Aus dem Institut für Biochemie
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Die Adsorption von Lipoproteinen an der Oberfläche fibrogener und inerter Mineralstäube

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Bettina Ulrike Bogatu
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter: 1. Prof. Dr. sc. med. H. Kühn

2. Prof. Dr. med. A. Habenicht

3. Prof. Dr. med. J. Thiery

Datum der Promotion: 21. Mai 2004

Schlagworte

Fibrose

high density lipoprotein

Quarz

Mineralstaub

Spezifische Oberfläche

Abstract (deutsch)

Sieben fibrogene und fünf nicht fibrogene (inerte) Mineralstäube wurden auf ihr Adsorptionsvermögen gegenüber Lipoproteinen untersucht. Die Adsorption erfolgte aus menschlichem Serum bzw. bovinem Lipoproteinkonzentrat. Die spezifischen Oberflächen der Stäube wurden mit Hilfe einer neuen Methode ermittelt, die auf der Adsorption von Nonadecansäure beruht. Sie vernachlässigt Oberflächenporen mit Öffnungsdurchmessern <2,5nm. Als entscheidendes Ergebnis zeigt sich, dass die fibrogenen Stäube signifikant mehr high density lipoproteins (HDL) adsorbieren, als die inerten Stäube. Die HDL Adsorption auf Quarz lässt sich durch Zugabe von Polyvinylpyridin-N-Oxid (PVPNO), einem Silikoseschutzstoff, um bis zu 96% reduzieren. Möglicherweise spielt die HDL- Adsorption eine Rolle im Entstehungsprozess mineralstaubinduzierter Fibrosen.

Keywords

fibrosis

high density lipoprotein

silica

mineral dust

surface area

Abstract (english)

Seven fibrogenic and five nonfibogenic (inert) mineral dusts were examined for their adsorption capacity for lipoproteins. Lipoproteins came from human serum and bovine lipoprotein-concentrate. The specific surface areas of the dusts were determined with the help of a new method, which is based on the adsorption of nonadecanoic acid. It neglects surface pores with opening diameters less than 2,5nm. The most important result is that fibrogenic dusts adsorb significantly more high density lipoproteins (HDL), than the inert dusts. The adsorption of HDL on quartz can be reduced up to 96% by addition of Polyvinylpyridine-N-oxide (PVPNO), an inhibitor of quartz- induced fibrosis. The HDL- adsorption might play a role during the developing process of mineral-dust-induced fibrosis.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis *7*

1. Einleitung *8*

1.1. Literaturübersicht **8**

1.1.1. Fremdkörperreaktion auf anorganischen Staub 8

1.1.2. Die Silikose 9

1.1.3. Hemmung der silikogenen Wirkung von Quarz durch Polyvinylpyridin-N-oxid 13

1.1.4. Lipoproteine 14

1.1.4.1. Einteilung und physiologische Bedeutung der Lipoproteine 14

1.1.4.2. Pathologische Bedeutung der Lipoproteine 17

1.2. Problemstellung und Zielsetzung **18**

2. Material und Methoden *20*

2.1. Grundlagen der Versuchsanordnung **20**

2.1.1. Die Experimente 20

2.1.2. Auswahl der Mineralstäube 21

2.1.3. Die Oberfläche der Stäube 23

2.2. Bestimmung der Mineralstauboberflächen **25**

2.2.1. Material 25

2.2.2. Geräte 26

2.2.3. Durchführung 26

2.3. Lipoproteinadsorption **30**

2.3.1. Material 30

2.3.2. Geräte 30

2.3.3. Durchführung 30

2.3.3.1. Adsorptionsisothermen mit bovinem Lipoproteinkonzentrat 30

2.3.3.2. Adsorption bei konstanter Konzentration aus bovinem Lipoproteinkonzentrat 31

2.3.3.3. Adsorption bei konstanter Konzentration aus menschlichem Serum 31

2.3.3.4. Adsorption bei konstanter Konzentration aus menschlichem Serum in Gegenwart von Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPNO) 31

2.3.3.5. Cholesterolbestimmung 32

2.4. Statistische Methoden **33**

3. Ergebnisse ***34***

3.1. Die Mineralstauboberflächen **34**

3.2. Lipoproteinadsorption **36**

3.2.1. Adsorption von Lipoproteinen aus bovinem Lipoproteinkonzentrat an fibrogene und inerte Mineralstäube 36

3.2.1.1. Adsorptionsisothermen 36

3.2.1.2. Adsorption aus Lipoproteinkonzentrat konstanter Konzentration 37

3.2.2. Adsorption von Lipoproteinen aus menschlichem Serum an fibrogene bzw. inerte Mineralstäube 38

3.2.3. Adsorption von Lipoproteinen aus menschlichem Serum an α-Quarz in Anwesenheit von Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPNO) 41

4. Diskussion ***44***

4.1. Methode der Oberflächenbestimmung mittels Nonadecansäureadsorption **44**

4.2. Lipoproteinadsorption **45**

4.2.1. Die Bindung zwischen HDL und α- Quarz 47

4.2.2. Mögliche Bedeutung der HDL- Adsorption für die Fibroseentstehung 56

5. Zusammenfassung ***59***

6. Literaturverzeichnis ***60***

Danksagung ***69***

Lebenslauf ***70***

Eidesstattliche Erklärung ***71***

Abkürzungsverzeichnis

A_{BET}	Spezifische Oberfläche (ermittelt mit der BET- Methode)
ACAT	AcylCoA-Cholesterol-Acyltransferase
Al^{3+}	Aluminiumion
A_{NDS}	Spezifische Oberfläche (ermittelt mit der NDS-Adsorptionsmethode)
apo	Apolipoprotein
ARG	Arginin
ASP	Asparaginsäure
BET	Brunauer- Emmett- Teller
BK-Nr.	Berufskrankheitennummer
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
cDNA	copy desoxyribonucleid acid
CETP	Choesterolester-Transferprotein
COO^-	Carboxylgruppe
GLU	Glutaminsäure
HDL	High density lipoproteins
HMG-CoA-Reduktase	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA-Reduktase
hSR-BI	human Scavenger-receptor class B type I
IDL	Intermediate density lipoproteins
IL1	Interleukin 1
IL6	Interleukin 6
LCAT	Lecithin-Cholesterol-Acyltransferase
LDL	Low density lipoproteins
LPL	Liporoteinlipase
LYS	Lysin
MAK	Maximale Arbeitsplatzkonzentration
NaCl	Natriumchlorid
NDS	Nonadecansäure
PAFAH	Platelet activating factor acetyl hydrolase
PDGF	Platelet derived growth factor
PVPNO	Polyvinylpyridin-N-oxid
SiO^-	ionisierte Silanolgruppe
SiO_2	Siliziumdioxid
SiOH	Silanolgruppe
SR	Scavenger-receptor
SR-BI	Scavenger-receptor class B type I
TFH	Technische Fachhochschule
TNFα	Tumornekrosefaktor α
VLDL	Very low density lipoproteins

1. Einleitung

1.1. Literaturübersicht

1.1.1. Fremdkörperreaktion auf anorganischen Staub

Anorganischer Staub kann durch Inhalation in den menschlichen Körper gelangen. Staubteilchen mit einem Partikeldurchmesser > 5-10µm werden im oberen Atemtrakt zurückgehalten, von wo sie durch das Flimmerepithel der auskleidenden Schleimhaut wieder in Richtung Mundhöhle transportiert werden. Staubpartikel mit Durchmessern < 5µm sind dagegen in der Lage, bis in den Alveolarraum vorzudringen [1]. Die Reaktion des Körpers auf diese alveolär deponierten Staubpartikel variiert in Abhängigkeit von physikalischen und chemischen Eigenschaften des Staubs sowie der individuellen Empfindlichkeit und der Immunitätslage des Organismus [2].

Grundsätzlich spricht man bei allen durch Inhalation anorganischen Staubs hervorgerufenen Lungenveränderungen von Pneumokoniosen. Sie können in kollagenerzeugende, d.h. fibrosierende und nicht kollagenerzeugende, d.h. nicht fibrosierende Pneumokoniosen unterteilt werden [3].

Eine bekannte fibrosierende Pneumokoniose ist die Silikose, die auch als Quarzstaublunge bezeichnet wird. Sie wird durch Inhalation von kristalliner Kieselsäure (SiO_2) in verschiedenen Modifikationen, wie beispielsweise α- Quarz, Cristobalit und Tridymit hervorgerufen. Unter einer Fibrose versteht man die Vermehrung des Kollagens in einer Volumen- oder Gewichtseinheit [4]. Die Ursache liegt in einer Proliferation von Fibroblasten. Der unmittelbare Stimulus, der die Fibroblastenproliferation bewirkt, ist bisher nicht mit Sicherheit nachgewiesen. Die Inhalation von Asbestfasern führt ebenfalls zu einer fibrosierenden Lungenerkrankung, der Asbestose. Daneben kommen beim Menschen die Berylliose (nach Exposition gegenüber Staub, der Berylliumverbindungen enthält), Silikatosen (durch Inhalation verschiedener Silikate, z.B. Talk, Kaolin), die Graphitfibrose, die Aluminose (durch Inhalation reinen Aluminiums in hohen Konzentrationen) und die sogenannte Hartmetallfibrose (hervorgerufen durch die Inhalation von Titan- oder Wolframcarbidhaltigem Staub) vor [5]. Die Silikose (BK-Nr.4101), Asbestose (BK-Nr.4103), Aluminose (BK-Nr.4106), Berylliose (BK-Nr.1110) sowie die „Lungenfibrose durch Metallstäube bei der Herstellung oder Verarbeitung von Hartmetallen“ (BK-Nr.4107) sind in

Deutschland als Berufskrankheiten anerkannt, wobei der Silikose die größte Bedeutung zukommt. Zwar hat die Zahl der angezeigten und als Berufskrankheit anerkannten Silikosefälle seit der Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts stetig abgenommen, und es wird mit einem weiteren Rückgang in der Zukunft gerechnet. Dennoch ist ihre Bedeutung nicht zu unterschätzen, wenn man bedenkt, dass zwischen 1993 und 1995 bei annähernd 10.000 Verdachtsfällen in Deutschland 6.446 als Berufkrankheit anerkannt wurden, und die Silikose damit im Jahr 1995 nach der Lärmschwerhörigkeit die zweithäufigste anerkannte Berufskrankheit darstellte [6].

Nicht fibrosierende Pneumokoniosen werden durch sogenannte inerte Mineralstäube ausgelöst. Im Zuge der Staubinhalation kommt es hier lediglich zu interstitiellen Staubablagerungen im Lungengewebe ohne Krankheitswert. Zu den inerten Stäuben zählen Eisenoxide. Die durch Eisenoxide ausgelöste nicht fibrosierende Pneumokoniose wird als Lungensiderose bezeichnet [7]. Auch andere Oxide, Titandioxid, α- Korund (ein Aluminiumoxid) und Zinndioxid führen nach Inhalation nicht zu Bindegewebsneubildung, sondern werden lediglich im Gewebe abgelagert [7,8], was keine Beeinträchtigung der Lungenfunktion zur Folge hat. Titandioxid wird aufgrund seines inerten Verhaltens häufig als Negativkontrolle in tierexperimentellen Studien zur Staublungenforschung eingesetzt.

1.1.2. Die Silikose

Die Silikose war und ist arbeitsmedizinisch sehr relevant und Gegenstand intensiver Forschungen. Die fibrosierenden Pneumokoniosen durch andere Mineralstäube sind dagegen seltener und weniger gut untersucht. An dieser Stelle soll ein Überblick über den jetzigen Stand der Silikoseforschung gegeben werden.

Als Silikose bezeichnet man eine durch die Inhalation von kristalliner Kieselsäure (z.B. Quarz) hervorgerufene Lungenfibrose. Betroffen sind vor allem Arbeiter im Bergbau, in der steinverarbeitenden Industrie, der Keramik- und Putzmittelindustrie sowie Gussputzer und Sandstrahlreiniger [9]. In der zweiten Hälfte des neunzehnten und zu Beginn des zwanzigsten Jahrhunderts lag das Maximum der Erkrankungsprävalenz, was mit der zunehmenden Industrialisierung und dem damit verbundenen Auftreten großer Mengen maschinell erzeugten lungengängigen Quarzstaubes zusammenhängt.

Die Ausbildung einer Silikose bei Exponierten ist abhängig von der Quarzstaubdosis in der Atemluft, der Zusammensetzung der Staubpartikel, der Partikelgröße und der Expositionsdauer. Daneben können auch individuelle genetische oder immunologische Faktoren entscheidend dafür

sein, ob ein Exponierter eine Silikose entwickelt [10]. Nachdem ein Zusammenhang von Quarzstaubdosis und dem Auftreten der Silikose erkannt worden war, konnte die Zahl der Neuerkrankungen durch geeignete Schutzmaßnahmen, wie Atemmasken und Festlegung von zulässigen Maximalwerten, reduziert werden. In den USA gilt heutzutage eine maximal zulässige Atemluftkonzentration von 100µg alveolengängigen Quarzstaubs pro Kubikmeter Luft [10]. In Deutschland liegen die Werte für die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) bei 150µg/m^3 für Quarzfeinstaub und bei 4000µg/m^3 für quarzhaltigen Feinstaub [5].

Bei Silikosepatienten werden unterschiedliche Formen der Erkrankung beobachtet [10]:

1. Einfache chronische Silikose
2. Progressive massive Fibrose
3. Akzelerierte Silikose
4. Akute Silikose

Die häufigste und deshalb hier kurz besprochene Form ist die einfache chronische Silikose, die nach einer über mehrere Jahrzehnte andauernden Quarzexposition auftritt. Charakteristisch sind 2- 5mm große, konzentrisch geschichtete Granulome, die vorwiegend in den Lungenmittel- und oberlappen auftreten. Das Granulomzentrum besteht aus hyalinisiertem Bindegewebe, das von zellarmem, kollagenreichem Gewebe umgeben ist. Darin findet man Gewebsspalten mit eingeschlossenen Quarzkristallen. Die äußerste Schicht der Silikoseknötchen zeigt die Zeichen einer chronischen Entzündung mit zahlreichen staubbeladenen Makrophagen und Lymphozyteninfiltraten [9]. Die einfache chronische Silikose kann in eine progressive massive Fibrose übergehen, bei der es zu einer Verschmelzung der einzelnen Silikoseknoten kommt.

Der Krankheitsverlauf wird röntgenologisch in drei Stadien unterteilt [9,11]:

- Stadium I zeichnet sich durch Hiluslymphknotenvergrößerungen und feinretikuläre Zeichnung der Lungenperipherie aus.
- Stadium II ist gekennzeichnet durch knötchenförmige Verschattungen in den Lungenmittelfeldern.
- Im Stadium III findet eine Verschmelzung der einzelnen Knoten zu größeren Schwielen statt. Röntgenologisch finden sich Anzeichen von Schrumpfungsprozessen.

Im Verlauf der chronischen Silikose kommt es zunächst zu restriktiven, später auch obstruktiven Ventilationsstörungen. Bei weiterer Progredienz kann es zu einer erheblichen Beeinträchtigung des Gasaustauschs sowie zu Emphysembildung kommen. Die Lungenveränderungen können

durch die Rechtsherzbelastung zur Ausbildung eines chronischen Cor pulmonale führen [11].

Der Pathomechanismus, der zur Ausbildung der Erkrankung führt, konnte trotz intensiver Forschung bisher nicht vollständig aufgeklärt werden. Im Folgenden wird der aktuelle Wissensstand dargestellt.

Quarz wirkt hämolytisch [12] und auf Makrophagenkulturen membranolytisch und zytotoxisch [13,14]. Die zytotoxische Wirkung von Quarz ist seit langem bekannt und wurde für seine fibrogene Wirkung verantwortlich gemacht. Als Ursache der Zytotoxizität werden Silanolgruppen (SiOH) auf der Oberfläche des Quarzes angesehen, die mit Estergruppen von Membranphospholipiden reagieren, dadurch den Membranaufbau stören und zum Zusammenbruch der Zellhomöostase und damit zur Zellnekrose führen [14]. Die Zytotoxizität von frisch gebrochenem Quarz ist besonders hoch [15]. Ursache hierfür sind vermutlich Radikale, die beim Brechen auf der Quarzoberfläche entstehen und ihrerseits zur Bildung von hochreaktiven OH- Radikalen in der Lage sind [16]. Diese können mit Membranen reagieren und sollen so für die Zelllyse verantwortlich sein [15]. Eine weitere Theorie, mit der die Zytotoxizität von Quarz erklärt wird, geht davon aus, dass die negative Ladung, die an der Kristalloberfläche durch dort vorhandene ionisierte Silanolgruppen (SiO^-) vorliegt, den entscheidenden Schaden an biologischen Membranen setzt und so zur Zelllyse führt [17].

Die fibrogene Wirkung von kristallinem SiO_2 wurde lange als Folge seiner Zytotoxizität gesehen. So ging man davon aus, dass von Alveolarmakrophagen phagozytierte Quarzpartikel durch ihre membranschädigenden Eigenschaften zur Membranolyse der quarzhaltigen Phagolysosomen und im Folgenden zur Nekrose der Phagozyten führen. Die absterbenden Makrophagen setzen dieser Theorie nach Faktoren frei, die das umliegende Gewebe schädigen und zu einer Entzündungsreaktion führen [18,19].

In neuerer Zeit gewinnt ein anderer möglicher Pathomechanismus in der Silikoseforschung an Aufmerksamkeit. Setzt man Makrophagen *in vitro* einer vergleichsweise geringen Quarzdosis aus, so verschwindet die zytotoxische Wirkung. Stattdessen werden die exponierten Zellen zur Produktion und Freisetzung von Mediatoren (Zytokinen und Proteasen) angeregt [20]. Es findet demnach eine Stimulation und keine Zellzerstörung statt.

Die Wirkung des Quarzes auf Zellen und Gewebe hat demnach eine zytotoxische und eine zellstimulierende Komponente. Die unterschiedlichen Quarzwirkungen zeigen eine Abhängigkeit von der Dosis. Die Zytotoxizität beobachtet man bei hohen Quarzdosen, während die Zellstimulation bei geringerer Staubbelastung auftritt [20].

Alveolarmakrophagen sind die Zellen, mit denen die inhalierten Quarzpartikel zuerst in Kontakt treten. Die ersten Hinweise auf eine makrophagenstimulierende Wirkung von Quarz ergaben sich 1984 [21]. Seither wird vermutet, dass diese den entscheidenden Mechanismus im Fibroseentstehungsprozess darstellt [13]. Es ist unklar, wie es zur Stimulation der Makrophagen kommt. Allison [14] schlägt drei mögliche Mechanismen vor. Durch Interaktion des Quarzes mit Enzymen und Fetten in der Membran werden Signalkaskaden ausgelöst, die zur Freisetzung der Mediatoren führen. Gleiches könnte durch Reaktion des Quarzes mit membranständigen Rezeptorproteinen geschehen, und schließlich könnte die Bildung von Sauerstoffradikalen für die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren verantwortlich sein, was zu einer verstärkten Genexpression führen würde. Auch eine durch die Einwirkung von Quarzpartikeln gestörte Kalziumhomöostase im Makrophagen wird als mögliche Ursache der Zytokinproduktion diskutiert [13].

Die von den aktivierten Makrophagen und möglicherweise weiteren Zellen freigesetzten Mediatoren (bekannt sind u.a. der Tumornekrosefaktor α (TNF-α), die Interleukine 1 und 6 (IL1, IL6), α-1-Antitrypsin, Elastase, Bombesin sowie der platelet derived growth factor (PDGF) [13,22]) sollen über ein komplexes Zusammenwirken, das noch nicht verstanden wird, letztendlich zur Fibrose führen [13]. Durch Freisetzung der Proteasen Elastase und α-1-Antitrypsin werden Alveolarzellen vom Typ1 sowie die angrenzende Basalmembran zerstört. Dies ermöglicht den Quarzpartikeln den Eintritt in das Interstitium [13]. Bedeutung für die Fibroseentstehung hat vermutlich auch die Tatsache, dass Makrophagen durch Quarzexposition in ihrer Beweglichkeit und Phagozytosefähigkeit eingeschränkt werden [23-25]. Dies behindert den Abtransport der inhalierten Staubpartikel. Quarz kann aus nekrotischen Makrophagen wieder freigesetzt werden [23], wodurch eine erneute Phagozytose möglich wird. So kommt es zur Chronifizierung des entzündlichen Geschehens, das auch lange nach Expositionsende anhält.

Auch dem Surfactant kommt möglicherweise eine Bedeutung in der Pathogenese der Silikose zu. Der Surfactant ist eine oberflächenaktive Substanz, die von Typ II- Alveolarzellen gebildet wird und als dünner Film die Innenwände der Alveolen auskleidet. Inhalierte Quarzpartikel kommen im Alveolarraum mit diesem Flüssigkeitsfilm in Berührung und adsorbieren vermutlich Surfactantbestandteile an ihrer Oberfläche [26]. Die membranolytische Aktivität von Quarz lässt sich *in vitro* durch vorherige Adsorption von Surfactant oder einzelnen Surfactantbestandteilen auf der Quarzoberfläche unterdrücken [27]. Wie diese Beobachtungen mit der Pathogenese der Silikose zusammenhängen, ist unklar [26].

1.1.3. Hemmung der silikogenen Wirkung von Quarz durch Polyvinylpyridin-N-oxid

In den sechziger Jahren des zwanzigsten Jahrhunderts entdeckten Schlipköter et al. [28], dass das Polymer Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPNO) in der Lage ist, die zytotoxische Wirkung von Quarzstaub zu hemmen. In Studien verschiedener Autoren konnte in der Folge gezeigt werden, dass sowohl die zytotoxische Komponente *in vitro* als auch die fibrogene Komponente der Quarzwirkung im Tierversuch durch subkutane, intravenöse oder inhalative Gabe von PVPNO wirksam blockiert werden können [29].

Die antisilikogene Wirkung von PVPNO wird zum einen mit seiner Fähigkeit erklärt, als Protonenakzeptor zu fungieren [12]. Die für die pathogene Wirkung von Quarz wichtigen Silanolgruppen (SiOH) auf der Kristalloberfläche werden demnach durch Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Polymer unschädlich gemacht (s. Abb. 1).

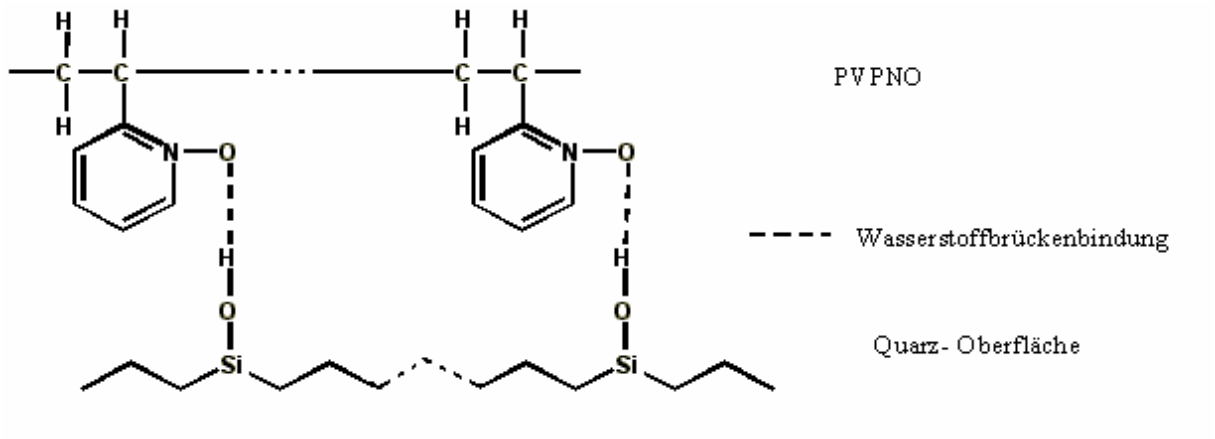


Abb.1: Modell der Bindung des Silikosehemmstoffs PVPNO an α- Quarz. Modifiziert nach Castranova [29].

Zum anderen wird gemutmaßt [30], dass sich PVPNO als eine mehrere hundert Angström dicke Schutzhülle auf der Quarzoberfläche ablagert und so die Reaktion von Oberflächenbestandteilen des Quarzkristalls mit biologischen Membranen rein mechanisch verhindert. Die Gegenwart des Polymers hemmt nicht die Phagozytose der Quarzpartikel durch Makrophagen, wohl aber die Membranolyse der quarzhaltigen Phagosomen [31].

1.1.4. Lipoproteine

1.1.4.1. Einteilung und physiologische Bedeutung der Lipoproteine

Lipoproteine sind Bestandteile des Blutplasmas, die dem Transport und Stoffwechsel von weitgehend wasserunlöslichen Lipiden dienen. Sie sind größtenteils sphärische Partikel, bestehend aus Cholesterolestern, Triglyzeriden und wasserunlöslichen Vitaminen, die den Kern der Partikel bilden und von Phospholipiden, unverestertem Cholesterol und Proteinen, den sogenannten Apoproteinen umgeben sind [32]. Die Zusammensetzung der Lipoproteine aus den genannten Bestandteilen variiert stark. Man unterscheidet deshalb verschiedene Lipoproteinklassen. Die gebräuchlichste Einteilung und Benennung der Lipoproteine folgt der Dichte der Teilchen. Demnach gibt es sechs Lipoproteindichteklassen [33]:

1. Chylomikronen,
2. Chylomikronen- Remnants,
3. Very Low Density Lipoproteins (VLDL),
4. Intermediate Density Lipoproteins (IDL),
5. Low Density Lipoproteins (LDL),
6. High Density Lipoproteins (HDL).

Zwischen den verschiedenen Lipoproteinen existiert ein sehr komplexes Netz von Austausch- und Umwandlungsvorgängen, das erst zum Teil verstanden wird. Jede Lipoproteinklasse verfügt über spezielle Apoproteine, die zum einen als Strukturproteine, zum anderen für die Regulation der Stoffwechselvorgänge von entscheidender Bedeutung sind [33].

Die wesentlichen Bestandteile und Funktionen der einzelnen Lipoproteine sind im Folgenden zusammengestellt.

Chylomikronen werden von Mukosazellen des Darms aus Nahrungsfetten, Phospholipiden und den Apoproteinen apoA-I, apoA-II, apoA-IV und apoB-48 synthetisiert. Ihr Hauptbestandteil sind mit 86% die Triglyzeride. Sie gelangen mit der Lymphe über den Ductus thoracicus in die venöse Blutbahn, wo es zum Austausch von Apoproteinen kommt [32]. Die Chylomikronen geben apoA-I und apoA-IV ab und nehmen apoC und apoE auf. ApoC-II aktiviert die Lipoproteinlipase (LPL), ein kapillarwandständiges Enzym, das Triglyzeride aus den Chylomikronen hydrolysiert. Die entstehenden freien Fettsäuren werden vom Gewebe

aufgenommen, während die verbleibenden Partikel als sogenannte Chylomikronen- Remnants zur Leber gelangen. Hier werden sie über apoE rezeptorvermittelt in die Hepatozyten aufgenommen und abgebaut [32].

Very Low Density Lipoproteins (VLDL) werden von Hepatozyten gebildet. Sie transportieren endogen synthetisierte Triglyzeride und Cholesterol von der Leber zu peripheren Geweben. Hauptbestandteil sind auch hier die Triglyzeride, die 53% des Teilchens ausmachen [34]. Zunächst enthalten sie die Apoproteine apoB-100 und apoE und nehmen ähnlich wie die Chylomikronen im Blutplasma Apoproteine der C- Klasse auf, was ebenfalls über eine Aktivierung der Lipoproteinlipase (LPL) zur Spaltung der Triglyzeride und Freisetzung freier Fettsäuren führt, die vom Zielgewebe aufgenommen werden. Durch diesen Vorgang werden die Teilchen triglyzeridärmer und relativ cholestrolreicher, wodurch ihre Dichte zunimmt. Sie werden jetzt als Intermediate Density Lipoproteins (IDL) bezeichnet. Der größte Teil der IDL wird durch Hepatozyten weiter abgebaut, wobei Lipoproteine geringer Dichte (LDL) entstehen. Ein Teil der LDL wird direkt im Blutplasma aus IDL gebildet [32].

Low Density Lipoproteins (LDL) entstehen wie oben beschrieben beim Abbau der VLDL. Durch den Verlust von Triglyzeriden beim Abbau der VLDL bestehen die LDL nur noch zu 6-10% aus Triglyzeriden und zu 45- 50% aus ihrem Hauptbestandteil Cholesterol. Ihr Apoprotein ist apoB-100, welches konstant im Teilchen verbleibt, also keinem Austausch mit anderen Lipoproteinklassen unterliegt [32]. LDL transportieren endogen synthetisiertes Cholesterol von der Leber zu peripheren Organen. Ihre Aufnahme durch die Zielzellen erfolgt über einen spezifischen LDL- Rezeptor, der auch als B,E- Rezeptor bezeichnet wird. Ligand am Rezeptor ist das Apoprotein B-100. Die Funktionsweise des LDL- Rezeptors ist weitgehend erforscht [32,35]. Durch die Bindung von LDL an Rezeptoren bilden sich sogenannte coated pits, Grübchen in der Plasmamembran, in denen sich LDL- Rezeptoren ansammeln und an deren zytosolischer Seite Klathrinmoleküle in vernetzter Form vorliegen. Durch Endozytose wird der gesamte Rezeptor- Lipoprotein- Komplex in die Zelle aufgenommen, wo die Lipoproteine von den Rezeptoren gelöst werden. Letztere werden in Vesikeln zur Plasmamembran zurücktransportiert, wo sie zur erneuten LDL- Bindung zur Verfügung stehen, was als Rezeptor-Recycling bezeichnet wird. Das lipoproteinhaltige Endosom fusioniert mit einem Lysosom. Es folgt die Spaltung der Proteine und Lipide. Das dabei freigesetzte Cholesterol bewirkt eine Hemmung sowohl der LDL- Rezeptorsynthese als auch der Synthese von 3-Hydroxy- 3-methylglutaryl -CoA- Reduktase (HMG-CoA-Reduktase), dem Schlüsselenzym der Cholesterolbiosynthese. Beide Mechanismen verhindern bei ausreichendem Angebot an freiem

Cholesterol eine Überladung der Zelle mit diesem Metaboliten.

Eine Besonderheit stellen in diesem Zusammenhang Makrophagen dar. Sie verfügen über Rezeptoren zur Aufnahme von modifiziertem LDL, die sogenannten Scavenger- Rezeptoren (SR). Die LDL- Aufnahme über SR unterliegt keinem der beschriebenen Regulationsmechanismen [36].

High Density Lipoproteins (HDL) werden in der Leber aus Phospholipiden, freiem Cholesterol und in der Hauptsache Apoproteinen der Gruppe A gebildet. In dieser Zusammensetzung imponieren sie zunächst als scheibchenförmige Gebilde. Die Apoproteine machen mit 47-48% fast die Hälfte der Teilchen aus, während sie nur zu 20% aus Cholesterol bestehen [32]. Sie sind in der Lage, Cholesterol aus peripheren Geweben aufzunehmen und zur Leber, dem Ausscheidungsorgan von Cholesterol zu transportieren. Dieser Prozess wird als „reverse cholesterol transport“ bezeichnet [37]. Der Mechanismus der Cholesterolaufnahme durch HDL ist noch nicht abschließend geklärt.

Ein beschriebener Mechanismus ist die sogenannte „aqueous diffusion“ [38,39]. Danach diffundiert Cholesterol entlang eines Konzentrationsgefälles zwischen Plasmamembran und HDL durch die wässrige Phase. Durch die Funktion des Enzyms Lecithin- Cholesterol-Acyltransferase (LCAT) kann der Gradient zugunsten der Cholesterolaufnahme ins HDL beeinflusst werden. LCAT verestert freies Cholesterol, wobei Apoprotein A-I als Aktivator fungiert [40]. Die entstehenden Cholesterolester gelangen ins Innere der HDL- Partikel, wodurch diese eine zunehmend sphärische Gestalt annehmen. Durch diese Reaktion vermindert sich der Gehalt an freiem Cholesterol im HDL, und das Konzentrationsgefälle verschiebt sich wie oben beschrieben. Der Prozess der „aqueous diffusion“ findet apolipoproteinunabhängig statt. Es scheint jedoch ein relativ uneffizienter Mechanismus des Cholesterolefflux zu sein [41].

Ein weiterer Mechanismus zur Cholesterolaufnahme durch HDL wird von Oram und Yokoyama [42] als „Apolipoprotein-mediated lipid removal pathway“ bezeichnet und erfordert die Dissoziation von Apoprotein A-I vom HDL und die anschließende Bindung von apoA-I an spezifische Bindungsstellen in der Plasmamembran. Die Bindung von apoA-I stimuliert die Mobilisation von Cholesterol und hemmt die intrazelluläre Veresterung von Cholesterol durch das Enzym AcylCoA- Cholesterol- Acyltransferase (ACAT). So wird die Einlagerung von Cholesterolestern in der Zelle verhindert. Anstelle der Dissoziation der Apoproteine vom HDL können diese auch direkt von der Leber als lipidarme Apolipoproteine synthetisiert werden und dann in gleicher Weise zum Cholesterolefflux beitragen. Die Möglichkeit zur

Cholesterolaufnahme durch lipidarme Apolipoproteine ist abhängig von der Stoffwechsellage der Zellen. So konnte gezeigt werden, dass die Erhöhung des Gehaltes an freiem Cholesterol in den Zellen den Efflux ebenso erhöht, wie die Zugabe von cAMP zur Zellkultur [41], wobei cAMP über eine Induktion der Apolipoproteinbindungsstellen in der Zellmembran wirken soll, während hohe Konzentrationen an freiem Cholesterol die Lipiddomänen der Zellmembran so modifizieren können, dass ein besserer Kontakt zwischen Apolipoproteinen und Lipiddomänen möglich wird [41].

Nach der Aufnahme des Cholesterols und anschliessender Veresterung durch die LCAT übertragen die HDL- Partikel Cholesterolester mit Hilfe des Cholesterolester- Transferproteins (CETP) auf triglyzeridreiche Lipoproteine, wie z.B. VLDL Remnants, die dann zur Leber gelangen, wo Cholesterol umgebaut und in Form von Gallensäuren ausgeschieden werden kann [32]. Die cholesterolesterreichen HDL können auch direkt von der Leber aufgenommen werden, wo sie einem Abbau unterliegen [43]. Johnson et al. [38] vermuten, dass das Enzym Hepatische Lipase die Aufnahme von Cholesterol aus HDL durch die Hepatozyten erleichtert. Seit 1996 ist die Existenz eines HDL- Rezeptors (SR-BI) in der Maus bekannt [44], der die selektive Aufnahme von Cholesterolestern aus HDL durch Hepatozyten und Zellen der steroidbildenden Gewebe ermöglicht. Es kommt dabei nicht zur Internalisierung des gesamten HDL- Partikels, wie es beim LDL- Rezeptor der Fall ist. Stattdessen wird die selektive Aufnahme von Cholesterolestern in die Zelle vermittelt. Die DNA des entsprechenden Rezeptors im Menschen (human Scavenger receptor, classB, type I (hSR-BI)) wurde schon 1993 isoliert [45] und als cDNA unbekannter Funktion mit der Bezeichnung CLA-1 versehen. Es wird vermutet, dass hSR-BI im Menschen eine dem SR-BI der Maus vergleichbare Rolle im HDL- Metabolismus spielt [46,47].

1.1.4.2. Pathologische Bedeutung der Lipoproteine

Lipoproteine spielen eine entscheidende Rolle im Entstehungsprozess der Arteriosklerose. Die LDL- Konzentration im Blutplasma korreliert positiv mit dem Auftreten der Erkrankung [48], während die HDL- Konzentration eine negative Korrelation zeigt [49].

Der proatherogene Effekt der LDL tritt auf, nachdem die Lipoproteine durch konzentrationsabhängigen, aktiven, transepithelialen Transport in Endothelvesikeln extrazellulär im Interstitium von Gefäßwänden abgelagert wurden [36]. Werden LDL durch Alterung oder Radikalbildung im Gewebe oxidativ modifiziert, so können sie über den Scavenger- Rezeptor (SR) von ins Interstitium eingewanderten Makrophagen aufgenommen werden. Diese Zellen

können das mit den LDL aufgenommene Cholesterol nicht abbauen. Eine Entladung der Zellen von Cholesterol ist nur durch den „reverse cholesterol transport“ mittels HDL möglich. Ist dieser Mechanismus unzureichend, z.B. bei unphysiologisch hohen LDL- bzw. niedrigen HDL-Konzentrationen, so kommt es zur Überladung der Makrophagen mit Cholesterol und zum anschließenden Zelltod. Die dabei entstehenden Cholesterolkristallablagerungen im Gewebe bilden den Kern von sich zur Arteriosklerose weiterentwickelnden Atheromen [36]. Die Fähigkeit von LDL, über spezielle Domänen des apoB100 besonders gut an Proteoglykane der extrazellulären Matrix sowie an Kollagenfasern zu binden, sowie die Induktion von vermehrter Leukozytenadhärenz an Endothelzellen durch LDL werden ebenfalls als wichtige proatherogene Eigenschaften dieser Lipoproteindichteklasse angesehen [36].

Die antiatherogene Wirkung der HDL wird zum einen ihrer Fähigkeit zum „reverse cholesterol transport“ zugeschrieben, wodurch Cholesterol aus peripheren Geweben, z.B. aus lipidbeladenen Makrophagen in der Gefäßwand entfernt werden kann (s.1.1.4.1. Einteilung und physiologische Bedeutung der Lipoproteine). Zum anderen konnte gezeigt werden [50], dass HDL in der Lage sind, die oxidative Modifikation von LDL zu hemmen. Entscheidende Faktoren hierfür sind nach bisherigen Erkenntnissen die Enzyme Paraoxonase und Platelet activating factor acetyl hydrolase (PAFAH) [51-53]. Auch das Apolipoprotein des HDL apoA1 [54,55] und das HDL- assoziierte Enzym Lecithin- Cholesterol- Acyltransferase (LCAT) [56] scheinen für die Hemmung der oxidativen LDL- Modifizierung von Bedeutung zu sein. Eine weitere Erklärung der protektiven Eigenschaften findet sich in der Tatsache, dass die LDL- Bindung an Proteoglykane durch HDL verhindert werden kann [36].

In neueren Studien werden verstärkt die Stoffwechselvorgänge nach der Aufnahme fettreicher Mahlzeiten untersucht, da man annimmt, dass postprandial auftretende Lipoproteinkonstellationen einen großen Einfluss auf die Ausbildung von Vorstufen der arteriosklerotischen Plaques haben [57].

1.2. Problemstellung und Zielsetzung

Einige anorganische Mineralstäube besitzen ein fibrogenes Potential, das bei anderen nicht vorhanden ist. Die Ursachen dafür sind bis heute ungeklärt. Es ist denkbar, dass eine gemeinsame Eigenschaft innerhalb der Gruppe der fibrogenen Mineralstäube existiert, die für ihre fibrogene Wirkung verantwortlich ist.

Bereits in den fünfziger Jahren des 20. Jahrhunderts untersuchten und beschrieben Rüttner et al. [58] die Rolle von Adsorptionsvorgängen an Quarzoberflächen in der Pathogenese der Silikose. Sie fanden damals jedoch keine spezifischen Adsorptionseigenschaften, die Quarz von anderen Substanzen unterschied.

Im Rahmen noch nicht veröffentlichter Untersuchungen zur Karzinogenese stellte Contag (TFH, Berlin) fest, dass Quarzstaub auffällig stark Lipoproteine aus menschlichem Serum auf seiner Oberfläche adsorbiert. Schon 1965 fanden McFee und Tye [59] bei immunoelektrophoretischen Untersuchungen heraus, dass die „schnellen Lipoproteine“ selektiv auf der Oberfläche von Quarz und Cristobalit (zweier Strukturvarianten von SiO_2), adsorbieren. Noishiki [60] sowie Breemhaar et al. [61] machten Anfang der achtziger Jahre unabhängig voneinander die Beobachtung, dass Lipoproteine auf der Oberfläche fibrogener Kunststoffe stark adsorbiert werden.

Diese Befunde führten zu der Überlegung, ob möglicherweise die Fähigkeit zur Lipoproteinadsorption eine Ursache für die fibrogenen Eigenschaften eines Mineralstaubes sein könnte. Auch die Tatsache, dass die für die Silikose als ursächlich angenommene Zytokinproduktion von Makrophagen durch Quarz nur in Anwesenheit von Serum, nicht jedoch in serumfreier Kultur angeregt wird [20], deutet darauf hin, dass Serumbestandteile in der Fibroseentstehung eine Rolle spielen könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht,

- ob die Lipoproteinadsorption eine gemeinsame Eigenschaft fibrogener Mineralstäube darstellt, die sie von inerten Mineralstäuben unterscheidet,
- inwieweit Unterschiede im Adsorptionsverhalten gegenüber den Lipoproteindichteklassen HDL und LDL existieren,
- ob und wie das Polymer Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPNO) das Adsorptionsverhalten von Lipoproteinen auf Quarzoberflächen beeinflusst.

2. Material und Methoden

2.1. Grundlagen der Versuchsanordnung

2.1.1. Die Experimente

Um eine Aussage treffen zu können, ob die bevorzugte Lipoproteinadsorption eine gemeinsame Eigenschaft fibrogener Mineralstäube darstellt, die sie von inerten Mineralstäuben unterscheidet, wurden *in vitro* Adsorptionsversuche durchgeführt und das Adsorptionsverhalten fibrogener mit dem inerter Mineralstäube verglichen.

Die Adsorption erfolgte aus einer reinen bovinen Lipoproteinlösung und aus menschlichem Serum. Die Adsorption aus Serum unterscheidet sich von der aus reiner Lipoproteinlösung durch das Auftreten von Konkurrenz, da alle im Serum befindlichen Substanzen als potentielle Adsorbate um die auf dem Mineralstaub zur Verfügung stehende Fläche konkurrieren. Unterschiede im Adsorptionsverhalten, die unter diesen Bedingungen auftreten, kommen der Realität im Körper vermutlich näher als solche, die bei fehlender Konkurrenz beobachtet werden können.

Auch die Fähigkeit des Polymers Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPNO), die Oberfläche von Quarz zu maskieren und so seine silikogene Wirkung zu hemmen, wurde genutzt, um zu überprüfen, ob Lipoproteine in der Pathogenese der Silikose eine Rolle spielen könnten. Die Adsorption von Lipoproteinen aus Serum an Quarz wurde in An- und Abwesenheit von PVPNO in der Suspension durchgeführt. Das Polymer wurde dem Serum in einer Konzentration von einem Massenprozent zugesetzt. Dies entspricht in der Größenordnung den PVPNO- Konzentrationen, unter denen die Verminderung pathogener Effekte von Quarz beobachtet werden konnten [29].

Die Bestimmung von Menge und Art der adsorbierten Lipoproteine erfolgte über die Messung der durch den Mineralstaubkontakt verursachten Konzentrationsabnahme von LDL-, HDL-, und Gesamtcholesterol in den untersuchten Lösungen.

2.1.2. Auswahl der Mineralstäube

Unter den Mineralstäuben gibt es faserförmige (z.B. Asbest) und granuläre (z.B. Quarz). Aufgrund dieses Unterschiedes in der physikalischen Eigenschaft folgt die pathologische Wirkung auf Zellen und Gewebe einem möglicherweise grundlegend anderen Mechanismus. So sollen bei der Entstehung der Asbestose Länge und Durchmesser der Asbestfasern einen Einfluss auf die Ausbildung der Fibrose haben [62,63], ein Mechanismus, der in der Silikoseentstehung keine Rolle spielt.

Die vorliegende Arbeit beschränkt sich auf die Untersuchung granulärer Mineralstäube, um zusätzliche Konfusion durch die Verwendung von Stäuben mit unterschiedlicher physikalischer Struktur zu vermeiden.

Für die Adsorptionsversuche mussten Mineralstäube ausgewählt und nach vorhandenem bzw. fehlendem fibrogenen Potential in zwei Gruppen unterteilt werden. Um eine Aussage über das fibrogene Potential eines Staubes machen zu können, wurden Tierversuchsstudien und epidemiologische Studien über das Auftreten von Staublungenerkrankungen bei exponierten Menschen ausgewertet. Dabei traten Schwierigkeiten auf, die im Folgenden kurz erläutert werden.

Den verschiedenen Studien liegt kein einheitlicher Versuchsaufbau zugrunde. So wurden die zu untersuchenden Stäube im Tierversuch teils intratracheal appliziert, teils der normalen Atemluft zugesetzt. Andere Autoren injizierten Staub intraperitoneal oder intravenös. Dies erschwerte die Vergleichbarkeit und führte zum Teil zu widersprüchlichen Aussagen in bezug auf die Fibrogenität eines Staubes. Ein weiteres Problem ergab sich daraus, dass in Tierversuchsstudien meist gleiche Massen verschiedener Stäube eingesetzt werden, nicht gleiche Oberflächen. Da nach unserer Vorstellung die Lipoproteinadsorption aus Körperflüssigkeiten an die Oberfläche des Mineralstaubs für dessen Fibrogenität ursächlich sein könnte, stellte sich die Frage, inwieweit Studien aussagekräftig sind, in denen Substanzen zwar anhand gleicher Massen, möglicherweise aber stark voneinander abweichender Oberflächen auf ihr fibrogenes Potential hin verglichen wurden. Weiterhin war es problematisch, Gewebereaktionen verschiedener Versuchstiere miteinander zu vergleichen oder daraus Rückschlüsse auf mögliche Reaktionen beim Menschen zu ziehen, zumal die nach unserer Vorstellung möglicherweise entscheidenden Lipoproteine bei den verschiedenen Tieren in unterschiedlichen Serumkonzentrationen vorliegen und auch eine unterschiedliche Dichte und chemische Zusammensetzung aufweisen können

[64,65], was zu veränderten Adsorptionseigenschaften führen könnte. Bei der Auswertung der epidemiologischen Studien über das Auftreten von Pneumokoniosen bei exponierten Menschen entstand das Problem, dass die inhalierten Stäube oft nicht eindeutig charakterisiert sind, da es sich um Staubgemische handelt. In diesen Fällen war es schwer möglich, das fibrogene Potential einem der beteiligten Mineralstäube allein zuzuschreiben. Möglicherweise sind eher die Verunreinigungen ursächlich beteiligt.

Nach Auswertung der vorhandenen Literatur wurden folgende Mineralstäube in die Versuchsreihen aufgenommen. Die Zuteilung zu beiden Gruppen erfolgte anhand der in Klammern angegebenen Literatur.

Mineralstäube mit fibrogenem Potential:

- α-Quarz (SiO_2 der Firma Sigma) [5,66,67],
- α-Quarz (SiO_2 DQ12) [5,66,67],
- α-Quarz (SiO_2 F600) [5,66,67],
- Graphit (C) [5,68],
- Titancarbid (TiC) [5,7,66,69],
- Kaolin ($Al_4[(OH)_8/Si_4O_{10}]$) [5,7,70,71],
- Talk ($Mg_3[(OH)_2/ Si_4O_{10}]$) [72-75].

Inerte Mineralstäube:

- Anatas (TiO_2) [76-79],
- Hämatit (α- Fe_2O_3) [5,7,66,80,81],
- Magnetit (Fe_3O_4) [7,66],
- Zinndioxid (SnO_2) [7],
- Korund (α- Al_2O_3) [7,81,82].

α- Quarz ist der am besten untersuchte Mineralstaub hinsichtlich seiner Wechselwirkung mit dem Organismus. In den verschiedenen Tierversuchsstudien und *in vitro* Experimenten werden in Europa vorwiegend die Standard- α- Quarze $Quarz_{DQ12}$ und $Quarz_{F600}$ verwendet. Es erschien

deshalb interessant, auch das Adsorptionsverhalten dieser Quarze vergleichend zu untersuchen. Die Mineralstäube Talk und Kaolin gehören zu den Silikaten und enthalten im Kristallgitter unter anderem auch SiO_4- Tetraeder, aus denen auch α- Quarz aufgebaut ist.

2.1.3. Die Oberfläche der Stäube

In der vorliegenden Arbeit wurde quantitativ die Adsorption von Lipoproteinen auf den Oberflächen verschiedener Stäube untersucht. Dafür war es notwendig, jeweils Staubmengen gleicher Oberfläche zu verwenden. Die Kenntnis der spezifischen Oberflächen der Stäube, d.h. der Fläche in Quadratmetern, die ein Gramm des Stoffes besitzt, war deshalb eine Grundvoraussetzung.

Eine verbreitete Methode, die die Bestimmung der spezifischen Oberfläche erlaubt, ist die Brunauer-Emmett-Teller (BET) Gasadsorption [83]. Hier wird gasförmiger Stickstoff auf die Oberfläche von Stäuben aufgebracht und aus der adsorbierten Gasmenge auf die spezifische Oberfläche (A_{BET}) des Staubes rückgeschlossen. Der Platzbedarf eines Stickstoffmoleküls in monomolekularer Schicht auf der Stauboberfläche wird unter definierten Umgebungsbedingungen mit $0{,}162 nm^2$ angegeben [84]. Die Oberfläche von Mikroporen in der Stauboberfläche, deren Öffnungsfläche größer als der Durchmesser der Gasteilchen ist, geht in die Oberflächenbestimmung ein.

Der Durchmesser der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Lipoproteine liegt zwischen 5nm und 25nm [43]. Damit steht die Oberfläche der Mikroporen den wesentlich größeren Lipoproteinen nicht als Adsorptionsfläche zur Verfügung. Diese nicht nutzbare Fläche variiert mit der Porosität von Stoff zu Stoff, sodass ein systematischer Fehler resultieren würde. Deshalb wurde für diese Arbeit eine Methode zur Bestimmung der Oberfläche entwickelt, bei der die Mikroporen eines Staubes nicht in die Messung eingehen. Bei der Methodenentwicklung konnte auf nicht veröffentlichte Ideen und Vorversuche von Contag (TFH Berlin) zur Oberflächenbestimmung kanzerogener Stäube zurückgegriffen werden.

Das Prinzip der entwickelten Methode ist die Adsorption von in Lösung befindlichen Nonadecansäuremolekülen an die zu bestimmende Oberfläche. Als Lösungsmittel wurde n-Hexadecan verwendet. Man kann davon ausgehen, dass eine monomolekulare Schicht der langkettigen Fettsäure auf der Stauboberfläche entsteht, da nach Bigelow et al. [85] unverzweigte, langkettige Fettsäuren mit n-Hexadecan als Lösungsmittel auf Glas- und Metalloberflächen in Form einer monomolekularen Schicht abgeschieden werden. Um das

Adsorptionsverhalten zu überprüfen, wurde die Adsorptionsisotherme aufgenommen. Der Platzbedarf eines Fettsäuremoleküls in monomolekularer Schicht beträgt ca. 0,2nm^2 [86-89]. Die Länge der hydrophoben Kohlenstoffkette lässt sich nach Zocher et al. [90] berechnen und beträgt für Nonadecansäure etwa 2,5nm. Da die Fettsäure mit der funktionellen Carboxylgruppe an der Stauboberfläche adsorbiert, steht die Oberfläche von Poren mit einem Durchmesser kleiner als 2,5nm aufgrund der Länge der nach außen stehenden Kette nicht als Adsorptionsfläche zur Verfügung, d.h. diese Mikroporen werden bei der Oberflächenbestimmung nicht erfasst. Poren mit Durchmessern zwischen 2,5nm und 5nm stellen eine Fehlerquelle bei den Lipoproteinadsorptionsversuchen dar, da ihre Fläche zwar in die Oberflächenbestimmung eingeht, nicht aber für die Adsorption von Lipoproteinen zur Verfügung steht.

Die auf der Oberfläche adsorbierte Masse Nonadecansäure (NDS) wurde bestimmt, indem mittels Infrarotspektrometrie die Konzentrationsänderung der Lösung NDS in n-Hexadecan ermittelt wurde. Anhand von Eichsubstanzen, deren spezifische Oberflächen bekannt waren, wurde die Masse NDS ermittelt, die in monomolekularer Schicht pro Quadratmeter Oberfläche binden kann. Als Eichsubstanzen wurden Quarzsände verwendet unter der Annahme, dass Sände eine porenfreie Oberfläche besitzen. Diese Annahme bestätigte sich später durch die ermittelte Packungsdichte der NDS- Moleküle (vergleiche hierzu 3.1 Die Mineralstauboberflächen). Aus der Masse NDS, die in monomolekularer Schicht pro Quadratmeter Oberfläche binden kann, konnte die spezifische Oberfläche der untersuchten Mineralstäube bestimmt werden. Die so ermittelte Oberfläche unterscheidet sich von derjenigen, die mittels BET- Methode ermittelt würde (A_{BET}) um die Fläche der Mikroporen mit Öffnungsdurchmesern <2,5nm und wird im folgenden mit A_{NDS} bezeichnet. Die genaue Beschreibung der Methode findet sich unter 2.2.3 Durchführung.

2.2. Bestimmung der Mineralstauboberflächen

2.2.1. Material

- n-Hexadecan ($CH_3(CH_2)_{14}CH_3$) (Sigma, H-0255),
- Nonadecanic acid ($CH_3(CH_2)_{17}COOH$) (Sigma, N-5252),
- Quarzsand (Eichsubstanz für Blaine-Geräte der Amtlichen Materialprüfanstalt für Steine und Erden, Clausthal-Zellerfeld, Spezifische Oberfläche 0,299m^2/g),
- Quarzsand (Eichsubstanz für Blaine-Geräte der Amtlichen Materialprüfanstalt für Steine und Erden, Clausthal-Zellerfeld, Spezifische Oberfläche 0,406m^2/g),
- α-Quarz (SiO_2) (Sigma, S-5631),
- α-Quarz (SiO_2) (DQ12) (zur Verfügung gestellt von Prof. Pott, Düsseldorf),
- α-Quarz (SiO_2) (F600) (zur Verfügung gestellt von Prof. Pott, Düsseldorf),
- Graphit (C) (Merck, 4206),
- Titancarbid (TiC) (Goodfellow, Ti 546010/1),
- Kaolin ($Al_4[(OH)_8/Si_4O_{10}]$) (Sigma, K-7375),
- Talk ($Mg_3[(OH)_2/Si_4O_{10}]$) (Sigma, T-2015),
- Anatas (TiO_2) (Sigma, T-8141),
- Hämatit (α-Fe_2O_3) (Merck, 3924),
- Magnetit (Fe_3O_4) (Aldrich, 31.006-9),
- Zinn(IV)oxid (SnO_2) (Merck, 7818),
- Korund (α-Al_2O_3) (Sigma, A- 2039).

2.2.2. Geräte

- Infrared Fourier Transform Spectrometer 1720 (Perkin-Elmer),
- Zentrifuge: ehrist, Typ UJ1, No 30615, 100 Watt,
- Schüttelmaschine: heidolph,
- Waage: Sartorius, Kleinstwert der Fehlergrenze: 0,5mg.

2.2.3. Durchführung

Die Bestimmung der Oberflächen erfolgte bei Raumtemperatur (22 +/- 2°C). Zur Herstellung einer nahezu gesättigten Lösung von Nonadecansäure in n-Hexadecan wurden 150mg Nonadecansäure im Messkolben mit n-Hexadecan auf 100ml aufgefüllt und geschwenkt. Erleichtertes Lösen ließ sich durch Erwärmung im Wasserbad sowie mit Hilfe eines Magnetrührers erreichen. Von dieser Lösung (1,50mg/ml) wurden durch Mischen mit n-Hexadecan Lösungen folgender Konzentrationen hergestellt: 1,25mg/ml, 1,00mg/ml, 0,75mg/ml, 0,50mg/ml und 0,25mg/ml. Sie dienten zur Erstellung der Eichkurve am Infrarotspektrometer. Verwendet wurde eine NaCl- Küvette mit der Schichtdicke 0,1mm. Die Messung erfolgte bei 1714cm^{-1}, was dem Absorptionsmaximum der C=O- Schwingung entspricht. Die Küvette wurde vor jeder Messung mit Petrolether gespült, anschließend mit einer Wasserstrahlpumpe getrocknet und mit der zu messenden Lösung dreimal durchgespült, um den Fehler durch Verunreinigung der Küvette zu minimieren. Die Extinktion wurde mit je zwei Messungen bestimmt. Bei deutlicher Abweichung der beiden Messwerte voneinander wurden noch eine dritte oder vierte Messung angeschlossen. Ursache für Abweichungen waren möglicherweise Verunreinigungen durch Partikel auf der Küvettenaußenseite. Die Werte für die Eichkurve wurden an jedem Messtag bestimmt, um die Vergleichbarkeit der Extinktionswerte an den einzelnen Messtagen zu überprüfen. Aus den erhaltenen Wertepaaren von Nonadecansäurekonzentration und Extinktionswert wurde eine Eichkurve erstellt und deren Steigung als Steigung der Regressionsgeraden durch alle ermittelten Werte mit Gleichung 1 bestimmt.

Gleichung 1 zur Bestimmung der Steigung der Regressionsgeraden:

$$b = \frac{n\sum xy - \left(\sum y\right)\left(\sum x\right)}{n\sum x^2 - \left(\sum x\right)^2}$$

mit

n: Anzahl der Wertepaare (x/y)

x: Konzentration Nonadecansäure in n-Hexadecan [mg/ml]

y: Messwert der Extinktion am Infrarotspektrometer

b: Steigung der Eichkurve [ml/mg]

Ebenfalls durch Verdünnung mit n-Hexadecan wurden aus der Ausgangslösung (1,50mg/ml) Lösungen der folgenden Konzentrationen hergestellt: 1,20mg/ml, 0,90mg/ml, 0,60mg/ml, 0,30mg/ml. Mit diesen Lösungen wurde eine Adsorptionsisotherme aufgenommen, die den Verlauf der Adsorption von Nonadecansäure aus n-Hexadecan an eine Quarzsandoberfläche bei 22°C in Abhängigkeit von der Nonadecansäurekonzentration zeigt. Dazu wurden jeweils einem Quadratmeter eines Quarzsandes mit bekannter spezifischer Oberfläche (0,406m^2/g) 10ml der verschiedenen Lösungen zugesetzt. Die erhaltenen Suspensionen wurden auf einer Schüttelmaschine für eine Stunde waagerecht liegend geschüttelt. Anschließend wurde der Staub 20 Minuten bei 1000g abzentrifugiert. Im Überstand lag nun eine Nonadecansäurekonzentration vor, die aufgrund der stattgefundenen Adsorption um einen bestimmten Wert unter der ursprünglichen Konzentration lag. Die Nonadecansäurekonzentration im Überstand wurde infrarotspektrometrisch bestimmt. Die Messung am Spektrometer erfolgte wie oben beschrieben. Die Differenz aus Ausgangskonzentration und Konzentration im Überstand ergab bei bekanntem verwendeten Volumen (10ml) nach Gleichung 2 die adsorbierte Masse Nonadecansäure pro Quadratmeter. Es wurden jeweils drei Messungen durchgeführt und der Mittelwert gebildet.

Gleichung 2 zur Berechnung der adsorbierten Masse Nonadecansäure pro Quadratmeter Oberfläche:

$$M_{Ads} = \frac{V}{A_Q * m_Q} * \left(C_0 - \frac{E}{b} \right)$$

mit

M_{Ads}: Adsorbierte Masse Nonadecansäure pro Quadratmeter Oberfläche [mg/m²]

C_0: Konzentration der zugegebenen Lösung [mg/ml]

V: zugegebenes Volumen der Lösung [ml]

E: Extinktionswert am Infrarotspektrometer nach Adsorption

b: Steigung der Eichkurve [ml/mg]

A_Q : spezifische Oberfläche Quarzsand [m²/mg]

m_Q : Eingewogene Masse Quarzsand [mg]

Die Masse Nonadecansäure, die aus der nahezu gesättigten Lösung pro Quadratmeter Quarzsandoberfläche adsorbierte, wurde außerdem für den oben verwendeten und einen weiteren Quarzsand mit der bekannten spezifischen Oberfläche von 0,299m^2/g mit jeweils sieben Messungen in gleicher Weise bestimmt. Der Mittelwert diente als Referenz für die Bestimmung der spezifischen Oberflächen der einzelnen Mineralstäube.

Zur Bestimmung ihrer spezifischen Oberfläche wurde jeweils die Masse der einzelnen Mineralstäube abgewogen, die in etwa 0,4m^2 entsprach. Die ungefähre Masse eines Quadratmeters war im Vorfeld der eigentlichen Messreihen durch Vorversuche mit verschiedenen Einwaagen ermittelt worden. Die Stäube wurden in Zentrifugengläsern mit je 5ml der nahezu gesättigten Lösung (1,50mg/ml) versetzt, verschlossen, kräftig per Hand geschüttelt und anschließend für eine Stunde waagerecht liegend auf einer Schüttelmaschine geschüttelt. Nach 20- minütiger Zentrifugation bei 1000g wurde die Nonadecansäurekonzentration im Überstand wie oben beschrieben mittels Infrarotspektrometrie bestimmt. Für jeden Mineralstaub wurden mindestens drei Messreihen aufgenommen.

Unter der Annahme, dass die Masse Nonadecansäure, die pro Quadratmeter Oberfläche bindet, für alle untersuchten Stäube den glei

chen Wert hat (vergleiche hierzu 4.1 Methode der Oberflächenbestimmung mittels Nonadecansäureadsorption), konnte mit Gleichung 3 die spezifische Oberfläche aus den ermittelten Extinktionen errechnet werden.

Gleichung 3 zur Berechnung der spezifischen Oberfläche A_{NDS} der verwendeten Mineralstäube:

$$A_{NDS} = \frac{V * \left(C_0 - \frac{E}{b} \right)}{M_{Ads} * m}$$

mit

A_{NDS}: spezifische Oberfläche [m²/mg]

m: eingewogene Masse des Mineralstaubs [mg]

C_0: Konzentration der zugegebenen Lösung [mg/ml]

V: zugegebenes Volumen der Lösung [ml]

E: Extinktionswert am Infrarotspektrometer nach Adsorption

b: Steigung der Eichkurve [ml/mg]

M_{Ads}: Masse Nonadecansäure, die pro Quadratmeter Oberfläche bindet [mg/m²]

2.3. Lipoproteinadsorption

2.3.1. Material

- Mineralstäube (s. 2.2.1 Material),
- Lipoproteins from bovine plasma (Sigma:L-3626, HDL cholesterol: 90,8%, LDL cholesterol 8,1%),
- Serum eines 68- jährigen Mannes (aus am Messtag frisch entnommenem Blut),
- Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPNO)((zur Verfügung gestellt von Prof. Pott, Düsseldorf),
- NaCl-Lsg. (0,9%, eigene Herstellung),
- Reaktionslösung (Ecoline 25) zur Cholesterolbestimmung nach der CHOD-PAP- Methode (Merck, 14830),
- Calibrator (Merck, 19720),
- LDL- Fällungsreagenz (Merck, 14992),
- HDL- Fällungsreagenz (Merck, 14210).

2.3.2. Geräte

- Photometer (cecil instruments, Cambridge, ce 1010, serial No. 90403, 90 Watt)

2.3.3. Durchführung

2.3.3.1. Adsorptionsisothermen mit bovinem Lipoproteinkonzentrat

Zunächst wurden für einen Teil der Mineralstäube die Adsorptionsisothermen bei einer Temperatur von 22°C aufgenommen. Dazu wurde das Lipoproteinkonzentrat mit physiologischer Kochsalzlösung auf Werte von 800mg Cholesterol pro Deziliter, 600mg/dl, 400mg/dl und 200mg/dl verdünnt. Jeweils 3ml der jeweiligen Lösung wurden zu $1m^2$ Mineralstaub in ein Reagenzglas gegeben und durch kräftiges Schütteln per Hand vermengt. Im Anschluss wurden die Gefäße eine Stunde lang waagerecht liegend auf einer Schüttelmaschine geschüttelt. Der Mineralstaub wurde dann durch 20- minütige Zentrifugation bei 1000g abgetrennt. Pro Mineralstaub und Cholesterolkonzentration wurden drei Messungen

durchgeführt. Der klare Überstand wurde abpipettiert und zur Cholesterolbestimmung (siehe 2.3.3.5 Cholesterolbestimmung) bereit gestellt. Eine Differenzierung der Dichteklassen HDL und LDL wurde nicht vorgenommen.

2.3.3.2. Adsorption bei konstanter Konzentration aus bovinem Lipoproteinkonzentrat

Das Lipoproteinkonzentrat wurde mit physiologischer Kochsalzlösung auf eine Konzentration von 200mg Cholesterol pro Deziliter verdünnt. Die Lösung wurde anschließend im Wasserbad auf 37°C erwärmt bzw. in einer weiteren Versuchsreihe bei einer Raumtemperatur von 22°C ohne Erwärmung, wie oben beschrieben (siehe 2.3.3.1 Adsorptionsisothermen mit bovinem Lipoproteinkonzentrat), den Stäuben zugesetzt. Das Verhältnis betrug ebenfalls 3ml Lipoproteinkonzentrat pro Quadratmeter Stauboberfläche. Das anschließende Schütteln erfolgte für die eine Versuchsreihe im 37°C warmen Wasserbad, ansonsten glich das weitere Vorgehen mit Zentrifugation und Cholesterolbestimmung dem oben für die Aufnahme der Isothermen beschriebenen Verfahren. Mit jedem Mineralstaub wurden drei Messungen durchgeführt. Eine Differenzierung der Dichteklassen HDL und LDL wurde nicht vorgenommen.

2.3.3.3. Adsorption bei konstanter Konzentration aus menschlichem Serum

Alle Versuche wurden mit frisch entnommenem Blut eines 68-jährigen Mannes durchgeführt. Die Blutentnahmen erfolgten jeweils zu Beginn eines Messtages unter gleichbleibenden Bedingungen. Nach der Gewinnung des Serums durch 10- minütige Zentrifugation bei 1000g wurden die Cholesterolkonzentrationen im nativen Serum bestimmt (siehe 2.3.3.5 Cholesterolbestimmung). Das unverdünnte, auf 37°C erwärmte Serum wurde im Verhältnis von 3ml Serum zu $1m^2$ Mineralstaub den Stäuben zugesetzt. Im Weiteren wurde wie oben beschrieben verfahren (siehe 2.3.3.1 Adsorptionsisothermen mit bovinem Lipoproteinkonzentrat). Der Schüttelvorgang erfolgte im 37°C warmen Wasserbad. Auch die Adsorptionsversuche mit menschlichem Serum wurden für jeden Mineralstaub dreimal durchgeführt. Die HDL- und LDL- Adsorption wurden getrennt ermittelt.

2.3.3.4. Adsorption bei konstanter Konzentration aus menschlichem Serum in Gegenwart von Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPNO)

Um die Wirkung des Polymers PVPNO auf das Adsorptionsverhalten von Lipoproteinen auf Quarzoberflächen zu untersuchen, wurde dem unverdünnten, 37°C warmen Serum

pulverförmiges PVPNO im Verhältnis von 1g auf 100ml Serum unter ständigem Schwenken zugesetzt. Das Schwenken verhinderte ein Verklumpen des Polymers im Serum. Im Weiteren wurde wie oben verfahren (siehe 2.3.3.1 Adsorptionsisothermen mit bovinem Lipoproteinkonzentrat). In diese Versuchsreihe wurden nur die drei verschiedenen α- Quarze (Sigma, DQ12, F600) einbezogen, da für α- Quarz eine fibrosehemmende Wirkung von PVPNO gezeigt wurde [91]. Die HDL- und LDL- Adsorption wurden getrennt ermittelt.

2.3.3.5. Cholesterolbestimmung

Die Cholesterolbestimmung erfolgte in den durch Zentrifugation erhaltenen klaren Überständen der oben genannten Ansätze. Die Bestimmung erfolgte nach der CHOD-PAP-Methode. Mit Detergentien werden Cholesterol und Cholesterolester bei dieser Methode aus Lipoproteinen freigesetzt. Die Cholesterolester werden durch Cholesterolesterase hydrolysiert und das freie Cholesterol dann durch Cholesteroloxidase enzymatisch oxidiert. Das dabei entstehende H_2O_2 wird in einer Peroxidase- katalysierten Reaktion zu einem farbigen Chinonimin umgesetzt, dessen Konzentration photometrisch bestimmt werden kann.

Zur Bestimmung der Gesamtcholesterolkonzentration wurden je 0,01ml Überstand abgenommen und zur Cholesterolbestimmung mit je 1ml Reaktionslösung in 10mm- Einmalküvetten gemischt. Nach zehnminütiger Reaktionszeit folgte die photometrische Messung bei 500nm gegen die reine Reaktionslösung. Als Standard fungierte eine von Merck vorgesehene Kalibratorlösung, mit einem bekannten Cholesterolgehalt von 225mg/dl. Von jeder Probe wurden mindestens zwei Extinktionen bestimmt und diese anschließend gemittelt.

Zur Bestimmung des HDL- Cholesterols wurden vom Überstand je 0,1ml abgenommen und in Eppendorfgefäßen mit je 0,25ml HDL- Fällungsreagenz versetzt. Das Fällungsreagenz fällt Lipoproteine aller Dichteklassen außer HDL. Die Gefäße wurden gut geschüttelt und nach 15 Minuten Fällzeit 20 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 0,1 ml zur Cholesterolbestimmung mit je 1ml Reaktionslösung gemischt. Die photometrische Messung erfolgte wie oben beschrieben. Die Kalibratorlösung wurde im gleichen Verhältnis wie die zu untersuchenden Proben mit physiologischer NaCl- Lösung verdünnt (0,1ml zu 0,25ml).

Zur Bestimmung der LDL- Cholesterolkonzentration wurden je 0,04ml vom Überstand abgenommen und in Eppendorfgefäßen mit je 0,4ml LDL- Fällungsreagenz versetzt. Es wurde gut geschüttelt und nach 15 Minuten Fällzeit 20 Minuten bei 1000g zentrifugiert. Vom klaren Überstand wurden 0,1 ml zur Cholesterolbestimmung mit je 1ml Reaktionslösung gemischt. Die

photometrische Messung erfolgte wie oben beschrieben. Die Kalibratorlösung wurde im gleichen Verhältnis wie die zu untersuchenden Proben mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt (0,04ml zu 0,4ml). Das LDL- Fällungsreagenz fällt nur LDL. Daraus ergab sich, dass die LDL-Konzentration aus der Differenz der nach der Fällung verbliebenen Cholesterolkonzentration und der Gesamtcholesterolkonzentration errechnet werden musste.

2.4. Statistische Methoden

Aufgrund der kleinen Fallzahlen und der schiefen Verteilung der Merkmale erfolgte die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse mit nichtparametrischen Tests. Demnach kam beim Vergleich unabhängiger Stichproben der Mann- Whitney- U- Test für nichtparametrische, unverbundene Stichproben zur Anwendung, abhängige Stichproben wurden mit dem Wilcoxon-Test für nichtparametrische, verbundene Stichproben überprüft. Verwendet wurde das Software-Programm SPSS.

3. Ergebnisse

3.1. Die Mineralstauboberflächen

In Abb. 2 ist die Adsorptionsisotherme (aufgenommen bei einer Temperatur von 22°C) von in n-Hexadecan gelöster Nonadecansäure auf Quarzsand dargestellt. Bei einer Konzentration von 1,5mg/ml liegt eine nahezu gesättigte Lösung der Fettsäure im Alkan vor. Die Isotherme zeigt einen einphasigen Verlauf, das Plateau wird bei einer Konzentration von 1,5mg/ml erreicht.

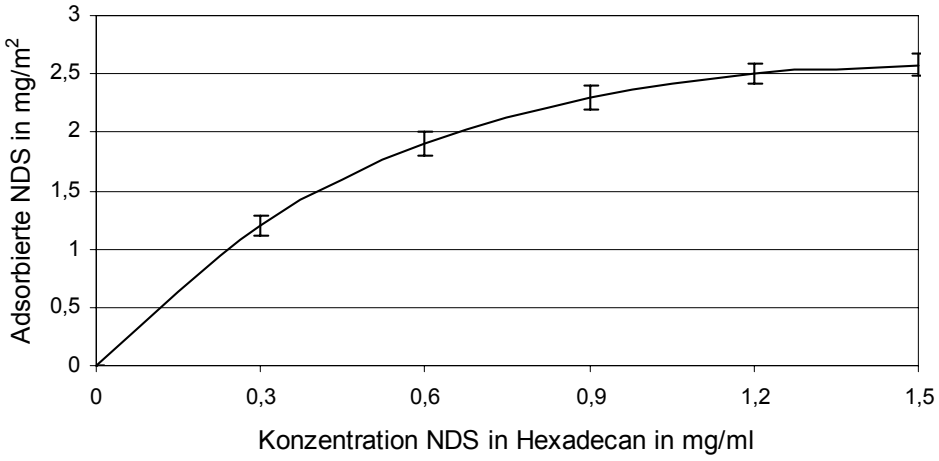


Abb. 2: Adsorptionsisotherme von Nonadecansäure (NDS) aus n-Hexadecan auf Quarzsand bei 22°C (Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Messungen).

Der Wert für die Nonadecansäureadsorption im Plateau der Isotherme wurde für den Quarzsand mit der bekannten spezifischen Oberfläche A_1= 0,406 * 10^{-4} m^2/g mit sieben Einzelmessungen ermittelt und anhand eines weiteren Quarzsandes mit der bekannten spezifischen Oberfläche A_2= 0,299 * 10^{-4} m^2/g überprüft. Als Ergebnis von jeweils 7 Einzelmessungen ergab sich, dass die verwendeten Quarzsände pro Quadratmeter Oberfläche 2,58 +/- 0,12mg Nonadecansäure binden. Der Platzbedarf eines Fettsäuremoleküls auf der Quarzoberfläche, errechnet aus molarer Masse und der adsorbierten Masse pro Fläche, beträgt somit 0,192 +/- 0,009nm^2 . Der ermittelte Platzbedarf bestätigt die Annahme, dass sich auf der Stauboberfläche eine monomolekulare Schicht der Fettsäure gebildet hat, da der Platzbedarf langkettiger Fettsäuren in monomolekularen Schichten von verschiedenen Autoren mit Werten um 0,2nm^2 angegeben wird [86-89].

Tab. 1 stellt die ermittelten Werte der Oberflächen (A_{NDS}) der einzelnen Mineralstäube dar. Die Werte liegen zwischen 0,3m^2/g und 7,7m^2/g. Die großen Unterschiede zwischen den einzelnen Mineralstäuben machen deutlich, wie wichtig die Kenntnis der Oberfläche pro Masseneinheit ist, will man die Stäube in Bezug auf ihre Adsorptionseigenschaften sinnvoll miteinander vergleichen.

Tab. 1: Mit der Methode der Nonadecansäureadsorption ermittelte Oberfläche (A_{NDS}) der Mineralstäube in m^2/g (Mittelwerte und Standardabweichungen aus je drei Messungen)

Substanz	A_{NDS} [m^2/g]	
Graphit	0,63	+/-0,11
Titancarbid	0,30	+/-0,02
Kaolin	7,69	+/-0,97
$Quarz_{DQ12}$	3,13	+/-0,45
$Quarz_{F600}$	1,52	+/-0,19
$Quarz_{Sigma}$	2,38	+/-0,22
Talk	1,92	+/-0,17
Zinndioxid	7,14	+/-0,87
Hämatit	2,22	+/-0,22
Magnetit	1,04	+/-0,05
Korund	0,36	+/-0,07
Titandioxid	7,14	+/-0,60

$Quarz_{DQ12}$ und $Quarz_{F600}$ sind sogenannte Standardquarze. Ihre spezifischen Oberflächen sind bekannt. So liegt die mittels BET- Methode bestimmte spezifische Oberfläche für $Quarz_{DQ12}$ bei A_{BET} = 8,48 +/- 0,08m^2/g, für $Quarz_{F600}$ bei A_{BET} = 3,65 +/- 0,02m^2/g [92]. Die Oberflächen, die mit der Nonadecansäureadsorptionsmethode ermittelt wurden liegen für $Quarz_{DQ12}$ bei A_{NDS} = 3,13 +/- 0,45m^2/g, für $Quarz_{F600}$ bei A_{NDS} = 1,52 +/- 0,19m^2/g. Die beiden Methoden unterscheiden sich darin, dass die Nonadecansäureadsorption die Oberfläche von Mikroporen mit einem Öffnungsdurchmesser von weniger als 2,5nm vernachlässigt. Vergleicht man die Ergebnisse beider Methoden so fällt auf, dass A_{BET} jeweils etwa 2,5mal so groß ist wie A_{NDS}. Das bedeutet, dass beide Standardquarze eine mikroporöse Struktur aufweisen.

3.2. Lipoproteinadsorption

3.2.1. Adsorption von Lipoproteinen aus bovinem Lipoproteinkonzentrat an fibrogene und inerte Mineralstäube

3.2.1.1. Adsorptionsisothermen

Die Adsorption erfolgte aus einem bovinen Lipoproteinkonzentrat. Zunächst wurden die Adsorptionsisothermen der fibrogenen und eines Teils der inerten Mineralstäube bei einer Raumtemperatur von 22°C aufgenommen. Die Adsorption wurde für Konzentrationen des Lipoproteinkonzentrates zwischen 200mg/dl und 1000mg/dl ermittelt. Die Isothermen sind in Abb.3 dargestellt.

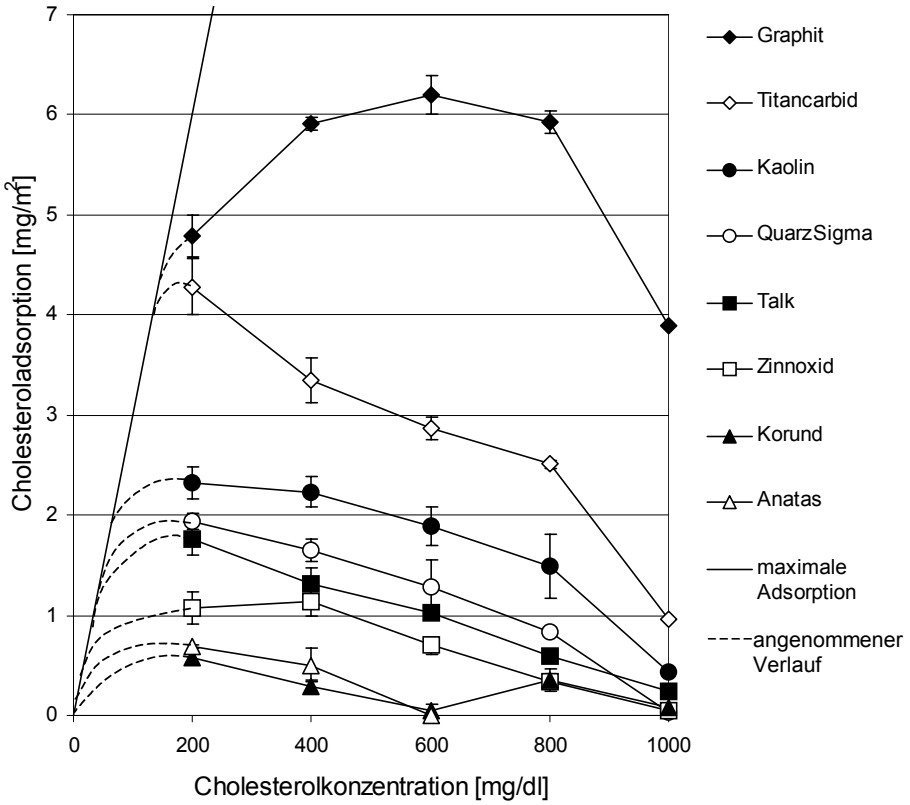


Abb. 3: Isothermen der Adsorption von Lipoproteinen aus Lipoproteinkonzentrat mit ansteigender Konzentration an Mineralstauboberflächen bei 22°C. Angegeben ist die adsorbierte Masse Cholesterol pro Quadratmeter Stauboberfläche. Mittelwerte und Standardabweichung aus jeweils drei Messungen. Fehlende Fehlerindikatoren bedeuten, dass die Standardabweichung innerhalb des jeweiligen Symbols liegt.

Es fällt auf, dass alle Isothermen der untersuchten Stäube mit Ausnahme von Korund ein Maximum durchlaufen. Das heißt, je größer das Cholesterolangebot in der Lösung wird, desto geringer ist ab einer bestimmten Konzentration die absolute Menge an adsorbiertem Cholesterol. Dieses zunächst unverständliche Phänomen konnte auch bei anderen Substanzen beobachtet werden und wird als „Vroman- Effekt“ bezeichnet [93]. Der Vroman- Effekt beschreibt ein Verhalten, bei dem die Proteinadsorption aus Plasma oder Proteingemischen bei einer bestimmten Verdünnung ein Maximum erreicht. Bei geringerer Verdünnung, d.h. bei höherer Konzentration des untersuchten Proteins, nimmt die Adsorption dagegen wieder ab. Eine Ursache dieses Verhaltens soll die Konkurrenz durch andere in der Lösung vorhandene Proteine sein, deren Menge bei starker Verdünnung nicht für eine Verdrängung des untersuchten Proteins von der Adsorptionsfläche ausreicht [93]. Dass es sich auch im vorliegenden Fall um eine Verdrängung durch konkurrierende Adsorbate handelt, ist wegen der Reinheit des Lipoproteinkonzentrates wenig wahrscheinlich. Vorstellbar ist dagegen, dass sich bei höheren Konzentrationen Lipoproteinaggregate im Konzentrat ausbilden. So könnten beispielsweise mit zunehmender Konzentration Wechselwirkungen zwischen den polaren Gruppen von apoA-I-Molekülen auftreten, die zu Aggregatbildung von HDL- Partikeln führen. Damit stünden Teile der im Konzentrat vorwiegend vorhandenen HDL nicht mehr als potenzielle Adsorbate zur Verfügung, was den Rückgang der adsorbierten Lipoproteinmengen auf den Stauboberflächen mit zunehmender Konzentration erklären könnte. Die Adsorptionsisotherme von Korund zeigt als einzige einen zweigipfligen Verlauf. Die Ursache hierfür ist ungeklärt.

3.2.1.2. Adsorption aus Lipoproteinkonzentrat konstanter Konzentration

Die Adsorption aus bovinem Lipoproteinkonzentrat wurde bei 37°C bzw. 22°C durchgeführt. Der Cholesterolgehalt des Lipoproteinkonzentrates nach Verdünnung betrug bei sechs Proben und jeweils zwei Messungen 190 +/- 11mg/dl. Das Ergebnis der Adsorption ist graphisch in Abb. 4 dargestellt. Es zeigt, dass alle untersuchten Stäube Lipoproteine aus der Lipoproteinlösung adsorbieren. Auffällig ist, dass Graphit und Titancarbid mit 93% bzw. 94% bei 37°C fast die gesamten in der Ausgangslösung befindlichen Lipoproteine an ihrer Oberfläche adsorbieren. Die drei verschiedenen α-Quarze adsorbieren bei 37°C zwischen 36% und 42%. Kaolin adsorbiert bei 37°C 43%. Der am schwächsten adsorbierende fibrogene Stoff ist Talk mit 32% bei 37°C. Alle inerten Substanzen adsorbieren bei 37°C weniger als 25% der in der Ausgangslösung vorhandenen Lipoproteine. Die Adsorption bei 22°C zeigt nur geringe relative Abweichungen gegenüber der Adsorption bei einer Temperatur von 37°C.

Die statistische Auswertung zeigt, dass die fibrogenen Mineralstäube signifikant mehr Lipoproteine adsorbieren, als die inerten Mineralstäube (Mann- Whitney U- Test, p = 0,003).

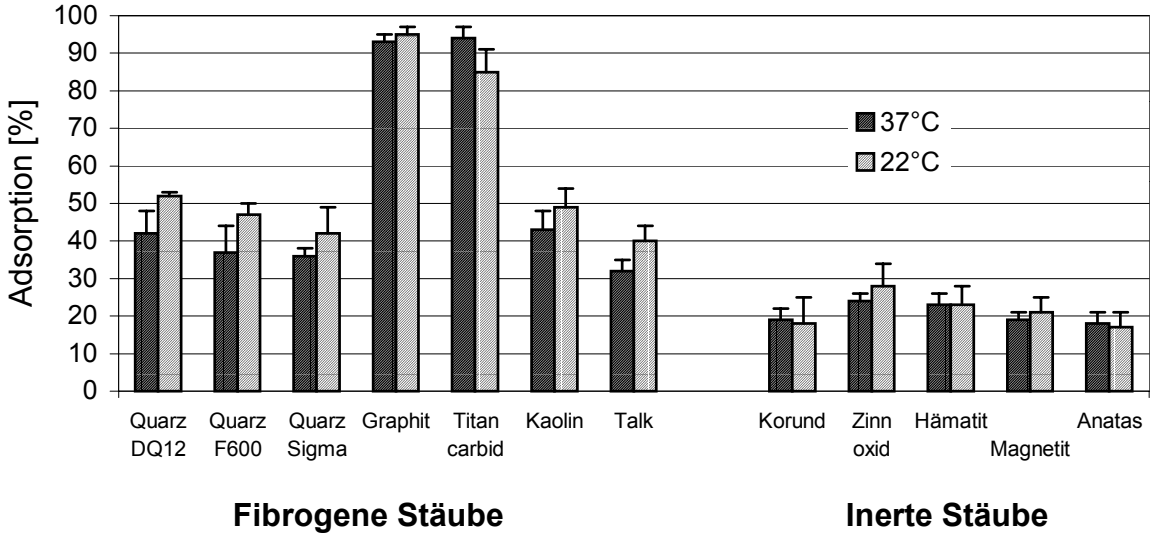


Abb. 4: Lipoproteinadsorption aus bovinem Lipoproteinkonzentrat (>90% HDL- Cholesterol) an die Oberfläche fibrogener und inerter Mineralstäube, ausgedrückt als Relation der am Mineralstaub adsorbierten Cholesterolmasse zur Cholesterolmasse in der Ausgangslösung in Prozent. Der Cholesterolgehalt im Konzentrat betrug 190 +/- 11mg/dl. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen.

3.2.2. Adsorption von Lipoproteinen aus menschlichem Serum an fibrogene bzw. inerte Mineralstäube

In dieser Versuchsreihe wurde die Adsorption der beiden Lipoproteindichteklassen High density lipoprotein (HDL) und Low density lipoprotein (LDL) getrennt untersucht. Dazu wurde die Abnahme der Konzentration an HDL- Cholesterol und LDL- Cholesterol im Serum einzeln bestimmt. Im Unterschied zur Lipoproteinadsorption aus Lipoproteinkonzentrat handelt es sich um eine konkurrierende Adsorption verschiedenster im Serum enthaltener potenzieller Adsorbate. Da für alle Versuchsreihen ausschließlich Serum einer Einzelperson verwendet wurde, ist nicht auszuschließen, dass es sich bei den im Folgenden dargestellten Ergebnissen um Einzelbefunde handeln könnte, die mit dem Serum anderer Personen so nicht zu beobachten wären. Deshalb erscheint es sinnvoll, die durch diese Arbeit gewonnenen Erkenntnisse an größeren Populationen zu überprüfen.

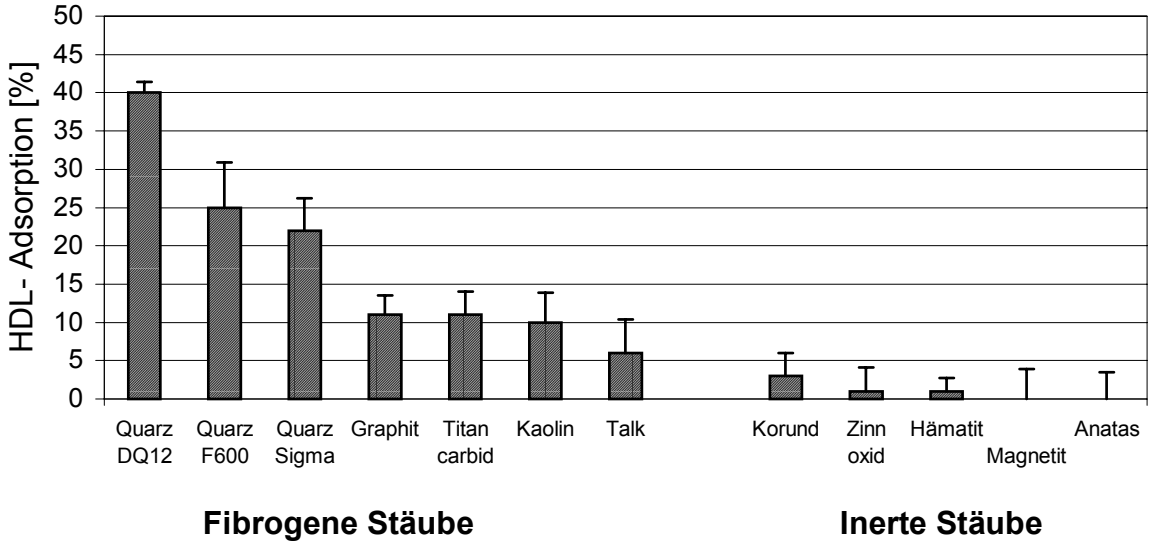
Es zeigt sich eine deutliche Verteilung der HDL- Adsorption zwischen den beiden untersuchten Mineralstaubgruppen. Die Adsorption von HDL erfolgt deutlich stärker auf Oberflächen von

Stäuben, die ein fibrogenes Potenzial aufweisen, als auf Oberflächen inerter Stäube. Letztere adsorbieren praktisch kein HDL. Lediglich 0-3% des vorhandenen HDL werden an der Oberfläche inerter Stäube adsorbiert. Die fibrogenen Stäube adsorbieren dagegen bis zu 40% des im Serum enthaltenen HDL. Hierbei fällt besonders auf, dass die drei Quarze, die unter den untersuchten Substanzen das höchste fibrogene Potenzial aufweisen, auch die mit Abstand stärkste HDL- Adsorption zeigen. Sie adsorbieren 22%- 40% des im Serum vorhandenen HDL. Die entsprechenden Adsorptionswerte für die anderen untersuchten fibrogenen Mineralstäube liegen zwischen 6% und 11%. Die statistische Auswertung zeigt hier, dass die fibrogenen Mineralstäube signifikant mehr HDL aus menschlichem Serum adsorbieren, als die inerten Mineralstäube (Mann- Whitney U- Test, $p = 0{,}003$).

Die Fähigkeit zur Adsorption von LDL zeigt sich dagegen unabhängig vom fibrogenen Potenzial der Stäube. Die stärkste LDL- Adsorption zeigt α- $Quarz_{Sigma}$ mit 45%. Der ebenfalls fibrogene Titancarbidstaub adsorbiert dagegen im messbaren Bereich kein LDL. Dementsprechend ergibt die statistische Auswertung, dass die fibrogenen Mineralstäube nicht signifikant mehr LDL adsorbieren, als die inerten Mineralstäube (Mann- Whitney U- Test, $p = 0{,}639$).

Die Abbildungen 5 und 6 stellen das Verhalten der fibrogenen und inerten Mineralstäube in bezug auf die Adsorption von HDL und LDL aus menschlichem Serum prozentual dar. Die Gesamtcholesterolkonzentration im verwendeten Serum lag bei den an 10 Tagen entnommenen Blutproben bei 169 +/-9mg/dl, bei einer HDL- Cholesterolkonzentration von 59 +/- 5mg/dl und einer LDL- Cholesterolkonzentration von 102 +/- 8mg/dl.

Die funktionellen Gruppen auf den Oberflächen der untersuchten Mineralstäube können anhand ihrer chemischen Eigenschaften eingeteilt werden in neutrale, saure und basische Gruppen. Die Ergebnisse zeigen, dass HDL unter den gegebenen Versuchsbedingungen aus humanem Serum bevorzugt an Stäube adsorbiert, die gleichzeitig saure und basische funktionelle Gruppen aufweisen. Das sind die α- Quarze und die Silikate. Auch an die neutralen Stoffe Graphit und Titancarbid erfolgt eine starke HDL- Adsorption. LDL wird ebenfalls in großem Maße an der Oberfläche der Silikate und α- Quarze adsorbiert. Die neutralen Substanzen Graphit und Titancarbid adsorbieren dagegen praktisch kein LDL, vielmehr erfolgt eine bevorzugte Adsorption von LDL an die Oxide Zinndioxid und α- Korund. Möglicherweise spielt der amphotere Charakter dieser Oxide hierbei eine Rolle.



.

Abb. 5: HDL- Adsorption aus menschlichem Serum an fibrogene und inerte Mineralstäube, ausgedrückt als Relation der am Mineralstaub adsorbierten HDL-Cholesterolmasse zur HDL-Cholesterolmasse im zugegebenen Serum in Prozent. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen. Die HDL- Cholesterolkonzentration im Ausgangsserum lag an den verschiedenen Messtagen zwischen 54mg/dl und 64mg/dl.

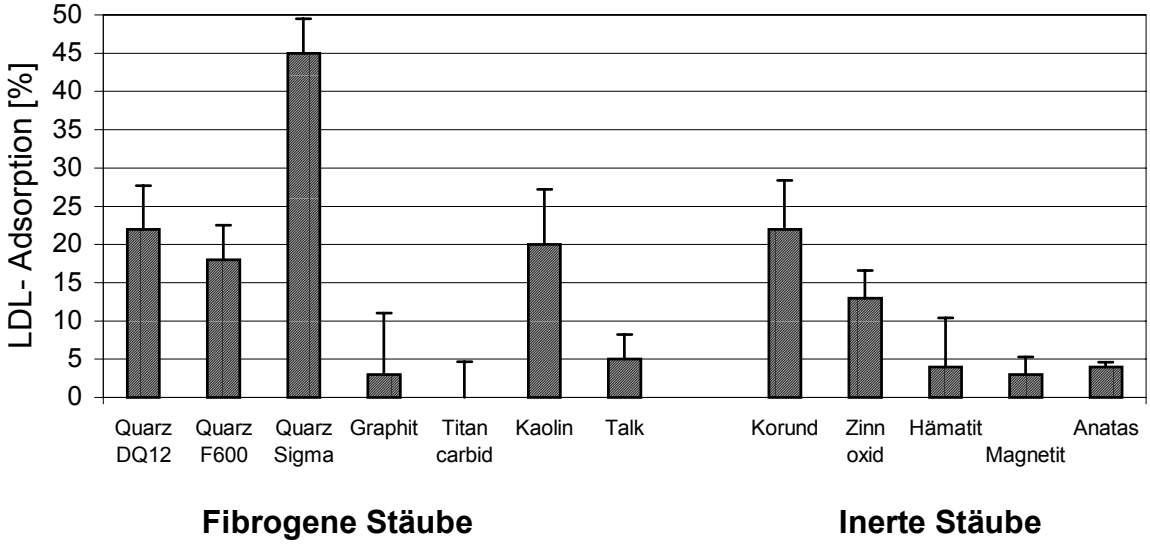


Abb. 6: LDL- Adsorption aus menschlichem Serum an fibrogene und inerte Mineralstäube, ausgedrückt als Relation der am Mineralstaub adsorbierten LDL-Cholesterolmasse zur LDL-Cholesterolmasse im zugegebenen Serum in Prozent. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen. Die LDL- Cholesterolkonzentration im Ausgangsserum lag an den verschiedenen Messtagen zwischen 94mg/dl und 110mg/dl.

Die bei den Untersuchungen erhaltenen Messwerte für die LDL- und HDL- Adsorption lassen sich auch direkt in Beziehung zueinander setzen, wenn man die adsorbierten Cholesterolmassen vergleicht, wie es in Abb. 7 zu sehen ist. Aufgrund der Versuchsanordnung wurde jeweils die adsorbierte Masse an HDL- bzw. LDL- Cholesterol gemessen und nicht die adsorbierte Lipoproteinmasse selbst. Es muss deshalb beim direkten Vergleich die unterschiedliche Zusammensetzung der beiden untersuchten Lipoproteindichteklassen beachtet werden. So besteht LDL zu ca. 50% aus Cholesterol, HDL dagegen nur zu ca. 20% [64].

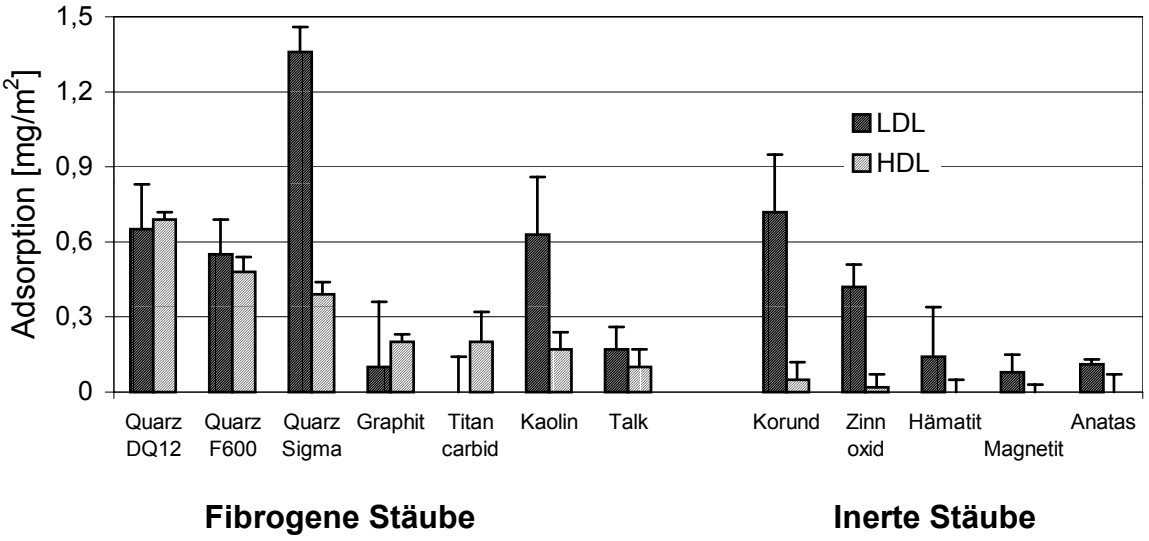


Abb. 7: LDL- und HDL-Cholesteroladsorption an der Oberfläche fibrogener und inerter Mineralstäube in mg Cholesterol pro Quadratmeter Stauboberfläche. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen. Die Cholesterolkonzentrationen im Ausgangsserum lagen an den verschiedenen Messtagen für HDL zwischen 54mg/dl und 64mg/dl sowie für LDL zwischen 94mg/dl und 110mg/dl.

3.2.3. Adsorption von Lipoproteinen aus menschlichem Serum an α-Quarz in Anwesenheit von Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPNO)

Die Versuche dieses Abschnitts unterscheiden sich von denen im vorigen lediglich durch die Zugabe von 1g der antisilikogenen Substanz Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPNO) zu 100 ml Serum. Alle anderen Versuchsbedingungen blieben unverändert. Untersucht wurde die Fähigkeit der drei verschiedenen α- Quarze zur Adsorption von HDL und LDL aus dem mit PVPNO versetzten Serum. Die Versuche zeigen, dass die Adsorption von HDL auf der Oberfläche von Quarz durch das Vorhandensein von PVPNO im Serum stark reduziert wird.

Tab. 2: Beeinflussung der Lipoproteinadsorption aus humanem Serum an α- Quarzstäube durch das Polymer PVPNO. Angegeben ist die Masse HDL- bzw. LDL- Cholesterol, die pro Quadratmeter Staub adsorbiert.

			HDL- Cholesterol [mg/m^2]	LDL- Cholesterol [mg/m^2]
$Quarz_{DQ12}$	ohne	PVPNO	0,69 +/- 0,03	0,65 +/- 0,18
	mit		0,05 +/-0,08	0,23 +/-0,09
$Quarz_{F600}$	ohne	PVPNO	0,48 +/- 0,06	0,55 +/- 0,14
	mit		0,03 +/- 0,02	0,49 +/- 0,11
$Quarz_{Sigma}$	ohne	PVPNO	0,39 +/- 0,05	1,36 +/- 0,1
	mit		0,20 +/- 0,05	1,72 +/- 0,09

Die Werte aus Tab. 2 zeigen, dass die Masse von adsorbiertem HDL- Cholesterol auf α- $Quarz_{DQ12}$ und α- $Quarz_{F600}$ in Anwesenheit von PVPNO um mehr als 90% gegenüber dem reinen Serum reduziert wird. Die Adsorption von HDL- Cholesterol auf α- $Quarz_{Sigma}$ wird um 49% gesenkt. Dagegen wird die LDL- Adsorption durch die Zugabe von PVPNO zum Serum nicht einheitlich verändert. Die LDL- Adsorption auf α- $Quarz_{DQ12}$ und α- $Quarz_{F600}$ wird ebenfalls reduziert. Die LDL- Adsorption auf α- $Quarz_{Sigma}$ verstärkt sich durch PVPNO. Die Ursache dieser Zunahme ist unbekannt. Die statistische Auswertung ergibt, dass die Adsorption von LDL auf allen drei Quarzoberflächen durch die Anwesenheit von PVPNO nicht signifikant reduziert wird (Wilkoxon-Test, $p = 0,593$). Die Reduktion der HDL- Adsorption durch PVPNO ist knapp nicht signifikant (Wilkoxon-Test, $p = 0,109$). Es ist zu vermuten, dass bei größeren Fallzahlen eine signifikante Reduzierung der HDL- Adsorption durch PVPNO hätte nachgewiesen werden können.

In Abb. 8 ist die Veränderung der HDL- Adsorption in Gegenwart von PVPNO im Vergleich zur HDL- Adsorption aus reinem Serum dargestellt. Das Gleiche stellt Abb. 9 für die Adsorption von LDL dar.

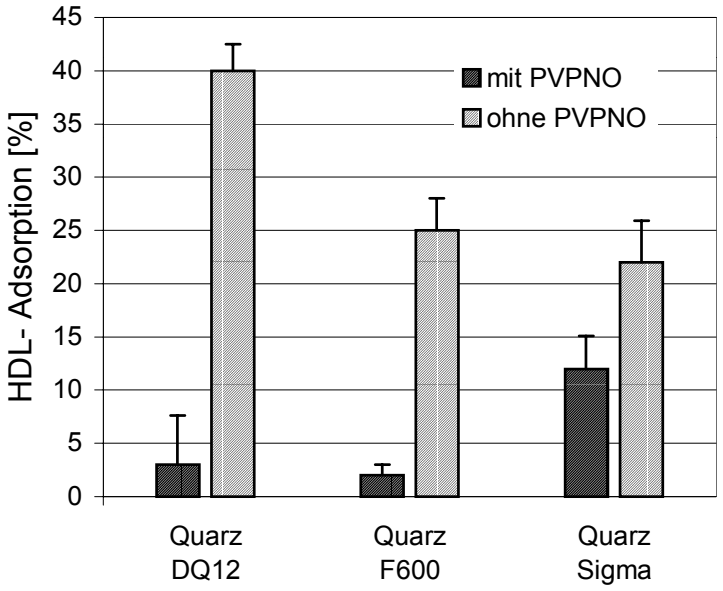


Abb. 8: HDL- Adsorption aus menschlichem Serum mit und ohne Zusatz von PVPNO an drei verschiedene α- Quarze, ausgedrückt als Relation der am Mineralstaub adsorbierten HDL-Cholesterolmasse zur HDL- Cholesterolmasse im zugegebenen Serum in Prozent. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen. Die HDL- Cholesterolkonzentration im Ausgangsserum lag an den verschiedenen Messtagen zwischen 54mg/dl und 64mg/dl.

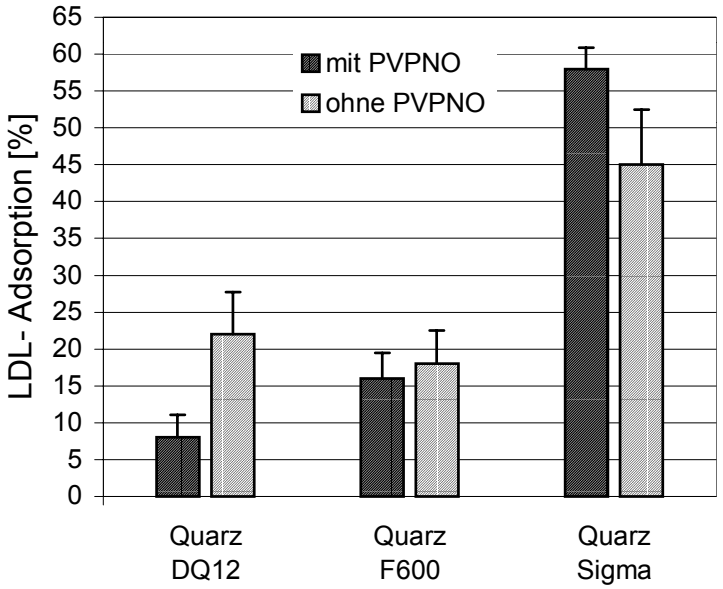


Abb. 9: LDL- Adsorption aus menschlichem Serum mit und ohne Zusatz von PVPNO an drei verschiedene α- Quarze, ausgedrückt als Relation der am Mineralstaub adsorbierten LDL-Cholesterolmasse zur LDL- Cholesterolmasse im zugegebenen Serum in Prozent. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen. Die LDL- Cholesterolkonzentration im Ausgangsserum lag an den verschiedenen Messtagen zwischen 94mg/dl und 110mg/dl.

4. Diskussion

4.1. Methode der Oberflächenbestimmung mittels Nonadecansäureadsorption

Die Annahme, dass die verwendete langkettige Fettsäure eine monomolekulare Schicht auf der Stauboberfläche bildet wird durch den ermittelten Platzbedarf pro Molekül bestätigt. Dieser beträgt 0,192 +/- 0,009nm^2 und liegt damit im Bereich der 0,2nm^2, die von verschiedenen Autoren als Platzbedarf langkettiger Fettsäuren in monomolekularen Schichten ermittelt wurden [86-89]. Die Adsorptionsisotherme (vergleiche Abb.2) spricht mit ihrem Verlauf ebenfalls für die Annahme, dass es sich bei der Adsorption der Nonadecansäure auf der Quarzsandoberfläche um die Bildung einer monomolekularen Schicht handelt. Es findet sich eine gleichmäßige Adsorptionskurve ohne Sprünge, die die Bildung von bi- oder trimolekularen Schichten anzeigen würden. Da es sich bei den verwendeten Eichsubstanzen um natürlich vorkommende Sände handelt, kann man davon ausgehen, dass sie weitgehend frei von Mikroporen sind. Unter dieser Bedingung erhält man mit der angewandten Methode der Nonadecansäure- Adsorption die gleichen Werte für die spezifische Oberfläche, wie mit anderen Methoden, die die Oberfläche von Mikroporen nicht vernachlässigen.

Sing [84] nennt grundsätzliche Schwierigkeiten, die bei der Bestimmung der spezifischen Oberfläche mittels Adsorption aus einer flüssigen an eine feste Phase auftreten können. So sind die meisten Kristalloberflächen heterogen und die entstehende Schicht des adsorbierten Stoffes infolgedessen nicht gleichmäßig über die gesamte Oberfläche verteilt. Die Anordnung der einzelnen Moleküle des Adsorbates auf der Oberfläche kann in Abhängigkeit von der Oberflächenstruktur von Stoff zu Stoff variieren. Außerdem kann der Einbau von Molekülen des Lösungsmittels in die monomolekulare Schicht eine Fehlerquelle darstellen. Die genannten Probleme gelten grundsätzlich auch für die in dieser Arbeit angewandte Methode. Allerdings ist der Einbau von Molekülen des Lösungsmittels in die monomolekulare Fettsäureschicht aufgrund der großen Kettenlängen sehr unwahrscheinlich.

Die Bestimmung von Stauboberflächen ist grundsätzlich mit relativ großen Fehlern behaftet. Für die Stickstoffadsorption, die in der weit verbreiteten BET- Methode zum Einsatz kommt, werden Abweichungen von bis zu 30% zwischen der ermittelten und der tatsächlichen Oberfläche angenommen, die in Abhängigkeit von der strukturellen Beschaffenheit der untersuchten

Oberfläche auftreten können [84].

Die Methode der Nonadecansäureadsorption in der vorliegenden Untersuchung liefert Oberflächenwerte mit Fehlern zwischen +/-5% und +/-19% (vergleiche Tab.1). Deren Ursache konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden. Vermutlich sind die einzelnen verwendeten Stäube nicht ganz einheitlich in bezug auf den Mahlgrad der enthaltenen Staubpartikel. Andere Ursachen könnten im Schüttelvorgang begründet sein. Möglicherweise kommt es stellenweise zu Staubverklumpungen während des Schüttelns, sodass nicht immer die gesamte Stauboberfläche als Adsorptionsfläche zur Verfügung steht.

Abschließend betrachtet handelt es sich bei der Methode der Nonadecansäureadsorption um eine Alternative zu etablierten Oberflächenbestimmungsmethoden, die dann sinnvoll angewendet werden kann, wenn die Oberfläche von Poren mit einem Öffnungsdurchmesser < 2,5nm vernachlässigt werden soll.

4.2. Lipoproteinadsorption

Bei der Adsorption von Lipoproteinen aus bovinem Lipoproteinkonzentrat zeigt sich, dass in der Gruppe der fibrogenen Mineralstäube mit 32-93% (bei 37°C) bzw. 40-95% (bei 22°C) der vorhandenen Lipoproteine signifikant ($p = 0,003$) mehr adsorbiert wird, als in der Gruppe der inerten Stäube mit Werten von 18- 24% (bei 37°C) bzw. 17-28% (bei 22°C). Das verwendete Konzentrat besteht in seinem Cholesterolanteil zu >90% aus HDL- Cholesterol.

Im nächsten Schritt wurde anstelle des Lipoproteinkonzentrates menschliches Serum verwendet. Das Adsorptionsverhalten der Lipoproteindichteklassen HDL und LDL wurde dabei separat untersucht. Die Adsorption von Lipoproteinen aus Serum wird, im Gegensatz zur Adsorption aus Konzentrat, durch das Auftreten von Konkurrenz mit anderen potenziellen Adsorbaten beeinflusst. So enthält Serum sehr viele Proteine, die ebenfalls auf der Stauboberfläche adsorbieren können und dieses in Abhängigkeit von Konzentration und Affinität tun. Es ist deshalb möglich, dass ein Staub, der große Mengen an Lipoproteinen aus einem Lipoproteinkonzentrat adsorbiert, nahezu keine Lipoproteine aus Serum an seiner Oberfläche bindet, wenn die gesamte Oberfläche von einem oder mehreren Adsorbaten mit höherer Affinität und/ oder Konzentration besetzt wird. Die konkurrierenden Adsorbate können für die einzelnen Mineralstäube unterschiedlich sein und somit auch das Ausmaß der Beeinflussung des Adsorptionsverhaltens der Stäube gegenüber Lipoproteinen.

In diesem Zusammenhang muss auch auf die Bedeutung der Proteine und Lipide des Surfactant als potenziell konkurrierende Adsorbate hingewiesen werden. Inhalierte Staubpartikel kommen im Alveolarraum mit diesem Flüssigkeitsfilm in Berührung und adsorbieren vermutlich Surfactantbestandteile an ihrer Oberfläche. Ein Einfluss dieser Adsorption auf die Fibrogenität eines Staubes wird diskutiert [26]. Es erscheint deshalb interessant, auch den Einfluss von Surfactant auf das Lipoproteinadsorptionsvermögen von Mineralstäuben zu untersuchen.

Das Phänomen der konkurrierenden Adsorption findet sich im Ergebnis der Adsorptionsversuche aus humanem Serum. Während bei der Adsorption aus Lipoproteinkonzentrat alle Stäube Lipoproteine adsorbieren, zeigt die Adsorption von HDL aus menschlichem Serum eine eindeutige, statistisch signifikante ($p = 0{,}003$) Verteilung in dem Sinne, dass alle inerten Mineralstäube so gut wie kein HDL adsorbieren (0-3%), während die fibrogenen Stäube zwischen 6 und 40% des vorhandenen HDL binden. Hier fällt innerhalb der Gruppe der fibrogenen Stäube auf, dass der als besonders stark fibrogen bekannte $Quarz_{DQ12}$ auch die stärkste HDL- Adsorption zeigt, während der als nur schwach fibrogen, teilweise sogar als inert bezeichnete Talk [80,94] eine vergleichsweise geringe HDL- Adsorption von 6% aufweist.

Die Adsorption von LDL zeigt eine unregelmäßige Verteilung zwischen beiden untersuchten Gruppen.

Die Zugabe von PVPNO, einem Hemmstoff der Silikoseentstehung zum Serum führt bei sonst gleichen Versuchsbedingungen zu einem Rückgang der HDL- Adsorption auf α- Quarz um 93% für $Quarz_{DQ12}$, 94% für $Quarz_{F600}$ sowie 49% für $Quarz_{Sigma}$.

Demnach ist die durch PVPNO hemmbare, bevorzugte Adsorption von HDL eine gemeinsame Eigenschaft der fibrogenen Mineralstäube, die sie von den inerten Mineralstäuben unterscheidet.

4.2.1. Die Bindung zwischen HDL und α- Quarz

Die Abildungen 10 und 11 zeigen die Adsorption von Lipoproteinen aus Lipoproteinkonzentrat neben der Adsorption von HDL aus Serum.

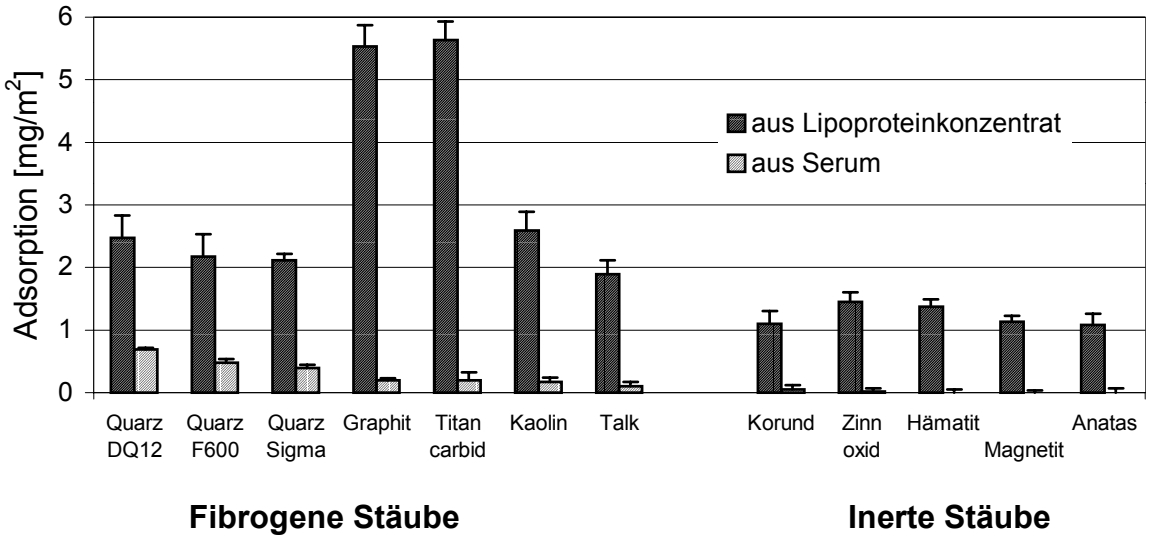


Abb. 10: Adsorption von Lipoproteinen aus Lipoproteinkonzentrat (>90% HDL- Cholesterol) an die Oberfläche fibrogener und inerter Mineralstäube im Vergleich zur Adsorption von HDL aus Serum an diese Oberflächen. Angegeben ist die jeweils adsorbierte Masse Cholesterol pro Quadratmeter Stauboberfläche. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen. Die Cholesterolkonzentration betrug im Lipoproteinkonzentrat 190+/-11mg/dl, die HDL-Cholesterolkonzentration im Serum betrug 59+/-5mg/dl.

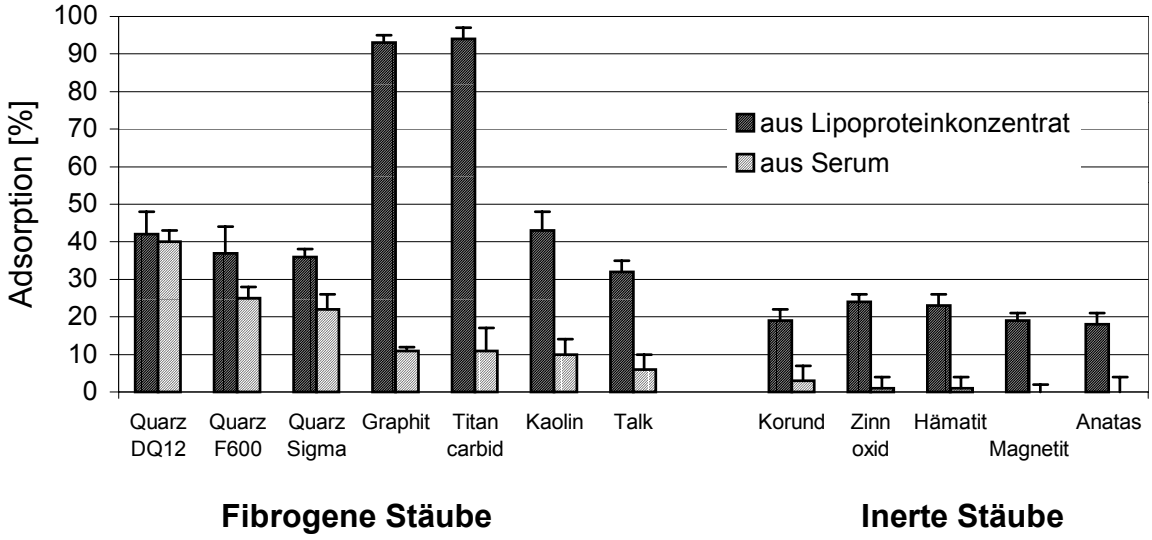


Abb. 11: Adsorption von Lipoproteinen aus Lipoproteinkonzentrat (>90% HDL- Cholesterol) an die Oberfläche fibrogener und inerter Mineralstäube im Vergleich zur Adsorption von HDL aus Serum an diese Oberflächen. Angegeben ist jeweils die Relation der am Mineralstaub adsorbierten Cholesterolmasse zur Cholesterolmasse in der Ausgangslösung in Prozent. Mittelwerte und Standardabweichungen aus jeweils drei Messungen. Die Cholesterolkonzentration betrug im Lipoproteinkonzentrat 190+/-11mg/dl, die HDL- Cholesterolkonzentration im Serum betrug 59+/-5mg/dl.

Da das Konzentrat nicht ausschließlich, sondern nur zu >90% aus HDL- Cholesterol besteht und die Ausgangskonzentrationen in Serum und Konzentrat nicht identisch sind, lassen sich die Absolutwerte nicht vergleichen. Vergleicht man jedoch die einzelnen Mineralstäube untereinander, so fällt auf, dass die Differenz zwischen der Adsorption aus Konzentrat und der aus Serum bei den drei α- Quarzen geringer ist, als bei den anderen Mineralstäuben. Ursache der Differenz sind zum einen die oben beschriebenen Konzentrationsunterschiede. Diese gelten jedoch für alle Stäube in gleichem Maße. Zum anderen ergibt sich die Differenz durch konkurrierende Adsorbate, die im Serum, nicht jedoch im Konzentrat vorliegen. Die unterschiedliche Abnahme des HDL- Adsorptionsvermögens der einzelnen Stäube ist daher vermutlich Ausdruck der unterschiedlich starken Konkurrenz durch Serumbestandteile. Die geringe Differenz, die bei den α- Quarzen zu beobachten ist, spricht dafür, dass Serumbestandteile die HDL Adsorption auf den Quarzoberflächen in geringerem Maße beeinflussen, als die HDL- Adsorption auf den Oberflächen der anderen Mineralstäube. Dies lässt auf eine vergleichsweise stabile Bindung zwischen der Quarzoberfläche und den HDL-

Partikeln schließen. Auf die Frage, wie diese stabile Bindung aussehen könnte, und welche Strukturen sich möglicherweise daran beteiligen, soll im Folgenden eingegangen werden.

Der Proteinanteil der HDL setzt sich zusammen aus den Apolipoproteinen apoA-I, apoA-II, apoA-IV, apoCI-III und apoE [95]. ApoA-I stellt den Hauptbestandteil dar und hat eine große Bedeutung für die Funktion der HDL durch seine Fähigkeit zur Lipidbindung [96] und seine Cofaktorwirkung bei der Aktivierung des Enzyms Lecithin- Cholesterol- Acyltransferase (LCAT) [40].

In den Sekundärstrukturen aller genannten Apoproteine des HDL treten charakteristischerweise sogenannte amphipatische α- Helices auf [97]. Darunter versteht man eine besondere Form der α- Helix, bei der eine Seite entlang der Längsachse des Helixstranges von polaren Gruppen gebildet wird, die gegenüberliegende Seite von unpolaren Gruppen. Diese Strukturen bieten sich an als Assoziationsstellen für Lipide.

Klimov et al. [98] untersuchten die Bindung von Cholesterol an apoA-I und apoE und kommen zu dem Schluss, dass es eine Bindung über zwei verschiedene Strukturen gleichzeitig gibt. Diese Zwei- Punkt- Bindung führt zu einer großen Stabilität. So kann die polare Hydroxylgruppe des Cholesterolmoleküls an der Aminosäure Arginin im apoA-I bzw. apoE binden, indem eine Wasserstoffbrückenbindung und/ oder Ionen- Dipol- Beziehung zwischen der Hydroxylgruppe des Cholesterols einerseits und der positiv geladenen Guanidingruppe des Arginin andererseits ausgebildet wird. Gleichzeitig kann die aliphatische Seitenkette des Cholesterolmoleküls in eine hydrophobe Wechselwirkung mit einer neutralen Aminosäure treten und so die zweite Bindungsstelle ausbilden. Klimov et al. [98] fanden ein häufig wiederkehrendes Muster in den Primärstrukturen von apoA-I und apoE, bei dem jeweils die dritte Aminosäureposition vor oder nach Arginin durch eine Aminosäure mit hydrophobem Rest als möglichem Partner zur Wechselwirkung mit der hydrophoben Seitenkette des Cholesterolmoleküls besetzt ist.

Nimmt man an, dass α- Quarz bei seiner Bindung an HDL ähnlich wie Cholesterol eine Bindung über zwei Bindungsstellen eingehen kann, könnte dies eine Erklärung für die Festigkeit der Bindung sein.

α- Quarz besitzt an seiner Oberfläche Silanol (SiOH)- und ionisierte Silanolgruppen (SiO^-), die als mögliche Bindungspartner für Aminosäuren der Apoproteine im HDL in Frage kommen. Eine Bindung der sauren Silanolgruppe könnte als Wasserstoffbrückenbindung an die bei physiologischem pH- Wert negativ geladene Carboxylgruppe (COO^-) der Aminosäuren

Asparaginsäure und Glutaminsäure erfolgen, während als Bindungspartner der negativ geladenen ionisierten Silanolgruppe (SiO^-) die bei physiologischem pH- Wert positiv geladenen Aminogruppen der Aminosäuren Arginin und Lysin in Frage kommen. Hier könnte sich eine Ionen- Ionen- Beziehung ausbilden (siehe Abb.12).

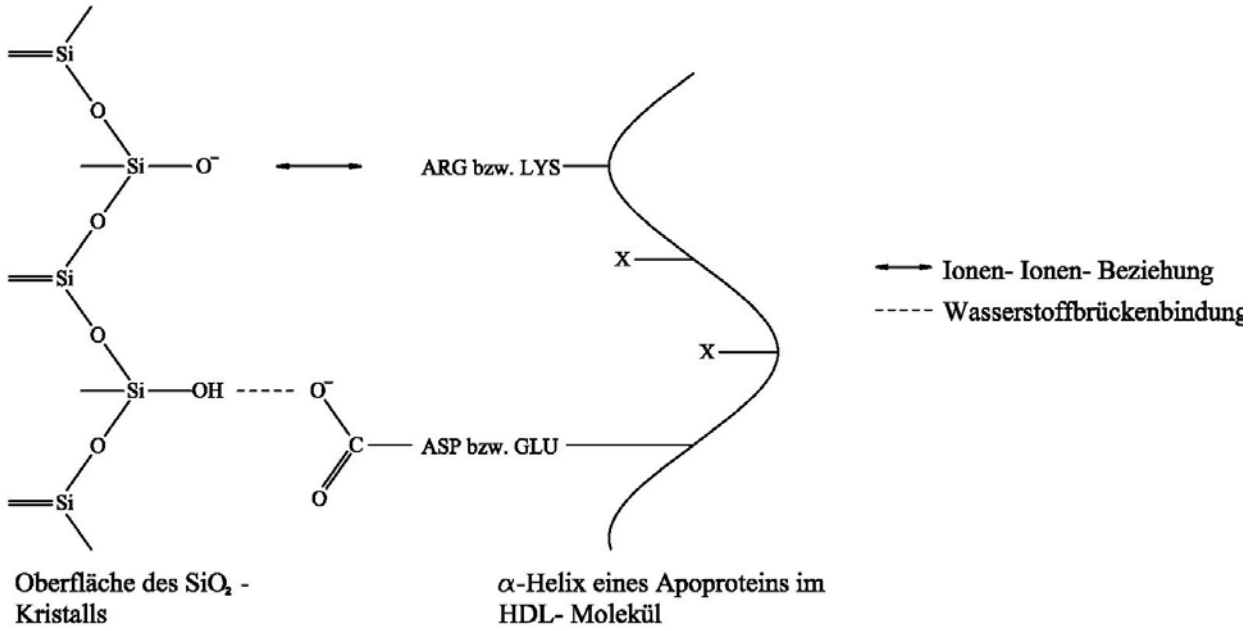


Abb. 12: Hypothetisches Modell einer Zwei- Punkt- Bindung zwischen α- Quarz und Apolipoproteinen des HDL

Von den geladenen Aminosäuren Asparaginsäure, Glutamaminsäure, Arginin und Lysin wird die polare Seite der amphipatischen α- Helix gebildet [97]. Untersucht man die Primärstrukturen der Apolipoproteine in bezug auf die vier genannten Aminosäuren, so fällt wie in den Tabellen 3 bis 9 dargestellt auf, dass ähnlich der von Klimov et al. [98] bemerkten festen Abstände zwischen bestimmten Aminosäuren auch unter den als Quarzbindungspartner in Frage kommenden Aminosäuren häufig eine Sequenz der Form Asparaginsäure (Glutaminsäure) – X – X– Arginin (Lysin) auftritt. Das bedeutet, dass mögliche Bindungspartner der Silanolgruppe (Asparaginsäure und Glutaminsäure) in einem jeweils definierten Abstand, nämlich an dritter Position vor oder nach einem möglichen Bindungspartner der ionisierten Silanolgruppe (Arginin oder Lysin) anzutreffen sind. Besonders häufig erscheint diese Sequenz im apoA-I, das bei einer Gesamtzahl von 243 Aminosäuren 27 mal die spezifische Sequenz Asparaginsäure (Glutaminsäure) – X – X– Arginin (Lysin) beinhaltet. Im apoA-II- Molekül findet sich diese Sequenz unter 77 Aminosäuren 5 mal, im apoA-IV unter 376 Aminosäuren 27 mal, im apoE unter 299 Aminosäuren 15 mal, im apoC-I unter 57 Aminosäuren 7 mal, im apoC-II unter 79 Aminosäuren 4 mal, im apoC-III unter 79 Aminosäuren 1 mal.

Tab. 3: Spezifische Sequenzen der Form ASP(GLU) – X – X– ARG(LYS) im **apoA-I**- Molekül und ihre Position innerhalb der Aminosäuresequenz. (Die Sequenz wurde entnommen aus Mahley et al. [95]). ASP = Asparaginsäure, GLU = Glutaminsäure, ARG = Arginin, LYS = Lysin.

Saure Aminoäure	Position im Protein	Basische Aminosäure
ASP	9 – X – X – 12	LYS
ASP	13 – X – X – 10	ARG
ASP	20 – X – X – 23	LYS
ASP	24 – X – X – 27	ARG
GLU	62 – X – X – 59	LYS
GLU	80 – X – X – 77	LYS
GLU	80 – X – X – 83	ARG
GLU	85 – X – X – 88	LYS
GLU	91 – X – X – 94	LYS
ASP	103 – X – X – 106	LYS
GLU	110 – X – X – 107	LYS
GLU	113 – X – X – 116	ARG
GLU	120 – X – X – 123	ARG
GLU	128 – X – X – 131	ARG
GLU	136 – X – X – 133	LYS
GLU	146 – X – X – 149	ARG
ASP	150 – X – X – 153	ARG
ASP	157 – X – X – 160	ARG
ASP	168 – X – X – 171	ARG
GLU	179 – X – X – 182	LYS
GLU	191 – X – X – 188	ARG
GLU	198 – X – X – 195	LYS
GLU	205 – X – X – 208	LYS
GLU	212 – X – X – 215	ARG
GLU	223 – X – X – 226	LYS
GLU	235 – X – X – 238	LYS

Tab. 4: Spezifische Sequenzen der Form ASP(GLU) – X – X– LYS im **apoA-II**- Molekül und ihre Position innerhalb der Aminosäuresequenz. (Die Sequenz wurde entnommen aus Mahley et al. [95]). ASP = Asparaginsäure, GLU = Glutaminsäure, LYS = Lysin.

Saure Aminoäure	Position im Protein	Basische Aminosäure
ASP	20– X – X – 23	LYS
GLU	27 – X – X – 30	LYS
GLU	33 – X – X – 30	LYS
GLU	47 – X – X – 44	LYS
GLU	43 – X – X – 46	LYS

Tab. 5: Spezifische Sequenzen der Form ASP(GLU) – X – X– ARG(LYS) im **apoA-IV**- Molekül und ihre Position innerhalb der Aminosäuresequenz. (Die Sequenz wurde entnommen aus Elshourbagy et al. [91]). ASP = Asparaginsäure, GLU = Glutaminsäure, ARG = Arginin, LYS = Lysin.

Saure Aminoäure	Position im Protein	Basische Aminosäure
GLU	48 – X – X – 45	LYS
ASP	55 – X – X – 58	LYS
GLU	76 – X – X – 73	LYS
ASP	74 – X – X – 77	LYS
GLU	76 – X – X – 79	LYS
GLU	80 – X – X – 77	LYS
GLU	81 – X – X – 84	LYS
GLU	87 – X – X – 84	LYS
GLU	87 – X – X – 90	ARG
ASP	106 – X – X – 103	LYS
ASP	106 – X – X – 109	ARG
ASP	120 – X – X – 122	ARG
GLU	131 – X – X – 134	ARG
ASP	164 – X – X – 167	LYS
GLU	175 – X – X – 178	LYS
ASP	186 – X – X – 189	LYS

GLU	197 – X – X – 200	ARG
GLU	198 – X – X – 201	ARG
GLU	227 – X – X – 230	LYS
GLU	230 – X – X – 233	LYS
GLU	241 – X – X – 244	ARG
GLU	225 – X – X – 228	ARG
GLU	281 – X – X – 284	ARG
GLU	282 – X – X – 285	ARG
GLU	288 – X – X – 285	ARG
GLU	302 – X – X – 305	ARG
GLU	342 – X – X – 339	LYS

Tab. 6: Spezifische Sequenzen der Form ASP(GLU) − X − X− ARG(LYS) im **apoE**- Molekül und ihre Position innerhalb der Aminosäuresequenz. (Die Sequenz wurde entnommen aus Mahley et al. [95]). ASP = Asparaginsäure, GLU = Glutaminsäure, ARG = Arginin, LYS = Lysin.

Saure Aminosäure	Position im Protein	Basische Aminosäure
ASP	35 – X – X – 32	ARG
ASP	35 – X – X – 38	ARG
GLU	66 – X – X – 69	LYS
GLU	87 – X – X – 90	ARG
GLU	131 – X – X – 134	ARG
ASP	153 – X – X –150	ARG
ASP	154 – X – X – 157	LYS
GLU	186 – X – X – 189	ARG
GLU	212 – X – X – 215	ARG
ASP	227 – X – X – 224	ARG
GLU	231 – X – X – 228	ARG
ASP	230 – X – X – 233	LYS
GLU	245 – X – X – 242	LYS
ASP	271 – X – X – 274	ARG

Tab.7: Spezifische Sequenzen der Form ASP(GLU) – X – X– LYS im **apoC-I**- Molekül und ihre Position innerhalb der Aminosäuresequenz. (Die Sequenz wurde entnommen aus Mahley et al. [95]). ASP = Asparaginsäure, GLU = Glutaminsäure, ARG = Arginin, LYS = Lysin.

Saure Aminosäure	Position im Protein	Basische Aminosäure
GLU	13– X – X – 10	LYS
ASP	20 – X – X – 23	ARG
GLU	24 – X – X – 21	LYS
GLU	33 – X – X – 30	LYS
GLU	40 – X – X – 37	LYS
GLU	51 – X – X – 48	LYS
GLU	51 – X – X – 54	LYS

Tab.8: Spezifische Sequenzen der Form ASP(GLU) – X – X– LYS im **apoC-II**- Molekül und ihre Position innerhalb der Aminosäuresequenz. (Die Sequenz wurde entnommen aus Mahley et al. [95]). ASP = Asparaginsäure, GLU = Glutaminsäure, ARG = Arginin, LYS = Lysin.

Saure Aminosäure	Position im Protein	Basische Aminosäure
GLU	27– X – X – 30	LYS
GLU	47 – X – X – 50	ARG
ASP	51 – X – X – 48	LYS
GLU	79 – X – X – 76	LYS

Tab.9: Spezifische Sequenzen der Form ASP(GLU) – X – X– LYS im **apoC-III**- Molekül und ihre Position innerhalb der Aminosäuresequenz. (Die Sequenz wurde entnommen aus Mahley et al. [95]). GLU = Glutaminsäure, LYS = Lysin.

Saure Aminosäure	Position im Protein	Basische Aminosäure
GLU	63– X – X – 60	LYS

In einer α- Helix, wie sie die genannten Apoproteine als Sekundärstruktur aufweisen [97], beträgt die Ganghöhe einer Windung 0,54nm bei 3,6 Aminosäureresten pro Windung [99]. Das bedeutet, dass die potenziellen Quarzbindungsstellen der Sequenz Asparaginsäure (Glutaminsäure) – X – X– Arginin (Lysin) in der Helix einen Höhenunterschied von 0,45nm aufweisen und um 60° versetzt liegen.

Die Kristallstruktur von α-Quarz zeigt einen Aufbau aus über Sauerstoff verknüpften SiO_4-Tetraedern, die in Richtung der kristallographischen a- Achse einen definierten Abstand von 0,491nm voneinander haben [100]. In diesem Abstand befinden sich demnach die funktionellen Gruppen (SiOH und SiO^-) auf der Stauboberfläche. Andere fibrogene Modifikationen des Siliziumdioxids, wie Cristobalit und Tridymit sowie die SiO_4- Tetraeder im Talk und im Kaolin zeigen entlang dieser kristallographischen Achse einen ähnlichen Abstand. Die Werte sind in Tabelle 10 zusammengestellt. Sie liegen in einem engen Bereich von 0,51 +/- 0,02nm. Der Tabelle ist auch zu entnehmen, dass die Abstände entlang der kristallographischen a- Achse für die nur gering fibrogenen Kristallmodifikationen des Siliziumdioxids Coesit und Stishovit [1] nicht in diesem Bereich zu finden sind.

Tab. 10: Abstände der SiO_4- Tetraeder entlang der kristallographischen a- Achse in den Kristallgittern verschiedener Minerale. Entnommen aus Strunz, Mineralogische Tabellen [100].

Mineral	a [nm]
α- Quarz (SiO_2)	0,491
α-Cristobalit (SiO_2)	0,497
β-Tridymit (SiO_2)	0,503
Kaolin($Al_4[(OH)_8/Si_4O_{10}]$)	0,514
Talk ($Mg_3[(OH)_2/ Si_4O_{10}]$)	0,527
Coesit (SiO_2)	0,723
Stishovit (SiO_2)	0,418

Der Abstand zwischen den funktionellen Gruppen auf der Oberfläche der genannten fibrogenen Mineralstäube (0,51 +/- 0,02nm) sowie der Abstand zwischen ihren möglichen Bindungspartnern in der α- Helix der Apoproteine (0,45nm) liegen so dicht beieinander, dass man vermuten kann, dass es zu epitaktischen Phänomenen kommt. Die Aminosäurereste von Arginin und Lysin sind lang und flexibel [99] und sollten in der Lage sein, die Streckendifferenz und die Rotation um 60° auszugleichen.

4.2.2. Mögliche Bedeutung der HDL- Adsorption für die Fibroseentstehung

Die untersuchten fibrogenen Mineralstäube adsorbieren signifikant mehr HDL, als die untersuchten inerten Stäube. Die HDL- Adsorption kann durch PVPNO gehemmt werden.

Ein möglicher pathogenetischer Zusammenhang von HDL- Adsorption und Fibrogenität eines Staubes wurde bisher nicht untersucht. Im Folgenden werden Ideen und mögliche neue Erklärungsansätze für bisher nicht erklärbare Phänomene der Silikoseforschung aufgezeigt, die sich aus einem möglichen pathogenetischen Zusammenhang ergeben könnten. Es handelt sich um Anregungen, die im Rahmen entsprechender experimenteller Untersuchungen überprüft werden sollten.

Die Aufnahme von oxidativ modifiziertem LDL durch Makrophagen ist ein Faktor in der Pathogenese der Arteriosklerose [101]. Die Möglichkeiten zur Aufnahme von LDL durch Makrophagen sind bekannt. Dagegen ist nicht sicher geklärt, ob Makrophagen auch in der Lage sind, HDL- Partikel aufzunehmen. Der vor einigen Jahren entdeckte HDL bindende Scavenger-Rezeptor SR- BI bewirkt nicht die Aufnahme des gesamten HDL- Partikels in die Zelle, sondern vermittelt Cholesterolaustauschvorgänge über die Zellmembran [47,102]. Der für die Internalisierung von oxidativ modifiziertem LDL verantwortliche Scavenger- Rezeptor ist nicht in der Lage, natives HDL zu binden [103]. Mit Kupferionen oxidiertes HDL kann dagegen nach La Ville et al. [103] über den Scavenger- Rezeptor aufgenommen werden, während dies nach den Ergebnissen von Parthasarathy et al. [50] nicht möglich ist.

Die Adsorption von HDL an der Oberfläche von Staubpartikeln stellt eine Möglichkeit dar, wie HDL- Partikel von Makrophagen aufgenommen werden könnten. Die mit HDL beladenen Staubpartikel könnten als Überträger fungieren, indem HDL im Rahmen der Partikelphagozytose rezeptorunabhängig in die Makrophagen gelangen könnte. Möglicherweise sind auf diese Weise internalisierte HDL- Partikel die Auslöser der Freisetzung fibrogener Mediatoren durch Makrophagen, wie sie im Rahmen der Pathogenese der Silikose beobachtet werden kann [20].

Die Tatsache, dass die Zugabe des Polymers PVPNO zum Serum eine Hemmung der HDL-Adsorption bewirkt, spricht für die Vorstellung, dass adsorbiertes HDL die Fibrogenität eines Mineralstaubs beeinflusst. PVPNO ist ein starker Protonenakzeptor und in der Lage mit Silanolgruppen der Quarzoberfläche Wasserstoffbrückenbindungen einzugehen [29]. Das Polymer kann die Entstehung einer Silikose verhindern [28]. Unter Einbeziehung der vorangegangenen Überlegungen lässt sich die Wirkung des PVPNO folgendermaßen erklären.

Durch die Besetzung der Silanolgruppen könnte PVPNO die Ausbildung einer stabilen Zwei-Punkt- Bindung zwischen der Quarzoberfläche und HDL verhindern, da eine der beiden benötigten Bindungsstellen, die Silanolgruppe, nicht mehr für HDL zur Verfügung steht. Andere potenzielle Adsorbate wären nun in der Lage, weniger fest gebundenes HDL von der Quarzoberfläche zu verdrängen. Damit könnten die eigentlich fibrogenen Stäube nicht mehr als HDL- Überträger wirksam werden, wodurch sie ihre Fibrogenität verlören.

Neben PVPNO ist auch das dreifach positiv geladene Aluminiumion (Al^{3+}) in der Lage, die fibrogene Aktivität von Quarz zu inhibieren [104]. Al^{3+} bindet vermutlich an die ionisierte Silanolgruppe (SiO^{-}) auf der Quarzoberfläche [104]. Auch durch die Bindung von Al^{3+} wäre demnach die Ausbildung einer stabilen Zwei- Punkt- Bindung zwischen Quarz und HDL nicht mehr möglich. Wie im Falle des PVPNO würde dadurch die angenommene HDL-Überträgerfunktion von Quarz gestört und die Fibrogenität von Quarz inhibiert.

Die Vorstellung einer besonders stabilen Bindung zwischen Quarz und den Apolipoproteinen im HDL durch die Bindung über zwei verschiedene Bindungsstellen liefert somit eine neue Erklärung für die Tatsache, dass zwei an unterschiedlichen Strukturen angreifende Substanzen (PVPNO und Al^{3+}) dieselbe Wirkung, nämlich die Verhinderung der durch Quarz ausgelösten fibrotischen Reaktion, erzielen.

Die vorgeschlagene stabile Zwei- Punkt- Bindung könnte ebenfalls erklären, weshalb Siliziumdioxid in seiner amorphen Struktur eine nur sehr geringe fibrogene Wirkung aufweist [105,106]. Erst die kristalline Struktur ermöglicht das Auftreten eines geometrisch festen Musters an Silanol- (SiOH) und ionisierten Silanolgruppen (SiO^{-}), die als Bindungsstellen für die ebenfalls in festen Abständen vorkommenden Aminosäuren im Apoprotein zur Verfügung stehen. Im amorphen Siliziumdioxid sind die Abstände zwischen den einzelnen Siliziumatomen nicht durch ein Kristallgitter definiert. Dies bedeutet, dass definierte Abstände zwischen funktionellen Gruppen, die mit den entsprechenden Aminosäuren zur Ausbildung von Zwei-Punkt- Bindungen führen könnten, nur zufällig und damit sehr viel seltener auftreten.

Untersuchungen [20] ergaben, dass Quarz stark zytotoxisch auf humane Alveolarmakrophagen wirkt, wenn ein serumfreies Kulturmedium verwendet wird. Werden dem Kulturmedium jedoch 10% Rinderserum zugesetzt, so verschwindet der zytotoxische Effekt und es kommt zur Stimulation der Makrophagen mit der Freisetzung verschiedener Zytokine. Auch für dieses Phänomen kann die HDL- Adsorption auf der Quarzoberfläche eine Erklärung liefern. Im serumfreien Medium kommen die zytotoxischen Gruppen der Quarzoberfläche (SiOH und SiO^{-})

in direkten Kontakt mit den Makrophagen und können dort ihre zytotoxische Wirkung entfalten. Durch Zugabe des Serums werden diese funktionellen Gruppen durch HDL- Adsorption maskiert, die zytotoxische Wirkung des Quarzes wird aufgehoben. Dagegen würde erst durch die HDL- Bindung ein zellstimulierender Effekt auftreten, indem Quarz im Rahmen der Phagozytose HDL in die Makrophagen überträgt und diese möglicherweise dadurch zur Zytokinproduktion anregt.

Die durch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit entstandene Vorstellung, dass die Adsorption von HDL einen Faktor in der mineralstaubinduzierten Fibroseentstehung darstellen könnte, sollte in geeigneten Experimente näher untersucht werden. Möglicherweise liesse sie sich auf fibrogene Feststoffe generell ausweiten und bliebe nicht auf Stäube beschränkt. Darauf deutet hin, dass HDL auch als bevorzugtes Adsorbat auf diversen Kunststoffen ausgemacht wurde [60,61,93,107,108]. Implantiert man im Tierversuch Scheiben oder Folien aus polymeren Kunststoffen, so reagiert das umliegende Gewebe mit der Bildung einer fibrösen Kapsel [109]. Die Implantatoberfläche wird dabei zu einem Großteil von Makrophagen bedeckt [109]. Man kann vermuten, dass HDL auf der Implantatoberfläche adsorbiert wird und von den dort befindlichen Makrophagen im Rahmen vergeblicher Phagozytoseversuche aufgenommen werden könnte. So könnten die internalisierten HDL- Partikel wiederum als Auslöser von Zytokinproduktion und lokaler Fibrose fungieren.

Bezugnehmend auf die in der Einleitung genannten Ziele der Arbeit, lassen sich folgende Feststellungen treffen:

- Die bevorzugte HDL Adsorption stellt eine gemeinsame Eigenschaft fibrogener Mineralstäube dar, die sie von inerten Mineralstäuben unterscheidet.
- Das Adsorptionsverhalten der Lipoproteindichteklassen HDL und LDL auf Mineralstäuben unterscheidet sich in dem Sinne, dass nur HDL eine deutliche, statistisch signifikante Verteilung zwischen inerten und fibrogenen Mineralstäuben zeigt, während die Adsorption von LDL nicht mit der Fibrogenität eines Staubes korreliert.
- Das Polymer PVPNO verringert die Adsorption von HDL auf α- Quarz erheblich.

5. Zusammenfassung

Einige Mineralstäube (z.B. Quarz) wirken nach Inhalation fibrogen während sich andere (z.B. Titandioxid) unter gleichen Bedingungen inert verhalten. Der Entstehungsmechanismus der mineralstaubinduzierten Fibrose und die Ursachen des unterschiedlichen Verhaltens verschiedener Stäube sind bisher nicht restlos geklärt. In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob die bevorzugte Adsorption von Lipoproteinen eine gemeinsame Eigenschaft der fibrogenen Mineralstäube darstellt, die sie von inerten Mineralstäuben unterscheidet.

Es wurden Adsorptionsversuche mit menschlichem Serum und bovinem Lipoproteinkonzentrat durchgeführt. Zur Oberflächenbestimmung der Stäube wurde ein Verfahren entwickelt, welches die Oberfläche von Mikroporen unberücksichtigt lässt, da Lipoproteine aufgrund ihres Teilchendurchmessers nicht in die Mikroporen der Stauboberflächen eindringen können. Dieses neue Verfahren basiert auf der Adsorption von Nonadecansäure aus dem stark hydrophoben Lösungsmittel n-Hexadecan und ermöglicht es, unterschiedlich stark porige Stäube miteinander zu vergleichen.

Es konnte gezeigt werden, dass alle sieben untersuchten fibrogenen Stäube signifikant mehr High density lipoproteins (HDL) adsorbieren, als die fünf untersuchten inerten Stäube. Dieses unterschiedliche Verhalten wurde in Gegenwart konkurrierender Adsorbate (Serumproteine) besonders deutlich. Desweiteren konnte gezeigt werden, dass das als Silikoseschutzstoff bekannte Polymer Polyvinylpyridin-N-oxid (PVPNO) die HDL- Adsorption auf Quarzstauboberflächen hemmt.

Die Adsorption von Low density lipoproteins (LDL) zeigte eine unregelmässige Verteilung zwischen beiden Mineralstaubgruppen.

Die bevorzugte Adsorption von HDL stellt somit eine gemeinsame Eigenschaft der untersuchten fibrogenen Mineralstäube dar, die sie signifikant von den untersuchten inerten Mineralstäuben unterscheidet.

Literaturverzeichnis

[1] Reiser KM, Last JA. Silicosis and fibrogenisis: fact and artifact. Toxicol. 1979; *13:* 51-72.

[2] MSD Sharp&Dohme GmbH, Haar. MSD Manual . 6. Auflage, München, Jena: Urban & Fischer, 2000: 755ff.

[3] Könn G, Schejbal V, Oellig W-P. Pneumokoniosen In: Doerr W, Seifert G. (Hrsg.). Spezielle pathologische Anatomie – Pathologie der Lungen. Band 16/II. Berlin, Heidelberg, New York, Tokyo: Springer, 1983: 647-808.

[4] Gedigk P, Totovic V. Zell- und Gewebsschäden. In: Eder M, Gedigk P (Hrsg.). Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie . 33. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1990: 6-74.

[5] Reichel G. Stäube. In: Reichel G, Bolt HM, Hettinger T et al. (Hrsg.). Grundlagen der Arbeitsmedizin. Stuttgart, Berlin, Köln, Mainz: W. Kohlhammer, 1985: 362-382.

[6] Südbeck C. Berufskrankheiten. In: Südbeck C. (Hrsg.). Arbeits- und Betriebsmedizin. 2. Auflage, Stuttgart, New York: Schattauer, 1998: 29-98.

[7] Reichel G. Auf anorganische Stäube mit geringem oder fehlendem Quarzgehalt zurückgehende Lungenveränderungen. In: Schwiegk H (Hrsg.). Handbuch der Inneren Medizin . Band 4. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1976: 467-469.

[8] Lee KP, Trochimowicz HJ, Reinhardt CF. Pulmonary response of rats exposed to titanium dioxide (TiO2) by inhalation for two years . Toxicol Appl Pharmacol. 1985; *79:* 179-192.

[9] Riede UN, Costabel U. Lunge. In: Riede UN, Schaefer HE, Wehner H (Hrsg.). Allgemeine und Spezielle Pathologie . 2. Auflage, Stuttgart, New York: Georg Thieme, 1989: 554-591.

[10] Banks DE. Clinical features of silicosis. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (Hrsg.). Silica and silica- induced lung diseases. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc., 1996: 23-37.

[11] Seidel HJ. Arbeitsmedizin. In: Gaus W, Hingst V, Mattern R, Reinhardt G, Seidel HJ, Sonntag H-G (Hrsg.). Ökologisches Stoffgebiet . 3. Auflage, Stuttgart: Hippokrates bei Georg Thieme, 1999: 194.

[12] Nash T, Allison AC, Harington JS. Physico-chemical properties of silica in relation to its toxicity. Nature. 1966; *210:* 259-261.

[13] Kane AB. Questions and controversies about the pathogenesis of silicosis. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (Hrsg.). Silica and silica- induced lung diseases. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc., 1996: 121-136.

[14] Allison AC. Fibrogenic and other biological effects of silica. Curr Top Microbiol Immunol. 1996; *210:* 147-158.

[15] Castranova V, Dalal NS, Vallyathan V. Role of Surface free radicals in the pathogeicity of silica. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (Hrsg.). Silica and silica- induced lung diseases. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc., 1996: 91-105.

[16] Fubini B et al.. Physico- chemical properties of crystalline silica dusts and their implication in various biological responsese. Scan J Work Environ Health 1995; *21(2):* 9-14.

[17] Stalder K, Stöber W. Hemolytic activity of suspension of different silica modification and inert dust. Nature. 1965; *206:* 874-875.

[18] Allison AC. Lysosomes and the toxicity of particulate pollutants. Arch Intern Med. 1971; *128:* 131-139.

[19] Nadler S, Goldfischer S. The intracellular release of lysosomal contents in macrophages that have ingested silica. J Histochem Cytochem. 1970; *18:* 368.

[20] Jabbour AJ et al.. Potential intracellular messengers involved in silica stimulation of alveolar macrophages. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (Hrsg.). Silica and silica- induced lung diseases. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc., 1996: 137-149.

[21] Schmidt JA et al.. Silica- stimulated monocytes release fibroblast proliferation factors identical to interleukin 1. J Clin Invest. 1984; *73:* 1462.

[22] Green FHY, Vallyathan V. Pathologic responses to inhaled silica. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (Hrsg.). Silica and silica- induced lung diseases. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc., 1996: 39-59.

[23] Kane AB. Particle- and fiber- induced lesions: an overview. In: Mohr U, Dungworth DL, Mauderly JL, Oberdörster G (Hrsg.). Toxic and carcinogenic effects of solid particles in

the respiratory tract. Washington, D.C.: ILSI Press, 1994: 3-16.

[24] Fogekmark B et al. Pulmonary macrophage phagocytosis and enzyme production after in vivo exposure to silica dust. Toxicol Appl Pharmacol. 1983; *68:* 152.

[25] Fischer GL, Wilson FD. The effects of coal fly ash and silica inhalation of macrophage function and progenitors. J Reticuloendoth Soc. 1980;

[26] Keane MJ, Wallace WE. Pulmonary surfactant adsorption and the expression of silica toxicity. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (Hrsg.). Silica and silica- induced lung diseases. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc., 1996: 271- 281.

[27] Wallace WE et al.. Contrasting respirable quartz and kaolin retention of lecithin surfactant and expression of membranolytic activity following phospholipase A2 digestion . J Toxicol Environ Health. 1992; *37:* 391.

[28] Schlipköter HW, Brockhaus A. Die Hemmung der experimentellen Silikose durch subkutane Verabreichung von PVPNO. Klin Wochenschr. 1961; *39:* 1182- 1189.

[29] Castranova V. Suppression of the cytotoxicity and fibrogenicity of silica with PVPNO. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (Hrsg.). Silica and silica- induced lung diseases. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc., 1996: 293-298.

[30] Nolan RP et al.. Quartz hemolysis as related to its surface functionalities. Environ Res. 1981; *210:* 259-261.

[31] Allison AC, Harrington JS, Birbeck M. An examination of the cytotoxic effects of silica on macrophages. J Exp Med. 1966; *124:* 141-154.

[32] Aufenanger J, Kattermann R. Lipid- und Lipoproteinstoffwechsel. In: Greiling H, Gressner AM (Hrsg.). Lehrbuch der Klinischen Chemie und Pathobiochemie. 3.Auflage, Stuttgart, New York: Schattauer, 1995: 300-360.

[33] Stryer L. Die Biosynthese von Membranlipiden und Steroidhormonen. In: Stryer L. Biochemie. 4.Auflage, Heidelberg, Berlin, Oxford: Spektrum, 1996: 719-825.

[34] Linnemann M, Kühl M. Transport von Lipiden: Lipoproteine. In: Linnemann M, Kühl M. Biochemie für Mediziner. 4. Auflage, Braunschweig, Wiesbaden: Vieweg, 1995: 338-343.

[35] Brown MS, Goldstein JL. Ein rezeptor- vermittelter Stoffwechselweg für die Cholesterin-

Homöostase (Nobel- Vortrag). Angew Chem. 1986; *7:* 579-658.

[36] Schaefer H-E. Ätiologie und Pathogenese arterieller Verschlußkrankheiten. In: Alexander K (Hrsg.). Gefäßkrankheiten. 1994: 25-46.

[37] Glomset JA. The plasma lecithins: cholesterol acyltransferase reaction. J Lipid Res. 1968; *9:* 155-167.

[38] Johnson WJ et al.. Cholesterol transport between cells and high-density lipoproteins. Biochem Biophys Acta. 1991; *1085:* 273-298.

[39] Rothblat GH et al.. Apolipoproteins, membrane cholesterol domains, and the regulation of cholesterol efflux. J Lipid Res. 1992; *33:* 1091-1097.

[40] Roosbeek S et al.. Three arginine residues in apolipoprotein A-I are critical for activation of lecithin:cholesterol acyltransferase. J Lipid Res. 2001; *42:* 31-40.

[41] Rothblat GH et al. Cell cholesterol efflux: integration of old and new observations provides new insights. J Lipid Res. 1999; *40:* 781-796.

[42] Oram JF, Yokoyama S. Apolipoprotein-mediated removal of cellular cholesterol and phospholipids. J Lipid Res. 1996; *37:* 2473-2491.

[43] Löffler G. Lipide. In: Löffler G (Hrsg.). Basiswissen Biochemie mit Pathobiochemie. 3. Auflage, Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1999: 149-217.

[44] Acton S et al.. Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. Science. 1996; *271:* 518-520.

[45] Calvo D, Vega MA. Identification, primary structure, and distribution of CLA-1, a novel member of the CD36/LIMPII gene family. J Biol Chem. 1993; *268:* 18929-18935.

[46] Mingpeng S, Zongli W. The protective role of high- density lipoproteins in artherosklerosis. Exp Gerontol. 1999; *34:* 539-548.

[47] Rigotti A, Krieger M. Getting a handle on “good” cholesterol with the high- density lipoprotein receptor. N Engl J Med. 1999; *341:* 2011-2013.

[48] Kannel BW et al.. Serum cholesterol, lipoproteins, and the risk of coronary heart disease. the framingham study. Ann Intern Med. 1971; *74:* 1-12.

[49] Gordon DJ, Rifkind BM. High density lipoprotein. The clinical implications of recent

studies. N Engl J Med. 1989; *321:* 1311-1316.

[50] Parthasarathy S, Barnett J, Fong LG. High- density lipoprotein inhibits the oxidative modification of low- density lipoprotein. Biochem Biophys Acta. 1990; *1044:* 275-283.

[51] Mertens A, Holvoet P. Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. Faseb J. 2001; *15:* 2073-2084.

[52] Quarck R et al.. Adenovirus- mediated gene transfer of human platelet- activating factor-acetylhydrolase prevents injury-induced neointima formation and reduces spontaneous atherosclerosis in apolipoprotein E- deficient mice. Circulation 2001; *103:* 2495-2500.

[53] Laplaud PM, Dantoine T, Chapman MJ. Paraoxonase as a risk marker for cardiovascular disease: facts and hypotheses. Clin Chem Lab Med 1998; *36(7):* 431-441.

[54] Navab M et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. J Lipid Res. 2000; *41:* 1481-1494.

[55] Navab M et al. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: steps 2 and 3. J Lipid Res. 2000; *41:* 1495-1508.

[56] Vohl MC et al. A novel lecithin- cholesterol acyltransferase antioxidant activity prevents the formation of oxidized lipids during lipoprotein oxidation. Biochemistry 1999; *38:* 5976-5981.

[57] Karpe F. Postprandial lipoprotein metabolism and artherosclerosis. J Intern Med. 1999; *246:* 341-355.

[58] Rüttner JR, Isler KM. Die Adsorption von Serumeiweißkörpern an Quarz und andere Mineralien. Schweiz med Wochenschr. 1956; *86:* 63-67.

[59] McFee DR, Tye R. Adsorption of proteins on dust related to pneumoconiosis: selectivity. J occup Med. 1965; *7:* 269-275.

[60] Noishiki Y. Application of immunoperoxidase method to microscopic observation of plasma protein on polymer surface. J Biomed Mater Res. 1982; *16:* 359-367.

[61] Breemhaar W et al.. Preferential adsorption of HDL from blood onto biomaterial surface. Biomaterials . 1984; *5:* 269-274.

[62] Pott F. Die krebserzeugende Wirkung anorganischer Fasern im Tierexperiment – Daten und Bewertung. Umwelthygiene. 1987/88; *20:* 97-133.

[63] Aalto M, Hepplesto AG. Fibrogenesis by mineral fibres: an in-vitro study of the roles of the macrophage and fibre length. Br J exp Path. 1984; *65:* 91-99.

[64] Chapman J. Comparative analysis of mammalian plasma lipoproteins. Methods Enzymol. 1986; *128:* 70-143.

[65] Alexander C, Day CE. Distribution of serum lipoproteins of selected vertebrates . Comp Biochem Physiol. 1973; *46b:* 295-312.

[66] Reichel G. Pneumokoniosen durch anorganische Stäube. In: Ferlinz R (Hrsg.). Pneumonologie in Praxis und Klinik. Stuttgart, New York: Georg Thieme, 1994: 581-608.

[67] Saffiotti U et al.. Carcinogenesis by cristalline silica: Animal, cellular and molecular studies. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (Hrsg.). Silica and silica- induced lung diseases. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc., 1996: 345- 381.

[68] Rüttner JR, Bovet P, Aufdermaur M. Graphit, Carborund, Staublunge. Deut Med Wochenschr. 1952; *77:* 1413-1415.

[69] Konitzko H et al.. Lungenfibrosen bei der Bearbeitung von Hartmetallen. Deut Med Wochenschr. 1980; *105:* 120-123.

[70] Rosmanith J et al.. The fibrogenic action of kaolinite, muscovite and feldspat. Silicosis Report/ North Rhine Westphalia. 1989; *17:* 305-322.

[71] Sheers G. Prevalence of pneumoconiosis in Cornish kaolin workers. Brit J. Industr Med. 1964; *21:* 218-225.

[72] Vallayathan V, Craighead JE. Pulmonary pathology in workers exposed to nonasbestiform talc. Human Pathol. 1984; *12:* 28-35.

[73] Davis WB, Crystal RG. Cronic interstitial lung disease. In: Simmons DH (Hrsg.). Current pulmonology. Band 5, Chicago: III, Year- Book Med. Publ., 1984: 347-473.

[74] Wagner JC et al.. Animal experiments with talc. In: Inhaled particles. Band 4. Oxford: Pergammon Press, 1975: 647-654.

[75] Pickrell JA et al.. Talc deposition and effects after 20 days of repeated inhalation exposure of rats and mice to talc. Environ Res. 1989; *49:* 233-245.

[76] Lundgren KD, Swensson A. Experimental investigations using the method of Miller and

Sayers on the effect upon animals of cemented tungstencarbides, and the powders used as raw material. Acta Med Scand. 1953; *145:* 20-27.

[77] Stalder K. Pathogenese und gewerbshygienische Aspekte der Silikose. Klin Wochenschr. 1968; *46:* 457-464.

[78] Driscoll KE. The role of interleucin- I and tumor necrosis factor α in the lung`s response to silica. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (Hrsg.). Silica and silica- induced lung diseases. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc., 1996: 163-184.

[79] Nolan RP, Langer AM, Weisman I et al.. Surface character and membranolytic activity of rutile and anatase: two titanium dioxide polymorphs. Brit J Industr Med. 1987; *44:* 687-698.

[80] Pott F, Friedrichs KH. Tumoren der Ratte nach i.p- Injektion faserförmiger Stäube. Naturwiss. 1972, *59:*318.

[81] Stacy BD et al.. Tissue changes in rats lungs caused by hydroxides, oxides and phosphates of aluminium and iron. J Pathol Bact . 1959; *7:* 417-428.

[82] Nagelschmidt G et al.. The recovery of quartz and other minerals from the lungs of rats. Arch Industr Health. 1957; *16:* 188-202.

[83] Brunauer S, Emmett PH, Teller E. Adsorption of gasaes in multimolecular layers. J Amer Chem Soc. 1938; *60:* 309.

[84] Sing KSW. Adsorption methods for surface area determination. In: Stanley- Wood NG, Lines RW (Hrsg.). Particle size analysis. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1992: 13-32.

[85] Bigelow WC, Pickett DL, Zisman WA. Oleophobic monolayers- films adsorbed from solution in non-polar liquids. J Colloid Sci. 1946; *1:* 513-583.

[86] Kuhn H. Energieübertragung in monomolekularen Schichten. Naturwiss. 1967; *15/16:* 429-436.

[87] Davis WW, Krahl ME, Clowes GHA. Interactions between polycyclic hydrocarbons and sterols in mixed surface films at the air- water surface. J Am Chem Soc. 1940; *62:* 3080-3098.

[88] Adam NK. The properties and molecular stucture of thin films of palmitic acid on water.

Proc Roy Soc. 1921; *99(A):* 336-351.

[89] Small DM. Lateral chain packing in lipids and membranes. J Lipid Res. 1984; *25:* 1490-1500.

[90] Zocher H, Stiebel F. Dunkelfeldmikroskopie dünnster Filme auf Flüssigkeitsoberflächen. Z phys Chem Abt A. 1930; *147:* 401- 435.

[91] Elshourbagy NA et al. The nucleotide and derived amino acid sequence of human apolipoprotein A-IV mRNA and the close linkage of its gene to the genes of apolipoproteins A-I and C-III. J Biol Chem. 1986; *261:* 1998-2002.

[92] Daniel L et al.. Binding of the cationic dye, Janus Green B, as a measure of the specific surface area of crystalline silica in aqueous suspension. Toxicol Appl Pharmacol. 1993; *123:* 62-67.

[93] Poot A et al.. Detection of surface- adsorbed (lipo)proteins by means of a two- step enzyme-immunoassay: A study on the Vroman effect. J Biomed Mater Res. 1990; *24:* 1021-1036.

[94] Woodworth CD, Mossman BT, Craighead JE. Comparative effects of fibrous and nonfibrous minerals on cells and liposomes. Environ Res. 1982; *27:* 190-205.

[95] Mahley RW et al.. Plasma lipoproteins: apolipoprotein structure and function. J Lipid Res. 1984; *25:* 1277-1294.

[96] Frank PG, Marcel YL. Apolipoprotein A-I: structure- function relationship. J Lipid Res. 2000; *41:* 853-872.

[97] Segrest JP et al.. The amphipathic helix in the exchangeable apolipoproteins: a review of secondary structure and function. J Lipid Res. 1992; *33:* 141-166.

[98] Klimov AN et al.. On the mechanism of cholesterol interaction with apolipoproteins A-I and E. Chem Phys Lipids. 1992; *62:* 229-237.

[99] Dickerson RE, Geis I. Struktur und Funktion der Proteine. Weinheim/Bergstraße: Chemie, 1971: 32.

[100] Strunz H. Mineralogische Tabellen. 4. Auflage, Leipzig: Geesr & Portig K.-G., 1966: 178,381,400.

[101] Assmann G. Lipidstoffwechsel und Arteriosklerose. Stuttgart, New York: Schattauer, 1982: 56.

[102] Rigotti A et al.. Scavenger receptor BI – a cell surface receptor for high density lipoprotein. Curr Opin Immunol. 1997; *8:* 181-188.

[103] La Ville AE et al.. In vitro oxidised HDL is recognised by the scavenger receptor of macrophages: implications for ist protective role in vivo. Atherosclerosis. 1994; *105:* 179-189.

[104] Brown GM, Donaldson K. Modulation of quartz toxicity by aluminium. In: Castranova V, Vallyathan V, Wallace WE (Hrsg.). Silica and silica- induced lung diseases. Boca Raton, New York, London, Tokyo: CRC Press, Inc., 1996: 299-304.

[105] King EJ et al.. The action of different forms of pure silica on the lungs of rats. Brit J industr Med. 1953; *10:* 9-17.

[106] Allison AC. Effects of silica, asbestos and other pollutants on macrophages. In: Brain JD, Proctor DF, Reid LM (Hrsg.). Air pollution and the lung. Jerusalem: Israel Universities Press, 1975: 114-132.

[107] Feng M et al.. Adsorption of high density lipoproteins (HDL) on solid surfaces. J Colloid Interface Sci. 1996; *177:* 364-371.

[108] Van Damme HS et al.. Protein adsorption from plasma onto poly(n-alkylmethacrylate) surfaces. J Biomater Sci Polym Edn. 1991; *3:* 69-84.

[109] Behling CA, Spector M. Quantitative characterization of cells at the interface of long- term implants of selected polymers. J. Biomed Mater Res. 1986; *20:* 653-666.

Danksagung

Herrn Professor Bodo Contag danke ich für die Überlassung des Themas sowie für die ausgiebige Unterstützung, die hilfreichen Anregungen und Ratschläge und die insgesamt sehr gute, intensive Betreuung.

In besonderem Maße danke ich Herrn Professor Hartmut Kühn für das Interesse an der Arbeit sowie die sehr freundliche, kompetente Betreuung als Doktorvater.

Frau Tania Schink danke ich sehr herzlich für die Beratung in statistischen Fragen.

Herrn Peter Dultz danke ich für die Einführung in die Technik der Infrarot- Spektrometrie.

Herrn Professor Friedrich Pott danke ich für das Interesse am Thema und die Überlassung spezieller Materialien.

Meiner Familie danke ich für die vielen schönen, kreativen Ablenkungen.

Lebenslauf

Name:	Bogatu, Bettina Ulrike
Geburtsdatum:	03. April 1974
Geburtsort:	Berlin, Deutschland
Familienstand:	verheiratet, drei Kinder (geb. 9/1999, 5/2001 und 2/2004)

Bildungsgang:

Hermann- Löns- Grundschule/ Berlin:	1980 - 1986
Carl- Friedrich von Siemens Gymnasium/ Berlin:	1986 - 1993
Abitur:	Juni 1993
Chemiestudium *(Freie Universität Berlin)*:	Oktober 1993 - September 1994

Medizinische Ausbildung:

Beginn des Medizinstudiums *(Humboldt-Universität zu Berlin/ Charité)*:	Oktober 1994

Prüfungen:

Physikum- Ärztliche Vorprüfung:	September 1996
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung:	August 1997
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung :	August 1999
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung :	Mai 2003

Praktisches Jahr:

Pädiatrie *(Universitätsklinikum Rudolph Virchow- Berlin)*:	23.10.2000 - 09.02.2001
Innere Medizin *(Gemeinschaftskrankenhaus Havelhöhe- Berlin)*:	10.06.2002 - 27.09.2002
Chirurgie *(Spital Zollikerberg- Kanton Zürich- Schweiz)*:	01.10.2002 - 20.01.2003

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin, Oktober 2003