

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde des
Universitätsklinikums Halle (Saale)
(Direktor: Prof. Dr. med. habil. Stefan Plontke)

**Analyse der DNA Stabilität bei Miniorgankulturen unter dem Einfluss von
Refluxbestandteilen**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Juliane Illert

geboren am 28.02.1984 in Guben

Betreuerin: PD Dr. med. Kerstin Hoffmann

Gutachter/Gutachterin: PD Dr. med. Kerstin Hoffmann
Prof. Dr. med. Ulrich Harréus
Prof. Dr. med. dent. Heidi Foth

16.02.2016

01.12.2016

Referat

Einleitung

Epidemiologische Studien weisen darauf hin, dass laryngopharyngealer Reflux als Risikofaktor für die Entstehung von Larynx- bzw. Hypopharynxkarzinomen wirken kann. Hierbei scheinen sowohl saure als auch biliäre Refluxatbestandteile eine Rolle zu spielen. In unterschiedlichen in vitro Modellen wurde der Einfluss einzelner Magensaftbestandteile auf die DNA Stabilität ausgewachsener Epithelzellen (EpC) und Miniorgankulturen (MOC) untersucht.

Material und Methoden

Epithelzell- und Miniorgankulturen aus Nasenmuschelepithelien wurden mit nativem und künstlichem Magensaft bei pH 3,0; 4,5; 5,5; 6,5 sowie unter Zusatz von Pepsin und Gallensalzen in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Anschließend erfolgte die Quantifizierung der DNA-Schädigung in Form von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und inkompletter Exzisionsreparatur mithilfe des Comet Assay.

Ergebnisse

Sowohl nativer als auch artifizieller Magensaft verursachen DNA-Strangbrüche. Mit sinkendem pH – Wert wurden steigende OTM-Werte gefunden. Die stärkste DNA- Fragmentierung war nach Inkubation mit nativem Magensaft messbar. Die Analyse nach MOC- Inkubation mit einzelnen Refluxatbestandteilen zeigte für Glycochenodeoxycholat (GCDA) das größte Schädigungspotential, gefolgt von Pepsin. Durch Hitzeinaktivierung des Enzyms, waren die Werte mit der pH-Kontrolle nahezu identisch. Ein signifikanter Einfluss der Veränderung der Pepsinkonzentration war nicht nachweisbar. MOCs und EpC zeigten das gleiche Schädigungsmuster. Spenderspezifische Vorbedingungen wie Alter und Geschlecht beeinflussten die Höhe der OTM signifikant.

Diskussion und Schlussfolgerungen

Im in- vitro- Modell konnte mithilfe des Comet Assays der DNA- schädigende Einfluss von Magensaft und seinen Bestandteilen unter aziden Bedingungen auf die DNA-Stabilität nachgewiesen werden. Das komplexe Primärkultur-in- vitro- System ist der in- vivo- Situation sehr nah. In weiterführenden Studien sollten die der DNA- Schädigung zugrunde liegenden Mechanismen auf der Zellkulturebene analysiert werden.

Illert, Juliane: Analyse der DNA Stabilität bei Miniorgankulturen unter dem Einfluss von Refluxbestandteilen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 68 Seiten, 2016

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AECG	Airway epithelial cell growth medium
Akt.	Aktivität
BATP	Artifizieller Magensaft
BCL	B- Zell- Lymphom- Protein
BSA	Bovine serum albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCL	C-C Chemokin- Ligand
CCR	C-C Chemokin- Rezeptor
Cl	Chlorid
CI	Konfidenzintervall
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
CXCL	C-X-C Chemokin- Ligand
d	Tag
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EpC	Epithelzelle
et al.	und andere
FCS	Fötale Kälberserum
GCDA	Glycochenodeoxycholate
GBSS	Gey's balanced salt solution
GDR	Gastroduodenaler Reflux
GER	Gastroesophageal Reflux (Gastroösophagealer Reflux)
GERD	Gastroesophageal Reflux Disease (Gastroösophageale Refluxkrankheit)
GIT	Gastrointestinaltrakt
glg.	gelegentlich
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
hGj	humaner Magensaft

HNO	Hals- Nasen- Ohren- Heilkunde
ID	Identifikator
IL	Interleukin
LMP	Low melting point (niedriger Schmelzpunkt)
LPR	Laryngopharyngealer Reflux
m	männlich
mg	Milligramm
min	Minute
MD	Mean Deviation (mittlere absolute Abweichung)
ml	Milliliter
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
mA	Milliampere
mm	Millimeter
mmol	Millimol
MOC	Miniorgankultur
mosm	Milliosmol
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid (Kochsalz)
Na ₂ EDTA	Dinatrium- EDTA
NaOH	Natriumhydroxid
neg.	negativ
neg. K.	Negativprobe
N	Normal
NF-κB	Nuklear Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' von aktivierten B- Zellen
nm	Nanometer
NMP	Normal melting point (normaler Schmelzpunkt)
OADT	Oberer Aerodigestivtrakt
OÖS	Oberer Ösophagussphinkter
OP	Operation
OSAS	Obstruktives Schlafapnoe Syndrom
OT	Objektträger
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Phosphate buffered saline
PenStrep	Penicillin- Streptomycin- Lösung
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration

Pos. K.	Positivprobe
PPI	Protonenpumpeninhibitor
prot	Protein
proteolyt.	Proteolytisch
RKI	Robert- Koch- Institut
rpm	Revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
s	Standardabweichung
SPSS	Statistical package for social sciences
Tab.	Tabelle
TAE	Tris- Acetat- EDTA
TGF	Transformierender Wachsumsfaktor
Tris	Tris (hydroxymethyl)- aminomethan
UÖS	Unterer Ösophagussphinkter
UV	Ultraviolett
U	Units
V	Volt
vs.	versus
w	weiblich
Wo.	Woche
z. B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Risikofaktoren.....	1
1.2 Reflux.....	2
1.3 Magensaft.....	3
1.4 Duodenalsaft	4
1.4.1 Gallensäuren	4
1.4.2 Trypsin	5
1.5 DNA- Schäden	5
1.6 Comet Assay	6
1.7 Miniorgankulturen	6
2 Zielstellung	8
3 Material und Methoden.....	9
3.1 Reagenzien.....	9
3.2 Geräte.....	10
3.3 Kulturmedium und Gelelektrophorese.....	11
3.4 Patientengut	12
3.5 Miniorgankulturen	15
3.5.1 Materialgewinnung	15
3.5.2 Präparation	16
3.5.3 Kultivierung	16
3.5.4 Schädigung.....	17
3.6 Einzelzellgewinnung.....	21
3.7 Vitalitätstest	21
3.8 Epitheliale Zellen	22
3.8.1 Kultivierung	22
3.8.2 Schädigung epithelialer Zellen	22
3.9 Einzelzell- Gelelektrophorese	23
3.9.1 Beschichtung der Objektträger	23
3.9.2 Lyse der Zell- und Kernmembran.....	23
3.9.3 Elektrophorese	24
3.10 Ergebnis- Analyse.....	24
3.10.1 Quantifizierung der Ergebnisse	24
3.10.2 Statistik	26
4 Ergebnisse.....	28
4.1 Miniorgane.....	28

4.1.1	Artifizieller und humaner Magensaft.....	29
4.1.2	Salzsäure	33
4.1.3	Pepsin.....	34
4.1.4	Pepsinkonzentration.....	36
4.1.5	Gallensäuren	37
4.1.6	Trypsin	40
4.2	Epithelzellen	40
4.3	Spenderspezifische Einflüsse.....	42
4.3.1	Geschlecht.....	42
4.3.2	Alter	43
4.3.3	Allergien	44
4.3.4	Alkohol	45
4.3.5	Nikotin	46
5	Diskussion.....	47
5.1	Gastroösophagealer Reflux.....	47
5.2	Miniorgankulturen	48
5.3	Comet Assay	49
5.4	Magensaft.....	49
5.4.1	Pepsin.....	50
5.5	Duodenales Sekret	51
5.5.1	Trypsin	51
5.5.2	Gallensalze.....	52
5.6	Auswertung anamnestischer Merkmale.....	53
6	Zusammenfassung	55
7	Literatur	56
8	Anlagen.....	62
8.1	OTM- Mittelwert	62
8.2	Konfidenzintervalle der Messwerte	64
9	Thesen.....	68
	Selbstständigkeitserklärung	
	Danksagung	

1 Einleitung

Krebserkrankungen gelten, nach Angaben des statistischen Bundesamtes (Statistisches Bundesamt, 2014), nach den Herz- Kreislaferkrankungen als die zweithäufigste Todesursache in Deutschland. Absolute, flächendeckende Häufigkeitsangaben stehen leider nicht zur Verfügung, da die Krebsregister noch immer größtenteils landesspezifisch geführt werden.

Kopf-Hals-Tumore, beschreiben als Überbegriff eine Vielzahl von verschiedenen Tumoren, insbesondere aber maligne Erkrankungen der Mundhöhle, des Larynx und des Pharynx. Malignome im oberen Aerodigestivtrakt machen ca. 5% aller Tumorerkrankungen aus und sind durch eine ca. 4:1 Prädisposition des männlichen Geschlechtes gekennzeichnet. Die Inzidenz in Deutschland beträgt ca. 7/100.000. Sowohl die Inzidenz als auch die Mortalität haben sich in den letzten Jahrzehnten vervielfacht (RKI, 2012). Bezüglich der Heilungsraten hat man seit 30 Jahren nur geringe Fortschritte erreicht (Forastiere et al., 2001). Verbesserungen in der Therapie und vor allem in der rechtzeitigen Erkennung liegen deshalb verstärkt im Interesse der Krebsforschung.

1.1 Risikofaktoren

Derzeitig gelten als verantwortliche Hauptfaktoren für das Auftreten von Plattenepithelzell-Karzinomen im Kopf- Halsbereich Tabakrauchen, Alkoholmissbrauch, genetische Prädispositionen, Ernährungsdefizite, berufliche Faktoren und die Exposition mit viralen und toxischen Agenzien (Sassen et al., 2005; Seitz et al.; 2007, Maier, 1999). In der Arbeit von Harréus et al. „Zur Untersuchung von genotoxischen Effekten von Umwelt- und Arbeitsstoffen an humanen Schleimhautzellen“ wurde beschrieben, dass Vertreter der Stoffgruppen Metalle und polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe erhebliche genotoxische Schäden verursachten. Weiterhin war auffällig, dass Nasenschleimhautzellen von weiblichen Spendern empfindlicher auf Schadstoffeinwirkungen reagierten. An der Schleimhaut von Probanden mit chronischem Alkoholkonsum (>40g/ Tag) ließ sich ebenfalls ein höherer genotoxischer Effekt nach Schadstoffexposition nachweisen (Harréus et al., 1999).

In den letzten Jahren wurde vermehrt ein Augenmerk auf gastroösophagealen Reflux als unabhängigen kanzerogenen Faktor und Co- Kanzerogen in Verbindung mit Alkohol- und Nikotin- Konsum gerichtet. Nikotin vermindert den mittleren Druck des unteren ösophagealen

Sphinkters (UÖS), die Magenfüllung ist reduziert und die basale Magensäureproduktion wird stimuliert. Zusätzlich wirkt Alkohol auch auf den Tonus des UÖS, so dass die Magenentleerung verlangsamt und die ösophageale Motilität reduziert wird (Vitale, 1987).

Da den malignen Neubildungen meist eine multifaktorielle Ätiologie zugrunde liegt, konnten einzelne ursächliche Faktoren bisher nicht identifiziert werden.

Die Invasivität und das Metastasierungsverhalten stellen bei der Behandlung von Tumoren die größten Probleme dar. Zum Zeitpunkt der Diagnosestellung liegen bei vielen Patienten bereits lymphogene Metastasen und zum Teil auch schon Fernmetastasen vor oder die entsprechenden Organe sind derart infiltriert, so dass eine chirurgische Therapie nicht adäquat durchgeführt werden kann (Zimmermann et al., 2003).

Eine Früherkennung bösartiger Neubildungen könnte die Diagnostik in einem niedrigeren Stadium ermöglichen und die Prognose deutlich verbessern.

Die Detektion, Evaluierung und Prävention bestehender Risikofaktoren könnten wiederum eine Tumorentstehung sogar vermeiden.

1.2 Reflux

Unter Gastroösophagealem Reflux (GER) versteht man den Rückfluss von Magensaftbestandteilen in die Speiseröhre. Dieser kann zu ösophagealen und extraösophagealen Symptomen führen. Er ist ein multifaktorielles Geschehen, wobei ursächlich vor allem eine Störung der Motilität mit einer herabgesetzten Funktion des unteren ösophagealen Sphinkters ist (Sifrim et al., 2001).

Koufman beschreibt einen Rückfluss bis in den Larynx und Pharynx, welcher dann als laryngo-pharyngealer Reflux (LPR) bezeichnet wird. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass dieser vor allem tagsüber in aufrechter Position auftritt (Postma et al., 2001). Dabei wird zusätzlich eine Schwäche des oberen ösophagealen Sphinkters angenommen. LPR wird als Ursache für bis zu 60% aller Kehlkopf- und Stimmprobleme bei HNO- Patienten verantwortlich gemacht (Koufman, 1991). Im Bereich der Atemwege fehlen im Gegensatz zum Ösophagus Schutzmechanismen gegenüber Magensaft und dessen Bestandteilen. Es wird beschrieben, dass bereits einzelne Refluxepisoden Schäden im respiratorischen Epithel verursachen können (Pearson et al., 2011).

Die klassischen Symptome der gastroösophagealen Refluxerkrankung (GERD) zeigen sich in Sodbrennen, Regurgitation und saurem Aufstoßen, welche insbesondere nachts, in liegender

Position auftreten. Seltener findet man epigastrischen Schmerz oder Brustschmerz, sowie Dysphagie. Doch nicht immer ist GERD symptomatisch und kann nicht selten als okkulter Reflux auftreten. Marshall et al. zeigten in Untersuchungen, dass insbesondere saurer Reflux im Gegensatz zu biliärem Reflux subjektive Beschwerden verursacht (Marshall et al., 1997). Extraösophageale Refluxsyndrome involvieren verschiedene Bereiche, wie zum Beispiel die Lunge (Bronchiolitis, chronischer Husten, Asthma), otolaryngeale Symptome (Otitis media, Laryngitis, Adenoide, Karzinome), sowie orale und dentale Erosionen. Im oberen Aerodigestivtrakt sind die typischen Symptome ein trockener oder rauher Hals, Globusgefühl, Heiserkeit, Reizhusten, Dysphagie und Zungenbrennen. Bei der HNO-ärztlichen Spiegeluntersuchung finden sich primär jedoch selten pathologische Korrelate. Meist zeigen sich nur geringfügige Veränderungen wie Erythem und Ödem im Bereich des Larynx (Issing et al., 2001).

Die Standardtherapie bei refluxassoziierten Beschwerden im HNO- Bereich beinhaltet diätische Maßnahmen, Alkohol- und Nikotinkarenz, Veränderung der Schlafposition und die medikamentöse Therapie mit Protonenpumpeninhibitoren (PPI). Dabei zeigt sich jedoch nur ein therapeutisches Ansprechen von 60-90% auf PPI, was darauf schließen lässt, dass nicht nur saurer Reflux für oben genannte Symptome verantwortlich ist (Saber et al. 2012).

Viele Studien untersuchen die Auswirkungen von extraösophagealem Magensaft, die genauen Tragweiten von GER im Bereich der oberen Atemwege sind hingegen noch nicht ausreichend beschrieben.

1.3 Magensaft

Die Zusammensetzung des Magensafts variiert je nach Phase der Verdauung. Im Nüchternzustand erfolgt die kontinuierliche Sekretion von Bikarbonat und Muzinen. Bei Nahrungsaufnahme kommt es im Magen zur Sekretion von Salzsäure (HCl), Pepsinogenen und Intrinsic Factor.

Pepsinogen (MG 42500) ist eine Proteasenvorstufe welche in den Hauptzellen der Magenmukosa gebildet und nach Sekretion durch Magensalzsäure zu proteolytisch wirksamen Enzymen durch Abspaltung eines 40kDa großen Peptids vom N- Terminus aktiviert wird. Das pH- Optimum von Pepsin (MG 34500) liegt bei 1,0 bis 4,0, wobei die maximale Enzymaktivität bei pH 1,5 erreicht wird (Worthington Enzyme Manual). Bei pH 6,5 ist Pepsin inaktiv, jedoch bis pH 7 stabil für mindestens 24h. Fällt der pH- Wert auf 2 ab kann das Enzym reaktiviert werden. Dabei bleiben bis zu 79% der ursprünglichen Aktivität erhalten (Crapko et al., 2007).

Die durchschnittliche basale Pepsinsekretion beträgt bei Männern 19kU/24h, bei Frauen 29kU/24h (Dennebaum, 2008a).

1.4 Duodenalsaft

Auch die Zusammensetzung des Duodenalsaftes variiert stark in Abhängigkeit von der Verdauungsphase. Neben einer Reihe von Elektrolyten und Proteinen, finden sich Pankreasenzyme und Gallensalze im duodenalen Sekret. Der mediane pH- Wert liegt bei pH 7,2 (5,3 – 8,1), wobei die alkalischen Eigenschaften des Hydrogencarbonats im Pankreassaft zur Neutralisierung des Mageninhalts beitragen (Dennebaum, 2008b).

Treten duodenale Bestandteile (Gallensaft, Pankreasenzyme) in den Magen oder in manchen Fällen in den Ösophagus spricht man von gastroduodenalem Reflux (GDR). Dabei sind Einzelepisoden physiologisch. Ein kontinuierlicher Kontakt der Magen- oder Ösophaguskosa mit Duodenalsaft kann ulzerogen und möglicherweise sogar kanzerogen wirken (Freedman et al., 2001). Ätiopathologisch kann primärer GDR von sekundärem unterschieden werden. Primärer GDR wird verursacht durch nicht- koordinierten Pylorusschluss und eine duodenale Kontraktion aufgrund einer erhöhten Sphinktermotilität (idiopathisch oder sekundär nach Cholezystektomie, Cholezystolithiasis, Helicobacter- pylori- Infektion). Sekundärer GDR tritt bei dauerhaft beeinträchtigter Funktion des Pylorus auf, wie zum Beispiel nach Magenresektion oder Pyloroplastik (Madura, 2003).

1.4.1 Gallensäuren

Gallensalze werden in der Leber aus Cholesterol synthetisiert und konjugiert. Nur ein Bruchteil aller Gallensäuren tritt unkonjugiert im Gallensaft auf. Die durchschnittliche Konzentration der Blasengalle beträgt 172 ± 14 mmol/l. Davon sind $80 \pm 9\%$ Glycin- und $19 \pm 10\%$ Taurinkonjugate (Dennebaum, 2008c).

Die Zusammensetzung der Gallensäuren ist zum einen abhängig von der Nahrungsaufnahme, zum anderen verändert sie sich bei bestimmten Vorerkrankungen. So berichtete Sjövall beim Gesunden über einen durchschnittlichen Anteil von 41% Cholate, 37% Chenodeoxycholate und 22% Deoxycholate, welche hauptsächlich in konjugierter Form mit Taurin oder Glycin vorlagen. Bei langandauerndem obstruktiven Ikterus, akuter Hepatitis oder Leberzirrhose war wenig bis gar keine Deoxycholsäure messbar (Sjövall, 1960).

Deoxycholsäure und Chenodeoxycholsäure gehören zu den Hauptkomponenten von Gallensäuren bei Patienten nach totaler oder subtotaler Gastrektomie mit endoskopisch

gesicherter Ösophagitis. Dabei lag der durchschnittliche Anteil von Cholaten bei 29%, Chenodeoxycholaten 37,1% und Deoxycholaten 33,5% (Matikainen et al., 1982).

Der pH- Wert der Gallenflüssigkeit liegt zwischen 6,9 und 7,7 und ist damit neutral bis alkalisch.

Als Nachweis gallensäurehaltigen Magensaftes hat sich Bilirubin als Marker etabliert.

Bilirubin hat ein charakteristisches Absorptionsspektrum bei 453nm und lässt sich mittels Bilitec 2000, einer fiberoptischen Spectrophotometrie, kontinuierlich im Refluxat messen (Baldini et al., 2000).

1.4.2 Trypsin

Als Endopeptidase wird Trypsin (MG 23800) in den exokrinen Azinuszellen des Pankreas aus der inaktiven Enzymvorstufe, dem Trypsinogen (MG 24000), synthetisiert. Sein pH- Optimum liegt bei pH 7-8. Es hydrolysiert Peptide substratspezifisch nach Arginin- und Lysinresten. Das aktivierte Trypsin wirkt autokatalytisch und aktiviert auch andere Proteasen, wie zum Beispiel Chymotrypsinogen, Proelastase und Carboxypeptidase A und B (Kalbitzer, 2014).

1.5 DNA- Schäden

Die DNA kann durch zelleigene oder zellfremde Prozesse geschädigt werden. Hauptverantwortliche Faktoren sind dabei die nicht- enzymatische Hydrolyse, reaktive Sauerstoffverbindungen, alkylierende oder quervernetzende Agenzien, sowie kurzweilige elektromagnetische Strahlung. Die dabei erzeugten Schäden lassen sich unterteilen in räumliche DNA- Modifizierungen, mit oder ohne Störungen der Doppelhelixstruktur, und DNA- Strangbrüche (Schwarz und Bock, 1998).

Es gibt eine Vielzahl komplexer Reparaturmechanismen für alle Arten von DNA- Schäden. Basenmodifizierungen und -verluste werden durch Basenexzisionsreparatur repariert (Seeberg et al., 1995). Dabei werden nach Entfernung fehlerhafter Basen diese durch ein neues Nukleotid ersetzt. Größere DNA- Schädigungen werden vor allem durch die Nukleotidexzisionsreparatur entfernt (Nospikel et al., 2002). Einzelstrangbrüche werden durch „Single strand break repair“ geschlossen (Whitehouse et al., 2001).

Kommt es zu einer partiellen oder vollständigen Fehlfunktion dieser Reparaturmechanismen, kann dies zu Veränderungen im Genom und zu Translokationen führen, welche Onkogene aktivieren und damit die Krebsentstehung begünstigen können (Agarwal et al., 2006).

1.6 Comet Assay

Der Comet Assay, auch Einzelzellgelelektrophorese genannt, ist eine Form der Gelelektrophorese zum Nachweis von DNA- Schädigungen in einzelnen Zellen verschiedener Spezies. Benannt ist er nach der Form der geschädigten Zellen, welche nach Durchwanderung im elektrischen Feld, UV- lichtmikroskopisch, mit einem Schweif aus DNA- Fragmenten, das Aussehen eines Kometen haben.

Rydberg und Johanson entwickelten 1978 als erste eine Methode zur Quantifikation von DNA- Schäden in Einzelzellen (Rydberg und Johanson, 1978).

Sie lysierten unter alkalischen Bedingungen in Agarose eingebettete Zellen und ermöglichten damit das partielle Entwinden der DNA- Einzelstränge. Nach Anfärben wurden die fluoreszierenden Zellen gezählt. Um die Sensitivität der Messung von DNA- Schäden zu verbessern, entwickelte das gleiche Labor 6 Jahre später eine Mikrogel- Elektrophorese- Technik unter neutralen Bedingungen (Ostling et al. 1984).

Die im elektrischen Feld migrierte DNA wird im Anschluss mit Ethidiumbromid eingefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop wird die Intensität der Fluoreszenz gemessen. Damit können ausschließlich Doppelstrangbrüche detektiert werden.

Die am besten geeignete Version des Comet Assay zur Identifikation von genotoxischen Substanzen ist der Alkaline Comet Assay (pH >13), welcher 1988 von Singh et al. entwickelt wurde (Singh et al., 1988). Mittels dieser Methode können DNA- Einzelstrangbrüche, alkali- labile Stellen, DNA-DNA-/ DNA-Protein- Vernetzung und inkomplette Exzisionsreparaturstellen detektiert werden.

Andere Techniken zur Detektion von DNA- Schäden sind die „unscheduled DNA synthesis“ oder der „Alkaline Elution Assay“.

1.7 Miniorgankulturen

Bei den Miniorgankulturen handelt es sich um einzelne Gewebefragmente welche in Nährmedium kultiviert und mit Noxen geschädigt werden können. Sie sind bei vielen Gewebearten anwendbar (Bauer und Herzog, 1988) und wurden erstmals durch Steinsvåg et al. für respiratorische Mukosa beschrieben (Steinsvåg et al., 1991). Im Gegensatz zu Einzelzellen stellen sie ein geeigneteres Modellsystem dar, um Zellen in Ihrem Zellverband zu untersuchen, da man davon ausgeht, dass isolierte Zellen Veränderungen in der metabolischen Kompetenz, in den Reparaturfähigkeiten und möglicherweise auch in der Empfindlichkeit der DNA aufweisen (Teissier et al., 1998).

Das initial von Kleinsasser und Ihbe verwendete Modell zur Testung der Genotoxizität von Umweltstoffen anhand von Miniorgankulturen (Ihbe, 2004) wurde durch vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe etabliert und zur Frage der DNA- Stabilität humaner respiratorischer Mukosa bei unterschiedlichen pH- Bedingungen weiterentwickelt (Oertel, 2008).

2 Zielstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in einem in- vitro- Modell genotoxische Effekte von Magensaft und dessen Bestandteilen bei unterschiedlichen pH- Bedingungen zu untersuchen. Als in- vitro- Modell dienten Minorgankulturen von Nasenmuschelepithelien. Das genotoxische Potential des Refluxats und einzelner Komponenten wurde durch Analyse der DNA- Integrität mittels Comet Assay bestimmt.

Neben Magensaft bzw. artifiziellm Magensaft wurden in der vorliegenden Studie Salzsäure, Pepsin und Gallensalze als wichtigste Bestandteile des Magensafts ausgewählt, um deren Einfluss unter verschiedenen pH- Konditionen auf die Stabilität der DNA zu untersuchen.

Darüber hinaus wurden anamnestiche Daten zur Frage einer möglichen Vorschädigung und einem Einfluss auf das Schädigungsausmaß ausgewertet.

Es galt zu ermitteln inwiefern laryngopharyngealer Reflux im Allgemeinen und einzelne Komponenten im Speziellen die Entwicklung eines Malignoms im oberen Aerodigestivtrakt begünstigen oder gar verursachen können.

3 Material und Methoden

3.1 Reagenzien

Tabelle 1: Reagenzien

Artikel	Firma	Sitz
AECG- Medium	Promo Cell	Heidelberg
Agarose LMA	Peq lab	Erlangen
Agarose NMA	Biozym	Erlangen
Antibiotikum PenStrep	Biochrom AG	Berlin
Collagenase	Gibco/Invitrogen	Karlsruhe
DMEM	Gibco/Invitrogen	Karlsruhe
DMSO	Merck	Darmstadt
EDTA	Roth	Karlsruhe
Ethidiumbromid	Roth	Karlsruhe
Ethanol	Sigma	Steinheim
Formaldehyd 4%	Fischar	Saarbrücken
Fötales Kälberserum	Biochrom AG	Berlin
GBSS	Sigma	Steinheim
GCD A	Sigma	Steinheim
Gallensäure- Mix	Sigma	Steinheim
H ₂ O ₂	Universitätsapotheke	Halle
Hämatoxylin- Eosin	Roth	Karlsruhe
Hyaluronidase	Serva	Heidelberg
N- Laurylsarcosinat	Sigma	Steinheim
2- Mercaptoethanol	Ferak Berlin GmbH	Berlin
Natriumchlorid	Applichen	Darmstadt
Natronlauge	Roth	Karlsruhe
PBS	Gibco/ Invitrogen	Karlsruhe
Pepsin (2000U/ml)	Sigma	Steinheim
Pronase	Sigma	Steinheim
Salzsäure	Merck	Darmstadt
Supplement	Promo Cell	Heidelberg
Tris	HB Labor- und Feinchemikalien	Apolda
Triton	Merck	Darmstadt
Trypanblau	Sigma	Steinheim
Trypsin	Sigma	Steinheim

3.2 Geräte

Tabelle 2: Geräte und Software

Artikel	Firma	Sitz
Brutschrank function line	Heraeus	Hanau
Comet 5.5	Kinetic Imaging [®]	Liverpool, Großbritannien
Deckgläschen	Marienfeld	Lauda- Königshafen
Elektrophoresekammer	BioRad	Hercules, Californien, USA
Excel 2010	Microsoft Corporation	Redmond, USA
Feinwaage, MC1 Analytic, AC 210S	Sartorius AG	Göttingen
Fotosoftware Nis Elements 2.10	Novell	Waltham, Massachusetts, USA
Heizplatte mit Rührer, PMC	Neo lab	Heidelberg
Kulturplatten	Nunc/ Nalge Nunc Int.	Roskilde, Dänemark
Mikroskop- Filter	Carl Zeiss	Jena
Mikrotom jung biocut	Leica jung	Nußloch
Mikroskop Axiovert 135	Carl Zeiss	Jena
Mikroskop Axioskop	Carl Zeiss	Jena
Mikroskop (Licht)	Carl Zeiss	Jena
Mikroskop Eclipse E 400	Nikon	Japan
Mikroskop (OP) S88	Carl Zeiss	Jena
Multi Safe Seal Tubes	Peq lab	Erlangen
Objektträger	Marienfeld	Lauda- Königshafen
pH- Meter, Multi Cal [®]	WTW	Weilheim
Pipetten	Eppendorf	Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg
PP- Röhrchen	Greiner	Kremsmünster
Schüttler Promax 1020	Heidolph Instruments	Schwabach
Skalpell (Cutfix Fig.20)	Aesculap	Tuttlingen
Sterilbank Herasafe	Heraeus	Hanau
SPSS Statistics 17.0	SPSS	Stanford, USA
Wärmeplatte	Medax	Kiel
Wasserbad	BINZ	Ilmenau
Zählkammer	Fuchs- Rosenthal	Bad Blankenburg
Zentrifuge	Heraeus	Hanau

3.3 Kulturmedium und Gelelektrophorese

Tabelle 3: Zusammensetzung der verwendeten Lösungen

Zellkultur			
Agarlösung in DMEM (Plattenbeschichtung)	0,75 50	g ml	Spezial- Agar, Noble DMEM
Nährmedium	2,48 1 100	ml ml ml	Supplement PenStrep AECG- Medium
Enzymatischer Verdau			
Enzymmix	300 300 600 6	mg mg mg ml	Kollagenase Hyaluronidase Pronase AECG- Medium
Beschichtung der Objektträger			
1% NMP- Agarose (Vorbeschichtung)	1 100	g ml	NMP- Agarosepulver Aqua destillata
0,6% NMP- Agarose (1. Schicht)	36 6	mg ml	NMP- Agarosepulver PBS
0,5% LMP- Agarose (2. und 3. Schicht)	50 10	mg ml	LMP- Agarosepulver PBS
Einzelzellgelelektrophorese			
Lysestammlösung (pH 10)	146,4 1,2 37,2 10 ad 1	g g g g l	NaCl (2,5M) Tris (Trishydroxy- methylaminomethan) Na ₂ EDTA N- Lauryl-sarcosinat 1% Aqua bidestillata
Lysepuffer	1 10 89	ml ml ml	Triton DMSO Lysestammlösung
Elektrophoresepuffer (4°C)	100 5 ad 1	ml ml l	NaOH- Lösung (3M) Na ₂ EDTA Aqua destillata
Neutralisationspuffer (pH 7,4)	48,5 ad 1	g l	Tris (0,4M) Aqua bidestillata
Ethidiumbromid (Färbelösung)	2 ad 1	µl ml	Ethidiumbromid Aqua destillata

3.4 Patientengut

Bei Aufnahme eines jeden Patienten wurde präoperativ ein Anamnesebogen erstellt. Diese wurden retrospektiv ausgewertet und es stellte sich die Frage inwieweit bestimmte Risikofaktoren einen Einfluss auf das Entwickeln von Doppelstrangbrüchen nach Noxeneinwirkung haben können. Die Patienten wurden unter anderem zu Allergien, Vorerkrankungen, Beruf, Größe und Gewicht befragt. In der Auswertung der Daten wurde gesteigerter Wert auf vorbestehenden Alkohol- und Nikotingenuss, Alter und Geschlecht gelegt. Die statistische Analyse erfolgte auch hier mittels einer Mixed- Model- Kalkulation unter Berücksichtigung doppelter Messungen bei den Patienten.

Das Patientenkollektiv teilte sich in 68,1 % Männer und 31,9 % Frauen. Das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Diagnosestellung betrug 41,43 Jahre, der jüngste Patient war 16 und der älteste 73 Jahre alt (Tab. 4).

Tabelle 4: Retrospektiv erhobene anamnestische Patientendaten
 ("-" bedeutet Merkmal nicht vorhanden, „glg.“ = gelegentlich)

ID	Alter	Ge- schlecht	Nikotin	Alkohol	Allergien	Vorerkrankungen	Beruf	BMI (kg/ m ²)
1	24	W	-	-	-	-	Köchin	22
2	51	M	-	1 Bier/d	-	Hypertonie, Gicht, Benigne Prostatahyperplasie	Lager- arbeiter	41
3	24	M	10/d	1 Bier/d	-	-	Schwei- ßer	22
4	20	M	20/d	2 Bier/d	-	-	Student	19
5	38	M	-	glg.	Pollen	Hypertonie	Raffi- nerie	27
6	45	W	-	-	Pflaster, Codein	Migräne, Skoliose, Arthritis	Lehrer	19
7	23	W	glg.	glg.	-	-	Student	20
8	22	W	-	glg.	-	-	Büro	22
9	42	W	glg.	glg.	Pflaster, Tomate, Laktose, Erdbeeren	M. Crohn, Reflux, Akute Pankreatitis	-	30
10	67	W	-	glg.	Penicillin	Hypertonie, Carotisplaques, Reflux	Rentner	25
11	17	M	-	glg.	-	-	-	19
12	46	W	20- 25/d	-	-	Varizen, Cholezystektomie	Kranken- pflege	26
13	71	W	-	-	-	Adipositas, Osteoporose	Rentner	34
14	49	M	-	1-2 Bier/d	-	Hernie	Elektro- techniker	29
15	45	M	glg.	glg.	-	-	Moderator	24
16	40	M	-	glg.	-	-	Gärtner	23
17	61	M	-	-	-	Prostata- Karzinom	-	30
	51	M	-	2 Bier/d	-	Hypertonie, Herzrhythmusstö- rungen, Hyperlipidämie	-	32
19	38	W	20/d	-	-	Diabetes mellitus, Hypothyreose, Reflux	-	21
20	67	M	10/d	-	-	Hypothyreose, Reflux, Tinnitus	-	21
21	57	M	-	glg.	Milben	Diabetes mellitus, Hypertonie	Elektro- monteur	27
22	49	M	-	glg.	Penicillin, Pollen	Hypertonie, Hyperlipopro- teinämie	Feuer- wehr- mann	31
23	40	W	-	-	-	-	-	20
24	54	M	15/d	1 Bier/d	-	Hypothyreose, Gicht	Haus- meister	27
25	37	M	glg.	2 Bier/d	-	Reflux	Lager-	25

							arbeiter	
26	54	M	15/d	2 Bier/d	Pollen	Reflux, OSAS	Schlosser	26
27	20	M	-	glg.	-	-	Student	25
28	50	M	-	2 Bier/d	-	Hypertonie, Chronische Bronchitis	-	29
29	52	M	-	2 Bier/d	-	Tonsillenkarzinom	Isolierer	26
30	20	M	20/d	-	-	-	-	23
31	53	M	-	2 Bier/d	-	Presbyakusis	Ange- stellter	27
32	49	W	-	-	Paracetam ol Ibuprofen	Neurodermitis, Asthma	Ange- stellter	24
33	32	M	-	3 Bier/ Wo	Gräser, ASS, Aspergillus	Polyposis nasi, Neurodermitis, Asthma	Designer	20
34	35	M	-	glg.	Chrom, Nickel	-	Heizungs bau	24
35	23	M	-	glg.	Gräser	-	Chemi- kant	22
36	24	M	glg.	glg.	-	Drogenabusus	Ange- stellter	28
37	38	M	10/d	1 Bier/d	-	-	Ange- stellter	28
38	44	M	10/d	3 Bier/d	-	-	Metall- bau	25
39	55	M	Vor 2J.	glg.	-	-	Monteur	26
40	23	M	10/d	-	Milben, Pollen	Rheuma, Asthma	Student	20
41	55	M	Vor 3J.	1 Bier/d	-	Asthma, Hypertonie	-	26
42	73	M	-	2 Bier/d	Pollen	Bronchitis, Varizen, Cholezystektomie	Rentner	24
43	42	W	-	glg.	Pollen, Katze	-	Lehrer	35
44	16	W	-	-	Hund, Katze, Pilze	Privinismus	Schüler	21
45	44	W	15/d	-	Milben, Pollen, ASS	Asthma	Büro	24
46	18	M	-	-	-	-	Schüler	21
47	49	W	-	glg.	-	Hypertonie	Lehrer	30

3.5 Miniorgankulturen

3.5.1 Materialgewinnung

Es wurde respiratorisches Epithel von Nasenmuscheln zur experimentellen Untersuchung schädigender Substanzen verwendet. Die benötigte Schleimhaut wurde allen Patienten im Rahmen einer Septumplastik mit Conchotomie entnommen. Ein positives Ethikvotum lag vor. Die etwa 1cm x 3cm großen Schleimhaut- Stücke wurden unmittelbar nach der OP in Falconröhrchen gefüllt mit GBSS bei 4°C bis zur weiteren Bearbeitung gelagert.

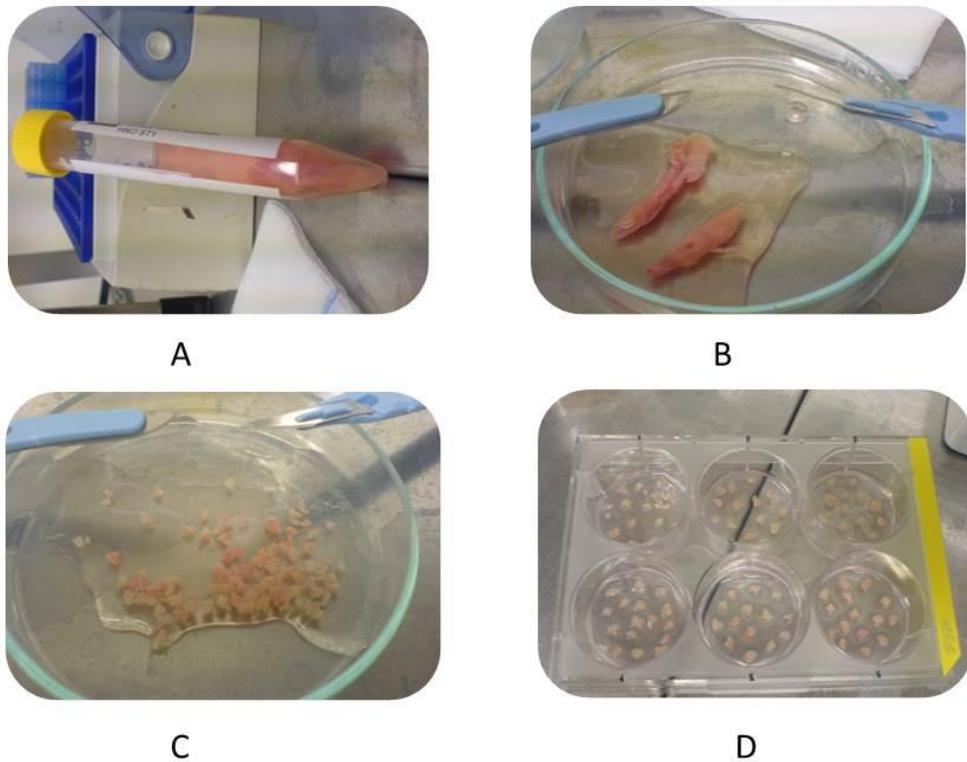


Abbildung 1: Präparation der Miniorgankulturen (MOC). A: Transport via Falconröhrchen aus dem Operationssaal in das Labor. B: Herauslösen der Bindegewebs- und Knochenreste. C: Zerteilen der Mukosa in ca. 1mm³ große Fragmente. D: Auftragen von 12 MOCs/ Well

3.5.2 Präparation

Die Nasenschleimhaut wurde im Labor unter sterilen Bedingungen mit Skalpell und Pinzette von Knorpel-, Knochen- und Bindegewebsresten befreit. Das Präparat wurde in einer, mit etwas Basalmedium (AECG- Medium mit PenStrep) gefüllten, sterilen Petrischale in 1mm³ große Fragmente geschnitten (Abb.1).

3.5.3 Kultivierung

Nach dreifacher Spülung mit Basalmedium wurden jeweils 12 Mukosastücke pro Well auf eine agarbeschichtete 6- Well- Platte aufgetragen. Anschließend wurden in jedes Well 500µl Nährmedium (AECG- Medium mit Supplement- Mix und PenStrep) hinzugefügt und die Platten bei 37°C, 5 % CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank 7 Tage kultiviert. (Abb.2)

Das Füttermedium wurde alle 2 Tage vorsichtig abgesaugt und dann erneuert. Zur Vermeidung bakterieller Infektionen fanden alle Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen statt.

Es erfolgten tägliche lichtmikroskopische Kontrollen der Viabilität, wobei man bei vitalen Präparaten an der Oberfläche einen Zilienschlag beobachten konnte. (Abb.3)

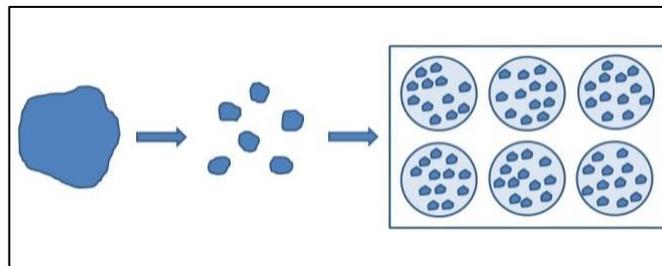


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Vorbereitung der Miniorgankulturen zur Kultivierung im Brutschrank

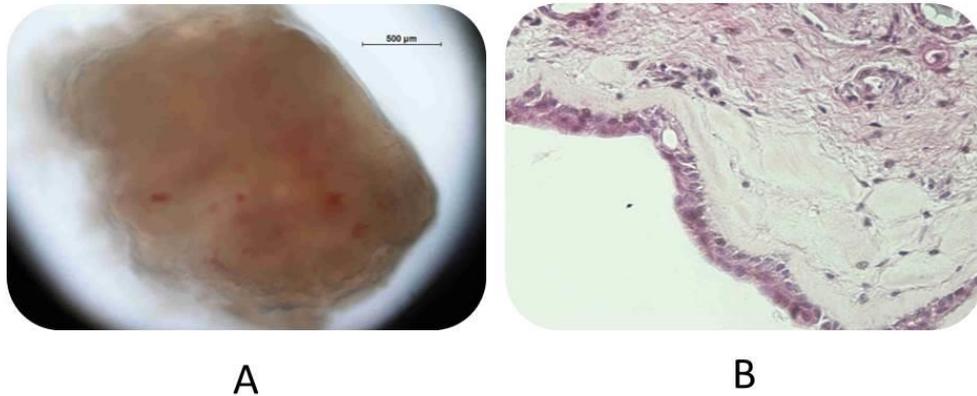


Abbildung 3: Lichtmikroskopische Abbildungen eines Mukosafragments. A: 4fach Vergrößerung der MOC vor Inkubation. B: Histologisches Bild nach 8d Inkubation angefärbt mit Hämalaun-Eosin in 200facher Vergrößerung

3.5.4 Schädigung

Nach 7-tägiger Kultivierung wurden die MOCs für die Schädigung unter der Sterilbank vorbereitet. In jedes Mikroreaktionsgefäß (Eppendorf) wurden 7 MOCs zu je 500 µl PBS gegeben und zweimal gespült. Im Anschluss daran wurden 500 µl der Schädigungslösung zu den Schleimhautproben hinzugefügt. Hierzu wurde PBS mit Hilfe von Salzsäure auf den gewünschten pH- Wert eingestellt. Je nach Versuchsansatz wurden 500 µl PBS-HCl mit den pH- Werten 3; 4,5; 5,5 und 6,5 bzw. unter Zusatz von Pepsin, Gallensalzen, humanem oder artifiziellen Magensaft inkubiert. Die Konzentrationen der jeweiligen Testsubstanzen wurden in Anlehnung an bekannte Werte der durchschnittlichen Zusammensetzung von Körperflüssigkeiten, sowie Eigenanalysen unseres Labors von Magensaftproben gewählt (Dennebaum, 2008b).

Versuchsreihe mit Pepsin:

Pepsin 1:1 3200-4500 units/mg prot

Pepsin- Stammlösung: 10mg/ml gelöst in 0.01M HCl

Arbeitskonzentration: 0,5mg/ml 457µl PBS-HCl+ 25µl Pepsin-Stammlösung ~2000 Units
Verdünnung 1:20 unmittelbar vor Versuchsbeginn

Verdünnung 1:10 = 500 µg/ml -> 475 µl Salzsäure- PBS- Lösung + 25 µl Pepsin

Verdünnung 1:100 = 50 µg/ml -> 450 µl Salzsäure- PBS- Lösung
+ 50 µl 1:20 Pepsinverdünnung

Verdünnung 1:1000 = 5 µg/ml -> 495 µl Salzsäure- PBS- Lösung
+ 5 µl 1:20 Pepsinverdünnung

Zur Überprüfung der Wirkung von Pepsin wurde dieses durch 5 min. Abkochen im Wasserbad bei 100°C denaturiert und damit inaktiviert.

Versuchsreihe mit Gallensalzen

Gallensäure-Mix 120 mg/ml ~ 250 mM (bezogen auf Taurocholat)

Verdünnung 1:1000 = 250µM -> 495µl Salzsäure- PBS- Lösung
+ 5µl 1:10 Gallensäure-Mix-Verdünnung

Sodium Glycochenodeoxycholate 94 mg/ml ~ 200mM

Verdünnung 1:100 = 200µM -> 495 µl Salzsäure- PBS- Lösung
+ 5 µl GCDS- Verdünnung

Artifizieller Magensaft

25µl Pepsin (500µg/ml, ~ 2000U) + 5µl Gallensäure-Mix + 5µl Trypsin (0,01mg/ml, ~ 149U)
+ 430 µl Salzsäure- PBS- Lösung

Humaner Magensaft

Der humane Magensaft stammte von Patienten, welche sich einer diagnostischen Endoskopie unterzogen. Die Proteinkonzentration und der Gehalt an Gallensäuren, der bei der Gastroskopie normalerweise verworfenen Magensäfte, wurden im Zentrallabor des Universitätsklinikums bestimmt (Tab. 5). Der pH- Wert wurde im Forschungslabor unserer Klinik mittels pH- Meter

bestimmt. Die Enzymkonzentration und proteolytische Aktivität wurde in Anlehnung an das von Langner et al. beschriebene Verfahren durch Umsatz von 0,8%iger Azokaseinlösung bei pH 5,3 (Pepsin) bzw. 7,0 (Trypsin) bestimmt (Barrett und Kirschke, 1981). Der Magensaft wurde für die Versuche mit 0,1 N HCl auf die gewünschten pH- Werte (3; 4,5; 5,5 und 6,5) eingestellt und als Aliquots bis zum Versuchstag bei -20°C gelagert. Dabei wurden die Aliquots so gewählt, dass wiederholtes Einfrieren oder Auftauen vermieden werden konnte.

Tabelle 5: Laborchemische Analyse von Magensaftproben

ID	MW	Pepsin	Trypsin	mmol/l	Cl	Gallensäure	Osmolalität	Protein	pH
	proteolyt Akt	mg/ml	mg/ml	Na	mmol/l	µmol/l	mosm/kg	g/l	
1	0,055	0,000	0,020	153,0	158,3	12,5	294	0,060	3
2	0,062	0,000	0,022	0,0	134,7	8,0	263	0,550	2
3	0,062	0,000	0,022	153,0	157,3	5,8	308	0,050	7
8	0,103	0,000	0,029	0,0	118,0	3,8	250	0,530	2
9	0,239	0,099	0,055	106,0	128,7	36,3	245	1,120	3
10	0,413	0,320	0,088	0,0	106,3	401,1	337	1,080	3
11	0,244	0,106	0,056	130,0	141,1	5,3	345	0,210	5
12	2,191	2,578	0,422	0,0	48,3	291,5	277	0,530	9
13	0,057	0,000	0,021	154,0	158,1	3,7	304	0,000	4
14	0,588	0,542	0,120	0,0	0,0	34,5	230	0,220	8
15	0,187	0,033	0,045	0,0	113,0	13,0	247	0,770	1
16	0,214	0,068	0,050	119,0	131,6	32,1	295	0,370	3
17	0,329	0,213	0,072	0,0	114,0	23,5	462	1,290	6
18	0,055	0,000	0,020	140,0	142,5	4,3	273	0,000	3
19	0,537	0,477	0,111	146,0	149,6	266,8	312	0,000	5
20	0,209	0,061	0,049	119,0	129,2	5,1	383	0,420	8
21	0,031	0,000	0,016	148,0	151,1	3,5	285	0,000	4
22	0,060	0,000	0,021	114,0	134,2	3,4	265	0,280	1
23	0,000	0,000	0,010	151,0	152,7	3,6	288	0,000	4
24	0,033	0,000	0,016	55,0	60,3	4,3	345	0,610	8
26	1,887	2,192	0,364	74,0	68,6	114,9	263	7,770	9
27	0,170	0,011	0,042	97,0	123,1	9,7	246	0,590	2
28	>3	>	>	129,0	128,2	356,9	353	0,190	7
31	0,342	0,230	0,074	53,0	123,4	366,3	370	0,790	1
32	0,045	0,000	0,018	27,0	137,9	6,0	286	0,480	1
33	0,021	0,000	0,014	150,0	151,0	3,6	290	0,000	4
35	0,140	0,000	0,036	66,0	126,8	9,1	267	0,490	2
36	0,041	0,000	0,018	136,0	140,6	27,5	277	0,100	3
37	0,212	0,064	0,050	25,0	35,7	165,1	83	0,430	4
38	>3	>	>	122,0	109,0	251,8	306	1,030	8
39	>3	>	>	105,0	114,5	438,8	362	1,670	8
40	>3	>	>	91,0	90,4	239,6	284	1,580	7
41	0,050	0,000	0,019	15,0	64,2	3,1	208	0,570	1
42	0,032	0,000	0,016	81,0	88,8	3,6	227	1,810	8
43	>3	>	>	93,0	91,5	443,2	397	2,020	8
44	>3	>	>	108,0	116,0	574,8	288	1,110	7
45	0,034	-0,162	0,016	83,0	121,9	3,1	301	0,310	1
46	>3	>	>	88,0	103,2	518,2	285	0,400	7
47	1,808	2,092	0,350	159,0	159,6	69,7	319	0,050	5
48	0,204	0,054	0,048	28,0	82,6	11,6	333	0,580	1
49	0,004	0,000	0,011	174,0	164,6	1,7	327	0,220	5
50	0,093	0,000	0,027	49,0	135,1	18,0	306	0,660	1
51	0,201	0,050	0,048	57,0	70,2	48,1	396	1,110	6
52	0,215	0,068	0,050	97,0	126,5	170,0	256	0,810	1
53	0,944	0,995	0,187	77,0	91,2	208,8	215	0,340	7
54	0,016	0,000	0,013	158,0	154,7	2,8	298	0,000	5
55	0,039	0,000	0,000	52,0	114,5	42,6	246	0,710	2
56	0,836	0,858	0,087	77,0	91,0	120,9	290	0,420	8
57	>3	>	>1	95,0	105,0	137,0	335	0,570	8
58	0,194	0,041	0,013	73,0	104,4	27,5	281	0,620	3
59	0,052	0,000		58,0	134,1	38,3	272	0,670	1
60	>3	>	>1	66,0	99,3	565,0	264	0,760	7
61	>3	>	>1	97,0	100,7	342,0	317	0,600	9
62	0,139	0,000	0,006	33,0	133,8	115,0	275	0,400	1
63	1,317	1,468	0,144	111,0	100,3	7,5	297	0,730	8
64	0,082	0,000	0,000	139,0	145,2	3,0	297	0,300	5
65	0,077	0,000	0,000	129,0	129,0	2,6	289	0,150	1
66	0,022	0,000	0,000	154,0	153,9	3,7	289	0,000	5
67	1,334	1,489	0,145	87,0	100,0	356,0	228	0,370	7
MW	0,33	0,28	0,06	88,15	116,26	118,46	292,05	0,67	4,60

Die Schädigung erfolgte für eine Stunde bei 37°C, 5 % CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Zur Kontrolle der Versuchsbedingungen und des Ausgangszustandes des Schleimhautepithels wurden eine Negativ- und eine Positivkontrolle mitgeführt. Die Negativkontrolle wurde in Analogie zu den experimentellen Proben 1h mit PBS inkubiert. Die Positivkontrolle erfolgte durch Inkubation der MOC für 5 min. mit 15 mM H₂O₂ auf Eis. Nach Beendigung der Inkubationszeit wurden die Noxen entfernt und die MOCs zweifach mit PBS gewaschen.

3.6 Einzelzellgewinnung

Zur Lösung der Epithelzellen aus dem Zellverband wurden die MOCs mit 500µl Enzymmix verdaut. Dieser Enzymmix setzte sich zusammen aus Kollagenase, Hyaluronidase und Pronase, welche in AECG gelöst wurden. Der Verdau erfolgte bei 37°C 45 min. im Dunkeln auf dem Schüttler.

Durch Zugabe von 500 µl gekühlter 10%iger FCS- Lösung wurde die Aktivität des Enzymmix abgestoppt.

Mit Hilfe eines Holzstäbchens wurden die Gewebereste aus dem Tube entfernt. Die Zellsuspension wurde anschließend bei 800rpm 10 min. zentrifugiert.

Das Pellet wurde zweimal in 500µl PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert, um die Zellen von Enzymresten zu befreien.

3.7 Vitalitätstest

Die Zellzahl und die Vitalität der Zellen wurden mittels Trypanblau- Test bestimmt. Das Zellpellet wurde dafür in 300 µl PBS resuspendiert und 20 µl dieser Suspension zu 20 µl Trypanblau gegeben.

Durch Auftragen der Lösung auf eine Zählkammer ließen sich die Zellkerne unter dem inversen Lichtmikroskop beurteilen. Trypanblau färbte tote Zellen blau an, da die Kernmembran dann für dieses durchlässig wurde. Intakte Zellen blieben jedoch farblos.

3.8 Epitheliale Zellen

3.8.1 Kultivierung

Auf einer unbeschichteten 6- Well- Platte wurden 7- 8 MOCs/ Well zum Auswachsen eingesetzt. Nach Hinzufügen des Nährmediums (AECG- Medium mit Supplement- Mix und PenStrep) wurden die Platten bei 37°C, 5 % CO₂, 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank kultiviert.

Der Medienwechsel erfolgte im 2-tägigen Abstand nach lichtmikroskopischer Kontrolle. Das erfolgreiche Auswachsen der Epithelzellen war im Mikroskop erkennbar durch einschichtige Zellinseln, welche um die MOCs herum wuchsen und auf dem Boden der Platte fest verankert waren. Ein Ablösen und Schwimmen der Zellen sprach für einen Verlust der Zellkontakte und ein Absterben der entsprechenden Zelle.

Sobald ein Auswachsen der Zellen erkennbar war, konnten die MOCs abgesammelt werden und die Zellen blieben zur weiteren Kultivierung auf der Platte.

Die Dauer der Inkubation war abhängig von der Dichte des Zellrasens. Sie variierte von 13 bis 20 Tagen.

3.8.2 Schädigung epithelialer Zellen

Die Schädigung erfolgte auf der 6- Well- Platte. Pro Kondition wurden 2 Wells genutzt.

Nach Abnahme des Mediums wurden 220µl der Noxe direkt auf die Zellen gegeben. Als Schädigungssubstanzen wurden artifizieller, sowie humaner Magensaft, jeweils in den pH- Werten 4,5 und 5,5, aufgetragen.

Artifizieller Magensaft setzte sich dabei zusammen aus 25 µl Pepsin (0,5 mg/ml), 5 µl Gallensäure- Mix (250 µM) und 470 µl der entsprechenden Salzsäure- PBS- Lösung.

Der humane Magensaft wurde mit 0,1N und 1N HCl auf pH 4,5 bzw. 5,5 titriert und im Verhältnis 1:5 mit HCl in dem entsprechenden pH- Wert verdünnt.

Während der Schädigung wurden die Platten 1 Stunde im Brutschrank inkubiert.

Die Positivkontrolle erfolgte mit 15 mM H₂O₂ für 5 min. auf Eis.

Anschließend wurden die Noxen abgenommen und die Zellen wurden einmalig mit 1xPBS gespült. Zum Ablösen der Zellen wurden 200µl Trypsin pro Well auf die Zellen gegeben, welches nach 5 min. mit 30 µl FCS abgestoppt wurde.

Die Zellsuspension wurde bei 800 rpm 10 min. zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die weitere Verfahrensweise entsprach dem Protokoll der MOC- Versuche nach Einzelzellgewinnung.

3.9 Einzelzell- Gelelektrophorese

3.9.1 Beschichtung der Objektträger

Verwendet wurden mattierte Objektträger (OT) der Größe 24mm x 60 mm. Die erste Schicht konnte bereits Tage zuvor aufgetragen werden. Die Objektträger wurden dafür in 1 %ige, in Aqua destillata gelöste, NMP- Agarose getaucht und auf einer Heizplatte bei 40 °C getrocknet. Am Versuchstag wurde dann die zweite Schicht aufgetragen. Bei dieser wurden 85 µl 0,6%ige in PBS gelöste NMP- Agarose auf den OT pipettiert und mit einem Deckgläschen verteilt.

Die OT wurden bei 4°C aufbewahrt.

Das Pellet mit den Epithelzellen wurde nun in 200 µl 0,5%ige in PBS gelöste LMP- Agarose aufgenommen und sorgfältig resuspendiert. 85 µl des Zell- Agarose- Gemischs wurden dann auf die gekühlten OT aufgetragen und ebenfalls mit einem Deckgläschen verteilt.

Abschließend wurde auf das erstarrte Gel eine vierte Schicht bestehend aus 60 µl 0,5%ige LMP- Agarose aufgetragen (Abb.4).

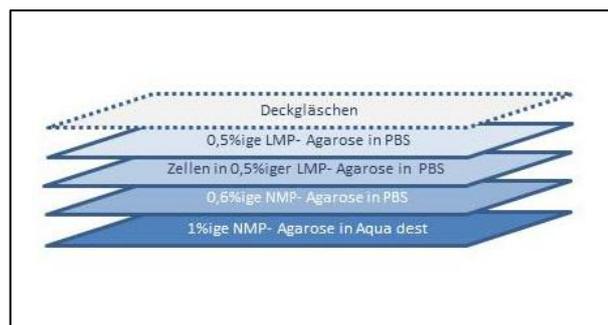


Abbildung 4: Beschichtung der Objektträger

3.9.2 Lyse der Zell- und Kernmembran

Damit die DNA in der Elektrophorese frei laufen kann, muss sowohl die Zell- als auch die Kernmembran lysiert werden.

Zur Lyse wurden die OT für eine Stunde flach in eine Schale gelegt und vollständig mit Lysepuffer bedeckt. Dieser bestand aus einer Lysestammlösung (2,5M NaCl, 10mM Tris, 100mM Na₂EDTA, 1% Laurylsarcosinat), 10% DMSO und 1% Triton. Um unerwünschte DNA Schäden zu vermeiden erfolgten alle Vorgänge bei einer konstanten Temperatur (4°C) und Dunkelheit.

3.9.3 Elektrophorese

Im Anschluss wurden die Objektträger mit gekühltem Elektrophoresepuffer gewaschen und ohne Zwischenräume in der Elektrophoresekammer platziert. Zur Alkalidenaturierung der DNA und Expression verschiedener alkalilabiler Stellen wurden die OT mit vorgekühltem, alkalischen Elektrophoresepuffer überschichtet und 25 min. auf Eis inkubiert.

Während der Elektrophorese wanderte die negativ geladene DNA zum Pluspol. Dank der Poren in der Agarose trennten sich die Bruchstücke der Größe nach auf. Kleinere Bruchstücke legten in einer bestimmten Zeit eine weitere Strecke zurück als die größeren. Chromosomale DNA ist zu groß, um als Ganzes im elektrischen Feld zu wandern. Nur geschädigte, bruchstückhafte DNA war in der Lage, aus dem Zellkern herauszuwandern

Die Elektrophorese erfolgte für 25 min. im Dunkeln auf Eis bei 25V und 300mA. Die Spannungsstärke ließ sich direkt an der Spannungsquelle einstellen. Durch Variation der Höhe des Puffers ließ sich die gewünschte Stromstärke regulieren.

Nach Beendigung der alkalischen Elektrophorese wurden die OT dreimal mit Neutralisationspuffer (0,4M Tris in Aqua bidestillata bei pH 7,4) überschichtet und jeweils 5 min. neutralisiert. Die Neutralisation gewährleistet eine Interkalation der DNA mit DNA-Farbstoffen. Zur Aufbewahrung bis zur Auswertung wurden zwei Methoden verwendet. Zum einen wurden die OT in einer feuchten Kammer im Kühlschrank gelagert. Die zweite Methode bestand in der Fixation der OT mit eiskaltem Methanol. Nach 5-minütiger Überschichtung wurden die OT bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet. Der Vorteil der zweiten Methode bestand darin, dass man die OT bis zur Auswertung zeitlich unbegrenzt lagern konnte. Ein Unterschied im Ergebnis war nicht festzustellen.

3.10 Ergebnis- Analyse

3.10.1 Quantifizierung der Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte im Institut für Umwelttoxikologie der MLU- Halle- Wittenberg.

Um die aufgetrennte DNA auswerten zu können, wurden die OT mit 0,002%igem Ethidiumbromid angefärbt. Innerhalb der 15- minütigen Einwirkzeit interkalierte der Farbstoff mit den Basen der DNA und diese wurde dann unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Filter: Excitation BP546/16, Immission LP590, Beamsplitter FT580, Carl Zeiss, Jena) sichtbar (Abb.5). Mit Hilfe einer speziellen Software (Comet 5.5, Liverpool, Großbritannien) ließen sich die im elektrischen Feld gewanderten DNA- Fragmente ausmessen.

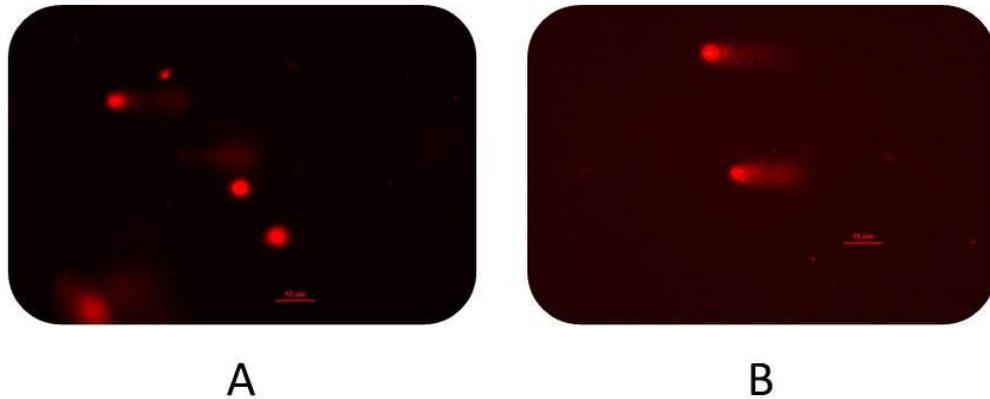


Abbildung 5: Comet Assay. Floureszenzmikroskopische Darstellung nach Anfärben mit Ethidiumbromid.(100fache Vergrößerung) A: intakt DNA nach Inkubation mit PBS (Negativkontrolle). B: Fragmentierte DNA nach Inkubation mit H2O2 (Positivkontrolle)

Das Olive- Tail- Moment (OTM) wurde zur Quantifizierung der DNA- Schäden herangezogen (Olive & Banáth, 1993). Es beschreibt den Anteil der fragmentierten DNA, der im Spannungsfeld gewandert ist und sich nun im Schweif des Kometen befindet. Dieser Wert wird mit dem Median der Laufstrecke multipliziert (Abb. 6). Pro OT wurden 50 Zellen gemessen und die Daten in einer Excel- Tabelle (Microsoft Corporation, Redmond, USA) automatisch gespeichert.

$$\text{OTM} = \frac{\text{Dichte der DNA im Kometenschweif}}{\text{Dichte der DNA im Kometenkopf}} * \text{Wanderungsstrecke in der Elektrophorese}$$

Abbildung 6: Berechnung des Olive Tail Moment (OTM)

3.10.2 Statistik

Als Grundlage zur statistischen Auswertung dienten die in der Fluoreszenzmikroskopie gemessenen OTM.

Mit Hilfe der Programme IBM SPSS Statistics (Version 17) und Microsoft Office Excel (2010) erfolgten die statistische Auswertung und die graphische Darstellung.

Im Rahmen der Ergebnisdarstellung in Boxplots wurde auf unterschiedliches Migrationsverhalten der DNA bei verschiedenen Konditionen geprüft. An der Y- Achse wurden DNA- Migrationen mit dem OTM quantifiziert. Deskriptive Werte wurden über den Mittelwert, die Mean Deviation und die Standardabweichung angegeben.

Zur Ergebnisanalyse kam eine „mixed- model- calculation“ mit wiederholten Messungen an den verschiedenen Kulturen zum Einsatz, welche mit freundlicher Unterstützung durch das Institut für Epidemiologie, Biometrie und Informatik durchgeführt wurde. Es wurde ein gemischtes Modell mit wiederholten Messungen erstellt. Um eine Normalverteilung zu erreichen wurden zur Berechnung logarithmierte Werte genutzt. Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die exponierten Werte verwendet. Das Konfidenzintervall wurde bei 95% festgelegt. Die Kontrollgruppe (Positiv- und Negativkontrolle) wurde mittels t- Test statistisch analysiert. Der Einfluss anamnestischer Daten wie Geschlecht, Alter, Alkohol- und Nikotingenuss, sowie das Vorhandensein von Allergien wurde mittels Sensitivitätsanalysen ermittelt.

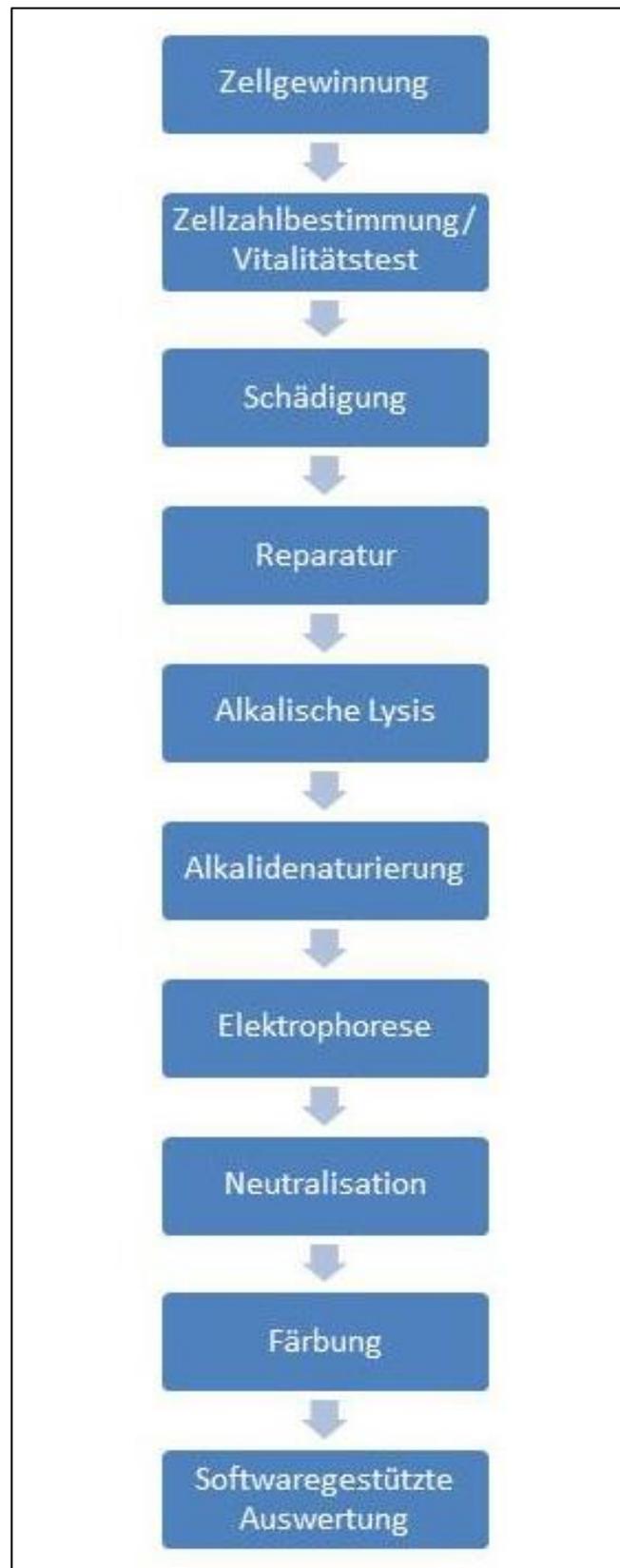


Abbildung 7: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

4 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit untersuchte in einem in vitro- Modell den Einfluss von Refluxat bzw. seinen Bestandteilen auf die DNA- Integrität/ -Stabilität. Die Quantifizierung dieser Schädigungen erfolgte mittels Comet Assay. Besonderes Augenmerk wurde auf die Wirkung von Refluxat bzw. seinen Einzelkomponenten gegenüber pH- Wert- Änderungen gelegt.

4.1 Miniorgane

In Anlehnung an das Versuchsprotokoll von Oertel wurden Mukosaproben nach Entnahme 7 Tage kultiviert und dann mit den zu testenden Noxen bei im Vergleich zum Magensaft ansteigenden pH- Werten inkubiert (Oertel, 2008). Im Anschluss daran erfolgte die Analyse der DNA- Schädigung mittels Einzelzellgelelektrophorese.

Im Rahmen der Vitalitätsuntersuchungen wurden die Miniorgankulturen täglich unter dem inversen Lichtmikroskop kontrolliert. Dabei diente der Zilienschlag als positives Zeichen der Vitalität.

Zur Vorbereitung des Comet Assays wurden die Zellen enzymatisch aus ihrem Verband gelöst. Es erfolgte eine Färbung einer kleinen Probe mit Trypanblau und anschließender Auszählung vitaler und avitaler Zellen. Proben mit einer Vitalität unter 80% wurden verworfen.

Insgesamt wurden nach Berücksichtigung oben genannter Vitalitätskriterien 47 Proben untersucht. Dabei wurden auch anamnestische Daten, wie Geschlecht, Alter, Allergien, Vorerkrankungen, Nikotin- und Alkoholkonsum mit einbezogen. Die Präparate waren von 15 Frauen und 32 Männern. Keiner der Patienten hatte in der Vorgeschichte eine maligne Erkrankung im OADT angegeben.

Mit jeder Versuchsreihe wurden als Standardkontrollen eine Positiv- (H_2O_2) und eine Negativkontrolle (PBS) mitgeführt. Eine Vorschädigung der Zellen wäre durch überdurchschnittlich hohe OTM- Werte bei der Negativkontrolle im Comet Assay aufgefallen. Eine im Vergleich zum Gesamtdurchschnitt stark abweichende Positivkontrolle hätte Hinweise auf einen Fehler im Schädigungsprotokoll ergeben.

Mit Hilfe des t- Tests konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den OTM- Werten der Kontrollgruppen (positiv $MD_{pos} = 12,4$; 95% KI 11,75-13,08 vs. negativ $MD_{neg} = 1,67$; 95% KI 1,49-1,87) nachgewiesen werden ($p < 0,001$), (Abb. 8).

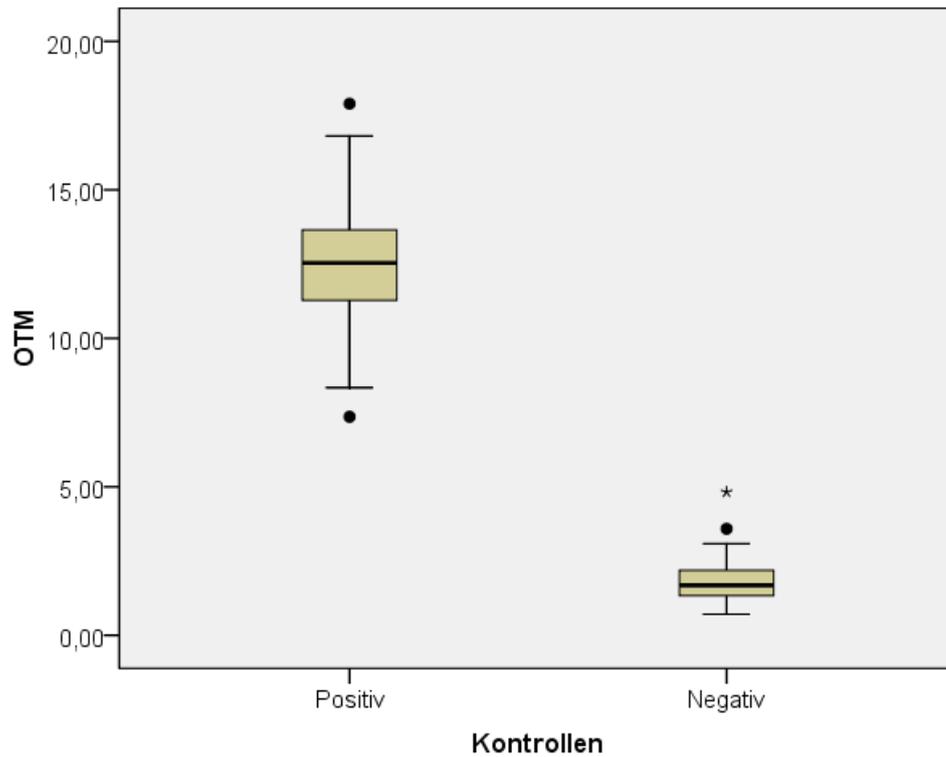


Abbildung 8: OTM-Werte in Abhängigkeit vom Zusatz der bei jedem Versuch mitgeführten Positiv- und Negativkontrolle

4.1.1 Artifizierter und humaner Magensaft

Zur Simulation des Refluxgeschehens wurde der Effekt von humanem Magensaft mit dem Schädigungspotential von künstlich hergestelltem Magensaft verglichen. Der synthetische Magensaft bestand aus HCl, Gallensäuren- Mix, Trypsin und Pepsin.

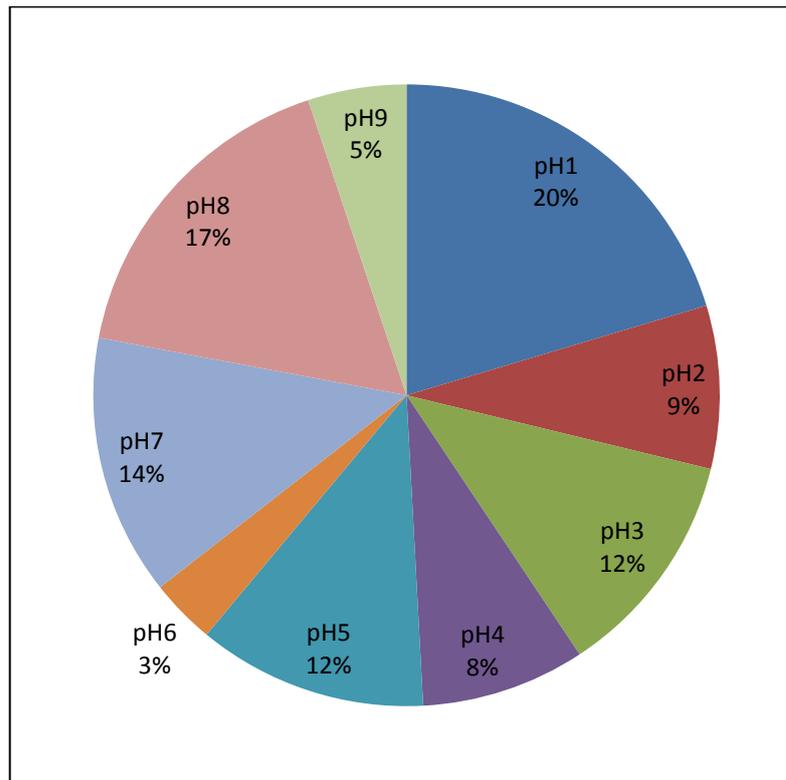


Abbildung 9: Prozentuale Verteilung der pH- Werte humaner Magensaftproben (n=67)

In Anlehnung an das von Oertel erstellte Protokoll wurden die artifizialen sowie die humanen Magensaftproben auf die pH- Werte 3,0; 4,5; 5,5 und 6,5 eingestellt. Die in Abb. 9 dargestellten Verteilungen der pH- Werte in den humanen Magensaftproben veranschaulicht, dass 64% der untersuchten Proben einen $\text{pH} < 7,0$ zeigen, während 22% alkalische pH- Werte $> 7,0$ aufweisen. Der durchschnittliche pH- Wert lag mit $\text{pH}=4,6$ ($s= 1,27$) deutlich im sauren Bereich. Da Experimente unter einem pH von 3,0 zu einer starken Gewebeschädigung führten, wurden die von Oertel etablierten pH- Werte beibehalten. Die mittlere Pepsinkonzentration betrug $0,28 \text{ mg/ml}$ ($s= 0,62$) und die mittlere Gallensäure- Konzentration $118,46 \text{ } \mu\text{mol/l}$ ($s= 164,64$).

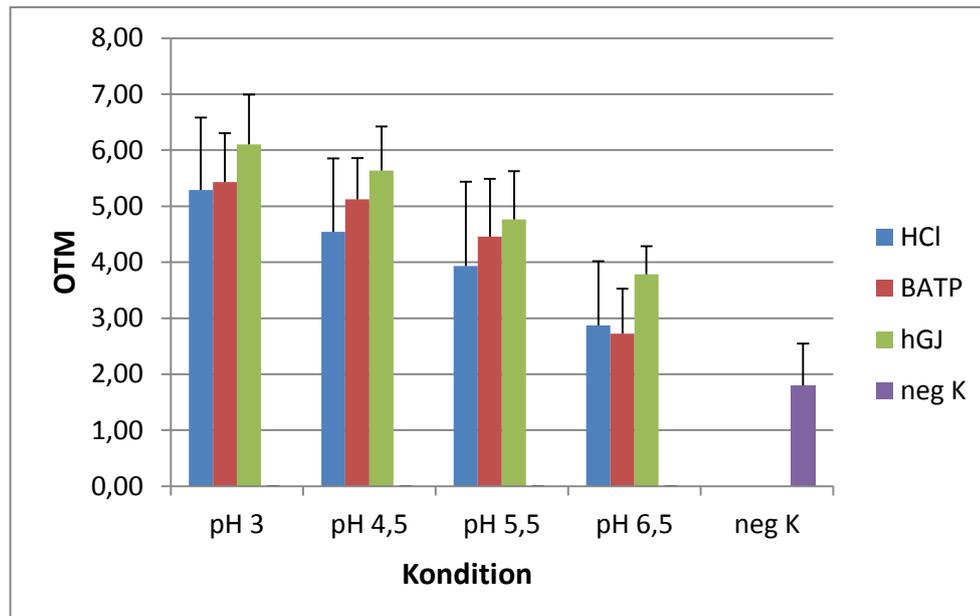


Abbildung 10: Graphische Darstellung der unterschiedlichen Konditionen in der experimentellen Untersuchung. Mit zunehmendem pH- Wert nimmt die Schädigung der DNA ab, humaner Magensaft hat das größte Schädigungspotential (n=6).

Um den Einfluss von humanem Magensaft bzw. artifiziellem Magensaft von der bereits bekannten PBS- HCl- Schädigung zu differenzieren, wurden als zusätzliche Kontrollen die MOCs bei den gewählten pH- Konditionen ohne weitere Zusätze inkubiert. Neben der bekannten Wirkung durch HCl ($p < 0,001$) ließ sich eine geringfügig erhöhte Anzahl von DNA-Strangbrüchen nach Zugabe von hGJ und BATP messen, wobei das Schädigungspotential von humanem Magensaft etwas höher war als das des artifiziiellen Magensaftes. Durch Zugabe von humanem Magensaft stiegen die Mittelwerte der OTM- Werte im Vergleich zum Nichtvorhandensein von hGJ ($MD_{OTM} = 5,47$; 95%KI 4,7-6,38) bis auf 8,53 (95%KI 6,74-6,38). Nach Inkubation mit artifiziellem Magensaft zeigte sich ein Anstieg der mittleren OTM- Werte bis auf 7,91 (95%KI 6,25-10,02) im Vergleich zu keinem BATP- Zusatz ($MD_{OTM} = 5,91$; 95%KI 5,07-6,88) (Abb.10).

Im Vergleich zur Probengesamtheit konnte in einer F- Statistik ein signifikanter Einfluss von humanem und artifiziellem Magensaft nachgewiesen werden (jeweils $p < 0,001$) (Abb.11 und 12).

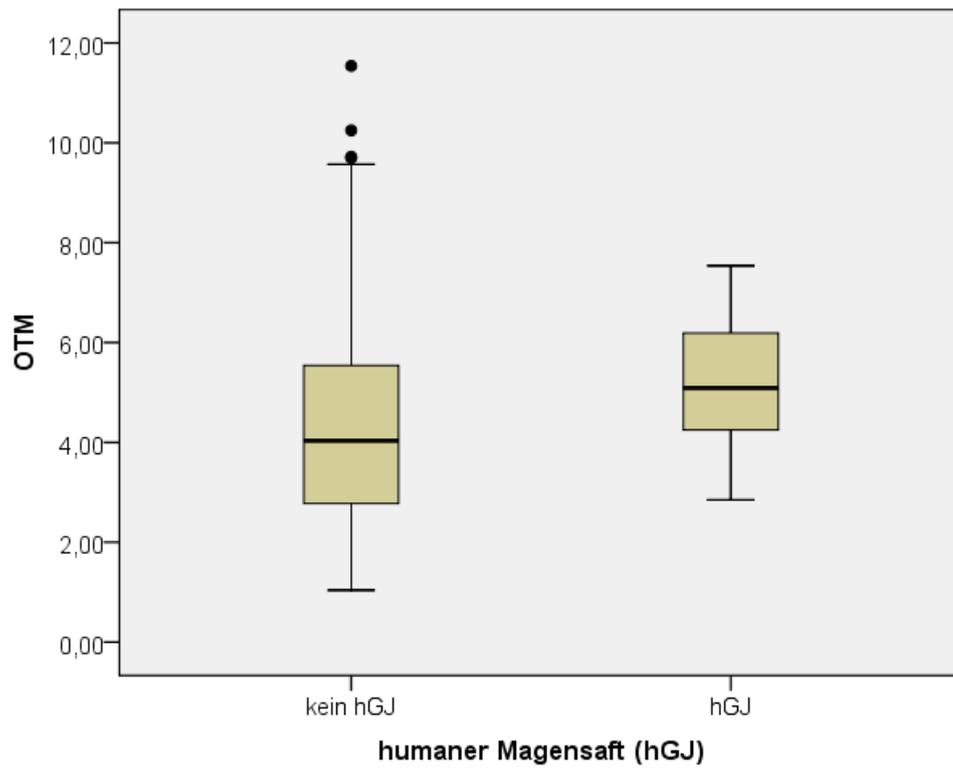


Abbildung 11: Boxplotdarstellung der DNA- Fragmentierung. Nach Inkubation der Mukosafragmente mit humanem Magensaft ist ein signifikanter Anstieg der OTM- Werte messbar.

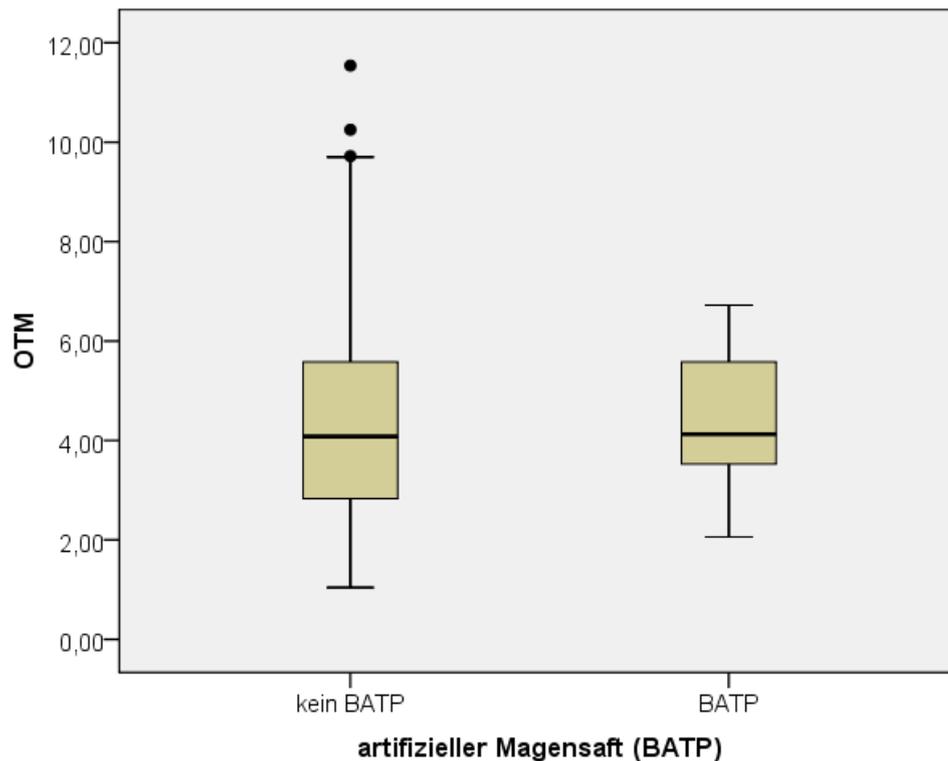


Abbildung 12: Nach Inkubation der Mukosafragmente mit artifiziellem Magensaft (BATP) sind die OTM- Werte signifikant höher als ohne BATP.

4.1.2 Salzsäure

Die detaillierte Auswertung nach Inkubation der Mukosafragmente mit PBS- HCl- Lösung unterschiedlicher pH- Werte (3; 4,5; 5,5; 6,5) zeigte, dass mit niedrigerem pH, die OTM- Werte zunahm (Abb. 13). Die mittleren OTM-Werte sanken von 6,01 (95%KI 5,31-6,8) (pH=3) auf 1,67 (95%KI 1,49-1,87) (pH=7,4). Es konnte ein signifikanter Einfluss des pH- Wertes auf die Entstehung von DNA- Strangbrüchen nachgewiesen werden ($p < 0.001$).

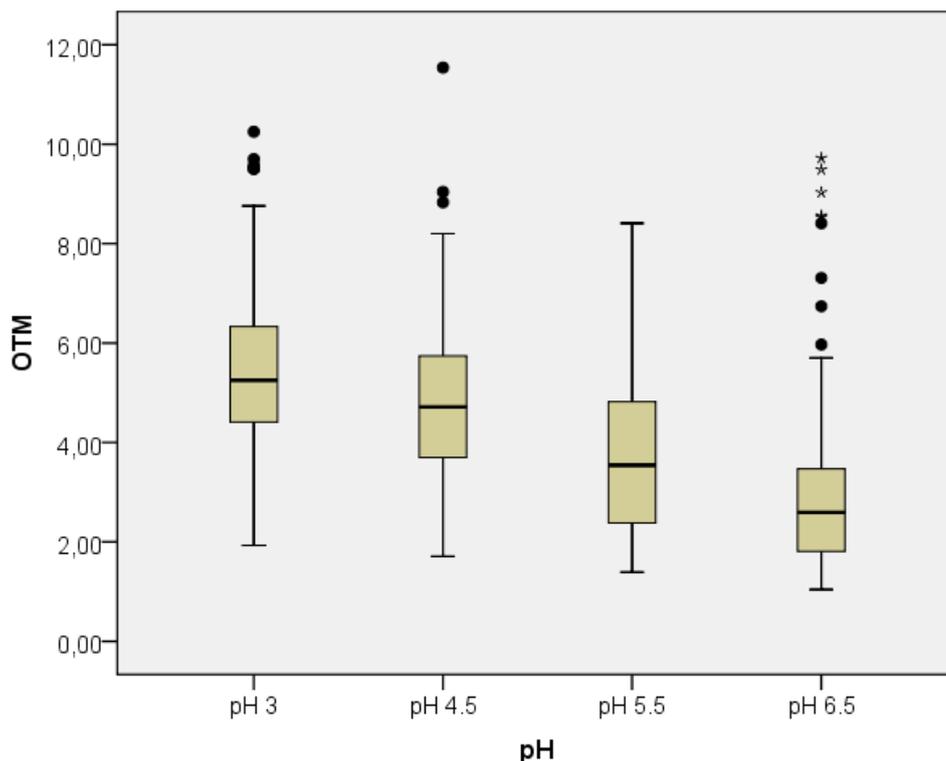


Abbildung 13: Eine Abnahme des pH- Wertes führt zu einer Zunahme der DNA- Schädigung.

4.1.3 Pepsin

Zur Testung des Einflusses einzelner Refluxkomponenten wurde den PBS- HCl- Lösungen der pH- Werte 3; 4,5; 5,5 und 6,5 Pepsin in der Konzentration 500µg/ml (320- 450 units/mg prot) hinzugefügt.

Mit sinkendem pH- Wert, nahmen auch hier die OTM- Werte zu, was auf eine erhöhte DNA- Schädigung im sauren pH- Bereich schließen lässt. Dies ist nicht allein auf die Schädigung durch pH- Absenkung zurückzuführen. In der F- Statistik ließ sich ein signifikanter Einfluss von Pepsin auf die DNA- Schädigung nachweisen ($p= 0,001$). Durch Zugabe des aktiven Pepsins zeigte sich im Mittel eine etwas höhere Schädigung ($MD_{OTM} = 5,14$; 95%KI 4,37-6,05). Nach Hitzedenaturierung der proteolytischen Aktivität zeigte der Vergleich der Mittelwerte Annäherungen des inaktiven Pepsins ($MD_{OTM} = 4,21$; 95%KI 3,63-4,89) an die reine PBS-HCl- Schädigung ($MD_{OTM} = 3,8$; 95%KI 3,39-4,29; $p=0,074$). Abb. 14 fasst alle mit Pepsin durchgeführten Experimente zusammen. In Abb. 15 sind die durch Pepsin bedingten Veränderungen in Abhängigkeit vom pH- Wert differenziert.

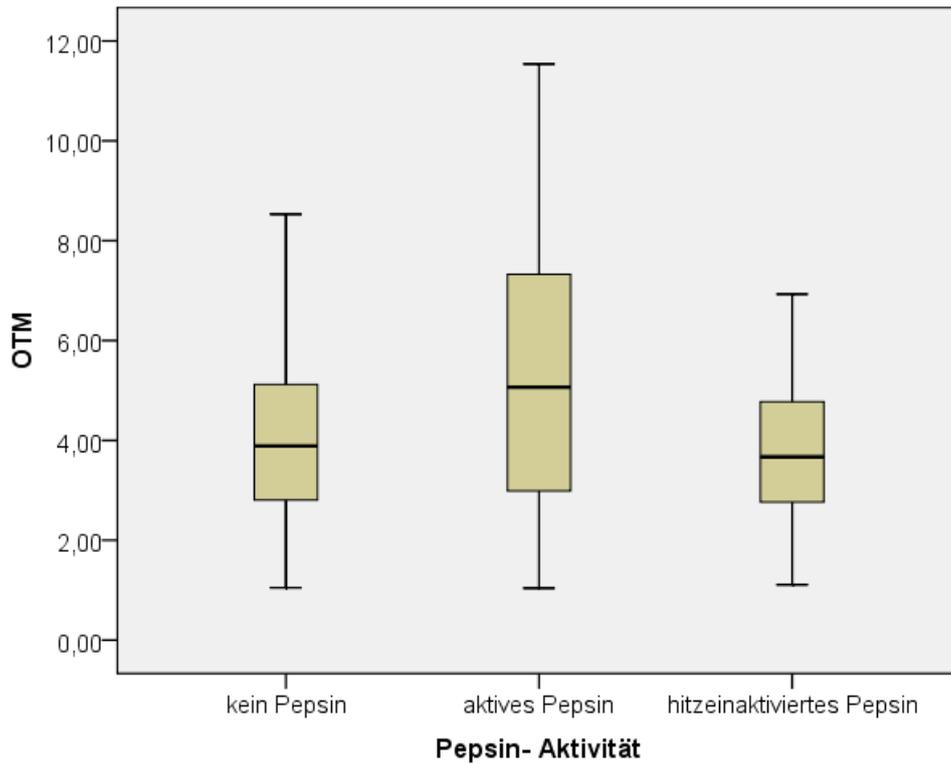


Abbildung 14: Boxplotdarstellung nach Inaktivierung des Pepsins durch Abkochen.

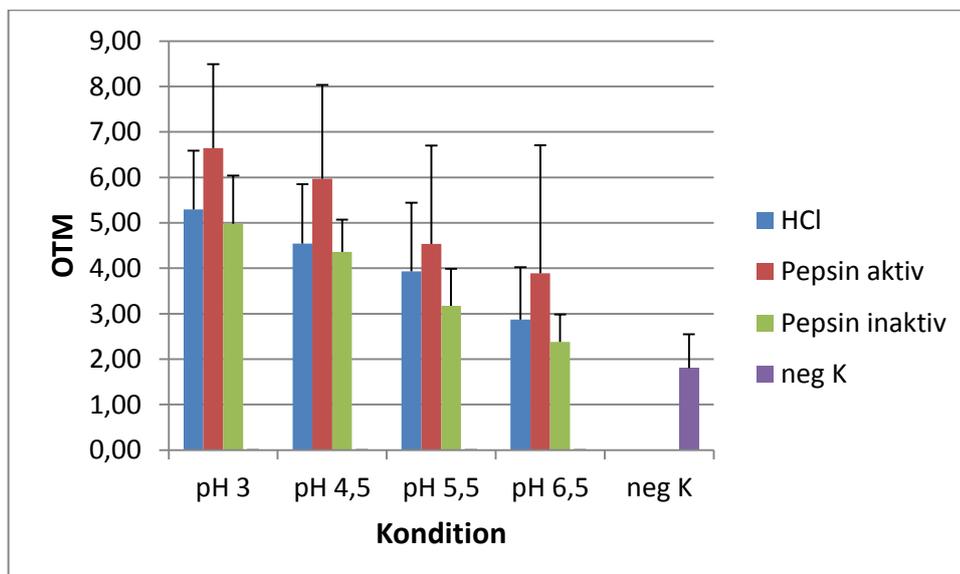


Abbildung 15: In der graphischen Darstellung zeigt sich eine Erhöhung der OTM- Werte nach Inkubation mit aktivem Pepsin im Vergleich zu HCl und inaktivem Pepsin (n=13).

4.1.4 Pepsinkonzentration

In einer weiteren Versuchsreihe wurde Pepsin in den Konzentrationen 1:1 (500µg/ml), 1:10 (50µg/ml) und 1:100 (5µg/ml) den unterschiedlichen pH- Werten der Lösungen zugegeben.

Dabei zeigte sich bei steigenden pH- Werten ebenfalls eine Abnahme der OTM- Werte (Abb.16). Vergleicht man die mittleren OTM- Werte in PBS- HCl ($MD_{OTM} = 4,01$; 95%-KI 3,56-4,52) mit den verschiedenen Verdünnungen ($MD_{OTM:1:1} = 4,06$; 95%KI 3,49-4,74; $MD_{OTM:1:10} = 4,67$; 95%KI 3,97-5,51; $MD_{OTM:1:100} = 4,71$; 95%KI 3,99-5,56) konnte in der statistischen Auswertung kein signifikanter Unterschied zwischen den verschiedenen Konzentrationen errechnet werden ($p = 0,074$) (Abb.17).

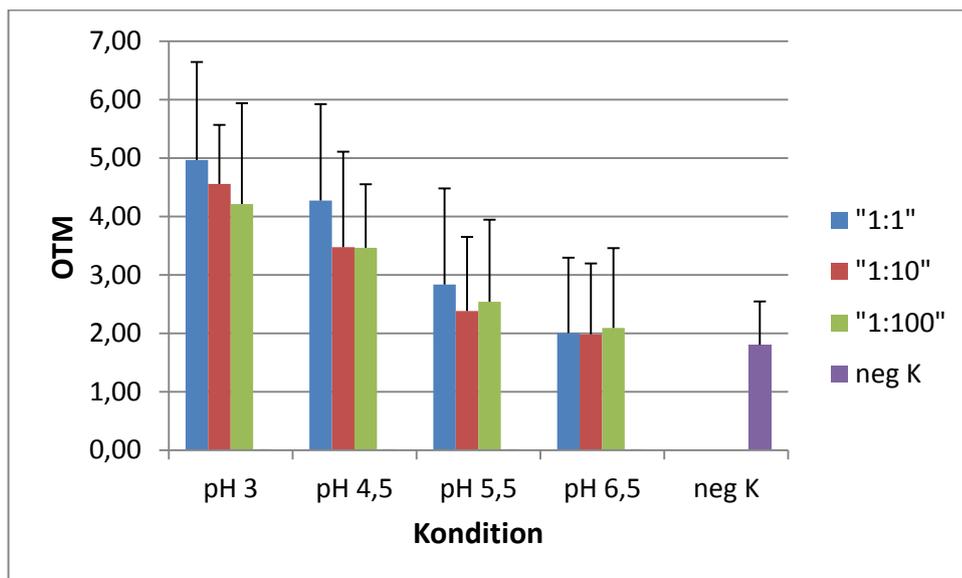


Abbildung 16: Pepsin unverdünnt (500µg/ml), nach 10facher (50µg/ml) und 100facher (5µg/ml) Verdünnung mit Salzsäure (HCl) (n= 10.)

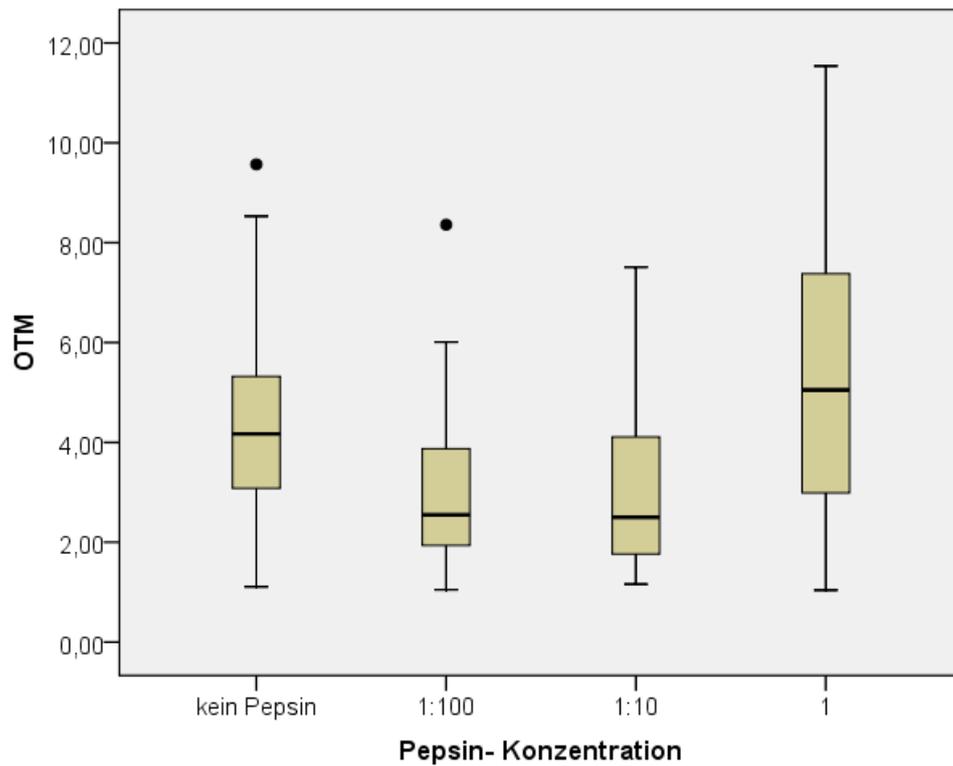


Abbildung 17: Vergleich der OTM-Mittelwerte aufsteigender Pepsin-Konzentrationen.

4.1.5 Gallensäuren

Der Einfluss der Gallensäure wurde in zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen untersucht. Es wurde zum einen ein Gallensäure-Mix bestehend aus konjugierten und unkonjugierten Gallensäuren der PBS- HCl- Lösung zugefügt. Weiterhin wurde der Effekt von Glycochenodeoxycholsäure als ein Hauptbestandteil des Gallensaftes separat analysiert, da es Hinweise auf eine kanzerogene Wirkung gibt (Jaiswal et al., 2004).

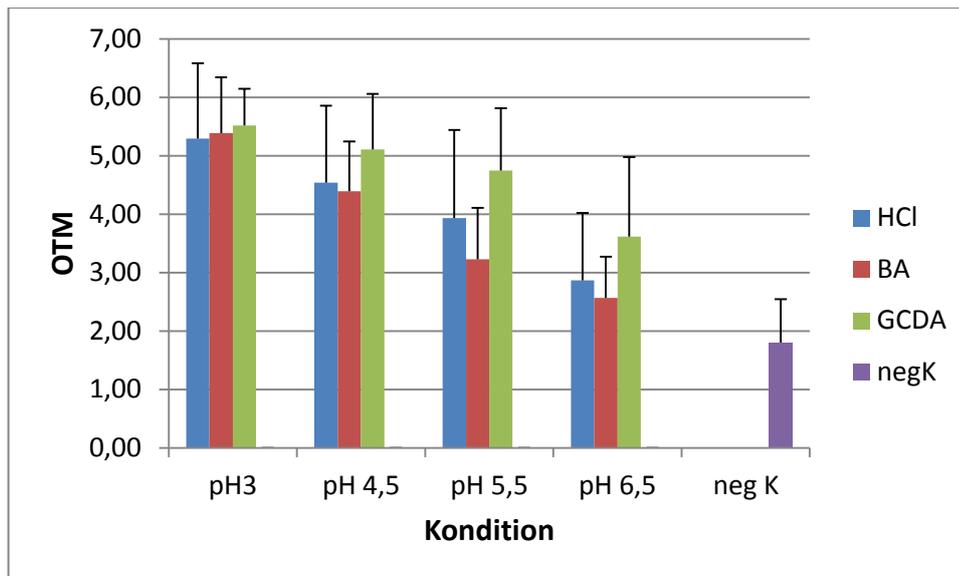


Abbildung 18: Vergleich der OTM- Mittelwerte unter unterschiedlichen pH- Bedingungen nach Zugabe von Gallensäuren als Mix, sowie der solitären Gallensäure Glycochenodeoxycholsäure (GCDA). Diese lag im Verhältnis zum in-vivo Vorkommen in deutlich erhöhter Konzentration vor ($200\mu\text{M}$)($n=7$).

Auch hier ist ein steigender pH- Wert mit sinkenden OTM- Werten assoziiert (Abb.18). Der Zusatz von BA bewirkte eine geringfügige Erhöhung der OTM- Werte ($\text{MD}_{\text{OTM}}=7,24$; 95%KI 5,82-9,01) im Vergleich zum Nichtvorhandensein der Gallensäuren ($\text{MD}_{\text{OTM}}= 6,46$; 95%KI 5,47-7,62), zeigte aber in der statistischen Auswertung einen geringeren nichtsignifikanten Einfluss ($p=0,068$). Mit einer F- Statistik konnte ein signifikanter Einfluss durch Zugabe von GCDA nachgewiesen werden ($p<0.001$; $\text{MD}_{\text{OTM}}= 8,08$; 95%KI 6,5-10,06) (Abb.19 + 20).

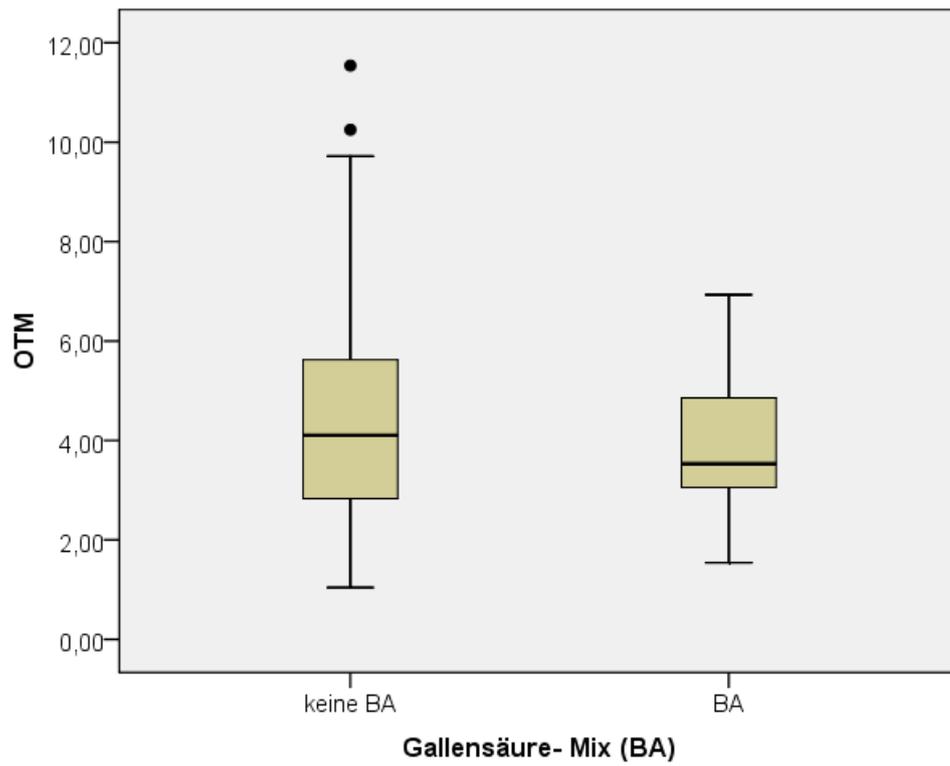


Abbildung 19: Die Zugabe von Gallensäuren als Mix konnte im Vergleich der OTM-Mittelwerte keine signifikante Veränderung zeigen.

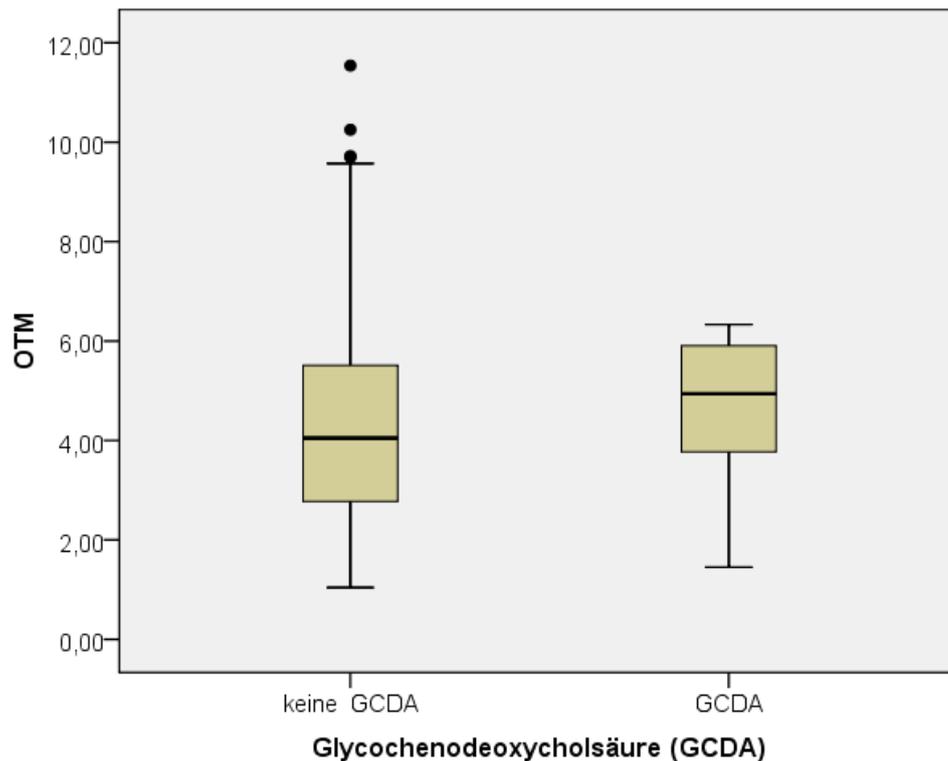


Abbildung 20: Das Vorhandensein von Glycochenodeoxycholsäure (GCDA) führt zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der OTM- Werte.

4.1.6 Trypsin

Aufgrund der gewählten pH- Konditionen wurde der Einfluss von Trypsin allein nicht untersucht. Das pH- Optimum der tryptischen Spaltung liegt bei pH 8 und sollte deshalb als individuelle Noxe hier keine Rolle spielen.

4.2 Epithelzellen

Zum Vergleich der Ergebnisse aus den Versuchen mit Miniorgankulturen wurden Versuche an ausgewachsenen Epithelzellen durchgeführt. Diese waren aus kultivierten MOCs auf Nährmedium nach ca. 10-14d ausgewachsen und lichtmikroskopisch auf dem Boden der 6-Well- Platten als mehr oder weniger dichte Zellschicht erkennbar. Die Epithelzellen wurden mit humanem Magensaft, artifiziellen Magensaft, Gallensalzen, sowie Pepsin und GCDA in der Zellkulturschale (adhärent) geschädigt. Bei pH 3 wurde beobachtet, dass viele der adhären

Zellen sich lösten und an der Oberfläche der Kulturschale schwammen. Im Vitalitätstest konnten durch Anfärben mit Trypanblau im Überstand tote Zellen nachgewiesen werden, weshalb keine weiteren Experimente bei pH 3 durchgeführt wurden. Ebenso wurde auf die Experimente bei pH 6,5 verzichtet, da nur 3% der humanen Magensaftproben einen pH- Wert >5 aufwiesen. Die Untersuchungen an Epithelzellen wurden bei pH 4,5 und 5,5 durchgeführt.

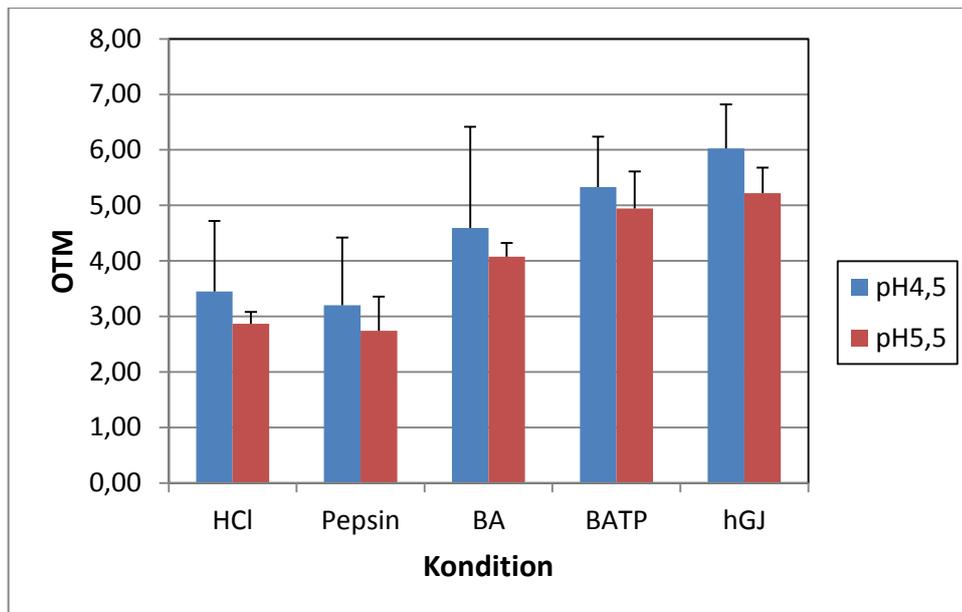


Abbildung 21: Ausmaß der DNA- Fragmentierung nach Inkubation ausgewachsener Epithelzellen mit Salzsäure (HCl)/ PBS (n=6), Gallensalz- Mix (n=3), Pepsin (n=3), humanem (n=3) und artifiziellem Magensaft (n=6).

In Abb. 21 ist der Einfluss der einzelnen Noxen in Abhängigkeit vom pH-Wert dargestellt. Auch hier war ein erhöhter OTM- Wert im niedrigeren pH- Bereich messbar. Verglichen mit der Negativkontrolle konnte ein signifikanter Anstieg von DNA- Strangbrüchen nach Inkubation mit BATP ($p < 0,01$, 95%KI 0,25-4,61) gefunden werden. Humaner Magensaft hatte das höchste Schädigungspotential ($p_{\text{pH}4,5} < 0,015$, 95%KI 4,61-6,79), wohingegen Pepsin allein keinen Einfluss zu haben schien.

4.3 Spenderspezifische Einflüsse

4.3.1 Geschlecht

Im untersuchten Patientenkollektiv waren 32 (68%) Männer und 15 (32%) Frauen. Unter Berücksichtigung aller Daten konnte ein signifikanter Einfluss des Geschlechts auf die Höhe der OTM- Werte nachgewiesen werden ($p=0,012$). Frauen weisen einen um das 1.3-fache (95% KI 1,0-1,6) höheren OTM-Wert als Männer auf (Abb.22). Betrachtet man nur die Standardkontrollen (neg./pos.), so unterscheiden sich die Mittelwerte nicht signifikant (t-Test).

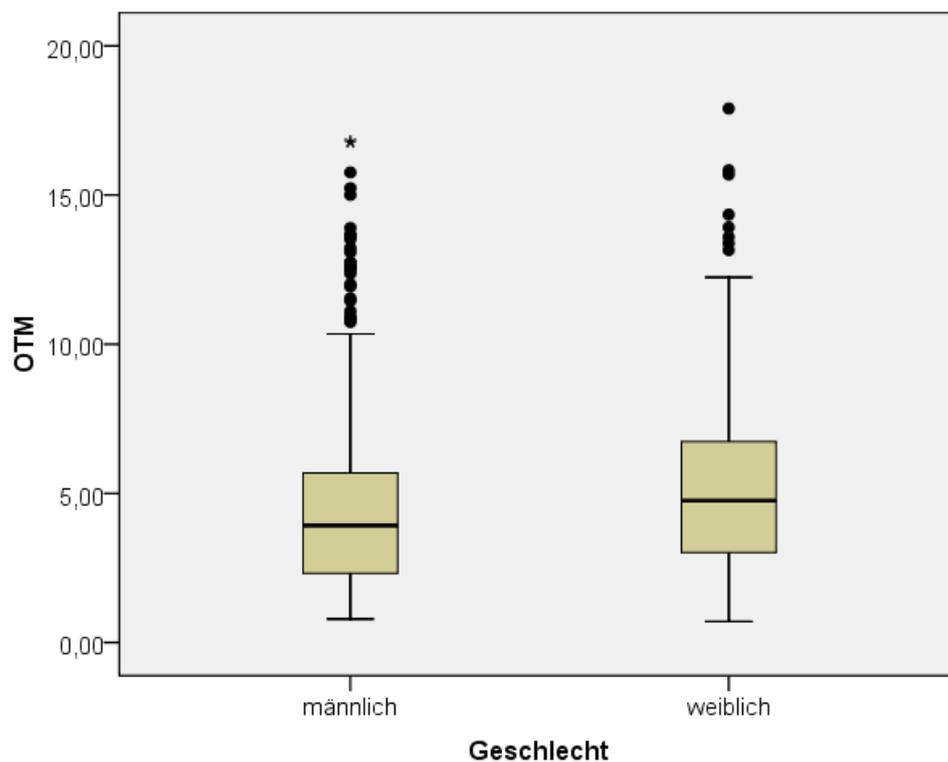


Abbildung 22: Boxplotdarstellung der DNA- Fragmentierung gemessen mithilfe des OTM in Abhängigkeit vom Geschlecht.

4.3.2 Alter

Das mittlere Alter der Probanden betrug 42,59 Jahre ($s= 15,43$). Es wurden 2 Subgruppen gebildet: 19 Patienten unter 40 Jahre und 28 Personen über 40 Jahre.

Jüngere Patienten (unter 40 Jahren) weisen einen um das 1.3-fache (95%KI 1.0-1.5) signifikant ($p=0,012$) höheren OTM-Wert als ältere Patienten auf (Abb. 23).

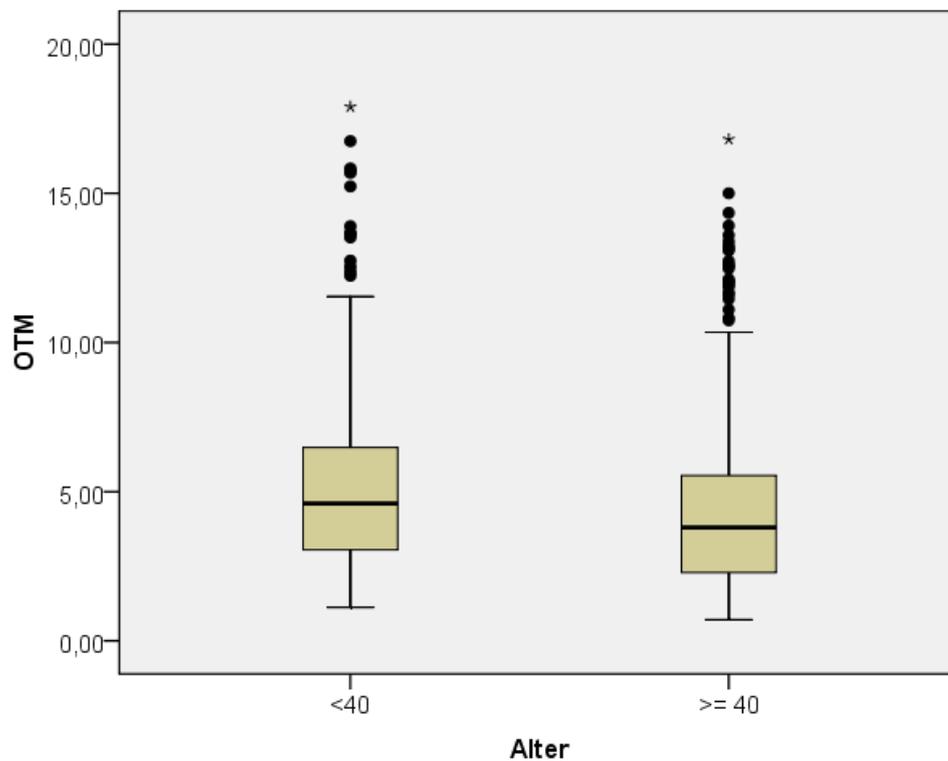


Abbildung 23: Boxplotdarstellung der DNA- Fragmentierung gemessen mithilfe des OTM in Abhängigkeit vom Alter.

4.3.3 Allergien

12 (25,5%) Patienten gaben an eine bekannte Allergie zu haben. Dabei konzentrierte man sich vor allem auf Allergene von Pollen, Tierhaaren und Milben, die auf den Respirationstrakt einwirken.

Es konnte nur ein geringer, nichtsignifikanter Einfluss von Allergien in der Vorgeschichte gezeigt werden ($p=0,277$). Dieser Einfluss zeigt sich in einem um den Faktor 1.1 (95% KI 0,9-1,4) erhöhten OTM-Wert bei Nichtallergikern (Abb. 24).

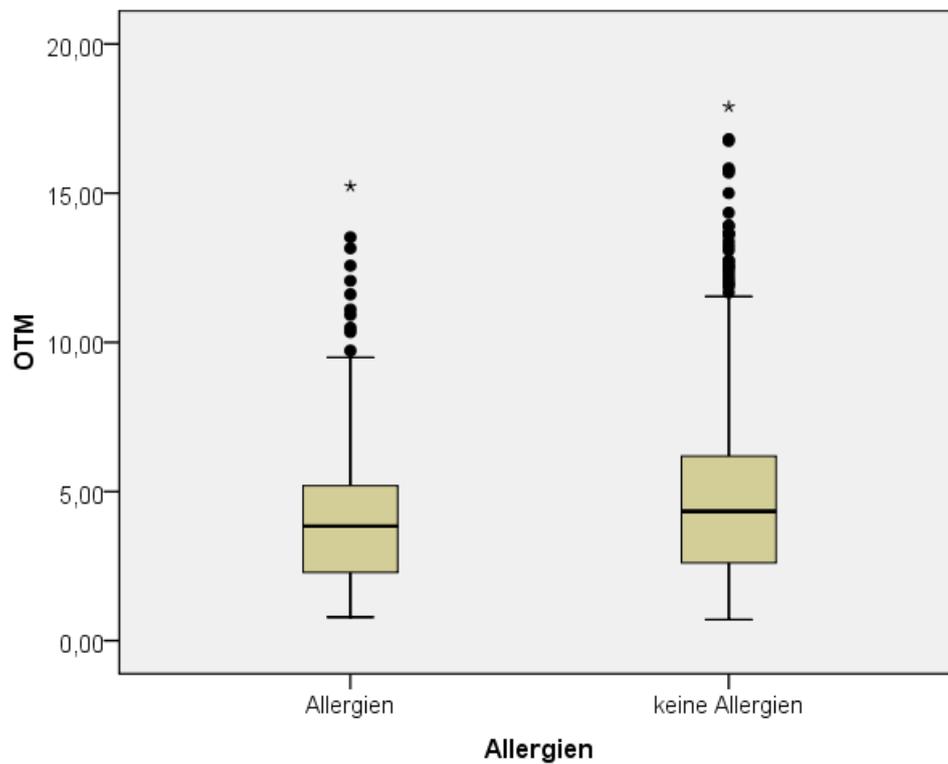


Abbildung 24: Boxplotdarstellung der DNA-Fragmentierung gemessen mithilfe des OTM in Abhängigkeit von der Allergienanamnese.

4.3.4 Alkohol

40% der Frauen und 84% der Männer gaben an gelegentlich, aber auch zum Teil regelmäßig Alkohol zu konsumieren. Insgesamt waren 5 weibliche und 9 männliche Patienten laut eigenen Angaben vollständig abstinent. Es sollte untersucht werden, ob jegliche Form des Alkoholkonsums die OTM- Werte und damit den Grad der DNA- Schädigung beeinflussen.

Es konnte dabei jedoch kein signifikanter Einfluss festgestellt werden. Patienten mit Alkoholkonsum wiesen einen um das 1.2-fache (95%KI 0,9-1,5) höheren OTM-Wert auf, als diejenigen, die nie alkoholische Getränke zu sich nahmen (Abb.25).

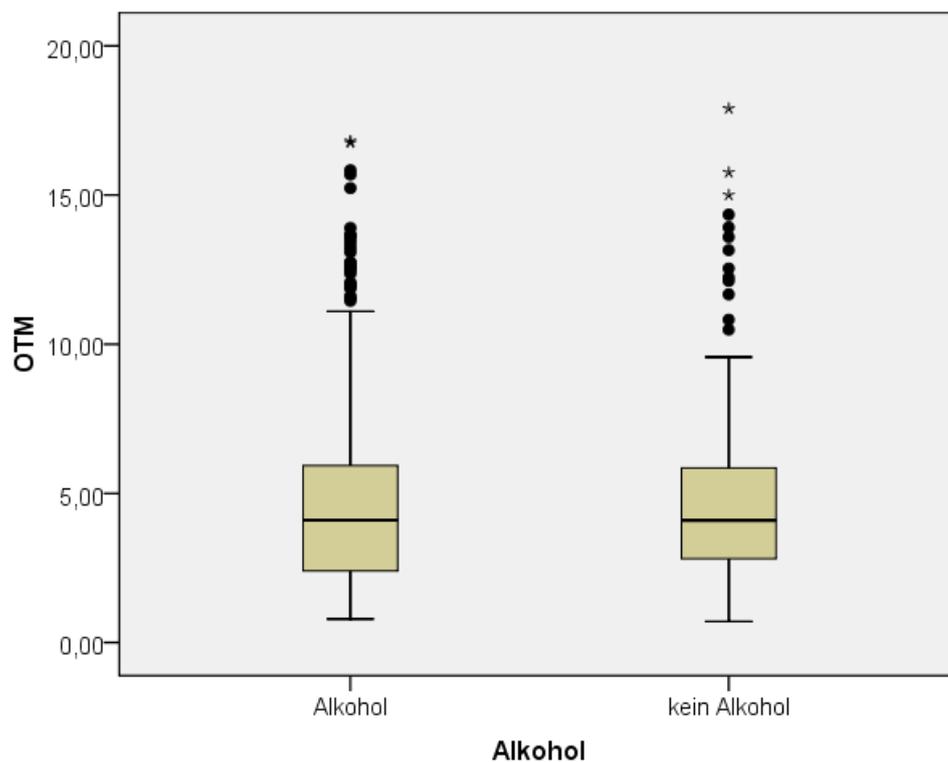


Abbildung 25: Boxplotdarstellung der DNA- Fragmentierung gemessen mithilfe des OTM in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum.

4.3.5 Nikotin

14 (43,7%) Männer und 5 (33%) Frauen gaben an Nikotin in Form von Zigaretten zu konsumieren. Dabei variierte die Menge von gelegentlich bis zu einer Schachtel pro Tag. Auch bei vorgeschädigtem respiratorischem Epithel durch Zigarettenrauch konnte keine signifikante Erhöhung der OTM- Werte nachgewiesen werden. Raucher wiesen einen um das 1.1-fache (95%KI 0,9-1,3) höheren OTM-Wert als Nichtraucher auf (Abb.26).

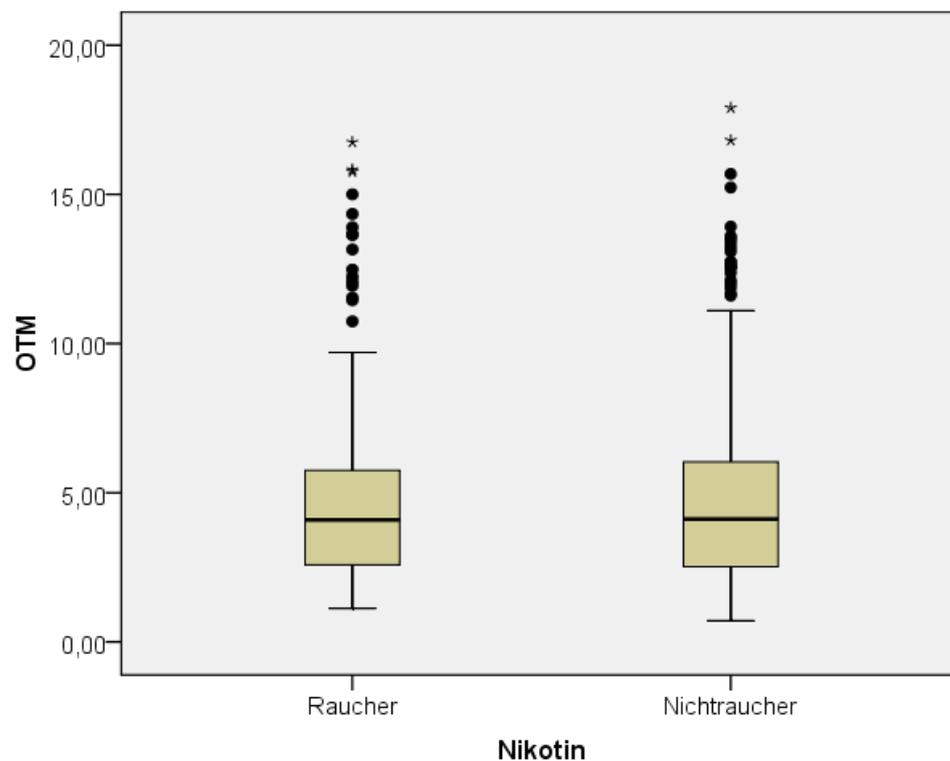


Abbildung 26: Boxplotdarstellung der DNA- Fragmentierung gemessen mithilfe des OTM in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum.

5 Diskussion

5.1 Gastroösophagealer Reflux

Es wurde eine Studie durchgeführt, in der untersucht wurde, welchen Einfluss Magensaft und dessen Bestandteile auf die menschliche Nasenschleimhaut haben. Steigt Magensaft aus dem Magen über die Speiseröhre in den Nasen- Rachenraum auf, spricht man von nasopharyngealem Reflux.

Es ist erwiesen, dass Reflux in der Speiseröhre Veränderungen der Schleimhaut bis hin zu Tumorentstehung verursachen kann (Ofman, 2001).

Ähnliches wird es auch für das Schleimhautepithel des Nasen- Rachen- Raumes vermutet, wenn der Magensaft weiter nach oben gelangt. Neben bekannten Risikofaktoren, wie Nikotin und Alkohol, wird auch laryngopharyngealer Reflux mit der Karzinomentstehung in Verbindung gebracht. So zeigte sich bei Patienten mit Larynxkarzinomen ein häufigeres Auftreten von Reflux im oberen Aerodigestivtrakt (Dagli et al., 2004). Die meisten Untersuchungen berufen sich dabei allerdings auf die Analyse von Fallserien statt großer epidemiologischer Studien. Prospektive beobachtende Langzeitstudien wären hilfreich, um den Zusammenhang von Reflux und Kopf- Hals- Malignomen zu überprüfen. In unseren Untersuchungen wurden Miniorgankulturen bzw. Epithelzellen mit Magensaft und dessen Bestandteilen inkubiert, um die in- vivo- Refluxsituation zu imitieren. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Dies entspricht nicht ganz der in-vivo- Situation, wo bis zu 50 Episoden pro Tag noch als physiologisch gelten können. Die Untersuchungen von Oertel haben gezeigt, dass wiederholte Exposition der MOCs nicht zu signifikanten Unterschieden der OTM-Werte als Maß für die genotoxische Wirkung von Reflux führt. Pearson et al. weisen jedoch darauf hin, dass bereits einzelne Refluxereignisse das respiratorische Epithel schädigen können (Pearson et al., 2011).

Ein maßgeblicher Faktor in der Refluxtherapie stellt eine Reduktion der Magensäureproduktion mittels Protonenpumpeninhibitoren dar (PPI). Dennoch lassen sich unter PPI- Anwendung weiterhin Pathologien beobachten, was die Frage offen lässt, welche anderen Bestandteile an der Pathogenese beteiligt sein könnten oder ob eine Absenkung des pH- Wertes überhaupt als ursächlich angesehen werden kann (Mertens et al., 2010). Die Bestimmung der pH-Werte der humanen Magensaftproben zeigte, dass 22% der analysierten Proben einen alkalischen pH-Wert aufwiesen. Der nichtsaure bzw. schwach alkalische Reflux wird bislang wenig beachtet (Bashashati et al., 2014, Boeckxstaens und Smout, 2010). Vor diesem Hintergrund sollten Folgestudien auch das pH-Spektrum > 7 berücksichtigen.

5.2 Miniorgankulturen

Im Rahmen der Untersuchung von Tumorentstehung werden in in- vitro- Studien meist Zellkulturen verwendet. Dabei gibt es Hinweise, dass Interaktionen zwischen Epithelzellen und Stroma entscheidend für die Entwicklung von Plattenepithelkarzinomen sind (Underwood et al., 2010).

Malignome des oberen Aerodigestivtraktes entstehen aus dem Zusammenspiel individueller Suszeptibilität und exogener Noxen. Zur Untersuchung dieses Zusammenwirkens in- vitro wird ein Versuchssystem benötigt, das die Verhältnisse in- vivo optimal nachbildet und die kontrollierte Exposition der Zielzellen gegenüber potenziell schädigenden Einflüssen erlaubt.

Das Modell der Miniorgankulturen humaner nasaler Schleimhaut kann diese Anforderungen erfüllen. Da die Zellen in ihrem organspezifischen Verband verbleiben, kommen die Versuchsbedingungen dem lebenden Organismus sehr nahe. Untersuchungen zur Permeabilität von niedermolekularen Arzneimitteln durch die Arbeitsgruppe um Chemuturi ergaben, dass es große Unterschiede zwischen der Durchlässigkeit von respiratorischem Epithel in Zellkulturen und bei Gewebestücken in Abhängigkeit von der Substanz gab (Chemuturi et al, 2005).

Der Vergleich von Miniorganen und Epithelzellen zeigte insgesamt ähnliche Ergebnisse nach Inkubation mit den unterschiedlichen Schädigungssubstanzen, jedoch waren die OTM- Werte bei den Epithelzellen höher als bei den MOCs. Aufgrund der geringen Zahl an Experimenten mit Epithelzellen lassen sich erst nach einer vergleichbaren Anzahl an Experimenten endgültige Schlüsse ziehen.

Kleinsasser beschrieb bereits, dass im Vergleich zu Untersuchungen an Einzelzellen das Schädigungsniveau in Organkulturen etwas niedriger zu sein scheint (Kleinsasser et al., 2001). Erklärbar wäre das zum einen damit, dass im Gewebeverbund der Fremdstoff vorwiegend mit den äußeren Zellen des Organs in Verbindung tritt. Weitere Gründe für die geringere DNA-Schädigung könnten aber auch eine aufrechterhaltene metabolische Kompetenz, welche für eine „Entgiftung“ der Fremdstoffe verantwortlich ist, sowie der Informationsaustausch zwischen Zellen im epithelialen Verband darstellen. Auch Olive und Durand (Olive und Durand, 1994) vermuteten einen Kontakteffekt als Ursache für die Resistenz der von ihnen untersuchten Sphäroidzellen.

Wir wählten für unsere Versuche eine einstündige Inkubationszeit in Anlehnung an das etablierte Protokoll (Oertel, 2008). Unmittelbar nach Ende der Inkubationszeit erfolgte die Auswertung mittels Comet Assay. Andere Arbeitsgruppen weisen darauf hin, dass ein Großteil der DNA- Reparaturmechanismen in den ersten 15 min. erfolgte und es damit zu einer Reduktion der OTM- Werte kam (Schuller, 2008). Die Reparaturfähigkeit der untersuchten

MOCs wurde von uns nicht analysiert. Die Auswertung direkt im Anschluss an die einstündige Inkubationszeit wurde beibehalten, um die Vergleichbarkeit mit vorangegangenen Studien zu erhalten.

5.3 Comet Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Messung der DNA- Schädigung die Einzelzell-Gelelektrophorese eingesetzt (Comet Assay). Das Comet Assay ist geeignet, auch kleine Änderungen in der Empfindlichkeit der Noxen sicher und reproduzierbar zu detektieren. Die beschriebene Methodik kann zur Bestimmung der Genotoxizität von Refluxat auf die respiratorische Mukosa herangezogen werden. Zur Vermeidung einer Beeinflussung der Ergebnisse durch zytotoxische Schäden, wurden nur Proben verwendet, die nach Kontrolle durch den Trypanblautest eine Vitalität von >80% aufwiesen. Zur Bias- Minimierung wurden die Experimente alle von der gleichen Person und doppelblind ausgewertet. Pro Objektträger wurden 50 Zellen durch den Untersucher manuell ausgewählt. Morphologisch erkennbare apoptotische und nekrotische Zellen wurden nicht mit in die Auswertung einbezogen (Brendler-Schwaab et al, 2005). Weiterhin wurden die zu messenden Schweiflängen manuell eingegeben, so dass sich dabei auch individuelle Unterschiede ergaben. Auch technische Veränderungen hatten einen Einfluss auf das Messergebnis. So zeigten sich je nach Leuchtkraft der UV- Lampe am Fluoreszenzmikroskop gering- bis mittelgradige Schwankungen in der OTM- Bestimmung.

Bereits geringe Abweichungen in der Methodik führten zu Veränderungen der absoluten Messwerte, so dass eine gewisse Erfahrung und Routine seitens des Experimentators notwendig sind. Trotzdem lassen sich methodische Fehler nicht vollständig vermeiden, aber zumindest minimieren.

5.4 Magensaft

In der vorliegenden Arbeit konnte mithilfe des Comet Assay gezeigt werden, dass ein niedriger pH- Wert eine signifikante Genotoxizität auf MOCs bewirkt. Das Modell zeigt, dass höhere Säurekonzentrationen zu einer signifikanten Steigerung von DNA- Strangbrüchen führen. Weiterhin konnte eine signifikante Zunahme von DNA- Strangbrüchen durch Exposition von MOCs mit humanem Magensaft gezeigt werden. Der artifizielle Magensaft (BATP) lieferte einen vergleichbaren, ebenfalls signifikanten Anstieg der OTM-Werte. Aufgrund dieses Ergebnisses war es möglich Komponenten von BATP separat zu testen.

Epithelzellen des Respirationstrakts sind primär gegenüber toxischen Umweltsubstanzen wie Tabakrauch, Luftschadstoffen und bakteriellen Partikeln exponiert. Im Rahmen von laryngopharyngealem Reflux geht man davon aus, dass sie auch mit Refluxatbestandteilen in Kontakt treten können. Das respiratorische Epithel stellt nicht nur eine mechanische Barriere zur Außenwelt dar, sondern ist auch wirksamer Vermittler von Immun- und Entzündungsreaktionen im Abwehrmechanismus der Atemwege. Die Epithelzellen exprimieren eine Vielzahl von Zytokinen, die in entzündlichen Atemwegsprozessen eine wichtige Rolle spielen, wie Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-8 (IL-8) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) (Knaapen et al, 2002, Wallner et al, 2005).

Die Produktion von Zytokinen stellt unter anderem einen Anhaltspunkt für die beständige metabolische Aktivität dieser über einen längeren Zeitraum kultivierten Mukosafragmente dar. Häufig verlieren in Kultur gehaltene Zellen schon nach wenigen Tagen die Fähigkeit, ihren Stoffwechsel und eine Bioaktivierung aufrecht zu erhalten. Dies ist meist mit einem Rückgang der Aktivität Fremdstoff metabolisierender Enzyme verbunden, wie dem Zytochrom P450 oder der Glutathion-S-Transferase (Cummings et al., 2000).

5.4.1 Pepsin

Laryngopharyngealer Reflux wird als entscheidender Risikofaktor in der Entstehung von laryngealen Plattenepithelkarzinomen angenommen. Bei Patienten mit einem Larynx- Karzinom wurde eine erhöhte Rate an GER detektiert (Dagli et al., 2004). Da nicht nur saurer Reflux schädigende Eigenschaften aufweist, liegt es nahe einzelne Komponenten des Refluxats zu untersuchen (Ford, 2005). Pepsin wird ausschließlich im Magen produziert und ist neben Salzsäure ein essentieller Bestandteil des Magensaftes. Es eignet sich als Marker um extraösophageale Manifestationen zu detektieren (Mims, 2008).

Bereits Ende der 60er Jahre konnten Goldberg et al. die schädigende Wirkung von Pepsin auf die ösophageale Mukosa nachweisen (Goldberg et al., 1969). Im Laufe der Zeit gab es dann immer wieder Hinweise dafür, dass im Rahmen des laryngopharyngealen Reflux Pepsin bis in den OADT aufsteigt und dort Läsionen begünstigt oder gar verursacht. So kann Pepsin einen Beitrag zur Pathogenese von chronischen Lungenerkrankungen und chronischer Otitis media bei Kindern leisten (Junqueira und Penna, 2007, Crapko et al., 2007). Samuels und Johnston zeigten, dass das Enzym im neutralen Milieu an hypopharyngealen Zellen einen deutlichen Anstieg in der Expression von Genen inflammatorischer Zytokine wie CCL20, CCL26, IL8, IL1F10, IL1A, IL5, BCL6, CCR6 und CXCL14 induzierte. Diese haben zum Teil einen bedeutenden Anteil an der Entstehung entzündlicher Erkrankungen im OADT (Samuels und Johnston, 2009).

Pepsin gelangt möglicherweise in epitheliale Zellen via Endozytose und verursacht Veränderungen im Golgi-Apparat und in den Mitochondrien (Saber und Ghanei, 2012).

Wir konnten zeigen, dass aktives Pepsin eine signifikante Erhöhung der OTM- Werte bewirkte und damit zu einer gesteigerten Zahl von DNA-Strangbrüchen führte. Wurde die Konzentration des Pepsins verringert, ließ sich kein signifikanter Einfluss mehr nachweisen. DNA-Strangbrüche stellen nur eine Form von zellschädigenden Mechanismen dar. Arbeiten von Johnston ergaben Hinweise darauf, dass Pepsin sowohl in Tumorzellen, als auch in normalen laryngealen Epithelzellen eine Erhöhung der Zellproliferation verursachte. Pepsin erhöhte die Expression mehrerer Gene, die mit Karzinogenese in Verbindung gebracht werden und zum Teil in humanen Kopf- Hals- Tumoren erhöht sind (Johnston et al., 2012).

Johnston hat in seiner Arbeitsgruppe außerdem eine gesteigerte Expression von Stressproteinen in ösophagealen und laryngealen Zellproben gemessen, welche zu Zellschäden führen können (Johnston et al., 2006). Folgeuntersuchungen in Zellkulturen könnten den Metabolismus der Zytotoxizität und anderen DNA- schädigenden Mechanismen von Pepsin untersuchen.

5.5 Duodenales Sekret

5.5.1 Trypsin

Als Bestandteil des duodenalen Sekrets und damit mögliche Komponente des gastroduodenalen Reflux, ist auch Trypsin als potentielle DNA- schädigende Substanz in Betracht zu ziehen. Dabei ist noch ungeklärt, ob Trypsin selbst oder eine durch das Enzym aktivierte Protease (Chymotrypsinogen, Proelastase, Carboxypeptidase) als Noxe wirken können. Im Rahmen der akuten Pankreatitis, welche durch fettreiche Nahrung und/oder Alkoholabusus verursacht werden kann, kommt es durch Proteinpräzipitation in den Pankreasgängen und einer Permeabilitätssteigerung der Epithelien zu einer Zellschädigung. Dabei ist die vorzeitige oder gesteigerte autokatalytische Aktivierung von Trypsinogen zu Trypsin maßgeblich beteiligt, welche zum Selbstverdau des Pankreas führt (Schmidt und Lang, 2007). In einer Untersuchung von Adhami am Tiermodell, wurde respiratorisches Epithel des Larynx in-vivo mit verschiedenen Komponenten des Magensaftes unter sauren Bedingungen bis pH 6 exponiert und anschließend visuell und histologisch evaluiert. Nach der Zugabe von Pepsin und konjugierten Gallensäuren ließen sich Zeichen der akuten und chronischen Entzündung nachweisen. Trypsin und weitere duodenale Bestandteile hingegen verursachten keine laryngealen Pathologien (Adhami et al., 2004). In dieser Studie wurde nicht berücksichtigt, dass das pH- Optimum des Trypsins bei pH 8 liegt. Auch unsere Versuche blieben auf den sauren pH- Bereich beschränkt. Weiterführende Untersuchungen sollten sowohl basische pH- Werte

einschließen, als auch gezielt Trypsin als Einzelkomponente überprüfen.

5.5.2 Gallensalze

Während es keinen Zweifel daran gibt, dass gastroösophagealer saurer Reflux verantwortlich für die Entstehung von Ösophagitis und deren Komplikationen ist, bleibt die Rolle duodener Bestandteile (Gallensäuren) in Krankheiten ösophagealer Mukosa unsicher. Jedoch gibt es ausreichend Hinweise dafür, dass sowohl im Bereich der Speiseröhre, als auch im OADT Gallensalze Pathologien hervorrufen können (Galli et al., 2003). Experimente an humanen respiratorischen Zellkulturen zeigten dass Chenodeoxycholsäure die TGF- β 1- Produktion und die Fibroblasten- Proliferation steigerten. So ergaben sich Hinweise, dass der Eintritt von Gallensäuren in die Luftwege zu Fibrose führen kann (Perng et al., 2007). Weiterhin sind zytotoxische Effekte wie zum Beispiel die Modulation der Golgi- Membran und Induktion der Cyclo-Oxygenase-2- Expression bekannt (Jolly et al., 2004, Byrne et al., 2010). An ösophagealen Zellen konnte bei neutralen pH- Werten durch Einfluss von Deoxycholsäure eine NF- κ B- Aktivierung und Induktion der IL- 8- Expression nachgewiesen werden (Jenkins et al., 2004). Im Gastrointestinaltrakt hat zusätzlich zum sauren Reflux auch der alkalische Reflux Potential die ösophageale Schutzbarriere der Mukosa durch Modulation von Tight Junction Proteinen zu unterbrechen (Chen et al., 2011). Ähnliche Mechanismen wären beim respiratorischen Epithel denkbar.

In der vorliegenden Arbeit konnte durch einen Gallensäuremix aus konjugierten und unkonjugierten Gallensäuren zwar kein eindeutig signifikantes Schädigungspotential nachgewiesen werden, jedoch war das Signifikanzlevel mit $p=0,068$ grenzwertig und die Anzahl der Versuche mit $n=7$ relativ gering. Es wäre möglich, dass eine größere Versuchsanzahl noch andere Ergebnisse zeigen würde. Wie bei allen durchgeführten Untersuchungen zeigten sich bei abnehmenden pH- Werten steigende OTM- Werte, was vor allem auf das Schädigungspotential der Salzsäure zurückgeführt werden kann. Wir untersuchten nur die pH- Konditionen von 3 bis 6,5. Sowohl stark saure, als auch alkalische Werte wurden nicht betrachtet. pH- Werte unter 3 konnten nicht untersucht werden, da die Zellen dann nekrotisierten und sich vermehrt ablösten. Eine Abnahme der vitalen Zellen bei sinkendem pH- Wert wurde ebenfalls in Studien von Sarosi et al. beobachtet (Sarosi et al., 2005). Allerdings führte bei Barrett's Adenokarzinomzellen der abnehmende extrazelluläre pH zu einem sinkendem intrazellulärem pH- Wert. Dieses ging mit einer gesteigerten Proliferation und einer verminderten Apoptose in den Tumorzellen einher (Souza et al., 2002). Möglicherweise spielen Gallensäuren in stark

saurem Reflux auch keine Rolle, da sie bei einem pH- Wert unter 4 zunehmend unlöslich werden und präzipitieren (Vaupel, 2008).

Während der Gallensäure- Mix in einer der in-vivo durchschnittlichen vorkommenden Konzentration von 250µM eingesetzt wurde, untersuchten wir den Einfluss der Glycochenodeoxycholsäure, als einen Hauptbestandteil von Galle, in Anlehnung an vorbeschriebene Studien, in einer im Vergleich zum Mix deutlich erhöhten Konzentration von 200µM, um mögliche genotoxische Potentiale zu betrachten (Jolly et al, 2004). Hierbei konnte eine signifikante Steigerung der OTM- Werte gemessen werden, welche die Vermutungen bestätigt, dass Gallensalze insgesamt oder aber nur im speziellen DNA- schädigende Eigenschaften besitzen. Die Konzentrationen der Gallensalze im Magensaft variieren stark. Doch selbst wenn Gallensalzbestandteile im ösophagealen Reflux noch messbar sind, ist es gut möglich, dass bei Eintritt in den Larynx/ Pharynx die Konzentrationen unterhalb der messbaren Grenze sind, aufgrund der starken Verdünnung durch Speichel und Sekrete des OADT.

Bezüglich der Mechanismen von Gallensäure- induzierter Karzinogenese ist die Studienlage noch lückenhaft. Viele Untersuchungen zur Genotoxizität wurden an Zellen des Gastrointestinaltrakts durchgeführt. Durch Natrium- Deoxycholat im neutralen Milieu verursachte DNA- Strangbrüche konnten mittels Comet- Assay gemessen werden und können damit zur Genese und Progression des Barrett- Ösophagus beitragen (Jolly et al., 2004). In einer Arbeit von Jenkins et al. wurde eine erhöhte Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies durch Gallensalze im neutralen und sauren Bereich an ösophagealen Zellen gemessen. Dies gibt Hinweise auf die Verursachung oxidativen Stresses und einen Mechanismus der Gallensäuren- induzierten Genotoxizität (Jenkins et al., 2007). Unter Einsatz weiterer analytischer Methoden sollten detailliertere Untersuchungen zum schädigenden Potential von Gallensalzen durchgeführt werden.

5.6 Auswertung anamnestischer Merkmale

Alkohol und Nikotin gelten neben anderen Komponenten als Hauptrisikofaktoren in der Entstehung von Kopf- Hals- Tumoren. Eine Auswertung der präoperativ durchgeführten Anamnesebögen sollte in Zusammenschau mit den experimentell gewonnenen Messwerten Hinweise darauf geben, ob eine Prädisposition bei bestimmten Patientenmerkmalen erkennbar ist. Sowohl bei Patienten mit Alkohol-, als auch mit Nikotinkonsum in der Vorgeschichte konnte nur eine geringfügige Erhöhung der OTM- Werte gezeigt werden. Durch die Auswertung der anamnestischen Daten konnte dargestellt werden, dass mögliche

Vorschädigungen durch bekannte Noxen wie Alkohol und Nikotin die Ergebnisse unserer Messungen nicht beeinflusst haben. Gleiches gilt für Allergien und das Alter der Patienten.

Der beobachtete signifikante Unterschied zwischen Männern und Frauen wird nicht signifikant, wenn man nur die Standardkontrollen vergleicht. Damit könnten die gefundenen signifikanten Unterschiede auf die unterschiedlichen Gruppenstärken, das Verhältnis Männern zu Frauen lag bei 2:1, zurückgeführt werden. Arbeiten von Harréus et al. berichteten ebenfalls über eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber Noxen und einem damit verbundenen gesteigerten OTM- Wert bei weiblichen Probanden im Vergleich zu männlichen (Harréus et al., 1999).

Weiterhin wurden 2 Altersgruppen gebildet und es zeigte sich, dass jüngere Patienten (<40 Jahre) signifikant höhere OTM- Werte aufwiesen als die Gruppe der Über- 40- Jährigen ($p=0,012$). Diese Ergebnisse unterscheiden sich von der Arbeit von Oertel, welche keinen Einfluss von Alter oder Geschlecht nachweisen konnte (Oertel, 2008). Eine Erklärung für eine gesteigerte Anzahl von DNA- Strangbrüchen bei jüngeren Patienten könnte sein, dass dort im Vergleich zu älteren Patienten eine gesteigerte Frequenz der Zellteilung bzw. der DNA-Replikation zu beobachten ist.

6 Zusammenfassung

Das Auftreten von Neoplasien im oberen Aerodigestivtrakt zeigt weiterhin eine steigende Tendenz. Neben Hauptrisikofaktoren wie Alkohol- und Tabakkonsum nehmen Magensaftbestandteile im Rahmen von laryngopharyngealem Reflux (LPR) an Bedeutung zu. Dies erfordert neben der Ergründung endogener Ursachen eine genauere Untersuchung potentiell kanzerogener Substanzen und betroffener Risikogruppen.

Aufbauend auf vorangegangene Studien wurde in der vorliegenden Arbeit mithilfe des MOC-Modells das genotoxische Potential von Refluxat und seiner Einzelkomponenten analysiert.

Neben dem über HCl-vermittelten Einfluss des pH- Wertes gelang es im vorliegenden Modellsystem, einen signifikanten Einfluss von Pepsin und Gallensalzen auf die DNA-Stabilität von Nasenmuschlelepidhellen nachzuweisen. Damit stellt das gewählte Modellsystem eine gute Alternative zum Tierexperiment dar.

Insbesondere die nachgewiesene Signifikanz des Einflusses von Pepsin und GCDA könnten eine Veränderung des bisherigen Therapieregimes vorantreiben, um Reflux- assoziierte Pathologien unabhängig vom pH- Wert zu reduzieren.

Die alkalische Einzelzellelektrophorese ist geeignet, um genotoxische Suszeptibilität an humaner respiratorischer Nasenschleimhaut zu untersuchen und so potentiell gefährdete Patienten frühzeitig zu identifizieren. Dadurch könnten Präventivmaßnahmen eingeleitet werden, die eine mögliche Induktion der Tumorgenese vermeiden.

Weiterführende prospektive klinische Studien sollten das Augenmerk auf Reflux- bedingte Veränderungen im OADT legen, die durch LPR hervorgerufen werden können.

7. Literatur

- Adhami T, Goldblum J R, Richter, J E, Vaezi M F, Ph D (2004). The Role of Gastric and Duodenal Agents in Laryngeal Injury : An Experimental Canine Model, (2), 2098–2106.
- Agarwal S, Tafel A A, Kanaar R (2006). DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA Repair*, 5(9-10), 1075–81.
- Baldini F, Bechi P, Cianchi F, Falai A, Fiorillo C, Nassi P (2000). Analysis of the optical properties of bile. *Journal of Biomedical Optics*, 5(3), 321–9.
- Barrett AJ, Kirschke H. (1981). Cathepsin B, Cathepsin H and Cathepsin L. *Methods Enzymol.*, 80, 535–61.
- Bashashati M, Hejazi R A, Andrews C N, Storr M A, (2014). Gastroesophageal reflux symptoms not responding to proton pump inhibitor : GERD , NERD , NARD , esophageal hypersensitivity or dyspepsia ? *Can J Gastroenterol Hepatol.*, 28(6), 335–341.
- Bauer MF, Herzog V. (1988). Mini organ culture of thyroid tissue: a new technique for maintaining the structural and functional integrity of thyroid tissue in vitro. *Lab Invest.*, 59(2), 281–91.
- Boeckxstaens G E, Smout A (2010). Systematic review: Role of acid, weakly acidic and weakly alkaline reflux in gastro-oesophageal reflux disease. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 32(May), 334–343.
- Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S, Speit G (2005). The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis*, 20(4), 245–54.
- Byrne A-M, Foran E, Sharma R, Davies A, Mahon C, O’Sullivan J, Long A (2010). Bile acids modulate the Golgi membrane fission process via a protein kinase Ceta and protein kinase D-dependent pathway in colonic epithelial cells. *Carcinogenesis*, 31(4), 737–44.
- Chemuturi N V, Hayden P, Klausner M, Donovan M D (2005). Comparison of human tracheal/bronchial epithelial cell culture and bovine nasal respiratory explants for nasal drug transport studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(9), 1976–85.
- Chen X, Oshima T, Tomita T, Fukui H, Watari J, Matsumoto T, Miwa H (2011). Acidic bile salts modulate the squamous epithelial barrier function by modulating tight junction proteins, *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2, 203–209.
- Crapko M, Kerschner J E, Syring M, Johnston N (2007). Role of extra-esophageal reflux in chronic otitis media with effusion. *The Laryngoscope*, 117(8), 1419–23.
- Cummings B S, Lasker J M, Lash L H (2000). Expression of glutathione-dependent enzymes and cytochrome P450s in freshly isolated and primary cultures of proximal tubular cells from human kidney. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 293(2), 677–85.
- Dagli Ş, Dagli Ü, Alkim C, Şahin B (2004). Laryngopharyngeal reflux in laryngeal cancer Larenks kanserinde larengofarengal reflü. *Journal of Gastroenterology*, 15(2), 77–81.

- Dennebaum R (2008a). Extravasale Körperflüssigkeiten. In Thomas L. (Ed.), *Labor und Diagnose*. (7. Auflage., p. 1812). Frankfurt/M.: TH- Books.
- Dennebaum R (2008b). Extravasale Körperflüssigkeiten. In Thomas L. (Ed.), *Labor und Diagnose*. (7. Auflage., p. 1800). Frankfurt/M.: TH- Books.
- Dennebaum R (2008c). Extravasale Körperflüssigkeiten. In Thomas L. (Ed.), *Labor und Diagnose*. (7. Auflage., pp. 1805–06). Frankfurt/M.: TH- Books.
- Forastiere A, Koch W, Trotti A, Sidransky D (2001). Head and Neck Cancer. *N Engl J Med*, 26(345), 1890–1900.
- Ford C N (2005). Evaluation and management of laryngopharyngeal reflux. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 294(12), 1534–1540.
- Freedman J, Ye W, Näslund E, Lagergren J (2001). Association between cholecystectomy and adenocarcinoma of the esophagus. *Gastroenterology*, 121(3), 548–553.
- Galli J, Calò L, Agostino S, Cadoni G, Sergi B, Cianci R, Cammarota G. (2003). Bile reflux as possible risk factor in laryngo- pharyngeal inflammatory and neoplastic lesions. *ACTA OTORHINOLARYNGOL ITAL*, 23(5), 377–382.
- Goldberg HI, Dodds WJ, Gee S, Montgomery C, Zboralske F F (1969). Role of acid and pepsin in acute experimental esophagitis. *Gastroenterology*, 56(2), 223–30.
- Harréus U, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H. (1999). Genotoxic effect on human mucous membrane biopsies of the upper aerodigestive tract. *Laryngo-Rhino-Otol*, 78(4), 176–81.
- Ihbe J (2004). Entwicklung eines Modells zur Testung der Genotoxizität von Umweltstoffen anhand von Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosazellen.
- Issing W J, Gross M (2001). Manifestationen gastroösophagealem Reflux. *Laryngo-Rhino-Otol* 2001; 80(8), 8, 464–469.
- Jaiswal K, Tello V, Lopez-Guzman C, Nwariaku F, Anthony T, Sarosi G A (2004). Bile salt exposure causes phosphatidyl-inositol-3-kinase-mediated proliferation in a Barrett's adenocarcinoma cell line. *Surgery*, 136(2), 160–8.
- Jenkins G J S, D'Souza F R, Suzen S H, Eltahir Z S, James S A, Parry J M, Baxter J N (2007). Deoxycholic acid at neutral and acid pH, is genotoxic to oesophageal cells through the induction of ROS: The potential role of anti-oxidants in Barrett's oesophagus. *Carcinogenesis*, 28(1), 136–42.
- Jenkins G J S, Harries K, Doak S H, Wilmes A, Griffiths A P, Baxter J N, Parry J M (2004). The bile acid deoxycholic acid (DCA) at neutral pH activates NF-kappaB and induces IL-8 expression in oesophageal cells in vitro. *Carcinogenesis*, 25(3), 317–23.
- Johnston N, Dettmar PW, Lively MO, Postma GN, Belafsky PC, Birchall M, Koufman J (2006)Effect of pepsin on laryngeal stress. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 115(1).
- Johnston N, Yan J C, Hoekzema C R, Samuels T L, Stoner G D, Blumin J H, Bock J M (2012). Pepsin promotes proliferation of laryngeal and pharyngeal epithelial cells. *The Laryngoscope*, 122(6), 1317–25.

- Jolly AJ., Wild CP., Hardie L J. (2004). Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines. *Mutagenesis*, 19(4), 319–324.
- Junqueira J C D F, Penna F J (2007). Nasopharyngeal pH and gastroesophageal reflux in children with chronic respiratory disease. *Jornal de Pediatria*, 83(3), 225–32.
- Kalbitzer H (2014). Proteine- Analytische Untersuchungsmethoden, Synthese und Isolierung. In Graeve L. Heinrich P, Müller M (Ed.), *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (9. Auflage., pp. 86–99). Heidelberg: Springer Verlag.
- Kleinsasser N H, Gamarra F, Bergner A, Wallner, B C, Harréus U A, Juchhoff J., Huber R M (2001). Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelia and the comet assay. *ORL; Journal for Oto-Rhino-Laryngology and Its Related Specialties*, 63(3), 141–7.
- Knaapen, A M, Schins R P F, Polat D, Becker A, Borm P J A (2002). Mechanisms of neutrophil-induced DNA damage in respiratory tract epithelial cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 234-235(1-2), 143–51.
- Koufman, J. A. (1991). The otolaryngologic manifestations of gastroesophageal reflux disease (GERD): a clinical investigation of 225 patients using ambulatory 24-hour pH monitoring and an experimental investigation of the role of acid and pepsin in the development of laryngeal. *Laryngoscope*. 101(4 Pt 2 Suppl 53):1-78.
- Krebs in Deutschland 2007/2008*. (2012) (8. Ausgabe.). Berlin: Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. Retrieved from www.rki.de/krebs, Aufgerufen am 13.2.2014
- Madura J. A. (2003). Primary bile reflux gastritis: diagnosis and surgical treatment. *The American Journal of Surgery*, 186(3), 269–273.
- Maier H, Tisch M. (1999). Beruf und Krebs im Kopf-Hals-Bereich. *HNO*, 47, 1025–1037.
- Marshall R E, Anggiansah A, Owen W A, Owen W J (1997). The relationship between acid and bile reflux and symptoms in gastro-oesophageal reflux disease, *Gut* 1997;40:182-187
- Matikainen M, Laatikainen T, Kalima T, Kivilaakso E (1982). Bile acid composition and esophagitis after total gastrectomy. *American Journal of Surgery*, 143(2), 196–8.
- Mertens V, Blondeau K, Vanaudenaerde B, Vos R, Farre R, Pauwels A, Sifrim D (2010). Gastric Juice From Patients “On” Acid Suppressive Therapy Can Still Provoke a Significant Inflammatory Reaction by Human Bronchial Epithelial Cells. *Journal of Clinical Gastroenterology*. Nov-Dec;44(10):e230-5
- Mims J W (2008). The impact of extra-esophageal reflux upon diseases of the upper respiratory tract. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery*, 16(3), 242–6.
- Nouspikel T, Hanawalt P C (2002). DNA repair in terminally differentiated cells. *DNA Repair*, 1(1), 59–75.
- Oertel K (2008). Testung des Einflusses unterschiedlicher pH-Bedingungen auf die DNA-Stabilität anhand von Miniorgankulturen / Etablierung eines Modells.

- Ofman J J (2001). Disease and Esophageal and Head and Neck Cancers : A Critical Appraisal of Epidemiologic Literature. *Am J Med. 111 Suppl 8A*,124S-129S.
- Olive P L, Banáth J P (1993). Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: “tail moment” as a function of position in the cell cycle. *Mutation Research, 294*(3), 275–83.
- Olive P L, Durand R E (1994). Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Reviews, 13*(2), 121–38.
- Ostling O, Johanson K J (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications, 123*(1), 291–298.
- Vaupel P (2008). Funktionen des Magen-Darm-Trakts. In Lang F. Schmidt Robert F. (Ed.), *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* (30. Auflag., p. 885). Heidelberg: Springer Verlag.
- Pearson JP, Parikh S, Orlando RC, Johnston N, Allen J, Tinling SP, Johnston N, Belafsky P, Arevalo LF, Sharma N, Castell DO, Fox M, Harding SM, Morice AH, Watson MG, Shields MD, Bateman N, McCallion WA, van Wijk MP, Wenzl TG, Karkos PD, Belafsky P C (2011). Review article: reflux and its consequences--the laryngeal, pulmonary and oesophageal manifestations. Conference held in conjunction with the 9th International Symposium on Human Pepsin (ISHP) Kingston-upon-Hull, UK, 21-23 April 2010. *Aliment Pharmacol Ther, 33*(April 2010), 21–23.
- Pepsin - Worthington Enzyme Manual. <http://www.worthington-biochem.com/pm/default.html>, aufgerufen am 15.2.2013
- Perng D-W, Chang K-T, Su K-C, Wu Y-C, Wu M-T, Hsu W-H, Lee Y-C (2007). Exposure of airway epithelium to bile acids associated with gastroesophageal reflux symptoms: a relation to transforming growth factor-beta1 production and fibroblast proliferation. *Chest, 132*(5), 1548–56.
- Postma G N, Tomek M S, Belafsky P C, Koufman J A (2001). Esophageal motor function in laryngopharyngeal reflux is superior to that in classic gastroesophageal reflux disease. *The Annals of Otolaryngology, Rhinology, and Laryngology, 110*(12), 1114–6.
- Rydberg B, Johanson K J (1978). Estimation of DNA Strand Breaks in Single Mammalian Cells. In Hanawalt P, Friedberg E and Fox C (Ed.), *DNA Repair Mechanisms* (pp. 465–468).
- Saber H, Ghanei M (2012). Extra-esophageal manifestations of gastroesophageal reflux disease: controversies between epidemiology and clinic. *The Open Respiratory Medicine Journal, 6*, 121–6.
- Samuels T L, Johnston N (2009). Pepsin as a causal agent of inflammation during nonacidic reflux. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery : Official Journal of American Academy of Otolaryngology-Head and Neck Surgery, 141*(5), 559–63.
- Sarosi G A, Jaiswal K, Herndon E, Lopez-Guzman C, Spechler S J, Souza R F (2005). Acid increases MAPK-mediated proliferation in Barrett’s esophageal adenocarcinoma cells via

- intracellular acidification through a Cl⁻/HCO₃⁻- exchanger. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, 289(6), G991–7.
- Sassen A W, Richter E, Semmler M P, Harréus U A, Gamarra F, Kleinsasser N H (2005). Genotoxicity of nicotine in mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia. *Toxicological Sciences : An Official Journal of the Society of Toxicology*, 88(1), 134–41.
- Schmidt R F, Lang F (2007). *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie* (30. Auflag., p. 879). Heideberg: Springer Verlag.
- Schuller P R (2008). Quantifizierung genotoxischer Schäden an humanen Schleimhautzellen des oberen Aerodigestivtraktes.
- Schwarz M, Bock K W (1998). Mechanismen der Entstehung fremdstoffbedingter Krebsformen. In R. K. Ganten D. (Ed.), *Handbuch der Molekularen Medizin - Tumorerkrankungen* (pp. 27–50). Heidelberg: Springer Verlag.
- Seeberg E, Eide L, Bjørås M (1995). The base excision repair pathway. *Trends in Biochemical Sciences*, 20(10), 391–7.
- Seitz H K, Stickel F (2007). Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. *Nature Reviews. Cancer*, 7(8), 599–612.
- Sifrim D, Holloway R, Silny J, Tack J, Lerut A, Janssens J (2001). Composition of the postprandial refluxate in patients with gastroesophageal reflux disease. *The American Journal of Gastroenterology*, 96(3), 647–55.
- Singh NP; McCoyMT; Tice RR; Schneider E, Schneider E L (1988). Technique for Quantitation Damage in Individual of Low Levels of DNA Cells. *Electrophoresis*, 175(1), 184–191.
- Sjövall J (1960). Bile acids in man under normal and pathological conditions BILE ACIDS AND STEROIDS. *Clinica Chimica Acta*, 5(1), 33–41.
- Souza R F, Shewmake K, Terada LS, Spechler S J (2002) Acid exposure activates the mitogen-activated protein kinase pathways in Barrett’s esophagus. *Gastroenterology*, 122(2), 299–307.
- Statistisches Bundesamt. (2014). Sterbefälle insgesamt nach der ICD-10 im Jahr 2013. Retrieved from <https://www.destatis.de/DE/ZahlenFakten/GesellschaftStaat/Gesundheit/Todesursachen/Todesursachen.html>, aufgerufen am 13.2.2014
- Steinsvåg S K, Strand M, Berg O, Miaguchi M, Olofsson J (1991). Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *The Laryngoscope*, 101(12 Pt 1), 1323–31.
- Teissier E, Fennrich S, Strazielle N, Daval J L, Ray D, Schlosshauer B, Ghersi- Egea J F (1998). Drug metabolism in in vitro organotypic and cellular models of mammalian central nervous system: activities of membrane-bound epoxide hydrolase and NADPH-cytochrome P-450 (c) reductase. *Neurotoxicology*, 19(3), 347–55.

- Underwood T J, Derouet M F, White M J, Noble F, Moutasim K A, Smith E, Blaydes J P (2010). A comparison of primary oesophageal squamous epithelial cells with HET-1A in organotypic culture. *Biology of the Cell / under the Auspices of the European Cell Biology Organization*, 102(12),
- Vitale G C (1987). The Effect of Alcohol on Nocturnal Gastroesophageal Reflux. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 258(15), 2077.
- Wallner B C, Harréus U A, Gamarra F, Sassen A, Kleinsasser N H (2005). [Mini-organ cultures of human nasal mucosa. A model for eco-genotoxicological investigations]. *Hno*, 53(12), 1037–46.
- Whitehouse C J, Taylor R M, Thistlethwaite, A., Zhang, H., Karimi-Busheri, F., Lasko, D. D., Caldecott, K. W. (2001). XRCC1 stimulates human polynucleotide kinase activity at damaged DNA termini and accelerates DNA single-strand break repair. *Cell*, 104(1), 107–17.
- Zimmermann R, Budach W, Dammann F, Einsele H, Ruck P, Wehrmann M, Zenner H (2003). *Pharynx- und Larynxtumoren*. Retrieved from http://www.medizin.uni-tuebingen.de/uktmedia/EINRICHTUNGEN/Zentren/Tumorzentrum/PDF_Archiv/TLL/TL_L_PharynxLarynx.pdf, aufgerufen am 13.2.2014

8. Anlagen

8.1 OTM- Mittelwert

Tabelle 6: Mittelwerte der gemessenen OTM- Werte nach Schädigung mit humanem und artifiziiellen Magensaft

	posK	negK	pH 3	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	hGJ 3	hGJ 4,5	hGJ 5,5	hGJ 6,5	BATP 3	BATP 4,5	BATP 5,5	BATP 6,5
NM_91	12,57	1,98	4,28	3,63	2,96	1,86	7,54	6,62	6,44	4,19	5,72	5,72	5,75	3,51
NM_92	11,61	0,82					6,28	5,79	5,00	3,20	5,65	5,51	4,09	2,06
NM_94	10,49	1,67	3,83	2,94	3,24	1,48	4,98	4,59	3,91	2,85	4,99	4,08	3,99	2,79
NM_95	13,15	1,25	3,81	3,37	2,82	2,21	5,47	5,18	5,21	4,31	4,04	4,16	3,54	2,35
NM_96	12,54	1,46	4,47	4,01	3,76	1,65	6,20	5,43	4,45	3,23	5,50	5,49	4,06	2,69
NM_98	11,87	1,90					6,18	6,21	3,57	4,93	6,72	5,80	5,30	2,93

Tabelle 7: Mittelwerte der gemessenen OTM- Werte nach Schädigung mit Salzsäure und Pepsin

Pat.-ID	pos K	neg K	pH 3	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pep 3	pep 4,5	pep 5,5	pep 6,5
NM_27A	17,90	3,59	8,53	6,74	7,42	4,83	9,51	9,04	8,35	8,56
NM_29	16,81	1,87	6,68	6,30	6,29	3,79	7,19	7,71	6,71	8,41
NM_30	16,75	1,74	6,59	6,60	6,98	4,17	9,70	11,54	8,14	9,03
NM_31	13,64	2,36	6,28	5,74	4,58	3,84	6,09	7,12	6,09	5,70
NM_33	15,23	2,08	7,74	6,65	6,34	4,84	9,50	8,83	7,99	9,72
NM_34	13,59	1,88	5,06	4,56	3,99	3,47	7,13	7,95	5,58	6,74
NM_36	15,83	2,32	5,69	5,47	4,50	3,05	8,30	8,16	8,41	8,53
NM_37	15,69	2,40	7,61	6,48	5,41	5,65	10,25	7,91	7,56	9,49
NM_38	12,06	2,08	3,61	3,88	3,58	2,84	6,49	4,74	4,91	2,77
NM_39	13,38	2,34	6,05	5,05	4,79	3,33	8,76	8,02	7,34	7,31
NM_42	12,37	1,65	4,41	4,95	2,20	2,67	5,99	5,63	5,08	3,44

Tabelle 8: Mittelwerte der gemessenen OTM- Werte nach Schädigung mit Salzsäure, aktivem und hitzeinaktiviertem Pepsin

	pos K	neg K	pH 3	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	pep 3	pep 4,5	pep 5,5	pep 6,5	inakt 3	inakt 4,5	inakt 5,5	inakt 6,5
NM_46	12,48	1,52					7,56	6,39	2,01	2,29	2,95	3,09	2,78	1,90
NM_49	10,82	1,23					5,51	3,18	2,88	1,50	3,58	3,05	1,81	1,11
NM_43	14,34	2,21					6,21	5,71	3,33	3,01	5,74	4,74	3,82	2,12
NM_44	12,12	2,04					7,49	6,18	4,77	2,26	6,93	4,15	3,87	3,04
NM_45	12,01	1,48					5,05	3,97	2,85	1,57	4,90	4,35	2,56	3,33
NM_47	13,22	1,14					6,36	5,25	3,87	1,73	4,06	3,76	2,21	2,36
NM_50	13,08	2,24					6,50	6,44	3,39	2,97	5,36	5,25	2,66	2,45
NM_51	12,24	2,28					7,42	5,58	3,80	4,03	5,57	4,24	3,36	2,31
NM_53	15,00	2,28					8,58	7,21	6,33	1,97	4,07	5,08	4,60	2,76
NM_83	10,86	1,13	4,32	4,90	3,42	2,24	6,86	5,51	3,65	3,08	5,39	4,81	3,14	2,32
NM_82	13,52	3,08	5,28	4,62	3,86	1,52	6,15	5,26	4,58	2,91	5,32	4,73	4,34	2,86
NM_81	13,91	2,48	5,04	3,00	3,43	2,55	5,93	6,75	4,91	2,80	5,19	4,29	3,07	2,77
NM_80	12,60	2,17	5,10	4,70	2,05	1,93	7,72	6,21	3,29	2,28	5,69	5,10	3,03	1,64

Tabelle 9: Mittelwerte der gemessenen OTM- Werte nach Schädigung mit Salzsäure, Gallensalz-Mix und Glycochenodeoxycholsäure

Pat.-ID	pos K	neg K	pH 3	pH 4,5	pH 5,5	pH 6,5	BA 3	BA 4,5	BA 5,5	BA 6,5	GCDA 3	GCDA 4,5	GCDA 5,5	GCDA 6,5
NM_84	10,92	1,94	4,55	3,53	1,83	1,50	4,89	3,03	2,22	3,08	6,02	6,13	6,18	2,89
NM_87	11,45	1,69	5,14	2,61	3,16	2,57	5,20	4,54	2,20	2,98	5,62	4,88	3,82	3,55
NM_85	13,90	1,42	5,59	4,51	3,74	2,58	5,68	5,65	4,82	1,81	6,33	4,09	5,09	3,76
NM_86	13,67	1,67	4,90	4,54	3,54	2,97	6,93	4,64	3,39	3,14	5,00	5,77	3,68	3,57
NM_88	10,75	1,37	4,85	3,78	3,78	3,65	6,18	4,32	3,19	3,24	5,88	5,93	6,06	5,97
NM_89	9,23	1,36	4,00	2,44	2,35	1,87	4,12	3,62	3,31	2,19	4,54	3,65	3,78	1,45
NM_90	11,94	1,99	4,20	3,08	2,32	1,53	4,71	4,93	3,44	1,54	5,22	5,33	4,61	4,14

Tabelle 10: Mittelwerte der gemessenen OTM- Werte nach Schädigung ausgewachsener Epithelzellen mit Salzsäure, Gallensalz- Mix, Pepsin, humanem und artifiziellem Magensaft

	pos K	negK	Ph 4,5	pH 5,5	BA 4,5	BA 5,5	Pep 4,5	Pep 5,5	MS art4,5	MS art 5,5	MS hum 4,5	MS hum 5,5
EpC 3		1,84	3,06	2,67	7,17	4,40	5,11	2,73	4,54	5,75		
EpC 4		1,64	2,23	2,64	3,36	4,02	2,63	1,99				
			1,67	2,98	3,25	3,81	1,79					
EpC 5		2,19	5,39	3,26			3,28	3,50				
EpC 6	6,64								6,52	5,08		
	5,91								5,80	4,27		
EpC 7	13,05	1,45	4,41	2,90					4,58	4,09	6,01	5,68
		2,40	3,93	2,76					4,58	5,54	5,06	4,75
EpC 8	14,89	1,97							4,60		7,00	
EpC 9	12,80	2,61							6,69			
		3,23										

8.2 Konfidenzintervalle der Messwerte

Tabelle 11: Mittelwerte, Standardfehler und Konfidenzintervall der OTM- Werte der Positiv- und Negativkontrollen

Kontrollen		N	Mittelwert	Standardfehler	95% KI
OTM	pos	47	1,67	1,06	1,49-1,87
	neg	47	12,40	1,03	11,75-13,08

Tabelle 12: Mittelwerte und Konfidenzintervalle der gemessenen OTM nach Schädigung mit humanem Magensaft

hGJ	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
kein hGJ	5,47	4,7	6,38
hGJ	8,53	6,74	10,81

Tabelle 13: Mittelwerte und Konfidenzintervalle der gemessenen OTM nach Schädigung mit artifiziellem Magensaft

BATP	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
kein BATP	5,91	5,07	6,88
BATP	7,91	6,25	10,02

Tabelle 14: Mittelwerte und Konfidenzintervalle der gemessenen OTM nach Schädigung mit Salzsäure unterschiedlicher pH- Werte

pH	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
pH 3	6,01	5,31	6,8
pH 4.5	5,15	4,55	5,82
pH 5.5	3,94	3,48	4,45
pH 6.5	2,95	2,61	3,34

Tabelle 15: Mittelwerte und Konfidenzintervalle der gemessenen OTM nach Schädigung mit aktivem und inaktivem Pepsin

Pepsin Aktivität	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
Kein Pepsin	3,81	3,39	4,29
hitzeinaktiviert	4,21	3,63	4,89
aktiv	5,14	4,37	6,05

Tabelle 16: Mittelwerte und Konfidenzintervalle der gemessenen OTM nach Schädigung mit unterschiedlichen Pepsinkonzentrationen

Pepsin Konzentration	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
Kein Pepsin	4,01	3,56	4,52
1:100	4,71	3,99	5,56
1:10	4,67	3,97	5,51
1	4,06	3,49	4,74

Tabelle 17: Mittelwerte und Konfidenzintervalle der gemessenen OTM nach Schädigung mit Gallensäuremix (BA)

BA	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
Keine BA	6,46	5,47	7,62
BA	7,24	5,82	9,01

Tabelle 18: Mittelwerte und Konfidenzintervalle der gemessenen OTM nach Schädigung mit Glycochenodeoxycholsäure

GCDA	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
kein GCDA	5,78	4,89	6,82
GCDA	8,08	6,5	10,06

Tabelle 19: Mittelwerte und Konfidenzintervalle nach Analyse der OTM- Werte in Abhängigkeit vom Geschlecht

Geschlecht	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
männlich	3,9	3,3	4,6
weiblich	5,33	4,37	6,51

Tabelle 20: Mittelwerte und Konfidenzintervalle nach Analyse der OTM- Werte in Abhängigkeit vom Alter

Alter	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
<40 J.	5,2	4,33	6,26
>= 40 J.	3,99	3,41	4,68

Tabelle 21: Mittelwerte und Konfidenzintervalle nach Analyse der OTM- Werte in Abhängigkeit von der Allergieanamnese

Allergien	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
Allergien	4,38	3,54	5,43
keine Allergien	4,74	4,14	5,44

Tabelle 22: Mittelwerte und Konfidenzintervalle nach Analyse der OTM- Werte in Abhängigkeit vom Nikotinkonsum

Nikotin	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
Raucher	4,79	4,01	5,73
Nichtraucher	4,34	3,71	5,07

Tabelle 23: Mittelwerte und Konfidenzintervalle nach Analyse der OTM- Werte in Abhängigkeit vom Alkoholkonsum

Alkohol	Mittelwert	Konfidenzintervall 95%	
		Untergrenze	Obergrenze
Alkoholkonsum	4,91	4,16	5,8
kein Alkoholkonsum	4,23	3,46	5,18

Tabelle 24: Mittelwerte und Konfidenzintervalle nach Analyse der OTM- Werte nach Inkubation der Epithelzellen mit verschiedenen Noxen

OTM Variable	Mittelwert	95%-Konfidenzintervall	
		Untergrenze	Obergrenze
Neg K.	1,89	1,19	2,58
BATP	5,17	0,25	4,62
hGJ	5,70	4,61	6,79
Pepsin	3,00	1,97	4,04

9. Thesen

1. Reflux kann als Kanzerogen oder Co- Kanzerogen zur Malignomentstehung im oberen Aerodigestivtrakt beitragen.
2. Humaner und artifizieller Magensaft führen zu einem Anstieg von DNA-Schädigung.
3. Einzelkomponenten des Magensaftes führen zu Schäden der DNA.
4. Miniorgankulturen stellen ein geeignetes Modell dar, um Zellen im Gewebeverband, in Anlehnung an die in-vivo- Situation zu untersuchen.
5. Das Comet- Assay ist eine geeignete Methode zur Quantifizierung von DNA-Strangbrüchen, gemessen als Olive- Tail- Moments.
6. Standardisierte Durchführungs- und Auswertungsbedingungen im Versuchsablauf führen zu einer gesteigerten Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.
7. Mit Abnahme des pH- Wertes steigt die Anzahl der DNA- Strangbrüche.
8. Pepsin und Gallensalze haben potentiell genotoxische Eigenschaften.
9. Spenderspezifische Vorbedingungen haben einen Einfluss auf das Ausmaß der DNA-Schäden.
10. Experimente mit primären Epithelzellen bestätigen die an Miniorgankulturen gemessenen Ergebnisse.

Selbstständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Person) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Außer dieser Arbeit habe ich keine weiteren Promotionsversuche unternommen.
Dies ist mein erstes Promotionsverfahren.

Juliane Illert

Halle (Saale), den 25.1.2016

Danksagung

Meinen Dank möchte ich Frau PD Dr. med. Kerstin Hoffmann für die Möglichkeit zur Promotion, sowie der freundlichen Überlassung des Themas aussprechen.

Ebenso Danke ich Herrn Prof. Dr. med. habil. Stefan Plontke als Direktor der Universitäts- und Poliklinik für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde der MLU Halle- Wittenberg für die Zulassung zur Promotion an seiner Klinik.

Ein gebührender Dank geht an Frau Dr. rer. nat. Ilona Schön, Leiterin des Forschungslabors der Klinik. Mit Rat und Tat stand sie mir jederzeit geduldig bei der Bearbeitung dieses interessanten und spannenden Themas zur Seite. Ohne ihre Nachsicht und Beständigkeit wäre eine Vollendung dieser Arbeit unmöglich gewesen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Sabine Koitzsch, medizinisch- technische Assistentin des Forschungslabors, für die großartige Unterstützung bei der praktischen Durchführung meiner Laborarbeit.

Dem Institut für Umwelttoxikologie unter der Leitung von Prof. Dr. Heidi Foth danke ich für die Möglichkeit zur Quantifizierung und Auswertung meiner Comet- Assay- Ergebnisse. Dabei danke ich auch ganz herzlich Dr. Felix Glahn für die stete Hilfsbereitschaft und Kompensation meiner technischen Defizite, wobei insbesondere auch die angenehmen und konspirativen Kaffeepausen zum Gelingen beigetragen haben.

Weiterhin möchte ich mich bei Frau PD Dr. rer. nat. Susanne Unverzagt, wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Medizinische Epidemiologie, Biometrie und Informatik, für die schnelle und wertvolle Hilfe und Beratung bei der statistischen Aufarbeitung meiner Ergebnisse bedanken.

Meinen Eltern, meiner Familie und ganz besonders meinem Ehemann danke ich von Herzen dafür, dass sie das Fundament meines persönlichen und beruflichen Werdegangs bilden und mich in jeder Lebenslage mit Verständnis und Unterstützung begleiten.