

**Aus der Medizinischen Klinik
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke
Pneumologie: Leiter der Abteilung Prof. Dr. R.M. Huber**

**Wirkung ionisierender Strahlung auf verschiedene
Lungengewebe epithelialen Ursprungs**

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

**Vorgelegt von
Jutta Stief
aus Weilheim (Oberbayern)**

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. R.M. Huber
Mitberichterstatter: Prof. Dr. Dr. h.c. E. Lengfelder
Prof. Dr. E. Richter

Mitbetreuung durch den
Promovierten Mitarbeiter: Dr. med. A. Bergner
Dr. med. F. Gamarra

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.03.2006

Inhalt

Inhalt	3
Abbildungsverzeichnis	6
Abkürzungsverzeichnis	7
1 Einleitung und Fragestellung	8
1.1 Einleitung	8
1.2 Zielsetzung und Fragestellung	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Kultivierung des respiratorischen Epithels im dreidimensionalen Modell	11
2.1.1 Gewinnung der Bronchialschleimhaut	11
2.1.2 Kulturbedingungen	11
2.2 Kultivierung des respiratorischen Epithels im zweidimensionalen Modell	15
2.2.1 Kultivierung der Primärkulturen	15
2.2.1.1 <i>Verwendetes Epithel</i>	15
2.2.1.2 <i>Kulturbedingungen</i>	15
2.2.2 Kultivierung der BEAS-2B Zelllinie	18
2.2.2.1 <i>Verwandte Zelllinie</i>	18
2.2.2.2 <i>Kulturbedingungen</i>	19
2.3 Kultivierung der Plattenepithelzell-Tumorlinie EPLC-32M1	19
2.3.1 Verwendete Zelllinie	19
2.3.2 Kulturbedingungen	20
2.4 Bestrahlung der Zellkulturen	20
2.5 Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH)	21
2.5.1 Grundlagen zur LDH	21
2.5.2 (photometrische) LDH-Bestimmung	21
2.5.3 Durchführung der LDH-Messungen	22
2.6 Bestimmung der Zellzahl	22
2.6.1 Herstellung der Zellsuspension im dreidimensionalen Modell	22
2.6.2 Herstellung der Zellsuspension im zweidimensionalen Modell	23
2.6.3 Herstellung der Zellsuspension der Tumorzelllinie	23
2.6.4 Auszählung der Zellen	23

2.7	Statistische Auswertung	24
3	Ergebnisse	25
3.1	LDH-Verhalten nach der Bestrahlung von dreidimensionalen Organkulturen	25
3.2	LDH-Verhalten nach Bestrahlung von Primärkulturen	26
3.3	LDH-Verhalten nach Bestrahlung der BEAS-2B-Zelllinie	27
3.4	LDH-Verhalten nach der Bestrahlung von Tumorzellen	29
3.5	Zellzahlen nach der Bestrahlung von dreidimensionalen Organkulturen	31
3.6	Zellzahlen nach Bestrahlung von Primärkulturen	32
3.7	Zellzahlen nach der Bestrahlung der BEAS-2B-Zelllinie	33
3.8	Zellzahlen nach der Bestrahlung von Tumorzellen	37
3.9	Zellzahlen aller bestrahlten Zellkulturmodelle im Vergleich	38
4	Diskussion	39
4.1	Diskussion der Materialien und Methoden	39
4.1.1	Dreidimensionale Organkulturen	39
4.1.2	Primärkulturen aus Patientenmaterial	42
4.1.3	BEAS-2B-Zelllinie	43
4.1.4	EPLC-32M1-Tumor-Zelllinie	45
4.1.5	Diskussion der Gewinnung und Kultivierung der Bronchialschleimhaut	46
4.1.6	Diskussion der Gewinnung und Kultivierung der Primärkulturen	47
4.1.7	Diskussion der Kultivierung der BEAS-2B und der EPLC-32M1-Zelllinie	48
4.1.8	Diskussion des Bestrahlungsvorganges	48
4.1.9	Diskussion der Lactatdehydrogenase-Bestimmung	50
4.1.10	Diskussion der Zellzahl-Bestimmung	52
4.2	Diskussion der Ergebnisse	54
4.2.1	Allgemeines	54
4.2.2	Verlauf der Lactatdehydrogenase-Aktivität	58
4.2.3	Zellzahlen nach Bestrahlung	62

5	Zusammenfassung, Schlussfolgerungen und Ausblicke	65
6	Literaturverzeichnis	70
7	Danksagung	83
8	Lebenslauf	85

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1 dreidimensionale Organkultur
- Abbildung 2 Flimmerepithelsaum einer dreidimensionale Organkultur
- Abbildung 3 Aussprossen der Epithelzellen aus einer dreidimensionalen Organkultur
zur Kultivierung einer Primärkultur
- Abbildung 4 Primärkultur
- Abbildung 5 LDH-Verhalten von Organkulturen bis zu 21 Tage
nach Bestrahlung
- Abbildung 6 LDH-Verhalten in Primärkulturen bis zu 5 Tage nach
Bestrahlung
- Abbildung 7 LDH-Verhalten bis zu 5 Tage nach Bestrahlung von BEAS-2B
Kulturen
- Abbildung 8 LDH-Verhalten von Tumorzellen bis zu 4 Tage nach
Bestrahlung
- Abbildung 9 Zellzahlen 4 Tage nach der Bestrahlung von Organkulturen
- Abbildung 10 Zellzahlen 21 Tage nach der Bestrahlung von Organkulturen
- Abbildung 11 Zellzahlen 5 Tage nach der Bestrahlung von Primärkulturen
- Abbildung 12 Zellzahlen von BEAS-2B Kulturen im Verlauf über 5 Tage
nach Bestrahlung
- Abbildung 13 Zellzahlen 4 Tage nach der Bestrahlung von BEAS-2B-Kulturen
- Abbildung 14 LDH pro BEAS-2B Zelle im Verlauf über 5 Tage nach
Bestrahlung
- Abbildung 15 Zellzahlen 4 Tage nach der Bestrahlung von Tumorzellen
- Abbildung 16 Verbleibende Zellen aller Kulturmodelle 4 Tage nach
Bestrahlung

Abkürzungsverzeichnis

BEGM	Bronchial Epithelial Growth Medium
°C	Grad Celsius
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylen Diamin Tetra-Acetat
FKS	Fetales Kälberserum
g	Zentrifugalbeschleunigung
Gy	Gray
H ⁺	Wasserstoff
LDH	Lactatdehydrogenase
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
n	Anzahl
NAD ⁺	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH+H ⁺	reduzierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NCS	New-Born-Calf-Serum
PBS	Phosphate Buffered Saline
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
U/l	Units pro Liter

1 Einleitung und Fragestellung

1.1 Einleitung

Nach den Herz-Kreislaufkrankungen mit 393.778 Todesfällen im Jahr 2002 sind maligne Neubildungen mit 215.441 Todesfällen die zweithäufigste Todesursache in Deutschland (stat. Bundesamt 2004).

Ein großer Anteil neoplasie-bedingter Todesfälle ist dem Bronchialkarzinom zuzuschreiben, dessen Inzidenz in Deutschland im Jahr 2000 bei den Männern 31.800 (16% der Neoplasien), bei den Frauen 10.400 (5,4% der Neoplasien) betrug. In der Rangordnung der Krebssterbefälle 2000 nahm es bei den Männern mit 26,8% Platz 1, bei den Frauen mit 9,8% Platz 3 ein (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004). Schon im 18. Jahrhundert waren Fälle von Lungenkreberkrankungen zu verzeichnen, allerdings war die Ursache damals vorwiegend im beruflichen Umfeld der Erkrankten zu sehen. So begünstigt zum Beispiel die Exposition mit Asbest, Radon, Uran, Chromaten, Arsen, Nickel, Haloether und polyzyklischen Kohlenwasserstoffen die Entstehung von Bronchialkarzinomen (Coultas D.B. and Samet J.M. 1992, Omenn G.S. et al. 1986, Harley N. et al. 1986). Durch bessere arbeitsmedizinische Vorsorgemaßnahmen und Nutzung anderer Ressourcen spielen diese Stoffklassen heutzutage nur noch eine untergeordnete Rolle in der Kanzerogenese der Lungenmalignome. Die Hauptursache des Bronchialkarzinoms ist derzeit im inhalativen Rauchen zu sehen, welches für ca. 80-90% der Bronchialkarzinome verantwortlich ist (U.S. Dept. Health 1989). Auch das Passivrauchen scheint mit einem erhöhten Karzinomrisiko einherzugehen (Trichopoulos D. et al. 1983, Janerich D.T. et al. 1990, Boffetta P. et al. 1999, GSF aktuell 15 1997).

Durch ein verändertes Rauchverhalten kann gerade bei Frauen eine Zunahme der Lungenkreberkrankungen verzeichnet werden, wobei bei den Männern seit Ende der 80er Jahre ein leichter Rückgang der Inzidenz zu beobachten ist. (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004).

Trotz verbesserter diagnostischer und therapeutischer Möglichkeiten konnte die Lebenserwartung Lungenkrebskranker in den letzten Jahren nur unwesentlich verbessert werden. Neuere Therapieansätze zum Beispiel mit Angiogenese-Hemmfaktoren sind erst in klinischer Erprobung und scheinen nach bisherigen Ergebnissen nur zu einem unzureichenden Benefit in der Therapie des Bronchialkarzinomes zu führen. Somit bestehen die Haupt-Pfeiler der Therapie nach wie vor aus der chirurgische Resektion, der Chemotherapie und der Radiotherapie. Hier kam es in den letzten Jahrzehnten zu einer deutlichen Verbesserung der therapeutischen Möglichkeiten. So führen die in der Strahlentherapie zur externen Bestrahlung verwandten Linearbeschleuniger zu einer Verkürzung der Bestrahlungszeit und einem homogeneren Bestrahlungsfeld. Mit Hilfe multimodaler Therapiekonzepte gelang es, die Überlebenszeit im Einzelfall doch zu verbessern. Insgesamt beträgt die 5-Jahresüberlebensrate abhängig vom Stadium ca. 13-14% (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland 2004).

Einen wichtigen Aspekt in der Therapie stellen auch palliative Maßnahmen z.B. die endoluminale Brachytherapie bei Bronchusstenosen dar, welche zu einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität des Patienten führen.

Im Rahmen von kombinierten Radio-Chemotherapien rücken zunehmend mögliche Nebenwirkungen der Therapie in den Vordergrund. So sind die Strahlenbronchitis (Gollins S.W.et al. 1996) und Strahlenpneumonitis ein häufiges Problem nach Radiotherapie. Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen zur Strahlenempfindlichkeit des gesunden Lungengewebes, speziell des Bronchialepithels. Nachdem die Radiotherapie im Rahmen multimodaler Therapiekonzepte zunehmend an Bedeutung gewinnt, ist es nötig, neue Erkenntnisse über die Strahlenbiologie des Normalepithels zu erlangen.

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere Bronchialepithel-Zellkultur-Modelle zur Untersuchung der Strahlenwirkung verwandt. Zum einen wurde eine etablierte Zellkulturlinie (BEAS-2B) verwandt, um *in vivo*-nahe Bedingungen zu simulieren wurden des weiteren

Monolayer-Kulturen aus Patienten-Material entwickelt. Nachdem es sich hier um zweidimensionale Kulturmodelle handelt, wurden, um eine möglichst gute Widerspiegelung der *in vivo*-Situation zu erhalten, von unserer Arbeitsgruppe entwickelte dreidimensionale Organkulturen bestrahlt. Ferner wurde zum Vergleich mit dem Normalgewebe eine Plattenepithelkarzinom-Tumorzelllinie ionisierenden Strahlen ausgesetzt.

Als Parameter für die Zellschädigung nach Bestrahlung wurde das Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) verwandt. Bei der LDH handelt es sich um ein zytoplasmatisches Enzym, welches in nahezu allen Körperzellen vorkommt und bei Plasmamembranschäden oder beim Zelltod freigesetzt wird. Die LDH als Parameter für Zelluntergang wird als solcher lange in der Medizin genutzt, wie z.B. bei der Diagnose des Myokardinfarktes oder bei verbrauchenden malignen Prozessen. Auch im Rahmen von zytostatischen Therapien oder der Strahlentherapie kommt es durch den vermehrten Zelluntergang zu einem Anstieg der LDH. Zur quantitativen Bestimmung der LDH liegen etablierte photometrische Testverfahren vor, welche die Verwendung der LDH als Parameter für die Zellschädigung nahe legen.

1.2 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel der Arbeit war es, die Auswirkung unterschiedlicher Strahlendosen anhand von LDH-Messungen und Zellzahlbestimmungen in den verschiedenen Kulturmodellen zu vergleichen. Insbesondere sollte untersucht werden, ob der Zell-Zell-Kontakt Einfluss auf die Strahlenbiologie der verschiedenen Kultivierungsformen hat. Des Weiteren sollte der zeitliche Ablauf der Strahlenwirkung in den verschiedenen Kulturmodellen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Kultivierung des respiratorischen Epithels im dreidimensionalen Modell

2.1.1 Gewinnung der Bronchialschleimhaut

Für die Kultivierung im dreidimensionalen Modell wurde humane Bronchialschleimhaut verwandt, die bei Lobektomien oder Pneumektomien gewonnen wurde. Die Operationen wurden von der Abteilung für Thoraxchirurgie in der Asklepios Fachklinik für Lungenerkrankungen in Gauting im Rahmen der kurativen Therapie des Bronchialkarzinoms durchgeführt.

An dieser Stelle möchten wir uns bei allen Mitarbeitern der Asklepios-Fachklinik für die gute Zusammenarbeit bedanken.

Die schleimhaut-tragenden Bronchialringe wurden im Operationssaal vom Resektat abgetrennt, in PBS-Waschlösung (Phosphate Buffered Saline without $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Boehringer Mannheim, Deutschland) verbracht und während des Transportes gekühlt zur Weiterverarbeitung in unser Labor der Medizinischen Klinik Innenstadt transportiert. Zwischen Entnahme und Aufarbeitung vergingen in der Regel 1,5-maximal 3 Stunden.

Nach Durchtrennung des Bronchialringes wurde der aufgeklappte Ring mittels Kanülen auf einem sterilen Styroporblock fixiert und die Mucosa mit einem Skalpell (No.22 Disposable Scalpel FEATHER[®], Martin, Tuttlingen, Deutschland) von dem darunterliegenden Gewebe abpräpariert. Die so gewonnene Schleimhaut wurde in ca. 1-1,5 mm große Stücke zerteilt. Nach vorsichtigem Waschen in BEGM-Medium (Bronchial Epithel Cell Growth Medium, PromoCell, Heidelberg, Deutschland) wurden die Schleimhautstücke auf 24 Well-Kulturplatten gebracht.

2.1.2 Kulturbedingungen

Die Kultivierung erfolgte auf 24 Multiwell-Platten (Gewebekulturplatten, MULTIWELL.TM Tissue Culture Plate Falcon[®], Lincoln Park, New Jersey, USA), die zur Verhinderung der

Adhäsion an die Plattenoberfläche mit 1,5%-igem Agar Noble beschichtet waren (Difco[®], Detroit, USA) versehen mit: Heps gepuffertem DMEM-Medium (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gibco, Life Technologies, Paisley, Scotland), NCS (New-Born-Calf-Serum, Gibco) sowie nichtessentiellen Aminosäuren (Gibco), Amphotericin B (Fungizone) und Streptomycin (Penstrep), beides von Gibco. Als Nährlösung wurden je Well 250 µl BEGM-Medium zugegeben. Alle zwei Tage wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, nach einer Woche wurden die Kulturen auf neue Kulturplatten umgesetzt.

Die Kultivierung fand bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Inkubator (Heraeus[®] LaminAir[®], Schultheiss, München, Deutschland) statt.

Die Kultivierungsdauer bis zur Bestrahlung betrug im Durchschnitt 10-14 Tage. In dieser Zeit waren Umbauvorgänge in den Kulturen weitgehend abgeschlossen (Bals R. et al. 1998). Die Beurteilung der Kulturen erfolgte lichtmikroskopisch unter 20-facher Vergrößerung (DIAPHOT-TMD, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) und richtete sich nach der Epithelialisierung und dem Zilienbesatz sowie der Innenstruktur der Kulturen. Für die Versuche wurden lediglich voll-epithelialisierte Kulturen, möglichst mit Zilien, frei von Knorpel und Alveolen verwendet.

Abbildung 1



Abbildung 1 zeigt eine, im Nährmedium befindliche dreidimensionale Organkultur aus humaner Bronchialschleimhaut bei 10facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop.

Abbildung 2

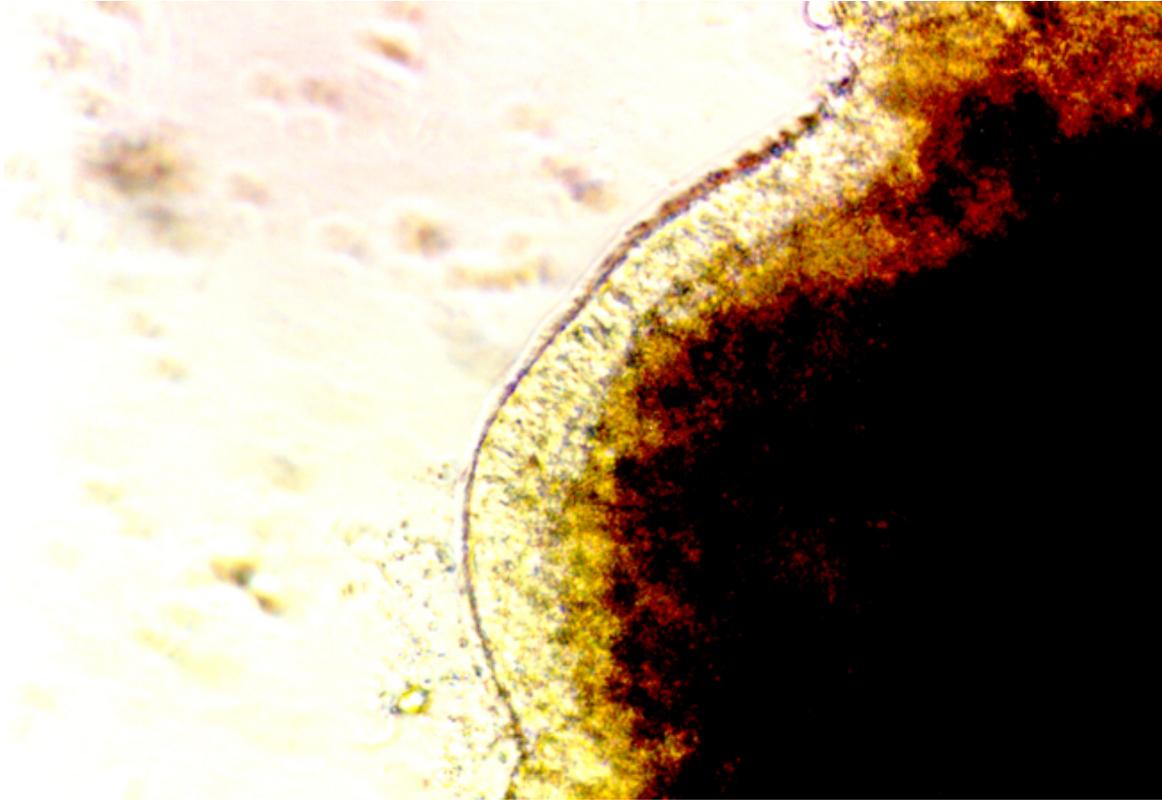


Abbildung 2 Ausschnitt einer dreidimensionalen Organkultur bei 20facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop. An der Oberfläche ist der schmale Flimmerepithelsaum der Kultur zu erkennen.

2.2 Kultivierung des respiratorischen Epithels im zweidimensionalen Modell

2.2.1 Kultivierung der Primärkulturen

2.2.1.1 Verwendetes Epithel

Um ein zweidimensionales Zellkultur-Modell aus Patientenmaterial zu erhalten, wurden die unter 2.1. beschriebenen Organkulturen auf kollagenbeschichtete 24-Multiwellplatten gebracht um ein Aussprossen der Epithelzellen in das Kollagen zu ermöglichen.

Die Organkulturen wurden bis zum Aufbringen auf die Multiwellplatten durchschnittlich 8 Tage kultiviert. Die Beschichtung der Kulturplatten erfolgte mit humanem Kollagen Typ IV (COLLAGEN Type IV, C 5533, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland). Das Kollagen wurde in einer Konzentration von 0,5 mg/ml in 0,25 %-iger Essigsäure unter gelegentlichem Rühren über mehrere Stunden gelöst. Die Lösung wurde gleichmäßig auf dem Wellboden verteilt und über Nacht unter UV-Licht getrocknet. Nun wurde eine Organkultur je Well aufgebracht und nach Zugabe eines Tropfens EDTA (EDTA 0,02% Solution, Sigma-Aldrich), um das Lösen vom bindegewebigen Kern zu verbessern, für 2 Stunden im Brutschrank inkubiert. Die EDTA getriggerte Reaktion wurde durch einen Tropfen NCS beendet. Als Kulturmedium wurden anschließend 350 µl BEGM Medium unter Zusatz von 10% NCS (New-Born-Calf-Serum, Gibco) zugegeben.

2.2.1.2 Kulturbedingungen

Während der Inkubation bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit erfolgte ein 2tägiger Mediumwechsel. Die Organkulturen verblieben auf den kollagenbeschichteten Platten, bis ein deutlicher Zellrasen um die Kulturen zu sehen war. Erst dann wurden sie mit einer Kanüle entfernt. Der Zeitraum bis zur Entfernung betrug durchschnittlich 6-10 Tage. Bis zum Bestrahlungstermin wurden die Primärkulturen noch 3 Tage weitergezüchtet.

Der Zeitraum von der Kultivierung der dreidimensionalen Organkultur bis zur endgültigen Verwendung als zweidimensionales Monolayer betrug 17-21 Tage. Das Wachstum wurde

täglich mikroskopisch bei 10 und 20-facher Vergrößerung begutachtet. Kulturen, mit zu kleinem Zellrasen oder mit Fibroblasten-Wachstum wurden verworfen.

Abbildung 3

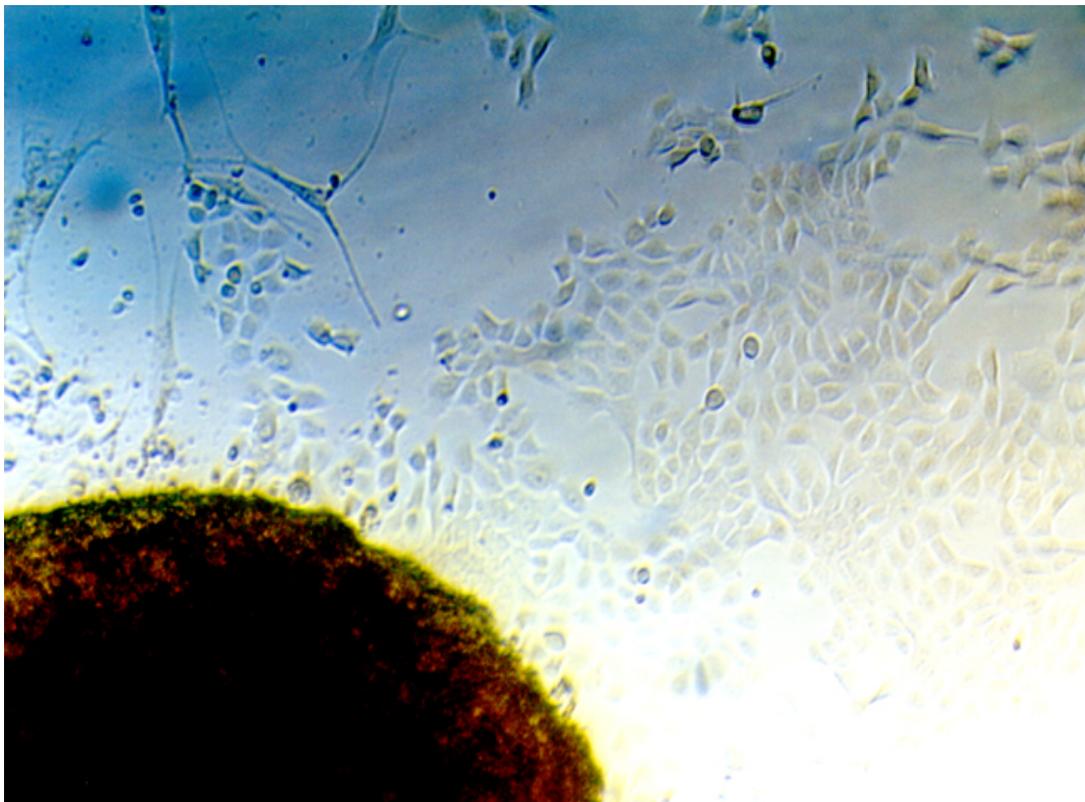


Abbildung 3 Aussprossen von Epithelzellen einer dreidimensionalen Organkultur auf den Kollagen beschichteten Wellboden zur Kultivierung von Primärkulturen. Darstellung bei 20facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop.

Abbildung 4

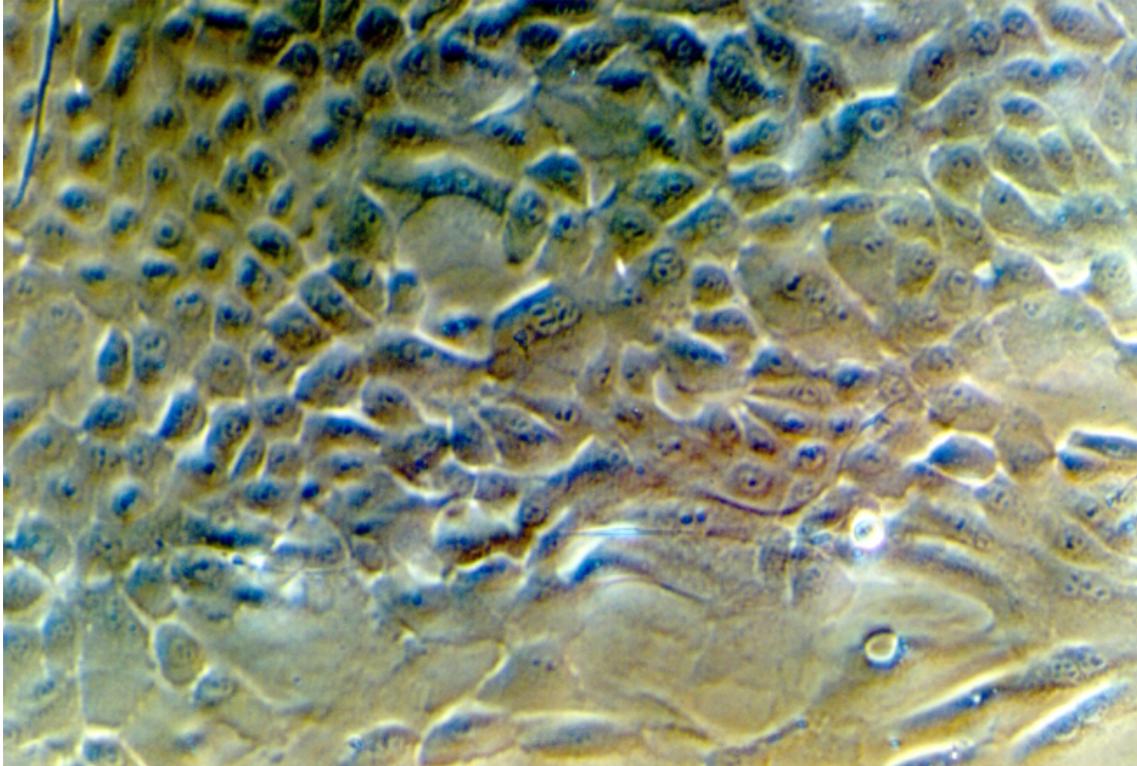


Abbildung 4 Primärkultur 4 Tage nach Entfernen der Organkultur bei 30facher Vergrößerung unter dem Phasenkontrastmikroskop.

2.2.2 Kultivierung der BEAS-2B Zelllinie

2.2.2.1 Verwandte Zelllinie

Bei der BEAS-2B Zelllinie handelt es sich um eine Adenovirus-12 SV 40 hybrid virus-transformierte, humane Bronchialepithelzelllinie, die uns freundlicherweise von Prof. Dr. A. Gillissen, Pneumologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn zur Verfügung gestellt wurde. Die Zelllinie wurde bis zum Bedarf in flüssigem Stickstoff konserviert. Hierzu wurde eine Zellsuspension mit bekannter Zellzahl in 10% DMSO-FKS-Lösung (1 Teil DMSO (Dimethyl Sulfoxid), Sigma-Aldrich, 9 Teile FKS (fetales Kälberserum), Gibco) in Kryoröhrchen eingefroren.

Zur Wiederverwendung wurden die Kryoröhrchen leicht angetaut und der Zellblock in frischem RPMI-Medium (Biochrom/Seromed, Berlin, Deutschland) aufgelöst. Nach zweimaliger Zentrifugation (Varifuge 20 RS, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 143 g für 5 min wurde die Suspension auf den Boden einer 200 ml Kulturflasche (Falcon[®]) aufgetragen und zum Festsetzen der Zellen am Boden des Kulturgefäßes für 15 min inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 14 ml RPMI-Medium zur Kultivierung. Bis zur vollständigen Konfluenz wurde das Medium alle 2-3 Tage gewechselt.

Nun wurden die Zellen mit Hilfe eines EDTA-Trypsin Gemisches (EDTA 0,02% Solution, Sigma-Aldrich, 2,5% Trypsin, Bio Whittaker, Walkersville, USA) abgelöst, nach Beendigung der Reaktion durch Zugabe von NCS (Gibco) erfolgten mehrere Waschungen mit RPMI-Medium. Von der erhaltenen Zelllösung wurden jeweils 20 µl/Well gleichmäßig auf 24 Multi-Well-Platten verteilt. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 400 µl RPMI-Medium pro Well.

2.2.2.1 Kulturbedingungen

Die Kultivierung der Epithelzelllinie erfolgte auf unbeschichteten 24 Multiwell-Platten. Als Kultursubstrat wurde RPMI-Medium, unter Zugabe von 10% NCS und L-Glutamin 200MM (Gibco) sowie Amphotericin B (Fungizone) und Streptomycin (Penstrep), beides von Gibco verwandt. Ein Austausch gegen frisches Kulturmedium erfolgte alle zwei Tage bis zur Versuchsdurchführung. Die Kultivierung fand bei 37 °C, 5% CO² und 100% Luftfeuchtigkeit im Inkubator statt.

Für die Bestrahlungsversuche wurden nur konfluente Kulturen verwendet, d.h. der Wellboden war zum Zeitpunkt der Bestrahlung komplett mit einem einschichtigen Zellrasen bedeckt. Das Wachstum der Epithelzellen wurde unter 20facher Vergrößerung mikroskopisch verfolgt. Konfluenz wurde nach 12-14 Tagen erreicht.

2.3 Kultivierung der Plattenepithelzell- Tumorlinie EPLC-32M1

2.3.1 Verwendete Zelllinie

Es handelt sich um eine adhärente Plattenepithelzelllinie (EPLC-32M1 epidermoid lung cancer), die 1989 in Marburg aus der Metastase eines Bronchialkarzinoms etabliert wurde und uns freundlicherweise von Dr. G. Jaques, Universität Marburg, zur Verfügung gestellt wurde.

Die Zelllinie wurde bis zum Bedarf in flüssigem Stickstoff konserviert. Hierzu wurde eine Zellsuspension mit bekannter Zellzahl in 10% DMSO-FKS-Lösung (1 Teil DMSO, Sigma-Aldrich, 9 Teile FKS, Gibco) in Kryoröhrchen eingefroren.

Zur Wiederverwendung wurden die Kryoröhrchen wie auch bei der BEAS-Zelllinie leicht angetaut und der Zellblock in frischem RPMI-Medium (Biochrom/Seromed) aufgelöst. Es folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 224 g. Nach Entfernung des alten Mediums und Zugabe von frischem RPMI-Medium erfolgte eine erneute Zentrifugation. Das Zellpelett wurde mit 2-3 ml Medium gemischt, anschließend wurden je 1 ml der Suspension auf den Boden einer 200 ml Kulturflasche (Falcon®) gebracht. Nach 15-minütiger Inkubation erfolgte

die Zugabe von 14 ml RPMI-Medium. Bis zur Konfluenz wurde alle 2-3 Tage das Medium gewechselt.

Für die Versuchsreihe wurden die Kulturen mit 5 ml EDTA Lösung (EDTA 0,02% Solution, Sigma-Aldrich) vom Boden der Kulturflaschen abgelöst sowie nach Beendigung der Reaktion durch Beigabe von 5 ml NCS mehrmals gewaschen und gleichmäßig auf 20 ml Kulturflaschen verteilt (Falcon®). Nach 15 Minuten Inkubation im Brutschrank wurden jeweils 15 ml Medium zugegeben.

2.3.2 Kulturbedingungen:

Die Kultivierung der Tumorzelllinie erfolgte in unbeschichteten 20 ml Kulturflaschen. Als Kultursubstrat wurde RPMI-Medium, unter Zugabe von 10% NCS und L-Glutamin 200MM (Gibco) sowie Amphotericin B (Fungizone) und Streptomycin (Penstrep), beides von Gibco verwandt. Ein Austausch gegen frisches Kulturmedium erfolgte wie bei den anderen Kulturmodellen alle zwei Tage bis zur Versuchsdurchführung.

Auch hier wurden wie bei der BEAS 2B Zelllinie nur vollständig konfluente Kulturen bestrahlt. Konfluenz wurde im Tumorzell-Modell nach 12-15 Tagen erreicht.

2.4 Bestrahlung der Zellkulturen

Die Bestrahlung der Kulturen wurde in der Klinik für Strahlentherapie und Radioonkologie Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt, hier noch vielen Dank an die Mitarbeiter der Einrichtung für die gute Zusammenarbeit. Zur Bestrahlung wurde ein Linearbeschleuniger für Elektronen (Sli 15, Elekta, Hamburg, Deutschland) verwandt. Dieses Gerät wird auch im Rahmen der klinischen Strahlentherapie eingesetzt.

Alle Zellkulturen einschließlich der Kontrollgruppen wurden mit in die Bestrahlungseinrichtung transportiert, um eventuell durch den Transport hervorgerufene Schäden an den Zellkulturen mit möglichem LDH-Anstieg in allen Kulturen gleichermaßen zu erfassen und so von der Strahlenwirkung unterscheiden zu können. Die Kulturen wurden

gleichmäßig im Bestrahlungsfeld verteilt, anschließend erfolgte die Strahlen-Applikation von 10 und 30 Gray. Die Bestrahlungsdauer betrug bis zu 8 Minuten bei 30 Gray, bei einer Dosis von 4 Gray pro Minute. Nach erfolgter Bestrahlung wurden die Zellkulturen wieder in den Brutschrank verbracht. Insgesamt wurden 36 BEAS-2B Kulturen, 30 Primärkulturen, 100 Organkulturen sowie 18 EPLC-32M1 Tumorzell-Kulturen untersucht.

2.5 Bestimmung der Lactatdehydrogenase (LDH)

2.5.1 Grundlagen zur LDH

Bei der Lactatdehydrogenase handelt es sich um ein zytoplasmatisches Enzym der anaeroben Glykolyse, welches die Reaktion $\text{Pyruvat} + \text{NADH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons \text{L-Lactat} + \text{NAD}^+$ katalysiert. Im klinischen Gebrauch kennt man die LDH als Parameter für Diagnose und Verlaufsbeurteilung schwerwiegender Organschäden, wie sie zum Beispiel beim Myokardinfarkt oder fortgeschrittenen Tumorleiden mit Gewebszerfall vorkommen. Der Nachweis einer vermehrten LDH im Serum oder anderen Medien, wie im Überstand der Nährlösung der Zellkultur, wird durch den gesteigerten Austritt des Enzyms aus der Zelle bei Zellmembranläsionen verursacht. Ein Vorteil der LDH-Bestimmung als Marker für eine Zellschädigung nach Bestrahlung liegt darin, dass die LDH ohne eine Zerstörung der Zellkulturen aus dem Medium der Kulturen ermittelt werden kann und eine quantitative Aussage über die Höhe des Schadens zulässt. Ein weiterer Vorteil der LDH-Bestimmung liegt in der hohen Stabilität der LDH, welche bei Raumtemperatur bis zu 7 Tagen haltbar ist.

2.5.2 (photometrische) LDH-Bestimmung

Die quantitative LDH-Bestimmung erfolgte photometrisch über die Messung der NAD^+ Extinktion. Zu dem Überstand, bestehend aus dem Kulturmedium einer einzelnen Zellkultur, wurden maschinell (Hitachi 917, Boehringer, Mannheim, Deutschland) ein Phosphatpuffer 68 mmol/l (pH=7,5) und Pyruvat $\geq 0,73$ mmol/l sowie Konservierungsmittel (beides Boehringer) beigelegt. Anschließend wurde die Reaktion durch die Zugabe von $\text{NADH} \geq 1,1$ mmol/l

gestartet. Bei der Umsetzung von Pyruvat zu Lactat, welche durch die LDH katalysiert wird, wird das NADH zu NAD^+ oxidiert. Photometrisch ermittelt wird die Geschwindigkeit der NADH-Abnahme, welche direkt proportional zur LDH-Konzentration ist. Der Messbereich beträgt 6- 1200 Units/Liter (U/l).

2.5.3 Durchführung der LDH-Messungen

Die LDH-Aktivität wurde in allen Zellkulturmodellen jeweils direkt vor der Bestrahlung sowie alle 24 Stunden nach Bestrahlung ermittelt, um eine zeitnahe Verlaufsbeurteilung der LDH-Aktivität zu ermöglichen. Bei allen Kultivierungsmodellen wurde die Höhe der LDH mindestens bis zu 4 Tagen nach der Bestrahlung ermittelt, im Organkulturmodell zusätzlich 10 und 21 Tage nach der Bestrahlung. Die Messungen der LDH-Aktivität erfolgten im Anschluss an die Abpipettierung des Zellüberstandes. Zur Bestimmung der LDH wurden 250 μl des Zellkulturüberstandes einzelner Zellkulturen herangezogen, nach Abnahme des Überstandes wurde dieses durch neues Nährmedium ersetzt.

2.6 Bestimmung der Zellzahl

2.6.1 Herstellung der Zellsuspension im dreidimensionalen Modell

Nach dem Abpipettieren des Mediums für die LDH-Bestimmung wurde je eine Organkultur in ein 1,5 ml fassendes Eppendorf-Cup (Eppendorf-Reaktionsgefäße, Hamburg, Deutschland) verbracht. Zur Isolierung der Zellen aus dem Epithelverband wurden pro Well 600 μl eines Protease- Kollagenase-Gemisches zugegeben. Dazu wurden 1 mg Kollagenase und 1,5 mg Protease (beides Sigma-Aldrich) in 1 ml BEGM-Medium gelöst. Anschließend erfolgte die 50- minütige Inkubation bei 37 °C und 200 U/min im Schüttelinkubator (Certomat[®]H, Braun Biotech, Melsungen, Deutschland). Im Anschluss an die Inkubation wurde die enzymatische Reaktion mittels 600 μl NCS geblockt. Nach 20 sekundigem Vortexen (Vortexer, Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) zur Lösung von an dem bindegewebigen Kern der Organkulturen haftenden Zellen wurde dieser Kern mit Hilfe einer Kanüle entfernt. Nach

kräftiger Durchmischung der Suspension und Zentrifugation bei 143 g für 10 Minuten fand eine weitere Zentrifugation nach Abpipettierung des Überstandes und der Zugabe von je 1000 µl PBS statt. Nun wurde der Überstand genau bis zur unteren Markierung des Eppendorf Cups entfernt. Die verbleibende Zellsuspension wurde nach vorsichtigem Mischen mit der Neubauer Zählkammer (Kammertiefe 0,1 mm, Brand, Wertheim, Deutschland) ausgezählt.

2.6.2 Herstellung der Zellsuspension im zweidimensionalen Modell

Nach Entfernung des Mediums wurde jedes Well mit 200 µl 0,02% EDTA inkubiert. Die Inkubationszeit betrug bei den BEAS-2B Linien ca. 20 min, bei den Primärkulturen ca. 60 min. Der Zellsuspension wurden nach ausgiebigem Mischen je 200 µl NCS beigefügt. Das weitere Vorgehen war analog dem bei den dreidimensionalen Organkulturen.

2.6.3 Herstellung der Zellsuspension der Tumorzelllinie

Nach Entfernung des Mediums und Zugabe von 2 ml EDTA-Lösung pro Kulturflasche erfolgte eine 30 minütige Inkubation im Brutschrank. Nach vollständiger Ablösung der Tumorzellen wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 2 ml NCS abgeblockt. Die Lösung wurde nun für 5 min bei 143 g zentrifugiert, anschließend wurde der Überstand abdekantiert und zur besseren Auszählung mit 10 ml PBS verdünnt.

2.6.4. Auszählung der Zellen

Jeweils 10 µl der Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypanblau (Sigma) versetzt. Im Anschluss erfolgte die Auszählung mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Im Phasenkontrastmikroskop wurden für jeden Zellpool vier Zählfelder zu je 1 µl ermittelt. Durch Division erhielt man den Mittelwert der Zellkonzentration/Kultur. Um die Gesamtzellzahl zu erhalten, wurde das Ergebnis mit dem Volumen der Zelllösung multipliziert.

2.7 Statistik

Alle Daten in Text und Abbildungen wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben. Zur Beurteilung bezüglich des zeitlichen Verlaufs nach Bestrahlung wurde eine one-way repeated-measurement analysis of variance, kombiniert mit einer all pairwise multiple comparison procedure (Student-Newman-Keuls-Methode) verwandt. Zum Vergleich einzelner Gruppen wurde ein *t*-Test für normalverteilte Merkmale beziehungsweise der Mann-Whitney Rank Sum Test verwandt. Als statistisch signifikant wurden P-Werte $<0,05$ gewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Sigma Stat 3.0 Statistik-Software-Paket für Windows 2000.

3 Ergebnisse

3.1 LDH-Verhalten nach der Bestrahlung von dreidimensionalen Organkulturen

Im Organkulturmodell zeigte sich 2 Tage nach Bestrahlung ein signifikanter Anstieg der LDH-Aktivität der mit 30 Gray (Gy) bestrahlten Kulturen im Vergleich zu der unbestrahlten Kontrollgruppe ($P < 0,05$) (Abb. 5). Auch bei den mit 10 Gy bestrahlten Kulturen war ein LDH-Anstieg zu verzeichnen, wogegen in der Kontrollgruppe keine relevante Änderung der LDH-Aktivität zu beobachten war. Am 4. Tag nach Bestrahlung fand sich ein Rückgang der LDH-Aktivität in den bestrahlten Gruppen, nach 21 Tagen zeigte sich eine insgesamt deutlich verminderte LDH-Aktivität in allen Versuchsgruppen.

Abbildung 5: LDH-Verhalten von Organkulturen bis zu 21 Tagen nach Bestrahlung

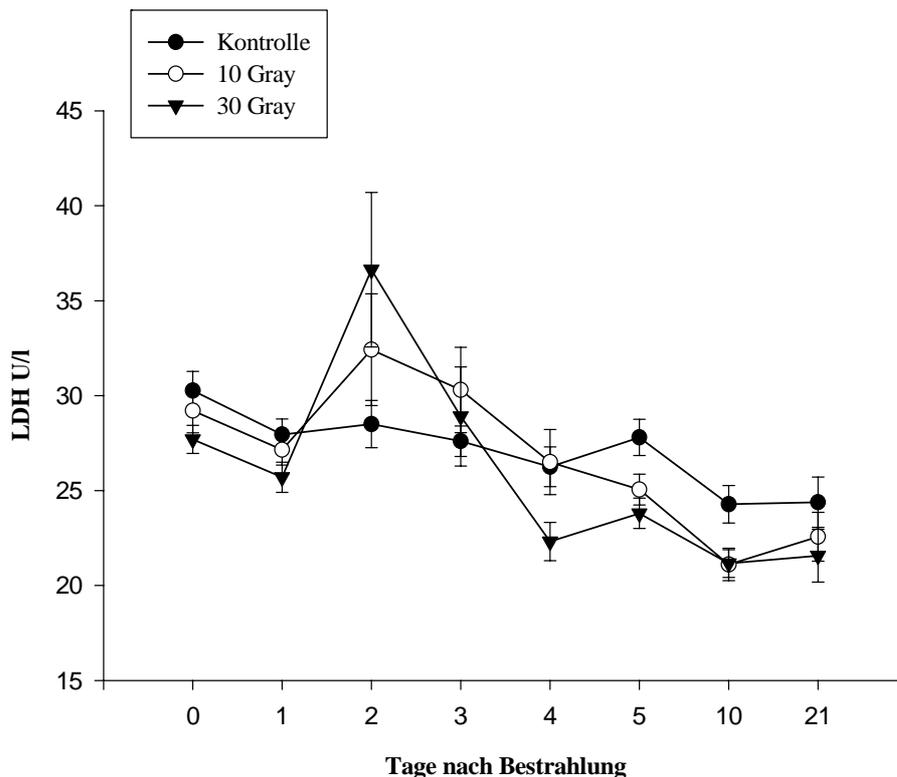


Abbildung 5 zeigt die LDH-Aktivität nach Bestrahlung im Organkultur- Modell. Auf der X-Achse ist die Zeit nach dem Bestrahlungszeitpunkt aufgetragen, auf der Y-Achse die LDH-Aktivität in Units/Litern (U/l). Die ausgefüllten Kreise stellen die unbestrahlte Kontrollgruppe dar, die nicht ausgefüllten Kreise bzw. die ausgefüllten Dreiecke stellen die mit 10 bzw. 30 Gy bestrahlten Gruppen dar. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler von je 20 Kulturen pro Versuchsgruppe angegeben. An Tag 2 nach Bestrahlung zeigte sich ein signifikanter LDH-Anstieg in der 30 Gy Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ($P < 0,05$).

3.2 LDH-Verhalten nach Bestrahlung von Primärkulturen

Am ersten Tag nach Bestrahlung war kein signifikanter Unterschied in der LDH-Aktivität unbestrahlter und bestrahlter Zellkulturen festzustellen, 2 Tage nach Bestrahlung fand sich ein deutlicher LDH-Anstieg in der Kontrollgruppe und der 30 Gy-Gruppe (Abb. 6). Ein signifikanter Unterschied der LDH-Aktivität war zwischen der 10 und der 30 Gy Gruppe zu verzeichnen ($P < 0,05$). In der 30 Gy Gruppe kam es 3 Tage nach Bestrahlung zu einem deutlichen LDH-Abfall, wogegen die LDH in der Kontrollgruppe nach wie vor erhöht war. Am 5. Tag nach der Bestrahlung findet sich in allen Versuchsgruppen ein leichter LDH-Anstieg.

Abbildung 6: LDH-Verhalten in Primärkulturen bis zu 5 Tage nach Bestrahlung

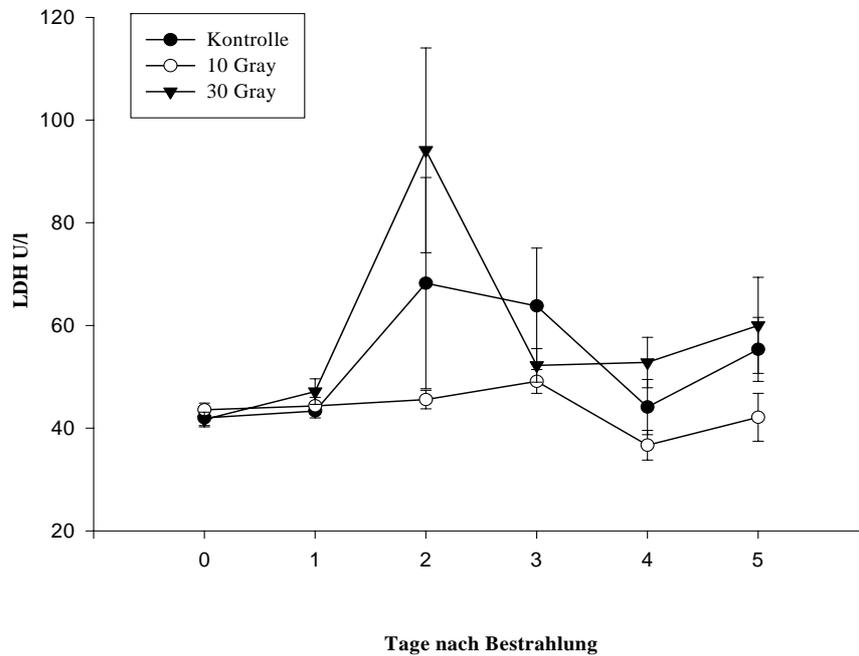


Abbildung 6 zeigt die Höhe der LDH nach Bestrahlung mit 0, 10 und 30 Gy im Primärkulturmodell. Auf der X-Achse sind die Tage nach Bestrahlung dargestellt, auf der Y-Achse die LDH-Aktivität (U/l). Ausgefüllte Kreise stellen die unbestrahlte Kontrollgruppe dar, nicht ausgefüllte Kreise bzw. ausgefüllte Dreiecke stellen die mit 10 bzw. 30 Gy bestrahlten Gruppen dar. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler aus je 10 Kulturen pro Versuchsgruppe angegeben. Die LDH-Aktivität zeigte 2 Tage nach Bestrahlung einen signifikanten Unterschied zwischen der 10 Gy und der 30 Gy Gruppe ($P < 0,05$).

2.3 LDH-Verhalten nach Bestrahlung der BEAS-2B Zelllinie

Vor Bestrahlung zeigten die Kulturen eine weitgehend identische LDH-Aktivität, bereits ein Tag nach der Bestrahlung fand sich ein signifikanter dosisabhängiger LDH-Anstieg in den

beiden bestrahlten Gruppen ($P < 0,01$) (Abb. 7). Im Verlauf war in der 30 Gy Gruppe nach 4 Tagen ein deutlicher LDH-Abfall, in der 10 Gy Gruppe dagegen bereits nach 2 Tagen ein erster LDH-Abfall zu beobachten. Nach 3 Tagen kam es in der mit 10 Gy bestrahlten Gruppe zu einem erneuten Anstieg der LDH. Am 4. Tag nach Bestrahlung kommt es zu einer Annäherung der LDH aller 3 Versuchsgruppen. In der Kontrollgruppe war über den gesamten Messzeitraum ein leichter kontinuierlicher LDH-Anstieg zu verzeichnen.

Abbildung 7: LDH-Verhalten bis zu 5 Tage nach Bestrahlung von BEAS-2B Kulturen

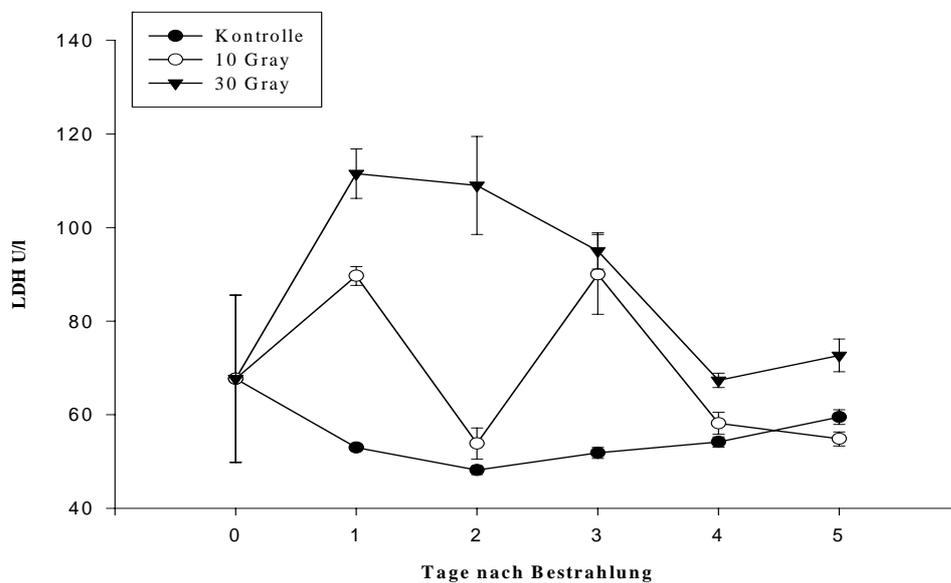


Abbildung 7 zeigt die Höhe der LDH-Aktivität vor der Bestrahlung und bis zu 5 Tagen nach Bestrahlung der BEAS-2B Zelllinie. Auf der X-Achse ist die Zeit nach Bestrahlung in Tagen aufgetragen, die Y-Achse zeigt die LDH-Aktivität in U/l. Die ausgefüllten Kreise stellen die unbestrahlte Kontrollgruppe dar, die nicht ausgefüllten Kreise bzw. die ausgefüllten Dreiecke die mit 10 bzw. 30 Gy bestrahlten Gruppen. Die Werte wurden als Mittelwerte \pm Standardfehler mit je 6 Kulturen pro Versuchsgruppe angegeben. 1 Tag nach Bestrahlung fand sich ein signifikanter LDH Anstieg in der 10 Gy und der 30 Gy Gruppe ($P < 0,01$).

3.4 LDH-Verhalten nach der Bestrahlung von Tumorzellen

Bei EPLC-32M1-Tumorzellen war 1 Tag nach Bestrahlung ein signifikanter LDH-Abfall in der Kontroll und der 10 Gy Gruppe zu verzeichnen ($P < 0,001$). An den folgenden Tagen kam es in diesen beiden Gruppen zu einem kontinuierlichen LDH-Anstieg, welcher von Tag 3 zu Tag 4 nach Bestrahlung signifikant war ($P < 0,001$) (Abb. 8). In der mit 30 Gy bestrahlten Gruppe kam es ab dem 1. Tag nach Bestrahlung zu einem leichten kontinuierlichen LDH-Abfall, erst ab dem 3. Tag war auch hier ein signifikanter Anstieg der LDH zu beobachten ($P < 0,01$).

Abbildung 8: LDH-Verhalten von Tumorzellen bis zu 4 Tagen nach Bestrahlung

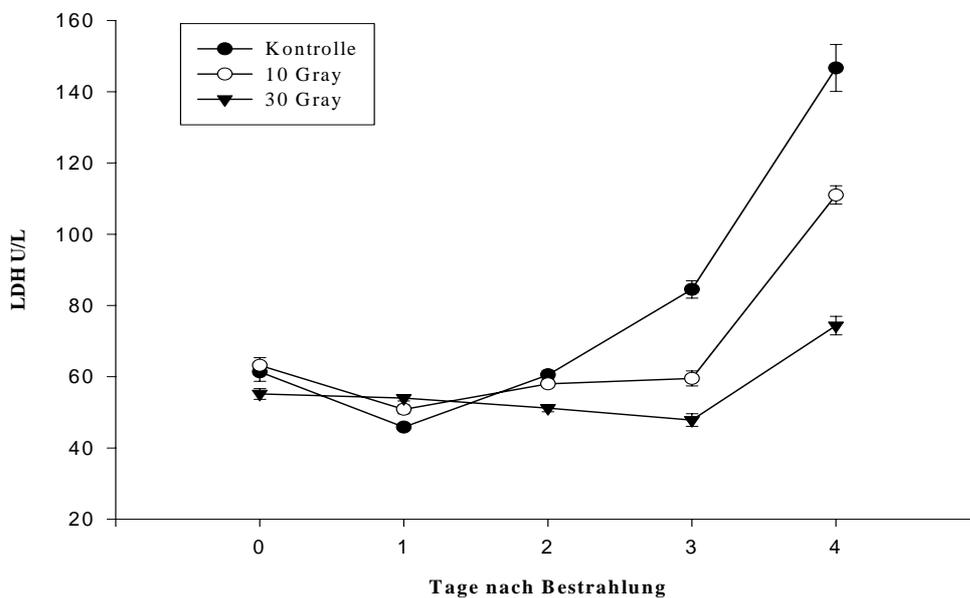


Abbildung 8 zeigt die LDH-Aktivität nach der Bestrahlung von EPLC-32M1 Tumorzellen. Auf der X-Achse ist die Zeit nach dem Bestrahlungszeitpunkt aufgetragen, auf der Y-Achse die LDH-Aktivität in U/l. Die ausgefüllten Kreise stellen die unbestrahlte Kontrollgruppe dar, die nicht ausgefüllten Kreise bzw. die ausgefüllten Dreiecke stellen die mit 10 bzw. 30 Gy bestrahlten Gruppen dar. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler aus je 6 Kulturen pro Dosis angegeben. Von Tag 0 zu Tag 1 nach Bestrahlung ist ein signifikanter LDH-Abfall in der Kontroll und der 10 Gy Gruppe zu verzeichnen ($P < 0,001$). Von Tag 3 zu Tag 4 kommt es zu einem signifikanten LDH-Anstieg in allen Versuchsgruppen (Kontrolle, 10 Gy $P < 0,001$; 30 Gy $P < 0,01$)

3.5. Zellzahlen nach der Bestrahlung von dreidimensionalen Organkulturen

4 Tage nach der Bestrahlung fand sich im Organkulturmodell kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellzahlen zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Abb. 9).

Abbildung 9: Zellzahlen 4 Tage nach der Bestrahlung von Organkulturen

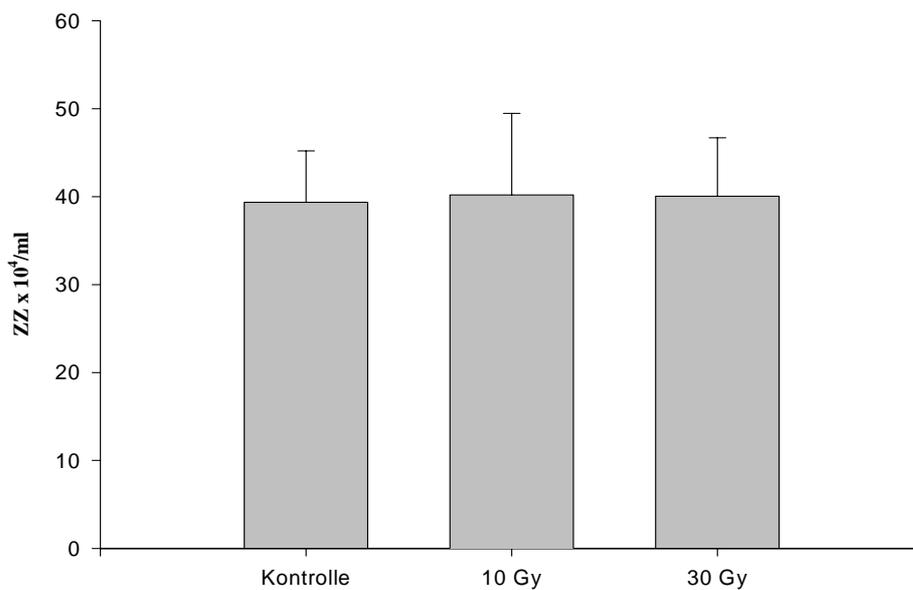


Abbildung 9 zeigt die Zellkonzentration der Organkulturen 4 Tage nach Bestrahlung. Auf der X-Achse sind die Gruppen nach der Strahlendosis geordnet aufgetragen, die Y-Achse zeigt die Zellzahl x 10⁴/ml. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler aus je 20 Kulturen pro Gruppe angegeben.

21 Tage nach Bestrahlung fand sich ein signifikanter Unterschied in der Zellkonzentration der mit 10 Gy und 30 Gy bestrahlten Gruppe verglichen mit der Kontrollgruppe ($P < 0,05$). (Abb.10)

Abbildung 10: Zellzahlen 21 Tage nach der Bestrahlung von Organkulturen

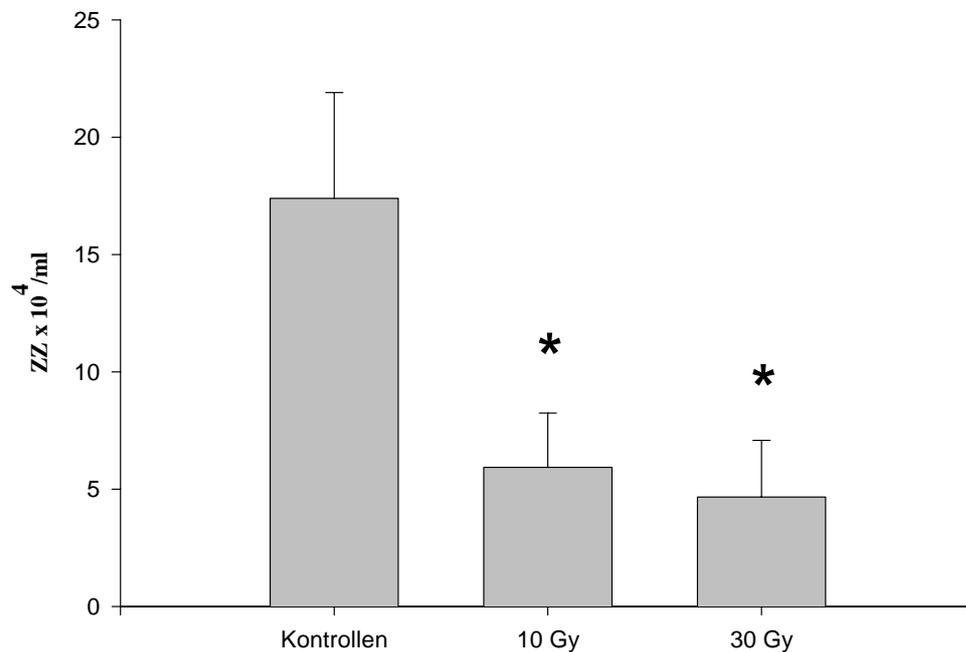


Abbildung 10 zeigt die Zellzahlen der Organkulturen 21 Tage nach Bestrahlung. Auf der X-Achse sind die einzelnen Versuchsgruppen anhand der Dosis aufgetragen, die Y-Achse zeigt die Zellzahl x 10⁴/ml. Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben. Die Anzahl der Organkulturen je Dosis betrug 20. Die Zellzahl der Kontrolle war im Vergleich zu 10 und 30 Gy signifikant höher ($P < 0,05$; * = signifikant).

3.6 Zellzahl nach Bestrahlung von Primärkulturen

Bei der Zellzahl von Primärkulturen zeigte sich 5 Tage nach Bestrahlung eine signifikante Abnahme der Zellen in den bestrahlten Zellkulturen verglichen mit den Kontrollen ($P < 0,01$). Der Unterschied zwischen der mit 10 und 30 Gy bestrahlten Gruppe war dagegen nicht signifikant (Abb. 11).

Abbildung 11: Zellzahlen 5 Tage nach der Bestrahlung von Primärkulturen

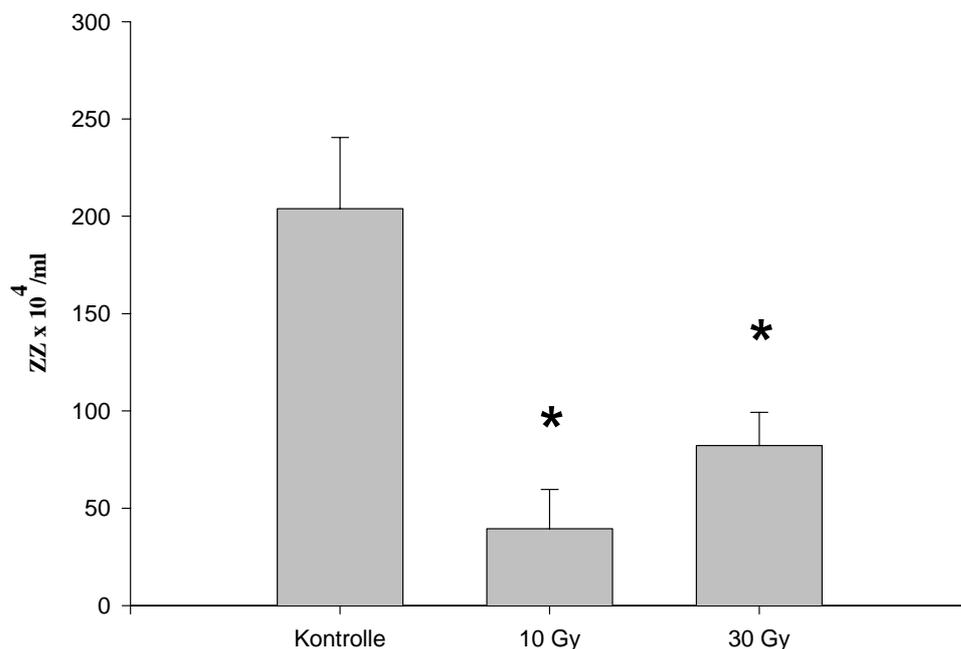


Abbildung 11 zeigt die Zellzahlen pro ml der Primärkulturen 5 Tage nach Bestrahlung. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Bestrahlungs-Gruppen aufgetragen, die Y-Achse zeigt die Zellzahl x 10⁴/ml. Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler aus je 10 Kulturen pro Versuchsgruppe angegeben. Die Zellzahl der Kontrolle war im Vergleich zu 10 und 30 Gy signifikant höher ($P < 0,01$; * = signifikant).

3.7 Zellzahlen nach der Bestrahlung der BEAS-2B Zelllinie

Zellzahlen von BEAS 2B Kulturen im Verlauf nach Bestrahlung

Bei initial weitgehend identischen Zellzahlen zeigte sich in den ionisierten Gruppen nach dem 2. post-Bestrahlungs-Tag ein deutlicher Zellverlust, wogegen in der Kontrollgruppe ein ausgeprägtes Zellwachstum zu beobachten war ($P < 0,001$). Innerhalb der bestrahlten Gruppen war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellzahlen zu verzeichnen (Abb. 12).

Abbildung 12: Zellzahlen von BEAS-2B im Verlauf über 5 Tage nach Bestrahlung

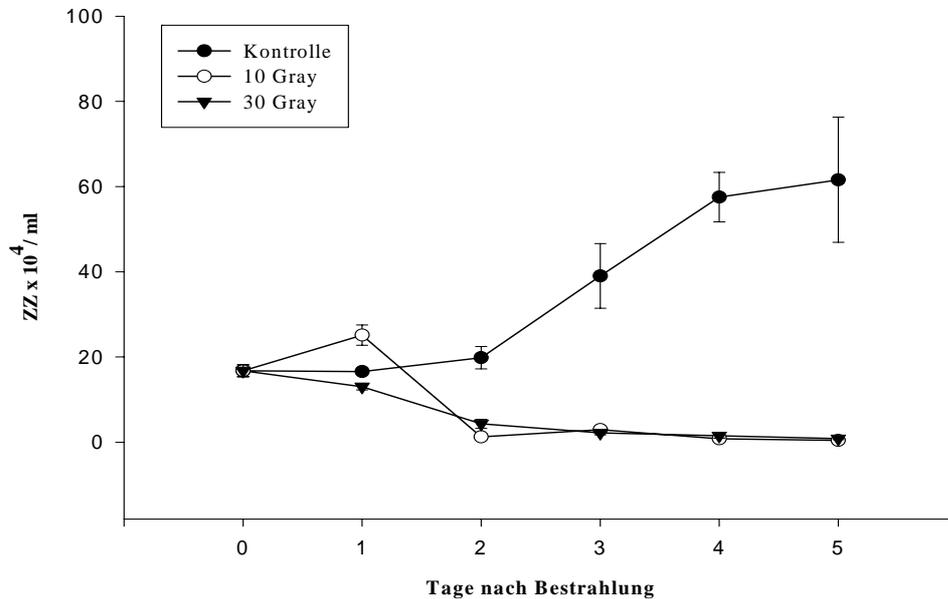


Abbildung 12 zeigt die Zellkonzentrationen vor Bestrahlung bis zu 5 Tage nach Bestrahlung. Auf der X-Achse sind die Tage nach Bestrahlung aufgezeichnet, auf der Y-Achse die Zellzahl x 10⁴/ml. Die ausgefüllten Kreise stellen die unbestrahlte Kontrollgruppe dar, nicht ausgefüllte Kreise bzw. ausgefüllte Dreiecke stellen die mit 10 bzw. 30 Gy bestrahlten Gruppen dar. Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler aus je 6 Kulturen angegeben. Von Tag 0 zu Tag 3 nach Bestrahlung zeigte sich eine signifikante Zunahme der Zellzahl in der Kontrollgruppe ($P < 0,001$)

Um die Vergleichbarkeit mit den Zellzahlen bei Organkulturen und Primärkulturen zu ermöglichen, werden die Zellzahlen bei BEAS 2B-Zellen getrennt für den 4. Tag nach Bestrahlung dargestellt. Es zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der Zellzahl der unbestrahlten Kontrollgruppe und den beiden bestrahlten Zellpopulationen ($P < 0,001$).

Zwischen der mit 10 und 30 Gy bestrahlten Gruppe fand sich 4 Tage nach dem Bestrahlungszeitpunkt kein signifikanter Unterschied bezüglich der Zellzahl (Abb. 13).

Abbildung 13: Zellzahlen 4 Tage nach der Bestrahlung von BEAS-2B Kulturen

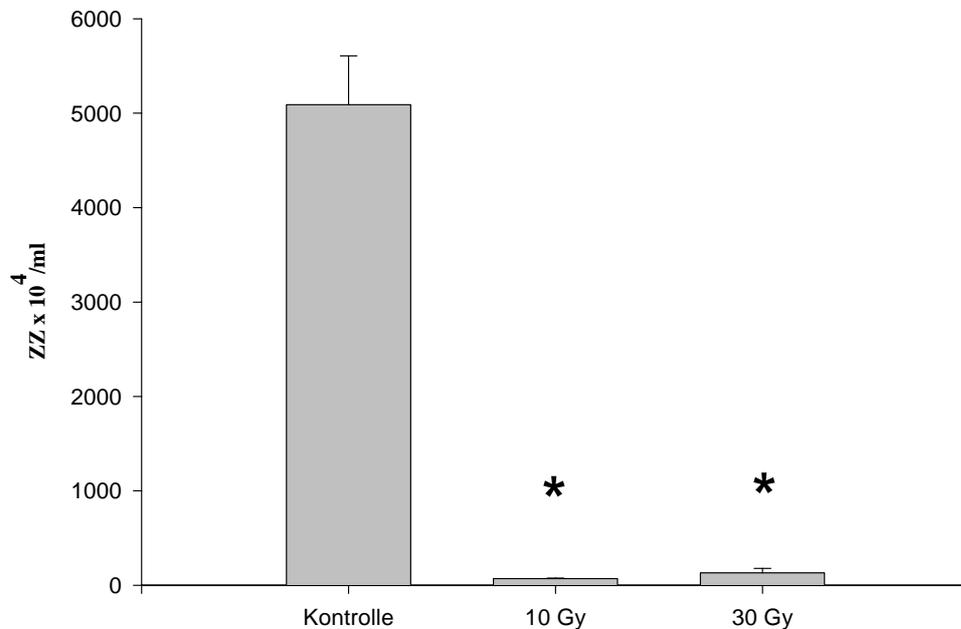


Abbildung 13 zeigt die Zellkonzentration der BEAS-2B Zelllinie 4 Tage nach der Bestrahlung. Auf der X-Achse sind die jeweiligen Gruppen entsprechend der Strahlendosen aufgetragen, die Y-Achse zeigt die Zellzahl x 10⁴/ml. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (n=6) angegeben. Die Zellzahl der Kontrolle war im Vergleich zu 10 und 30 Gy signifikant höher ($P < 0,001$; * = signifikant).

Bei Berechnung der LDH in Abhängigkeit von der Zellzahl zeigte sich, dass die LDH-Aktivität der einzelnen Zellen in den bestrahlten Gruppen 2 Tage nach der Bestrahlung anstieg und auch im Verlauf deutlich weiter zunahm, wogegen es in der Kontrollgruppe eher zu einem leichten Abfall der LDH-Aktivität über die 5 Tage hinweg kam (Abb. 14).

Abbildung 14: LDH pro BEAS-2B Zelle im Verlauf über 5 Tage nach Bestrahlung

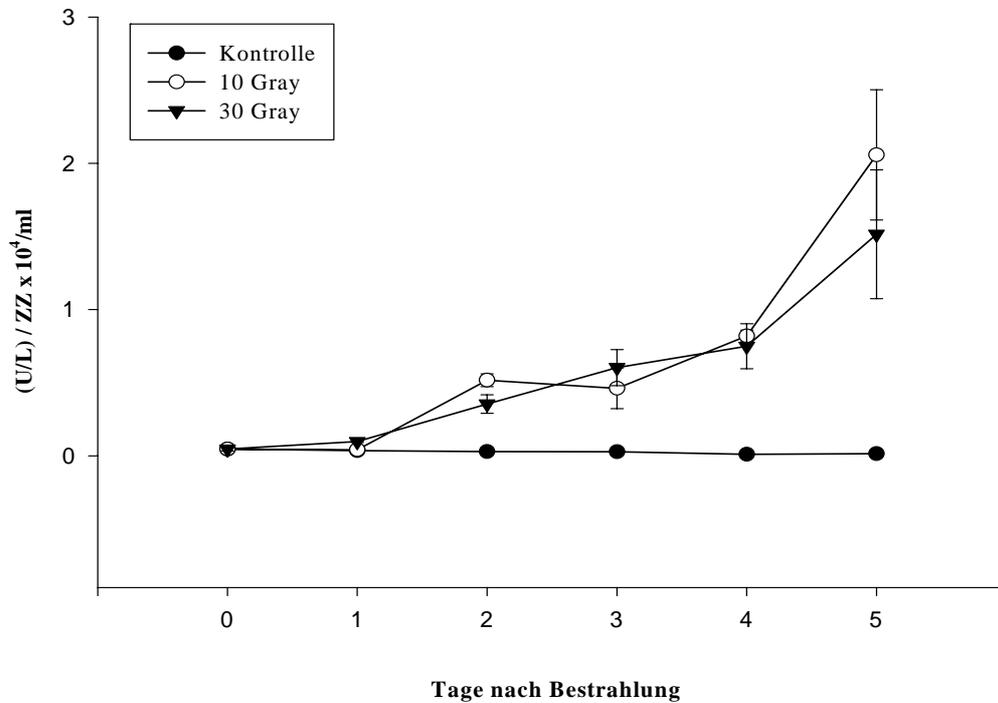


Abbildung 14 zeigt die LDH-Aktivität pro BEAS 2B-Zelle vor Bestrahlung bis zu 5 Tage nach Bestrahlung. Auf der X-Achse sind die Tage nach Bestrahlung aufgezeichnet, auf der Y-Achse die LDH-Aktivität (U/l)/Zellzahl x 10⁴/ml. Die ausgefüllten Kreise stellen die unbestrahlte Kontrollgruppe dar, die nicht ausgefüllten Kreise bzw. die ausgefüllten Dreiecke stellen die mit 10 bzw. 30 Gy bestrahlten Gruppen dar. Alle Werte sind als Mittelwerte ± Standardfehler angegeben (Zahl je Gruppe n=6).

3.8 Zellzahlen nach der Bestrahlung von EPLC- Tumorzellen

Nach der Bestrahlung zeigte sich im Tumorzell-Modell 4 Tage nach dem Bestrahlungszeitpunkt eine signifikant niedrigere Zellkonzentration in den strahlen- ausgesetzten Gruppen verglichen mit den nicht-bestrahlten Kulturen ($P < 0,001$, Abb. 15). Auch war ein größerer, allerdings nicht signifikanter Zellverlust unter der höheren 30 Gy Dosis zu beobachten.

Abbildung 15: Zellzahlen 4 Tage nach der Bestrahlung der Tumorzellen

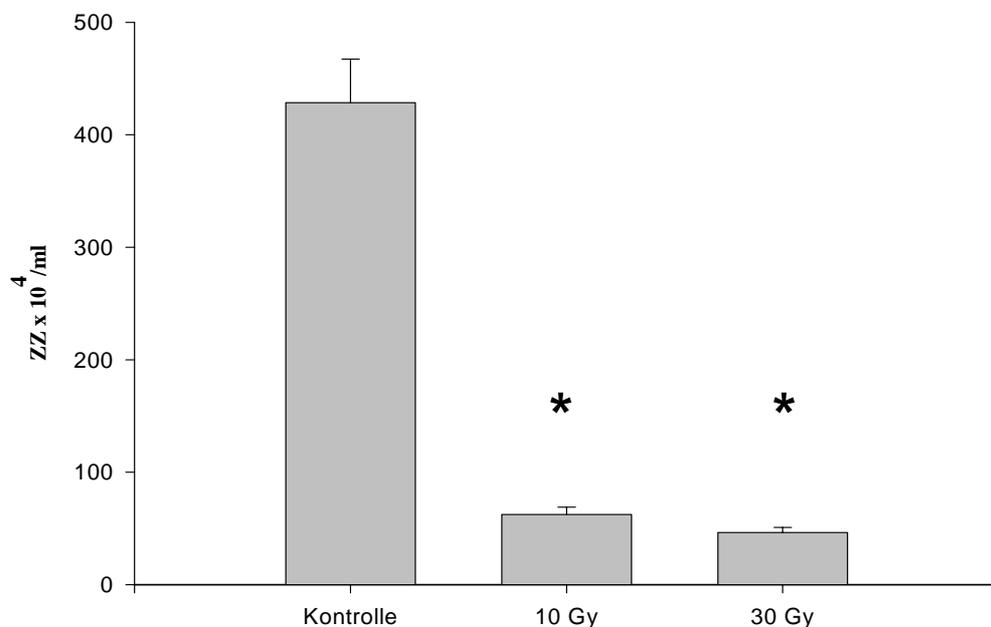


Abbildung 15 zeigt die Zellzahlen der EPLC-32M1- Tumorzelllinie 4 Tage nach Bestrahlung. Auf der X-Achse sind die Kontroll- sowie die mit 10 und 30 Gray bestrahlten Gruppen aufgetragen, die Y-Achse zeigt die Zellzahl x 10⁴/ml. Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardfehler angegeben (n=6). Die Zellzahl der Kontrolle war im Vergleich zu den mit 10 und 30 Gy bestrahlten Gruppen signifikant höher ($P < 0,001$; * = signifikant).

3.9 Zellzahlen aller bestrahlten Zellkulturmodelle im Vergleich

Im Vergleich der verbleibenden Zellen aller Kulturformen fand sich im Organkulturmodell 4 Tage nach Bestrahlung eine nahezu unveränderte Zellzahl, wogegen in allen übrigen Kultivierungsformen ein deutlicher Zellverlust ($P < 0,01$) zu verzeichnen war (Abb. 16). Den zweit-geringsten Zellverlust erlitten die Primärkulturen gefolgt von den EPLC-32M1 und den BEAS-2B Zelllinien.

Abbildung 16: Verbleibende Zellen aller Kulturmodelle nach Bestrahlung

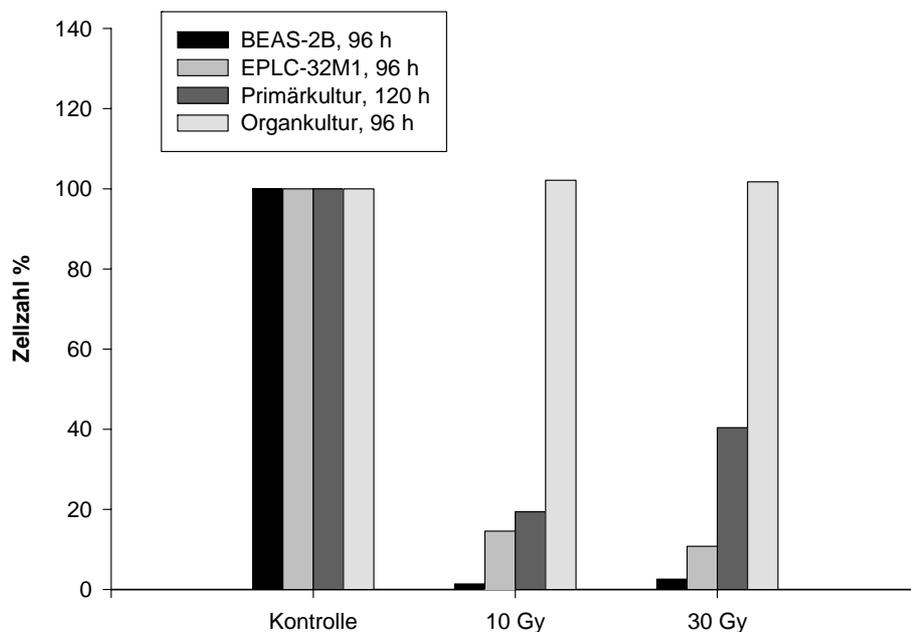


Abbildung 16 zeigt den Anteil verbleibender Zellen in den einzelnen Kultivierungsformen 96-120 Stunden nach Bestrahlung verglichen mit den unbestrahlten Kontrollgruppen in Prozent. Die Zellzahl der Kontrollgruppen wurde als 100% definiert. Auf der X-Achse sind die einzelnen Bestrahlungsdosen aufgezeichnet, auf der Y-Achse befindet sich die prozentuelle Zellzahl im Vergleich zu den Kontrollen. Als schwarze Balken sind die BEAS-2B Kulturen, als mittel- bzw. dunkelgraue Säulen die Tumorzelllinie und die Primärkulturen dargestellt, hellgrau steht für die Organkulturen. Zellzahl nach Bestrahlung im BEAS-2B, Primärkultur und EPLC-32M1-Modell signifikant vermindert ($P < 0,01$).

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Materialien und Methoden

4.1.1 Dreidimensionale Organkulturen

Im Gegensatz zu den weitverbreiteten Monolayer-Zellkulturen stellen die dreidimensionalen Organkulturen eine alternative Kultivierungsform dar, in welcher in unseren Augen die *in vivo*-Situation besser abgebildet wird. Erste Modelle der dreidimensionalen Kultivierung respiratorischen Epithels wurden in den 90er Jahren von Steinsvag und Mitarbeitern etabliert (Steinsvag S.K. et al. 1991). Initial wurde menschliche Tonsillenschleimhaut kultiviert, später erfolgte auch die Kultivierung humaner Bronchialschleimhaut. Neben den zum Teil Zilien tragenden Epithelzellen finden sich hier im Gegensatz zu herkömmlichen Monolayer-Kultursystemen auch eine Basalmembran sowie ein bindegewebiger Kern mit vereinzelt mesenchymalen Zellen und Kollagenfasern. 1993 wurde die Methode der dreidimensionalen Kultivierung von menschlichem respiratorischen Epithel in der Medizinischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München modifiziert (Gamarra F. et al. 1993, Bals R. et al. 1998). Das entwickelte Modell wurde zwischenzeitlich in verschiedenen Projekten verwandt und ist recht genau charakterisiert. So kommt es nach 1-3 Wochen Kultivierung zu einer vollständigen Bedeckung der Gewebestücke mit einem differenzierten Epithel aus sekretorischen Zellen, zilierten Zellen, wie auch Basal-Zellen, welches nach morphologischen Kriterien dem normalen humanen Bronchialepithel entspricht. Im weiteren Verlauf ist eine Verminderung der Anzahl insbesondere zilientragender Zellen zu beobachten, bis es letztlich nach ca. 10 Wochen zu einer Degeneration des respiratorischen Epithels zu Plattenepithel kommt (Bals R. et al. 1998).

Vorteile des dreidimensionalen Organkulturmodells gegenüber zweidimensionalen Kulturmodellen:

- Große Nähe zur *in vivo*-Situation durch die komplexe Architektur mit dem bindegewebigen Kern, welcher von einer Basalmembran und differenziertem Bronchialepithel bedeckt ist.
- Besserer Zell-Zell-Kontakt über verschiedene physiologische Verbindungen wie tight- und gap-junctions und den zusätzlichen Kontakt der Bronchialepithelzellen mit der Basalmembran.
- Höhere Stabilität der Kulturen mit längerer Lebensdauer und deutlich späterer Dedifferenzierung des Epithels als in der Monolayer-Kultur.
- Möglichkeit der Ko-Kultivierung mit Tumorzellen zum Beispiel zur Erforschung der Tumorinvasion oder Effekten von ionisierenden Strahlen.

Nachteile des dreidimensionalen Organkulturmodells gegenüber zweidimensionalen Kulturmodellen:

- Womöglich Einfluss auf die Versuchsergebnisse durch „patienten-eigene“-Charakteristika, welche eine Generalisierung der Ergebnisse unzuverlässig machen.
(So schien es bei Bronchuspräparat-Material von Rauchern zu einem geringeren Zilienbesatz zu kommen.)
- Unterschiedliche Größe, unterschiedliche Zellzahl und Präsenz der verschiedenen Zelltypen führen zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit.
- Das Vorhandensein verschiedener Komponenten in der Organkultur wie Bronchialepithel, Stroma, Basalmembran erschwert die Zuordnung möglicher Effekte zu einer Kulturkomponente.

Die Organkulturen wurden in verschiedenen Testreihen untersucht und verwandt. Gerade im Anfangsstadium erfolgten viele Untersuchungen zur näheren Charakterisierung der Organkulturen. So zeigten Licht- und Raster-/Elektronenmikroskopische Untersuchungen den oben geschilderten Aufbau der Zellkulturen. Die Kulturen wurden hier bis zu einem Zeitraum von 54 Tagen regelmäßig begutachtet und hinsichtlich ihrer Zusammensetzung untersucht. Die ziliäre Schlagfrequenz zeigte sich vergleichbar mit der *in vivo*-Situation (Bals R. et al. 1998, Gamarra F. et al. 1995). Auch wurden der Zilienschlag und die Vitalität der Organkulturen nach Kryokonservierung näher untersucht, wobei sich eine gute Vitalität und Funktion der Bronchialepithelzellen nach Kryokonservierung vergleichbar mit den Eigenschaften der Kontrollgruppen fand (Gamarra F. et al. 1996/a). Versuche zur Proliferation durch Reize wie mechanische Schädigung des Epithels durch Zerschneiden der Kulturen oder eine Kultivierung in serumfreien Medium für 48 Stunden konnten zeigen, dass die dreidimensionalen Organkulturen ähnliche proliferative Eigenschaften wie die Bronchialschleimhaut *in vivo* aufweist (Gamarra F. et al. 1996/b, Thein F. et al. 1996). Nach Inkubation von Organkulturen mit Substance P zeigten sich die Kulturen stabil und reagierten nicht mit einer relevanten Steigerung der Proliferationsrate (Bergner A. et al. 1997). Versuche nach Applikation von 5-Aminolävulinsäure als Photosensibilisator zeigten eine Aufnahme der Substanz sowie eine daraufhin einsetzende Bildung von Protoporphyrin IX. (Gamarra F. et al. 1995,2002, Grundler S. et al. 1994). Eine weitere Möglichkeit bietet sich in der Anwendung als Ko-Kultur-Modell mit verschiedenen Tumorzelllinien, die es unter anderem ermöglichte, die Tumordinvasion ins Normalgewebe zu untersuchen (Al Batran S. et al. 1997, 1998). Auch Untersuchungen zur Wirkung ionisierender Strahlen auf Bronchialschleimhaut erfolgten bereits. Hier wurden insbesondere die Vitalität und das morphologische Verhalten der Organkulturen nach Bestrahlung untersucht, wobei sich eine hohe Strahlentoleranz von normalem Bronchialepithel zeigte (Kotsianos D. et al. 2000). Die LDH als Parameter für Zellläsionen im Organkultur-Modell wurde nach thermischer Schädigung (Hyperthermie von

47 °C) verwandt und zeigte hier eine gute Anwendbarkeit als Parameter für eine Zellschädigung im Organkulturmodell (Bergner A. et al. 1999, 2000).

Somit stellt die dreidimensionale Organkultur ein *in vivo*-nahes, stabiles Kultivierungsmodell dar.

4.1.2 Primärkulturen aus Patientenmaterial

Um Kulturmodelle zu erhalten, welche eine *in vivo*-nahe Situation bezüglich der Struktur und Funktionalität, insbesondere der mukoziliären Clearance des respiratorischen Epithels darstellen, wurden diverse Modelle mit ihren Vor- und Nachteilen entwickelt (Jorissen M. et al. 1991). Frühe Modelle einer Kultivierung zweidimensionaler Primärkulturen aus menschlicher Bronchialschleimhaut wurden 1981/1982 von Lechner und Mitarbeitern beschrieben (Lechner J.F. et al. 1981,1982). Hier zeigte sich vor allem eine temporäre Co-Kultivierung mit Mäuse-Fibroblasten sinnvoll. Insgesamt stehen zwei Hauptmethoden der Primärkultivierung zur Verfügung (Lechner 1981,1982, de Jong P.M. et al. 1993). Bei einer Methode werden Zellsuspensionen zum Beispiel aus Bürstenabstrichen in Kultur verbracht (Kelsen S.G. et al. 1992, Galiotta L.J.V. et al. 1998), bei dem anderen Verfahren werden Gewebestücke (Explantate), die unter anderem bei Biopsien gewonnen wurden, auf Kulturplatten aufgebracht und ein Aussprossen von Bronchialepithelzellen abgewartet (de Jong P.M. et al. 1993, Dirksen E.R. et al. 1995, Sanderson M.J. and Sleight M. 1981). Hier wurde eine Modifikation des Explantat-Modelles vorgenommen, indem die unten beschriebenen Organkulturen auf Kollagen beschichtete Platten aufgebracht wurden und ein Aussprossen der Bronchialepithelzellen abgewartet wurde. Eigene Versuche mit Zellsuspensionen zeigten eine größere Anfälligkeit der Kulturen gegenüber bakteriellen Infektionen, auch war nur ein sehr zögerliches Anwachsen auf den kollagen-beschichteten Platten zu beobachten, weswegen dem anderen Verfahren der Vorzug gegeben wurde. 6-10 Tage nach Aufbringen der Organkulturen war ein deutlicher Zellrasen von aussprossendem

Bronchialepithel zu beobachten, hier wurde die Organkultur entfernt. Nach Entfernung fand sich in der Regel kein weiteres mikroskopisch sichtbares Wachstum der Primärkulturen. Auch fanden sich nur vereinzelt zilienträgende Zellen, deren Anzahl im Verlauf zusätzlich deutlich abnahm, was auf den fehlenden Kontakt des Zellrasens mit Luft zurückzuführen sein kann. Eine Durchsetzung mit Fibroblasten, wie häufig in der Literatur beschrieben, konnte nur in sehr seltenen Fällen beobachtet werden, die entsprechenden Primärkulturen wurden verworfen.

Vorteile der Primärkultur:

- kein genetisch verändertes Kulturmaterial im Vergleich zu Viren transfizierten Zelllinien.
- Höherer Differenzierungsgrad als in konventionellen Bronchialepithelzelllinien.

Nachteile der Primärkultur:

- Erschwerte Kultivierung mit langsamem Wachstum bei nur geringer Differenzierung des Epithels bei fehlender Luftexposition.
- Bei Verwendung insgesamt älteres Zellmaterial als in der dreidimensionalen Organkultur und kürzere Lebensdauer der Kulturen.
- Unterschiedliche Größe und Zellzahlen der einzelnen Primärkulturen erschweren die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse.
- Im Vergleich zu dem dreidimensionalen Modell geringerer Zell-Zell-Kontakt.

4.1.3 BEAS-2B Zelllinie

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um eine immortalisierte humane bronchoepitheliale Zelllinie (BEAS-2B), die mit einem Adenovirus 12-SV40 Virus-Hybrid infiziert und geklont

wurde. Zur Verfügung gestellt wurden uns die Zellen freundlicherweise von Prof. Dr. A. Gillissen, Pneumologie, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität. Ursprünglich entwickelt wurde die Zelllinie von Reddel und Mitarbeitern, Bethesda, USA (Reddel R.R. et al. 1985,1988). Das verwandte bronchiale Gewebe stammte von lungengesunden Verstorbenen und wurde im Rahmen von Autopsien gewonnen. Die Zellen zeigten nach Injektion in Nacktmäuse keine kanzerogene Wirkung (Reddel R.R. et al. 1988). In der von uns verwandten Zelllinie sind Keratine und SV40T-Antigen nachweisbar. Auch sind die Zellen wie normales Bronchialepithel nach Exposition mit TGF- β 1 oder fetalem Rinderserum in der Lage, squamös zu differenzieren (Ke Y et al. 1988). Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 (CD54), LFA-3 (CD58) (Bloemen P.G. et al. 1993) oder Chemokine (Fujisawa T. et al. 2000, Yoshida N. et al. 2001) können von BEAS-2B Zellen gebildet werden. Von Kinnula und Mitarbeitern wurde eine mit Normalepithel vergleichbare Aktivität antioxidativer Enzyme wie Katalase und Glutathion-Reduktase in BEAS-2B-Zellen nachgewiesen (Kinnula V.L. et al. 1994). Untersuchungen der Chromosomensätze von BEAS-2B-Zellen zeigten einen aneuploiden Chromosomensatz mit charakteristischen Abnormalitäten SV40 transformierter Zellen (Reddel R.R. et al. 1988). Spätere Versuche von Ohnuki zeigten mit zunehmender Passagehäufigkeit, welche für die Immortalisation erforderlich ist, das Auftreten bestimmter chromosomaler Abnormalitäten und den Verlust einiger homologer Chromosomen; mit zunehmender Passage-Zahl waren immer mehr Zellen betroffen, nun zeigten die Zellen auch eine leichte kanzerogene Wirkung (Ohnuki Y. et al. 1996).

Vorteile der BEAS-2B Zelllinie:

- Bessere Charakterisierung und Reproduzierbarkeit als bei Primär- oder dreidimensionalen Organkulturen.
- Schnelles Wachstum der Monolayer-Kulturen bei weniger aufwendiger Kultivierung.

Nachteile der BEAS-2B Zelllinie:

- Genetisch verändertes Material mit möglicher kanzerogener Wirkung
- Im Vergleich zur dreidimensionalen Organkultur geringere Zelldifferenzierung
- Geringerer Zell-Zell-Kontakt als im dreidimensionalen Kulturmodell

4.1.4 EPLC-32M1 Tumorzelllinie

Bei der EPLC 32M1- (Epidermoid Lung Cancer) Zelllinie handelt es sich um eine adhären wachsende squamöse Karzinom-Zelllinie, die 1988 in Marburg aus der Lymphknotenmetastase eines Plattenepithelzellkarzinomes der Lunge etabliert wurde und uns freundlicherweise von Dr. G. Jaques, Philipps Universität, Marburg zur Verfügung gestellt wurde. Die Zelllinie weist eine Verdoppelungsrate von 16 Stunden auf und bildet ca. 512 Kolonien pro 10.000 Zellen. Insgesamt findet sich nur noch eine geringe Ähnlichkeit mit dem verwandten Primärtumor. In verschiedenen Untersuchungen der Zelllinie konnte das Vorhandensein von humanem Choriongonadotropin (HCG), sowie von Rezeptoren mit hoher Bindungsaffinität für den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) und Glucocorticoid-Rezeptoren nachgewiesen werden (Bepler G. et al. 1988, Hofmann J. et al. 1995). Spätere Versuche zeigten eine latente Ausschüttung von Pro-Cathepsin L, einem Vorläufer eines lysosomalen Cystein-Proteins, welches an der Zerstörung der extrazellulären Matrix beteiligt sein soll und hierdurch die Tumorausbreitung begünstigt (Heidtmann H.H. et al. 1993). Von unserer Arbeitsgruppe wurden die EPLC 32M1-Zellen zum Beispiel auf die Aufnahme von 5-Aminolävulinsäure als Photosensibilisator hin untersucht, hier zeigten die Tumorzellen einen signifikanten Anstieg der Fluoreszenz-Intensität verglichen mit Normalgewebe. (Gamarra F. et al. 2002, 2004). Anhand der Fluoreszenz-Untersuchungen konnte eine bessere Differenzierung zwischen Tumorzellen und normalem Bronchialepithel im Ko-Kultur-Modell erfolgen. Auch das Invasionsverhalten der EPLC-32M1 Linie wurde in verschiedenen Regimen untersucht (Al-Batran S. et al. 1997).

Vorteile der EPLC-32M1 Zelllinie:

- Gut charakterisierte Zelllinie, mit definierten Zellzahlen der gleichen Population.
- Schnelles Wachstum der Monolayer-Kulturen bei weniger aufwendiger Kultivierung.

Nachteile der EPLC-32M1 Zelllinie:

- schlechte Vergleichbarkeit mit tumorösem Gewebe im Patienten wegen veränderten Eigenschaften durch Herstellung mit nur noch wenig Gemeinsamkeit zum Primärtumor. Schlechte Übertragbarkeit der Ergebnisse.
- Wie in den übrigen Monolayer-Kulturen geringerer Zell-Zell-Kontakt verglichen mit dreidimensionaler Kultivierung.

4.1.5 Diskussion der Gewinnung und Kultivierung der Bronchialschleimhaut

Im Vergleich zu den meisten früheren Versuchsreihen wurde in dieser Arbeit kein bioptisch gewonnenes Material, sondern Schleimhaut von Operationspräparaten verwandt, was eine größere Anzahl an Kulturen ermöglichte. Mögliche Nachteile können in dem längeren Transportweg und möglichen Epithelschäden aufgrund des damit verbundenen Sauerstoff- und Nährstoff-Mangels liegen. Allerdings wurden die Gewebeproben spätestens innerhalb von 3 Stunden komplett verarbeitet, eine visuelle Kontrolle nach der Aufarbeitung zeigte eine gute ziliäre Funktion des Epithels. Frühere Versuche unserer Arbeitsgruppe zeigten bis 6 Stunden eine ausreichende Vitalität des respiratorischen Epithels. Ein möglicher Tumorbefall, wengleich lichtmikroskopisch keine verdächtigen Zellen bemerkt und makroskopisch tumorfreies Gewebe selektiert wurde, kann trotzdem nicht sicher ausgeschlossen werden. Auch zeigte sich das gewonnene Operations-Material zum Teil recht unterschiedlich, was die Größe der Bronchialringe und die Schleimhautqualität betraf. So reichte der Durchmesser der Bronchialringe von 0,5-1,5 cm, was Lappen- beziehungsweise Segmentbronchien entspricht.

Die unterschiedliche Lokalisation im Bronchialbaum impliziert eine leicht unterschiedliche Zusammensetzung des Epithels. Bezüglich der Qualität der Schleimhaut war bei lichtmikroskopischer Betrachtung bei einigen Präparaten von vorneherein nur ein geringer Zilienbesatz auszumachen. Oft war dies in Gewebematerial von langjährigen Rauchern zu bemerken. Trotz mikroskopischer Begutachtung können mögliche entzündliche Veränderungen oder Epithelveränderungen wie Dysplasien oder Metaplasien im Gewebe vorhanden sein, nachdem es sich in der Regel meist um Bronchus-Gewebe von Patienten mit Bronchialkarzinomen handelt, welche im kurativen Ansatz operiert wurden. Die Verwendung der Bronchialringe ermöglichte eine große Kulturausbeute, allerdings geht hier das Material von deutlich weniger Patienten ein, als bei Biopsien, was eine Generalisierung und Übertragbarkeit der Ergebnisse erschwert. Von den Kultivierungsbedingungen her sind die Organkulturen gut charakterisiert, so dass die Bedingungen und der Bestrahlungszeitpunkt recht gut festgelegt werden konnten. Problematisch war, dass das verwandte Material ein zum Teil unterschiedliches Wachstumsverhalten aufwies, so waren einige Kulturen schon nach 4 Tagen komplett von respiratorischem Epithel umgeben, andere benötigten deutlich länger bis zur vollständigen Epithelialisierung (bis zu 12 Tage), was zu einem gewissen Altersunterschied der Kulturen führte. Um die Einflüsse gering zu halten, wurde versucht eine möglichst große Kulturanzahl zu verwenden, auch wurden für die Auswertung Mittelwerte gebildet.

4.1.6 Diskussion der Gewinnung und Kultivierung der Primärkulturen

Für die Gewinnung der Bronchialschleimhaut spielen dieselben Faktoren eine Rolle wie für die dreidimensionalen Organkulturen, nachdem diese für die Anzucht der Primärkulturen verwandt wurden. Insgesamt ist anzumerken, dass es von unserer Arbeitsgruppe keine Vorarbeiten mit zweidimensionalen Primärkulturen gab, es sich hier also um ein Kulturmodell handelt, zu dem es kein bewährtes Kultivierungsprogramm gab. Die ersten

Versuche, Zellsuspensionen von frischen Operationspräparaten zu gewinnen, scheiterten an der fehlenden Adhäsion der Zellen an dem Kollagen-bedeckten Wellboden, auch fand sich bei der Verwendung einer Zellsuspension eine vermehrte Anfälligkeit gegenüber einer bakteriellen Besiedlung. Auch der Gebrauch von Zellsuspensionen nach Herauslösen der Zellen aus dreidimensionalen Organkulturen war aus ähnlichen Gründen nicht sinnvoll. Letztlich zeigte sich das beste Wachstum bei geringer Infektanfälligkeit nach dem Aufbringen von Organkulturen auf kollagenbeschichtete Wells. Hier fand nach Entfernung der Organkultur mikroskopisch betrachtet keine relevante Zellvermehrung mehr statt, wogegen in den anderen Kulturformen wie der BEAS-2B Zelllinie stets ein Wachstum zu verzeichnen war. Problematisch zeigte sich auch das Ablösen der Zellen am Ende der Bestrahlungsreihe, hier waren Versuche mit Kollagenase, Trypsin, Protease wenig erfolgreich, am besten ablösbar waren die Zellen mit EDTA, auch hier waren aber lange Inkubationszeiten und zum Teil sogar die Verwendung eines Zellschabers erforderlich.

4.1.7 Diskussion der Kultivierung der BEAS-2B und der EPLC-32M1- Zelllinie

Nachdem es sich um immortalisierte, handelsübliche Zelllinien handelte, bei denen die besten Kultivierungsbedingungen bekannt waren, war die Kultivierung der beiden Zelllinien recht unproblematisch. Was allerdings auffiel war, dass beide Zelllinien nach Erreichen der Konfluenz dazu neigten, mehrere Zelllagen zu bilden, was vor allem nach Bestrahlung in der unbestrahlten Kontrollgruppe der Fall war. Es wurde aber darauf geachtet, lediglich einschichtige Kulturen zu bestrahlen. Für die BEAS-2B Zellen ist auch bekannt, dass es bei Konfluenz leicht zu einer squamösen Differenzierung kommt. Ein Einfluss auf die Ergebnisse durch eventuelle Umdifferenzierungsvorgänge ist nicht ganz auszuschließen.

4.1.8 Diskussion des Bestrahlungsvorganges

Eine vermehrte LDH-Freisetzung ist in der Regel mit Zellläsionen verbunden, so kann zum Beispiel schon das Umsetzen der dreidimensionalen Organkulturen auf eine andere

Kulturplatte zu einer gesteigerten LDH-Freisetzung führen. Um den Einfluss solcher Vorgänge möglichst gering zu halten, wurden die Organkulturen 3 Tage vor Bestrahlung auf neue Kulturschalen verbracht. Hier wurden die Kulturen auf Petri-Perm Schalen umgesetzt, welche eine agarfreie Kultivierung ohne Zelladhäsion am Boden ermöglichen um Wechselwirkungen mit Inhaltsstoffen des Agars auf die LDH-Aktivität auszuschließen. Auch sind mögliche Einflüsse einer Kultivierung mit Agar auf die Strahlensensitivität von Organkulturen beschrieben (Deschavanne P.J. and Fertil B. 1996). Transportbedingte Zellläsionen mit einer damit verbundenen LDH-Freisetzung lassen sich nicht sicher ausschließen, um hier vergleichbare Bedingungen zu schaffen, wurden alle Kulturen einschließlich der Kontrollgruppen in einer Styroporbox in die Bestrahlungseinheit gebracht. Allenfalls das Umschichten der bestrahlten Kulturen auf die Auflage und die Positionierung ins Strahlenfeld können eine Mehrbelastung der bestrahlten Gruppen bedingen, allerdings wurde hier auch auf ein möglichst erschütterungsfreies Umstellen geachtet. Die Bestrahlung selbst wurde mit einem Linearbeschleuniger für Elektronen (Sli 15, Elekta, Hamburg, Deutschland) durchgeführt, einem verbreiteten Gerät in der Strahlentherapie. Im Linearbeschleuniger werden Elektronen auf Energien bis zu ca. 15 MeV (Millionen Elektronenvolt) beschleunigt. Nach Auftreffen auf ein Ziel kann diese Energie in Photonenstrahlung umgewandelt werden. Ein medizinischer Bestrahlungskopf an den Geräten sorgt für ein kollimiertes, geglättetes Strahlungsfeld. Die Kulturen wurden gleichmäßig im Bestrahlungsfeld verteilt, um eine möglichst homogene Bestrahlung zu ermöglichen. Um interindividuelle Faktoren möglichst gering zu halten wurden pro Versuchsreihe nur Organkulturen von einem Patienten hergenommen, auch wurde jeweils die gleiche Anzahl von Kulturen je Dosis verwandt. Insgesamt wurden 108 BEAS-2B Kulturen, 30 Primärkulturen, 120 Organkulturen sowie 18 EPLC-Tumorzell-Kulturen untersucht. Obwohl die Zahl der bestrahlten Kulturen in den einzelnen Gruppen abweicht, ist eine Vergleich durchaus möglich, nachdem es sich bei den BEAS-2B und EPLC Zelllinien um gut

charakterisierte Zellen mit weitgehend definierter Zellzahl pro Well beziehungsweise Kulturflasche handelt und hier Größe der Kultur oder Epithelqualität sowie individuelle Faktoren keine relevante Rolle spielen. Bezüglich der Primärkulturen ist anzumerken, dass die Kultivierung hier recht schwierig war, weswegen eine höhere Versuchszahl nicht erreicht werden konnte. Die Kultivierungsbedingungen (Temperatur, CO₂, Luftfeuchtigkeit) nach der Bestrahlung waren für alle Kulturformen identisch.

4.1.9 Diskussion der Lactatdehydrogenase-Bestimmung

Die Bestimmung der LDH als Parameter für Zellläsionen und Zelluntergang wird seit Jahrzehnten erfolgreich in der klinischen Medizin eingesetzt. Hier wurde zur Bestimmung ein handelsübliches Verfahren der Serumchemie mittels einer quantitativen LDH-Bestimmung mit klinisch-chemischen Analyseautomaten nach standardisierter Methode verwandt. Die Zugabe von Puffer, Pyruvat sowie von NADH führt in Anwesenheit von LDH zu der Umwandlung von Pyruvat + NADH + H⁺ zu Lactat + NAD⁺. Im Rahmen dieser Umwandlung wird NADH zu NAD oxidiert. Die Geschwindigkeit der NADH Abnahme wird photometrisch bestimmt und ist direkt proportional zur LDH- Konzentration. Im klinischen Gebrauch gibt es zahlreiche Beispiele für den Einsatz der Lactatdehydrogenase-Messung. Bei Tumor-Erkrankungen sind fortgeschrittenere Stadien oft mit einer erhöhten LDH-Aktivität assoziiert (Byhardt R.W. et al. 1986). Auch kann das Verfahren als Therapiekontrolle maligner Erkrankungen dienen, zum Beispiel wird unter dem Einsatz zytotoxischer Substanzen im Rahmen einer Chemotherapie gehäuft ein LDH-Abfall beobachtet. So fanden Kyrz-Krzemien und Mitarbeiter bei Patienten mit Multiplem Myelom unter Thalidomid-Monotherapie einen Lactatdehydrogenase-Abfall in der Gruppe der Therapie-Responder (Kyrz-Krzemien S. et al. 2003). Geeignet ist die LDH auch als prognostischer Parameter bei verschiedensten Malignomen (Velasquez W.S. et al. 1991, Lutterbach J. et al. 2003, Gordan L.N. et al. 2003). Untersuchungen an Patienten mit kleinzelligem Bronchialkarzinom fanden

unter anderem ein verminderte Überlebenszeit und eine kürzere Remissionsdauer bei Patienten, die schon prä-therapeutisch einen erhöhten LDH- Spiegel aufwiesen (Byhardt R.W. et al. 1986). Ähnliches war auch bei Patienten mit nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen zu beobachten (O'Connell J.P. et al. 1986, Carles J. et al. 1993, Kodaira T. et al. 1998). Es gibt aber auch Hinweise darauf, dass die Lactatdehydrogenase zur Früherkennung interstitieller Lungenschäden als Folge einer Chemotherapie oder Strahlentherapie geeignet sein kann (Ishioka S. 1997). Auch bei *in vitro*-Versuchen an verschiedenen Zelllinien konnte die Lactatdehydrogenase der Detektion von Zellschäden und zum indirekten Nachweis der Lebensfähigkeit von Zellkulturen dienen (Racher A.J. et al. 1990, Goergen J.L. et al. 1993). So wurden zum Beispiel Untersuchungen zur LDH-Freisetzung nach Gabe zytotoxischer Substanzen in unterschiedlichen Dosierungen durchgeführt. Nach 6 stündiger Taxol-Exposition war im Medium von V79 Zellkulturen aus dem Lungengewebe Chinesischer Hamster ein dosisabhängiger Lactatdehydrogenase-Anstieg zu verzeichnen, welcher negativ mit der Zahl vitaler Zellen korrelierte (Jagetia G.C. and Adiga S.K. 1995). Auch zum Nachweis der schädigenden Wirkung ionisierender Strahlen anhand der LDH liegen mehrere experimentelle Versuche vor (Tsuchida Y. et al. 1998). Hier konnte wie schon nach Exposition zytotoxischer Substanzen ein dosisabhängiger Effekt auf das Zellüberleben und die LDH-Aktivität gezeigt werden (Adiga S.K. and Jagetia G.C. 1999). Eine gesteigerte LDH-Aktivität im Überstand von dreidimensionalen Organkulturen war bei früheren Untersuchungen nach Zellschädigung durch Hyperthermie von 47 °C zu beobachten, somit scheint auch in diesem Kultivierungsmodell die Lactatdehydrogenase als quantitativer Parameter für Zellschäden geeignet zu sein (Bergner A. et al. 2000). Ein Vorteil der LDH-Bestimmung im Überstand der Zellkulturen liegt in der einfachen Durchführbarkeit, welche das gleiche Vorgehen für alle Kulturmodelle ermöglicht. Außerdem steht mit der LDH-Aktivität ein quantitativer Parameter für die Beurteilung des Ausmaßes von Zellschäden zur Verfügung, welcher ohne eine Zerstörung der einzelnen Kulturen erhoben werden kann und

somit einen geeigneten Parameter für den zeitlichen Ablauf der Strahlenwirkung auf die Kulturvitalität darstellt. Um den zeitlichen Verlauf eines möglichen Zellschadens besser zuordnen zu können, erfolgte die Medium-Abnahme zur LDH-Bestimmung im 24 Stunden Abstand, auch die Messung der LDH-Aktivität wurde schnellstmöglich durchgeführt, zum Teil kam es hier allerdings zu Verzögerungen von bis zu 18 Stunden, nachdem das Messgerät uns hier wegen klinischem Gebrauch nicht zur Verfügung stand. In einem solchen Fall wurden die Kultur-Überstände bei Raumtemperatur bis zur Verwendung aufbewahrt, bei 20-25°C ist die Lactatdehydrogenase bis zu 7 Tagen stabil, so dass bei einer Verwendung nach spätestens 17 Stunden nicht mit einer relevanten Änderung der LDH-Aktivität zu rechnen ist. Möglicherweise kann es in den hier vorhandenen Messbereichen zu einer gewissen Mess-Ungenauigkeit kommen, nachdem die ermittelten Werte unterhalb des klinisch gebräuchlichen Messbereiches liegen. Der Messbereich, der mit dem photometrischen Verfahren ermittelt werden kann, liegt mit 6-1200U/l aber noch weit unter den bei uns gemessenen LDH-Aktivitäten, auch treffen mögliche Abweichungen alle Versuchsgruppen gleichermaßen, somit ist eine Verwendung als Verlaufsparemeter und zum Vergleich zwischen den verschiedenen Kultivierungsformen durchaus möglich. Nachdem NCS, welches einen der Inhaltsstoffe der Kulturmedien darstellt, eine eigene LDH-Aktivität aufweisen kann, wurde für eine Versuchsreihe immer NCS derselben Charge verwandt, auch wurde die LDH-Aktivität des NCS-haltigen Mediums jeweils mitbestimmt. Für den zeitlichen Aktivitäts-Verlauf nach Bestrahlung dürfte eine geringe LDH-Aktivität des Mediums aber keine Rolle spielen.

4.1.10 Diskussion der Zellzahl-Bestimmung

Für die Ermittlung der Zellzahlen stand mit der Neubauer-Zählkammer ein etabliertes Verfahren zur Verfügung, welches sich wegen der Verwendung von Zellsuspensionen für alle Kultivierungsmodelle einsetzen ließ.

Ein Problem bei der Auszählung der BEAS-2B Zelllinie und der EPLC-32M1 Tumorzelllinie lag in der sehr großen Zelldichte in der verwandten Zellsuspension, hier waren zum Teil mehrere Verdünnungsschritte erforderlich, um eine Differenzierung der einzelnen Zellen unter dem Mikroskop überhaupt zu ermöglichen. Zwar wurde nach einer Verdünnung mit PBS auf eine gute Durchmischung der Suspension geachtet, allerdings kann es durch den mechanischen Reiz des Mischvorganges zu einer größeren Zellschädigung mit Fragmentierung der Zellen gekommen sein, so dass die ermittelte Zellzahl womöglich leicht unterschätzt wurde. Visuell ließen sich allerdings nicht mehr Fragmente nachweisen als in den Zell-Suspensionen der anderen Kulturformen. Bei der Zellzahl-Bestimmung der dreidimensionalen Organkulturen fanden sich erschwerend Verschmutzungen in der auszählenden Zellsuspension. Am ehesten sind diese auf Restbestandteile des bindegewebigen Kernes der Organkulturen zurückzuführen. Um die Verunreinigung möglichst gering zu halten, erfolgten mehrere Waschvorgänge, welche die Partikel-Anzahl deutlich reduzieren konnten, allerdings können die mehrmaligen Wasch-Vorgänge zu einem gewissen Zellverlust führen. Weitere Ursachen für einen möglichen Zellverlust während der Aufarbeitung können durch inkomplette Ablösung der Bronchialepithelzellen vom Bindegewebskern, sowie eine früheres Ablösen von Zellen ins Kulturmedium bedingt sein. Besonders problematisch gestaltete sich das Gewinnen der Zellen im Primärkultur-Modell. Hier waren sehr lange Inkubationszeiten bis zur Loslösung der Zellen von den kollagenbeschichteten Wells nötig, zum Teil mussten verbliebene Zellen sogar mechanisch mit einem Zell-Scrubber entfernt werden. Diese radikalen Verfahren können natürlich zu zusätzlichen Zellschäden geführt und somit die Zahl der auszählenden Zellen weiter reduziert haben. Die LDH-Bestimmungen erfolgten bei allen Experimenten vor der Zellseparierung. Innerhalb der Primärkulturen waren diese Probleme gleichermaßen vorhanden, somit dürften die Zellzahlen bezüglich der Strahlendosen verwertbar sein. Direkte Zellzahl-Vergleiche zwischen den einzelnen Kultivierungsformen ist sicher aus

obengenannten Gründen schwierig, innerhalb der Formen ist aber von den gleichen Bedingungen auszugehen, so dass auch hier eine Aussage zu möglichen Dosis-Wirkungsbeziehungen bezüglich der Zellzahlen möglich erscheint.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte die Wirkung ionisierender Strahlen auf verschiedene Kulturmodelle normaler Bronchialschleimhaut sowie auf eine Tumorzelllinie untersucht werden. Als Parameter für den Zelluntergang beziehungsweise von Zellläsionen wurde die Freisetzung von Lactatdehydrogenase als zytoplasmatischem Enzym verwandt, zur Detektion des Zellüberlebens erfolgte eine Zellzahlbestimmung.

4.2.1 Allgemeines

Bezüglich der zeitlichen Abfolge von Gewebeschäden nach Einwirkung ionisierender Strahlung wird unterschieden zwischen akuten und chronischen Strahlenschäden. Akute Strahlenschäden, das heißt Frühschäden, treten je nach betroffenem Gewebe von einigen Stunden bis zu mehreren Wochen nach Strahlen-Exposition auf. Klinische Beispiele sind zum Beispiel Erytheme, Ulzerationen oder bei Ganzkörperbestrahlung die sogenannte Strahlenkrankheit, welche bei Großschadensereignissen wie Hiroshima oder Tschernobyl zum Tode vieler betroffener Menschen führte. Zu den strahleninduzierten Spätschäden, die sich meist nach Monaten bis zu Jahrzehnten manifestieren, gehören zum Beispiel Gewebefibrosierungen, der Strahlenkatarakt oder auch bestimmte Tumorleiden wie Leukämien oder solide Tumore unter anderem der Schilddrüse.

Das hier vorliegende Versuchsmodell ermöglicht Aussagen über die akute Strahlenwirkung auf die untersuchten Zellkulturmodelle. Aufgrund der limitierten Lebensdauer der in vitro-Modelle und des fehlenden Zusammenspiels mit dem restlichen Organismus sind Spätfolgen hier nicht beziehungsweise nur schwer untersuchbar.

Außer dem Zeitpunkt der Strahlenwirkung hängt das Ausmaß der Schädigung auch von vielen anderen Faktoren wie der Art des bestrahlten Gewebes, dem Ort der Schädigung, der Zellzyklusphase, der Art der Strahlenapplikation und der Dosis ab. So ist die schädigende Akutwirkung ionisierender Strahlung auf Gewebe mit hohem Zellumsatz wie Knochenmark, Gonaden oder Dünndarmschleimhaut besonders ausgeprägt. Auch die Struktur des bestrahlten Gewebes ist entscheidend für das Ausmaß einer möglichen Schädigung. Proliferierendes Gewebe kann in 2 Kategorien eingeteilt werden, zum einen in Gewebe mit hierarchischer Struktur (H-Typ), bei denen zur Proliferation befähigte Stammzellen wie auch Zellen mit gewebetypischen Eigenschaften nebeneinander vorliegen. Zum anderen in Gewebe mit flexibler Struktur (F-Typ), bei denen die Zellen sowohl zur Proliferation, als auch zur Wahrnehmung gewebetypischer Funktionen befähigt sind. Dieser Aufbau bedingt ein unterschiedliches Schädigungsmuster nach Bestrahlung. In Geweben vom H-Typ hängt das Ausmaß des Schadens von der Anzahl der betroffenen Stammzellen, welche für die Nachbildung funktionsfähiger Zellen verantwortlich sind, ab. Bei den Funktionszellen wird ein regulärer von der gewebetypischen Lebensdauer abhängiger Zell-Verlust beobachtet, welcher unbeeinflusst von der Strahlendosis ist. Dosisabhängig zeigt sich dagegen die Wirkung auf das Überleben der proliferierenden Stammzellen (Herrmann T. and Baumann M. 1997, Michalowski A. 1981). Die verwendeten Organkulturen sind von ihrer Struktur her dem H-Typ zuzuordnen, nachdem die funktionsfähigen Zellen hier von der Basalmembran als „Stammzell- Kontingent“ nachgebildet werden. Beim Fehlen einer Basalmembran, wie es bei den BEAS-2B- und der EPLC-32M1-Zelllinien der Fall ist, handelt es sich um Kulturen vom F-Typ. Diese Gewebe zeigen im Gegensatz zu den hierarchisch strukturierten Geweben einen dosisabhängigen Verlust proliferierender und funktionsfähiger Zellen. (Eine kompensatorische Proliferationssteigerung geht hier gehäuft mit der Weitergabe strahlengeschädigten Gen-Materials einher). Etwas unklar ist, welchem Gewebe-Typ die Primärkulturen zuzuordnen sind, einige Untersuchungen an Primärkultur-Modellen von

respiratorischem Gewebe legen aber die Vermutung nahe, dass hier durchaus auch Basalzellen vorhanden sind. So fanden Franklin und Mitarbeiter bei der Begutachtung von Primärkulturen unter dem Phasenkontrastmikroskop kleine runde Zellen mit einer für Basalzellen typischen Morphologie (Franklin W.A. et al. 1996). Auch eine andere Arbeit konnte das Vorhandensein von Basalzellen neben zilienbesetzten Zellen und sekretorischen Zellen nachweisen (Kelsen S.G. et al. 1992). Vermutlich handelt es sich also auch bei den Primärkulturen um wenigsten teilweise hierarchisch strukturiertes Gewebe.

Eine weitere wichtige Rolle spielt die jeweilige Zellzyklusphase, in der sich die bestrahlten Zellen befinden. Der Zellzyklus kann in insgesamt 5 Phasen unterteilt werden:

- G1- Phase Zellwachstum, ggf. Einleitung zur Zellteilung
- S - Phase Synthese-Phase mit DNA-Replikation
- G2- Phase Sicherstellung der kompletten Replikation, Zellwachstum
- M - Phase Mitose, d.h. Zellteilungsvorgang
- G0- Phase Ruhephase innerhalb oder außerhalb der G1-Phase

G1-, S-, G2-Phase werden auch als Interphase bezeichnet, hier treten keine sichtbaren mikroskopischen Veränderungen der Zellen auf, wogegen in der Mitose-Phase Chromosomen sichtbar werden und es zur Zellteilung kommt. Im Zellzyklus werden bestimmte Kontrollpunkte („Checkpoints“) wirksam, um DNA-Schäden zu erkennen und Reparaturvorgänge einzuleiten. Solche “Checkpoints“ liegen am Ende der G1- und G2-Phase. Nach Einwirkung von ionisierenden Strahlen wird bei Säugetierzellen oft eine Verlängerung bestimmter Zellzyklus-Phasen beobachtet. So kommt es bei fast allen Zellreihen zu einem G2-Arrest, dessen Dauer vom jeweiligen Gewebe abhängt. Bei einigen Zellen tritt auch ein G1-Arrest oder eine Verlängerung der S-Phase auf (Herrmann T. and Baumann M. 1997, Maity A. et al. 1994, 1997, Bernhard E.J. et al. 1995). Eine wichtige Rolle für den G1-Arrest scheint das Protein p53 zu spielen. So wird bei verschiedenen Tumoren oft

eine Mutation des p53 gefunden (Gupta N. et al. 1996, Murnane J.P. 1995, Watanabe M. et al. 2002).

Die Strahlenempfindlichkeit einzelner Zellen scheint auch von der Zellzyklusphase abzuhängen, in der die entsprechenden Zellen sich befinden (Terasima T. and Tolmach L.J. 1963, Sinclair W.K. and Morton R.A. 1966). So reagieren in der Mitose- und in der G2-Phase befindliche Zellen am empfindlichsten auf ionisierende Strahlung, wogegen Zellen in der späten S-Phase relativ strahlenresistent sind (Kwok T.T. and Sutherland R.M. 1992). Von einer mittleren Strahlenempfindlichkeit ist bei in der frühen S-Phase und der G1-Phase befindlichen Zellen auszugehen (Morris G.M. 1996). So kommt es meist primär zu einem Untergang der in M- und G2-Phase befindlichen Zellen.

Kommt es als Bestrahlungsfolge zum Zelluntergang, wird des weiteren zwischen dem primären Zelltod mit zwei Arten des Zellunterganges, der Nekrose und Apoptose und dem klonogenen Zelltod unterschieden, welcher den Verlust der unbegrenzten Teilungsfähigkeit bedeutet und somit eine wesentliche Rolle im Rahmen der Strahlentherapie maligner Tumoren einnimmt. Zu den klonogenen Zellen werden unter anderem die Stammzellen, als auch unbegrenzt teilungsfähige Tumorzellen gezählt. Beim klonogenen Zelltod kann je nach Zellzyklusphase unterteilt werden in den Mitosetod, den Interphasetod und einem Teilungsverlust durch Differenzierung der betroffenen Zellen. Beim Mitosetod kommt es zum Teil erst nach Durchlaufen mehrerer Zellzyklen zu einem Verlust der Teilungsfähigkeit, diese Art des Zellunterganges wird vor allem in stark proliferierenden Zellen beobachtet und tritt auch schon bei niedrigen Dosen < 2 Gy auf. Der Interphasetod wird nur bei bestimmten Zellarten beobachtet, hier wird vor der eigentlichen Zellteilung eine Apoptose eingeleitet, dieser Effekt wird meist bei höheren Strahlendosen gesehen. Eine weitere Ursache für das Unvermögen zur Zellteilung liegt in einer Differenzierung betroffener Zellen zu reinen Funktionszellen.

Der Hauptangriffspunkt der Strahlenwirkung ist nach molekularbiologischen Untersuchungen die DNA (Elkind M.M. 1985), hier können verschiedene Schädigungsmechanismen beobachtet werden. So kann es zu Einzelstrangbrüchen, Doppelstrangbrüchen, Basenschäden und ungewollten Verbindungen zwischen Kernproteinen und DNA kommen (Hagen U. 1985). Die Zellen verfügen über vielfältige Reparaturmechanismen, um solche Schäden zu beheben. Die Effektivität der Reparatur von DNA-Schäden ist letztlich maßgeblich für die Strahlensensibilität von Zellen. So sind Zellen mit intakten Reparaturmechanismen in der Regel deutlich strahlenresistenter. In einer Untersuchung der DNA-Reparaturmechanismen verschiedener Zelllinien konnte eine deutlich gesteigerte Strahlenempfindlichkeit der Zelllinie mit der ineffektivsten Doppelstrangbruch-Reparatur nachgewiesen werden (Daza P. et al. 1997). Auch werden große Unterschiede in der Reparaturkapazität verschiedener Gewebearten, ja sogar individuelle Unterschiede gleicher Gewebetypen zum Teil sogar im gleichen Organismus bzw. Tumor beschrieben (Olive P.L. 1998).

Nach neueren Erkenntnissen nehmen viele weitere Parameter Einfluss auf die Strahlenantwort. So spielen hier neben intrazellulären Faktoren wie der Ausbildung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren, Proteinkinasen, Onkogenen (McKenna W.G. et al. 2003, auch Umgebungsfaktoren, wie das Kulturmedium, Kultivierungsart und Andere eine Rolle (Deschavenne P.J. and Fertil B. 1996, Oya N. et al. 2003). Im Zusammenhang mit der Therapie von Malignomen wird auch der intrazellulären Calcium- Konzentration eine zunehmende Bedeutung beigemessen. Calcium fungiert als wichtiger Second Messenger bei verschiedenen intra- und extrazellulären Vorgängen (Berridge M.J. et al. 2000) und scheint abhängig von der Konzentration pro- beziehungsweise anti-apoptotisch zu wirken (Cerella C. et al. 2003). Unter der Therapie von Malignomen wird eine gesteigerte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem endoplasmatischen Reticulum der Zelle beobachtet, welche die Apoptose induzieren soll. Ferner wird diskutiert, daß eine Erschöpfung der intrazellulären Calcium- Speicher zu einem Apoptoseschutz und somit zu Therapie-Resistenzen führen könnte.

4.2.2 Verlauf der Lactatdehydrogenase- Aktivität

Bei Betrachtung der LDH-Aktivität fand sich in den 2 Kulturmodellen aus Patientenmaterial, also den dreidimensionalen Organkulturen und den Primärkulturen erst 2 Tage nach Bestrahlung eine deutlicher Anstieg der Lactatdehydrogenase-Aktivität. Zu diesem Zeitpunkt war gleichzeitig auch die höchste LDH-Aktivität zu verzeichnen. Betrachtet man die Zellzahlen im Organkulturmodell, welche 4 Tage nach Bestrahlung keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufweisen, ist die gesteigerte LDH-Aktivität 2 Tage nach Bestrahlung am ehesten auf eine Schädigung der Zellmembran, nicht auf einen kompletten Zelluntergang zurückzuführen. Neben bestrahlungs-induzierten DNA-Schäden sind auch Strahlenwirkungen auf die Membranfunktion bekannt, so kommt es zu Permeabilitätsänderungen und Freisetzung von Proteinen aus membranumhüllten Zellbestandteilen (Hagen U. 1985), ein Mechanismus, der auch für die erhöhte LDH-Freisetzung verantwortlich gemacht werden kann. Unterstützt wird diese Annahme von einer Untersuchung, die die Freisetzung von Nukleosomen aus BEAS-2B-Zellen und dreidimensionalen Organkulturen nach Bestrahlung mit 0 Gy, 10 Gy und 30 Gy erforschte (Bergner A. et al. 2003, Holdenrieder S. et al. 2003, 2004). Als Nukleosomen werden Histon-DNA-Komplexe bezeichnet, die einen Bestandteil des Chromatins darstellen und somit im Zellkern zu finden sind. Eine Freisetzung ist folglich erst bei einer ausgeprägten Zellschädigung zu erwarten. Untersuchungen an Serum von Tumorpatienten oder Patienten mit entzündlichen Systemerkrankungen konnten hohe Nukleosomen-Konzentrationen nachweisen, was dem erhöhten Zellumsatz bei diesen Krankheiten zuzuschreiben ist (Holdenrieder S. et al. 2001, Amoura Z. et al. 1997, Kuroi K. et al. 1999). Nach Radiotherapie bei Tumorpatienten war initial ein Anstieg der Nukleosomen mit folgendem Abfall zu beobachten; zeigten sich die Nukleosomen-Konzentrationen im Verlauf niedrig, sprach dies für ein positives klinisches Outcome der Patienten (Holdenrieder S. et al. 1999). Nach Bestrahlung der BEAS-2B-Zellen fand sich nach 2 Tagen ein signifikanter Anstieg der

Nukleosomenkonzentration, wogegen bei den Organkulturen keine sichtbare Änderung zu verzeichnen war (Bergner A. et al. 2003), was gegen eine größere Zellschädigung spricht. Normalerweise werden DNA-Bestandteile bei apoptotischen Zelluntergängen freigesetzt, hier kommt es zu einer Aktivierung von Endonukleasen, die Chromatin in zahlreiche Oligo- und Mononucleotide spalten. Die Nukleotide sind schon in frühen Stadien der Apoptose nachweisbar (Arends M.J. et al. 1990, Degen W.G.J. et al. 2000).

Womöglich ist die Ursache für die hohe Strahlentoleranz in der komplexen Gewebearchitektur zu sehen, welche Basalzellen bis zu Funktionszellen einschließt. Untersuchungen von bronchialem Gewebe nach der endoluminalen Bestrahlung von Schweinen konnten relevante morphologische Veränderungen des Gewebes erst bei Dosen über 30 Gy nachweisen. Hier fanden sich des weiteren Hinweise darauf, dass das Bronchialgewebe einen langsamen Zellumsatz aufweist, was mit ursächlich für die geringe Strahlenempfindlichkeit sein kann (Huber R.M. et al. 1992, Waldschmidt A. 1994). Auch klinische Beobachtungen nach einer Brachytherapie im Bereich der Atemwege zeigten eine gute Verträglichkeit des Verfahrens (Burt P.A. et al. 1990).

Der ebenfalls nach einer Latenzzeit von 2 Tagen zu beobachtende LDH-Anstieg im Primärkulturmodell kann eventuell auch hier auf eine im Vergleich zu den anderen Monolayern komplexere Struktur mit Basalzellen zurückzuführen sein. Bei Betrachtung der Zellzahlen ist nach Bestrahlung allerdings ein deutlicher Zellverlust zu verzeichnen, was für eine höhere Strahlenempfindlichkeit der Primärkulturen verglichen mit den Organkulturen spricht. Eine Ursache ist sicher in der Kultivierung als Monolayer zu sehen, bei der eine komplexe hierarchische Gewebestruktur fehlt, obwohl ansonsten bei Konfluenz Zell-Zell-Kontakt gegeben war. Unklar ist, warum 2 Tage nach Bestrahlung bei den Kontrollen eine höhere LDH-Aktivität als bei den mit 10 Gy bestrahlten Primärkulturen zu verzeichnen ist. Allerdings lag bei der geringen Anzahl der Kulturen eine hohe Standardabweichung vor,

welche eine relevante Aussage zum Strahlenverhalten der Primärkulturen erschwert und für dieses Phänomen mitverantwortlich sein kann.

Bei den Organkulturen zeigte sich nach 3 Wochen ein deutlicher LDH-Abfall in allen Versuchsgruppen im Vergleich zum Ausgangswert vor Bestrahlung. Die verminderte LDH-Aktivität ist am ehesten auf einen alterungsbedingten Zellverlust mit verminderter Zellzahl zurückzuführen, nachdem die Organkulturen zu diesem Zeitpunkt durchschnittlich 5 Wochen alt waren. Auch Kotsianos und Mitarbeitern fiel nach einem ähnlichen Kultivierungszeitraum eine Abnahme von endothelialen Zellen und Fibroblasten sowie eine Umdifferenzierung des Epithels auf (Kotsianos D. et al. 2000). Die Primärkulturen wiesen an Tag 5 nach Bestrahlung einen leichten LDH-Anstieg in allen Gruppen auf. Hier ist womöglich gerade der Zeitpunkt eines akuten Zellverlustes durch Überalterung erfasst. Nachdem gerade in der Kontrollgruppe der höchste Anstieg der Lactatdehydrogenase-Aktivität zu beobachten war, sind strahlungsbedingte Ursachen für den leichten Anstieg eher als unwahrscheinlich anzusehen. Bei den BEAS-2B Zellen fand sich im Gegensatz zu den oben beschriebenen Kultur-Modellen schon 1 Tag nach Bestrahlung ein signifikanter LDH-Anstieg in den bestrahlten Gruppen. Bei den mit 30 Gy bestrahlten BEAS-2B Zellen zeigte sich die LDH-Aktivität bis zu 3 Tage nach Bestrahlung erhöht, wogegen die mit 10 Gy bestrahlten Zellen einen zweigipfligen Verlauf mit hoher LDH-Aktivität 1 und 3 Tage nach Bestrahlung aufwiesen. Womöglich befanden sich die Zellen hier in unterschiedlichen Zellzyklusphasen und es kam initial zur Schädigung von in den strahlensensiblen Zyklusphasen befindlichen Zellen und erst nach einer Latenzzeit zu einem Untergang initial resistenter Zellen (Herrmann T. and Baumann M. 1997). Der Einfluss der jeweiligen Zellzyklusphase nimmt mit zunehmender Strahlendosis ab, was erklären könnte, warum es bei den mit 30 Gy bestrahlten Zellen nicht zu einem zweigipfligen Verlauf kam. Eventuell kommt es bei der 10 Gy-Gruppe initial zu einem Untergang strahlensensitiver Zellen gefolgt von einer verzögerten Apoptose nach chromosomaler- Schädigung verbliebener Zellen mit erneutem Zelluntergang. Bei

Betrachtung der LDH-Aktivität bezogen auf die Zellzahl fand sich bei den bestrahlten Zellen eine zunehmende Verschiebung des LDH/ZZ Quotienten zugunsten der Lactatdehydrogenase, das heißt, dass aus einzelnen Zellen im Verlauf mehr und mehr LDH freigesetzt wurde, was auf einen zunehmenden Zelluntergang in den bestrahlten Gruppen zurückzuführen ist. Die Kontrollgruppe zeigte dagegen ein weitgehend konstantes LDH-Zellzahl Verhältnis, was für ein Gleichgewicht zwischen Zelltod und Zellerneuerung spricht. Die zum Vergleich herangezogene EPLC-32M1 Tumorzelllinie zeigte einen gänzlich anderen Verlauf der LDH-Aktivität nach Bestrahlung. Hier war nach 3 Tagen in allen Versuchsgruppen ein kontinuierlicher Anstieg der Lactatdehydrogenase-Aktivität zu verzeichnen. Dieser Anstieg zeigte sich wider Erwarten invers zu der verwandten Bestrahlungs-Dosis. Begründet sein kann dieses Verhalten womöglich in einem dosisabhängigen Verlust der Adhäsionsfähigkeit der Tumorzellen, welche dann womöglich ins Kultivierungsmedium abgeschieden wurden, ohne einen Verlust der Zellmembranintegrität aufzuweisen. Die wahrscheinlichere Ursache ist aber in dem ungehemmten Wachstum der unbestrahlten Kontrollgruppe mit erhöhtem Zellabsterben zu sehen. Mikroskopisch zeigte sich hier nach Bestrahlung die Ausbildung übereinanderliegender Zellschichten, auch war anhand des Farbumschlages des Kultur-Mediums von einem ausgeprägten Verbrauch an Nährmedium mit folgender pH-Verschiebung auszugehen. Hier dürfte die Bestrahlung durch eine Elimination von Zellen zu verbesserten Umgebungsbedingungen der überlebenden Tumorzellen geführt haben. Unklar ist, ob der spätere LDH-Anstieg auf eine verspätete Strahlenwirkung oder eine „Bevölkerungsexplosion“ zurückzuführen ist. Nach Betrachtung der Zellzahlen, welche im Vergleich zu den unbestrahlten Kontrollen signifikant erniedrigt waren, ist eine mit Latenz einsetzende Strahlenwirkung zu vermuten. Leider sind spätere LDH-Aktivitäten nicht erhoben worden, nachdem die Ergebnisse aus den übrigen Kultivierungsmodellen eine Strahlenwirkung innerhalb eines kürzeren Zeitraumes implizierten.

4.2.3 Zellzahlen nach Bestrahlung

Vier Tage nach Bestrahlung mit Dosen von 10 und 30 Gray zeigte sich ein signifikanter Abfall der Zellzahlen in allen zweidimensionalen Kultivierungsmodellen, wogegen bei den Organkulturen keine Unterschiede bezüglich der Zellkonzentrationen zu verzeichnen waren. Einen Einfluss auf die Strahlentoleranz von Gewebe scheinen die Zell-Kontakte zu haben. So könnte das dreidimensionale Wachstum von Zellen mit einer höheren Strahlenresistenz einhergehen. Frühe Untersuchungen an Zelllinien, die einmal als Monolayer, einmal als dreidimensionale Sphäroide kultiviert worden waren, konnten eine höhere Strahlenresistenz der Sphäroide nachweisen (Dertinger H. et al. 1982). Auch andere Studien stützen diese Daten (Olive P.L. and Durand R.E. 1994, Moussa H. et al. 2000). Guichard konnte nach Transplantation humaner Tumorzelllinien in Nacktmäuse eine höhere Strahlenempfindlichkeit im *in vivo*-Modell verglichen mit einer *in vitro*-Monolayer-Kultivierung zeigen; diese Effekte schienen nicht über eine Gewebhypoxie im Mäusemodell, sondern viel mehr über Zell-Zell-Kontakt-Mechanismen vermittelt worden zu sein (Guichard M. et al. 1983). Die genauen zugrundeliegenden zellulären und molekularbiologischen Vorgänge, die die vermehrte Strahlenresistenz bei intensiverem Zell-Kontakt bedingen, sind bisher nicht geklärt. Ursächlich für die primär geringe Auswirkung der Strahlung auf das dreidimensionale Kulturmodell kann die hierarchische Struktur sein. Hier zeigt sich ein relevanter Untergang von funktionsfähigen Zellen erst, wenn regulär abgestorbene reife Zellen durch die strahlenbedingte Dezimierung der Stammzellen nicht mehr adäquat ersetzt werden. Nachdem die Wirkung auf das reife Gewebe nicht dosisabhängig, sondern gewebetypisch ist, tritt ein strahleninduzierter Schaden erst nach einer Latenzzeit zutage. In der Literatur finden sich weitere Hinweise darauf, dass Bronchialschleimhaut zu den strahlenresistenteren Geweben gehört. So fanden Kotsianos und Mitarbeiter nach Bestrahlung dreidimensionaler Organkulturen mit Dosen von 30 bis 75 Gray lediglich bei 75 Gray einen signifikanten Unterschied der Lebensfähigkeit von Zellen verglichen mit der unbestrahlten Kontrollgruppe

(Kotsianos D. et al. 2000). Auch tierexperimentelle Daten konnten eine hohe Strahlentoleranz von Bronchialepithel nachweisen (Waldschmidt A. 1994, Huber R.M. et al. 1992).

Im Primärkulturmodell fand sich wie auch bei den BEAS-2B-Zellen ein deutlicher Zellverlust nach Bestrahlung. Dies kann zum einen an der fehlenden strukturellen Integrität dieser Modelle liegen, womöglich spielt bei den Primärkulturen aber auch eine gewisse Zellalterung eine Rolle. Wie beschrieben, waren die Zellkulturen im Durchschnitt eine Woche älter als die BEAS-2B Zellen. Gealterte Zellen scheinen eine deutlich höhere Strahlensensitivität aufzuweisen als jugendliche Zellen. So zeigten adulte Fibroblasten der Lunge im Vergleich mit embryonalen Fibroblasten der Lunge eine gesteigerte Strahlenempfindlichkeit (Macierira-Coelho A. et al. 1978). Auffallend ist auch, dass bei den Primärkulturen und den BEAS-2B-Zellen die Zellzahlen in der 30 Gray Gruppe höher waren, als in der 10 Gray-Gruppe. Die genaue Ursache für dieses Phänomen ist unklar, allerdings rücken zunehmend neue indirekte Mechanismen der Zellschädigung nach Bestrahlung in den Vordergrund. Ging man früher vor allem von einer direkten Schädigung der Zielzelle als Hauptkomponente der Strahlenwirkung aus, scheint ein weiterer Aspekt in einer Beeinflussung der Umgebungsbedingungen zu liegen. So wird eine schädigende Wirkung ionisierender Strahlen auch an benachbarten, nicht bestrahlten Zellen beobachtet. Solche sogenannten Bystander-Effekte werden sogar nach Zugabe von Kulturmedium bestrahlter Kulturen auf unbestrahlte Kulturen beobachtet (Azzam E.I. et al. 2004). Der Bystander-Effekt beinhaltet unter anderem Zelluntergang, Anstieg intrazellulärer Sauerstoffradikale, Induktion von Mutationen, gestörtes Zellwachstum, Apoptose-Induktion, Genominstabilität und neoplastische Transformation (Goldberg Z. and Lehnert B.E. 2002). Zugrundegelegt werden verschiedene Mechanismen: zum einen soll es über gap-junctions zu einem Austausch von bestimmten Molekülen kommen, zum anderen scheinen auch von den Zellen sezernierte Faktoren und Änderungen im oxidativen Stoffwechsel eine Rolle zu spielen. Die Bystander-Effekte sind nicht streng dosisabhängig, womöglich spielen auch bei den hier bestrahlten Zellkulturen ähnliche Effekte eine Rolle, was

womöglich die zum Teil nicht dosisabhängigen Unterschiede der Zellzahlen nach Bestrahlung betrifft. Für ganz niedrige Dosisbereiche <10 cGy ist bekannt, dass Zellen hier deutlich strahlensensitiver sind (hyper-radiosensitivity), wogegen Zellen, die Einzel-Dosen von 30 cGy-1 Gy ausgesetzt werden, sich strahlenresistent zeigen (increased radioresistant response) (Marples B. et al. 1997, Joiner M.C. et al. 2001). Eine weitere mögliche Erklärung für die zum Teil fehlende Dosisabhängigkeit bezüglich der Zellzahlen könnte sein, dass sich der Großteil der entsprechenden Zellen in einer der strahlenresistenteren Zellzyklusphasen befunden hat. Allerdings sind Strahlenschäden mit zunehmender Dosis unabhängiger von der entsprechenden Zellzyklusphase, womit diese Erklärung eher unwahrscheinlich ist.

Im Gegensatz dazu fand sich bei der EPLC-Tumorlinie 4 Tage nach Bestrahlung ein deutlicher, auch dosisabhängiger Zellzahlverlust, wie es nach strahlenbiologischen Untersuchungen an Tumorzelllinien zu erwarten war (Bedford J.S. and Mitchell J.B. 1973, Mitchell J.B. and Bedford J.S. 1979).

5 Zusammenfassung, Schlussfolgerungen und Ausblicke

In der vorliegenden Arbeit sollte die Auswirkung unterschiedlicher Strahlendosen auf verschiedene Kultivierungsformen der Bronchialschleimhaut und eine Lungenkarzinomzelllinie untersucht werden. Untersuchungen zur Wirkung ionisierender Strahlen auf normales Bronchialepithel sind eher selten obwohl die Affektion von tumorfreiem umgebenden Gewebe eine wichtige Rolle bezüglich der Nebenwirkungen einer Radiotherapie spielt. Gerade im palliativen Bereich, in dem die endoluminale Bestrahlung von Bronchus-Stenosen einen wichtigen Faktor für die Verbesserung der Lebensqualität darstellt, ist durch den engen Kontakt der Strahlenquelle zum gesunden Bronchialepithel eine Strahlenauswirkung gegeben. Die bisherige Datenlage legt eine relativ hohe Strahlentoleranz des Bronchialepithels nahe. Ob sich diese Ergebnisse bestätigen lassen, sollte anhand verschiedener Bronchial-Epithel-Kultivierungsformen untersucht werden. Primäres Ziel der Untersuchung war die Frage, ob die Art der Kultivierung einen Einfluss auf die Effektivität ionisierender Strahlen hat und ob Tumorzellen eine andere Reaktion zeigen.

Die verwandten Modelle waren:

- BEAS-2B Zelllinien
- Primärkulturen aus Patientenmaterial
- dreidimensionale Organkulturen
- EPLC-32M1 Tumorzelllinien

Als „handelsübliche“ Bronchialepithel-Zelllinie zur Monolayer-Kultivierung wurden die BEAS-2B-Zellen verwandt, hier handelt es sich um immortalisierte, humane bronchoepitheliale Zelllinie, die mit einem Adenovirus 12-SV40 Virus-Hybrid transfiziert war. Zwar sind viele Eigenschaften der normalen Bronchialschleimhaut in diesem Modell vorhanden (Ke Y. et al. 1988, Reddel R.R. et al. 1985, 1988, Bloemen P.G. et al. 1993,

Kinnula V.L. et al. 1994) aber auch genetische Abweichungen wie Veränderungen des Chromosomensatzes sind beschrieben (Reddel R.R. et al. 1988). Mit zunehmender Passagezahl können die Zellen auch eine kanzerogene Wirkung zeigen (Ohnuki Y. et al. 1996).

Zum direkten Vergleich wurden Primärkulturen aus Patientenmaterial gewonnen, welche als Monolayer kultiviert wurden. Problematisch war hier die schwierige Kultivierbarkeit.

Die dreidimensionalen Organkulturen stellen vom Aufbau her eine *in vivo*-nahe Kulturform dar. Zentrum der Organkultur ist ein bindegewebiger Kern, welcher von einem respiratorischen Epithel umgeben ist. Morphologisch ist das kultivierte Epithel nicht von dem *in vivo* zu unterscheiden.

Als Tumormodell wurde eine EPLC-32M1 Zelllinie verwandt, die wie die BEAS-2B Linie und die Primärkulturen als Monolayer wachsen. Hier handelt es sich um eine squamöse Karzinom Zelllinie, deren Ursprungsgewebe ein Plattenepithelkarzinom der Lunge war. Die Ähnlichkeit zum Primärtumor ist nur noch gering ausgeprägt. Bekannterweise gehört das Plattenepithelkarzinom der Lunge zu den nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomen, welche im Vergleich zu Kleinzellern nur eine geringe Strahlensensitivität aufweisen.

Als Parameter für die Zellschädigung wurde die Lactatdehydrogenase verwandt, ein zytoplasmatisches Enzym, welches bei Zellmembranläsionen freigesetzt wird. Mit der LDH steht ein klinisch häufig eingesetzter, etablierter Parameter zu Detektion von Zellschäden zur Verfügung. Hier konnte eine Bestimmung im Kulturmedium erfolgen, wodurch Verlaufsbeobachtungen ohne Beeinflussung der Kulturen möglich waren.

Ferner wurde die Zellzahlen nach Bestrahlung ermittelt, um eine Aussage über das Zellüberleben machen zu können.

Zusammenfassung der Ergebnisse:

- Die Organkulturen und Primärkulturen zeigten nach einer Latenz von 48 Stunden nach der Bestrahlung eine gesteigerte LDH-Aktivität, die hier gleichzeitig ihr Maximum erreichte.
- Bei der BEAS-2B Linie kam es innerhalb der ersten 24 Stunden zu einem deutlichen LDH-Anstieg.
- Tumorzellen zeigten ein gänzlich anderes Verlaufsmuster bezüglich der LDH. Hier kam es nach 3 Tagen zu einem kontinuierlichen Anstieg.
- Die Zellzahlen im Organkulturmodell wiesen 4 Tage nach Bestrahlung keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen auf.
- Bei den Primärkulturen und den BEAS-2B Zellen fand sich in den bestrahlten Gruppen eine signifikant, nicht dosisabhängig erniedrigte Zellzahl.
- Im Tumorzell-Modell war dosisabhängig eine Zellzahlminderung in den bestrahlten Gruppen zu beobachten.

Schlussfolgerungen:

Sowohl vom LDH-Verhalten, als auch von den Ergebnissen der Zellzahlbestimmung zeigten sich die dreidimensionalen Organkulturen wenig anfällig für die Wirkung ionisierender Strahlen. Nachdem dieses Modell die *in vivo* Situation gut widerspiegelt, unterstützen die Ergebnisse die Daten, welche eine hohe Strahlentoleranz von Bronchialepithel nahe legen.

Von den übrigen Kultivierungsformen scheinen die aus Patientenmaterial gewonnenen Primärkulturen die höchste Strahlenresistenz aufzuweisen, wahrscheinlich sind hierfür Zelleigenschaften verantwortlich, die in den gentechnisch veränderten Zelllinien nicht mehr in der Art und Weise ausgeprägt sind wie *in vivo*. So nehmen viele intrazelluläre Faktoren wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Proteinkinasen oder auch Onkogene Einfluss auf die

Strahlensensibilität einer Zelle (Maity 1997, Oya N. et al. 2003, McKenna W.G. et al. 2003). Entscheidend scheint besonders der p53 Status zu sein.

Am strahlensensitivsten zeigten sich die BEAS-2B und die EPLC-32M1 Linien. Das hängt womöglich mit der Veränderung des genetischen Materials durch die Immortalisationsprozesse und die im Vergleich höhere Proliferationsrate zusammen. Möglich ist auch eine erhöhte Strahlensensibilität aufgrund des im Vergleich zu den Organkulturen schwächer ausgeprägten Zell-Zell-Kontaktes, der fehlenden dreidimensionalen Struktur und dem geringeren Anteil differenzierter Zellen. Nicht außer Acht lassen darf man individuelle Einflüsse, welche womöglich in den von Patientenmaterial stammenden Kulturen eine Rolle spielen.

Zusammenfassend konnten wir zeigen, dass der dreidimensionale Aufbau und die hierarchische Struktur des Bronchialepithels maßgeblich die Strahlensensibilität beeinflussen. Monolayer sind zur Untersuchung von Strahlenfolgen *in vivo* nur sehr bedingt geeignet.

Ausblick auf zukünftige Fragestellungen:

Nachdem in der vorliegenden Arbeit nur eine Tumorzelllinie untersucht wurde, wäre es von Interesse, die Auswirkung ionisierender Strahlung auf verschiedene Lungenkarzinom-Zelllinien zu vergleichen, welche *in vivo* deutliche Unterschiede in der Strahlenempfindlichkeit aufweisen. Anbieten würde sich hier der Vergleich mit strahlensensiblen kleinzelligen Bronchialkarzinom. Möglicherweise kann auch hier eine dreidimensionale Kultivierung von Tumorzellen aus Patientenmaterial etabliert werden, um einen größeren Zell-Zell-Kontakt im Tumor-Modell zu ermöglichen. Auch wäre hier durch die fehlenden gentechnischen Veränderungen eine bessere Vergleichbarkeit mit der *in vivo*-Situation möglich.

Auch die Untersuchung von Ko-Kulturen aus normaler Bronchialschleimhaut und verschiedenen Bronchialkarzinomzelllinien bietet die Möglichkeit, Auswirkungen von

Interaktionen zwischen Normalgewebe und Tumorgewebe nach Einwirkung ionisierender Strahlen näher zu eruieren. Dieses Modell käme der Situation beim Patienten am nächsten.

Interessant wäre in diesen Modellen auch die Überprüfung weiterer Zelltod-Parameter. So könnten hier verschiedene Apoptosemarker wie zum Beispiel die Nukleosomen im Überstand verschiedener Ko-Kulturmodelle bestimmt werden, um eine bessere Aussage über das Ausmaß der Zellschädigung zu erhalten. Im Kontext mit der Untersuchung von Nukleosomen scheint auch die Bestimmung von Calcium eine sinnvolle Ergänzung darzustellen.

Hier bieten sich verschiedene Möglichkeiten an, das Verhalten von Zellkulturen nach Bestrahlung, gerade hinsichtlich einer möglichen Resistenzbildung zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

1. Adiga S.K., Jagetia G.C. Correlation between cell survival, micronuclei-induction, and LDH activity in V79 cells treated with tenopside (VM-26) before exposure to different doses of gamma radiation. *Toxicol. Lett.* 1999 109:31-41
2. Al-Batran S., Gamarra F., Brückner K., Stocker I., Bals R., Welsch U., Huber R.M. 3-Dimensionale Kokultur aus humanem Bronchialepithel und Tumorzellen: ein Modell für das Bronchialkarzinom. *Pneumologie* 1997 Sonderheft I: 242 (Abstract)
3. Al-Batran S., Supthut M.M., Brückner K., Lang S.M., Gamarra F., Knüchel R., Welsch U., Huber R.M. Invasionscharakteristika von Tumorzellen in 3-dimensionalen Kokultur aus humanem Bronchialepithel und der Tumorzelllinie EPLC 32M1. *Atemw-Lungenkrkh.* 1998 24: 327-328
4. Amoura Z., Piette J.C., Chabre H., Cacoub P., Papo T., Wechsler B. Bach J.F., Koutouzov S. Circulating plasma levels of nucleosomes in patients with systemic lupus erythematosus: Correlation with serum antinucleosome antibody titers and absence of clear association with disease activity. *Arthritis Rheum.* 1997 40:2217-2225
5. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. *Krebs in Deutschland Häufigkeiten und Trends.* 2004 Saarbrücken
6. Arends M.J., Morris R.G., Wyllie A.H. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am. J. Pathol.* 1990 136:593-608
7. Azzam E.I., de Toledo S.M., Little J.B. Stress signalling from irradiated to non-irradiated cells. *Curr. Cancer Drug Targets* 2004 4:53-64
8. Bals R., Gamarra F., Kaps A., Grundler S., Huber R.M., Welsch U. Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system. *Cell Tissue Res.* 1998 293:573-577

9. Bedford J.S., Mitchell J.B. Dose-rate effects in synchronous mammalian cells in culture. *Radiat. Res.* 1973 54:316-327
10. Bepler G., Koehler A., Kiefer P., Havemann K., Beisenherz K., Jaques G.P., Gropp C., Haeder M. Characterization of the state of differentiation of six newly established human non-small-cell lung cancer cell lines. *Differentiation* 1988 37:158-171
11. Bergner A., Huber R.M., Thein F., Kleinsasser N., Al-Batran S., Wehling M., Gamarra F. Einfluß von Substanz P auf Vitalität, Zellzahl und Proliferationsrate von dreidimensionalen Organkulturen menschlichen respiratorischen Epithels während der Epitheldefektheilung. *Pneumologie* 1997 (Abstract) 51:192
12. Bergner A., Gamarra F., Henke M., Huber R.M. LDH- und Zellzahl- Messungen an dreidimensionalen Organkulturen menschlicher Bronchialschleimhaut (OCs) nach Hyperthermie von 47°C. *Pneumologie* 1999 (Abstract) 53:630
13. Bergner A., Stief J., Holdenrieder S., Stieber P., Haimerl W., Passlick B., Waldschmidt A., Kummermehr J., Gamarra F., Huber R.M. Effects of single dose irradiation on bronchial epithelium: a comparison of BEAS 2B cell monolayers, human organ cultures, and goettinger minipigs. 2003 *Radiat. Res.* 160:647-654
14. Bergner A., Stief J., Astner S.T., Gamarra F., Huber R.M. Lactat dehydrogenase (LDH) as a parameter for cell number (CN) and cell damage (CD) in three dimensional organ cultures of human bronchial epithelium (OCs). *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 2000 161:A147(Abstract)
15. Bernhard E.J., Maity A., Muschel R.J., McKenna W.G. Effects of ionizing radiation on cell cycle progression. A review. *Radiat. Environ. Biophys.* 1995 34:79-83
16. Berridge M.J., Lipp P., Bootman M.D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000 1:11-21

17. Bloemen P.G., van den Tweel M.C., Henricks P.A., Engels F., Wagenaar S.S., Rutten A.A., Nijkamp F.P. Expression and modulation of adhesion molecules on human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1993 9:586-593
18. Boffetta P., Ahrens W., Nyberg F., Mukeria A., Brüske-Hohlfeld I., Fortes C., Constantinescu V., Simonato L., Batura-Gabryel H., Lea S., Gaborieau V., Benhamou S. Exposure to environmental tobacco smoke and risk of adenocarcinoma of the lung. *Int. J. Cancer* 1999 83:635-639
19. Burt P.A., O'Driscoll B.R., Notley H.M., Barber P.V., Stout R. Intraluminal irradiation for the palliation of lung cancer with the high dose rate micro-Selectro. *Thorax* 1990 45:765-768
20. Byhardt R.W., Hartz A., Libnoch J.A., Hansen R., Cox J.D. Prognostic influence of TNM staging and LDH levels in small cell carcinoma of the lung (SCCL). *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1986 12:771-777
21. Carles J., Rosell R., Ariza A., Pellicer I., Sanchez J.J., Fernandez-Vasalo, Abad A., Barnadas A. Neuroendocrine differentiation as a prognostic factor in non-small lung cancer *Lung Cancer* 1993 10:209-219
22. Cerella C., D'Alessio M., De Nicola M., Magrini A., Bergamaschi A., Ghibelli L. Cytosolic and endoplasmic reticulum Ca^{2+} concentrations determine the extent and the morphological type of apoptosis, respectively. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2003 1010:74-77
23. Coultas D.B., Samet J.M. Occupational lung cancer. *Clin. Chest Med.* 1992 13:341-354
24. Daza P., Schubler H., McMillan T.J., Girod S.C., Pfeiffer P. Radiosensitivity and double-strand break rejoining in tumorigenic and non-tumorigenic human epithelial cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 1997 72 :91-100

25. Degen W.G.J., Pruijn G.J.M., Raats J.M.H., van Venrooij W.J. Caspase-dependent cleavage of nucleic acids. *Cell Death Diff.* 2000 7:616-627
26. Dertinger H., Hinz G., Jakobs K.H. Intercellular communication, three-dimensional cell contact and radiosensitivity. *Biophys. Struct. Mech.* 1982 9:89-93
27. Deschavanne P.J., Fertil B. A review of human cell radiosensitivity in vitro. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1996 34:251-266
28. Dirksen E.R., Felix J.A., Sanderson M.J., Preparation of explant and organ cultures and single cells from airway epithelium. *Methods Cell. Biol.* 1995 47:65-74
29. Elkind M.M. DNA Damage and cell killing. Cause and effect? *Cancer* 1985 56:2351-2363
30. Franklin W.A., Folkvord J.M., Varella-Garcia M., Kennedy T., Proudfoot S., Cook R., Dempsey E.C., Helm K., Bunn P.A., Miller Y.E. Expansion of bronchial epithelial cell populations by in vitro culture of explants from dysplastic and histologically normal sites. *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 1996 15:297-304
31. Fujisawa T., Kato Y., Atsuta J., Terada A., Iguchi K., Kamiya H., Yamada H., Nakajima T., Miyamasu M., Hirai K. Chemokine production by the BEAS-2B human bronchial epithelial cells: differential regulation of eotaxin, IL-8, and RANTES by TH2- and TH1- derived cytokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2000 105:126-133
32. Galiotta L.J.V., Lantero S., Gazzolo A., Sacco O., Romano L., Rossi G.A., Zegarra-Moran O. An improved method to obtain highly differentiated monolayers of human bronchial epithelial cells. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal.* 1998 34:478-481
33. Gamarra F., Baretton G., Grundler S., Christ M., Wehling M., Huber R.M. A new technique to culture human bronchial epithelial cells as mini-organ system in vitro. *Eur. Respir. J.* 1993 suppl.17,6:182 (Abstract)

34. Gamarra F., Grundler S., Wehling M., Huber R.M. Vitalität und Zilienschlag in dreidimensionalen Kulturen des humanen Bronchialepithels nach Kryokonservierung. *Pneumologie* 1996/a 50:127 (Abstract)
35. Gamarra F., Grundler S., Heil P., Ziesenis A., Baretton G., Bals R., Huber R.M. Etablierung einer Miniorgankultur des Bronchialepithels: Morphologie, ziliäre Schlagfrequenz und Protoporphyrin-IX-Bildung nach Exposition mit 5-Aminolävulinsäure. *Med. Klinik* 1995 90:143 (Abstract)
36. Gamarra F., Thein F., Leberig A., Kleinssasser N., Wehling M., Huber R.M. Cell proliferation in three dimensionally cultured human respiratory epithelium. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 1996/b 153:A724 (Abstract)
37. Gamarra F., Wagner S., Al-Batran S., Maier I., Castro M., Hautmann H., Bergner A., Baumgartner R., Huber R.M. Kinetics of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in organic cultures of bronchial epithelium and tumor. *Respiration* 2002 69:445-450
38. Gamarra F., Lingk P., Marmarova A., Edelmann M., Hautmann H., Stepp H., Baumgartner R., Huber R.M. 5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence in bronchial tumor dependency on the patterns of tumour invasion. *J. Photochem. Photobiol. B.* 2004 Jan 23;73(1-2):35-42
39. Goergen J.L., Marc A., Engasser J.M. Determination of cell lysis and death kinetics in continuous hybridoma cultures from the measurement of lactate dehydrogenase release. *Cytotechnology* 1993 11:189-195
40. Goldberg Z., Lehnert B.E. Radiation-induced effects in unirradiated cells: a review and implications in cancer. *Int. J. Oncol.* 2002 21:337-349
41. Gollins S.W., Ryder W.D.J., Burt P.A., Barber P.V., Stout R. Massive haemoptysis death and other morbidity associated with high dose rate intraluminal radiotherapy for carcinoma of the bronchus. *Radiother. Oncol.* 1996 39:105-116

42. Gordan L.N., Sugrue M.W., Lynch J.W., Williams K.D., Khan S.A., Wingard J.R., Moreb J.S. Poor mobilization of peripheral blood stem cells is a risk factor for worse outcome in lymphoma patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Leuk. Lymphoma* 2003 44:815-820
43. Grundler S., Heil P., Gamarra F., Huber R.M. Aufnahme von ALA und Bildung von Protoporphyrin IX an einer Mini-Organ-Kultur des humanen Bronchialepithels. *Lasermedizin* 1994 10:105 (Abstract)
44. GSF aktuell 15 1997
45. Guichard M., Dertinger H., Malaise E.P. Radiosensitivity of four human tumor xenografts. Influence of hypoxia and cell-cell contact. *Radiat. Res.* 1983 95:602-609
46. Gupta N., Vij R., Haas-Kogan D.A., Israel M.A., Deen D.F., Morgan W.F. Cytogenetic damage and the radiation-induced G1-phase checkpoint. *Radiat. Res.* 1996 145:289-298
47. Hagen U. Grundlagen der Strahlenbiochemie. Aus: Grundlagen der Nuklearmedizin. Gustav Fischer Verlag 1985 293-310
48. Harley N., Samet J.M., Cross F.T., Hess T., Muller J., Thomas D. Contribution of radon and radon daughters to respiratory cancer. *Environ. Health Perspect.* 1986 70:17-21
49. Heidtmann H.H., Salge U., Havemann K., Kirschke H., Wiederanders B. Secretion of a latent, acid activatable cathepsin L precursor by human non-small cell lung cancer cell lines. *Oncol. Res.* 1993 5:441-451
50. Herrmann T., Baumann M. Klinische Strahlenbiologie. Gustav Fischer Verlag 1997

51. Hofmann J., Kaiser U., Maasberg M., Havemann K. Glucocorticoid receptors and growth inhibitory effects of dexamethasone in human lung cancer cell lines. *Eur. J. Cancer* 1995 31A:2053-2058
52. Holdenrieder S., Stieber P., Förg T., Kühl M., Schulz L., Busch M., Schalhorn A., Seidel D. Apoptosis in serum of patients with solid tumors. *Anticancer Res.* 1999 19:2721-2724
53. Holdenrieder S., Stieber P., Bodenmüller H., Fertig G., Fürst H., Schmeller N., Untch M., Seidel D. Nucleosomes in serum as a marker for cell death. *Clin. Chem. Lab. Med.* 2001 39:596-605
54. Holdenrieder S., Stieber P., Stief J., Bergner A., Gamarra F., Mitlewski A., Nagel D., Huber RM. Release of nucleosomes and LDH from normal broncho-epithelial cells and malignant lung cancer cells during irradiation indicate in vitro radiosensitivity. 2003 *Lung Cancer* 41, suppl. 2:176
55. Holdenrieder S., Stief J., Bergner A., Gamarra F., Mitlewski A., Nagel D., Huber RM. Stieber P. Nucleosomes indicate the in vitro radiosensitivity of irradiated bronchoepithelial and lung cancer cells. 2004 *Tumor Biol.* 25:321-326
56. Huber R.M., Waldschmidt A., Heun J., Arnold M., Kummermehr J. Acute reactions of the bronchial system to high dose rate bronchial endoluminal irradiation with Ir192 in the afterloading technique. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1992 145 (Abstract)
57. Ishioka S. Strategy of therapy for interstitial lung disease due to chemotherapeutic drugs or radiation. *Gan To Kagaku Ryoho* 1997 24 Suppl. 3: 432-438
58. Jagetia G.C., Adiga S.K. Influence of various concentrations of taxol on cell survival, micronuclei induction, and LDH activity in cultured V79 cells. *Cancer Lett.* 1995 96:195-200

59. Janerich D.T., Thompson W.D., Varela L.R., Greenwald P., Chorost L., Tucci C., Azman M.B., Melamed M.R., Kiely M., McKneally M.F. Lung cancer and exposure to tobacco smoke in the household. *N. Engl. J. Med.* 1990 323:632-636
60. Joiner M.C., Marples B., Lambin P., Short S.C., Turesson I. Low-dose hypersensitivity: current status and possible mechanisms. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2001 49:379-389
61. de Jong P.M., van Sterkenburg M.A.J.A., Kempenaar J.H., Dijkman J.H., Ponc M. Serial culturing of human bronchial epithelial cells derived from biopsies *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 1993 29A:379-387
62. Jorissen M., Van der Schueren B., Van den Berghe H., Cassiman J.J. Contribution of in vitro culture methods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. *Eur. Respir. J.* 1991 4:210-217
63. Ke Y., Reddel R.R., Gerwin B.I., Miyashita M., McMenamin M., Lechner J.F., Harris C.C. Human bronchial epithelial cells with integrated SV40 virus T antigen genes retain the ability to undergo squamous differentiation. *Differentiation* 1988 38:60-66
64. Kelsen S.G., Mardini I.A., Zhou S., Benovic J.L., Higgins N.C. A technique to harvest viable tracheobronchial epithelial cells from living human donors. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1992 7:66-72
65. Kinnula V.L., Yankaskas J.R., Chang L., Virtanen I., Linnala A., Kang B., Crapo J.D. Primary and immortalized (BEAS 2B) human bronchial epithelial cells have significant antioxidative capacity in vitro. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994 11:568-576
66. Kodaira T., Yamakawa K., Taniguchi H., Matsubara K., Ishigaki T. Clinical efficiency of concurrent carboplatin, etoposide, and definitive radiotherapy for stage

- III non-small-cell lung cancer in consideration as to therapeutic outcomes and morbidity. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 1998 58:497-502
67. Kotsianos D., Bach D., Gamarra F., Haimerl W., Knüchel R., Lang S., Pfeifer K.J., Huber R.M. High-dose-rate brachytherapy: dose escalation in three-dimensional miniorgans of the human bronchial wall. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2000 46:1267-1273
68. Kuroi K., Tanaka C., Toi M. Plasma nucleosome levels in node-negative breast cancer patients. *Breast Cancer* 1999 6:361-364
69. Kwok T.T., Sutherland R.M. Cell cycle dependence of epidermal growth factor induced radiosensitization. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1992 22:525-527
70. Kyrz-Krzemien S., Helbig G., Stella-Holowiecka B., Holowiecki J. Preliminary results of monotherapy with thalidomide in recurrent and treatment resistant cases of multiple myeloma. *Wiad. Lek.* 2003 56:227-232
71. Lechner J.F., Haugen A., Autrup H., McClendon I.A., Trump B.F., Harris C.C. Clonal growth of epithelial cells from normal adult human bronchus. *Cancer Res.* 1981 41:2294-2304
72. Lechner J.F., Haugen A., McClendon I.A., Pettis E.W. Clonal growth of normal adult human bronchial epithelial cells in a serum-free medium. *In Vitro* 1982 18:633-642
73. Lutterbach J., Sauerbrei W., Guttenberger R. Multivariate analysis of prognostic factors in patients with glioblastoma. *Strahlenther. Onkol.* 2003 179:8-15
74. Macierira-Coelho A., Diatloff C., Billard M., Fertil B., Malaise E., Fries D. Effects of low dose rate irradiation on the division potential of cells in vitro. IV. Embryonic and adult human lung fibroblast-like cells. *J. Cell Physiol.* 1978 95:235-238

75. Maity A., Kao G.D., Muschel R.J., McKenna W.G. Potential molecular targets for manipulating the radiation response. *Int. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 1997 37:639-653
76. Maity A., McKenna W.G., Muschel R.J. The molecular basis for cell cycle delays following ionising radiation: a review. *Radiother. Oncol.* 1994 31:1-13
77. Marples B., Lambin P., Skov K.A., Joiner M.C. Low dose hyper-radiosensitivity and increased radioresistance in mammalian cells. *Int. J. Radiat. Biol.* 1997 71:721-735
78. McKenna W.G., Muschel R.J., Gupta A.K., Hahn S.M., Bernhard E. The RAS signal transduction pathway and its role in radiation sensitivity. *Oncogene* 2003 22:5866-5875
79. Michalowski A. Effects of radiation on normal tissue: hypothetical mechanisms and limitations of in situ assays of clonogenicity. *Radiat. Environ. Biophys.* 1981 19:157-172
80. Mitchell J.B., Bedford J.S., Bailey S.M. Dose rate effects in mammalian cells in culture III. Comparison of cell killing and cell proliferation during continuous irradiation for six different cell lines. *Radiat. Res.* 1979 79:537-551
81. Morris G.M. Review article: Effects of radiation on the cell proliferation kinetics of epithelial tissues-therapeutic implications. *Brit. J. Radiol.* 1996 69:795-803
82. Moussa H., Mitchell S.A., Grenman R., Joiner M.C. Cell-cell contact increases radioresistance in head and neck carcinoma cell lines. *Int. J. Radiat. Biol.* 2000 76 :1245-1253
83. Murnane J.P. Cell cycle regulation in response to DNA damage in mammalian cells: a historical perspective. *Cancer Metastasis Rev.* 1995 14:17-29
84. O'Connell J.P., Kris M.G., Gralla R.J., Groshen S., Trust A., Fiore J.J., Kelsen D.P., Heelan R.T., Golbey R.B. Frequency and prognostic importance of pre-

- treatment clinical characteristics in patients with advanced non-small-cell lung cancer treated with combination chemotherapy. *J. Clin. Oncol.* 1986 4:1604-1614
85. Ohnuki Y., Reddel R.R., Bates S.E., Lehmann T.A., Lechner J.F., Harris C.C. Chromosomal changes and progressive tumorigenesis of human bronchial epithelial cell lines. *Cancer Genet. Cytogenet* 1996 2:99-110
86. Olive P.L. The role of DNA single- and double-strand breaks in cell killing by ionizing radiation. *Radiat. Res.* 1998 150(Suppl.5):42-51
87. Olive P.L., Durand R.E. Drug and radiation resistance in spheroids: cell contact and kinetics. *Cancer Metastasis Rev.* 1994 13:121-138
88. Omenn G.S., Merchant J., Boatman E., Dement J.M., Kuschner M., Nicholson W., Peto J., Rosenstock L. Contribution of environmental fibers to respiratory cancer. *Environ. Health Perspect.* 1986 70:51-56
89. Oya N., Zölzer F., Werner F., Streffer C. Effects of serum starvation on radiosensitivity, proliferation and apoptosis in four human tumor cell lines with different p53 status. *Strahlentherapie und Onkologie* 2003 179:99-106
90. Racher A.J., Looby D., Griffiths J.B. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology* 1990 3:301-307
91. Reddel R.R., Yang K., Rhim J.S., Brash D., Lechner J.F., Harris C.C., Amstad P. *J. Tissue Cult. Methods* 1985 9:43-48
92. Reddel R.R., Ke Y., Gerwin B.I., McMenamin M.G., Lechner J.F., Su R.T., Brash D.E., Park J.B., Rhim J.S., Harris C.C. Transformation of human bronchial epithelial cells by infection with SV40 or adenovirus-12 SV40 hybrid virus, or transfection via strontium phosphate coprecipitation with a plasmid containing SV40 early region genes. *Cancer Res.* 1988 48:1904-1909
93. Sanderson M.J., Sleigh M. Ciliary activity of cultured rabbit tracheal epithelium: beat pattern and metachrony. *J. Cell. Sci.* 1981 47:331-347

94. Sinclair W.K., Morton R.A. X-ray sensitivity during the cell generation of cultured chinese hamster cells. *Radiat. Res.* 1966 29:450-474
95. Statistisches Bundesamt (Hrsg.) Todesursachen. Gesundheitswesen, Fachserie
96. Steinsvag S.K., Strand M., Berg Ø., Miaguchi M., Olofsson J. Human respiratory mucosa in nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* 1991 101:1323-1331
97. Terasima T., Tolmach L.J. Variations in several responses of HeLa cells to X-irradiation during the division cycle. *Biophys. J.* 1963 3:11-33
98. Thein F., Huber R.M., Kleinsasser R., Bals R., Wehling M., Gamarra F. proliferation and vitality of three dimensional organ cultures of human respiratory epithelium after hyperthermia and mechanical lesion. *Eur. Respir. J.* 1996 Suppl. 23 9 :187 (Abstract)
99. Trichopoulos D., Kalandidi A., Sparros L. Lung cancer and passive smoking: conclusion of Greek study. *Lancet* 1983 2:677-678
100. Tsuchida Y., Tsuboi K., Ohyama H., Ohno T., Nose T., Ando K. Cell death induced by high-linear-energy transfer carbon beams in human glioblastoma cell lines. *Brain Tumor Pathol.* 1998 15: 71-76
101. U.S. Dept. Health Human Services, Public Health Services, Centres for Disease Control. Reducing the health consequences of smoking: 25 years of progress. A Report of the Surgeon General 1989 89: 8411
102. Velasquez W.S., Fuller L.M., Jagannath S., Tucker S.L., North L.B., Hagemeister F.B., McLaughlin P., Swan F., Redman J.R., Rodriguez M.A., Cabanillas F. Stages I and II diffuse large cell lymphomas : prognostic factors and long-term results with CHOP-Bleo and radiotherapy. *Blood* 1991 77 :942-947

103. Waldschmidt A. Die akute Strahlenreaktion des Bronchialepithels beim Schwein nach endoluminaler high-dose-rate Bestrahlung mit Ir-192 im Afterloadingverfahren. (Dissertation Veterinärmedizin) 1994
104. Watanabe M., Suzuki K., Kodama S. Molecular mechanism of cell death by radiation. *Nippon Igaku Hoshasen Gakkai Zasshi* 2002 62:540-544
105. Yoshida N., Arima M., Cheng G., Eda F., Hirata H., Honda K., Fukushima F., Fukuda T. Interleukin (IL)-4/IL-9 and exogenous IL-16 induce IL-16 production by BEAS-2B cells, a bronchial epithelial cell line. *Cell. Immunol.* 2001 207:75-80

7. Danksagung

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Mutter, die mich allzeit bei der Verwirklichung meines Traumes Arzt zu werden unterstützt hat, mir das Studium ermöglicht hat und immer an mich geglaubt hat.

Des Weiteren danke ich Herrn OA Prof. Dr. med. R.M. Huber, Leiter der pneumologischen Abteilung der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU für die menschliche und fachliche Unterstützung und die freundliche Aufnahme als Doktorandin in die Abteilung.

Insbesondere sei auch Herrn Dr. med. A. Bergner, der die Arbeit betreute und mir jederzeit bei theoretischen und Labor-technischen Problemen helfend zur Seite stand und viele Anregungen zur Versuchsplanung und Durchführung gegeben hat, gedankt.

Desweiteren unterstützten die Arbeit die Labor-erfahrenen Mitarbeiter Dr. med. F. Gamarra, sowie Frau Dr. med. S.T. Astner, welche wertvolle Tips und Hinweise gaben, wofür ich mich auch herzlich bedanken möchte.

Dank geht auch an die Mitarbeiter der Strahlentherapie Herrn Dipl. Phys. W. Haimerl und Herrn Dipl. Phys. C. Winkelhofer, welche nicht nur eine Mittagspause für die Betreuung der Bestrahlungsprozedur opferten sondern mir auch physikalische Sachverhalte zum Bestrahlungsvorgang darlegten.

An dieser Stelle auch vielen Dank an die Mitarbeiter der Thoraxchirurgie der Asklepios-Fachklinik in Gauting für die großzügige Bereitstellung von OP-Präparaten für die Kultivierung der Organkulturen.

Bei meinen Mitdoktoranden M. Edelmann, D. Kraijciova, P. Lingk, E. Stauß, sowie den übrigen Kollegen der Pneumologie, welche auch im Klinik-Alltag mit Rat und Tat zur

Seite standen möchte ich mich für die gute Zusammenarbeit und das nette Arbeitsklima bedanken.

8 Curriculum vitae

Name: Jutta Bärbel Stief
Geburtsdatum: 09.01.1973
Geburtsort: Weilheim
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1979 - 1983 Volksschule am Hardt Weilheim i. OB
1983 - 1992 Gymnasium Weilheim i. OB
1992 Abitur am Gymnasium Weilheim i. OB

Freiwilliges Soziales Jahr :

1992 - 1993 abgeleistet auf einer chirurgischen Station im Kreiskrankenhaus
Weilheim
1993 - 1994 6 monatige Tätigkeit als Aushilfskraft im Kreiskrankenhaus Weilheim
auf Stationen unterschiedlicher Fachrichtung

Studium :

11/1994 Erhalt eines Teilstudienplatzes an der
Ludwig Maximilian Universität München
05/1995 Erhalt eines Vollstudienplatzes an der LMU München
09/1997 Ablegen der Ärztlichen Vorprüfung
08/1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03/2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
06/2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Famulaturen: Innere Medizin: Krankenhaus der Missions - Benediktinerinnen Tutzing
Dermatologie: Dermatologische Klinik und Poliklinik der LMU
Innere Medizin: Krankenhaus Dritter Orden München
Allgemeinmedizin: Gemeinschaftspraxis Dr.Itzelsberger, Dr. Langer
Weilheim

Praktisches Jahr:

04/2001 – 08/2001 Chirurgie: Kreiskrankenhaus Starnberg
08/2001 – 12/2001 Neurologie: Städtisches Krankenhaus München – Harlaching
12/2001 – 03/2002 Innere Medizin: Medizinische Poliklinik Klinikum Innenstadt der LMU

Berufliche Tätigkeit:

10/2002 - 03/2004 AiP in der Abteilung Kardiologie Medizinische Poliklinik
Klinikum Innenstadt der LMU
Seit 03/2004 Assistenzärztin in der Abteilung Kardiologie Medizinische Poliklinik
Klinikum Innenstadt der LMU