitung der Luftqualitätsstandards bezüglich der Nanopartikel noch deutlicher hervorheben.

## **6.6 Einschränkungen der Studie**

Die Nano-SPM in dieser Studie hatten einen mittleren Durchmesser von 200nm-250nm. Somit können sie per Definition nicht als  $PM_{0.1}$  bezeichnet werden, obwohl die in Abb. 3.1 dargestellte Mengenverteilung zeigt, dass viele Partikel der Größe  $PM_{0.1}$  enthalten waren. Zudem wurde in einer Übersichtsarbeit ein Bereich bis zu  $200\mu m$  festgestellt, in dem Partikel die Alveolarregion erreichen und in den Blutkreislauf transmigrieren können [137]. Die Wahl eines chemisch inerten Materials beruhte vor allem auf dem Ziel dieser Arbeit, Größeneffekte zu betrachten und diese nicht durch zusätzliche chemische Effekte zu überlagern. Während der Studie stellten wir mehrere Einschränkungen in Bezug auf Studien zur Feinstaubbelastung im Allgemeinen und das aktuelle Expositionsprotokoll im Besonderen fest. Eine der größten Hürden bei der Bewertung der Auswirkungen von Feinstaub unterschiedlicher Größe ist die Konzentration und Größenverteilung. Da die meisten Feinstaubpartikel nicht einheitlich groß sind, sondern einer bestimmten Verteilung (z. B. Gauß) folgen, ist es ziemlich schwierig, eine präzise Expositionskonzentration (Massenstrom in  $\mu g/m^3$  oder Partikelstrom in  $N/m^3$ ) zu erreichen. Die Schwierigkeit ergibt sich daraus, dass größere Partikel eine unverhältnismäßig größere Masse als kleine Partikel tragen und die Massenkonzentration die übliche Methode zur Definition der Feinstaubkonzentration ist, wodurch sie stark von den größeren Partikeln abhängt (Massenverteilung siehe Abbildung 3.1). Bei der Anzahlverteilung ist es genau umgekehrt, da kleinere Partikel bei gleicher Gesamtmasse häufiger vorkommen. Daher ist es schwierig, allein auf der Grundlage des durchschnittlichen Durchmessers Rückschlüsse auf die gesundheitlichen Auswirkungen von Feinstaub zu ziehen, insbesondere angesichts der unterschiedlichen Eindringtiefe und Organverteilung. Wir führten das Fehlen einer Anhäufung von fluoreszierendem Nanopartikel-Feinstaub in der Lunge exponierter

Mäuse auf deren Transmigration in den Blutkreislauf zurück. Da in der vorliegenden Studie jedoch keine ausgeatmeten Partikel gemessen wurden, könnte das Fehlen eines ausgeprägten Fluoreszenzsignals in der Lunge auf die höhere Ausatemungsrate von Nanopartikeln zurückzuführen sein. Die ausgeprägteren Auswirkungen von SPM in Nanogröße im Vergleich zu Mikropartikeln auf Funktionsparameter, z. B. Blutdruckanstieg, und Parameter für oxidativen Stress und Entzündungsmarker in entfernten Organen wie Aorta, Herz und Gehirn deuten jedoch auf eine effizientere Transmigration von Nanopartikeln durch die Lunge hin. Während eine Endotoxin-Kontamination der synthetischen Partikel durch den Hersteller ausgeschlossen wurde, könnte die unterschiedliche Ummantelung aus Polysterol und Siliziumdioxid einen Einfluss auf die Messungen gehabt haben. Es ist ebenfalls nicht auszuschließen, dass eine relevante Anzahl an Nano-SPM über orale Aufnahme durch Fellpflege in den Blutkreislauf gelangt ist, da wir für die Exposition ein Ganzkörper-Expositionssystem verwendet haben (dies würde immer noch nicht die fehlende Fluoreszenz in der Lunge bei Exposition mit Nano-SPM erklären). Durch orale Aufnahme könnten die Partikel in den Darm gelangt sein, dessen Epithel eine höhere Durchlässigkeit bietet, als das Lungenepithel. Schließlich könnte für manche Parameter die Anzahl der Versuchstiere (n=3-4) zu einer verminderten Aussagekraft führen.

## 7 Zusammenfassung

Die schädlichen Auswirkungen von Feinstaub auf die Gesundheit sind bereits lange bekannt und seit den 80-er Jahren werden in der EU kontinuierlich Richtlinien für eine Verbesserung der Luftqualität erarbeitet und überwacht. Dies geschah auf der Basis von epidemiologischen Studien, die zunächst die Einflüsse von  $PM_{10}$  untersuchten, dann jedoch erkannt wurde, dass von kleineren Partikel  $PM_{2.5}$  noch schädlichere Wirkungen ausgehen könnten. Somit werden aktuell Messungen der Feinstaubbelastung und große epidemiologische Studien in Bezug zu  $PM_{2.5}$  durchgeführt. Durch einige präklinische Studien und wenige epidemiologische Erkenntnisse erhärtet sich jedoch der Verdacht, dass die schädlichsten systemischen Auswirkungen durch die kleinsten Partikel,  $PM_{0.1}$  ausgelöst werden, die durch die Luft-Blut-Schranke in den Kreislauf gelangen und so auch weitere Organe erreichen können. In dieser Arbeit werden Mikropartikel der Größen  $2.16\mu m$  und  $4.13\mu m$  mit Nanopartikeln der Größe  $0.25\mu m$  im Hinblick auf ihre räumliche Verteilung nach der Inhalation im Mausmodell untersucht und molekulare Funktions- und Inflammationsmarker betrachtet, die Aufschluss auf die schädlichen Auswirkungen der unterschiedlich großen Partikel liefern können. Die Ergebnisse zeigen, dass Mikropartikel vorwiegend in der Lunge akkumulieren und dort zu einer lokalen Aktivierung des Immunsystems mit Entzündungsreaktion führen, die sich jedoch auch systemisch ausbreiten kann. Nanopartikel dagegen verweilen kürzer in der Lunge und zeigen dort eine weitaus geringere Immunaktivierung und Inflammation. Jedoch überwinden sie die Luft-Blut-Schranke und gelangen über den Kreislauf zu weiteren Organen, wie beispielsweise Herz und sogar in das Gehirn, wo sie zu Inflammation und Funktionseinschränkungen führen können. Somit verdeutlicht diese Arbeit, dass bei der Betrachtung von gesundheitlichen Folgen der Feinstaubbelastung eine weitere Differenzierung zwischen  $PM_{2.5}$  und  $PM_{0.1}$  erfolgen sollte. Sie zeigt die Notwendigkeit auf, eine standardisierte, flächendeckende Messung von  $PM_{0.1}$  zu etablieren und so größere epidemiologische Studien zu ermöglichen, die weiteren Aufschluss über den Einfluss von Nanopartikeln auf die Gesundheit liefern.

## **8 Danksagung**

Ich danke vor allem Prof. Dr. Daiber und seiner Arbeitsgruppe, die mir die Möglichkeit gaben, einen Einblick in die Forschung zu gewinnen und während meiner Zeit als studentische Hilfskraft in mehreren Projekten einen Beitrag zur Gewinnung neuer Erkenntnisse zu leisten.

Hier danke ich besonders Marin und Ivana, die mich seit meinem ersten Tag im Labor begleitet haben und mit ihrem Wissen und ihrer Geduld in die verschiedenen Versuchsmethoden und Geräte eingewiesen haben.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Freundin und meinen Eltern, ohne deren Unterstützung das Studium, sowie diese Arbeit nicht so leicht möglich gewesen wären.

## 9 Tabellarischer Lebenslauf

### Lebenslauf

David Nußbaum

#### Bildungsweg

Gymnasium Rheinbach 08/2002 - 05/2011	•	Abitur
St. Marien-Hospital Bonn 09/2011 - 09/2012	•	Freiwilliges Soziales Jahr
Medakademie Köln / ASB Bonn 09/2012 - 05/2015	•	Rettungssanitäter und Rettungsassistent
Johannes Gutenberg- Universität Mainz / Rheinische Friedrich- Wilhelms-Universität Bonn 10/2015 - 11/2024	•	Studium der Humanmedizin Nebenberufliche Tätigkeiten: <ul style="list-style-type: none"><li>- Studentische Aushilfe auf der Intensivstation des St. Marien-Hospital Bonn</li><li>- Schlaflabor des Marienhaus Klinikum Mainz</li><li>- wissenschaftliche Hilfskraft im Labor für Molekulare Kardiologie and der Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Arbeitsgruppe Univ.-Prof. Dr. med. Thomas Münzel und Prof. Dr. rer. nat. et med. habil. Andreas Daiber)</li></ul>
Marienhospital Euskirchen (Euskirchen) 03/2025	•	Weiterbildung zum Facharzt für Kardiologie

## 10 Literaturverzeichnis

### References

- [1] Ralf Gödde, "The Great Smog" in London, 2022. <https://www1.wdr.de/radio/wdr5/sendungen/zeitzeichen/zeitzeichen-great-smog-london-100.html> (accessed 27 June 2024).
- [2] Manuel Opitz, "Great Smog" 1952: Der Todesnebel, der 12.000 Menschen das Leben kostete, 2022. <https://www.geo.de/wissen/weltgeschichte/great-smog-1952--londons-toedlicher-nebel-32960300.html> (accessed 27 June 2024).
- [3] B.J. Polivka, The Great London Smog of 1952, *Am. J. Nurs.* 118 (2018) 57–61. <https://doi.org/10.1097/01.NAJ.0000532078.72372.c3>.
- [4] M.e.a. Brauer, Global burden and strength of evidence for 88 risk factors in 204 countries and 811 subnational locations, 1990–2021: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2021, *The Lancet* (2024) 2162–2203.
- [5] WHO European Centre for Environment and Health, Air pollution: Impact of air pollution, 2024. [https://www.who.int/health-topics/air-pollution#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/air-pollution#tab=tab_2) (accessed 28 June 2024).
- [6] J. Lelieveld, A. Haines, R. Burnett, C. Tonne, K. Klingmüller, T. Münzel, A. Pozzer, Air pollution deaths attributable to fossil fuels: observational and modelling study, *BMJ* 383 (2023) e077784. <https://doi.org/10.1136/bmj-2023-077784>.
- [7] J. Lelieveld, K. Klingmüller, A. Pozzer, U. Pöschl, M. Fnais, A. Daiber, T. Münzel, Cardiovascular disease burden from ambient air pollution in Europe reassessed using novel hazard ratio functions, *Eur. Heart J.* 40 (2019) 1590–1596. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehz135>.
- [8] H.-S. Kwon, M.H. Ryu, C. Carlsten, Ultrafine particles: unique physicochemical properties relevant to health and disease, *Exp. Mol. Med.* 52 (2020) 318–328. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0405-1>.
- [9] World Health Organization, WHO European Centre for Environment and Health, WHO global air quality guidelines: Particulate matter (PM<sub>2.5</sub> and PM<sub>10</sub>), ozone, nitrogen dioxide, sulfur dioxide and carbon monoxide, WHO European Centre for Environment and Health, Bonn, Germany, 2021.
- [10] H. Kan, World Health Organization air quality guidelines 2021: implication for air pollution control and climate goal in China, *Chin. Med. J. (Engl)* 135 (2022) 513–515. <https://doi.org/10.1097/CM9.0000000000002014>.
- [11] N.R. Yacobi, N. Malmstadt, F. Fazlollahi, L. DeMaio, R. Marchelletta, S.F. Hamm-Alvarez, Z. Borok, K.-J. Kim, E.D. Crandall, Mechanisms of alveolar epithelial

- translocation of a defined population of nanoparticles, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 42 (2010) 604–614. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0138OC>.
- [12] M.R. Miller, J.B. Raftis, J.P. Langrish, S.G. McLean, P. Samutrtai, S.P. Connell, S. Wilson, A.T. Vesey, P.H.B. Fokkens, A.J.F. Boere, P. Krystek, C.J. Campbell, P.W.F. Hadoke, K. Donaldson, F.R. Cassee, D.E. Newby, R. Duffin, N.L. Mills, Inhaled Nanoparticles Accumulate at Sites of Vascular Disease, *ACS Nano* 11 (2017) 4542–4552. <https://doi.org/10.1021/acsnano.6b08551>.
- [13] M. Kuntic, I. Kuntic, O. Hahad, J. Lelieveld, T. Münzel, A. Daiber, Impact of air pollution on cardiovascular aging, *Mech. Ageing Dev.* 214 (2023) 111857. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2023.111857>.
- [14] O. Hahad, S. Rajagopalan, J. Lelieveld, M. Sørensen, M. Kuntic, A. Daiber, M. Basner, M. Nieuwenhuijsen, R.D. Brook, T. Münzel, Noise and Air Pollution as Risk Factors for Hypertension: Part II-Pathophysiologic Insight, *Hypertension* 80 (2023) 1384–1392. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.123.20617>.
- [15] M. Kuntic, I. Kuntic, R. Krishnankutty, A. Gericke, M. Oelze, T. Junglas, M.T. Bayo Jimenez, P. Stamm, M. Nandudu, O. Hahad, K. Keppeler, S. Daub, K. Vujacic-Mirski, S. Rajlic, L. Strohm, H. Ubbens, Q. Tang, S. Jiang, Y. Ruan, K.G. Macleod, S. Steven, T. Berkemeier, U. Pöschl, J. Lelieveld, H. Kleinert, A. von Kriegsheim, A. Daiber, T. Münzel, Co-exposure to urban particulate matter and aircraft noise adversely impacts the cerebro-pulmonary-cardiovascular axis in mice, *Redox Biol.* 59 (2023) 102580. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102580>.
- [16] O. Hahad, K. Frenis, M. Kuntic, A. Daiber, T. Münzel, Accelerated Aging and Age-Related Diseases (CVD and Neurological) Due to Air Pollution and Traffic Noise Exposure, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021). <https://doi.org/10.3390/ijms22052419>.
- [17] A. Daiber, M. Kuntic, O. Hahad, L.G. Delogu, S. Rohrbach, F. Di Lisa, R. Schulz, T. Münzel, Effects of air pollution particles (ultrafine and fine particulate matter) on mitochondrial function and oxidative stress - Implications for cardiovascular and neurodegenerative diseases, *Arch. Biochem. Biophys.* 696 (2020) 108662. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2020.108662>.
- [18] M. Kuntić, O. Hahad, T. Münzel, A. Daiber, Crosstalk between Oxidative Stress and Inflammation Caused by Noise and Air Pollution-Implications for Neurodegenerative Diseases, *Antioxidants (Basel)* 13 (2024). <https://doi.org/10.3390/antiox13030266>.
- [19] O. Hahad, J. Lelieveld, S. Al-Kindi, V.H. Schmitt, L. Hobohm, K. Keller, M. Rösli, M. Kuntic, A. Daiber, Krankheitslast in Deutschland durch Feinstaubbelastung Ergebnisse der GBD(Global Burden of Disease)-Studie 2019, *Herz* 50 (2025) 42–50. <https://doi.org/10.1007/s00059-024-05269-8>.
- [20] H. Sies, C. Berndt, D.P. Jones, Oxidative Stress, *Annu. Rev. Biochem.* 86 (2017)

- 715–748. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045037>.
- [21] J.Q. Wu, T.R. Kosten, X.Y. Zhang, Free radicals, antioxidant defense systems, and schizophrenia, *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 46 (2013) 200–206. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2013.02.015>.
- [22] Y. Taniyama, K.K. Griendling, Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms, *Hypertension* 42 (2003) 1075–1081. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F>.
- [23] E.C. Cheung, K.H. Vousden, The role of ROS in tumour development and progression, *Nat. Rev. Cancer* 22 (2022) 280–297. <https://doi.org/10.1038/s41568-021-00435-0>.
- [24] S. Steven, K. Frenis, M. Oelze, S. Kalinovic, M. Kuntic, M.T. Bayo Jimenez, K. Vujacic-Mirski, J. Helmstädter, S. Kröller-Schön, T. Münzel, A. Daiber, Vascular Inflammation and Oxidative Stress: Major Triggers for Cardiovascular Disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019) 7092151. <https://doi.org/10.1155/2019/7092151>.
- [25] M.P. Murphy, How mitochondria produce reactive oxygen species, *Biochem. J.* 417 (2009) 1–13. <https://doi.org/10.1042/BJ20081386>.
- [26] A. Panday, M.K. Sahoo, D. Osorio, S. Batra, NADPH oxidases: an overview from structure to innate immunity-associated pathologies, *Cell. Mol. Immunol.* 12 (2015) 5–23. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.89>.
- [27] T. Matsubara, M. Ziff, Superoxide anion release by human endothelial cells: synergism between a phorbol ester and a calcium ionophore, *J. Cell. Physiol.* 127 (1986) 207–210. <https://doi.org/10.1002/jcp.1041270203>.
- [28] M. Sausbier, R. Schubert, V. Voigt, C. Hirneiss, A. Pfeifer, M. Korth, T. Kleppisch, P. Ruth, F. Hofmann, Mechanisms of NO/cGMP-dependent vasorelaxation, *Circ. Res.* 87 (2000) 825–830. <https://doi.org/10.1161/01.res.87.9.825>.
- [29] S. Schildknecht, M. Bachschmid, V. Ullrich, Peroxynitrite provides the peroxide tone for PGHS-2-dependent prostacyclin synthesis in vascular smooth muscle cells, *FASEB J.* 19 (2005) 1169–1171. <https://doi.org/10.1096/fj.04-3465fje>.
- [30] J.M. McCord, B.B. Keele, I. Fridovich, An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 68 (1971) 1024–1027. <https://doi.org/10.1073/pnas.68.5.1024>.
- [31] K. Jomova, S.Y. Alomar, S.H. Alwasel, E. Nepovimova, K. Kuca, M. Valko, Several lines of antioxidant defense against oxidative stress: antioxidant enzymes, nanomaterials with multiple enzyme-mimicking activities, and low-molecular-weight antioxidants, *Arch. Toxicol.* 98 (2024) 1323–1367. <https://doi.org/10.1007/s00204-024-03696-4>.
- [32] G.R. Drummond, C.G. Sobey, Endothelial NADPH oxidases: which NOX to target in vascular disease?, *Trends Endocrinol. Metab.* 25 (2014) 452–463. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2014.06.012>.

- [33] V. Braunersreuther, F. Montecucco, M. Asrih, G. Pelli, K. Galan, M. Frias, F. Burger, A.L.G. Quinderé, C. Montessuit, K.-H. Krause, F. Mach, V. Jaquet, Role of NADPH oxidase isoforms NOX1, NOX2 and NOX4 in myocardial ischemia/reperfusion injury, *J. Mol. Cell. Cardiol.* 64 (2013) 99–107. <https://doi.org/10.1016/j.yjmcc.2013.09.007>.
- [34] E.A. Vilas-Boas, D.C. Almeida, L.P. Roma, F. Ortis, A.R. Carpinelli, Lipotoxicity and  $\beta$ -Cell Failure in Type 2 Diabetes: Oxidative Stress Linked to NADPH Oxidase and ER Stress, *Cells* 10 (2021). <https://doi.org/10.3390/cells10123328>.
- [35] F. Violi, R. Carnevale, L. Loffredo, P. Pignatelli, J.I. Gallin, NADPH Oxidase-2 and Atherothrombosis: Insight From Chronic Granulomatous Disease, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (2017) 218–225. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.116.308351>.
- [36] M.Y. Zeng, I. Miralda, C.L. Armstrong, S.M. Uriarte, J. Bagaitkar, The roles of NADPH oxidase in modulating neutrophil effector responses, *Mol. Oral Microbiol.* 34 (2019) 27–38. <https://doi.org/10.1111/omi.12252>.
- [37] T.J. Guzik, N.E. Hoch, K.A. Brown, L.A. McCann, A. Rahman, S. Dikalov, J. Goronzy, C. Weyand, D.G. Harrison, Role of the T cell in the genesis of angiotensin II induced hypertension and vascular dysfunction, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 2449–2460. <https://doi.org/10.1084/jem.20070657>.
- [38] P. Wenzel, M. Knorr, S. Kossmann, J. Stratmann, M. Hausding, S. Schuhmacher, S.H. Karbach, M. Schwenk, N. Yogev, E. Schulz, M. Oelze, S. Grabbe, H. Jonuleit, C. Becker, A. Daiber, A. Waisman, T. Münzel, Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular dysfunction, *Circulation* 124 (2011) 1370–1381. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.111.034470>.
- [39] M.K. Richardson, G. Keuck, The revolutionary developmental biology of Wilhelm His, Sr, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 97 (2022) 1131–1160. <https://doi.org/10.1111/brv.12834>.
- [40] W.C. Aird, Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms, *Circ. Res.* 100 (2007) 158–173. <https://doi.org/10.1161/01.RES.0000255691.76142.4a>.
- [41] Hans-Christian Pape, Armin Kurtz, Stefan Silbernagel (Ed.), *Physiologie: Kapitel 6.3.3 Aufbau und Funktion der Gefäßwand*, 8th ed., Thieme, 2018.
- [42] T. Münzel, S. Steven, A. Daiber, Organic nitrates: update on mechanisms underlying vasodilation, tolerance and endothelial dysfunction, *Vascul. Pharmacol.* 63 (2014) 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2014.09.002>.
- [43] E.F. Etter, M. Eto, R.L. Wardle, D.L. Brautigan, R.A. Murphy, Activation of myosin light chain phosphatase in intact arterial smooth muscle during nitric oxide-induced relaxation, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 34681–34685. <https://doi.org/10.1074/jbc.M104737200>.
- [44] D.H. Endemann, E.L. Schiffrin, Endothelial dysfunction, *J. Am. Soc. Nephrol.* 15 (2004)

- 1983–1992. <https://doi.org/10.1097/01.ASN.0000132474.50966.DA>.
- [45] A.S. de Vriese, T.J. Verbeuren, J. van de Voorde, N.H. Lameire, P.M. Vanhoutte, Endothelial dysfunction in diabetes, *Br. J. Pharmacol.* 130 (2000) 963–974. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0703393>.
- [46] Y. Matsuzawa, A. Lerman, Endothelial dysfunction and coronary artery disease: assessment, prognosis, and treatment, *Coron. Artery Dis.* 25 (2014) 713–724. <https://doi.org/10.1097/MCA.000000000000178>.
- [47] S. Roumeliotis, F. Mallamaci, C. Zoccali, Endothelial Dysfunction in Chronic Kidney Disease, from Biology to Clinical Outcomes: A 2020 Update, *J. Clin. Med.* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/jcm9082359>.
- [48] D. Tousoulis, A.-M. Kampoli, C. Tentolouris, N. Papageorgiou, C. Stefanadis, The role of nitric oxide on endothelial function, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 10 (2012) 4–18. <https://doi.org/10.2174/157016112798829760>.
- [49] P. Tripathi, P. Tripathi, L. Kashyap, V. Singh, The role of nitric oxide in inflammatory reactions, *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 51 (2007) 443–452. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2007.00329.x>.
- [50] L.L. Lintermans, C.A. Stegeman, P. Heeringa, W.H. Abdulahad, T cells in vascular inflammatory diseases, *Front. Immunol.* 5 (2014) 504. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00504>.
- [51] U. Förstermann, T. Münzel, Endothelial nitric oxide synthase in vascular disease: from marvel to menace, *Circulation* 113 (2006) 1708–1714. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.602532>.
- [52] U. Förstermann, W.C. Sessa, Nitric oxide synthases: regulation and function, *Eur. Heart J.* 33 (2012) 829–37, 837a–837d. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehr304>.
- [53] A. Daiber, M. Oelze, S. Steven, S. Kröller-Schön, T. Münzel, Taking up the cudgels for the traditional reactive oxygen and nitrogen species detection assays and their use in the cardiovascular system, *Redox Biol.* 12 (2017) 35–49. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2017.02.001>.
- [54] T. Münzel, A. Daiber, V. Ullrich, A. Mülsch, Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 25 (2005) 1551–1557. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000168896.64927.bb>.
- [55] F. Leresche, J.R. Salazar, D.J. Pfothauer, M.P. Hannigan, B.J. Majestic, F.L. Rosario-Ortiz, Photochemical Aging of Atmospheric Particulate Matter in the Aqueous Phase, *Environmental Science & Technology* 55 (2021) 13152–13163. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c00978>.
- [56] U. Pöschl, Atmospheric aerosols: composition, transformation, climate and health

- effects, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44 (2005) 7520–7540.  
<https://doi.org/10.1002/anie.200501122>.
- [57] Crystal L. Weagle\*, Graydon Snider, Chi Li, Global Sources of Fine Particulate Matter: Interpretation of PM<sub>2.5</sub> Chemical Composition Observed by SPARTAN using a Global Chemical Transport Model, *Environmental Science & Technology* 52 (2018) 11670–11681. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b01658>.
- [58] A. Mues, A. Manders, M. Schaap, L.H. van Ulft, E. van Meijgaard, P. Builtjes, Differences in particulate matter concentrations between urban and rural regions under current and changing climate conditions, *Atmospheric Environment* 80 (2013) 232–247. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2013.07.049>.
- [59] F. Oroumijeh, M. Jerrett, I. Del Rosario, J. Lipsitt, J. Liu, S.E. Paulson, B. Ritz, J.J. Schauer, M.M. Shafer, J. Shen, S. Weichenthal, S. Banerjee, Y. Zhu, Elemental composition of fine and coarse particles across the greater Los Angeles area: Spatial variation and contributing sources, *Environ. Pollut.* 292 (2022) 118356. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118356>.
- [60] J. Lelieveld, U. Pöschl, Chemists can help to solve the air-pollution health crisis, *Nature* 551 (2017) 291–293. <https://doi.org/10.1038/d41586-017-05906-9>.
- [61] B. Li, Y. Ma, Y. Zhou, E. Chai, Research progress of different components of PM<sub>2.5</sub> and ischemic stroke, *Sci. Rep.* 13 (2023) 15965. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-43119-5>.
- [62] O. Hahad, J. Lelieveld, F. Birklein, K. Lieb, A. Daiber, T. Münzel, Ambient Air Pollution Increases the Risk of Cerebrovascular and Neuropsychiatric Disorders through Induction of Inflammation and Oxidative Stress, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020). <https://doi.org/10.3390/ijms21124306>.
- [63] J. Wang, M. Zhang, X. Bai, H. Tan, S. Li, J. Liu, R. Zhang, M.A. Wolters, X. Qin, M. Zhang, H. Lin, Y. Li, J. Li, L. Chen, Large-scale transport of PM<sub>2.5</sub> in the lower troposphere during winter cold surges in China, *Sci. Rep.* 7 (2017) 13238. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13217-2>.
- [64] Directorate-General for Environment, Air Quality: The EU sets air quality standards to protect human health and the environment, 2024. [https://environment.ec.europa.eu/topics/air/air-quality\\_en](https://environment.ec.europa.eu/topics/air/air-quality_en) (accessed 17 January 2025).
- [65] Umweltbundesamt, Feinstaubkonzentrationen in Deutschland: Trend der PM<sub>10</sub>-Jahresmittelwerte, 2024. <https://www.umweltbundesamt.de/daten/luft/feinstaub-belastung#feinstaubkonzentrationen-in-deutschland> (accessed 17 January 2025).
- [66] European Environment Agency, Europe’s air quality status 2024: Exceedance of air quality standards in Europe, 2024. <https://www.eea.europa.eu/publications/europes-air-quality-status-2024> (accessed 17 January 2025).

- [67] A.W. Correia, C.A. Pope, D.W. Dockery, Y. Wang, M. Ezzati, F. Dominici, Effect of air pollution control on life expectancy in the United States: an analysis of 545 U.S. counties for the period from 2000 to 2007, *Epidemiology* 24 (2013) 23–31. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e3182770237>.
- [68] Directorate-General for Environment, Zero Pollution: New EU rules enter into force for cleaner air by 2030: Cleaner ambient air by 2030, 2024. [https://environment.ec.europa.eu/news/new-pollution-rules-come-effect-cleaner-air-2030-2024-12-10\\_en](https://environment.ec.europa.eu/news/new-pollution-rules-come-effect-cleaner-air-2030-2024-12-10_en) (accessed 17 January 2025).
- [69] D.E. Schraufnagel, The health effects of ultrafine particles, *Exp. Mol. Med.* 52 (2020) 311–317. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0403-3>.
- [70] Robert Koch-Institut, Disability-adjusted life years (DALY), 2024. [https://diabsurv.rki.de/Webs/Diabsurv/DE/diabetes-in-deutschland/4-40\\_Disability-adjusted\\_life\\_years\\_DALY.html](https://diabsurv.rki.de/Webs/Diabsurv/DE/diabetes-in-deutschland/4-40_Disability-adjusted_life_years_DALY.html) (accessed 23 January 2025).
- [71] K.-H. Kim, E. Kabir, S. Kabir, A review on the human health impact of airborne particulate matter, *Environ. Int.* 74 (2015) 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.10.005>.
- [72] Y.-F. Xing, Y.-H. Xu, M.-H. Shi, Y.-X. Lian, The impact of PM<sub>2.5</sub> on the human respiratory system, *J. Thorac. Dis.* 8 (2016) E69–74. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2016.01.19>.
- [73] K. Hiraiwa, S.F. van Eeden, Contribution of lung macrophages to the inflammatory responses induced by exposure to air pollutants, *Mediators Inflamm.* 2013 (2013) 619523. <https://doi.org/10.1155/2013/619523>.
- [74] R. Miyata, S.F. van Eeden, The innate and adaptive immune response induced by alveolar macrophages exposed to ambient particulate matter, *Toxicology and Applied Pharmacology* 257 (2011) 209–226. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2011.09.007>.
- [75] E.-J. Park, J. Roh, Y. Kim, K. Park, D.-S. Kim, S.-D. Yu, PM 2.5 collected in a residential area induced Th1-type inflammatory responses with oxidative stress in mice, *Environmental Research* 111 (2011) 348–355. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2010.11.001>.
- [76] R. Pozzi, B. de Berardis, L. Paoletti, C. Guastadisegni, Inflammatory mediators induced by coarse (PM<sub>2.5-10</sub>) and fine (PM<sub>2.5</sub>) urban air particles in RAW 264.7 cells, *Toxicology* 183 (2003) 243–254. [https://doi.org/10.1016/s0300-483x\(02\)00545-0](https://doi.org/10.1016/s0300-483x(02)00545-0).
- [77] J. Wang, J. Huang, L. Wang, C. Chen, D. Yang, M. Jin, C. Bai, Y. Song, Urban particulate matter triggers lung inflammation via the ROS-MAPK-NF- $\kappa$ B signaling pathway, *J. Thorac. Dis.* 9 (2017) 4398–4412. <https://doi.org/10.21037/jtd.2017.09.135>.
- [78] J. Li, Z. An, J. Song, J. Du, L. Zhang, J. Jiang, Y. Ma, C. Wang, J. Zhang, W. Wu, Fine particulate matter-induced lung inflammation is mediated by pyroptosis in mice,

- Ecotoxicol. Environ. Saf. 219 (2021) 112351.  
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.112351>.
- [79] K. Liu, S. Hua, L. Song, PM<sub>2.5</sub> Exposure and Asthma Development: The Key Role of Oxidative Stress, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2022 (2022) 3618806.  
<https://doi.org/10.1155/2022/3618806>.
- [80] R. Li, R. Zhou, J. Zhang, Function of PM<sub>2.5</sub> in the pathogenesis of lung cancer and chronic airway inflammatory diseases, *Oncol. Lett.* 15 (2018) 7506–7514.  
<https://doi.org/10.3892/ol.2018.8355>.
- [81] K.E. Pinkerton, F.H. Green, C. Saiki, V. Vallyathan, C.G. Plopper, V. Gopal, D. Hung, E.B. Bahne, S.S. Lin, M.G. Ménache, M.B. Schenker, Distribution of particulate matter and tissue remodeling in the human lung, *Environ Health Perspect* 108 (2000) 1063–1069. <https://doi.org/10.1289/ehp.001081063>.
- [82] L.H. Wyatt, R.B. Devlin, A.G. Rappold, M.W. Case, D. Diaz-Sanchez, Low levels of fine particulate matter increase vascular damage and reduce pulmonary function in young healthy adults, *Part Fibre Toxicol* 17 (2020) 58. <https://doi.org/10.1186/s12989-020-00389-5>.
- [83] J.C. Hogg, S. van Eeden, Pulmonary and systemic response to atmospheric pollution, *Respirology* 14 (2009) 336–346. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1843.2009.01497.x>.
- [84] X. Xia, an Zhang, S. Liang, Q. Qi, L. Jiang, Y. Ye, The Association between Air Pollution and Population Health Risk for Respiratory Infection: A Case Study of Shenzhen, China, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 14 (2017). <https://doi.org/10.3390/ijerph14090950>.
- [85] J. Zhao, M. Li, Z. Wang, J. Chen, J. Zhao, Y. Xu, X. Wei, J. Wang, J. Xie, Role of PM<sub>2.5</sub> in the development and progression of COPD and its mechanisms, *Respir. Res.* 20 (2019) 120. <https://doi.org/10.1186/s12931-019-1081-3>.
- [86] Health Effects Institute, State of global air 2020: A special report on global exposure to air pollution and its health impacts, 2020. <https://fundacionio.com/wp-content/uploads/2020/10/soga-2020-report.pdf> (accessed 27 January 2025).
- [87] G.B. Hamra, N. Guha, A. Cohen, F. Laden, O. Raaschou-Nielsen, J.M. Samet, P. Vineis, F. Forastiere, P. Saldiva, T. Yorifuji, D. Loomis, Outdoor particulate matter exposure and lung cancer: a systematic review and meta-analysis, *Environmental Health Perspectives* 122 (2014) 906–911. <https://doi.org/10.1289/ehp/1408092>.
- [88] J. Li, W.X. Li, C. Bai, Y. Song, Particulate matter-induced epigenetic changes and lung cancer, *Clin. Respir. J.* 11 (2017) 539–546. <https://doi.org/10.1111/crj.12389>.
- [89] J.A. Holme, J. Vondráček, M. Machala, D. Lagadic-Gossmann, C.F.A. Vogel, E. Le Ferrec, L. Sparfel, J. Øvrevik, Lung cancer associated with combustion particles and fine particulate matter (PM<sub>2.5</sub>) - The roles of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR), *Biochemical Pharmacology* 216 (2023) 115801.

- <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2023.115801>.
- [90] P. Wenzel, S. Kossmann, T. Münzel, A. Daiber, Redox regulation of cardiovascular inflammation - Immunomodulatory function of mitochondrial and Nox-derived reactive oxygen and nitrogen species, *Free Radic. Biol. Med.* 109 (2017) 48–60.  
<https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.027>.
- [91] C. Hatzis, J.J. Godleski, B. González-Flecha, J.M. Wolfson, P. Koutrakis, Ambient Particulate Matter Exhibits Direct Inhibitory Effects on Oxidative Stress Enzymes, *Environmental Science & Technology* 40 (2006) 2805–2811.  
<https://doi.org/10.1021/es0518732>.
- [92] T. Münzel, T. Gori, S. Al-Kindi, J. Deanfield, J. Lelieveld, A. Daiber, S. Rajagopalan, Effects of gaseous and solid constituents of air pollution on endothelial function, *Eur. Heart J.* 39 (2018) 3543–3550. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehy481>.
- [93] J. Calles-Escandon, M. Cipolla, Diabetes and endothelial dysfunction: a clinical perspective, *Endocr. Rev.* 22 (2001) 36–52. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.1.0417>.
- [94] B. Wang, K.-D. Eum, F. Kazemiparkouhi, C. Li, J. Manjourides, V. Pavlu, H. Suh, The impact of long-term PM2.5 exposure on specific causes of death: exposure-response curves and effect modification among 53 million U.S. Medicare beneficiaries, *Environmental Health* 19 (2020) 20. <https://doi.org/10.1186/s12940-020-00575-0>.
- [95] H. Powell, J.R. Krall, Y. Wang, M.L. Bell, R.D. Peng, Ambient Coarse Particulate Matter and Hospital Admissions in the Medicare Cohort Air Pollution Study, 1999-2010, *Environmental Health Perspectives* 123 (2015) 1152–1158.  
<https://doi.org/10.1289/ehp.1408720>.
- [96] B. Brunekreef, M. Strak, J. Chen, Z.J. Andersen, R. Atkinson, M. Bauwelinck, T. Bellander, M.-C. Boutron, J. Brandt, I. Carey, G. Cesaroni, F. Forastiere, D. Fehcht, J. Gulliver, O. Hertel, B. Hoffmann, K. de Hoogh, D. Houthuijs, U. Hvidtfeldt, N. Janssen, J. Jorgensen, K. Katsouyanni, M. Ketzel, J. Klompmaker, N. Hjertager Krog, S. Liu, P. Ljungman, A. Mehta, G. Nagel, B. Oftedal, G. Pershagen, A. Peters, O. Raaschou-Nielsen, M. Renzi, S. Rodopoulou, E. Samoli, P. Schwarze, T. Sigsgaard, M. Stafoggia, D. Vienneau, G. Weinmayr, K. Wolf, G. Hoek, Mortality and Morbidity Effects of Long-Term Exposure to Low-Level PM2.5, BC, NO2, and O3: An Analysis of European Cohorts in the ELAPSE Project, *Res Rep Health Eff Inst* 2021 (2021) 1–127.
- [97] F.W. Lipfert, A critical review of the ESCAPE project for estimating long-term health effects of air pollution, *Environ. Int.* 99 (2017) 87–96.  
<https://doi.org/10.1016/j.envint.2016.11.028>.
- [98] P.R. Lockman, J.M. Koziara, R.J. Mumper, D.D. Allen, Nanoparticle surface charges alter blood-brain barrier integrity and permeability, *J. Drug Target.* 12 (2004) 635–641.  
<https://doi.org/10.1080/10611860400015936>.

- [99] A. Adivi, J. Lucero, N. Simpson, J.D. McDonald, A.K. Lund, Exposure to traffic-generated air pollution promotes alterations in the integrity of the brain microvasculature and inflammation in female ApoE<sup>-/-</sup> mice, *Toxicol. Lett.* 339 (2021) 39–50. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.12.016>.
- [100] H.J. Forman, C.E. Finch, A critical review of assays for hazardous components of air pollution, *Free Radic. Biol. Med.* 117 (2018) 202–217. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.030>.
- [101] R. Hussain, U. Graham, A. Elder, M. Nedergaard, Air pollution, glymphatic impairment, and Alzheimer's disease, *Trends Neurosci.* 46 (2023) 901–911. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2023.08.010>.
- [102] C. Peng, J.Q. Trojanowski, V.M.-Y. Lee, Protein transmission in neurodegenerative disease, *Nat. Rev. Neurol.* 16 (2020) 199–212. <https://doi.org/10.1038/s41582-020-0333-7>.
- [103] P. Michalska, R. León, When It Comes to an End: Oxidative Stress Crosstalk with Protein Aggregation and Neuroinflammation Induce Neurodegeneration, *Antioxidants (Basel)* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/antiox9080740>.
- [104] S. Voet, S. Srinivasan, M. Lamkanfi, G. van Loo, Inflammasomes in neuroinflammatory and neurodegenerative diseases, *EMBO Mol. Med.* 11 (2019). <https://doi.org/10.15252/emmm.201810248>.
- [105] D.S.A. Simpson, P.L. Oliver, ROS Generation in Microglia: Understanding Oxidative Stress and Inflammation in Neurodegenerative Disease, *Antioxidants (Basel)* 9 (2020). <https://doi.org/10.3390/antiox9080743>.
- [106] A. Yildirim, J. Zhang, S. Manzetti, D. van der Spoel, Binding of Pollutants to Biomolecules: A Simulation Study, *Chemical Research in Toxicology* 29 (2016) 1679–1688. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00189>.
- [107] Y. Nunez, A.K. Boehme, M. Li, J. Goldsmith, M.G. Weisskopf, D.B. Re, A. Navas-Acien, A. van Donkelaar, R.V. Martin, M.-A. Kioumourtzoglou, Parkinson's disease aggravation in association with fine particle components in New York State, *Environmental Research* 201 (2021) 111554. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111554>.
- [108] Y. Nunez, A.K. Boehme, M.G. Weisskopf, D.B. Re, A. Navas-Acien, A. van Donkelaar, R.V. Martin, M.-A. Kioumourtzoglou, Fine Particle Exposure and Clinical Aggravation in Neurodegenerative Diseases in New York State, *Environmental Health Perspectives* 129 (2021) 27003. <https://doi.org/10.1289/EHP7425>.
- [109] X. Yuan, Y. Yang, C. Liu, Y. Tian, D. Xia, Z. Liu, L. Pan, M. Xiong, J. Xiong, L. Meng, Z. Zhang, K. Ye, H. Jiang, Z. Zhang, Fine Particulate Matter Triggers  $\alpha$ -Synuclein Fibrillization and Parkinson-like Neurodegeneration, *Mov. Disord.* 37 (2022) 1817–1830.

- <https://doi.org/10.1002/mds.29181>.
- [110] L. Iaccarino, R. La Joie, O.H. Lesman-Segev, E. Lee, L. Hanna, I.E. Allen, B.E. Hillner, B.A. Siegel, R.A. Whitmer, M.C. Carrillo, C. Gatsonis, G.D. Rabinovici, Association Between Ambient Air Pollution and Amyloid Positron Emission Tomography Positivity in Older Adults With Cognitive Impairment, *JAMA Neurol.* 78 (2021) 197–207. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.3962>.
- [111] M.-A. Kioumourtoglou, J.D. Schwartz, M.G. Weisskopf, S.J. Melly, Y. Wang, F. Dominici, A. Zanobetti, Long-term PM<sub>2.5</sub> Exposure and Neurological Hospital Admissions in the Northeastern United States, *Environmental Health Perspectives* 124 (2016) 23–29. <https://doi.org/10.1289/ehp.1408973>.
- [112] L. Shi, X. Wu, M. Danesh Yazdi, D. Braun, Y. Abu Awad, Y. Wei, P. Liu, Q. Di, Y. Wang, J. Schwartz, F. Dominici, M.-A. Kioumourtoglou, A. Zanobetti, Long-term effects of PM<sub>2.5</sub> on neurological disorders in the American Medicare population: a longitudinal cohort study, *Lancet Planet. Health* 4 (2020) e557–e565. [https://doi.org/10.1016/s2542-5196\(20\)30227-8](https://doi.org/10.1016/s2542-5196(20)30227-8).
- [113] A.-K. Viitanen, S. Uuksulainen, A.J. Koivisto, K. Hämeri, T. Kauppinen, Workplace Measurements of Ultrafine Particles-A Literature Review, *Ann. Work Expo. Health* 61 (2017) 749–758. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxx049>.
- [114] A. González-Maciel, R. Reynoso-Robles, R. Torres-Jardón, P.S. Mukherjee, L. Calderón-Garcidueñas, Combustion-Derived Nanoparticles in Key Brain Target Cells and Organelles in Young Urbanites: Culprit Hidden in Plain Sight in Alzheimer's Disease Development, *J. Alzheimers. Dis.* 59 (2017) 189–208. <https://doi.org/10.3233/JAD-170012>.
- [115] F.R. Cassee, H. Muijser, E. Duistermaat, J.J. Freijer, K.B. Geerse, J.C.M. Marijnissen, J.H.E. Arts, Particle size-dependent total mass deposition in lungs determines inhalation toxicity of cadmium chloride aerosols in rats. Application of a multiple path dosimetry model, *Arch. Toxicol.* 76 (2002) 277–286. <https://doi.org/10.1007/s00204-002-0344-8>.
- [116] M. Borgie, Z. Dagher, F. Ledoux, A. Verdin, F. Cazier, P. Martin, A. Hachimi, P. Shirali, H. Greige-Gerges, D. Courcot, Comparison between ultrafine and fine particulate matter collected in Lebanon: Chemical characterization, in vitro cytotoxic effects and metabolizing enzymes gene expression in human bronchial epithelial cells, *Environ. Pollut.* 205 (2015) 250–260. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2015.05.027>.
- [117] M. Stölzel, S. Breitner, J. Cyrus, M. Pitz, G. Wölke, W. Kreyling, J. Heinrich, H.-E. Wichmann, A. Peters, Daily mortality and particulate matter in different size classes in Erfurt, Germany, *Journal of Exposure Science & Environmental Epidemiology* 17 (2007) 458–467. <https://doi.org/10.1038/sj.jes.7500538>.

- [118] X. Meng, Y. Ma, R. Chen, Z. Zhou, B. Chen, H. Kan, Size-fractionated particle number concentrations and daily mortality in a Chinese city, *Environmental Health Perspectives* 121 (2013) 1174–1178. <https://doi.org/10.1289/ehp.1206398>.
- [119] M.L. Bergmann, Z.J. Andersen, A. Massling, P.A. Kindler, S. Loft, H. Amini, T. Cole-Hunter, Y. Guo, M. Maric, C. Nordstrøm, M. Taghavi, S. Tuffier, R. So, J. Zhang, Y.-H. Lim, Short-term exposure to ultrafine particles and mortality and hospital admissions due to respiratory and cardiovascular diseases in Copenhagen, Denmark, *Environ. Pollut.* 336 (2023) 122396. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2023.122396>.
- [120] G.S. Downward, E.J.H.M. van Nunen, J. Kerckhoffs, P. Vineis, B. Brunekreef, J.M.A. Boer, K.P. Messier, A. Roy, W.M.M. Verschuren, Y.T. van der Schouw, I. Sluijs, J. Gulliver, G. Hoek, R. Vermeulen, Long-Term Exposure to Ultrafine Particles and Incidence of Cardiovascular and Cerebrovascular Disease in a Prospective Study of a Dutch Cohort, *Environmental Health Perspectives* 126 (2018) 127007. <https://doi.org/10.1289/ehp3047>.
- [121] M. Kuntic, I. Kuntic, D. Cleppien, A. Pozzer, D. Nußbaum, M. Oelze, T. Junglas, L. Strohm, H. Ubbens, S. Daub, M.T. Bayo Jimenez, S. Danckwardt, T. Berkemeier, O. Hahad, M. Kohl, S. Steven, A. Stroh, J. Lelieveld, T. Münzel, A. Daiber, Differential inflammation, oxidative stress and cardiovascular damage markers of nano- and micro-particle exposure in mice: Implications for human disease burden, *Redox Biol.* (2025) 103644. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2025.103644>.
- [122] M. Schwarz, A. Schneider, J. Cyrus, S. Bastian, S. Breitner, A. Peters, Impact of ultrafine particles and total particle number concentration on five cause-specific hospital admission endpoints in three German cities, *Environ. Int.* 178 (2023) 108032. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.108032>.
- [123] A. Daiber, S. Steven, A. Weber, V.V. Shuvaev, V.R. Muzykantov, I. Laher, H. Li, S. Lamas, T. Münzel, Targeting vascular (endothelial) dysfunction, *Br. J. Pharmacol.* 174 (2017) 1591–1619. <https://doi.org/10.1111/bph.13517>.
- [124] J.C. Garber, *Guide for the care and use of laboratory animals*, eighth., rev. ed., National Academy Press, Washington, DC., 2011.
- [125] W.N. Burnette, "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A, *Anal. Biochem.* 112 (1981) 195–203. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(81\)90281-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(81)90281-5).
- [126] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>.
- [127] S.J. Compton, C.G. Jones, Mechanism of dye response and interference in the

- Bradford protein assay, *Anal. Biochem.* 151 (1985) 369–374.  
[https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90190-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90190-3).
- [128] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>.
- [129] B.J. Smith, SDS Polyacrylamide Gel Electrophoresis of Proteins, *Methods Mol. Biol.* 1 (1984) 41–55. <https://doi.org/10.1385/0-89603-062-8:41>.
- [130] H. Towbin, T. Staehelin, J. Gordon, Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 4350–4354. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4350>.
- [131] H. Sander, S. Wallace, R. Plouse, S. Tiwari, A.V. Gomes, Ponceau S waste: Ponceau S staining for total protein normalization, *Anal. Biochem.* 575 (2019) 44–53.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2019.03.010>.
- [132] J. Renart, J. Reiser, G.R. Stark, Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 76 (1979) 3116–3120.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.76.7.3116>.
- [133] Y.-G. Yeung, E.R. Stanley, A solution for stripping antibodies from PVDF immunoblots for multiple reprobing, *Anal. Biochem.* 389 (2009) 89–91.  
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2009.03.017>.
- [134] B. Halliwell, M. Whiteman, Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?, *Br. J. Pharmacol.* 142 (2004) 231–255. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705776>.
- [135] A.I.S.B. Villaverde, J. Netherton, M.A. Baker, From Past to Present: The Link Between Reactive Oxygen Species in Sperm and Male Infertility, *Antioxidants (Basel)* 8 (2019). <https://doi.org/10.3390/antiox8120616>.
- [136] O. Goksel, M.I. Sipahi, S. Yanasik, P. Saglam-Metiner, S. Benzer, L. Sabour-Takanlou, M. Sabour-Takanlou, C. Biray-Avci, O. Yesil-Celiktas, Comprehensive analysis of resilience of human airway epithelial barrier against short-term PM2.5 inorganic dust exposure using in vitro microfluidic chip and ex vivo human airway models, *Allergy* 79 (2024) 2953–2965. <https://doi.org/10.1111/all.16179>.
- [137] J. Löndahl, W. Möller, J.H. Pagels, W.G. Kreyling, E. Swietlicki, O. Schmid, Measurement techniques for respiratory tract deposition of airborne nanoparticles: a critical review, *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.* 27 (2014) 229–254.  
<https://doi.org/10.1089/jamp.2013.1044>.