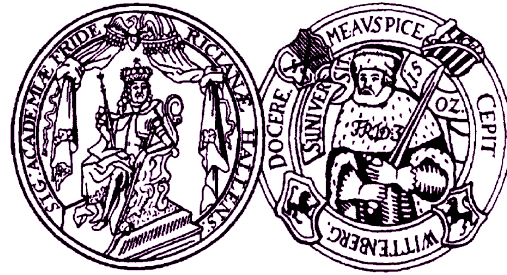


Aus der Universitätsklinik und Poliklinik  
für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde an der  
**Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
Kommissarische Leiterin  
PD Dr. med. Kerstin Neumann



**Testung des Einflusses unterschiedlicher pH-Bedingungen auf  
die DNA-Stabilität anhand von Miniorgankulturen /  
Etablierung eines Modells**

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

vorgelegt  
der Medizinischen Fakultät  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg  
am 22.09.2008

von Katrin Oertel  
geboren am 13.02.1981 in Halle (Saale)

Betreuer: Prof. Dr. med. Marc B. Bloching  
Gutachter: Prof. Dr. med. Marc B. Bloching  
PD Dr. med. Kerstin Neumann

Verteidigungsdatum: 22.09.2008

**urn:nbn:de:gbv:3-000014579**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000014579>]

*Meiner Familie  
und meinen Freunden*

## **Referat**

**Einleitung:** Ein Zusammenhang zwischen pharyngo-laryngealem Reflux und der Tumorentstehung im oberen Aerodigestivtrakt wird in der Literatur zwar postuliert, ein Beweis konnte bisher allerdings nicht erbracht werden. In der vorliegenden Arbeit wurde überprüft, ob Miniorgankulturen humaner nasaler Schleimhaut zur Untersuchung des Einflusses von pH-Wert-Erniedrigungen auf die DNA-Stabilität herangezogen werden können und ob pH-Wert-Absenkungen des extrazellulären Milieus Schäden an der Erbsubstanz in Form von Einzelstrangbrüchen hervorrufen können. Diese sollten mit Hilfe des Comet-Assays nachgewiesen werden.

**Material und Methoden:** Mukosa von 18 Patienten wurde in Form von Miniorganen kultiviert und zwei verschiedenen Versuchsprotokollen unterzogen. In der ersten Versuchsreihe erfolgte eine einfache Schädigung am siebenten Kulturtag. In der zweiten wurde die Schleimhaut nach siebentägiger Kultur im Abstand von zwei Tagen (Tage 7, 9 und 11) kumulativ mit acht verschiedenen pH-Werten geschädigt. Zu jedem Experiment wurden eine Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt. Die erwartete genotoxische Wirkung der sauren Lösungen wurde mittels Comet-Assay quantifiziert.

**Ergebnisse:** Die Untersuchungen haben ein geringes genotoxisches Potential von Salzsäure unterschiedlicher Konzentrationen gegenüber menschlichen Nasenschleimhautepithelzellen offenbart. Die schädigende Wirkung auf das Erbgut scheint von der Protonenkonzentration weitgehend unabhängig. Die Abhängigkeit der Ergebnisse von vorbestehenden mukosalen Schäden durch das Einwirken von Noxen auf die in situ befindliche Schleimhaut konnte für Alkohol und Allergien, nicht aber für Tabakrauch, in den vorliegenden Ergebnissen bestätigt werden. Geschlecht und Alter der Spender beeinflussten die Ergebnisse nicht.

**Diskussion und Implikation:** Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa kommen durch ihren intakten Zellverband der in vivo Situation sehr nahe. Die Möglichkeit der wiederholten Schädigung, lässt diese Art der Kultivierung ideal erscheinen. Der Einsatz des Comet-Assay ist durch seine Sensitivität gegenüber Erbgutschäden, die in einzelnen Zellen untersucht werden können, sehr effizient. Durch die Wahl eines geeigneten Patientenkollektivs und die Optimierung der Versuchsanordnung, könnten Reliabilität und Validität der Versuche erhöht werden.

Oertel, Katrin: *Testung des Einflusses unterschiedlicher pH-Bedingungen auf die DNA-Stabilität anhand von Miniorgankulturen / Etablierung eines Modells*

Halle, Univ. Med. Fak., Diss., 64 Seiten, 2007



## Inhalt

1	Einleitung.....	1
1.1	Tumorentstehung .....	1
1.2	Risikofaktoren.....	2
1.3	Experimentelle Ansätze zur Untersuchung der Tumorentstehung.....	3
1.3.1	Kanzerogenitätstests.....	3
1.3.2	Einzelzell-Gel-Elektrophorese (Comet-Assay).....	4
1.3.3	Miniorgankulturen.....	6
2	Zielstellung.....	7
3	Material und Methoden.....	8
3.1	Patientengut.....	8
3.2	Miniorgankulturen.....	9
3.2.1	Materialgewinnung.....	9
3.2.2	Präparation der Miniorgane.....	9
3.2.3	Kultivierung.....	9
3.2.4	Schädigung .....	10
3.2.5	Einzelzellgewinnung.....	13
3.2.6	Vitalitätstest.....	13
3.3	Einzelzell-Gel-Elektrophorese.....	13
3.3.1	Beschichtung der Objektträger.....	13
3.3.2	Lyse der Zell- und Kernmembran.....	14
3.3.3	Elektrophorese.....	14
3.3.4	Quantifizierung der DNA-Schäden.....	15
3.3.5	Statistische Auswertung der Ergebnisse.....	16
4	Ergebnisse.....	19
4.1	Kultivierung humaner nasaler Schleimhaut als Miniorgane.....	19
4.2	Histologische Untersuchungen.....	20
4.3	Vitalitätsbestimmung.....	21
4.4	Quantifizierung des DNA-Schadens.....	21

4.4.1	Einmalige Schädigung der Miniorgane.....	23
4.4.2	Kumulative Schädigung der Miniorgane.....	26
4.4.3	Vergleich der mittleren OTM-Werte in Abhängigkeit von verschiedenen Einflussfaktoren.....	27
5	Diskussion.....	31
5.1	Diskussion des Testsystems Miniorgankulturen.....	31
5.2	Comet-Assay.....	33
5.3	DNA-Migration unter verschiedenen pH-Bedingungen.....	37
5.4	Einfluss spenderspezifischer Vorbedingungen auf die DNA- Migration.....	39
5.4.1	Der Einfluss des Geschlechts.....	39
5.4.2	Der Einfluss des Rauchens.....	40
5.4.3	Der Einfluss des Alkoholkonsums.....	40
5.4.4	Der Einfluss von Allergien.....	41
5.4.5	Der Einfluss des Alters.....	42
5.5	Optimierungsmöglichkeiten.....	43
6	Schlussfolgerungen.....	44
7	Zusammenfassung.....	45
8	Literaturverzeichnis.....	47
9	Anlagen.....	57
9.1	OTM-Mittelwerte.....	57
9.2	p-Werte.....	58
9.3	Herstellung der zur Kultur und zu den Versuchen notwendigen Lösungen.....	60
9.3.1	Miniorgane.....	60
9.3.2	Einzelzellgelelektrophorese.....	61
10	Thesen.....	63

## Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADH	Alkoholdehydrogenase
AECGBM	Airway Epithelial Cell Growth Basal Medium
°C	Grad Celsius
CDK	Cyclin dependent Kinase
CKI	Inhibitoren der CDK
Cl/HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> Austauscher	Chlor/Hydrogencarbonat Austauscher
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CYP 450	Cytochrom-P-450
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et. al.	und andere
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
FKS	Fötales Kälber Serum
G <sub>0</sub> -Phase	mitotische Ruhephase des Zellzyklus
G <sub>1</sub> -Phase	präsynthetische Phase des Zellzyklus
G <sub>2</sub> -Phase	postsynthetische Phase des Zellzyklus
GBSS	Gey's Balanced Salt Solution
HPV	humanes Papilloma Virus
HCl	Salzsäure
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxyd
LMP	Low Melting Point
M	Molar

mA	Milli Ampere
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinase
min	Minute
ml	Milliliter
$\mu$ l	Mikroliter
MLU	Martin-Luther-Universität
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
mM	Millimolar
$\mu$ m	Mikrometer
MOC	Miniorgankultur
MW	Mittelwert
N	Normal
NaCl	Natriumchlorid
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
Na <sub>2</sub> EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz
NaOH	Natriumhydroxyd
NMP	Normal Melting Point
OADT	oberer Aerodigestivtrakt
OTM	Olive-Tail-Moment
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RNase	Ribonuklease
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
$\rho$	rho / physikalisches Zeichen für Dichte
rpm	rounds per minute/Umdrehungen pro Minute



S-Phase	DNA-Synthesephase des Zellzyklus
STABWN	Standardabweichung
V	Volt
wt	Wildtyp
Zn <sup>2+</sup>	Zinkion



# 1 Einleitung

## 1.1 Tumorentstehung

Krebs ist zur Zeit die zweit häufigste Todesursache nach Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Da die Mortalität dieser Krankheiten allerdings stärker abnimmt als die der Krebserkrankungen, wird bei gleich bleibender Entwicklung, nach Berechnungen des Deutschen Krebsforschungszentrums, bald Krebs an erster Stelle der Todesursachenstatistik stehen [dkfz]. Die Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes machen nur einen kleinen Prozentsatz aller Tumoren aus. Allerdings wird seit den 30er Jahren ein steter Anstieg dieser prognostisch ungünstigen Erkrankungen verzeichnet. Die gute lymphatische Versorgung des Kopf-Hals-Bereiches, zum Beispiel durch den Waldayr-Rachen-Ring und die zahlreichen Halslymphknotenstationen, gewährleisten eine sehr rasche Tumorausbreitung. Dies führt unter anderem dazu, dass über 80% dieser Erkrankungen erst in späten Stadien erkannt werden [Böcker W et al., 2004].

Die Tumorentstehung ist ein multifaktorielles Geschehen. Tumorzellen weisen Veränderungen in ihrem Chromosomenbestand auf, die durch somatische Mutationen entstanden sind. Zur Transformation einer normalen Zelle in eine maligne reicht eine Mutation nicht aus. Vielmehr müssen mehrere genetische Veränderungen zusammentreffen. Diese Veränderungen finden in Schlüsselgenen statt, die Signaltransduktion und Wachstumsregulation beeinflussen. Durch Mutation von Protoonkogenen können Onkogene entstehen, die sich der normalen Regulation entziehen und, ohne dass exogene Wachstumssignale vorhanden sind, zu ungehemmter Proliferation führen. Wachstumshemmende Signale werden in gesunden Zellen von Tumor-Supressor-Genen übermittelt. Sind sie inaktiviert, führt dies zum Verlust der Gegenregulation und somit zu Wachstumsstimulation [Petrides PE, 1998] [Schmid KW, Thomas C, Büttner R, 2001] [Trümper L, Pfreundschuh M, 2000]. Durch strukturelle Chromosomenabberationen, wie Translokation, Deletion, Inversion, Duplikation, können Gene neu kombiniert werden und so die Zelle zu expansivem Wachstum anregen. Bereits 1917 beschrieb Theodor Boveri (1862-1915) in seiner „Hypothese der Chromosomeninstabilität“, „zur Frage der Entstehung maligner Tumoren, [...] einen bestimmten, unrichtig kombinierten Chromosomenbestand. Dieser ist die Ursache für die Wucherungstendenz, die auf alle

Abkömmlinge der Urzelle [...] übergeht“ [biozentrum.uni-wuerzburg]. Heute ist die Instabilität des Genoms als eine tumorspezifische Eigenschaft bekannt. Eine Reihe von Erkrankungen mit Chromosomeninstabilität sind mit einer erhöhten Mutationsrate assoziiert (Bloom-Syndrom, Ataxia-teleangiectasia, Fankoni Anämie, Xeroderma pigmentosum) [Murken J, Cleve H, 1996].

Im Laufe eines Menschenlebens kommt es zu zirka  $10^{16}$  Zellteilungen. Die Häufigkeit von Spontanmutationen liegt dabei bei ungefähr  $10^{-6}$  pro Gen und Zellteilung. Somit kann man eine durchschnittliche Rate an Genmutationen im Lauf des Lebens von  $10^{10}$  berechnen, die auch für Tumorsuppressorgene und Protoonkogene gilt [Schmid KW, Thomas C, Büttner R, 2001]. Reparaturmechanismen sorgen dafür, dass latent vorhandene DNA-Schäden ständig beseitigt werden. Durch Schädigung bzw. Alterung der Reparaturmechanismen (DNA-Reparatur, Zellzyklusregulation, Apoptose, Biotransformation, Immunsystem) ist eine maligne Entartung wahrscheinlich. Eine Schädigung kann beispielsweise durch den Konzentrationsanstieg bzw. eine verlängerte Expositionszeit exogener Noxen entstehen. Es gilt als gesichert, dass Kanzerogene die genetische Information der Wirtszelle verändern können [Mc Cann J, Ames BN, 1976]. Diese Veränderungen können sowohl die genetische als auch die epigenetische Ebene betreffen. Auf genetischer Ebene kommt es zur irreversiblen Mutation des sogenannten Wildtyp (wt) Gens. Die theoretisch reversiblen epigenetischen Schäden führen beispielsweise durch Methylierung der Schlüsselgene zur Abschaltung eines bestimmten Signaltransduktions-weges. Die funktionelle Zellstabilität (Zellproliferation und -differenzierung) wird gestört und somit die Rate von Mutationen erhöht [Schmid KW, Thomas C, Büttner R, 2001]. Durch noch nicht ausreichend geklärte Mechanismen entziehen sich die mutierten Zellen der Zerstörung durch das Immunsystem. Interessant ist, welche Faktoren direkt oder indirekt zur Kanzerogenese beitragen.

## **1.2 Risikofaktoren**

Karl Heinrich Bauer (1890-1978), einer der Mitbegründer des Deutschen-Krebs-Forschungszentrums 1968, stellte 1928 in seiner ersten umfassenden Krebstheorie, die somatische Mutationstheorie der Krebsentstehung auf. Danach sind Kanzerogene Mutagene, die die genetische Information der Wirtszelle ändern [klinikum.uni-heidelberg] [Petrides PE, 1998].

Besonders die Entstehung von Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes ist durch dessen

Lage stark an die Exposition gegenüber kanzerogenen Stoffen gekoppelt. Die Mukosa kann leicht von Schadstoffen alteriert werden. Für Plattenepithelkarzinome des oberen Aerodigestivtraktes können eine Reihe extrinsischer und intrinsischer Risikofaktoren genannt werden, die die Schleimhaut entweder direkt schädigen oder diese für chemische und / oder biologische Kanzerogene empfänglicher machen [Smith CJ, 1989]. Als gesicherte Risikofaktoren für orale Plattenepithelkarzinome [Iro H et.al., 2000] gelten zum Beispiel:

- Tabakrauch
- Alkohol
- Umweltschadstoffe
- Arbeitsplatznoxen
- bestimmte Viruserkrankungen (HPV)

Darüber hinaus stellt mangelnde Mundhygiene einen Risikofaktor für die Entstehung oraler Karzinome dar [Maier H et al., 1994] [Schmid KW, Thomas C, Büttner R, 2001] [Zilker TH, 1998]. Der Einfluss von pharyngolaryngealem Reflux auf die Kanzerogenese im OADT ist noch nicht ausreichend geklärt. Es wird aber ein kanzerogener Einfluss auf die Zellen der Schleimhaut in Pharynx und Larynx vermutet [Dagli S et al., 2004] [Galli J, 2002] [Lewin JS et al., 2003]. In retrospektiven Studien konnte ein Zusammenhang der Refluxhäufigkeit von der Tumorinzidenz im Naso-/Oropharynx und Larynx gezeigt werden [Raj A, Jankowski J, 2004]. Denkbar ist sowohl eine direkte Schädigung, als auch eine indirekte Schädigung durch Erhöhung der Empfindlichkeit gegenüber anderen kanzerogenen Noxen. Möglicherweise spielt die Induktion von Enzymen, wie zum Beispiel der Cyclooxygenase-2 (COX2) durch chronische Entzündungsreize im Rahmen der Karzinogenese eine Rolle. Belegt ist eine pathogene Bedeutung sauren Refluxats für den Barrett-Ösophagus, der bei ungefähr 10% der Menschen mit saurem Reflux auftritt. Davon ausgehend entwickelt circa 1% ein Ösophaguskarzinom, das ist 30- bis 125- mal so viel wie in der Gesamtbevölkerung [Altorki NK, Oliviera S, Schrupp DS, 1997]. Analog zu diesem Mechanismus ist die Tumorentstehung im oberen Aerodigestivtrakt denkbar.

### ***1.3 Experimentelle Ansätze zur Untersuchung der Tumorentstehung***

#### **1.3.1 Kanzerogenitätstests**

Der Einfluss von Schadstoffen auf die genetische Stabilität kann im Tierversuch bzw. in verschiedenen Testsystemen untersucht werden. Es sind zahlreiche Methoden entwickelt

worden, um genetische Veränderungen auf verschiedenen Ebenen zu detektieren. Zum Beispiel sind der Ames-Test und der Mikrokerntest etablierte genotoxikologische Prüfverfahren mit reproduzierbarem Aussagewert, die gelegentlich kombiniert unter verschiedenen Gesichtspunkten angewandt werden. Da beim Ames-Test die Mutationen im Bakteriengenom induziert werden, ist die Aussagekraft bezogen auf den Menschen eher gering. Der Nachteil des Mikrokerntests liegt darin, dass er nur Erbgutschäden, die zu Fragmentbildungen führen, detektiert [Shin DM, Hittelman WN, Hong WK, 1994] [Van Schooten FJ et. al., 2002].

Andere Testsysteme die DNA-Schäden nachweisen, nutzen Veränderungen der Laufeigenschaften der mutierten Genabschnitte unter unterschiedlichen Elektrophoresebedingungen. Dazu gehören:

- der Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
- der Single Strand Conformation Polymorphismus
- die denaturierende Gradientengelelektrophorese
- die Temporal Temperature Gradient Electrophoresis
- die Heteroduplexanalyse
- die enzymatische Spaltung von Fehlpaarungen
- und der Protein Truncation Test

[Mühlhardt C, 1999]. Da Tumoren aus nur einer einzigen mutierten Zelle hervorgehen können, ist ein Testsystem, mit dem genetische Schäden an Einzelzellen detektiert und quantifiziert werden können, sinnvoll. Der Comet-Assay stellt eine Alternative zu den oben genannten Methoden dar.

### **1.3.2 Einzelzell-Gel-Elektrophorese (Comet-Assay)**

Der Comet-Assay ist eine sehr sensitive Technik zur Bestimmung der Genotoxizität. Er wurde 1984 von Östling und Johansen [Östling O, Johansen KJ, 1984] als neutraler Comet-Assay das erste Mal beschrieben und 1988 von Singh et al. [Singh et al. 1988] zum alkalischen Comet-Assay modifiziert. Das Prinzip besteht darin, Zellen in Agarose auf einem Objektträger einzubetten und deren aufgeknäuelte DNA, sowie die DNA-Helix durch Lyse der Zell- und Kernmembran zu liberieren und in der Elektrophorese aufzutrennen. Nach Färben mit einem Fluoreszenzfarbstoff können die so entstandenen

Kometen unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgemessen werden. Intakte DNA stellt sich als kreisrunder fluoreszierender Ball dar. Durch die Migration von DNA-Bruchstücken kommt es zu einem kometenähnlichen Bild. Diese DNA-Bruchstücke befinden sich im Kometenschweif, den Kometenkopf bildet die Kernmatrix. Da die DNA-Moleküle negativ geladen sind, wandern sie in der Elektrophorese zur Anode. Je frakturierter die DNA, das heißt je kleiner die Bruchstücke, desto weiter wandern sie im elektrischen Feld und desto länger ist der Kometenschweif. Dabei korreliert der Gehalt an migrierter DNA mit dem Erbgutschaden [Singh et al. 1988]. Als quantitatives Maß für die DNA-Schädigung wird häufig der Olive-Tail-Moment (OTM) benutzt. Dieser setzt sich zusammen aus der Dichte der DNA im Kometenschweif, im Verhältnis zu der Dichte der DNA im Kometenkopf, multipliziert mit der Wanderungstrecke in der Elektrophorese

$$\text{OTM} = \frac{\rho(\text{DNA}_{\text{Kometenschweif}})}{\rho(\text{DNA}_{\text{Kometenkopf}})} \cdot \text{Wanderungstrecke in der Elektrophorese}$$

[Olive PL et al., 1990] [Olive PL et al., 1992] [Muller WU et al., 1994]. Mit dem neutralen Comet-Assay können Doppelstrangbrüche dargestellt werden. Durch die Aufwindung der DNA im alkalischen Milieu können im alkalischen Comet-Assay zusätzlich Einzelstrangbrüche und Alkali-labile Stellen, DNA-DNA- und DNA-Protein-Cross-links sichtbar gemacht werden. Bestimmte Schädigungstypen können in der Immunfluoreszenz mit läsionsspezifischen Antikörpern markiert werden. In Kombination mit dem FISH können gezielt bestimmte Genabschnitte mit DNA-Sonden gekennzeichnet werden [Sauvaigo S et al., 1998] [Harréus UA et al., 2004].

Der Comet-Assay kann mit allen beliebigen Zellen durchgeführt werden. Es genügt eine kleine Menge Versuchsmaterial. Er dient zum Nachweis einer Schädigung von Einzelzellen [Brendler-Schwaab S et al., 2005] [Martino-Roth MG et al., 2003]. Außer für humane, wurde die Einzelzellgelelektrophorese schon für Zellen der unterschiedlichsten Spezies eingesetzt [Cotelle S, Féraud JF, 1999]. Bei den Arbeitsgruppen Ihbe und Kleinsasser kam sie erstmals auch bei Organkulturen zur Anwendung [Ihbe JB, 2004] [Kleinsasser NH et al., 2001].

### **1.3.3 Miniorgankulturen**

Untersuchungen zur Genotoxizität im Zellverband haben gegenüber solcher mit Hilfe von Einzelzellkulturen entscheidende Vorteile. Isolierte Zellen haben, im Vergleich zu intaktem Gewebe eine veränderte metabolische Kompetenz, eine herabgesetzte Reparaturfähigkeit und eine eventuell veränderte Empfindlichkeit der DNA [Teissier E et al., 1998]. Humane Lymphozyten wurden oft stellvertretend für die Vorgänge am eigentlichen Wirkort verwendet [Rajae-Bebahani N et al., 1999]. Die Aussagekraft der Mutagensensitivität ubiquitär im Körper vorhandener peripherer Zellen hat sich jedoch als ungenügend gegenüber den Vorgängen am Entstehungsort maligner Schleimhauttumoren herausgestellt [Kleinsasser NH et al., 2000]. Da die mutagenen Eigenschaften der meisten Xenobiotika erst nach repetitivem oder chronischem Einwirken relevant werden, ist ein Testsystem, das eine wiederholte Schädigung zulässt, wünschenswert [Kleinsasser NH et al., 2004].

Miniorgankulturen stellen ein Modellsystem dar, humane Zellen relativ lebensnah in ihrem Zellverband standardisiert *in vitro* zu untersuchen. Sie können aus Geweben des OADT kultiviert werden und wurden erstmals von Steinsvåg et al. [Steinsvag SK et al., 1991] für adenoides Gewebe beschrieben.

Miniorgane sind mehr als vierzig Tage kultivierbar und scheinen daher ideal für repetitive Schädigungszyklen [Al-Batran SE et al., 1999]. Episoden der Expositionskarenz können mittels DNA-Reparaturstudien untersucht werden. Um das System zeitlich unabhängiger gegenüber der Probenentnahme zu gestalten, ist es notwendig die gewonnenen Proben bis zum Versuchsbeginn zu lagern. Dies ist bei  $-80^{\circ}\text{C}$  möglich. Die Zellvitalität der gelagerten Miniorgane unterscheidet sich nicht von der der frisch aufgearbeiteten. Die Migrationsfähigkeit der DNA kann, je nach getestetem Stoff leicht differieren [Kleinsasser NH et al., 2003].



## **2 Zielstellung**

In der vorliegenden Studie handelt es sich um eine experimentelle Anwendung des Comet-Assay zur Detektion von DNA-Doppelstrangbrüchen bei humanen Miniorgankulturen nasaler Schleimhaut mit der Zielstellung, den Einfluss von pH-Erniedrigungen auf die DNA-Stabilität zu untersuchen.

Dazu soll unter Verwendung humaner nasaler Miniorgankulturen ein stabiles System etabliert werden, mit dessen Hilfe es möglich erscheint, unter standardisierten Bedingungen das genotoxische Potential von Substanzen auf die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtrakt zu testen.

Es soll erstens geprüft werden, inwieweit pH-Erniedrigungen unter das physiologische Niveau einen Einfluss auf die DNA-Stabilität unter dem Aspekt eines genotoxischen Potentials haben. Zweitens ist zu ermitteln, inwieweit repetitive Noxenexposition einen möglichen Schaden vergrößert. Drittens sollen durch anamnestische Erhebungen mögliche Einflussfaktoren beziehungsweise Vorschädigungen eruiert werden. Die Frage stellt sich vor dem Hintergrund inwieweit laryngopharyngealer Reflux, der mit einem statistisch gehäuften Auftreten von Karzinomen des OADT korreliert, auch für dieses ursächlich ist.

Zu erörtern sind Vor- und Nachteile des Systems und die Übertragbarkeit auf die Situation in vivo.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Patientengut

Die benötigte Nasenschleimhaut, stammte von Patienten, die außer einer Nasenmuschelhyperplasie gesund waren. Es lagen keine Neoplasien vor. Insgesamt wurden die Nasenmuscheln von 18 Patienten (14 Männer, 4 Frauen) im Alter zwischen 12 und 74 mit einem Altersdurchschnitt von 41 Jahren in den Versuchen verwendet. Die Experimente wurden mit einem positiven Votum der Ethikkommission genehmigt. Die Kandidaten wurden nach Beruf, Zigaretten- und Alkoholkonsum befragt. Dabei wurden Patienten, die seit mindestens fünf Jahren nicht mehr rauchen, als Nichtraucher eingestuft.

Tabelle 1: Patientengut

♀=weiblich ♂=männlich Zig=Zigaretten

Nr.	Geschlecht	Alter	Alkoholkonsum	Tabakkonsum	Beruf
1	♂	23	nein	-	Student
2	♂	29	nein	-	Toningenieur
3	♂	44	ja	20Zig/Tag	Kraftfahrer
4	♂	65	ja	-	Skiläufer
5	♂	35	ja	-	Lehrer
6	♀	46	nein	-	Projektmanager
7	♀	47	nein	-	Reinigungskraft
8	♂	57	ja	20Zig/Tag	arbeitslos
9	♂	41	nein	20Zig/Tag	Hühnerwirt
10	♂	23	nein	17Zig/Tag	Staplerfahrer
11	♂	27	nein	20Zig/Tag	Lagerarbeiter
12	♀	74	nein	-	Rentnerin
13	♂	43	nein	-	Hausmeister
14	♂	60	nein	20Zig/Tag	Klempner
15	♂	40	nein	-	Schweißer
16	♂	35	nein	-	arbeitslos
17	♀	12	nein	-	Schüler
18	♂	38	nein	-	arbeitslos

## **3.2 Miniorgankulturen**

### **3.2.1 Materialgewinnung**

Es wurde Nasenschleimhaut von Menschen verwendet, die sich, aufgrund einer behinderten Nasenatmung durch hyperplastische Nasenmuscheln, einer Conchotomie unterzogen. Bei dieser Routine-Operation wird die hyperplastische Concha nasalis inferior gekürzt. Die Schleimhaut wurde noch im Operationssaal der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg am Operationsmikroskop (S88, Carl Zeiss, Jena) von Knochen und Submukosa befreit. Es fand nur makroskopisch gesunde Schleimhaut Verwendung, die bei der Operation anfiel und im Normalfall ohne weitere histologische Untersuchungen verworfen worden wäre. Die Aufbewahrung bis zum Transport ins Labor erfolgte in 15ml PP-Röhrchen (Greiner, Kreuzmünster) in GBSS-Puffer (Sigma, Steinheim) im Kühlschrank.

### **3.2.2 Präparation der Miniorgane**

Die so gewonnene nasale Mukosa wurde im Labor unter der Sterilbank (HeraSafe, Heraeus, Hanau) weiterverarbeitet. In einer Petrischale in AECGB-Medium (Promo Cell, Heidelberg) wurde sie mit einem Skalpell (Aesculap, Tuttlingen) in Stücke geschnitten. Diese waren circa einen Kubikmillimeter groß und wurden vor der Kultivierung in PBS (Gibco, Karlsruhe) gewaschen.

### **3.2.3 Kultivierung**

Die Kultivierung erfolgte zu je 15 MOCs pro Well für die erste (einmalige Schädigung) und zu je 21 MOCs pro Well für die zweite (kumulative Schädigung) Versuchreihe in 6-Well-Platten (Nunc, Nalgel Nunc Int., Roskilde, Dänemark). Diese waren mit 0,75%igem, in DMEM (Gibco, Karlsruhe) gelöstem, Agar (Biozym, Erlangen) beschichtet. Als Nährmedium benutzte man AECGB-Medium mit Supplement (Promo Cell, Heidelberg) und Antibiotikum (2,48ml Supplement und 1ml PenStrep, Biochrom AG, Berlin, auf 100ml AECGB-Medium). Die Platten wurden bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank (function line, Heraeus, Hanau) für sieben, beziehungsweise elf Tage kultiviert. Alle 48 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel. Unter dem inversen Mikroskop (Carl Zeiss, Jena) wurde der Zilienschlag beobachtet.

Die Epithelialisierung der Miniorgane konnte durch histologische Proben, die vor jedem

Versuch entnommen wurden, gezeigt werden. Dazu wurde an jedem Versuchstag ein Miniorgan in 4%igem Formaldehyd (Fischar, Saarbrücken) fixiert. Im Institut für Pathologie der MLU-Halle-Wittenberg wurden die Proben in Paraffin eingebettet und später mit dem Mikrotom (jung biocut, leica-jung, Nußloch) in 4µm dünne Scheiben geschnitten. Nach Entparaffinieren und Entwässern im Alkoholbad wurden die Schnitte mit Hämatoxilin-Eosin (Roth, Karlsruhe) gefärbt.

### 3.2.4 Schädigung

#### a) Einmalige Schädigung der Miniorgane

Nach siebentägiger Kulturdauer entnahm man am Versuchstag die MOCs mit einer Pipette (Eppendorf, Hamburg) und transferierte je sieben in ein, mit 1ml PBS gefülltes Cup (Multi Safe Seal Tubes, peq lab, Erlangen). Um die Stücke von dem puffernden Medium zu befreien, wurden sie zweimal in PBS gewaschen. Der Überstand wurde abgesaugt. In jedes Cup gab man 1ml von der, mit 4 und 0,1N HCl, auf den gewünschten pH-Wert (6,5; 5,5; 5,0; 4,7; 4,5; 4,3; 4,0; 3,8) eingestellten PBS-Lösung. Die Positiv- und die Negativkontrollen wurden mit reinem PBS behandelt. Die Inkubation erfolgte für eine Stunde im Brutschrank. Danach wurden die MOCs erneut zweimal mit PBS gewaschen, um die Schädigung abzustoppen. Dann erholten sich die Mukosastücke für eine weitere Stunde im Brutschrank in AECGBasal-Medium mit Antibiotikazusatz. Die Positivkontrollen wurden 10min vor Beendigung der Erholphase entnommen, um sie mit 1ml einer 15mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung (Apothek der Universität Halle) für 5min auf Eis zu schädigen. Die ideale Konzentration der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung wurde in Vorversuchen ausgetestet. Um die Schädigung abzustoppen, wurden diese erneut zweimal mit PBS und einmal mit Medium gewaschen.

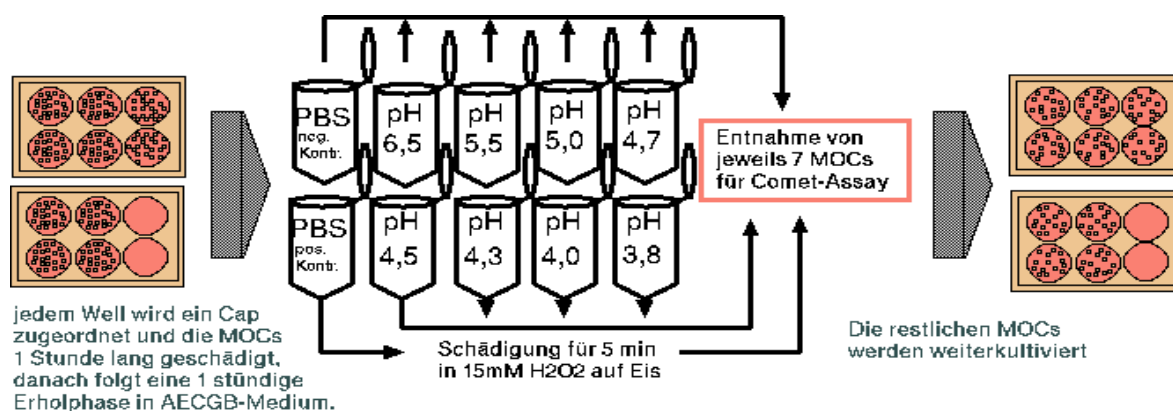


Abbildung 1: Die Miniorgane wurden für eine Stunde geschädigt, anschließend in PBS gewaschen und danach zur Erholung eine Stunde im Brutschrank in AECGBasal-Medium inkubiert. Jeweils sieben MOCs wurden zum Comet-Assay entnommen. Für die kumulative Schädigung wurden die restlichen weiterkultiviert.

b) Kumulative Schädigung der Miniorgane:

Um die in vivo Situation der Refluxösophagitis, bei der mehrere pH-Abfälle pro Tag auftreten, nachzuahmen, wurden die Miniorgankulturen in zweitägigen Abständen, am siebenten, neunten und elften Kulturtag, dreimal hintereinander kumulativ geschädigt. Nach jeder Schädigung wurden einige Miniorgane mit dem Comet-Assay getestet und die Übrigen weiter kultiviert (Abbildung 2).

Um einen Einfluss der Kulturdauer auf den Ausgangszustand der Epithelzellen auszuschließen, erfolgte der erste Comet-Assay nach einem Tag Aufbewahrung der frischen Schleimhaut in GBSS-Puffer im Kühlschrank. Hierbei wurde eine Negativ- und eine Positivprobe angefertigt. Die Negativprobe wurde für fünf Minuten auf Eis in PBS inkubiert, die Positivprobe für die gleiche Zeit in einer 15mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung. Danach wurden beide zweimal in PBS gewaschen, der Überstand abgesaugt und dann einem Enzymverdau zur Einzelzellgewinnung und dem darauf folgenden Comet-Assay unterzogen.

Die übrigen MOCs wurden zu je 21 Stück pro Well kultiviert. Am siebenten, neunten und elften Tag wurden alle Miniorgane aus einem Well mittels Pipettenspitze in jeweils ein Multi Safe Seal Tube transferiert und nach einer zweimaligen Waschung mit je einem Milliliter PBS eine Stunde lang mit jeweils einem Milliliter einer angesäuerten PBS-Lösung, bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die pH-Werte wurden mit einer 4- und einer 0,1N HCl-Lösung auf die pH-Werte 6,5; 5,5; 5,0; 4,7; 4,5; 4,3; 4,0 und 3,8 eingestellt. Die Positiv- und die Negativkontrolle wurden mit reinem PBS behandelt (siehe Abbildung 1). Nach der Inkubation erfolgten zwei weitere Waschvorgänge mit PBS. Danach wurde den Miniorganen zur Erholung pro Cup je ein Milliliter AECGBasal-Medium für eine Stunde zugegeben. Am Ende dieser Erholungsphase wurden sieben Miniorgane der Positivkontrolle für fünf Minuten auf Eis mit einer 15mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung inkubiert, danach zweimal in PBS und einmal in AECGB gewaschen. Aus jedem der Ansätze wurden sieben MOCs entnommen und einem Enzymverdau zur Gewinnung der Einzelzellen, sowie dem Comet-Assay, unterzogen. Die übriggebliebenen Schleimhautstücke wurden so auf die frisch mit Agar beschichteten Wells verteilt, dass jedem pH-Wert, sowie der Positiv- und Negativkontrolle ein Well zugeordnet wurde. Dort wurden sie zwei Tage bis zum nächsten Versuch in supplementierten AECG-Medium mit Antibiotikazusatz gehalten, sodass, wie in Abb. 2 dargestellt, am neunten und elften Kulturtag die Versuche in gleicher Weise durchgeführt werden konnten.

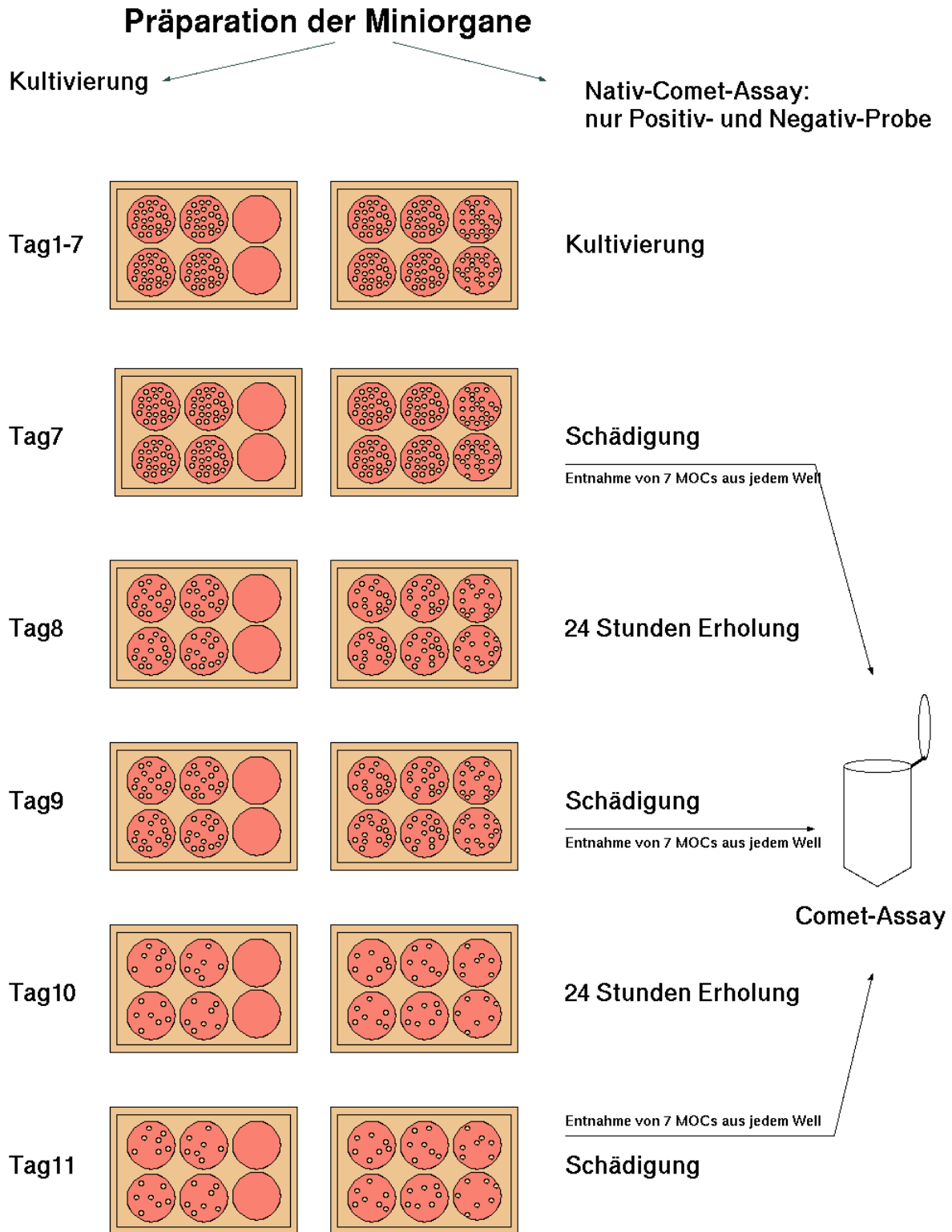


Abbildung 2: Schema für das kumulative Schädigungsprotokoll mit Salzsäure. An den Kulturtagen 7, 9 und 11 wurden nach der Schädigung jeweils 7 MOCs entnommen und einem Vitalitätstest, sowie dem Comet-Assay zugeführt. Die anderen Miniorgane wurden weiterkultiviert.

### **3.2.5 Einzelzellgewinnung**

Zur Vereinzelung der Epithelzellen unterzog man die MOCs einem Enzymverdau. Sie wurden für 45min in einem Mix aus 5% Kollagenase (Gibco, Karlsruhe), 5% Hyaluronidase (Serva, Heidelberg) und 10% Pronase (Sigma, Steinheim) auf einem Schüttler (Heidolph, Schwabach) bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Pro Cup mit jeweils sieben Miniorganen wurden 600µl des, in AECGB-Medium gelösten Enzymmixes benutzt. Nach 45min wurde der Verdau mit 650µl fötalem Kälberserum (Biochrom AG, Berlin) abgestoppt. Die Gewebereste wurden mit einer Pipette entfernt und die Zellsuspension bei 800rpm 8min zentrifugiert (Biofuge, Heraeus, Hanau). Um mögliche Reparaturvorgänge zu verhindern, erfolgten alle weiteren Schritte auf Eis. Nach Entnahme aus der Zentrifuge wurde der Überstand abgesaugt und zweimal mit auf 4°C gekühltem PBS gewaschen.

### **3.2.6 Vitalitätstest**

Der Trypanblauausschlußtest erfolgte nach zweimaligem Waschen mit PBS. Aus jedem Cup wurden 20µl Zellsuspension entnommen und mit ebenfalls 20µl Trypanblau (Sigma, Steinheim) gefärbt. Mit der Zählkammer (Fuchs-Rosenthal, Bad Blankenburg) wurde die Gesamtzellzahl und die prozentuale Vitalität eines jeden Ansatzes bestimmt. Die toten Zellen waren blau gefärbt, die lebenden waren farblos.

## **3.3 Einzelzell-Gel-Elektrophorese**

### **3.3.1 Beschichtung der Objektträger**

Mattierte Objektträger (Marienfeld, Lauda-Königshafen) wurden mit 1%iger, in Aqua destillata gelöster, normal schmelzender Agarose (biozym, Erlangen) in der Weise vorbeschichtet, dass die Objektträger in die gelöste Agarose eingetaucht und die nicht mattierte Unterseite wieder abgewischt wurde. Die Agarose auf der Oberseite wurde auf einer Wärmeplatte (Medax, Kiel) getrocknet, so dass die Objektträger problemlos für eine längere Zeit bei Raumtemperatur aufbewahrt werden konnten. Die vorbeschichteten Objektträger wurden am Versuchstag mit einer weiteren Schicht von 300µl 0,6%iger in PBS gelöster NMP-Agarose beschichtet. Nach der Beschichtung kamen diese für zehn Minuten zum Erstarren in den Kühlschrank.

Nach Verdau der Miniorgane und somit der Vereinzelung der Epithelzellen, wurden diese, nach zweimaligem Waschen in PBS, in 0,5%iger, in PBS gelöster, 37°C

warmer LMP-Agarose (Peq lab, Erlangen) resuspendiert und 85µl der Agarose-Zellsuspension auf die vorbeschichteten Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen (Marienfeld, Lauda-Königshafen) bedeckt, und ebenfalls für zehn Minuten im Kühlschrank aufbewahrt. Danach folgte eine weitere Schicht von 60µl LMP-Agarose, um das Gel glatt nach oben abzuschließen. Diese Art der Beschichtung, wurde in Vorversuchen mit Nasopharynx-karzinomzelllinien (22B) und primären humanen Knorpelzellen als am geeignetsten befunden.

### **3.3.2 Lyse der Zell- und Kernmembran**

Um die DNA auftrennen zu können, muss diese frei im Gel laufen. Dazu müssen Zell- und Kernmembran und auch größere Eiweißmoleküle lysiert werden. Da DNA ohne schützende Hülle besonders vulnerabel ist, ist vor allem bei diesem und den folgenden Schritten auf gleichbleibende Dunkelheit und Temperaturkonstanz zu achten. Die Lyse erfolgte bei 4°C im Kühlschrank für eine Stunde in einem speziellen Lysepuffer. Dieser setzte sich zusammen aus einer Lysestammlösung, bestehend aus 2,5M NaCl (Applichem, Darmstadt), 10mM Trizma Base, 100mM Na<sub>2</sub>EDTA und 1% Laurylsarcosinat (Sigma, Steinheim), die mit NaOH auf pH 10 eingestellt und mit Aqua bidestillata aufgefüllt wurde. Zu dieser Stammlösung wurde am Versuchstag DMSO (Merck, Darmstadt) und Triton (Merck, Darmstadt) zugegeben, sodass die Endkonzentration des DMSO 10% und die des Triton 1% betrug. Der Lysepuffer wurde bis zu seiner Verwendung ebenfalls im Kühlschrank aufbewahrt, sodass eine konstante Temperatur gewährleistet war.

### **3.3.3 Elektrophorese**

Nach einer Stunde wurden die Objektträger aus der Lyselösung entnommen und mit ebenfalls auf 4°C gekühltem Elektrophoresepuffer gewaschen. Um eine gute Auftrennung der DNA zu gewährleisten und die DNA-Helix zu entwinden, wurden die Objektträger mit den lysierten Zellen für eine halbe Stunde in dem alkalischen Puffer eingelegt. Dieser bestand aus 10% 3M NaOH-Lösung und 0,5% 200mM Na<sub>2</sub>EDTA (Roth, Karlsruhe) in Aqua destillata. Für die Elektrophorese wurden die Objektträger in einer horizontalen Elektrophoresekammer (BioRad, Californien) platziert und einer Spannung von 25V mit einer Stromstärke von 300mA für 20min ausgesetzt. Nach der alkalischen Elektrophorese wurden die Objektträger mit einem Neutralisationspuffer neutralisiert, um eine gute Interkalation des DNA-Farbstoffs zu begünstigen. Dazu wurden sie dreimal mit einer Lösung aus 0,4M Tris in Aqua bidestillata, die mit HCl auf pH 7,4 eingestellt war, gewaschen.



Die Objektträger wurden in einer feuchten Kammer ins Institut für Umwelttoxikologie transportiert und dort bis zur Auswertung im Kühlschrank aufbewahrt.

### 3.3.4 Quantifizierung der DNA-Schäden

Die aufgetrennte DNA der zu untersuchenden Zellen wurde mit 0,002%igem Ethidiumbromid (Roth, Karlsruhe), einem, in die DNA interkalierenden Farbstoff, gefärbt. Nach mindestens 15minütiger Einwirkzeit wurden die behandelten Zellen unter dem Fluoreszenzmikroskop (Axioskop, Filter: Excitation BP546/16, Immission LP590, Beamsplitter FT580, Carl Zeiss, Jena) betrachtet und mit einer speziellen Software (Comet 5.5, Liverpool, Großbritannien) ausgemessen. Zur Quantifizierung der DNA-Schädigung und zur statistischen Auswertung wurde der Olive-Tail-Moment (OTM) herangezogen. Um eine ausreichende statistische Signifikanz zu erreichen, wurden pro getestetem pH-Wert zwei Objektträger mit jeweils 50 Zellen ausgemessen. Die Daten wurden automatisch von der verwendeten Software im Microsoft Excel Format gespeichert.

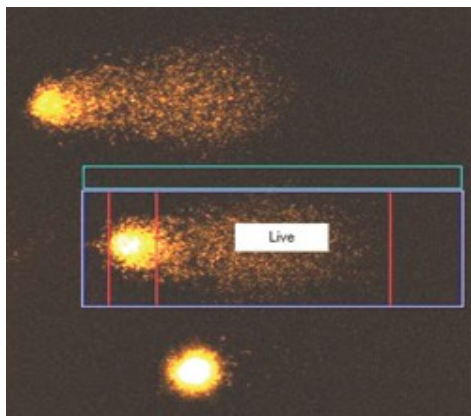


Abbildung 3A: Digitale Auswertung von „Kometen“ mit Comet 5.5: der auszuwertende „Komet“ wird mit einem Rahmen markiert, die roten Linien stellen die Begrenzungen von Kopf und Schweif dar.

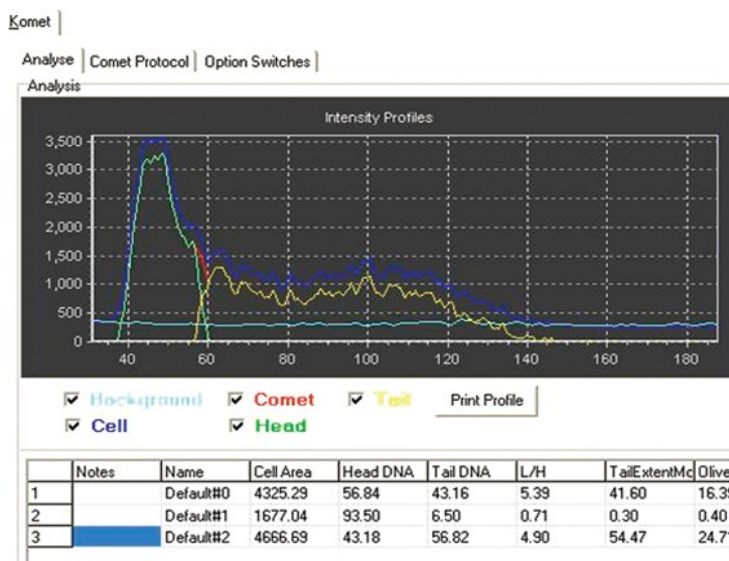


Abbildung 3B: Intensitätsprofil des markierten "Kometen" in Comet 5.5, Kinetic Imaging®

Quelle: <http://www.andor.com/products/software/?app=391Q>

### **3.3.5 Statistische Auswertung der Ergebnisse**

Zur statistischen Auswertung wurde der OTM benutzt. Die graphischen Darstellungen wurden mittels SPSS 12.0 (SPSS, Stanford, USA) als Boxplot erstellt. Darin werden Median als horizontale Linie in der Box, 25. und 75. Perzentile als obere und untere Begrenzung, sowie der jeweils kleinste und größte gemessene Wert als obere und untere T-Markierung dargestellt. Ausreißer die 1,5fach größer sind als der Zahlenwert zwischen der 25. und 75. Perzentile werden als Kreis, die die dreifach oder noch größer sind, als Stern als Extremwerte dargestellt. Die Erstellung der Liniendiagramme erfolgte mit Excel (Microsoft Corporation, Redmond, USA).

Als statistisches Testverfahren zum Vergleich der DNA-Migration zwischen den verschiedenen pH-Werten, sowie zwischen Positiv- und Negativkontrolle, und den, den verschiedenen Gruppen zugeteilten Miniorganen, wurde der Students t-test für unabhängige Stichproben verwendet. Das Signifikanzniveau wurde bei  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Tabelle 2: Chemikalien

<i>Artikel</i>	<i>Firma</i>	<i>Sitz</i>
AECG-Medium	Promo Cell	Heidelberg
Agar LMA	Peq lab	Erlangen
Agar 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
Formaldehyd 4%	Fischar	Saarbrücken
fötale Kälberserum	Biochrom Ag	Berlin
GBSS	Sigma	Steinheim
Hämatoxylin-Eosin	Roth	Karlsruhe
Hyaluronidase	Serva	Heidelberg
Laurylsarcosinat	Sigma	Steinheim
Natriumchlorid	Applichem	Darmstadt
Natronlauge	Roth	Karlsruhe
PBS	Gibco/Invitrogen	Karlsruhe
Pronase	Sigma	Steinheim
Supplement	Promo Cell	Heidelberg
Tris	HB Labor- und Feinchemikalien	Apolda
Triton	Merck	Darmstadt
Trypanblau	Sigma	Steinheim
Wasserstoffperoxyd	Universitätsapotheke	Halle

Tabelle 3: Geräte

<i>Artikel</i>	<i>Firma</i>	<i>Sitz</i>
Brutschrank function line	Heraeus	Hanau
Comet 5.5	Kinetic Imaging®	Liverpool, Großbritannien
Deckgläschen	Marienfeld	Lauda-Königshafen
Elektrophoresekammer	BioRad	Hercules, Californien
Excel 5.0	Microsoft Corporation	Redmond, USA
Feinwaage, MC1 Analytic AC 210 S	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	Nicon	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	SPSS	Stanford, USA
Wärmeplatte	Medax	Kiel
Wasserbad	BINZ	Ilmenau
Zählkammer	Fuchs-Rosenthal	Bad Blankenburg
Zentrifuge	Heraeus	Hanau

## 4 Ergebnisse

Die folgenden Darstellungen geben die Ergebnisse bei der Überprüfung der DNA-Stabilität von Epithelzellen von Miniorgankulturen gegenüber pH-Wert-Veränderungen des umgebenden Milieus wider. Mit Hilfe des alkalischen Comet-Assays wurde die Erbgutschädigung in Form von Einzelstrangbrüchen gezeigt.

Die Miniorgane wurden hinsichtlich der Spender auf mögliche Vorschäden der DNA durch exogene Noxen und Allergien, sowie auf geschlechtsspezifische Unterschiede hin überprüft.

### 4.1 Kultivierung humaner nasaler Schleimhaut als Miniorgane

Die 18 Resektate der unteren Nasenmuscheln wurden als Miniorgane kultiviert, um später mittels Comet-Assay den genotoxischen Einfluss unphysiologischer pH-Werte zu quantifizieren. Unter den Spendern waren 14 Männer und vier Frauen zwischen 12 und 74 Jahren mit einem Durchschnittsalter von 41.

Präparationsbedingt trugen die frischen Miniorgane nur an einer Seite Epithel und wiesen eine unregelmäßige, teilweise zerfranste Struktur auf. Nach ungefähr einer Woche waren die Wundränder soweit verheilt, dass die gesamte Oberfläche von Epithel überzogen war und die Miniorgane eine nahezu kugelige Form angenommen hatten. Unter dem inversen Mikroskop wurde nach jedem Mediumwechsel der koordinierte Zilienschlag als Beweis für die Vitalität der Präparate beobachtet. Diese bewegten sich, bedingt durch den rhythmischen Schlag der Zilien, frei schwimmend im Medium fort.

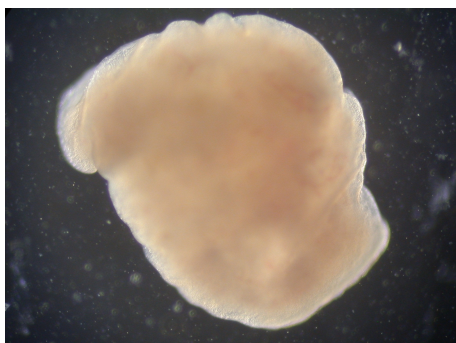


Abbildung 4A: Miniorgan nach sieben-tägiger Kultur bei 40 facher Vergrößerung in inverser Mikroskopie

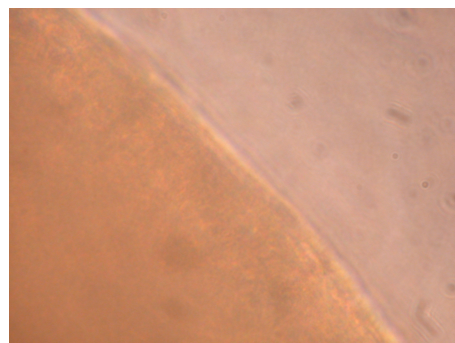
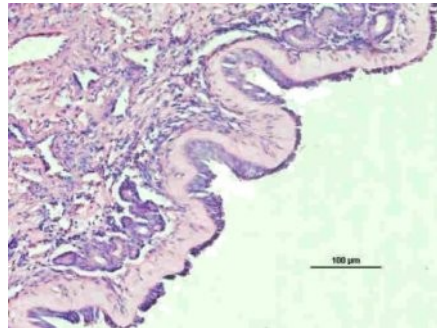


Abbildung 4B: zilientragendes Epithel einer Miniorgankultur bei 400 facher Vergrößerung in inverser Mikroskopie

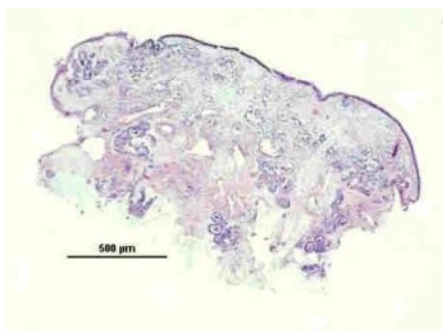
## 4.2 Histologische Untersuchungen

Von jeder entnommenen Nasenmuschel wurden nativ, sowie vor jedem Versuch histologische Präparate angefertigt. Bei der ersten Versuchsreihe wurden Proben am ersten und siebenten, bei der zweiten Reihe am ersten, siebenten, neunten und elften Kulturtag entnommen. Am ersten Tag der Kultivierung sah man in den HE-gefärbten Paraffinschnitten den unregelmäßig geformten Schnitttrand. Eine Seite der Miniorgankultur war mit Epithel bedeckt, die Wundränder waren noch nicht epithelialisiert. Bereits nach siebentägiger Kultur war das gesamte Miniorgan mit einer dünnen Epithelzellschicht überzogen. Während der weiteren Kultur wurde diese mehrschichtig.



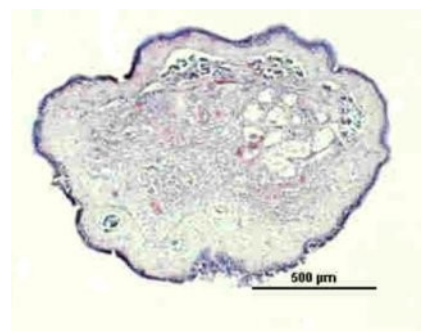
*Abbildung 5A: Natives respiratorisches Epithel in HE-Färbung. Man kann das zilientragende Epithel mit vereinzelt Becherzellen erkennen.*

*(eingefügter Maßstab: 100µm)*



*Abbildung 5B: Frisches, HE gefärbtes Miniorgan nach eintägiger Kulturdauer. Das Präparat ist nur an einer Seite von Epithel bedeckt, der Schnitttrand wirkt ausgefranst.*

*(eingefügter Maßstab: 500µm)*



*Abbildung 5C: HE-Färbung eines Miniorgans nach 7tägiger Kultivierung. Man sieht, dass die gesamte Oberfläche mit Epithel bedeckt ist.*

*(eingefügter Maßstab: 500µm)*

### 4.3 Vitalitätsbestimmung

Jeden Tag wurden die Miniorgankulturen unter dem inversen Mikroskop betrachtet, um den Zilienschlag zu beurteilen. Dieser äußerte sich als eine kräftige Flimmerbewegung an deren Oberfläche. Beim Mikroskopieren wurde darauf geachtet, dass die Platten mit den Organkulturen nicht länger als zehn Minuten aus dem Brutschrank entfernt wurden, um einem eventuellen Schaden durch Unterkühlung vorzubeugen. Auch nach Exposition mit den verschiedenen pH-Werten war der Zilienschlag uneingeschränkt erhalten, das heißt die MOCs vital.

Für die Einzelzellelektrophorese mussten die Miniorgane enzymatisch verdaut werden. Nach Separierung der Epithelzellen von ihrem Gewebeverband, wurde eine kleine Probe für den Trypanblauausschlußtest entnommen. Proben, deren Vitalität unter 75% lag, wurden verworfen. Alle verwendeten Proben wiesen eine Vitalität von mindestens 80% auf.

### 4.4 Quantifizierung des DNA-Schadens

Durch Induktion von Strangbrüchen durch Inkubation mit Wasserstoffperoxyd und angesäuerter PBS-Lösung entstanden DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe. Die DNA der untersuchten Zellen wurde aus ihrer Zell- und Kernmembran liberiert und die Bruchstücke in der Elektrophorese aufgetrennt. Dabei wanderten entsprechend ihrem Molekulargewicht die kleinsten am schnellsten Richtung Anode. Die unfragmentierte DNA blieb an der Ausgangsstelle liegen (siehe Abbildung 6). Das so entstandene kometenähnliche Gebilde, wurde mit dem interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht. Den Kopf dieses Kometen bildete die intakte DNA, die aufgrund ihres hohen Molekulargewichtes nicht im elektrischen Feld gewandert war. Den Schweif bildeten die Bruchstücke. Je kleiner diese waren, desto weiter sind sie Richtung Anode gewandert.

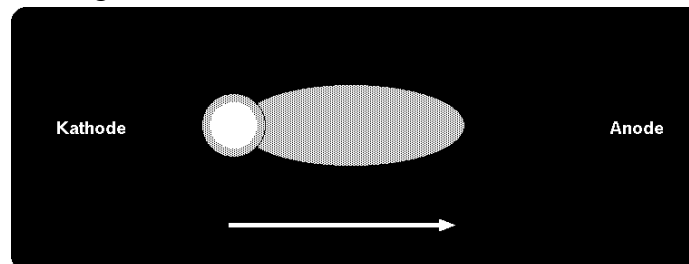


Abbildung 6: Schema zum Laufverhalten von DNA-Bruchstücken in der Elektrophorese

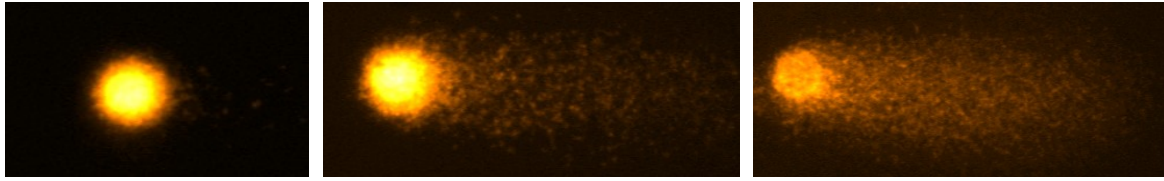


Abbildung 7A B C  
 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen in 200facher Vergrößerung und Färbung mit Ethidiumbromid. A: intakte DNA einer Zelle der Negativkontrolle, B: leicht geschädigte DNA einer mit erniedrigtem pH inkubierten Zelle, C: stark frakturierte DNA einer Zelle der Positivkontrolle

Das Erbgut von Epithelzellen der Negativkontrollen, die lediglich mit reinem PBS behandelt wurden, blieb weitgehend intakt und bewegte sich im elektrischen Feld kaum von der Stelle. Die ballartige Formation wies eine sehr starke Leuchtintensität auf (Abbildung 7A). Die Einwirkung unterschiedlicher pH-Werte auf die Schleimhautzellen führte zu einer geringgradigen Migrationstendenz deren DNA (Abbildung 7B). Durch den Radikalbildner Wasserstoffperoxyd wurde die DNA der Proben stark geschädigt. Die Bruchstücke migrierten größtenteils und befanden sich nach der Elektrophorese zu einem großen Prozentsatz im Kometenschweif. Dadurch nahm die Leuchtintensität im Kometenkopf proportional ab (Abbildung 7C).

Um den Schädigungsgrad der Zellen untereinander vergleichen zu können, wurde als Maß für die DNA-Fragmentierung der Einzelzelle der Olive-Tail-Moment (OTM) benutzt, da dieser die DNA-Schäden am zuverlässigsten quantifiziert [Olive PL et al., 1993] [Duez P, 2003].

Die Miniorgankulturen der insgesamt 18 Nasenmuscheln wurden zwei unterschiedlichen Versuchsprotokollen zugeführt. Die erste Versuchsreihe beschränkte sich auf eine einmalige Schädigung am siebenten Kulturtag. Für die zweite wurden die MOCs mit jeweils einem Tag Pause an drei Tagen geschädigt.



#### 4.4.1 Einmalige Schädigung der Miniorgane

Bei den folgenden Versuchen wurden die Miniorgane am siebenten Kulturtag geschädigt. Die Abhängigkeit des Schädigungsausmaßes der DNA von der Wasserstoffionenkonzentration wurde stellvertretend mit PBS-Lösungen untersucht, die mit Salzsäure auf die pH-Werte 6,5; 5,5; 5,0; 4,7; 4,5; 4,3; 4,0 und 3,8 eingestellt wurden. Die Negativprobe mit reinem PBS und die Positivprobe mit 15mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden als Kontrollen mitgeführt. Vor der eigentlichen Kultivierung wurde ein Comet-Assay mit Nativpräparaten der entnommenen Nasenschleimhaut angefertigt. Hierbei wurden nur Positiv- und Negativkontrollen untersucht.

Die Mediane der mittleren OTM-Werte der mit verdünnter Salzsäure behandelten Proben lagen zwischen 5,8 und 9,05. Ihre Mittelwerte unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Die Negativkontrolle war mit einem Median ihres mittleren OTM-Wertes von 5,05 signifikant geringer geschädigt als die Proben, die mit einem pH von 6,5; 5,5; 4,5; 4,3; 4,0 und 3,8 behandelt wurden. Die Positivkontrolle unterschied sich mit einem Median von 19,85 von allen Übrigen höchst signifikant. Sie wies ein wesentlich höheres Olive-Tail-Moment auf als alle anderen. Es lag eine sehr viel stärkere Schädigung vor. (Die p-Werte sind in Tabelle 6 im Anhang dargestellt)

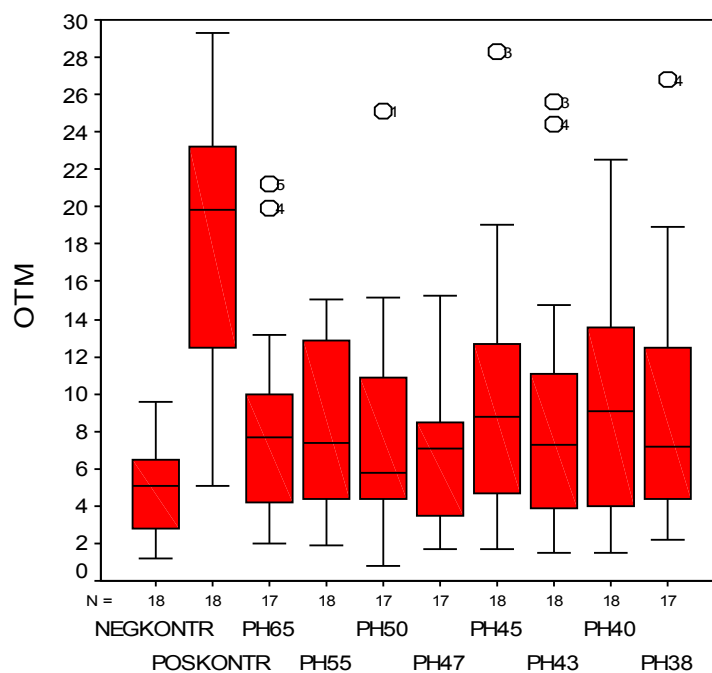


Abbildung 8: Boxplotdarstellung der DNA-Fragmentierung bei Schädigung von Miniorganen humaner nasaler Schleimhaut

Wie in Abbildung 8 deutlich wird, liegen die Mediane der OTM-Werte die mit einem pH unter 4,6 erzielt wurden, über denen die bei pH-Werten oberhalb von 4,6 erreicht worden sind. Um diesen Unterschied stärker zu verdeutlichen, wurden die Miniorgane zwei Gruppen zugeordnet. Einer Gruppe wurden die MOCs zugeordnet, die mit einem pH > 4,6 geschädigt wurden (Gruppe 1), der anderen die, die mit einem pH < 4,6 geschädigt wurden (Gruppe 2), sodass auf jede der beiden Gruppen die gleiche Anzahl an Miniorganen entfiel. Desweiteren wurden sechs Schädigungsbereiche festgelegt. Der erste Bereich enthielt alle OTM-Werte  $\leq 5,6$ , der zweite die OTM-Werte zwischen 5,6 und 11,2, der dritte diejenigen zwischen 11,2 und 16,8, der folgende die zwischen 16,8 und 22,4, der nächste die zwischen 22,4 und 28 und der letzte Bereich enthielt alle OTM-Werte zwischen 28 und 33,6. Die OTM-Werte der beiden Gruppen, Schädigung mit einem pH > 4,6 und Schädigung mit einem pH < 4,6, wurden diesen Bereichen zugeordnet und ermittelt, wie groß die Anzahl der, in dem jeweiligen Bereich liegenden Miniorgane war (Tabelle 4). Die graphische Darstellung in Abbildung 9 zeigt, dass die MOCs, die der Gruppe 1 zugeordnet waren, stärker als die der Gruppe 2 in den unteren Schädigungsbereichen mit OTM-Werten zwischen 0 und 16,8 vertreten waren, die der Gruppe 2 stärker in den oberen Bereichen mit OTM-Werten zwischen 16,8 und 33,6. Der Grad der Schädigung steigt also mit sinkendem pH-Wert.

Tabelle 4: Absolute Häufigkeiten der OTM-Werte in Abhängigkeit vom pH-Wert  $pH > 4,6$  (Gruppe 1) und  $pH < 4,6$  (Gruppe 2)

OTM-Werte	$pH > 4,6$	$pH < 4,6$
$< 5,6$	27	26
5,6-11,2	26	24
11,2-16,8	12	10
16,8-22,4	2	5
22,4-28	1	4
28-33,6	0	1

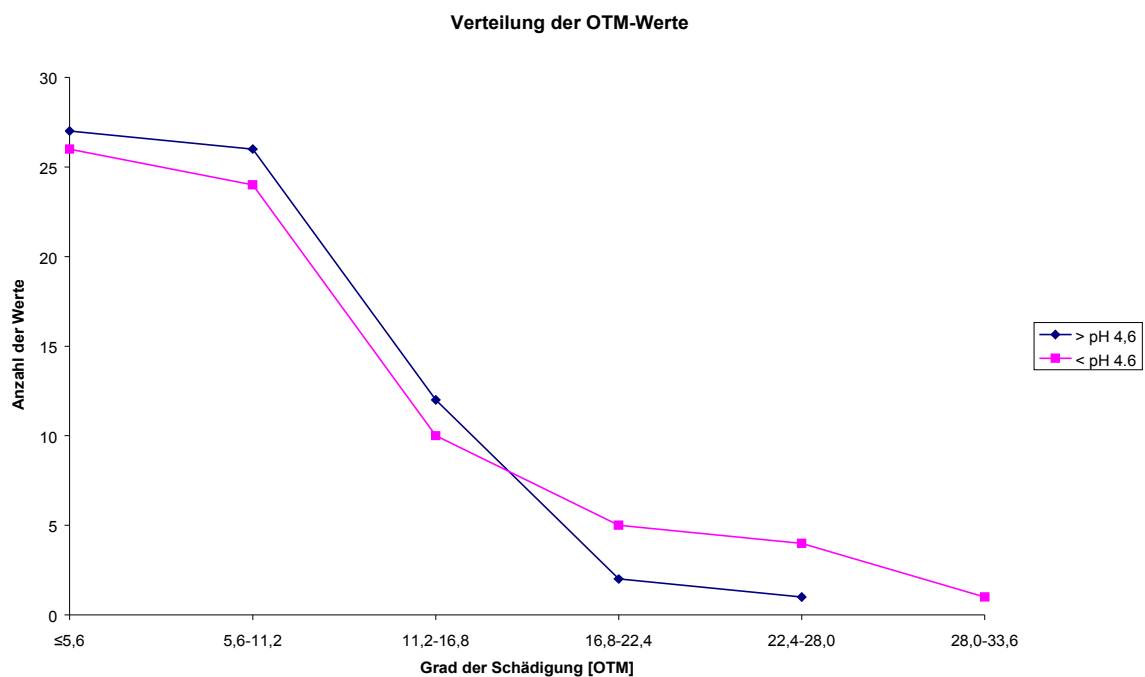


Abbildung 9: Darstellung der mittleren OTM-Werte nach Zuordnung der Miniorgane zu Gruppen die mit einem  $pH > 4,6$  und einem  $pH < 4,6$  inkubiert wurden

#### 4.4.2 Kumulative Schädigung der Miniorgane

Da in vivo bei einem Patienten mit Refluxösophagitis mehrere pH-Abfälle pro Tag auftreten, wurde der Einfluss einer repetitiven pH-Erniedrigung auf die Epithelzellen der Miniorgankulturen untersucht. Dabei wurden diese an drei verschiedenen Untersuchungszeitpunkten je acht unterschiedlich sauren PBS-Lösungen ausgesetzt. Sie wurden dem gleichen Schädigungsprotokoll zugeführt wie bei der ersten Versuchsreihe am siebenten Versuchstag. Jeweils am neunten Kulturtag der vorhergehenden Versuchsreihe wurden die Negativ- und Positivkontrolle der Nativpräparate mitgeführt. Da der Platz in der Elektrophoresekammer auf 20 Objektträger beschränkt war, konnten an diesem Tag nur sechs verschiedene pH-Werte getestet werden. Der höchste und der niedrigste pH-Wert, pH 6,5 und pH 3,8, wurden am Tag neun nicht untersucht.

An den verschiedenen Versuchstagen konnten innerhalb der untersuchten pH-Werte keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Lediglich die OTM-Werte der Positivkontrollen des ersten und siebenten, sowie des ersten und neunten Tages und der Negativkontrollen des ersten und neunten Tages unterschieden sich untereinander signifikant. (Die p-Werte sind in Tabelle 7 im Anhang dargestellt)

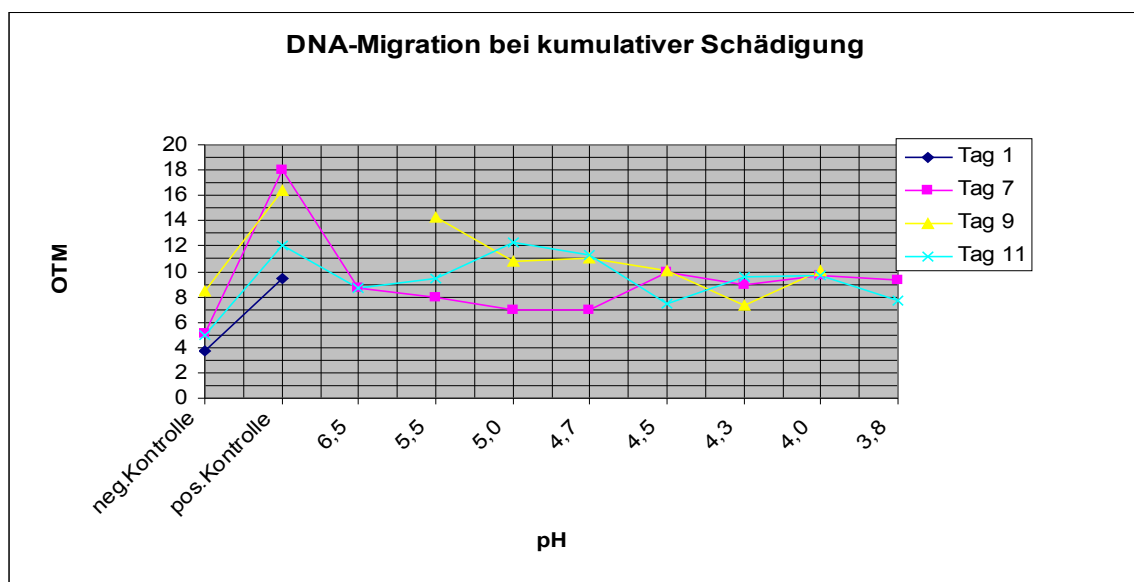


Abbildung 10: mittlere OTM-Werte bei kumulativer Schädigung von Miniorgankulturen mit unterschiedlichen pH-Werten.

Tag 1 n=5, Tag 7 n=18, Tag 9 n=3, Tag 11 n=4

#### 4.4.3 Vergleich der mittleren OTM-Werte in Abhängigkeit von verschiedenen Einflussfaktoren

Die insgesamt 18 Nasenmuscheln wurden hinsichtlich ihrer Spender unterschiedlichen Gruppen zugeordnet. Von den Spendern waren 14 Männer und vier Frauen. Unter ihnen befanden sich zwölf Nichtraucher und sechs Raucher. 14 von ihnen tranken keinen Alkohol, vier tranken regelmäßig, zehn hatten keine Allergien und acht waren Allergiker. Die in den vorangegangenen Experimenten gewonnenen Daten wurden in die entsprechenden Gruppen eingeordnet und untereinander verglichen.

##### a) Vergleich der mittleren OTM-Werte von Männern und Frauen

Beim Vergleich von Männern und Frauen ergab sich kein signifikanter Unterschied bezüglich der DNA-Fragmentation nach Einwirken unterschiedlicher Protonenkonzentrationen auf die Epithelzellen kultivierter Miniorgane ihrer Nasenschleimhäute. (Die p-Werte sind in Tabelle 8 im Anhang dargestellt)

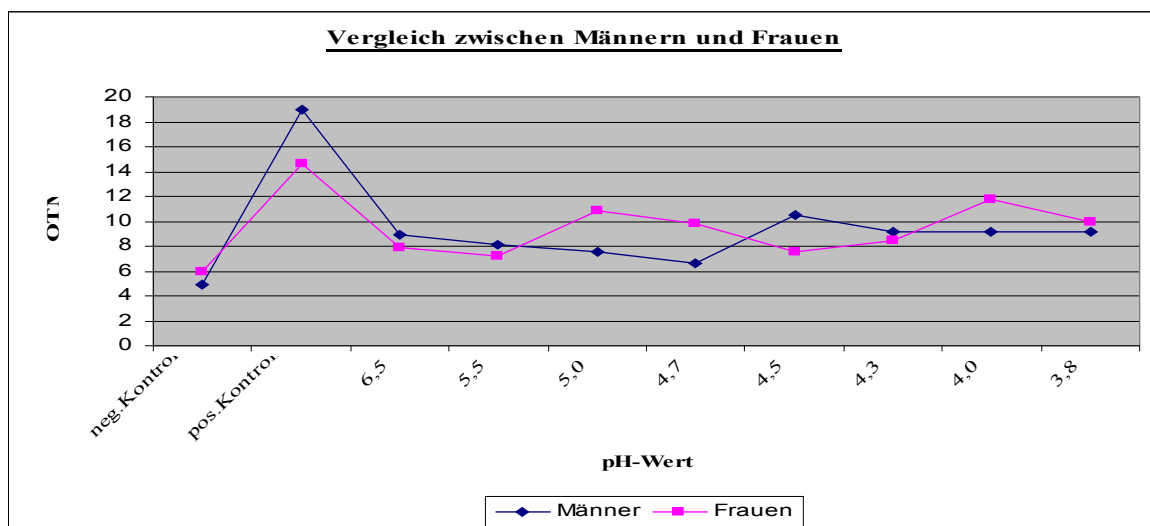


Abbildung 11: Vergleich der DNA-Fragmentation humaner nasaler Schleimhautepithelzellen nach einmaliger Einwirkung acht unterschiedlicher pH-Werte bei Männern und Frauen

Männer  $n=14$ , Frauen  $n=4$

## b) Vergleich der mittleren OTM-Werte von Rauchern und Nichtrauchern

Beim Vergleich von Rauchern und Nichtrauchern ergab sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied bezüglich der DNA-Fragmentation nach Einwirken von Salzsäure unterschiedlicher Verdünnungen auf die Zellen des Nasenschleimhautepithels von kultivierten Miniorganen. (Die p-Werte sind in Tabelle 9 im Anhang dargestellt)

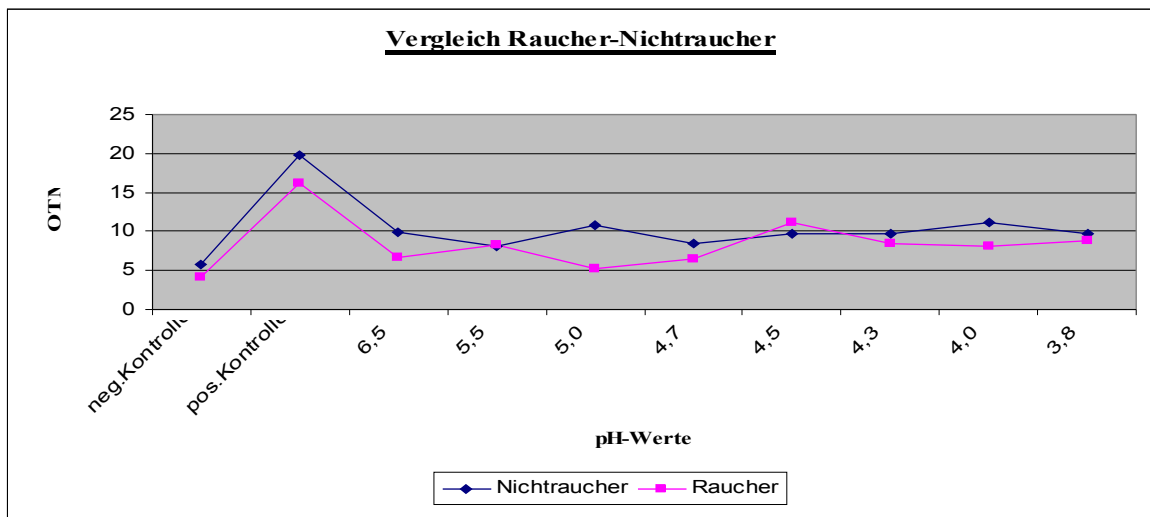


Abbildung 12: Darstellung der mittleren OTM-Werte von nasalen Schleimhautepithelzellen nach einmaligem Einwirken unterschiedlicher pH-Werte bei Rauchern und Nichtrauchern

Raucher  $n=6$ , Nichtraucher  $n=12$

## c) Vergleich der mittleren OTM-Werte ohne und mit Alkoholkonsum

Beim Vergleich der mittleren OTM-Werte der, gegenüber verschiedenen pH-Werten exponierten Nasenschleimhautepithelzellen von Spendern die nie Alkohol tranken, versus denjenigen, die regelmäßig Alkohol konsumierten, zeigte sich bei einigen pH-Werten ein statistisch signifikanter Unterschied. Insgesamt war das Genom der Mukosazellen von nie alkoholkonsumierenden Probanden schwächer geschädigt. Eine in der Statistik signifikant geringere Schädigung fiel allerdings nur bei den pH-Werten 6,5; 4,5; 4,3 und 3,8 auf. (Die p-Werte sind in Tabelle 10 im Anhang dargestellt)

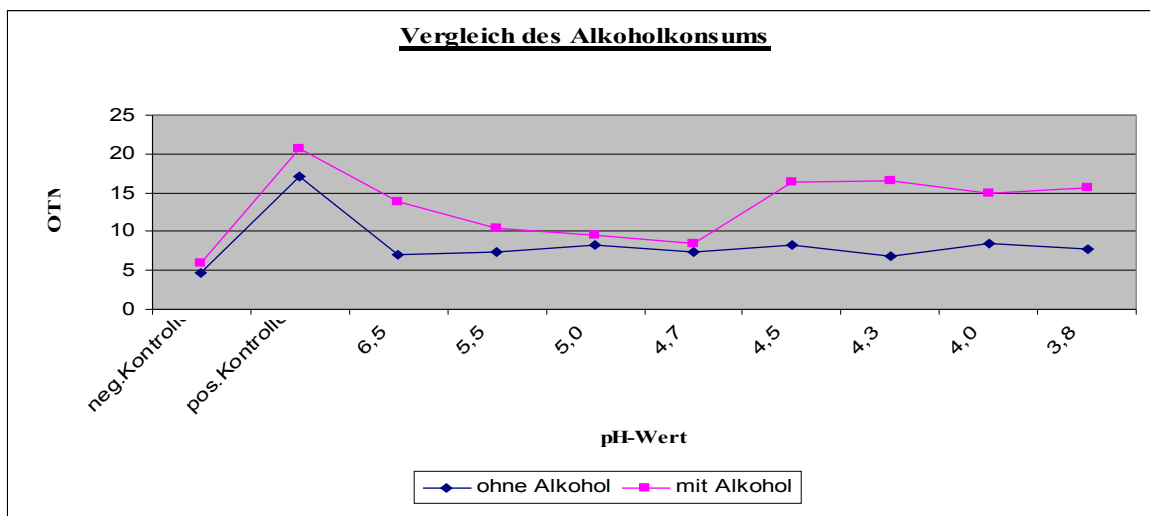


Abbildung 13: mittlere OTM-Werte von nasalen Schleimhautepithelzellen von Spendern mit und ohne Alkoholkonsum nach einmaligem Einwirken unterschiedlicher pH-Werte

ohne Alkohol  $n=14$ , mit Alkohol  $n=4$

## d) Vergleich der mittleren OTM-Werte bei Allergikern und Nicht-Allergikern

Bei Nicht-Allergikern zeigte sich im Vergleich zu Allergikern bezüglich der DNA-Fragmentation nach einmaliger Exposition von, aus ihrer Nasenschleimhaut gewonnenen Miniorgankulturen, gegenüber einem sauren Milieu, eine geringere Schädigung. Signifikant war diese aber nur bei der Positivkontrolle mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. (Die p-Werte sind in Tabelle 11 im Anhang dargestellt)

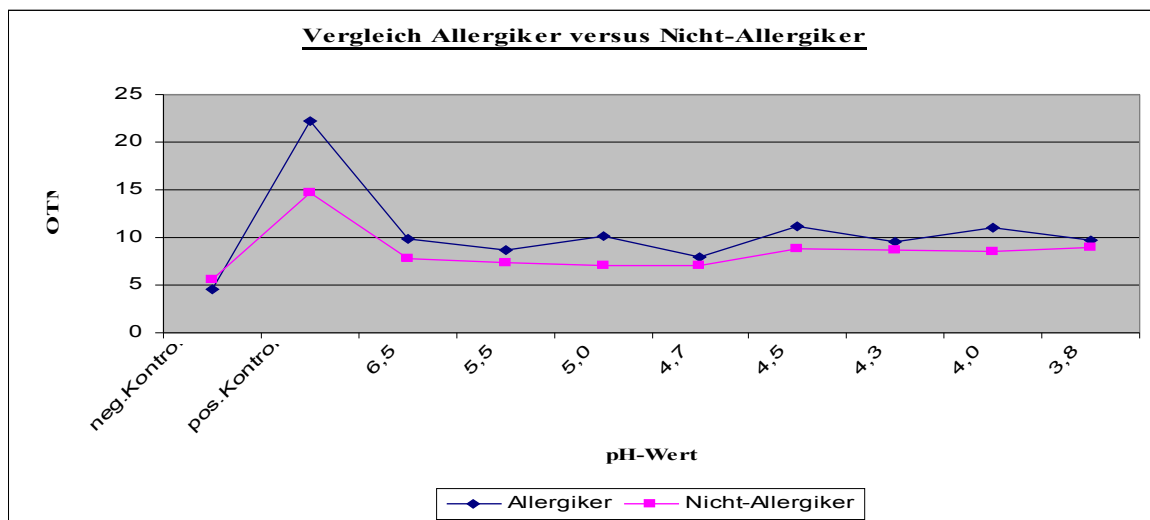


Abbildung 14: mittlere OTM-Werte von nasalen Schleimhautepithelzellen nach einmaliger Exposition gegenüber unterschiedlichen pH-Werten bei Allergikern und Nicht-Allergikern

Allergiker n=8, Nicht-Allergiker n=10

## e) Einfluss des Alters

Hinsichtlich des Alters waren die Gruppen sehr heterogen und sind hier graphisch nicht dargestellt.



## 5 Diskussion

### 5.1 Diskussion des Testsystems Miniorgankulturen

Miniorgankulturen wurden erstmals von Steinsvag et. al. 1991 beschrieben. Er kultivierte diese aus adenoidem Gewebe, führte histologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen durch und bewies, dass diese Miniorgankulturen über einen Zeitraum von bis zu 40 Tagen intakt bleiben können [Steinsvag SK et al., 1991]. Kleinsasser und Mitarbeiter haben dieses Modell aufgegriffen und ein Testsystem entwickelt, mit dem ökogenotoxikologische Untersuchungen durchgeführt werden können [Kleinsasser NH et al., 2001] [Kleinsasser NH et al., 2003] [Kleinsasser NH et al., 2004]. Obwohl dieses System zahlreiche Vorteile bietet, finden sich in der internationalen Literatur außerhalb der oben genannten Arbeitsgruppe vergleichsweise wenige Anwendungsbeispiele.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, in Anlehnung an Kleinsasser ein Testsystem aus Miniorgankulturen respiratorischer Schleimhaut in unserem Labor zu etablieren und als Organmodell für die Tumorentstehung im Kopf-Hals-Bereich zu nutzen. Hintergrund dieser Untersuchungen ist die These, dass pharyngolaryngealer Reflux zur Karzinomentstehung im oberen Aerodigestivtrakt beiträgt. Zur Beurteilung möglicher DNA-Veränderungen im epithelialen Zellverband kam der Comet-Assay zum Einsatz.

Der Verzicht auf Tierversuche, die nicht ausnahmslos auf die Situation im Menschen übertragbar sind, ist ein Vorteil dieses Systems. Da die Zellen in ihrem organspezifischen Verband bleiben, stellt die Verwendung von Miniorgankulturen eine Möglichkeit dar, in einem in vitro durchgeführten Versuch Bedingungen zu schaffen, die denen im lebenden Organismus sehr nahe kommen [Wallner BC et al., 2005]. Aus dem Zellverband herausgenommene Monokulturen eignen sich für viele Untersuchungen nur unzureichend, da sie sich in Gewebearchitektur, Zellzusammensetzung und -differenzierung teilweise stark von in situ befindlichen Zellen unterscheiden [Merkle HP et al., 1998] [Reed CJ, 1997] [Wroblewski R, Wroblewski J, 1994]. So stellt zum Beispiel die Entdifferenzierung von isolierten Zellen ein großes Problem dar. Dadurch ist die Detoxifikations- und Syntheseleistung von Monolayer-Kulturen herabgesetzt. Dies konnte am Beispiel von Leberzellen gezeigt werden [Khalil M et al., 2001] [Ambrosino G et al., 2005]. Bei Untersuchungen zur Permeabilität respiratorischen Epithels wurde festgestellt, dass diese zwischen Zellkulturen und zusammenhängendem Gewebe stark differiert. Die

Experimente ergaben eine wesentlich höhere Durchlässigkeit der Epithelzellkultur gegenüber den intakten Gewebestücken [Chemuturi NV et al., 2005].

Ein weiterer Vorteil zeigte sich in der relativ einfachen Handhabung des Systems. Die Kultivierung der Miniorgane aus respiratorischer Schleimhaut erwies sich als relativ störungsunanfällig. Als wichtigste Einflussgrößen für ein ungestörtes Wachstum wurden identifiziert:

- eine gründliche Entfernung der submukosalen Anteile von der Schleimhaut
- Aufbewahrung und Transport in GBSS-Puffer
- Aufbewahrung bis zur Präparation im Kühlschrank
- kurze Transportzeit
- eine schonende Präparation mit einem scharfen Skalpell, um epitheliale Läsionen zu vermeiden
- eine lückenlose Agarbeschichtung der Kulturplatten
- kurze Aufenthaltszeiten der Kulturplatten außerhalb des Brutschranks, zum Beispiel während des Mikroskopierens

In unserem Labor wurde eine Epithelialisierung der gesamten Oberfläche mit zilientragendem Epithel innerhalb von fünf bis sechs Tagen beobachtet. Dieses saß einer kräftigen Basalmembran auf. Der, unter dem inversen Mikroskop gesehene Zilienschlag führte dazu, dass sich die Proben frei im Kultursystem bewegten. Zu Beginn der Kultur wurde das Zentrum des Gewebestückchens von Lymphozyten dominiert, die im Laufe der Kulturdauer von einem kollagenreichen Stroma mit vereinzelt Fibroblasten abgelöst wurden. Die Resultate von Steinsvåg und Mitarbeitern konnten mit diesen Beobachtungen reproduziert werden [Steinsvag SK et al., 1991]. Ein möglicher Grund für das Verschwinden der Lymphozyten aus dem anfangs zellreichen Stroma kann die Anwesenheit von Hydrocortison im Kulturmedium sein.

Wir sahen eine erhöhte Proliferation und Migration von Epithelzellen. Sie ist unter anderem auf die Anwesenheit von Fibroblasten in der Mukosa zurückzuführen. Koboayashi et. al. postulierten, dass jener Zelltyp für dieses Phänomen verantwortlich sei [Kobayashi K et al., 2006]. Das gesteigerte Epithelzellwachstum führte zu einer geschlossenen, der Neo-Basalmembran aufliegenden, differenzierten Zellschicht, die innerhalb von wenigen Tagen das gesamte Gewebeteilchen umschloss. Sie enthielt sowohl Basal- als auch Becherzellen und kubische, zilientragende Zellen auf ihrer Oberfläche. Diese Architektur entspricht der der Nasenschleimhaut in vivo [Bucher O, Wartenberg H, 1997].

Unsere Beobachtungen werden durch die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen gestützt. Bals et. al. und Fjellbirkeland et. al. erkannten die Expression epithelialer Marker und zeigten einen steten Anstieg des Gehalts an Zilien innerhalb der ersten 15 Tage. Immunhistochemisch wiesen sie eine neusynthetisierte Basalmembran nach [Bals R et al., 1998] [Fjellbirkeland L et al., 1996]. Wir dokumentierten die Epithelialisierung der Miniorgane mit HE-gefärbten Paraffinschnitten.

## **5.2 Comet-Assay**

In der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Schäden durch die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (kurz: Comet-Assay) quantifiziert. Durch diese Methode wird der Nachweis von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und von Fragmenten, die aus der Exzisionsreparatur stammen ermöglicht [Brendler-Schwaab S et al., 2005] [Martino-Roth MG et al., 2003] [Tice RR et al., 2000]. Der sogenannte Comet-Assay ist ein etablierter Genotoxizitätstest mit reproduzierbarem Aussagewert, der bisher unter verschiedenen Gesichtspunkten angewandt wurde [Olive PL, Banáth JP, 1992] [Olive PL et al., 1993] [Cotelle S, Férard JF, 1999].

Andere Prüfverfahren für Genotoxizität, die gegenüber dem Comet-Assay verschiedene Nachteile besitzen, sind zum Beispiel der Ames-Test und der Mikrokerntest. Der Ames-Test nutzt die Eigenschaft einer schadstoffinduzierten Rückmutation histidindefizienter *Salmonella typhimurium*-Stämme. Genetische Veränderungen werden dadurch detektiert, dass die Bakterien ihre Fähigkeit wiedererlangen auf histidinfreiem Agar zu wachsen [biozentrum.uni-wuerzburg]. Der Ames Test bezieht sich auf das genotoxische Potential von Stoffen gegenüber dem Genom eines Prokaryonten, und ist so nicht ohne weiteres auf die Situation beim Menschen übertragbar. Beim Mikrokerntest wird die Zytoplasmateilung kultivierter Zellen mit dem Pilzgift Cytochalasin B blockiert. Proliferierende Zellen erscheinen dadurch doppelkernig. Die Zellen werden dann mit einem Fluoreszenzfarbstoff (DAPI) gefärbt. DNA-Bruchstücke und Chromosomen, die aufgrund einer Störung des Spindelapparates nicht auf einen der beiden Tochterkerne verteilt werden konnten, erscheinen unter dem Fluoreszenzmikroskop als Mikrokern [Fenech M, 2000] [Fenech M, 2005]. Diese stellen ein Maß der chromosomalen Schädigung dar. Inversionen und Translokationen können nicht detektiert werden, da sie nicht zur Fragmentbildung führen. Dadurch besteht keine direkte quantitative Beziehung zwischen Chromosomenaberrationen und Mikrokernrate. Das Phänomen der

Feldkanzerisierung im oberen Aerodigestivtrakt konnte durch eine erheblich gesteigerte Rate an Mikrokernen bei Patienten mit Tumoren und Leukoplakien in diesem Bereich nachgewiesen werden [Bloching MB, 2001]. Auch verschiedene Elektrophoresemethoden kommen zum Einsatz. Sie alle setzen eine vorhergehende PCR und spezielle Apparaturen voraus und erlauben die Analyse nur bestimmter Fragmentlängen [Mühlhardt C, 1999].

Um eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch zytotoxische Schäden im Comet-Assay auszuschließen, wurden in den vorliegenden Versuchen nur Proben verwendet, die eine Zellvitalität von über 80% aufwiesen. Gerade Gewebe mit einer hohen Zellumsatzrate, wie Schleimhautepithelien, besitzen einen relativ geringen Anteil an lebenden Zellen [Albertini RJ et. al., 2000]. Bei einem Gehalt von bis zu 20% avitaler Zellen ist es wichtig diese zu erkennen, da auch nekrotische und apoptotische Zellen ein zerstörtes Erbgut besitzen, jedoch nicht zur Tumorentstehung beitragen. Während der Auswertung am Computer konnten diese durch ihr spezifisches Erscheinungsbild erkannt werden. So imponierten tote oder sterbende Zellen als Kometen mit einem kleinen bis nicht existierenden Kopf und großem, diffusem Schweif [Brendler-Schwaab S et al., 2005]. Aufgrund ihres kleinen Kopfes und des fahnenartigen Schweifs, wird das Erscheinungsbild apoptotischer Zellen auch als „hedgehog“ (Igel)- image bezeichnet. Nekrotische Zellen weisen einen etwas größeren Kopf und längeren Schweif auf [Rundell MS, Wagner ED, Plewa MJ, 2003]. Im Endstadium der Apoptose finden sich kleine, kondensierte Partikel ohne Schweif, die als apoptotische Remnants bezeichnet werden [Bacsó Z, Everson RB, Eliason JF, 2000]. Diese Zellen wurden nicht ausgemessen. Ihre Werte flossen nicht in die Statistik ein, da dies zu deren Verfälschung geführt hätte, denn aufgrund ihrer typischen Form besitzen nekrotische und apoptotische Zellen einen sehr großen OTM. In Versuchen zur Ansprechrate von Tumorzellen auf die Therapie, wurde eine Korrelation der Prozentzahl von Kometen mit einem Tail-Moment unter 20 mit der Prozentzahl der Zellen die die Therapie überlebten festgestellt [Olive PL, Durand RE, 2005].

Desweiteren ergab sich in den hier durchgeführten Untersuchungen zur quantitativen Erfassung von DNA-Schäden durch erniedrigten pH-Wert auf Zellen des Respirationstraktes im Comet-Assay eine interindividuelle, wie auch interzelluläre Heterogenität.

#### a) Interindividuelle Heterogenität

Die interindividuelle Heterogenität im Comet-Assay wurde auf das sehr unterschiedliche Patientenkollektiv zurückgeführt. Nasenschleimhaut von Probanden zwischen 12 und 74 Jahren kam zum Einsatz, so dass testunabhängige Vorschäden zu beachten waren. Es wurden Gruppen mit weitgehend gleichen Spendereigenschaften gebildet und hinsichtlich möglicher Unterschiede verglichen. Die geringe Spenderzahl eignet sich jedoch nicht für eine Statistik mit relevanter Aussage. Die Trends in bestimmte Richtungen lassen aber Vermutungen anstellen.

#### b) Interzelluläre Heterogenität

Nicht nur zwischen den einzelnen Probanden, sondern auch zwischen den Zellen einer Probe, schwankten die Werte teilweise erheblich. Wie auch in Untersuchungen von Seidel zur Heterogenität im Comet-Assay, fiel auf, dass der mittlere DNA-Schaden und seine Varianz hochgradig positiv miteinander korrelieren. Das heißt, je stärker die DNA-Schädigung, desto mehr schwanken auch die OTM-Werte um ihren Mittelwert [Seidel CK, 2006]. Außerdem zeigte Seidel, dass Antioxidantien die Varianz der Messwerte bis auf das Niveau der in vivo Situation verkleinern [Seidel CK, 2006]. Auch der Antioxidantiengehalt in der Zelle selbst kann differieren und zu unterschiedlichen Ergebnissen führen [Olive PL, Banáth JP, Mac Phail HS, 1994].

Die Schädigung in dem vorliegenden Experiment geschah vor der Lyse. Somit ist der Einfluss eines interzellulär eventuell unterschiedlichen Packungsgrades der DNA eines Individuums denkbar. In unbehandelten Zellen ist die DNA zusammengefaltet und eng an Histone und Nicht-Histonproteine gebunden und mit ihnen an der nukleären Matrix verankert. Die DNA liegt dicht gepackt vor [Xue LY et al., 1994]. Unter den Bedingungen der alkalischen Gelelektrophorese werden diese Proteine größtenteils heraus gelöst, sodass nur noch wenige Histonproteine und Nicht-Histonproteine an der nukleären Matrix gebunden sind [Olive PL, Banáth JP, 1995]. Dass der Histongehalt einen Einfluss auf die Ergebnisse hat, wurde gezeigt. In Experimenten mit Röntgenstrahlen korrelierte dieser im Comet-Assay negativ mit dem Schädigungsausmaß sowie dessen Varianz [Seidel CK, 2006]. Möglicherweise wirkt sich auch der extrazelluläre pH-Wert indirekt auf die Architektur der Kernproteine aus. Jiminez et. al. beschrieben eine erhöhte Proliferationsrate von Epithelzellen des Ösophagus im Kaninchen in Abhängigkeit vom extrazellulären pH. Bedingt durch die gesteigerte Zellteilung ist eine zunehmende DNA-Schädigung möglich [Jiminez P et. al., 1998].

Ein weiterer Grund für die gefundene interzelluläre Heterogenität kann darin gesehen werden, dass, je nach Größe, nicht alle DNA-Fragmente nachweisbar sind. Im alkalischen Comet-Assay werden Einzelstrangbrüche sichtbar gemacht. Da die Bruchstücke je nach Molekulargewicht unterschiedlich weit in der Elektrophorese laufen, können bei einer zu geringen Anzahl von Brüchen (<50/Zelle) Fragmente entstehen, die zu groß sind, um zu migrieren. In diesem Fall kann der Schaden nicht detektiert werden. Die größtmögliche Schweiflänge kann im Allgemeinen bei einer Bruchstückzahl von 2000 pro Zelle abgeschätzt werden [Olive PL, Durand RE, 2005].

Das Epithel der Nasenschleimhaut befindet sich ständig in Regeneration. Es ist vorstellbar, dass auch hier ein Zusammenhang mit der interzellulären Heterogenität besteht. Olive et al. beschrieben die Abhängigkeit des Migrationsverhaltens der DNA vom Zellzyklus. Replizierende DNA migriert schneller, da die Replikationsgabeln wie Einzelstrangbrüche erscheinen. Die DNA von Zellen in der G<sub>1</sub>- und Mitose-Phase wandert dabei weiter als die der Zellen in der G<sub>2</sub>-Phase und diese wandert wiederum weiter, als die DNA der S-Phase [Olive PL, Durand RE, 2005].

### c) Einfluss des Experimentators

Da schon kleine Unterschiede in der Methodik zu großen Abweichungen der Ergebnisse führen, ist der Einfluss der Übung und Erfahrung des Experimentators in der Vorbereitung der Objektträger bis zur Auswertung nicht zu unterschätzen. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurden alle Auswertungen von der gleichen Person vorgenommen und die Objektträger mit einem, dem Experimentator unbekanntem Code versehen, und erst nach Beendigung der Messung entschlüsselt. Dieses Vorgehen wurde schon von anderen Arbeitsgruppen beschrieben [Tice RR et al., 2000].

Gleichzeitige oder automatisierte Messungen wie bei Böcker [Böcker W, 1999] wurden nicht durchgeführt.

Nach der Elektrophorese wurden die Objektträger bis zur Auswertung in einer feuchten Kammer im Kühlschrank gelagert. Um eine größere zeitliche Unabhängigkeit zu den Versuchen zu erreichen, können sie auch getrocknet und somit lange haltbar gemacht werden [Benítez-Bribiesca L et al., 2001]. Wichtig ist eine standardisierte Aufbewahrung der Objektträger für alle Versuche.

### 5.3 DNA-Migration unter verschiedenen pH-Bedingungen

Die Miniorgane wurden mit acht verschiedenen pH-Werten inkubiert, die in einer Spannbreite von 6,5 bis 3,8 gewählt wurden. In vivo ist Reflux definiert als ein pH-Abfall für 6% der Zeit auf unter vier [Chen MYH, Ott DJ, Cosolo B, 1998]. Diese Grenze wird allerdings von einigen Autoren angezweifelt [Andersson O et. al., 2006]. In Studien zur Wundreparatur von ösophagealen Epithelzellen konnte gezeigt werden, dass auch kleine pH-Abfälle zu schweren Schäden in der Wundheilung führen [Jiminez P et. al., 1998]. Im Ösophagus besteht ein pH-Gradient. Nahe dem distalen Ösophagussphinkter ist das Refluxat saurer als weiter proximal. Dieser Gradient hat einen Einfluss auf die klinische Ausprägung der Epithelschädigung [Dickmann R et. al., 2006].

Es fand sich eine leichte, aber signifikant erhöhte DNA-Schädigung bei fast allen der acht untersuchten pH-Werte. In einer ersten Versuchsreihe wurden die Miniorgane einer Einfachexposition am siebenten Kulturtag unterzogen. Bei den getesteten pH-Werten zeigte sich eine recht homogene Erhöhung der OTM-Werte gegenüber der Kontrolle. Die Zuordnung der Miniorgane zu zwei Gruppen, Schädigung mit einem  $\text{pH} > 4,6$  (Gruppe 1) und Schädigung mit einem  $\text{pH} < 4,6$  (Gruppe 2), machte deutlich, dass mit sinkendem Umgebungs-pH-Wert eine Zunahme von DNA-Strangbrüchen zu beobachten war (Abbildung 9). Vergleicht man die Mediane der OTM-Werte bei den einzelnen pH-Konditionen, stellt sich bei einem pH von 5 der geringste und bei einem pH von 4 der höchste Wert dar (Abbildung 8). Unterstützt werden diese Ergebnisse durch Experimente von den Autoren Sarosi und Mitarbeiter, die an einer vom Barrett-Adenokarzinom abgeleiteten Zelllinie zeigen konnten, dass durch Absenkung des extrazellulären pH-Wertes die Proliferationsrate der Epithelzellen gesteigert wurde. Die Erniedrigung des extrazellulären führte zu einer simultanen Erniedrigung des intrazellulären pH-Wertes, vermittelt durch einen  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  Austauscher. Dieser intrazelluläre pH-Abfall induzierte eine MAPK-medierte Proliferation dieser Zellen durch einen progredienten Zellzyklus, sowie durch eine Suppression der Apoptose. Der Anstieg der Proliferationsrate nahm mit sinkendem pH-Wert ab, lag aber auch bei pH 3 noch über der physiologischen Kontrolle. Ein stärker absinkender pH-Wert führt zu einem, der Proliferation entgegenwirkenden zytotoxischen Effekt [Sarosi GA et al., 2005]. Im intakten Gewebeverband ist dieser wahrscheinlich geringer ausgeprägt als in Zellkulturen. Dennoch ist die Carrier-vermittelte intrazelluläre Ansäuerung und die damit assoziierte MAPK- Aktivierung denkbar. In den hier vorgelegten Experimenten wurde ausschließlich nasale Schleimhaut von gesunden

Spendern verwendet. In einer Arbeit von Boyer wurde dargestellt, dass die Ionenaustauscher vermittelte Absenkung des internen pH-Wertes von der Zelllinie abhängig ist [Boyer MJ, Tannock IF, 1992].

Die unterschiedliche Reaktion ösophagealer und nasaler Epithelzellen auf ein saures Umgebungsmilieu liegt unter anderem in deren Enzymgehalt begründet. Ösophageale Zellen besitzen mehr Isoenzyme der Carboanhydrase und sind deswegen besser gegen den schädigenden Einfluss von Säure geschützt. Die, bei Ösophagitis vermehrt exprimierte Carboanhydrase III, ist in Epithelzellen der Interarythenoid-Region normalerweise geringer als in ösophagealen Epithelzellen und in denen der Stimmlippenfalte nicht nachweisbar [Axford SE et. al., 2001]. So ist bei Patienten mit laryngo-pharyngealem Reflux die Expression von Carboanhydrase III und E-Cadherin, einem transmembranen Zelloberflächen-Molekül, das eine Schlüsselfunktion in der Adhäsion epithelialer Zellen besitzt, verringert. Dies führt zu einer Auflockerung der interzellulären Barriere. Im Vergleich mit Ösophagusepithelzellen ist die Abwehr der Epithelzellen des Laryngopharynx gegen Säure vermindert [Johnston N et. al., 2003].

Als Antwort auf die Reflux-induzierte Laryngitis kommt es zu einer Überexpression des Enzyms Cyclooxygenase II [Smith WL, Gararvito M, DeWitt DL, 1996], die durch Apoptose-Inhibition [Tsuji M, DuBois RN, 1995] [Ballif BA et. al., 1996], Induktion von in die Zellproliferation involvierter Gene und die Verzögerung der G<sub>1</sub>-Zellzyklus-Progression zum Krebswachstum beiträgt [Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L, 1997] [Kinoshita T et. al., 1999]. Die gesteigerte Prostaglandin E<sub>2</sub>-, Interleukin 6- und Haptoglobinsynthese, sowie die reduzierte Cadherin-Expression und Prostaglandin mediierte Immunsuppression führt zu Tumorinvasion und Metastasenbildung [Kitamura Y et. al., 1997] [Guilford P, 1999] [Kim CD et. al., 1999]. Diese Hochregulation der Cyclooxygenase II wurde bereits in mehreren Tumorarten nachgewiesen [Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, 1995] [Georgette C, Jay OB, Eun KY 1999].

Das Tumorsuppressorgen p53 unterdrückt die Expression der Cyclooxygenase II in Kopf-Hals-Plattenepithel-Zelllinien nahezu vollständig. Auch andere Tumorsuppressorgene, wie die CKI p27, führen über unterschiedliche Mechanismen zur Inhibition der Zellproliferation und Apoptose und zum Zellzyklusarrest [Dong Wook Lee MD et. al., 2004]. Untersuchungen zur Apoptose in Miniorganen im Rahmen von Refluxstudien wären in weiterführenden Arbeiten denkbar.

Um eine Situation mit periodisch auftretenden Refluxattacken zu simulieren,



wurden in einer zweiten Versuchsreihe die Miniorgane kumulativ an drei Tagen mit dazwischenliegenden eintägigen Ruhepausen, für jeweils eine Stunde inkubiert. Der Grund für dieses Vorgehen liegt darin, dass gezeigt wurde, dass Patienten mit immer wiederkehrenden Refluxepisoden ein höheres Karzinomrisiko aufweisen als diejenigen mit seltener intermittierend auftretendem Reflux [Raj A, Jankowski J, 2004]. Es sollte herausgefunden werden, ob sich eine Mehrfachexposition hinsichtlich des induzierten DNA-Schadens von einer Einfachexposition unterscheidet. Dies konnte in den hier dargestellten Versuchen nicht gezeigt werden. Die Werte folgten keinem bestimmten Trend. Möglicherweise wurden die, zwischen den Experimenten gelegenen Ruhephasen mit 24 Stunden zu lang gewählt. In anderen Arbeiten sind vollständige DNA-Reparaturen nach Schädigung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> schon nach vier Stunden beschrieben [Rundell MS, Wagner ED, Plewa MJ, 2003]. Die Intervalle zu variieren, könnte Gegenstand späterer Untersuchungen sein.

#### ***5.4 Einfluss spenderspezifischer Vorbedingungen auf die DNA-Migration***

Sowohl der schon vor der experimentell bedingten Schädigung vorhandene DNA-Basalschaden, sowie der Initialschaden nach Schädigung, als auch der nach Erholung verbleibende Residualschaden kann unter Umständen durch Noxen, denen die Schleimhautspender präexperimentell ausgesetzt waren, modifiziert sein. Durch Zuteilung der Schleimhäute hinsichtlich ihrer Spender zu bestimmten Gruppen, sollte ein Einfluss dieses Sachverhalts auf die Ergebnisse überprüft werden.

##### **5.4.1 Der Einfluss des Geschlechts**

Da die Krebshäufigkeiten und die Verteilung auf die verschiedenen Organe zwischen Männern und Frauen differieren [dkfz] [Böcker W et al., 2004], könnte man auch einen geschlechtsspezifischen Unterschied des Materials aus dem die Miniorgankulturen generiert wurden, vermuten. Beim Vergleich der OTM-Werte die auf männliche, beziehungsweise weibliche Spender zurückgingen, konnten jedoch keine Unterschiede festgestellt werden. Allerdings war die Probandenzahl der beiden Gruppen sehr gering und mit 14 Männern und nur vier Frauen sehr unausgewogen.

### **5.4.2 Der Einfluss des Rauchens**

Tabakrauch enthält ca. 6000 verschiedene Stoffe, von denen mindestens 50 kanzerogene und mutagene Eigenschaften besitzen [Schmid KW, Thomas C, Büttner R, 2001]. Tabakrauch ist an durchschnittlich 25-30% aller Krebserkrankungen- und Todesfälle beteiligt [harvard report on cancer prevention Volume 1]. Inhalativer Tabakkonsum erhöht das Krebsrisiko entlang des gesamten Feldes von den Lippen, über die Mundhöhle (28fach), den Kehlkopf (10fach) bis in die Lunge (22fach), die Speiseröhre (8fach) und den Magen (1,5fach). Aber auch die meisten anderen Organe tragen ein erhöhtes Risiko [Freundt KJ, 2000]. Eine Induktion von Defekten in der Erbsubstanz an Zellen des oberen Aerodigestivtraktes konnte mit dem Comet-Assay gezeigt werden [Kleinsasser et al., 2005]. Deshalb musste eine Vorschädigung des Untersuchungsmaterials ausgeschlossen werden. Der Vergleich der Ergebnisse der hier vorliegenden Experimente nach Unterteilung der Proben in eine Gruppe von rauchenden und eine Gruppe von nichtrauchenden Spendern, zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen diesen. Allerdings unterschied sich auch hier die Gruppenstärke erheblich mit 12 Nichtrauchern versus sechs Raucher. Durch zahlenmäßig ausgeglichene Kohorten könnte sich ein signifikanter Unterschied ergeben.

### **5.4.3 Der Einfluss des Alkoholkonsums**

Ein Vergleich der OTM-Werte nach Unterteilung der Schleimhautspender in Gruppen mit und ohne Alkoholkonsum zeigte statistisch signifikant höhere OTM-Werte in einigen pH-Bereichen in der Gruppe der alkoholkonsumierenden Spender. Auch hier war die Spenderzahl der beiden Gruppen mit 14 alkoholabstinenten versus vier regelmäßig alkoholkonsumierender Patienten sehr unterschiedlich. Der Trend zu höheren OTM-Werten bei Schleimhautproben dessen Spender Alkohol konsumierten, unterstützt aber die These eines Zusammenhangs zwischen Alkoholkonsum und Erbgutschädigung. Alkohol führt über vielfältige Mechanismen zu einer gesteigerten Krebsentstehung im oro- und nasopharyngealen und laryngealen Bereich. Aufgrund der lokal reizenden, hyperämisierenden und adstringierenden Wirkung von hochprozentigem Alkohol, ist die Art des aufgenommenen Alkohols nicht unerheblich. Der Abbau erfolgt durch die zytosolische NAD<sup>+</sup>- und Zn<sup>2+</sup>- abhängige Alkoholdehydrogenase (ADH) in Acetaldehyd, die eigentlich toxische Form des Alkohols. Dieses wird durch die Aldehyddehydrogenase zu Essigsäure abgebaut, die dann im Citratzyclus verstoffwechselt wird. Aber auch das

CYP 450 abhängige mikrosomale Ethanoloxidationssystem ist am Abbau des Ethanols zu Essigsäure beteiligt. Alkohol wirkt durch dessen Aktivierung als Co-Karzinogen [Freundt KJ, 2000] zum Beispiel für die Toxifikation im Tabak enthaltener prokanzeregener Nitrosamine.

Die lokal reizende Wirkung des Alkohols führt gemeinsam mit mangelnder Mundpflege und dem Fehlen essentieller Nahrungsbestandteile bei Alkoholikern zu Stomatitis, Gingivitis und Paradontose. Aufgrund des chronischen Entzündungsprozesses und damit lokal erhöhter Proliferation des Mundschleimhautepithels, kommt es vermehrt zu Malignomen im Kiefer- und Pharynxbereich. Einen weiteren Beitrag dazu leistet eine Störung des unteren Ösophagusphinkters und dadurch bedingten gastroösophagealen und -pharyngealen Reflux [Zilker TH, 1998]. Weiterhin reizend wirkt der lokale Abbau von Ethanol zu Acetaldehyd durch extrahepatische ADH-Aktivität in ösophagealer und pharyngealer Schleimhaut. Außerdem fördert Alkohol in seiner Eigenschaft als Lösungsmittel die Penetration von kanzerogenen lipophilen Stoffen in die Schleimhaut [Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA, 1998]. Atrophische Veränderungen mit lipomatöser Umwandlung des Speicheldrüsenparenchyms bei chronischem Alkoholgenuss führen zu einer verringerten Speichelproduktion [Maier H et al., 1990]. Die daraus resultierende Konzentrationserhöhung lokal wirksamer Schadstoffe und eine Verlängerung der Kontaktzeit dieser Noxen, kann zu einer weiteren Reizung der Schleimhaut führen [Maier H, Born IA, Mall G, 1988]. Wenn auch diese Beispiele vor allem die Mundschleimhaut betreffen, so kann durch das Phänomen der Feldkanzerisierung im OADT doch von einem Einfluss dieses Mechanismus auch im nasopharyngealen Bereich ausgegangen werden. Systemisch ist die Atrophie der Magenschleimhaut und die eingeschränkte Funktionsfähigkeit von Leber und Pankreas schuld an einer Unterversorgung an essentiellen Nahrungsbestandteilen und Vitaminen. Daraus ergibt sich wiederum eine eingeschränkte Belastbarkeit des Immunsystems mit einer verringerten Fähigkeit, entartete Zellen zu eliminieren [Zilker TH, 1998] [Maier H et al., 1994].

#### **5.4.4 Der Einfluss von Allergien**

Der Vergleich der OTM-Werte von Allergikern und Nicht-Allergikern bestätigte eine verstärkte Schädigung des Genoms in der Gruppe der Allergiker. Diese war allerdings statistisch nicht signifikant. Die Spenderkollektive waren mit acht Allergikern und zehn Nicht-Allergikern relativ ausgeglichen.

Der Mechanismus der gesteigerten DNA-Schädigung erklärt sich unter anderem

damit, dass Allergien in der Nasenschleimhaut Entzündungsreaktionen hervorrufen können, die die funktionelle Zellstabilität stören und somit die Rate von Mutationen erhöhen. Der gesteigerte Zellumsatz birgt das Risiko einer erhöhten Fehlerrate während der DNA-Replikation [Schmid KW, Thomas C, Büttner R, 2001]. In vivo ist die zelluläre Abwehr gegenüber einwirkender Noxen verringert. Durch Störung der pulmonalen, sowie laryngo-pharyngealen Clearance kommt es zu einem vermehrten Einwirken toxischer Stoffe und damit zu einer erhöhten Chromosomenbrüchigkeit, die wiederum im Comet-Assay sichtbar wird.

#### **5.4.5 Der Einfluss des Alters**

Mit steigender Zahl an Lebensjahren nimmt der Einfluss von Noxen kumulativ zu. Eine im Comet-Assay nachweisbare, erhöhte Chromosomeninstabilität wäre als Folge zu erwarten. Dies konnte in den vorliegenden Experimenten aufgrund zu kleiner Fallzahlen nicht bestätigt werden. Es zeigte sich keine Korrelation zwischen Alter und OTM-Wert. Die Altersverteilung der Schleimhautspender war mit einer Breite zwischen 12 und 74 Jahren und einem Durchschnittsalter von 41 sehr inhomogen.

### **5.5 Optimierungsmöglichkeiten**

Da die Nasenschleimhaut gegenüber Umwelttoxinen stark exponiert ist, kann eine vorbestehende Schädigung die Ergebnisse beeinflussen. Bei einem ausreichend großen Patientenkollektiv sollte deswegen eine Selektion der Schleimhautspender stattfinden, um eine höhere Reproduzierbarkeit und Validität zu erzielen. Um die interindividuelle Heterogenität im Comet-Assay zu reduzieren, müssen Schleimhautproben von Spendern mit möglichst vielen gleichen Eigenschaften verwendet werden. Die gefundenen Ergebnisse sollten in Experimenten mit primären epithelialen Zellen überprüft werden.

Wie schon in dreidimensionalen Zellkultursystemen gezeigt, spielt die Umgebungsatmosphäre der Epithelzellen eine große Rolle [Le Visage C et al., 2004] [Grainger CI et al., 2006]. In vivo ist lediglich die basale Seite des Epithels der Nährstoff liefernden Schicht zugewandt. Die apikale Seite wird von Luft umströmt. Nur diese wird direkt von eventuellen Schadstoffen oder Refluxat erreicht. Durch Exposition der Miniorgankulturen in einem biphasischen System, könnte man die Schadstoffe direkt dem Luftstrom zufügen und so eine lebensnahe Exposition simulieren. Analog der Schadstoffvernebelung durch entsprechende Systeme auf air/liquid-Monolayerkulturen [Aufderheide M et. al., 2001] [Wolz L et. al., 2002], könnte die der Luft zugewandte Epithelschicht intermittierend, in variierbaren Intervallen, von Lösungen verschiedener pH-Werte und Enzymzusammensetzungen des Refluxats überströmt werden.

Da sich die verschiedenen Zellzyklusstadien auf die Konfiguration der Kometen in der Einzelzellgelelektrophorese auswirken, könnte man die Zellen vor dem Comet-Assay mittels FACS-Analyse nach diesem Gesichtspunkt sortieren. Alternativ wäre eine Inkubation mit Colcemid® denkbar, um die Zellen zu synchronisieren und so die intra- und interindividuelle Heterogenität zu verringern [mta-Verband].

## **6 Schlussfolgerungen**

Die Kombination aus Miniorgankulturen und Comet-Assay eignet sich für die Untersuchung eines genotoxischen Potentials von saurem Reflux auf das Erbgut von Nasenschleimhautepithelzellen. Um reproduzierbare Ergebnisse mit einer geringen interindividuellen Streuung zu erhalten, sollten die Schleimhautspender eng definierten Kollektiven mit weitgehend gleichen Eigenschaften zugeführt werden. Bedingt durch den hohen Zellumsatz respiratorischen Epithels findet sich im Comet-Assay eine große interzelluläre Heterogenität der OTM-Werte. Die Streubreite der Ergebnisse kann durch eine, dem Comet-Assay vorgeschaltete, FACS-Analyse, durch die Selektion von Zellen, die sich im gleichen Zellzyklusstadium befinden, reduziert werden. Desweiteren empfiehlt es sich, dass die Versuche einer Reihe immer von derselben Person vorgenommen werden und die Auswertung durch Kodierung der Objektträger blind geschieht.

Der genotoxische Einfluss eines alleinigen pH-Abfalls des Umgebungsmilieus ist eher moderat und unabhängig davon, wie stark der pH-Wert erniedrigt ist. Die Beteiligung weiterer Inhaltstoffe des Refluxats an der Tumorentstehung im oro- und nasopharyngealen Bereich wird Gegenstand weiterer Untersuchungen mit der hier etablierten Methode sein. In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen und dem pH-Wert des Umgebungsmilieus in Kombination mit anderen möglichen Bestandteilen des Refluxats wie Pepsin, Trypsin oder Gallensäuren [Galli J, 2002] [Jolly AJ, Wild CP, Hardie LJ, 2004].

## 7 Zusammenfassung

### **Einleitung:**

In der vorliegenden Arbeit sollte eine Methode etabliert werden, um eventuelle genotoxische Einflüsse von saurem Refluxat aus dem Magen auf menschliche Nasenschleimhaut zu quantifizieren. Hierzu wurde eine Kombination aus Comet-Assay und Miniorgankulturen als sinnvoll erachtet.

### **Material und Methoden:**

Von 18 Patienten wurde nach Conchotomie die Mukosa der Nasenmuscheln als Miniorgane kultiviert. In zwei verschiedenen Versuchsanordnungen wurden unterschiedliche Zeitregimes auf den Einfluss, den sie auf die Induktion eines Erbgutschadens der Epithelzellen ausüben, untersucht. Der entstandene DNA-Schaden wurde mittels Comet-Assay quantifiziert. Als Maß für die Schädigung diente der Olive-Tail-Moment. Dieser wurde nach entsprechender Fluoreszenzfärbung mit einer speziellen Software am Fluoreszenzmikroskop ausgemessen. Die Schädigung bestand im Einwirken von acht PBS-Lösungen unterschiedlicher pH-Werte für jeweils eine Stunde. Die pH-Werte wurden mit konzentrierter Salzsäure eingestellt. Zu jedem Versuch wurde eine reine PBS-Lösung als Negativ- und eine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung als Positivkontrolle mitgeführt. Nach dieser einstündigen Exposition wurden die Epithelzellen der Miniorgane mit einem bestimmten Enzymmix abverdaut und die Zellen nach Lyse der Zell- und Kernmembran dem Comet-Assay unterzogen. Die erste Versuchsanordnung sah eine einfache Schädigung am siebenten Kulturtag für jeweils eine Stunde vor. In der zweiten Versuchsanordnung wurde die Schädigung an drei aufeinanderfolgenden Tagen, mit jeweils einem Ruhetag dazwischen, vorgenommen. Die Proben wurden entsprechend der ersten Versuchsreihe behandelt.

### **Ergebnisse:**

Es zeigte sich eine Erhöhung der OTM-Werte der mit den sauren Lösungen behandelten Zellen gegenüber der Negativkontrolle, die jedoch nicht für jeden getesteten pH-Wert signifikant war. Der induzierte Erbgutschaden war für alle angesäuerten Lösungen recht homogen, zeigte allerdings eine große Streubreite. Bei der kumulativen Schädigung konnte kein Trend in eine bestimmte Richtung festgestellt werden. Nach Zuordnung der

Nasenschleimhäute hinsichtlich ihrer Spender zu verschiedenen Gruppen, wurde der Einfluss unterschiedlicher exogener und endogener Noxen auf die Ergebnisse eruiert. Es konnte mit den hier gewonnenen Daten kein Einfluss von Geschlecht oder Zigarettenkonsum gefunden werden. Es zeigte sich aber eine positive Korrelation von Alkoholkonsum und Allergien mit den OTM-Werten.

**Schlussfolgerungen:**

Miniorgankulturen und das Comet-Assay sind für Studien zur erbgutschädigenden Wirkung sauren Refluxats auf nasale Schleimhaut gut geeignet. Um das System noch aussagekräftiger zu gestalten, sollten die Miniorgane hinsichtlich ihrer Spender möglichst identischen Gruppen zugeordnet werden. Eine vorgeschaltete Synchronisation des Zellzyklusstadiums mittels FACS wäre geeignet die Reliabilität der Versuche weiter zu erhöhen. Die Auswertung muss blind erfolgen und immer vom selben Experimentator vorgenommen werden.

Mit der hier etablierten Methode werden weitere Inhaltstoffe des Refluxats auf ihr genotoxisches Potential und ihre Fähigkeit zur Apoptoseinduktion untersucht.



## 8 Literaturverzeichnis

*Al-Batran SE, Astner ST, Supthut M, Gamarra F, Brueckner K, Welsch U, Knuechel R, Huber RM*: Three-dimensional in vitro cocultivation of lung carcinoma cells with human bronchial organ culture as a model for bronchial carcinoma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 21 (1999) 200-208

*Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters MD, Aitio A*: IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 463 (2000) 111-172

*Altorki NK, Oliviera S, Schrump DS*: Epidemiology and molecular biology of Barrett's adenocarcinoma. *Semin. Surg. Oncol.* 13 (1997) 270-280

*Ambrosino G, Basso SM, Varotto S, Zardi E, Picardi A, D'Amico DF*: Isolated hepatocytes versus hepatocyte spheroids: in vitro culture of rat hepatocytes. *Cell Transplant* 14 (2005) 397-401

*Andersson O, Ylitalo R, Finizia C, Bove M, Magnus R*: Pharyngeal reflux episodes at pH 5 in healthy volunteers. *Scand J Gastroenterol* 41 (2006) 138-143

*Aufderheide M, Ritter D, Knebel JW, Scherer G*: A method for in vitro analysis of the biological activity of complex mixtures such as sidestream cigarette smoke. *Exp Toxic Pathol* 53 (2001) 141-152

*Axford SE, Sharp N, Ross PE, Pearson JP, Dettmar PW, Panetti M, Koufman JA*: Cell biology of laryngeal epithelial defenses in health and disease: preliminary studies. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 110 (2001) 1099-1108

*Bacsó Z, Everson RB, Eliason JF*: The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Research* 60 (2000) 4623-4628

*Ballif BA, Mincek NV, Barratt JT, Wilson ML, Simmons DL*: Interactions of cyclooxygenases with an apoptosis and autoimmunity associated protein. *Proc Natl*

Acad Sci U S A 93(11) (1996) 5544-5549

*Bals R, Gamarra F, Kaps A, Grundler S, Huber RM, Welsch U*: Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ culture system. *Cell Tissue Res* 293 (1998) 573-577

*Benítez-Bribiesca L, Sánchez P, Toledo J, Penarroja R, Flores M, Sosa J*: Differential staining of DNA strand breaks in dried comet assay slides. *J Histochem Cytochem* 49 (2001) 921-922

*biozentrum.uni-wuerzburg*: [http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/theodor\\_boveri.html](http://www.biozentrum.uni-wuerzburg.de/theodor_boveri.html): Die Person Theodor Boveri, Stand: 16.11.2005

*Bloching MB*: Abschätzung des relativen Tumorerkrankungsrisikos im oberen Aerodigestivtrakt durch kanzerogenitäts-assoziierte Biomarker. Schriften zur Habilitation (2001)

*Böcker W, Kleihues P, Höfer HK, Lax S, Poremba C, Moll R*: Allgemeine Tumorpathologie. In: Böcker W, Denk H, Heitz U (Hrsg): Pathologie 12. Auflage, Urban und Fischer, München, Jena 2004, S 169-217

*Böcker W*: Automated comet assay analysis. *Cytometry* 35 (1999) 134-144

*Boyer MJ, Tannock IF*: Regulation of intracellular pH in tumor cell lines: influence of microenvironmental conditions. *Cancer Res* 52 (1992) 4441-4447

*Brendler-Schwaab S, Hartmann A, Pfuhrer S, Speit G*: The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. *Mutagenesis* 20 (2005) 245-254

*Bucher O, Wartenberg H*: Nasenhöhle. In: Bucher O, Wartenberg H (Hrsg.): Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen 12. Auflage, Verlag Hans Huber, Bern 1997, S 246-248

*Chemuturi NV, Hayden P, Klausner M, Donovan MD*: Comparison of human tracheal/bronchial epithelial cell culture and bovine nasal respiratory explants for nasal drug transport studies. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 94 (2005) 1976-1985

*Chen MYH, Ott DJ, Cosolo B*: Correlation of laryngeal and pharyngeal carcinomas and 24 hour pH monitoring of the esophagus and pharynx. *Otolaryngol Head Neck Surg* 119 (1998) 460-462

*Coffey RJ, Hawkey CJ, Damstrup L*: Epidermal growth factor receptor activation induces nuclear targeting of cyclooxygenase-2, basolateral release of prostaglandins and mitogenesis in polarizing colon cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 657-662

*Cotelle S, Férard JF*: Comet assay in genetic ecotoxicology: a review. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 34 (1999) 246-255

*Dagli S, Dagli Ü, Kurtaran H, Aklim C, Sahin B*: Laryngopharyngeal reflux in laryngeal cancer. *Turk J Gastroenterol* 15 (2004) 77-81

*Dickmann R, Bautista JM, Wong W-M, Bhatt R, Beeler JN, Malagon I, Risner-Adler S, Lam K-F, Fass R*: Comparison of esophageal acid exposure distribution along the esophagus among the different gastroesophageal reflux disease (GERD) groups. *Am J Gastroenterol* 101 (2006) 2463-2469

*dkfz*:

[http://www.dkfz.de/epi/Home\\_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame4.html](http://www.dkfz.de/epi/Home_d/Programm/AG/Praevent/Krebshom/main/deutsch/frame4.html): Krebsatlas, zuletzt aktualisiert am 23.06.2005

*Dong Wook Lee MD, Seok-Woo P, Soo-Yeun P, Dae-Seog H, Kwang Hyun K, Myung-Whun S*: Effects of p53 or p27 overexpression on cyclooxygenase-2 gene expression in head and neck squamous cell carcinoma cell lines. *Head Neck* 26 (2004) 706-715

*Duez P, Dehon G, Kumps A, Dubois J*: Statistics of the comet assay: a key to discriminate between genotoxic effects. *Mutagenesis* 18 (2003) 159-166

*Fenech M*: The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res* 455 (2000) 81-95

*Fenech M*: In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. *Methods Mol Med* 111 (2005) 3-32

*Fjellbirkeland L, Bjerkvig R, Steinsvåg SK, Laerum OD*: Nonadhesive stationary organ

- culture of human bronchial mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15 (1996) 197-206
- Freundt KJ*: Tabak. In: Estler CJ (Hrsg): *Pharmakologie und Toxikologie*, 5. Auflage, Schattauer, Stuttgart 2000, S 800-804
- Galli J, Cammarota G, Calo L, Agostino S, D'Ugo D, Cianci R, Almadori G*: The role of acid and alkaline reflux in laryngeal squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 112 (2002) 1861-1865
- Georgette C, Jay OB, Eun KY*: Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 59 (1999) 991-994
- Grainger CI, Greenwell LL, Lockley DJ, Martin GP, Forbes B*: Culture of Calu-3 cells at the air interface provides a representative model of the airway epithelial barrier. *Pharm Res* 23 (2006) 1482-1490
- Guilford P*: E-Cadherin downregulation in cancer: fuel on the fire? *Mol Med Today* 5 (1999) 172-177
- Harréus UA, Kleinsasser NH, Zieger S, Wallner BC, Reiter M, Schuller P, Berghaus A*: Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of comet assay and fluorescence in situ hybridisation. *Mutat Res* 10 (2004) 131-138
- harvard report on cancer prevention Volume 1*: Causes of human cancer. *Cancer Causes Control* 7 (1996) 3-59
- Ihbe JB*: Entwicklung eines Modells zur Testung der Genotoxizität von Umweltstoffen anhand von Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosazellen. *Schriften zur Dissertation* (2004)
- Iro H, Waldfahrer F*: Larynx und Trachea. In: Probst R, Grevers G, Iro H (Hrsg): *Hals-Nasen- Ohren- Heilkunde*, 1. Auflage, Thieme, Stuttgart 2000, S 337-383
- Jiminez P, Lanas A, Piazuolo E, Esteva F*: Effects of extracellular pH on restitution and proliferation of rabbit oesophageal epithelial cells. *Aliment Pharmacol Ther* 13 (1998) 545-552

- Johnston N, Bulmer D, Gill GA, Panetti M, Ross PE, Pearson JP, Pignatelli M, Axford SE, Dettmer PW, Koufman JA*: Cell biology of laryngeal epithelial defenses in health and disease: further studies. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 112 (2003) 481-491
- Jolly AJ, Wild CP, Hardie LJ*: Acid and bile salts induce DNA damage in human oesophageal cell lines. *Mutagenesis* 19 (2004) 319-324
- Khalil M, Shariat-Panahi A, Tootle R, Ryder T, McCloskey P, Roberts E, Hodgson H, Selden C*: Human hepatocyte cell lines proliferating as cohesive spheroid colonies in alginate markedly upregulate both synthetic and detoxificatory liver function. *J Hepatol* 34 (2001) 68-77
- Kim CD, Sung MW, Lee SJ, Heo DS, Yoon SJ, Kim KH*: The effect of prostaglandin and its inhibitor on the antibody-dependent cellular cytotoxicity against human squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anticancer Res* 19 (1999) 450-455
- Kinoshita T, Takahashi Y, Sakashita T, Inoue H, Tanabe T, Yoshimoto T*: Growth stimulation and induction of epidermal growth factor receptor by overexpression of cyclooxygenase 1 and 2 in human colon carcinoma cells. *Biochem Biophys Acta* 1438 (1999) 120-130
- Kitamura Y, Morita I, Nihei Z, Miscima Y, Murota S*: Effect of IL-6 on tumor cell invasion of vascular endothelial monolayers. *Surg Today* 27 (1997) 534-5
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK, Harréus UA*: Comparing the genotoxic sensitivities of peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the comet assay. *Mutat Res* 467 (2000) 21-30
- Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harréus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER, Huber RM*: Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelium and the comet-assay. *ORL* 63 (2001) 141-147
- Kleinsasser NH, Kastenbauer ER, Zieger S, Baluschko T, Wallner BC, Harréus UA*: Lagerung humaner nasaler Mukosa für die Einzelzellmikrogelelektrophorese. *HNO*

51 (2003) 134-139

*Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harréus UA, Gamarra F, Buhrlen M, Huber RM, Rettenmeier AW*: The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat Res* 561 (2004) 63-73

*Kleinsasser NH, Sassen AW, Semmler MP, Staudenmaier R, Harréus UA, Richter E*: Trägt Nikotin zur Krebsentstehung im oberen Aerodigestivtrakt bei? *HNO* 54 (2005) 369-375

*linikum.uni-heidelberg*: <http://www.klinikum.uni-heidelberg.de/Chirurgische-Ordinarien.4726.0.html>: Chirurgische Ordinarien, Stand: 11.09.2006

*Kobayashi K, Nomoto Y, Suzuki T, Tada Y, Miyake M, Hazama A, Kanemaru S, Nakamura T, Omori K*: Effect of fibroblasts on tracheal epithelial regeneration in vitro. *Tissue Eng* 12 (2006) 2619-2628

*Le Visage C, Dunham B, Flint P, Leong KW*: Coculture of mesenchymal stem cells and respiratory epithelial cells to engineer a human composite respiratory mucosa. *Tissue Eng* 10 (2004) 1426-1435

*Lewin JS, Gillenwater AM, Garrett JD, Bishop-Leone JK, Nguyen DD, Callender DL, Ayers GD, Myers JN*: Characterization of laryngopharyngeal reflux in patients with premalignant or early carcinomas of the larynx. *Cancer* 97 (2003) 1010-1014

*Maier H, Seitz HK, Mayer B, Adler D, Mall G, Born IA*: Lipomatöse Atrophie der Glandula parotis bei chronischem Alkoholkonsum. *Laryngo Rhino Otolog* 69 (1990) 600-604

*Maier H, Fischer G, Sennewald E, Heller WD*: Occupational risk factors for pharyngeal cancer. Results of the Heidelberg pharyngeal cancer study. *HNO* 42(9) (1994) 530-540

*Maier H, Born IA, Mall G*: Effect of chronic ethanol and nicotine consumption on the function and morphology of the salivary glands. *Klin Wochenschrift* 66(12) (1988) 140-150

*Martino-Roth MG, Viegas J, Roth DM*: Occupational genotoxicity risk evaluation through the comet assay and the micronucleus test. *Genetics and Molecular Research* 2(4) (2003) 410-417

*Mc Cann J, Ames BN*: Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 (1976) 950-954

*Merkle HP, Ditzinger G, Lang SR, Peter H, Schmidt MC*: In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 29 (1998) 51-79

mta-Verband: <http://www.mta-verband.at/zytogenetikforum/praxis/ernten.htm>: Ernten, Stand 08.11.2007

*Mühlhardt C*: Methoden zur Analyse von DNA auf Mutationen. In: Mühlhardt C (Hrsg): *Der Experimentator: Molekularbiologie* 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Lübeck, Ulm 1999, S 146-155

*Muller WU, Bauch T, Streffer C, Niedereichholz F, Bocker W*: Comet Assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 64 (1994) 315-319

*Murken J, Cleve H*: Chromosomenaberrationen. In: Murken J, Cleve H (Hrsg): *Humangenetik* 6. durchgesehene Auflage, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart 1996, S 59-92

*Olive PL, Banáth JP, Durand RE*: Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay. *Radiat. Res.* 122 (1990) 86-94

*Olive PL, Wlodek D, Banáth JP, Durand RE*: Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exp. Cell. Res.* 198 (1992) 259-267

*Olive PL, Durand RE, Le Riche J, Olivotto IA, Jackson SM*: Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancer. *Cancer Res* 53 (1993) 733-736

*Olive PL, Banáth JP, Mac Phail HS*: Lack of a correlation between radiosensitivity and

- DNA double-strand break induction or rejoining in six human tumor cell lines. *Cancer Res* 54 (1994) 3939-3946
- Olive PL, Banáth JP*: Radiation-induced DNA double-strand breaks produced in histone-depleted tumor cell nuclei measured using the neutral comet assay. *Radiat Res* 142 (1995) 144-152
- Olive PL, Durand RE*: Heterogeneity in DNA damage using the comet assay. *Cytometry A* 66 (2005) 1-8
- Östling O, Johansen KJ*: Microelektrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 123(1) (1984) 291-298
- Petrides PE*: Tumorgewebe. In: Löffler G, Petrides PE (Hrsg): *Biochemie und Pathobiochemie* 6. Auflage, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg 1998, 1089-1112
- Raj A, Jankowski J*: Acid suppression and chemoprevention in Barrett's oesophagus. *Dig Dis* 22 (2004) 171-180
- Rajaei-Behbahani N, Schmezer P, Risch A, Thiel S, Rittgen W, Drings P, Dienemann H, Kayser KW, Schultz V, Bartsch H*: Effect of long-term cryopreservation on mutagen sensitivity and DNA repair capacity of peripheral human lymphocytes. *J Cancer Res clin Oncol* 125 (1999) 32
- Reed CJ*: In vitro models of nasal cavity toxicity. *Mutat Res* 380 (1997) 97-111
- Rundell MS, Wagner ED, Plewa MJ*: The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation? *Environmental and Molecular Mutagenesis* 42 (2003) 61-67
- Sano H, Kawahito Y, Wilder RL*: Expression of cyclooxygenase-1 und -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55 (1995) 3785-3789
- Sarosi GA, Jaiswal K, Herndon E, Lopez-Guzman C, Spechler SJ, Souza RF*: Acid increases MAPK-mediated proliferation in Barrett's esophageal adenocarcinoma cells via intracellular acidification through a Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289 (2005) 991-997



- Sauvaigo S, Serres C, Signorini N, Emonet N, Richard MJ, Cadet J*: Use of the single-cell gel electrophoresis assay for the immuno-fluorescent detection of specific DNA damage. *Analytical Biochemistry* 259 (1998) 1-7
- Schmid KW, Thomas C, Büttner R*: Tumoren. In: Büttner R, Thomas C (Hrsg): *Allgemeine Pathologie*, 2. Auflage, Schattauer, Stuttgart 2001, S 181-224
- Seidel CK*: Interzelluläre Heterogenität strahleninduzierten DNS-Schadens im Comet-Assay. *Schriften zur Dissertation* (2006)
- Seitz HK, Poschl G, Simanowski UA*: alcohol and cancer. *Recent Dev Alcohol* 14 (1998) 67-95
- Shin DM, Hittelman WN, Hong WK*: Biomarkers in upper aerodigestive tract tumorigenesis: a review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 3 (1994) 697-709
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL*: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175 (1988) 184-191
- Smith CJ*: Oral cancer and precancer: background, epidemiology and aetiology. *Br Dent J* 167 (1989) 377-383
- Smith WL, Gararvito M, DeWitt DL*: Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenase)-1 and -2. *J Biol Chem* 271 (1996) 33157-33160
- Steinsvag SK, Strand M, Berg O, Miagushi M, Olofsson J*: Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* 101 (1991) 1323-1331
- Teissier E, Fennrich S, Strazielle N, Daval JL, Ray D, Schlosshauer B, Gherzi-Egea JF*: 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 (1998) 347-355
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF*: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 35 (2000) 206-221

- Trümper L, Pfreundschuh M*: Wachstumsregulation und Neoplasie. In: Pfreundschuh M, Schölmerich J (Hrsg): Pathophysiologie Pathobiochemie 1. Auflage, Urban & Fischer Verlag, München, Jena 2000, S 49-59
- Tsuji M, DuBois RN*: Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxide synthase 2. *Cell* 83 (1995) 493-501
- Van Schooten FJ, Besaratinia A, De Flora S, D'Agostini F, Izzotti A, Camoirano A, Balm AJ, Dallinga JW, Bast A, Haenen GR, Van't Veer L, Baas P, Sakai H, Van Zandwijk N*: Effects of oral administration of N-acetyl-L-cysteine: a multi-biomarker study in smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 11 (2002) 167-175
- Wallner BC, Harréus UA, Gamarra F, Sassen A, Kleinsasser NH*: Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa, ein Modell für ökogenotoxikologische Untersuchungen. *HNO* 53 (2005) 1037-1046
- Wolz L, Krause G, Scherer G, Aufderheide M, Mohr U*: In vitro genotoxicity assay of sidestream smoke using a human bronchial epithelial cell line. *Food and Chemical Toxicology* 40 (2002) 845-850
- Wroblewski R, Wroblewski J*: X-ray microanalysis of endocrine, exocrine and intestinal cells and organs in culture: technical and physiological aspects. *Scanning Microsc* Suppl 8 (1994) 149-161
- Xue LY, Friedman LR, Oleinick NL, Chiu SM*: Induction of DNA damage in gamma-irradiated nuclei stripped of nuclear protein classes: differential modulation of double-strand break and DNA-protein crosslink formation. *Int J Radiat Biol* 66 (1994) 11-21
- Zilker TH*: Internistische Folgeerkrankungen des Alkoholismus. In: Classen M, Diel V, Kochsiek K (Hrsg): Innere Medizin 4. Auflage, Urban & Schwarzenberg, Wemding 1998, S 1042-1043

## 9 Anlagen

### 9.1 OTM-Mittelwerte

OTM-Mittelwerte aller Versuche am ersten, siebenten, neunten und elften Kulturtag. Pro Probe wurden bei jedem Versuch 100 Zellen ausgemessen, die auf zwei Objektträger verteilt waren, sodass sich hinter jedem Zahlenwert die OTM-Werte von insgesamt 100 Zellen verbergen.

Tabelle 5

	neg Kontr	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	6,5	5,5	5,0	4,7	4,5	4,3	4,0	3,8
<b>Tag 1</b>										
	2,9	9,9								
	2,6	6,4								
	5,8	10,2								
	1,9	11,4								
	5,3	9,3								
<b>MW</b>	<b>3,700</b>	<b>9,440</b>								
<b>STABWN</b>	<b>1,553</b>	<b>1,667</b>								
<b>Tag 7</b>										
	4,7	19,4		12,9	25,1	14,1	19,0	14,8	15,1	
	2,8	22,5	13,2	10,3	9,0	6,7	11,0	13,7	13,6	15,3
	3,5	21,7	4,2	13,0	9,2	8,3	28,3	25,6	22,5	12,5
	9,2	25,4	19,9	9,6			18,3	24,4	11,2	26,8
	5,5	26,1	21,2	13,2	13,9	11,9	13,9	6,2	21,0	4,4
	9	18,6	6,0	15,0	15,1	15,2	12,7	10,0	18,6	8,7
	6,5	9,2	8,1	5,4	10,1	8,5	5,8	8,8	13,0	10,8
	5,4	9,7	9,7	6,2	5,5	5,4	4,6	10,0	4,8	18,9
	6,3	13,3	10,2	8,6	5,2	7,6	6,2	4,8	3,4	5,0
	6,2	5,1	10,0	5,6	5,8	7,1	6,1	4,8	3,7	5,6
	1,5	23,2	3,7	13,2	0,9	7,4	10,1	3,4	7,8	3,5
	4,5	10,1	7,7	3,9	3,2	2,8	4,1	3,9	4,0	6,4
	1,2	29,3	2,0	1,9	0,8	1,7	2,1	1,5	1,6	2,2
	1,6	23,9	2,2	2,9	4,4	2,7	11,2	2,6	6,2	7,2
	2,2	12,5	4,2	3,5	2,9	3,2	1,7	2,6	1,5	3,4
	9,4	13	7,4	8,7	10,9	6,6	9,8	6,5	10,3	10,7
	3,5	20,3	9,8	4,5	15,1	12,8	7,8	11,1	11,5	13,6
	9,6	21	7,6	4,4	4,6	3,5	4,7	8,0	5,2	2,3
<b>MW</b>	<b>5,1</b>	<b>18</b>	<b>8,7</b>	<b>7,9</b>	<b>7,0</b>	<b>6,9</b>	<b>9,9</b>	<b>9,0</b>	<b>9,7</b>	<b>9,3</b>
<b>Tag 9</b>										
	6,2	12		12,1	10,0	4,1	7,4	4,9	8,3	
	8,7	19,6		5,0	11,1	15,7	11,8	9,9	13,2	
	10,5	17,6		25,7	11,3	13,5	11,0	7,2	8,8	
<b>MW</b>	<b>8,5</b>	<b>16,4</b>		<b>14,3</b>	<b>10,8</b>	<b>11,1</b>	<b>10,1</b>	<b>7,3</b>	<b>10,1</b>	
<b>Tag 11</b>										
	4	15	7,0	9,6	15,0	12,9	6,8	13,0	17,2	9,1
	2,3	13,1	4,3	6,5	6,7	6,7	2,5	2,9	1,8	2,5
	4,4	9,2	11,0	6,8	9,8	9,1	7,1	5,9	9,8	5,9
	9,3	10,9	12,5	14,7	17,6	16,6	13,0	16,6	10,0	13,3
<b>MW</b>	<b>5</b>	<b>12,05</b>	<b>8,7</b>	<b>9,4</b>	<b>12,3</b>	<b>11,3</b>	<b>7,4</b>	<b>9,6</b>	<b>9,7</b>	<b>7,7</b>

## 9.2 p-Werte

p-Werte für den Vergleich der OTM-Werte für beide Versuchsreihen, sowie für den Vergleich der OTM-Werte nach Zuordnung der Spender zu Gruppen die verschiedenen Einflussfaktoren ausgesetzt waren. Das Signifikanzniveau wurde jeweils bei  $p \leq 0,05$  festgelegt.

Tabelle 6: p-Werte für den Vergleich der DNA-Fragmentation von Epithelzellen humaner nasaler Schleimhaut nach einmaligem Einwirken unterschiedlicher pH-Werte am siebenten Kulturtag.

	Positiv-Kontrolle	pH 6,5	pH 5,5	pH 5,0	pH 4,7	pH 4,5	pH 4,3	pH 4,0	pH 3,8
Negativ-kontrolle	0,000	0,021	0,026	0,060	0,068	0,010	0,034	0,010	0,022
Positiv-kontrolle		0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,000	0,001	0,001
pH 6,5			0,663						
pH 5,5				0,825					
pH 5,0					0,605				
pH 4,7						0,205			
pH 4,5							0,724		
pH 4,3								0,764	
pH 4,0									0,835

Tabelle 7: p-Werte für den Vergleich der kumulativen Schädigungen von Miniorgan-kulturen mit verschiedenen pH-Werten an vier verschiedenen Tagen.

Vergleich Tag:	Negativ-kontrolle	Positiv-kontroll e	pH6,5	pH5,5	pH5,0	pH4,7	pH4,5	pH4,3	pH4,0	pH3,8
1 und 7	0,293	0,013								
1 und 9	0,014	0,013								
1 und 11	0,440	0,117								
7 und 9	0,690	0,702		0,068	0,517	0,193	0,959	0,684	0,924	
7 und 11	0,928	0,110	0,987	0,530	0,260	0,104	0,493	0,884	0,995	0,665
9 und 11	0,154	0,132		0,421	0,637	0,957	0,375	0,588	0,923	

Tabelle 8: *p*-Werte für den Vergleich humaner nasaler Mukosazellen nach einmaliger Behandlung mit acht unterschiedlichen pH-Werten von Männern und Frauen

Negativkontrolle	Positivkontrolle	pH 6,5	pH 5,5	pH 5,0	pH 4,7	pH 4,5	pH 4,3	pH 4,0	pH 3,8
0,573	0,268	0,762	0,706	0,374	0,183	0,468	0,854	0,495	0,838

Tabelle 9: *p*-Werte für den Vergleich der DNA-Fragmentation von nasalen Schleimhautepithelzellen nach einmaligem Einwirken unterschiedlicher pH-Werte bei Rauchern und Nichtrauchern

Negativkontrolle	Positivkontrolle	pH 6,5	pH 5,5	pH 5,0	pH 4,7	pH 4,5	pH 4,3	pH 4,0	pH 3,8
0,262	0,314	0,272	0,956	0,089	0,358	0,706	0,739	0,375	0,779

Tabelle 10: *p*-Werte für den Vergleich der DNA-Fragmentation von nasalen Schleimhautepithelzellen nach einmaligem Einwirken unterschiedlicher pH-Werte mit und ohne Alkoholkonsum

Negativkontrolle	Positivkontrolle	pH 6,5	pH 5,5	pH 5,0	pH 4,7	pH 4,5	pH 4,3	pH 4,0	pH 3,8
0,560	0,391	0,026	0,174	0,729	0,610	0,027	0,009	0,074	0,022

Tabelle 11: *p*-Werte für den Vergleich der DNA-Fragmentation von nasalen Schleimhautepithelzellen nach einmaligem Einwirken unterschiedlicher pH-Werte bei Allergikern und Nicht-Allergikern

Negativkontrolle	Positivkontrolle	pH 6,5	pH 5,5	pH 5,0	pH 4,7	pH 4,5	pH 4,3	pH 4,0	pH 3,8
0,421	0,016	0,479	0,528	0,331	0,662	0,457	0,820	0,443	0,819

### 9.3 Herstellung der zur Kultur und zu den Versuchen notwendigen Lösungen

#### 9.3.1 Miniorgane

Tabelle 12: Kultur der Miniorgane

<i>Herstellung von</i>	<i>benötigte Substanzen</i>	<i>Anleitung</i>
Agar zur Beschichtung der 6-Well Platten	0,75% Agar in DMEM gelöst	750mg Agarpulver werden in 100ml DMEM in der Mikrowelle aufgelöst und je 750µl pro Well aufgetragen
Nährmedium	2,48ml Supplement + 1ml PenStrep + 100ml AECGB-Medium	das Supplement, das Antibiotikum und das Basis-medium werden zusammengegeben und je 1ml des Gemisches in jedes Well pipettiert

Tabelle 13: Enzymatischer Verdau der Miniorgane

Enzymmix	Kollagenase Hyaluronidase Pronase in AECGB-Medium gelöst	300mg Kollagenase, 300mg Hyaluronidase und 600mg Pronase werden in 6ml AECG-Medium gelöst und je 600µl in jedes Cup mit 7 MOCs gegeben
----------	---	--

### 9.3.2 Einzelzellgelelektrophorese

Tabelle 14: Beschichtung der Objektträger

<i>Herstellung von</i>	<i>benötigte Substanzen</i>	<i>Anleitung</i>
Vorbeschichtung	1% NMP-Agarose in Aqua destillata gelöst	1g NMP-Agarosepulver wird in 100ml Aqua destillata in der Mikrowelle aufgelöst die Objektträger in die flüssige Agarose getaucht. Die nichtbeschichtete Unterseite wird abgewischt und die Objektträger auf der Wärmeplatte getrocknet
erste Agaroseschicht	0,6% NMP-Agarose in PBS gelöst	36mg NMP-Agarosepulver werden in der Mikrowelle in 6ml PBS gelöst und pro Objektträger 300µl aufgetragen, mit einem Deckgläschen bedeckt und zum Erstarren in den Kühlschrank gelegt
zweite Agaroseschicht (Zellschicht)	0,5% LMP-Agarose in PBS gelöst	50mg LMP-Agarosepulver werden im 37°C Wasserbad in 10ml PBS gelöst, die Zellen werden in der Agarose resuspendiert, sodass eine Zellzahl von 100 000 / ml entsteht. 85µl dieser Zellsuspension werden auf jeden Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen bedeckt und zum Erstarren 10min in den Kühlschrank gelegt
dritte Agaroseschicht	0,5% LMP-Agarose in PBS gelöst	60µl werden als abschließende Schicht auf jeden Objektträger aufgetragen, mit einem Deckgläschen bedeckt und für 10min zum Erstarren in den Kühlschrank gelegt

Tabelle 15: Lyse

<i>Herstellung von</i>	<i>benötigte Substanzen</i>	<i>Anleitung</i>
Lysestammlösung	146,4g NaCl (2,5M) 1,2g Trizma Base (Trishydroxy- methylaminomethan) (10mM) 37,2g Na <sub>2</sub> EDTA (100mM) 10g N-Lauryl- sarcosinat 1% Aqua bidest	NaCl und Trizma Base in 500ml Aqua bidestillata lösen, Na <sub>2</sub> EDTA in 160ml Aqua bidestillata mit Zugabe von NaOH-Plätzchen lösen, N-Laurylsarcosinat in 160ml Aqua bidestillata lösen. Nach Vermischen aller Komponenten pH-Wert auf 10 einstellen und mit Aqua bidestillata auf 1l auffüllen
Lysepuffer	1ml Triton 10ml DMSO 89ml Lysestammlösung	alles gut im Messzylinder mischen

Tabelle 16: Elektrophorese

Elektrophoresepuffer	3M NaHO-Lösung 200mM Na <sub>2</sub> EDTA in Aqua destillata	100ml NaOH-Lösung und 5ml Na <sub>2</sub> EDTA mit Aqua destillata auf 1l auffüllen und auf 4°C kühlen
----------------------	--	--

Tabelle 17: Neutralisation

Neutralisations-puffer	48,5g Trizma Base Aqua bidestillata	Trizma Base in 1l Aqua bidestillata lösen, pH auf 7,5 einstellen
------------------------	--	--

Tabelle 18: Färbung

Ethidiumbromidfärbelösung	1%iges Ethidiumbromid in Aqua destillata	2µl der Ethidiumbromidlösung mit Aqua destillata auf 1ml auffüllen
---------------------------	--	--



## **10 Thesen**

- 1) Miniorgankulturen stellen gut die in vivo-Situation dar, und eignen sich deshalb für genotoxikologische Untersuchungen.
- 2) Der Einfluss des gastropharyngealen/-laryngealen Refluxes auf die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes kann anhand von Miniorgankulturen aus nasaler Mukosa untersucht werden.
- 3) Durch die Möglichkeit einer kumulativen Schädigung kann man durch entsprechende Versuchsanordnungen der in vivo-Situation relativ nahe kommen.
- 4) Durch pH-Absenkung des Umgebungsmilieus kann ein Erbgutschaden in den Epithelzellen der Miniorgane induziert werden.
- 5) Im Comet-Assay ist der durch pH-Absenkung induzierte DNA-Schaden quantifizierbar.
- 6) Je niedriger der extrazelluläre pH-Wert, desto höher die DNA-Schädigung und damit das Olive-Tail-Moment.
- 7) Durch seine Sensitivität gegenüber Einzelstrangbrüchen und die Möglichkeit seines Einsatzes auch bei kleinen Probenmengen, eignet sich der Comet-Assay gut für genotoxikologische Untersuchungen mit Miniorgankulturen.
- 8) Für die Auswertung des Comet-Assay ist es wichtig ein standardisiertes Versuchsprotokoll auszuarbeiten, da sich nur kleine Änderungen im Ablauf auf die Ergebnisse auswirken.
- 9) Eine Versuchsreihe sollte immer von derselben Person ausgewertet werden, da sich die unterbewusst subjektive Technik des Experimentators in den Ergebnissen widerspiegelt.
- 10) Gastropharyngealer/-laryngealer Reflux kann Tumoren im Naso- und Oropharynx induzieren.
- 11) Die pH-Erniedrigung des Umgebungsmilieus ist ein wichtiger Faktor bei der Tumorentstehung bei Patienten mit Laryngo-pharyngealem Reflux.

- 12) Der extrazelluläre pH-Wert hat einen Einfluss auf die Stabilität des Genoms von Epithelzellen des oberen Aerodigestivtraktes.
- 13) Je nach Stärke der extrazellulären pH-Wert-Erniedrigung, kann dieser einen genotoxischen Einfluss ausüben.
- 14) Je saurer das Umgebungsmilieu, desto höher ist der induzierte DNA-Schaden der Epithelzellen.
- 15) Vorbestehende Erbgutschädigung beeinflusst die Widerstandsfähigkeit des Genoms gegenüber weiterer Noxeneinwirkung.

## **Lebenslauf**



### **Persönliche Daten:**

Name: Katrin Oertel  
geboren am 13.02.1981 in Halle/Saale  
Familienstand: ledig  
Eltern: Martha Sabine Oertel, geborene Illing  
Heinz-Jürgen Otto Ignaz Oertel

### **Schulausbildung:**

1987-1991 Friedensschule Halle/Ammendorf  
1991-1999 Gymnasium Frieden Halle/Ammendorf

### **Freiwilliges ökologisches Jahr:**

1999-2000 Freiwilliges ökologisches Jahr im Schulumweltzentrum  
Halle/Franzigmark

### **Universitätsausbildung:**

2000-2007 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg  
2005 Beginn der Arbeiten zur Dissertation im Labor der Hals-Nasen-  
Ohren-Klinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

### **-Famulaturen:**

2003 4 Wochen Innere Medizin, Palliativstation, Krankenhaus links der Weser, Bremen  
2003 2 Wochen Rechtsmedizin, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/Saale  
2004 6 Wochen Infektions- und Tropenmedizin, Universitätsklinikum Leipzig  
2004 4 Wochen Allgemeinchirurgie, Spitalul Județian, Brașov, Rumänien  
2005 4 Wochen HNO-Ambulanz, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle/S.  
2005 4 Wochen HNO, Rumah Sakit Dr. Sardjido, Yogyakarta, Indonesien

### **-Praktisches Jahr:**

17.04.-06.08.2006 Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der MLU-Halle-Wittenberg  
07.08.-26.11.2006 Onkologische Station des Basedow-Klinikums Merseburg  
27.11.'06-07.04.'07 Station für Allgemeinchirurgie der Universidade Federal de  
Pernambuco, Recife, Brasilien

**Sprachen:** Englisch, Portugiesisch, Grundkenntnisse in Rumänisch

**Nebentätigkeiten:** seit 2001 ehrenamtliche Tätigkeit im Hospiz Halle

**Hobbies:** Reiten, Reisen, Kraftsport, Radsport

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit versichere ich, dass diese Arbeit ausschließlich von mir und ohne fremde Hilfe angefertigt wurde. Alle Hilfsmittel und anderen Arbeiten wörtlich oder inhaltlich entnommenen Textstellen, sind ausdrücklich als solche gekennzeichnet und als Quellen angegeben.

Katrin Oertel

Halle/Saale, den 17.12.2007

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Hiermit versichere ich, dass ich außer dieser Arbeit keine weiteren Promotionsversuche unternommen habe.

Katrin Oertel

Halle/Saale, den 17.12.2007

## Danksagung

Herrn Prof. Bloching danke ich für die freundliche Überlassung dieses Themas.

Sehr danke ich Frau Dr. Schön und Frau Dr. Sandner für die gute Betreuung. Beide standen mir jeder Zeit mit Rat zur Seite und haben entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Der Laboringenieurin Frau Pietz danke ich für die vielen praktischen Ratschläge in der Laborarbeit, weiterhin gilt Dank der Medizinisch Technischen Assistentin Frau Wolfsteller, die sich um die histologische Färbung meiner Präparate kümmerte.

Herrn Dr. Sel danke ich für hilfreiche Unterstützung in Statistikfragen und für nette Unterhaltung zu Zeiten an denen sonst niemand mehr im Labor war.

Großer Dank gilt weiterhin Frau Prof. Foth, die mir gestattete jederzeit meine Auswertungen im Institut für Umwelt-Toxikologie durchzuführen.

Herrn Felix Glahn aus dem Institut für Umwelt-Toxikologie danke ich herzlich für seine immense Einsatzbereitschaft, wenn es darum ging mich aus verzweifelten Lagen mit Mikroskop und Computer zu retten.

Ich danke dem gesamten Team der Umwelt-Toxikologie für ein wunderbares Arbeitsklima und nette, aufbauende Unterhaltung.

Dem Institut für Pathologie danke ich für die Einbettung meiner Präparate.

Großer Dank gilt meinem Vater, der mich aus vielen Konfliktsituationen mit meinem Computer befreite.

Meiner Familie und all meinen Freunden danke ich für ihr Verständnis und aufbauende Worte und für ihre Gabe mich auch mal abzulenken wenn es nötig war.