

Aus dem
Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin der Universität München
Leitung: Prof. Dr. med. Ulrich Pohl

**Pro-thrombotische und pro-inflammatorische Effekte
kohlenstoffbasierter Nanopartikel in der Mikrozirkulation der Maus**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Martin Holzer

aus

Freising

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach

Mitberichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Michael Mederos y Schnitzler
Prof. Dr. med. Josef Maria Briegel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. Peter Bihari

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 13.07.2017

Eidesstattliche Versicherung

Holzer, Martin

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

**Pro-thrombotische und pro-inflammatorische Effekte kohlenstoffbasierter
Nanopartikel in der Mikrozirkulation der Maus**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorand

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	2
Publikationsliste	3
Einleitung	4
Nanopartikel	4
Kohlenstoffnanoröhrchen	6
Kardiovaskuläre Effekte von Nanomaterialien.....	8
Effekte kohlenstoffbasierter Nanomaterialien auf Thrombozyten und die Entstehung von Thromben in der Mikrozirkulation	10
Effekte kohlenstoffbasierter Nanomaterialien auf Leukozyten-Endothelzell- Interaktionen in der Mikrozirkulation	18
Zusammenfassung	22
Summary	25
Veröffentlichungen mit Fundstellen	27
Literatur	28
Danksagung	31

Abkürzungsverzeichnis

CB

carbon black, deutsch: Industrieruß

SWCNT

single-walled carbon nanotubes, deutsch: einwandige Kohlenstoffnanoröhrchen

MWCNT

multi-walled carbon nanotubes, deutsch: mehrwandige Kohlenstoffnanoröhrchen

GP

Glykoprotein

vWF

von-Willebrand-Faktor

Publikationsliste

1. Haberl, N., S. Hirn, **M. Holzer**, G. Zuchtriegel, M. Rehberg, F. Krombach. Effects of acute systemic administration of TiO₂, ZnO, SiO₂, and Ag nanoparticles on hemodynamics, hemostasis and leukocyte recruitment. **Nanotoxicology**, 2015. 9(8): p. 963-71.
2. **Holzer, M.**, P. Bihari, M. Praetner, B. Uhl, C. Reichel, J. Fent, M. Vippola, S. Lakatos, F. Krombach. Carbon-based nanomaterials accelerate arteriolar thrombus formation in the murine microcirculation independently of their shape. **J Appl Toxicol**, 2014. 34(11): p. 1167-76.
3. Uhl, B., G. Zuchtriegel, D. Pühr-Westerheide, M. Praetner, M. Rehberg, M. Fabritius, M. Hessenauer, **M. Holzer**, A. Khandoga, R. Furst, S. Zahler, F. Krombach, C.A. Reichel. Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. **Arterioscler Thromb Vasc Biol**, 2014. 34(7): p. 1495-504.
4. Bihari, P., **M. Holzer**, M. Praetner, J. Fent, M. Lerchenberger, C.A. Reichel, M. Rehberg, S. Lakatos, F. Krombach. Single-walled carbon nanotubes activate platelets and accelerate thrombus formation in the microcirculation. **Toxicology**, 2010. 269(2-3): p. 148-54.
5. Praetner, M., M. Rehberg, P. Bihari, M. Lerchenberger, B. Uhl, **M. Holzer**, M.E. Eichhorn, R. Furst, T. Perisic, C.A. Reichel, U. Welsch, F. Krombach. The contribution of the capillary endothelium to blood clearance and tissue deposition of anionic quantum dots in vivo. **Biomaterials**, 2010. 31(26): p. 6692-700.

Einleitung

Nanopartikel

Nanopartikel sind winzige Teilchen, die in mindestens einer Dimension weniger als 100 Nanometer messen [1]. In ihrer Größe sind sie daher mit Proteinkomplexen, Viren oder Zellorganellen vergleichbar. Die physikalischen und chemischen Eigenschaften von Nanopartikeln unterscheiden sich erheblich, einerseits von denen größerer Partikel aus dem gleichen Material ab dem Mikrometerbereich, andererseits von den Merkmalen der Atome und Moleküle, aus denen sie aufgebaut sind. Die speziellen physikochemischen Eigenschaften von Nanopartikeln werden unter anderem durch ihre Oberflächenstruktur, ihre Löslichkeit, ihre Form und ihr Aggregationsverhalten bestimmt [1]. Man unterscheidet zwischen natürlich vorkommenden und anthropogenen, also von Menschen verursachten Nanopartikeln. Gegenüber natürlich vorkommenden Nanopartikeln ist der Mensch seit jeher exponiert. Sie werden beispielsweise bei Waldbränden oder Vulkanausbrüchen in die Umwelt freigesetzt. Im Gegensatz dazu gibt es eine stetig steigende Zahl an anthropogenen Nanopartikeln. Sie können unterteilt werden in Partikel, die ungewollt freigesetzt werden, wie es z.B. bei der Verbrennung von fossilen Brennstoffen der Fall ist, und Nanopartikel oder Nanomaterialien, die künstlich hergestellt werden [2]. Synthetische Nanomaterialien wiederum sind einheitlich aufgebaute Materialien, welche in mindestens einer Dimension weniger als 100 Nanometer messen und für definierte Anwendungen gezielt entworfen werden [3]. Potenziell sind unzählige Einsatzmöglichkeiten synthetischer Nanomaterialien in allen Bereichen unseres täglichen Lebens denkbar. Bereits jetzt wird mit deutlich steigender Tendenz eine Vielzahl synthetischer Nanomaterialien in Konsumgütern und Industrieprodukten verarbeitet [4]. Daraus lässt sich ableiten,

dass der Mensch unterschiedlichsten synthetischen Nanomaterialien in steigendem Ausmaß ausgesetzt sein wird [2]. Ein Beispiel für synthetische Nanomaterialien sind Industrierußpartikel (Elektronenmikroskopische Aufnahmen siehe Abbildung 1, B und D). Sie besitzen eine sphärische Form und finden beispielsweise als Füllstoff in der Gummiindustrie oder als Farbpigment Verwendung. Ebenfalls zu nennen und von zunehmender Bedeutung sind Kohlenstoffnanoröhrchen. Sie wurden erstmals in den 1990er Jahren durch den japanischen Physiker Sumio Iijima synthetisiert und beschrieben [5]. Kohlenstoffnanoröhrchen können einwandig oder mehrwandig sowie mit offenem oder geschlossenem Ende hergestellt werden und bestehen aus einem oder mehreren eingerollten Graphenblättern. In der Fachliteratur werden sie daher als einwandige Kohlenstoffnanoröhrchen (engl.: *single-walled carbon nanotubes*) (Elektronenmikroskopische Aufnahmen siehe Abbildung 1, A und C) oder mehrwandige Kohlenstoffnanoröhrchen (engl.: *multi-walled carbon nanotubes*) bezeichnet [6].

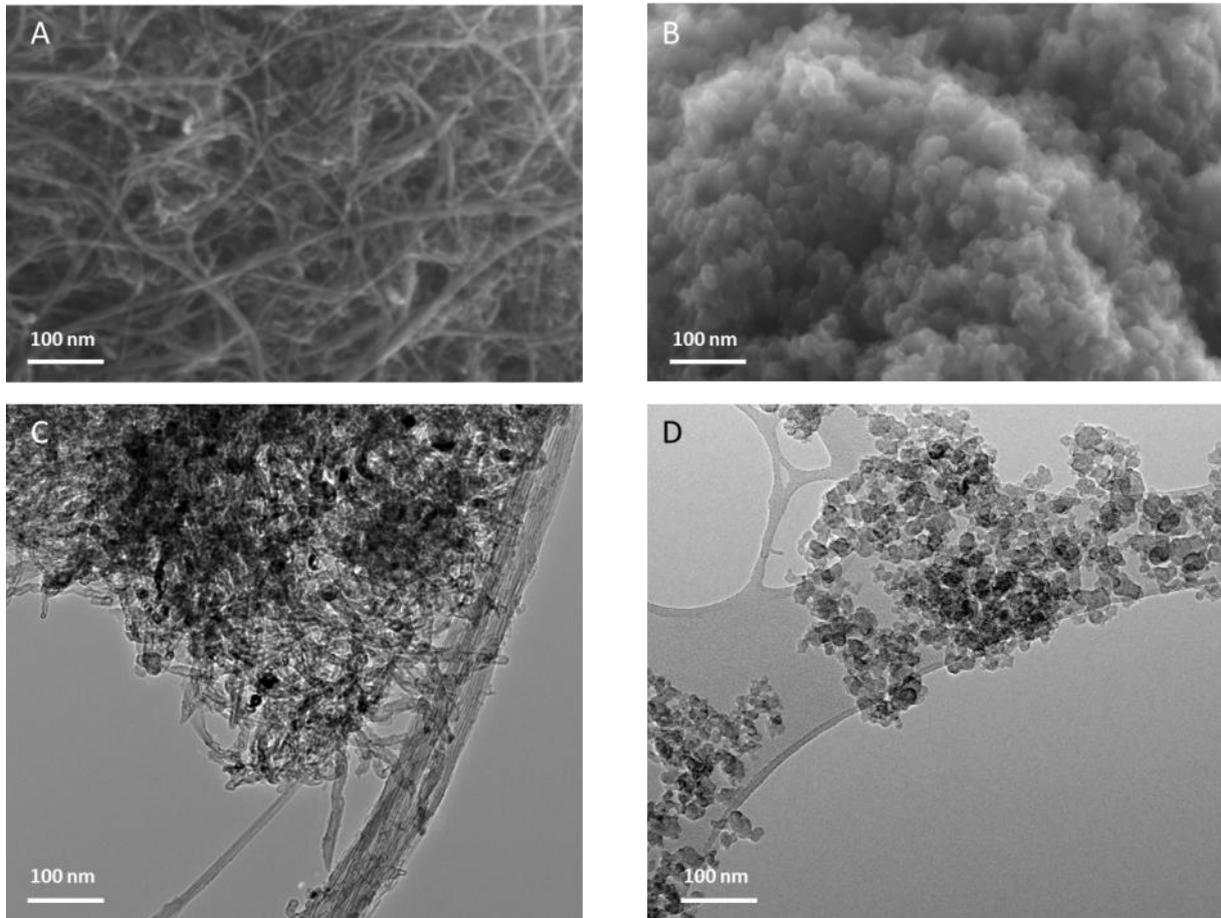


Abbildung 1. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von **(A)** einwandigen Kohlenstoffnanoröhren und **(B)** Industrierauflpartikeln; Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von **(C)** einwandigen Kohlenstoffnanoröhren und **(D)** Industrierauflpartikeln; entnommen aus [7].

Kohlenstoffnanoröhren

Die Materialeigenschaften von Kohlenstoffnanoröhren sind vielfältig. Zunächst imponieren ihre herausragenden mechanischen Eigenschaften, wie zum Beispiel ihre außergewöhnlich hohe Festigkeit [8], weshalb sie bereits jetzt von der Industrie beispielsweise bei der Fertigung von Verbundwerkstoffen für Rotoren von Windkraftanlagen eingesetzt werden [9]. Weitere interessante Anwendungsmöglichkeiten ergeben sich aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften, wie z.B. ihrer ungewöhnlichen elektrischen Leitfähigkeit [10] und ihrer

Fähigkeit, Energie zu speichern oder umzuwandeln, wodurch Kohlenstoffnanoröhrchen beispielsweise in der Entwicklung von effektiven Solarzellen eine wichtige Rolle spielen [11]. Aufgrund weiterer interessanter Materialeigenschaften eignen sich Kohlenstoffnanoröhrchen auch für den Einsatz in Biologie und Medizin. Infolge der oben genannten mechanischen Eigenschaften werden sie im Bereich der Endoprothetik als vielversprechendes neues Material angesehen [12]. Weiterhin wurden Kohlenstoffnanoröhrchen in experimentellen Studien bereits erfolgreich zur Regeneration neuronalen Gewebes [13] und zu dreidimensionaler Gewebekonstruktion [14] eingesetzt. Es gibt jedoch noch andere höchst interessante Materialeigenschaften von Kohlenstoffnanoröhrchen, aufgrund derer sie sich hervorragend für biomedizinische Anwendungen eignen. So sind ihre bemerkenswerten optischen Eigenschaften, wie die Absorptionsfähigkeit von Licht des ultravioletten, sichtbaren und nahen Infrarot-Spektrums, ihre besondere Nahinfrarot-Photolumineszenz, ihr einzigartiges Raman-Spektrum (Streuung von Licht), ihre interessanten photothermalen Eigenschaften (Erzeugung von Hitze durch Lichtanregung) und ihre Besonderheit, lichtinduziert reaktive Sauerstoffspezies zu generieren, zu nennen. Weiterhin besitzen Kohlenstoffnanoröhrchen eine enorm große Oberfläche, an die sich kovalent oder nichtkovalent Kontrastmittel, pharmazeutische Wirkstoffe, Desoxyribonukleinsäure oder Ribonukleinsäure binden lassen. Hieraus ergeben sich Anwendungsmöglichkeiten im Bereich des Bioimaging, des Biosensing, der Gen- und Pharmakotherapie sowie der photothermalen und photodynamischen Therapie von Krebs- und Infektionserkrankungen [15-21]. So konnten einwandige Kohlenstoffnanoröhrchen bereits erfolgreich als Trägersubstanz für Paclitaxel zur Reduktion des Tumorwachstums in einem Mausmodell eingesetzt werden [22].

Kardiovaskuläre Effekte von Nanomaterialien

Experten warnen jedoch bereits seit einigen Jahren davor, synthetische Nanomaterialien in großen Mengen zu produzieren und in Konsumgütern massenhaft zu verwenden, ohne ihre möglichen schädlichen Auswirkungen auf den Menschen erforscht zu haben. Sie fordern, dass synthetische Nanomaterialien zunächst auf mögliche toxische Effekte hin überprüft und schließlich auf dieser Basis entwickelt werden sollten, sodass sie keine Gefahr für Mensch und Umwelt darstellen [1-4]. Diese Forderungen begründen sich unter anderem aus Erkenntnissen über kardiovaskuläre Effekte ultrafeiner Partikel. Ultrafeine Partikel sind nanoskalige Partikel, die bei der Verbrennung von fossilen Treibstoffen, beispielsweise im Straßenverkehr, freigesetzt werden, und Bestandteil der Schmutzpartikel, die unter dem Begriff Feinstaub aus der Presse bekannt sind. In epidemiologischen Studien konnte ein erhöhtes Risiko für akute kardiovaskuläre Erkrankungen durch chronische Exposition gegenüber ultrafeinen Partikeln nachgewiesen werden [23-27]. Außerdem konnten Peters und Koautoren zeigen, dass ein für kardiovaskuläre Erkrankungen anfälliges Patientenkollektiv auch kurzfristig, also bereits eine Stunde nach der Teilnahme am Straßenverkehr, ein erhöhtes Risiko aufweist, einen Herzinfarkt zu erleiden [28]. Dieser Effekt könnte unter anderem durch die Exposition der Patienten gegenüber erhöhten Konzentrationen von ultrafeinen Partikeln in der Atemluft verursacht sein. Die Prozesse, welche einzeln oder in Kombination zu akuten kardiovaskulären Ereignissen nach Exposition gegenüber ultrafeinen Partikeln führen können, sind bislang nicht im Detail geklärt. Aus den Ergebnissen vorliegender Studien werden jedoch drei mögliche Mechanismen abgeleitet, welche diesen Effekten zugrunde liegen könnten. Der am besten untersuchte Mechanismus geht von einem durch regelmäßige Inhalation ultrafeiner Partikel induzierten, chronischen

Entzündungsprozess in der Lunge aus. In der Folge kommt es zur Abgabe von systemisch wirksamen Entzündungsmediatoren und reaktiven Sauerstoffspezies, die extrapulmonal das kardiovaskuläre System schädigen können [29-33]. Als weiterer Mechanismus wird beschrieben, dass ultrafeine Partikel das autonome Nervensystem, welches die Herz- und Gefäßfunktion reguliert, direkt negativ beeinflussen können [29-33]. Der dritte Erklärungsansatz bezieht sich auf die unmittelbaren Interaktionen nanoskaliger Partikel mit Zellpopulationen des Herz-Kreislaufsystems und damit auch deren unmittelbare schädliche kardiovaskuläre Effekte [29-33]. In diesem Zusammenhang wurde bereits gezeigt, dass ultrafeine Partikel [34], aber auch synthetische Nanomaterialien wie Titandioxid- [35], Iridium- [36], Silber- [37] und Kohlenstoff-Nanopartikel [38, 39] sowie Kohlenstoffnanoröhrchen [40] nach Inhalation die Blut-Luft-Schranke passieren oder über den tracheobronchialen Lymphabfluss in den Blutkreislauf gelangen können. Darüber hinaus werden synthetische Nanomaterialien, die zur gezielten Pharmakotherapie systemisch angewendet werden, direkt in die Blutzirkulation verabreicht. Letztendlich verteilen sich synthetische Nanomaterialien im gesamten menschlichen Körper und passieren die Mikrozirkulation der verschiedenen Gewebe und Organe. Dort sind unmittelbare Interaktionen mit Endothelzellen, zirkulierenden Thrombozyten und Leukozyten sowie weiteren Blutbestandteilen wie dem Komplementsystem, dem Gerinnungssystem und allen anderen Serumproteinen möglich. Die Folgen der beschriebenen Interaktionen können Inflammation, Thrombose, veränderter Gefäßtonus und Atherosklerose sein. Klinisch relevante Endpunkte sind die aus epidemiologischen Studien bekannten akuten kardiovaskulären Ereignisse [29-33]. Ultrafeine Partikel und synthetische Nanomaterialien sind in ihrer Größe vergleichbar und weisen ähnliche physikochemische Eigenschaften auf. Im Gegensatz zu ultrafeinen Partikeln ist

jedoch über mögliche schädliche Effekte synthetischer Nanomaterialien auf den menschlichen Körper wenig bekannt. Die Ergebnisse tierexperimenteller Studien deuten aber darauf hin, dass diese Materialien gesundheitsschädliche Folgen verursachen können [41-43]. Dies lässt den Schluss zu, dass auch synthetische Nanomaterialien negative Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem, zumindest in einem anfälligen Patientenkollektiv, entfalten können.

Effekte kohlenstoffbasierter Nanomaterialien auf Thrombozyten und die Entstehung von Thromben in der Mikrozirkulation

Endothelzellen kleiden die Innenseite intakter Blutgefäße im gesamten Körper aus und formen so die zelluläre Barriere zwischen dem Blutkompartiment und der Gefäßwand. Durch Verletzungen oder im Rahmen unterschiedlicher pathologischer Prozesse kann es zur Schädigung und zum Untergang von Endothelzellen kommen. Dadurch werden die subendotheliale Matrix oder tiefer gelegene Strukturen, wie die glatten Muskelzellen der *Tunica media* oder das Bindegewebe der *Tunica adventitia* freigelegt. Thrombozyten reagieren unmittelbar auf dieses Ereignis, indem sie sich im Bereich des entstandenen Defekts an die Gefäßwand anheften und so eine mögliche Blutung unterbinden (schematische Darstellung in Abbildung 2). Dieser Prozess der initialen Thrombozytenadhäsion wird unter anderem durch die direkte Bindung der Untereinheit Glykoprotein (GP) Iba des GPIb-IX-V-Rezeptor-Komplexes auf der Oberfläche der Thrombozyten an die A1-Proteindomäne des auf Kollagenfasern der subendothelialen Matrix gebundenen von-Willebrand-Faktors (vWF) vermittelt. Weiterhin tragen Interaktionen der thrombozytären Oberflächenproteine GP α 2 β 1 (synonym: GPIa-IIa) und GPVI mit subendothelialen Kollagenfasern sowie weiterer

thrombozytärer Glykoproteine mit Bestandteilen der subendothelialen Matrix, wie Fibronectin oder Laminin, zur Thrombozytenadhäsion bei. Insbesondere die Bindung von GPVI an Kollagenfasern bewirkt darüber hinaus eine Aktivierung der adhärenen Thrombozyten. Diese setzen in der Folge Agonisten wie Adenosindiphosphat, Serotonin und Thromboxan A_2 frei. Dadurch werden die bereits adhärenen Thrombozyten selbst weiter aktiviert. Darüber hinaus kommt es zu einer Aktivierung von Thrombozyten aus dem Blut, wodurch diese sich an den wachsenden Thrombus anheften können. Neben den Interaktionen thrombozytärer Glykoproteine mit vWF und Kollagenfasern der subendothelialen Matrix gibt es einen weiteren Wirkmechanismus der Thrombozytenaktivierung, der unabhängig von oder gemeinsam mit den oben genannten Prozessen auftritt. Dabei spielt Tissue Factor (synonym: Thromboplastin) aus den tieferen Schichten der verletzten Gefäßwand eine entscheidende Rolle. Tissue Factor bildet einen Komplex mit dem aktivierten Gerinnungsfaktor VIIa. Dieser Komplex spaltet und aktiviert nachfolgend den Gerinnungsfaktor X, wodurch eine proteolytische Kaskade ausgelöst wird, deren Endprodukt Thrombin ist. Thrombin spaltet schließlich den Protease-Aktivierten Rezeptor 1 auf der Oberfläche der Thrombozyten, wodurch diese ebenfalls aktiviert werden. Die Rekrutierung und Aggregation weiterer Thrombozyten aus dem Blut ist von der Ausbildung interthrombozytärer Verbindungen abhängig. Diese werden vor allem über die Bindung von Fibrinogenmolekülen aus dem Blutplasma an GP α IIb β 3 (synonym: GPIIb-IIIa) auf aktivierten Thrombozyten ausgebildet. Des Weiteren können aber auch vWF-Proteine, die an die thrombozytären Glykoproteine GPIb α und GP α IIb β 3 anheften, diese Verbindungen vermitteln [44, 45].

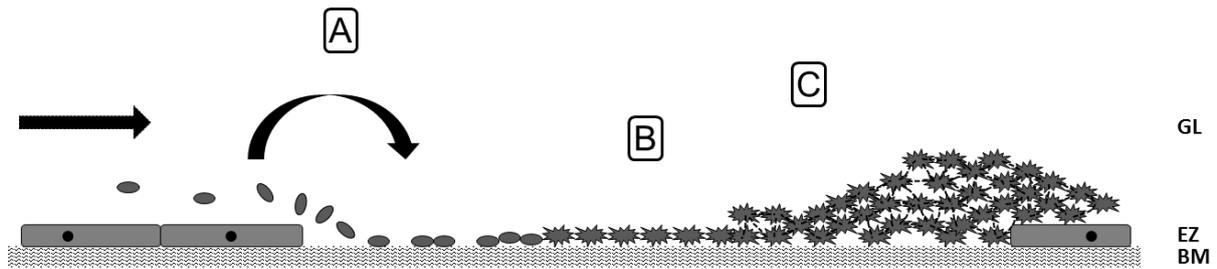


Abbildung 2. Bildung eines Thrombozytenaggregates nach Gefäßwandschädigung am Beispiel einer präkapillären Arteriole; **(A)** Adhäsion im Blut zirkulierender Thrombozyten an die freiliegende subendotheliale Matrix; **(B)** Aktivierung der Thrombozyten; **(C)** Stabilisierung des bestehenden Thrombozytenaggregates und Rekrutierung weiterer Thrombozyten durch Bindung von Proteinen wie Fibrinogen aus dem Plasma an thrombozytäres Glykoprotein IIb-IIIa; **Pfeil:** Blutfluss; **GL:** Gefäßlumen; **EZ:** Endothelzellen; **BM:** Basalmembran.

Interaktionen synthetischer Nanomaterialien mit dem humoralen Gerinnungssystem des Blutes sowie mit Thrombozyten könnten zu unerwünschten Folgen wie einer beschleunigten Thrombusbildung führen [46]. Für einige synthetische Nanomaterialien wurden bereits sowohl *in vitro* als auch *in vivo* pro-thrombotische Effekte bewiesen. So konnte gezeigt werden, dass nanoskalige Silberpartikel *in vitro* eine Thrombozytenaggregation auslösen und *in vivo* die Bildung eines Thrombozytenaggregates beschleunigen [47]. Nemmar und Mitarbeiter wiesen ebenfalls *in vitro*, aber auch *in vivo* die pro-thrombotischen Effekte amorpher Silizium-Nanopartikel nach [48]. Auch Polystyren-Nanopartikel beschleunigten *in vitro* und *in vivo* die Aggregation von Thrombozyten. Mit Aminogruppen besetzte Polystyren-Nanopartikel schienen die Thrombozyten direkt miteinander zu verbinden und so Thrombozytenaggregate bilden zu können. Diese Erkenntnis legen elektronenmikroskopische Aufnahmen nahe, in welchen diese Nanopartikel zwischen den einzelnen aktivierten Thrombozyten zu erkennen waren [49]. Unsere Arbeitsgruppe untersuchte kürzlich die Effekte unterschiedlicher industriell hergestellter Nanopartikel auf die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation von Mäusen. Es wurden Titandioxid-Nanopartikel in den zwei unterschiedlichen

natürlichen Modifikationen - Anatas und Rutil - sowie Siliziumdioxid-, Zinkoxid- oder Silber-Nanopartikel systemisch appliziert. Dabei konnte gezeigt werden, dass nur nach systemischer Gabe von Anatas-Titandioxid-Nanopartikeln die Thrombusbildung in der Mikrozirkulation der Skelettmuskulatur von Mäusen verkürzt war. Keine Effekte auf die Thrombusbildung hatten dagegen Rutil-Titandioxid-, Siliziumdioxid-, Zinkoxid- oder Silber-Nanopartikel. Diese Befunde konnten sowohl in vivo als auch in vitro bestätigt werden [50]. Nemmar und Kollegen wiesen in einem Thrombosemodell an Hamstern nach, dass die intratracheale Instillation von Dieselrußpartikeln zu einer beschleunigten photochemisch induzierten Thrombosierung der *Arteria* und *Vena femoralis* führt [51]. In einer weiteren Studie belegte diese Arbeitsgruppe ähnliche Effekte nach der Instillation oder der intravenösen Applikation von unterschiedlich geladenen Polystyren-Nanopartikel. Hierbei fand sich, dass nur die mit Aminogruppen besetzten, also positiv geladenen Partikel pro-thrombotische Effekte verursachten und eine intraluminale Thrombusbildung beschleunigten [52]. Auch kohlenstoffbasierte Nanomaterialien können sowohl in vitro als auch in vivo pro-thrombotische Effekte hervorrufen. In einer systematischen Untersuchung wiesen Guidetti und Mitarbeiter nach, dass mehrwandige Kohlenstoffnanoröhrchen und Industrierußpartikel die Thrombozytenaggregation beeinflussen. Interessanterweise wurde in dieser Studie die Thrombozytenaggregation durch mehrwandige Kohlenstoffnanoröhrchen bereits in geringeren Konzentrationen ($> 50 \mu\text{g/ml}$) und dosisabhängig induziert, während dies durch Industrierußpartikel erst ab einer höheren Dosis ($>100 \mu\text{g/ml}$) möglich war. In weitaus niedrigerer Dosierung ($10 \mu\text{g/ml}$) wirkten sowohl mehrwandige Kohlenstoffnanoröhrchen als auch Industrierußpartikel zusammen mit dem unterschwellig dosierten Thrombozytenagonisten und Thromboxan- A_2 -Analogon U46619 synergistisch und führten zu einer signifikant verstärkten Thrombozytenaggregation [53]. Khandoga und Kollegen zeigten anhand

eines Mausmodells, dass unabhängig vom Aufnahmeweg sowohl die intraarterielle Gabe als auch die Inhalation von Industrierußpartikel zu einer GP-IIb/IIIa-abhängigen Adhäsion von Thrombozyten in der hepatischen Mikrozirkulation führten. Zusätzlich waren Fibrinablagerungen in der Mikrozirkulation wichtiger extrapulmonaler Organen wie Leber und Herz nachweisbar [54, 55]. Durch welche Eigenschaften Nanopartikel Thrombozyten aktivieren können, ist nur unzulänglich erforscht. Die äußere Form scheint einen großen Einfluss auf die pro-thrombotischen Eigenschaften synthetischer Nanomaterialien zu haben. So konnten Radomski und Koautoren in wegweisenden Experimenten zeigen, dass durch die Inkubation von humanen Thrombozyten mit faserförmigen einwandigen und mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhrchen, nicht jedoch mit sphärischen, ebenfalls aus 60 Kohlenstoffatomen aufgebauten synthetischen Nanomaterialien, den Fullerenen, eine verstärkte Thrombozytenaggregation induziert wurde. Zudem wies die Arbeitsgruppe an Ratten nach, dass wiederum nur faserförmige Kohlenstoffnanoröhrchen nach intravenöser Gabe in vivo die Thrombosierung der *Arteria carotis* in Folge einer Schädigung der Gefäßwand durch Eisen(III)-chlorid beschleunigten [56]. In einem anderen Ansatz belegten Meng und Mitarbeiter in vitro unter Verwendung von humanem Vollblut, dass die Länge der Kohlenstoffnanoröhrchen ebenfalls einen Einfluss auf das Aktivierungspotential von Thrombozyten hat. Insgesamt führten alle verwendeten mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhrchen zu einer Thrombozytenaktivierung, wobei die längeren mehrwandigen Kohlenstoffnanoröhrchen die Thrombozyten stärker aktivierten als die kürzeren [57]. In dieser Studie wurde zudem untersucht, ob auch die elektrische Ladung der Oberfläche der Kohlenstoffnanoröhrchen einen Einfluss auf die Vitalität von Thrombozyten hat. So wirkten lange und aminierte mehrwandige Kohlenstoffnanoröhrchen, also Nanoröhrchen deren Oberfläche mit Aminogruppen

besetzt und somit positiv geladen waren, auf die Thrombozyten zytotoxisch. Im Gegensatz dazu hatten sowohl kurze aminierte als auch lange und kurze mit Carboxylgruppen besetzte und dadurch negativ geladene Kohlenstoffnanoröhrchen keinen Einfluss auf die Vitalität der Thrombozyten [57]. Auch Burke und Kollegen untersuchten mögliche pro-thrombotische Effekte von unbeschichteten, aminierten und carboxylierten Kohlenstoffnanoröhrchen. In Einklang mit der oben genannten Studie von Meng konnten sie in vitro ebenfalls nachweisen, dass insbesondere aminierte mehrwandige Kohlenstoffnanoröhrchen Thrombozyten aktivierten. Weiterhin wurde durch alle in dieser Studie verwendeten Nanomaterialien der intrinsische Weg der Gerinnungskaskade dosisabhängig in Gang gesetzt. In vivo dagegen kam es nur nach venöser Gabe carboxylierter mehrwandiger Kohlenstoffnanoröhrchen zu einem signifikanten Abfall der systemischen Thrombozytenzahl, während aminierte und unbeschichtete Kohlenstoffnanoröhrchen im Blutkreislauf der Mäuse die Anzahl an systemischen Thrombozyten nicht veränderten [58]. In Tabelle 1 werden die wichtigsten Ergebnisse der oben genannten Studien über pro-thrombotische Eigenschaften kohlenstoffbasierter Nanomaterialien nochmals aufgelistet.

Aus den Erkenntnissen dieser Studien ergeben sich die Fragestellungen, ob (i) pro-thrombotische Effekte durch die in der Industrie bereits vielfach eingesetzten Nanomaterialien einwandige Kohlenstoffnanoröhrchen und Industrierußpartikel sowohl in größeren Gefäßen als auch in der Mikrozirkulation von Mäusen in vivo zu beobachten sind, ob (ii) die möglichen pro-thrombotischen Effekte kohlenstoffbasierter Nanomaterialien abhängig von der jeweiligen Form der Partikel sind (sphärisch vs. faserförmig) und ob (iii) pro-thrombotische Effekte kohlenstoffbasierter Nanomaterialien auch in vitro nachweisbar sind.

Nanomaterial	Modell / Applikationsweg	Effekt	Referenz
MWCNT, CB	<ul style="list-style-type: none"> - Stimulation von gewaschenen humanen Thrombozyten mit kohlenstoffbasierten Nanomaterialen - Messung der Thrombozytenaggregation mit Lumi-Aggregometer 	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombozytenaggregation durch MWCNT und CB in hohen Dosen - Thrombozytenaggregation synergistisch durch kohlenstoffbasierte Nanomaterialen in niedrigen Dosen und Thromboxan-A₂-Analogon U46619 - Thrombozytenaggregation abhängig von GP IIb/IIIa-Fibrinogen-Interaktion 	[53]
CB	<ul style="list-style-type: none"> - Intraarterielle Gabe / Inhalation im Mausmodell - Messung der Thrombozytenaggregation mit Intravitalmikroskopie, Immunfärbung und Durchflusszytometrie - Untersuchung prothrombotischer Effekte in der Mikrozirkulation mit Intravitalmikroskopie und gefärbten histologischen Schnitten 	<ul style="list-style-type: none"> - Erhöhte Anzahl an adhärenenten Thrombozyten in der hepatischen Mikrozirkulation - Effekt GP IIb/IIIa-abhängig, kann durch Gabe eines GP-IIb/IIIa-Rezeptor-Antagonisten aufgehoben werden - Fibrinablagerungen in der Mikrozirkulation von Lunge und Herz - Effekte unabhängig vom Aufnahmeweg 	[54, 55]
SWCNT, MWCNT, Fullerene	<ul style="list-style-type: none"> - Inkubation von gewaschenen humanen Thrombozyten mit kohlenstoffbasierten Nanomaterialen - Messung der Thrombozytenaggregation mit Aggregometer - Messung der Thrombozytenaktivierung mit Durchflusszytometrie - Intravenöse Gabe im Rattenmodell 	<ul style="list-style-type: none"> - Gesteigerte Thrombozytenaggregation nur durch faserförmige Kohlenstoffnanoröhrchen, nicht durch sphärische Fullerene - Beschleunigte Thrombosierung der <i>Arteria carotis</i> nur durch faserförmige Kohlenstoffnanoröhrchen, nicht durch sphärische Fullerene - Aktivierung von Thrombozyten durch faserförmige Kohlenstoffnanoröhrchen 	[56]
MWCNT: lang (50 µm), kurz (0,5 – 2 µm), aminiert, carboxyliert	<ul style="list-style-type: none"> - Inkubation von humanem Vollblut mit aminierten oder carboxylierten MWCNT - Messung der Thrombozytenvitalität und -aktivierung mit Durchflusszytometrie 	<ul style="list-style-type: none"> - Nur lange aminierte MWCNT wirken auf Thrombozyten zytotoxisch - Bei gleicher Oberflächenladung aktivieren lange MWCNT (50 µm) Thrombozyten signifikant stärker als kürzere (0,5 – 2 µm) 	[57]

MWCNT: unbehandelt, aminiert, carboxyliert	In vitro:	[58]
	<ul style="list-style-type: none"> - Inkubation von humanem thrombozytenreichem Plasma mit MWCNT und Messung der Thrombozytenaktivierung mit Durchflusszytometrie sowie der Thrombozytenaggregation mit Konfokalmikroskopie - Inkubation von humanem Blutplasma mit MWCNT und Messung der aktivierten partiellen Thromboplastinzeit 	<ul style="list-style-type: none"> - Thrombozytenaktivierung insbesondere durch aminierte MWCNT - Thrombozytenaggregation nur durch aminierte MWCNT - Dosisabhängige Aktivierung des intrinsischen Wegs der Gerinnungskaskade durch alle verwendeten MWCNT
	In vivo:	
	<ul style="list-style-type: none"> - Intravenöse Gabe im Mausmodell und Messung der systemischen Thrombozytenzahl mit Coulter-Counter 	<ul style="list-style-type: none"> - Abfall der systemischen Thrombozytenzahl nur nach Gabe von carboxylierten MWCNT - Systemische Thrombozytenzahl nach Gabe von unbehandelten und aminierten MWCNT unverändert

Tabelle 1. Pro-thrombotische Effekte kohlenstoffbasierter Nanomaterialien in vitro und in vivo; Abkürzungen: **MWCNT** = mehrwandige Kohlenstoffnanoröhrchen (engl.: *multi-walled carbon nanotubes*); **SWCNT** = einwandige Kohlenstoffnanoröhrchen (engl.: *single-walled carbon nanotubes*); **CB** = Industrierußpartikel (engl.: *carbon black*); **GP** = Glykoprotein; **aminiert** = Oberfläche der Kohlenstoffnanoröhrchen mit Aminogruppen beschichtet, **carboxyliert** = Oberfläche der Kohlenstoffnanoröhrchen mit Carboxylgruppen beschichtet.

Effekte kohlenstoffbasierter Nanomaterialien auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Mikrozirkulation

Wie oben aufgeführt, spielen auch Entzündungsreaktionen bei der Entstehung von Herz-Kreislauferkrankungen eine wesentliche Rolle. Im menschlichen Körper wird eine Entzündungsreaktion ausgelöst, um beispielsweise Krankheitserreger oder Schadstoffe aus dem Gewebe von Organen zu eliminieren. Die Rekrutierung von Leukozyten aus den postkapillären Venolen der Mikrozirkulation in erkranktes Gewebe ist ein mehrstufiger Prozess (schematische Darstellung in Abbildung 3). Leukozyten rollen zunächst auf den Endothelzellen. Dieser erste Schritt wird vor allem durch die Interaktion von P- und E-Selektinen auf Endothelzellen mit ihren entsprechenden Liganden, die auf der Oberfläche von Leukozyten wie neutrophilen Granulozyten und Monozyten, zum Beispiel *P-selectin glycoprotein ligand-1* (PSGL-1; CD162), exprimiert sind, eingeleitet und als Rolling bezeichnet. Der auf den Endothelzellen rollende Leukozyt kann nach Aktivierung durch endothelial präsentierte Chemokine schließlich an den Endothelzellen haften bleiben, was als sogenannte feste Adhärenz bezeichnet wird. Dieser Schritt wird insbesondere durch Interaktionen von leukozytären Integrinen wie *lymphocyte function-associated antigen* (LFA-1; CD11a/CD18), *macrophage-1 antigen* (Mac-1; CD11b/CD18) oder *very late antigen-4* (VLA-4; CD49d/CD29) und deren Liganden *intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1; CD54), *intercellular adhesion molecule-2* (ICAM-2; CD102) und *vascular cell adhesion molecule 1* (VCAM-1; CD106) auf der Oberfläche von Endothelzellen vermittelt. In einem letzten Schritt wandert der Leukozyt durch die Gefäßwand, die sogenannte Transmigration, in das umliegende interstitielle Gewebe. Bei diesem Schritt spielen unter anderem die Moleküle *vascular endothelial cadherin* (VE-Cadherin; CD144), *platelet-endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1;

CD31), *junctional adhesion molecule A* (JAM-A), *endothelial cell-selective adhesion molecule* (ESAM), ICAM-2 oder CD99 eine entscheidende Rolle. Im interstitiellen Gewebe können Krankheitserreger oder krankheitserregende Stoffe schließlich durch die eingewanderten Leukozyten neutralisiert werden [59].

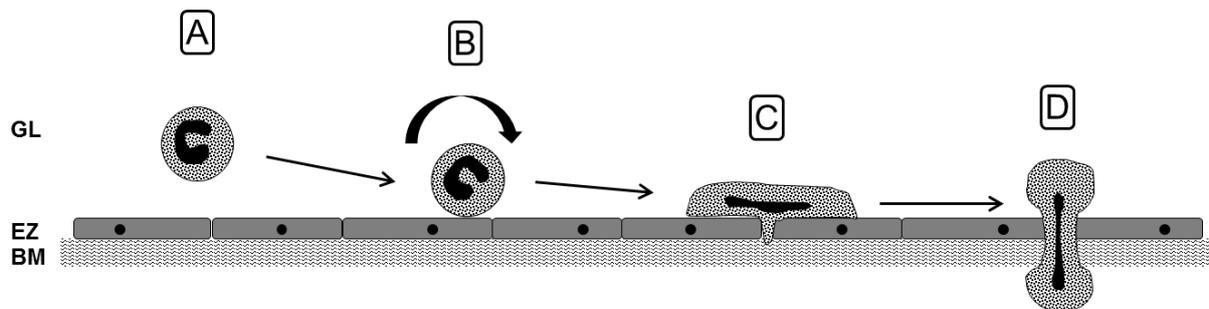


Abbildung 3. Leukozytenrekrutierung aus einer postkapillären Venole der Mikrozirkulation; **(A)** Im Blut zirkulierender Leukozyt; **(B)** Rollen; **(C)** feste Adhärenz; **(D)** Transendotheliale Migration des Leukozyten durch die Gefäßwand; **GL:** Gefäßlumen; **EZ:** Endothelzellen; **BM:** Basalmembran; modifiziert nach [59].

Über Effekte synthetischer Nanomaterialien auf die beschriebenen Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen als Ursache für Herz-Kreislaufkrankungen ist bislang sehr wenig bekannt. Tierexperimentelle Studien haben jedoch bereits gezeigt, dass künstlich hergestellte und insbesondere faserförmige kohlenstoffbasierte Nanomaterialien unabhängig von ihrem Aufnahmeweg (Inhalation/Instillation oder intraperitoneale Injektion) pro-inflammatorische Effekte induzieren [60-63]. Im Gegensatz dazu gibt es bislang kaum In-vivo-Studien, welche mögliche Einflüsse synthetischer Nanomaterialien auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Mikrozirkulation untersucht haben. Nurkiewicz und Mitarbeiter belegten, dass die Homöostase der Mikrozirkulation von Ratten nach Inhalation nanoskaliger Titandioxidpartikel gestört ist. So war einerseits die Gefäßdilatation der Arteriolen durch die inhalierten Nanopartikel beeinträchtigt. Zusätzlich war die Anzahl der an der Endothelzellwand rollenden und adhärenen Leukozyten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöht [64]. Unsere Arbeitsgruppe zeigte, dass bis 120

Minuten nach systemischer Gabe nanoskaliger Titandioxid-, Zinkoxid-, Siliziumoxid und Silberpartikel keiner der oben beschriebenen Schritte der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Mikrozirkulation von Mäusen beeinflusst wird [50]. Systemisch verabreichte Quantenpunkte hingegen, welche an ihrer Oberfläche mit negativ geladenen Carboxylgruppen besetzt waren, führten zu einer gesteigerten Adhäsion und Transmigration von Leukozyten in der Mikrozirkulation von Mäusen, während ungeladene oder positiv geladene, aminierte Quantenpunkte die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen nicht beeinflussten [65]. In postischämischem Gewebe steigerten dagegen nur die positiv geladenen aminierten Quantenpunkte die Transmigration von Leukozyten in die Mikrozirkulation, wodurch die durch Ischämie und Reperfusion ausgelöste Entzündungsreaktion noch verstärkt wurde [66]. Interessanterweise wies die Arbeitsgruppe um Uchiyama antiinflammatorische Effekte synthetischer Gold-Nanopartikel in der mesenterialen Mikrozirkulation von Ratten nach. Die Nanopartikel waren hierbei mit aus Mäusen gewonnenen Anti-H3-Immunglobulin-G-Molekülen konjugiert. Die intravenöse Gabe dieser Partikel vor einer lokalen Applikation von Leukotrien B4 konnte sogar die zu erwartende lokale Entzündungsreaktion, gekennzeichnet durch eine erhöhte Anzahl von adhären Leukozyten in den postkapillären mesenterialen Venolen, verhindern [67]. Ob auch kohlenstoffbasierte Nanomaterialien die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Mikrozirkulation in vivo beeinflussen, ist bislang weitgehend unbekannt. Khandoga und Koautoren stellten in ihren bereits oben zitierten Studien im Mausmodell unabhängig vom Applikationsweg, d.h. weder nach intraarterieller Injektion noch nach Inhalation von Industrierußpartikeln, vermehrte Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Mikrozirkulation der Leber von Mäusen fest [54, 55]. Die Effekte systemisch verabreichter einwandiger Kohlenstoffnanoröhrchen auf Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen in der Mikrozirkulation wurden in vivo jedoch noch nicht

untersucht. Aufbauend auf den Ergebnissen der ersten Studie über die prothrombotischen Effekte einwandiger Kohlenstoffnanoröhrchen in der Mikrozirkulation von Mäusen entwickelten wir daher eine weitere Studie, um zu untersuchen, ob (i) kohlenstoffbasierte Nanomaterialien die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und die Leukozyten-Transmigration akut (bis 120 Minuten) und subakut (bis vier Stunden) nach systemischer Gabe beeinflussen können, (ii) die Form der Nanomaterialien (sphärisch vs. faserförmig) hierbei eine Rolle spielt und (iii) kohlenstoffbasierte Nanomaterialien Leukozyten in vitro aktivieren und somit pro-inflammatorische Effekte verursachen können.

Zusammenfassung

Synthetische Nanomaterialien besitzen aufgrund ihrer geringen Größe mit definitionsgemäß mindestens einer Dimension unter 100 Nanometer außergewöhnliche physikochemische Eigenschaften. Wegen ihren besonderen mechanischen Eigenschaften und ihrem Verhalten in biologischer Umgebung gelten Kohlenstoffnanoröhrchen, eine spezielle Form synthetischer Nanomaterialien, als wichtiges Produkt für die Entwicklung von Verbundstoffen in Industrie und Technik, aber auch als vielversprechendes nanotechnologisches Material in der Medizin. Die außerordentlichen Eigenschaften dieser synthetischen Nanomaterialien werfen jedoch Fragen über ihre Kompatibilität und mögliche Toxizität im menschlichen Körper auf. Aus epidemiologischen Studien ist bekannt, dass ultrafeine Partikel, die bei der Verbrennung von fossilen Brennstoffen in die Umwelt gelangen, negative Effekte auf das Herzkreislaufsystem ausüben. Ursächlich hierfür sind unter anderem pro-thrombotische und pro-inflammatorische Effekte ultrafeiner Partikel, die zu akuten kardiovaskulären Ereignissen führen können. Ähnliche Effekte sind durch synthetische Nanomaterialien, wie einwandige Kohlenstoffnanoröhrchen oder Industrierußpartikel, nach deren Eindringen in den Blutkreislauf ebenfalls denkbar. So sind insbesondere in der Mikrozirkulation durch Interaktionen solcher synthetischer Nanomaterialien mit Thrombozyten pro-thrombotische Effekte sowie durch Interaktionen mit Leukozyten und Endothelzellen pro-inflammatorische Effekte möglich. Entsprechende Daten aus tierexperimentellen In-vivo-Studien sind bislang jedoch nur unzureichend verfügbar. Das Ziel der dieser Dissertation zugrunde liegenden Studien war es daher, mögliche pro-thrombotische und pro-inflammatorische Effekte in der akuten (bis 120 Minuten) und subakuten (bis 4 Stunden) Phase nach systemischer Gabe kohlenstoffbasierter Nanomaterialien unterschiedlicher Form, faserförmiger einwandiger Kohlenstoffnanoröhrchen und

sphärischer Industrierußpartikel, in der Mikrozirkulation von Mäusen zu untersuchen, beziehungsweise diese Effekte in vitro zu überprüfen. Zunächst wurde die durch phototoxische Schädigung induzierte Thrombusbildung in der Mikrozirkulation der Mäuse unmittelbar nach systemischer Gabe der kohlenstoffbasierten Nanomaterialien in aufsteigender Dosierung (0,01 – 1 mg/kg) untersucht. Weiterhin wurden ebenfalls nach systemischer Applikation der kohlenstoffbasierten Nanomaterialien (1 mg/kg) die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und die Transmigration von Leukozyten aus der Mikrozirkulation mit Hilfe der Intravitalmikroskopie akut (bis 120 Minuten) und subakut (bis vier Stunden) beobachtet. In vitro wurden mittels Durchflusszytometrie einerseits die Expression von P-Selektin auf humanen Thrombozyten und die Anzahl an Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen sowie andererseits die Expression der Oberflächenmoleküle CD11b, CD11c und CD18 auf Monozyten und Granulozyten nach Inkubation von humanem Vollblut mit den synthetischen Nanomaterialien untersucht. In den In-vivo-Untersuchungen hatten die beiden unterschiedlich konfigurierten kohlenstoffbasierten Nanomaterialien in der Dosis von 1 mg/kg Körpergewicht bis zu vier Stunden nach systemischer Applikation keinen Einfluss auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und die Transmigration von Leukozyten in der Mikrozirkulation der Mäuse. Im Gegensatz dazu führten faserförmige einwandige Kohlenstoffnanoröhrchen wie auch sphärische Industrierußpartikel in gleicher Dosierung (1 mg/kg) unmittelbar nach systemischer Gabe zu einer signifikant beschleunigten Thrombusbildung in den Arteriolen der Mikrozirkulation der Mäuse. Die Ergebnisse der In-vitro-Untersuchungen, welche eine signifikant stärkere Expression von P-Selektin auf Thrombozyten und eine signifikant größere Anzahl an Thrombozyten-Granulozyten-Komplexen ergaben, stützten die Ergebnisse der In-vivo-Experimente. Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass

kohlenstoffbasierte Nanomaterialien unabhängig von ihrer Form – faserförmig vs. sphärisch – in vitro Thrombozyten aktivieren und in vivo pro-thrombotische Effekte entfalten können.

Summary

Engineered nanomaterials exhibit extraordinary and entirely different physicochemical properties compared to larger particles of the same material. These specific attributes of engineered nanomaterials are predominantly a result of their small size that is by definition less than 100 nanometers at least in one dimension. Carbon nanotubes, which are one type of carbon-based nanomaterials, are considered to be important for the development of compound materials for industrial applications because of their tremendous mechanical capabilities and for delivery systems in medicine due to their distinct behavior in biological systems. These unique properties of carbon-based nanomaterials also raise concerns about the compatibility and possible toxicity in the human body. It is well known from epidemiological studies that ultrafine particles, which are also at the nanoscale and released during combustion of fossil fuels into the ambient air, are able to impair the cardiovascular system. It has been shown that, amongst others, thrombosis and inflammation are responsible for acute adverse cardiovascular events. Similar adverse effects of engineered nanomaterials such as single-walled carbon nanotubes and carbon black are possible upon translocation into the bloodstream. In particular, interactions of these engineered nanomaterials with platelets, endothelial cells, and leukocytes in the microcirculation raise concerns about their pro-thrombotic and pro-inflammatory potential. There are, however, only few *in vivo* studies addressing these issues. Thus, the aim of our studies was to test and compare possible pro-thrombotic and pro-inflammatory effects of differently shaped carbon-based nanomaterials (fiber-shaped single-walled carbon nanotubes and spherical carbon black), in the acute (up to 120 minutes) and subacute (up to four hours) phase upon systemic administration into mice. In a first set of experiments, thrombus formation elicited by phototoxic injury was analyzed in the microcirculation of mice

immediately after systemic application of carbon-based nanomaterials in different doses (0.01 – 1 mg/kg). The second approach was the analysis of leukocyte-endothelial cell interactions and transmigration of leukocytes in the murine microvasculature in an acute (up to 120 minutes) and a subacute (four hours) setting using *in vivo* microscopy. *In vitro*, platelet P-selectin expression and formation of platelet-granulocyte-complexes as well as the expression of CD11b, CD11c and CD18 on human monocytes and granulocytes upon incubation of human whole blood with engineered nanomaterials were assessed by flow cytometry. The results of these *in vivo* experiments show that differently shaped carbon-based nanomaterials (1 mg/kg body weight) do neither affect leukocyte-endothelial cell interactions in the microvasculature nor transmigration of leukocytes to the perivascular tissue up to four hours upon systemic administration. In contrast, fiber-shaped single-walled carbon nanotubes and spherical carbon black at the same dose (1 mg/kg) led to significantly enhanced thrombus formation in arterioles of the murine microcirculation immediately upon systemic injection. Results from *in vitro* measurements, which revealed a significantly higher expression of P-selectin on human platelets and a significantly higher number of platelet-granulocyte-complexes, confirmed the *in vivo* findings. Taken together, these results demonstrate that carbon-based nanomaterials activate platelets *in vitro* and exert pro-thrombotic effects *in vivo* independently of their shape.

Veröffentlichungen mit Fundstellen

Veröffentlichung I

Single-walled carbon nanotubes activate platelets and accelerate thrombus formation in the microcirculation.

Bihari, P., **M. Holzer**, M. Praetner, J. Fent, M. Lerchenberger, C.A. Reichel, M. Rehberg, S. Lakatos, F. Krombach. **Toxicology**, 2010. 269(2-3): p. 148-54.
doi: 10.1016/j.tox.2009.08.011.

Veröffentlichung II

Carbon-based nanomaterials accelerate arteriolar thrombus formation in the murine microcirculation independently of their shape.

Holzer, M., P. Bihari, M. Praetner, B. Uhl, C. Reichel, J. Fent, M. Vippola, S. Lakatos, F. Krombach. **J Appl Toxicol**, 2014. 34(11): p. 1167-76.
doi: 10.1002/jat.2996.

Literatur

1. Nel, A., et al., *Toxic potential of materials at the nanolevel*. Science, 2006. **311**(5761): p. 622-7.
2. Oberdorster, G., E. Oberdorster, and J. Oberdorster, *Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles*. Environ Health Perspect, 2005. **113**(7): p. 823-39.
3. Colvin, V.L., *The potential environmental impact of engineered nanomaterials*. Nat Biotechnol, 2003. **21**(10): p. 1166-70.
4. Maynard, A.D., et al., *Safe handling of nanotechnology*. Nature, 2006. **444**(7117): p. 267-9.
5. Iijima, S., *Helical microtubules of graphitic carbon*. Nature, 1991. **354**(6348): p. 56-58.
6. Falcao, E.H.L. and F. Wudl, *Carbon allotropes: beyond graphite and diamond*. Journal of Chemical Technology & Biotechnology, 2007. **82**(6): p. 524-531.
7. Holzer, M., et al., *Carbon-based nanomaterials accelerate arteriolar thrombus formation in the murine microcirculation independently of their shape*. J Appl Toxicol, 2014. **34**(11): p. 1167-76.
8. Lu, W., et al., *State of the art of carbon nanotube fibers: opportunities and challenges*. Adv Mater, 2012. **24**(14): p. 1805-33.
9. De Volder, M.F.L., et al., *Carbon Nanotubes: Present and Future Commercial Applications*. Science, 2013. **339**(6119): p. 535-539.
10. Kaiser, A.B. and V. Skakalova, *Electronic conduction in polymers, carbon nanotubes and graphene*. Chem Soc Rev, 2011. **40**(7): p. 3786-801.
11. Dai, L., et al., *Carbon nanomaterials for advanced energy conversion and storage*. Small, 2012. **8**(8): p. 1130-66.
12. Puertolas, J.A. and S.M. Kurtz, *Evaluation of carbon nanotubes and graphene as reinforcements for UHMWPE-based composites in arthroplastic applications: A review*. J Mech Behav Biomed Mater, 2014. **39**: p. 129-45.
13. Fabbro, A., M. Prato, and L. Ballerini, *Carbon nanotubes in neuroregeneration and repair*. Adv Drug Deliv Rev, 2013. **65**(15): p. 2034-44.
14. Hopley, E.L., et al., *Carbon nanotubes leading the way forward in new generation 3D tissue engineering*. Biotechnol Adv, 2014. **32**(5): p. 1000-14.
15. Bianco, A., et al., *Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes*. Chem Commun (Camb), 2005(5): p. 571-7.
16. Prato, M., K. Kostarelos, and A. Bianco, *Functionalized carbon nanotubes in drug design and discovery*. Acc Chem Res, 2008. **41**(1): p. 60-8.
17. Kostarelos, K., A. Bianco, and M. Prato, *Promises, facts and challenges for carbon nanotubes in imaging and therapeutics*. Nat Nanotechnol, 2009. **4**(10): p. 627-33.
18. Shi, D., N.M. Bedford, and H.S. Cho, *Engineered multifunctional nanocarriers for cancer diagnosis and therapeutics*. Small, 2011. **7**(18): p. 2549-67.
19. Heister, E., et al., *Are Carbon Nanotubes a Natural Solution? Applications in Biology and Medicine*. ACS Applied Materials & Interfaces, 2013. **5**(6): p. 1870-1891.
20. Biju, V., *Chemical modifications and bioconjugate reactions of nanomaterials for sensing, imaging, drug delivery and therapy*. Chem Soc Rev, 2014. **43**(3): p. 744-64.
21. Al Faraj, A., *SWCNTs as novel theranostic nanocarriers for cancer diagnosis and therapy: towards safe translation to the clinics*. Nanomedicine (Lond), 2016. **11**(11): p. 1431-45.
22. Liu, Z., et al., *Drug delivery with carbon nanotubes for in vivo cancer treatment*. Cancer Res, 2008. **68**(16): p. 6652-60.
23. Forastiere, F., et al., *A case-crossover analysis of out-of-hospital coronary deaths and air pollution in Rome, Italy*. Am J Respir Crit Care Med, 2005. **172**(12): p. 1549-55.
24. Stolzel, M., et al., *Daily mortality and particulate matter in different size classes in Erfurt, Germany*. J Expo Sci Environ Epidemiol, 2007. **17**(5): p. 458-67.
25. Breitner, S., et al., *Short-term mortality rates during a decade of improved air quality in Erfurt, Germany*. Environ Health Perspect, 2009. **117**(3): p. 448-54.

26. Breitner, S., et al., *Sub-micrometer particulate air pollution and cardiovascular mortality in Beijing, China*. *Sci Total Environ*, 2011. **409**(24): p. 5196-204.
27. Ostro, B., et al., *Associations of mortality with long-term exposures to fine and ultrafine particles, species and sources: results from the California Teachers Study Cohort*. *Environ Health Perspect*, 2015. **123**(6): p. 549-56.
28. Peters, A., et al., *Exposure to traffic and the onset of myocardial infarction*. *N Engl J Med*, 2004. **351**(17): p. 1721-30.
29. Schulz, H., et al., *Cardiovascular effects of fine and ultrafine particles*. *J Aerosol Med*, 2005. **18**(1): p. 1-22.
30. Mills, N.L., et al., *Adverse cardiovascular effects of air pollution*. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med*, 2009. **6**(1): p. 36-44.
31. Mann, E.E., et al., *Changes in cardiopulmonary function induced by nanoparticles*. *Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol*, 2012. **4**(6): p. 691-702.
32. Shannahan, J.H., U.P. Kodavanti, and J.M. Brown, *Manufactured and airborne nanoparticle cardiopulmonary interactions: a review of mechanisms and the possible contribution of mast cells*. *Inhal Toxicol*, 2012. **24**(5): p. 320-39.
33. Donaldson, K., et al., *Nanoparticles and the cardiovascular system: a critical review*. *Nanomedicine (Lond)*, 2013. **8**(3): p. 403-23.
34. Oberdorster, G., et al., *Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain*. *Inhal Toxicol*, 2004. **16**(6-7): p. 437-45.
35. Geiser, M., et al., *Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells*. *Environ Health Perspect*, 2005. **113**(11): p. 1555-60.
36. Kreyling, W.G., et al., *Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low*. *J Toxicol Environ Health A*, 2002. **65**(20): p. 1513-30.
37. Takenaka, S., et al., *Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats*. *Environ Health Perspect*, 2001. **109 Suppl 4**: p. 547-51.
38. Oberdorster, G., et al., *Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats*. *J Toxicol Environ Health A*, 2002. **65**(20): p. 1531-43.
39. Nemmar, A., et al., *Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans*. *Circulation*, 2002. **105**(4): p. 411-4.
40. Mercer, R.R., et al., *Extrapulmonary transport of MWCNT following inhalation exposure*. *Part Fibre Toxicol*, 2013. **10**(1): p. 38.
41. Elder, A.C., et al., *Systemic effects of inhaled ultrafine particles in two compromised, aged rat strains*. *Inhal Toxicol*, 2004. **16**(6-7): p. 461-71.
42. Chen, Z., et al., *Age-related differences in pulmonary and cardiovascular responses to SiO₂ nanoparticle inhalation: nanotoxicity has susceptible population*. *Environ Sci Technol*, 2008. **42**(23): p. 8985-92.
43. LeBlanc, A.J., et al., *Nanoparticle inhalation impairs endothelium-dependent vasodilation in subepicardial arterioles*. *J Toxicol Environ Health A*, 2009. **72**(24): p. 1576-84.
44. Furie, B. and B.C. Furie, *Mechanisms of thrombus formation*. *N Engl J Med*, 2008. **359**(9): p. 938-49.
45. Savage, B. and Z.M. Ruggeri, *CHAPTER 18 - Platelet Thrombus Formation in Flowing Blood A2 - Michelson, Alan D, in Platelets (Second Edition)*. 2007, Academic Press: Burlington. p. 359-376.
46. Ilinskaya, A.N. and M.A. Dobrovolskaia, *Nanoparticles and the blood coagulation system. Part II: safety concerns*. *Nanomedicine (Lond)*, 2013. **8**(6): p. 969-81.
47. Jun, E.A., et al., *Silver nanoparticles enhance thrombus formation through increased platelet aggregation and procoagulant activity*. *Nanotoxicology*, 2011. **5**(2): p. 157-67.
48. Nemmar, A., et al., *Amorphous silica nanoparticles impair vascular homeostasis and induce systemic inflammation*. *Int J Nanomedicine*, 2014. **9**: p. 2779-89.

49. Smyth, E., et al., *Induction and enhancement of platelet aggregation in vitro and in vivo by model polystyrene nanoparticles*. *Nanotoxicology*, 2014: p. 1-9.
50. Haberl, N., et al., *Effects of acute systemic administration of TiO₂, ZnO, SiO₂, and Ag nanoparticles on hemodynamics, hemostasis and leukocyte recruitment*. *Nanotoxicology*, 2015. **9**(8): p. 963-71.
51. Nemmar, A., et al., *Possible mechanisms of the cardiovascular effects of inhaled particles: systemic translocation and prothrombotic effects*. *Toxicol Lett*, 2004. **149**(1-3): p. 243-53.
52. Nemmar, A., et al., *Ultrafine particles affect experimental thrombosis in an in vivo hamster model*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. **166**(7): p. 998-1004.
53. Guidetti, G.F., et al., *Nanoparticles induce platelet activation in vitro through stimulation of canonical signalling pathways*. *Nanomedicine*, 2012. **8**(8): p. 1329-36.
54. Khandoga, A., et al., *Ultrafine particles exert prothrombotic but not inflammatory effects on the hepatic microcirculation in healthy mice in vivo*. *Circulation*, 2004. **109**(10): p. 1320-5.
55. Khandoga, A., et al., *Platelet adhesion and fibrinogen deposition in murine microvessels upon inhalation of nanosized carbon particles*. *J Thromb Haemost*, 2010. **8**(7): p. 1632-40.
56. Radomski, A., et al., *Nanoparticle-induced platelet aggregation and vascular thrombosis*. *Br J Pharmacol*, 2005. **146**(6): p. 882-93.
57. Meng, J., et al., *Effects of long and short carboxylated or aminated multiwalled carbon nanotubes on blood coagulation*. *PLoS One*, 2012. **7**(7): p. e38995.
58. Burke, A.R., et al., *Determinants of the thrombogenic potential of multiwalled carbon nanotubes*. *Biomaterials*, 2011. **32**(26): p. 5970-8.
59. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. *Nat Rev Immunol*, 2007. **7**(9): p. 678-89.
60. Lam, C.W., et al., *Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation*. *Toxicol Sci*, 2004. **77**(1): p. 126-34.
61. Shvedova, A.A., et al., *Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005. **289**(5): p. L698-708.
62. Shvedova, A.A., et al., *Inhalation vs. aspiration of single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice: inflammation, fibrosis, oxidative stress, and mutagenesis*. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2008. **295**(4): p. L552-65.
63. Poland, C.A., et al., *Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study*. *Nat Nanotechnol*, 2008. **3**(7): p. 423-8.
64. Nurkiewicz, T.R., et al., *Systemic microvascular dysfunction and inflammation after pulmonary particulate matter exposure*. *Environ Health Perspect*, 2006. **114**(3): p. 412-9.
65. Rehberg, M., et al., *Quantum dots modulate leukocyte adhesion and transmigration depending on their surface modification*. *Nano Lett*, 2010. **10**(9): p. 3656-64.
66. Rehberg, M., et al., *Surface chemistry of quantum dots determines their behavior in postischemic tissue*. *ACS Nano*, 2012. **6**(2): p. 1370-9.
67. Uchiyama, M.K., et al., *In vivo and in vitro toxicity and anti-inflammatory properties of gold nanoparticle bioconjugates to the vascular system*. *Toxicol Sci*, 2014. **142**(2): p. 497-507.

Danksagung

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Pohl für die Aufnahme an das von ihm geleitete Institut für Chirurgische Forschung im Walter-Brendel-Zentrum der Ludwig-Maximilians-Universität München, in dem ich die vorliegende Arbeit durchführen durfte.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. vet. Dr. med. habil. Fritz Krombach für die Überlassung des Themas. Mit seiner geduldigen und stets freundlichen Art sowie seinem hervorragenden Erfahrungs- und Wissensschatz unterstützte er mich während des gesamten Promotionsprozesses. Bei Fragen und Sorgen stand seine Tür jederzeit für ein klärendes Gespräch oder eine hilfreiche Anregung offen. Seine angenehme Persönlichkeit, seine hervorragenden Führungsqualitäten und sein Ideenreichtum sind eine besondere Bereicherung für die Forschungsgruppe und ermöglichten mir, mich in meiner Arbeit frei zu entfalten. Diese Eigenschaften sollen mir in meiner eigenen wissenschaftlichen und ärztlichen Tätigkeit stets ein Vorbild sein.

Ein herzlicher Dank geht auch an meinen Betreuer Herrn Dr. Peter Bihari, der mich mit besonderer Geduld in die komplexen mikrochirurgischen Techniken ein- und an das wissenschaftliche Arbeiten heranführte. Bei Erfolgen und Niederlagen meiner täglichen Laborarbeit stand er mir stets motivierend zur Seite. Mit großer Freude denke ich an die unterhaltsamen und lehrreichen Stunden zurück.

Herrn PD Dr. med. Christoph Reichel danke ich ebenfalls herzlich. Mit seiner Hilfe vervollständigte ich meine mikrochirurgischen Fähigkeiten. Weiterhin brachte er mir in stets freundlicher Art und Weise wichtige Kenntnisse sowohl im Hinblick auf die Datenerhebung als auch auf die Veröffentlichung und Präsentation der Daten bei. Als Kollege und Freund begleitet er aktuell meine Facharztausbildung an der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- und Ohrenheilkunde der LMU München.

Bei den postdoktoralen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Frau Dr. hum. biol. Stephanie Hirn und Herrn PD Dr. rer. nat. Markus Rehberg bedanke ich mich für die gute Zusammenarbeit und die Unterstützung während und nach der Zeit der Labortätigkeit.

Insbesondere meinen Mitstreitern in der täglichen Laborarbeit, den ehemaligen Doktoranden Herrn Dr. med. Bernd Uhl, Herrn Dr. med. Marc Praetner und Herrn Dr. med. Maximilian Lerchenberger danke ich für die gemeinsam verbrachte Zeit im Labor. Diese war durch eine stets kameradschaftliche und freundschaftliche Zusammenarbeit, Unterstützung und Ablenkung von den Anstrengungen der täglich anfallenden Arbeit geprägt. Dabei sind gute Freundschaften entstanden.

Bei Frau Dr. rer. nat. Gabriele Zuchtriegel, Frau Dr. med. vet. Nadine Haberl, Frau Sabine Sellner, Frau Anna Katharina Nekolla und Herrn Daniel Pühr-Westerheide, die die Arbeitsgruppe erst später als Doktorandinnen und Doktorand verstärkten, bedanke ich mich ebenso für die kollegiale wie freundschaftliche Zusammenarbeit.

Herrn Dr. Janos Fent, Frau Prof. Susan Lakatos und Frau Prof. Minnamari Vippola danke ich für die erfolgreichen Kooperationen. Ihre Daten ergänzten und vervollständigten die Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe und mündeten in der erfolgreichen Veröffentlichung der im Literaturverzeichnis aufgeführten Publikationen.

Bei Herrn Dr. hum. biol. Jürgen Peters bedanke ich mich herzlich für die stets wohlwollende Unterstützung bei der Beantwortung von statistischen Fragestellungen.

Herrn Gerhard Adams und Herrn Dieter Müller danke ich für ihre Unterstützung in organisatorischen Belangen. Mit ihnen war stets ein motivierendes Gespräch möglich.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei den Tierpflegern des Instituts für die gute Zusammenarbeit und die zuverlässige Pflege der Versuchstiere.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Heesemann, stellvertretend für den Promotionsstudiengang „Förderprogramm für Forschung und Lehre“ (FöFoLe) der LMU München, durch den diese Promotion teilweise finanziert wurde. Die ausgezeichneten Vorträge der regelmäßig stattfindenden Seminare und die anschließenden fruchtbaren Diskurse unter den Teilnehmern waren eine Bereicherung meiner Ausbildung.

Besonders danken möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern und meiner Großtante Elisabeth für die ununterbrochene Unterstützung, die sie mir gerade während der schwierigen Phase der Laborarbeit zuteilwerden ließen.

Mein abschließender Dank gilt meiner Frau Anna Marie. Ohne ihre unermüdlichen aufbauenden Worte und ihre unendliche Geduld wäre diese Dissertation so nicht möglich gewesen.