

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik V
Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Jürgen Behr

Die Auswirkung von Cisplatin auf die mukoziliäre Funktion von humanen Nasenepithelzellen

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

vorgelegt von

Nermina Bučan-Dedić

aus

Sarajevo

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. Dr. Nikolaus Kneidinger
Mitberichterstatterin: PD Dr. Sophia Horster
Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel
Tag der mündlichen Prüfung: 06.06.2019

Gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	6
Tabellenverzeichnis.....	7
Abkürzungsverzeichnis.....	8
1. Einleitung und Zielsetzung dieser Arbeit	9
1.1. Die Funktion des mukoziliären Epithels	9
1.1.1. Etablierte Methoden zur Untersuchung der mukoziliären Funktion.....	9
1.1.2. Der Saccharintest	9
1.1.3. Rhinoszintigraphie.....	10
1.1.4. Die digitale Highspeed-Video-Methode	10
1.1.5. Die Photoverstärker-Methode	10
1.1.6. Untersuchung der mukoziliären Funktion anhand der Sphäroide aus humanem respiratorischem Epithel	10
1.2. Primäre und sekundäre Störfaktoren für die Funktion des Flimmerepithels.....	11
1.3. Cisplatin	14
1.3.1. Pharmakodynamische Eigenschaften	14
1.3.2. Pharmakokinetische Eigenschaften	15
1.3.3. Die Wirkung von Cisplatin auf Endorgane	15
1.4. Zielsetzung der Arbeit	19
2. Material und Methoden	22
2.1. Kohorte.....	22
2.1.1. Gewinnung von Nasenepithel.....	23
2.1.2. Kultivierung des nasalen respiratorischen Epithels	23
2.1.3. Herstellung der Zellkulturen	24
2.1.4. Zählung und Beurteilung der entstandenen Sphäroide.....	25
2.2. Grundmedienherstellung.....	25
2.2.1. Herstellung von AECGM	25
2.2.2. Herstellung von DMEM.....	26
2.3. Bestimmung der mukoziliären Funktion	26
2.3.1. Durchführung des Versuchs zur Messung der mukoziliären Funktion.....	27
2.3.2. Messung der Rotationsfrequenz.....	29
2.3.3. Erhebung der Durchmesser der Sphäroide.....	29
2.3.4. Erhebung der mukoziliären Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide	30
2.4. Versuchsreihen	31

2.4.1. Versuchsvorbereitungen und Aufbau.....	31
2.4.2. Aufteilung der Sphäroide.....	31
2.5. Medium DMEM/NCS-Versuchsreihe	32
2.5.1. Kultivierung der nasalen Sphäroide für die DMEM/NCS-Versuchsreihe.....	32
2.5.2. Versuchsaufbau für die Medium DMEM/NCS-Gruppe.....	32
2.6. Cisplatin Versuchsreihe	33
2.6.1. Versuchsaufbau für die Cisplatin-Gruppe.....	33
2.7. Bestimmung der Rotationsgeschwindigkeit	34
3. Ergebnisse	35
3.1 Anzahl der Gesamt-Sphäroide und der rotierenden Sphäroide an Tag 1/ Tag 2 / Tag 3	35
3.2. Statistische Auswertung	38
3.2.1. Vergleich des Anteils rotierender Sphäroide über die Zeit.....	39
3.3. Statistische Auswertung der ausgewerteten Sphäroide	39
3.3.1. Statistische Auswertung der Rotationsfrequenz der Sphäroide ohne kontinuierlicher Zugabe von Medium oder Cisplatin (ohne Flow)	41
3.3.2. Statistische Auswertung der Rotationsfrequenz der Sphäroide mit kontinuierlicher Zugabe (Flow) von 1 mg/ml Cisplatin mit einer Geschwindigkeit von 0,1 ml/min über 30 min.	42
3.3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	42
4. Diskussion.....	44
4.1. Diskussion des Materials und der Methodik.....	44
4.2. Diskussion der Ergebnisse	48
4.2.1. Vergleich der Kultur DMEM/NCS versus Cisplatin	48
5. Zusammenfassung.....	52
6. Literaturverzeichnis	54
Danksagung	59

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Darstellung eines Cisplatin- DNA- Komplexes (27).....	18
Abbildung 2: Versuchsaufbau: Doppelkammer mit über die Pumpe angeschlossenem Wasserbad und Thermometer (6).....	28
Abbildung 3: Neubauer-Kammer	29
Abbildung 4: Aufbau des Zählerfeldes bei der Neubauer Kammer	30
Abbildung 5: Versuch 5, Well 4, (Kultur DMEM/NCS); Vergrößerung 1:100	32
Abbildung 6: Vergleich des Anteils rotierender Sphäroide über die Zeit	39
Abbildung 7: Rotationsfrequenz der Sphäroide ohne Flow	41
Abbildung 8: Rotationsfrequenz der Sphäroide mit Flow	42

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht der Probanden 22-23

Tabelle 2: Anzahl der Gesamt-Sphäroide und der rotierenden Sphäroide an Tag 1/ Tag 2/ Tag 3 der Probanden 1-6 35-38

Abkürzungsverzeichnis

AECBM	Airway Epithelial Cell Basal Medium
AECGM	Airway Epithelial Cell Growth Medium
Ca2+	Calcium
°C	Grad Celsius
d	Durchmesser des Sphäroids
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle´s Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	Epidermal Growth Factor
GCP	good clinical practize
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperracin-N-2-Ethansulfonsäure
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
ml/h	Milliliter pro Stunde
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MTV	Mukoziliare Transportgeschwindigkeit
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
NCS	Newborn Calf Serum
NES	Neugeborenen Kälberserum
π	pi=3,14
PCD	Primäre Ciliäre Dyskinesie
PET	Polyethylenterephthalat
R	Rotationsfrequenz
RNA	Ribonukleinsäure
t	Zeit
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
U	Umdrehungen
V	Geschwindigkeit

1. Einleitung und Zielsetzung dieser Arbeit

1.1. Die Funktion des mukoziliären Epithels

Das humane Atemwegssystem wird von einem mehrreihigen Flimmerepithel ausgekleidet, welches die mukoziliäre Funktion ausführt. Auf jeder einzelnen Epithelzelle befinden sich ca. 200 Kinozilien oder Zilien, welche beweglich sind (1). Sie schlagen mit einer Frequenz von ca. 25 Schlägen pro Sekunde und sind 5-7 µm lang. Das optimale Milieu für das Flimmerepithel wird von den Becherzellen sowie den Glandulae bronchiales durch die Produktion des Mukus hergestellt. Somit ist die Viskoseelastizität für die mukoziliäre Funktion von großer Bedeutung (2, 3, 4, 5). Zudem ist der Bewegungsablauf der Zilien ein wichtiger Bestandteil der mukoziliären Schutzfunktion. Die eingeatmeten Partikel, wie Aerosole, Staub und Mikroorganismen, werden oralwärts transportiert, verschluckt oder abgehustet. Die Schlagfrequenz der Zilien ist am Vormittag signifikant höher und nimmt im Tagesverlauf ab. Die mukoziliäre Clearance ist ein wichtiger Abwehrmechanismus (6, 7, 8).

1.1.1. Etablierte Methoden zur Untersuchung der mukoziliären Funktion

Hier werden die am häufigsten benutzten Methoden zur Messung der mukoziliären Funktion *in vitro* und *in vivo* kurz dargestellt.

1.1.2. Der Saccharintest

Der Saccharintest stellt den einfachsten und schnellsten Weg zur Überprüfung der mukoziliären Funktion beim Menschen dar. Man legt eine definierte Menge Saccharin auf die Concha nasalis inferior und ermittelt, nach welcher Zeit der Proband diesen Saccharinschmack wahrnimmt. Bei normaler mukoziliärer Funktion gibt der Proband nach ca. 12-15 min an, diesen wahrzunehmen (9).

1.1.3. Rhinoszintigraphie

Zur funktionellen Bestimmung der mukoziliären Funktion *in vivo* wird die Rhinoszintigraphie herangezogen. Hierfür wird ein Tropfen gelösten Tc-99m-Albumins im unteren Nasengang platziert und mittels einer Gammakamera verfolgt. Durch Auswertung der Bilder wird die Transportgeschwindigkeit ermittelt. Die Messmethode wird vor und nach operativen Polypenextirptionen empfohlen (12, 13, 14).

1.1.4. Die digitale Highspeed-Video-Methode

Unter einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM) mit Highspeed-Videokamera können Biopsien von Flimmerepithel untersucht werden. Es werden fünfhundert Aufnahmen pro Sekunde gemacht. Hiermit können dann die ziliäre Schlagfrequenz sowie die Struktur der Zilien qualitativ und quantitativ beschrieben und ausgewertet werden (15, 16, 17, 18).

1.1.5. Die Photoverstärker-Methode

Bei dieser Untersuchung werden die entnommenen Biopsien des respiratorischen Epithels in ein Medium gebracht, dem verschiedene Testsubstanzen zugegeben werden. Der Versuchsaufbau liegt unter einem Lichtmikroskop. Die durch die schlängelnde Bewegung einzelner Zilien verursachten Veränderungen der Lichtintensität können über einen Photodetektor oszilloskopisch visualisiert werden. Die ziliäre Schlagfrequenz kann so unter Zuhilfenahme der Fast- Fourier- Transformation unter definierten Bedingungen ermittelt werden (19), in dem die Veränderungen der Lichtintensität durch Darstellung eines Frequenzspektrums visualisiert wird.

1.1.6. Untersuchung der mukoziliären Funktion anhand der Sphäroide aus humanem respiratorischem Epithel

Bei dieser Untersuchung wird die Rotationsgeschwindigkeit der Nasenepithel-Sphäroide als Messparameter für die mukoziliäre Funktion verwendet (20). Corssen und Allen (21, 22) beschrieben erstmals, dass sich aus Fragmenten respiratorischen Epithels in Kulturmedium „little globes“ bilden, die wegen ihrer geschlängelten Zilien an der äußeren Oberfläche rotieren. Hierfür wurden Biopsien von Trachea und Bronchien in das Kulturmedium gegeben. In anderen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe konnte kein Unterschied in der Rotationsfrequenz zwischen Tracheal- und Nasenepithel-Sphäroiden gezeigt werden (6). Gamarra et al. zeigten, dass die Geschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide in der Größenordnung der Transportgeschwindigkeit respiratorischen Epithels beim Menschen *in vivo* liegt. Somit kann die Geschwindigkeit der im Schleim rotierenden Sphäroide als Äquivalent zur Transportgeschwindigkeit, mit der die Zilien *in vivo* den Schleim befördern, angenommen werden (20).

1.2. Primäre und sekundäre Störfaktoren für die Funktion des Flimmerepithels

Funktionsstörungen des respiratorischen Flimmerepithels können primäre und sekundäre Ursachen zur Grunde liegen.

Unter Primären Ciliären Dyskinesien (PCD) wird eine heterogene Gruppe angeborener Erkrankungen des Zilienapparates zusammengefasst, die sich sowohl in der klinischen Präsentation als auch in der genetischen Ursache unterscheiden. Als sekundäre Störfaktoren werden exogene Einflüsse, beispielsweise Temperaturschwankungen, Rauchen, postinfektiöse Ziliendysfunktion oder medikamentöse Einflüsse zusammengefasst.

Alle unter der PCD zusammengefassten Erkrankungen einigt eine Fehlfunktion des Zilienapparates. Auffällig ist eine überzufällige Koinzidenz einer PCD mit dem Vorliegen eines Situs inversus. Unter dem Namen Kartagener-Syndrom wird das gleichzeitige Auftreten einer PCD und eines Situs inversus in der Literatur bezeichnet. Die Prävalenz der

PCD wird mit ca. 500.000 Patienten weltweit angegeben. Infolge der dysfunktionellen Ziliien kumuliert der Mukus in den oberen Atemwegen und kann nicht passiv oralwärts abtransportiert werden. Infolgedessen kommt es gehäuft zu mikrobiellen Infektionen der Atemwege sowie der Nasennebenhöhlen und des Mittelohres. Das rezidivierende Auftreten von Infektionen erhöht das Risiko einer Chronifizierung mit im Verlauf strukturellen Organschäden. Die betroffenen Kinder fallen bereits im Neugeborenenalter durch eine angestrengte Atemarbeit auf, häufig werden sekretverlegte Atemwege beobachtet und durch rezidivierende Hustenanfälle kann es zu einem Kollaps einzelner Lungenabschnitte kommen. Infolge der gestörten mukoziliären Clearance nimmt im Verlauf nicht nur die Häufigkeit von Infektionen der Atemwege zu, zusätzlich werden schon im Kleinkindalter gehäuft Adenoide und Mittelohrinfektionen beobachtet. Prognostisch sind die Infektionen der Lunge bestimmend, da es neben strukturellen Veränderungen infolge der Chronifizierung zu einem gehäuften Auftreten von Pneumothoraces kommt. Insbesondere wenn es nicht gelingt, kollabierte Lungenabschnitte wiederzueröffnen, sind diese als Herde chronischer Infektionen zu betrachten. Der Ventilmechanismus von sekretverstopften Bronchien kann zur Entwicklung von Bronchiektasien führen (60). Die Diagnosestellung erfolgt durch die Analyse von zilientragenden Zellen der Nasenschleimhaut wie oben beschrieben.

Als ein weiterer relevanter Auslöser der ziliären Dysfunktion wird die Mukoviszidose, die zu den Stoffwechselerkrankungen gezählt wird, gerechnet. Sie ist eine autosomal-rezessive Erbkrankheit der exokrinen Drüsen, bei der ein Defekt der Chloridkanäle in der Membran der Epithelzellen besteht. Durch diesen Kanaldefekt ist der Transport für Chlorid und Natrium gestört, wodurch die Mukoviskosität stark verändert wird (73). Im respiratorischen System kommt es aufgrund des zähen Schleimes zu rezidivierendem Husten sowie pulmonalen Infekten, u.a. verursacht durch *Pseudomonas aeruginosa*, *Bukholderia cepacia*

oder *Staphylococcus aureus*. Im weiteren Verlauf entwickeln die Patienten oft ein ausgeprägtes obstruktives Emphysem. Die mukoziliäre Funktion wird hier scheinbar durch die Abnahme der periziliären Flüssigkeit negativ beeinflusst und die eingeschränkte Zilienfunktion lässt eine bakterielle Überwucherung und Entzündung der Lunge zu (74, 75).

Zu den relevantesten sekundären Störfaktoren der Zilienfunktion wird der tägliche Zigarettenkonsum gezählt. Infolge des hochfrequenten Nikotinkonsums kommt es zu morphologischen Veränderungen durch eine Epithelverdickung sowie eine Hyperplasie von Becherzellen des Respirationstraktes. Zudem kommt es zu einer Proliferation von Alveolarmakrophagen. Dies führt zum Verlust von Zilien sowie einem signifikant erhöhten Risiko zur Entwicklung einer Plattenepithelmetaplasie (71). Einige Studien haben gezeigt, dass sich der Zigarettenkonsum in Abhängigkeit der Konzentration des Nikotins negativ auf die ziliäre Schlagfrequenz auswirken kann (72).

Häufig werden sekundäre Zilienfunktionsstörungen bei Atemwegsinfektionen beobachtet. Die Diagnostik und die Differentialdiagnose basieren auf dem typischen klinischen Bild mit verdickten Schleimhäuten, erschwerter Nasenatmung und Dyspnoe. Die Zilienstruktur kann unter einem Elektronenmikroskop untersucht werden, wo sich die Veränderungen ihrer Morphologie nachweisen lässt (96). Ein weiterer relevanter Faktor für die Beeinträchtigung der Schlagfrequenz der Zilien sind Temperaturschwankungen. So konnten Gamarra et al eine Zunahme der Schlagfrequenz bei einer Temperatursteigerung von 37° bis 40° Celsius feststellen, bei über 40 ° Celsius kam es zu einer signifikanten Abnahme der Schlagfrequenz (20).

Die Frequenz des Zielschlags kann unter dem Einfluss verschiedener Faktoren stimuliert oder gehemmt werden. Beispielweise kann die Schlagfrequenz der Zilien durch ATP, Adrenalin, Terbutalin (61, 62, 63, 64, 65), Calcitonin gene-related peptide (66) und durch Prostaglandine (67) stimuliert werden. Eine Hemmung der Schlagfrequenz der Zilien wird

unter anderen durch Stoffe wie Lokalanästhetika (68), Opioide (69) und Nitrogenoxide (70) hervorgerufen.

Bislang liegen keine ausreichenden Daten zur Funktionsstörung des respiratorischen Flimmerepithels unter chemotherapeutischer Behandlung vor.

1.3. Cisplatin

Cisplatin (cis-Diammildichloroplatin II) ist eines der am meisten verwendeten Chemotherapeutika (23). Die chemische Struktur basiert auf einem komplex gebundenen Platinatom. Die antitumoröse Wirkung basiert auf einer Vernetzung von DNA-Molekülen, was zu Apoptose führt. Durch die Vernetzung der DNA-Stränge kommt es zu einer Störung des Zellstoffwechsels und in dessen Folge zur Apoptose. Aufgrund der unspezifischen Wirkweise treten diese Effekte- analog zu anderen Zytostatika- nicht nur bei maligne entarteten Zellen, sondern auch bei gesunden Körperzellen mit hoher Teilungsrate auf. (56, 57, 58).

1.3.1. Pharmakodynamische Eigenschaften

Als anorganische Verbindung, die mit Platin ein Schwermetall enthält (cis-Diammildichloridoplatin II), hemmt Cisplatin durch Bildung von Vernetzungen einzelner DNA-Stränge die DNA- Synthese. In weitaus geringerem Umfang werden auch die Synthese von Proteinen und RNA gehemmt. Neben der Hemmung der DNA-Synthese werden auch andere Wirkmechanismen des Cisplatins beschrieben, hierzu zählt insbesondere die Steigerung der Immunogenität von Tumorzellen. Alkylierende Substanzen sind in ihrem Wirkprofil dem Cisplatin ähnlich. Neben den oben beschriebenen Eigenschaften verfügt Cisplatin auch über eine radiosensibilisierende, antibakterielle und immunsuppressive Potenz. Sämtliche Effekte von Cisplatin scheinen Zellzyklus- unspezifisch zu sein. Die bevorzugte Bindung von Cisplatin an die N-7- Position von Guanin und Adenosin - auch andere DNA- Basen sind potentielle Bindungspartner - begründet die zytotoxische Wirkung dieser Substanz (59).

1.3.2. Pharmakokinetische Eigenschaften

Nach intravenöser Anwendung wird Cisplatin rasch in allen Geweben verteilt. Die höchsten Konzentrationen werden in Leber, Nieren, Harnblase, Muskelgewebe, Haut, Hoden, Prostata, Pankreas und Milz erreicht. Nach intravenöser Anwendung verläuft die Elimination von filtrierbarem, nichtproteingebundenem Cisplatin zweiphasig, wobei die initiale und terminale Halbwertszeit bei 10 – 20 Minuten respektive 32 – 53 Minuten liegt. Die Elimination der Platin-Gesamtmenge verläuft in drei Phasen mit einer Halbwertszeit von 14 Minuten, 274 Minuten bzw. 5,3 Tagen. Cisplatin liegt zu 90% an Plasmaproteine gebunden vor. Die Ausscheidung erfolgt überwiegend über den Harn. 27 – 43 % der verabreichten Dosis sind innerhalb der ersten fünf Tage nach der Behandlung im Harn nachweisbar. Ebenso wird Cisplatin auch über die Galleflüssigkeit ausgeschieden (59).

1.3.3. Die Wirkung von Cisplatin auf Endorgane

Gegenstand dieser Arbeit war es, genau zu untersuchen, welche Auswirkung das Cisplatin auf die mukoziliäre Funktion aufweist unter der Annahme, dass die mukoziliäre Funktion deutlich eingeschränkt sein wird und die Rotationsfrequenz der hier in vitro Modell verwendeten Sphäroide abnehmen wird.

Der Aqua-Cisplatin-Komplex reagiert aufgrund seiner hohen Elektrophilie bevorzugt mit dem N-7- Atom von Guanin und Adenin. Hierdurch entstehen entweder Verknüpfungen innerhalb eines DNA-Stranges (Intrastrang-Quervernetzung) oder zwischen benachbarten DNA-Strängen (Interstrang Quervernetzungen). Zusätzlich kann das Auslösen von Punktmutationen als weiterer Wirkmechanismus angesehen werden. Darüber hinaus führt Cisplatin zu einer Hemmung der DNA-Reparatur sowie der Telomeraseaktivität. Durch alle genannten Wirkungsmechanismen kommt es zur Induktion der Apoptose in sich schnell teilenden Zellen (27). Nach intravenöser Gabe bleibt der Wirkstoff zunächst im

Serum und erreicht durch passive Diffusion das intrazelläre Kompartiment. Wahrscheinlich bindet nur etwa ein Prozent des aufgenommenen Cisplats die intrazelluläre DNA. Der Rest wird von löslichen und unlöslichen Proteinen gebunden. Der vollständige Metabolismus ist noch nicht abschließend erforscht. In der Onkologie wird Cisplatin in vielen Erstlinientherapien aufgrund seiner im Vergleich guten Ansprechrate der behandelten Tumoren verwendet (23, 24, 25, 26). Das hochwirksame Cisplatin wird bei vielen onkologischen Erkrankungen eingesetzt, eine Limitierung zur Fortführung der Therapie beruht immer auf seinem ausgeprägten Nebenwirkungsprofil. So ist bekannt, dass vor allem die Nephrotoxizität (55) oft eine Dosislimitierung bedingt. Zudem erleiden viele Krebspatienten einen Tumorprogress bei beobachteter Cisplatinresistenz, bedingt durch Änderungen in der zellulären Aufnahme, des Metabolismus des Wirkstoffes in der Niere und der Leber sowie einer Steigerung der DNA-Reparatur und anti-apoptotischer Mechanismen (92). Um die Resistenzentwicklung zu überwinden, wird Cisplatin regelhaft in Kombination mit anderen Medikamenten verwendet. Bei niedrigen intrazellulären Chloridionenkonzentrationen hydrolysiert das Cisplatin in unterschiedlich geladene reaktive Formen, welche ca. tausend Mal stärker wirken als das normale Cisplatin und bewirkt eine Hemmung der Mitochondrien durch Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung (93). Daraus resultiert ein Ausstrom von Calcium aus den Mitochondrien und ein Anstieg des intrazellulären Calciums, was zu einer Störung in der normalen Calciumhomöostase führt und damit die normale Zellfunktion beeinträchtigt. Das Glutathion scheint essential für die Permeabilität der Mitochondrien-Membran und für die Enzymfunktion zu sein, indem es die SH-Gruppe in reduzierter Form behält. Ist die SH-Gruppe nicht in dieser reduzierten Form so wird das Enzym inaktiviert. Cisplatin induzierte Toxizität insbesondere die Nephrotoxizität scheint durch eine Abnahme der intrazellulären Gluthation Konzentration zu stehen. Unter Cisplatin Einwirkung wird auch das Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid welches für die Aufrechterhaltung der SH-Gruppen notwendig ist reduziert. Folglich scheint diese Abnahme

zur einer Hemmung der Dehydrogenase zu führen, was zur Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung führt und zum oxydativen Stress. Dieser Prozess ist autolytisch und verursacht schwere Schäden an der Mitochondrien-Membran (94). Die Nephrotoxizität oder ein akutes Nierenversagen unter Cisplatinbehandlung tritt bei etwa einem Drittel der Patienten auf (82-87).

Wie Cisplatin zur Schädigung von gesunden Zellen führt, ist nicht im Detail bekannt. Wie genau Cisplatin die mukoziliäre Funktion beeinflusst, ist bislang nicht untersucht worden. Gonzalez et al konnten zeigen, dass Cisplatin eine zytotoxische Wirkung aufweist auch ohne DNA-Schädigung (76). In weiteren Studien konnte gezeigt werden, dass das Cisplatin eine Apoptose auch in zellkernlosen Zytoblasten indiziert (77). So weist das Cisplatin weitere Angriffspunkte auf, da nur ca. ein Prozent eine intrazelluläre Interaktion mit der DNA aufweist (78). Park et al zeigten, dass Cisplatin einen Einfluss auf viele Proteine und Ionenkanäle aufweist, letztendlich wie der Apoptoseweg in Tumorzellen zu Stande kommt ist noch unzureichend geklärt (79, 80). Cisplatin scheint jedoch auch seine Wirkung über das Calciumion zu entfalten was in einer weiteren Arbeit aus unserer Arbeitsgruppe unter genaueren Betrachtung der Veränderung des Calciumhaushaltes des respiratorischen Epithels unter Cisplatinbehandlung untersucht wurde (45). Berger et al zeigten bereits in ihren Versuchen, dass es einen niedrigeren Calciumgehalt in den kleinzelligen Lungenkarzinomzelllinien im Vergleich zu gesunden Lungenepithel gab, wodurch erkenntlich wurde, dass die Veränderungen des intrazellulären Calciumhaushaltes in den Lungenkrebszellen eine wichtige Rolle zuzuschreiben wäre (49, 81).

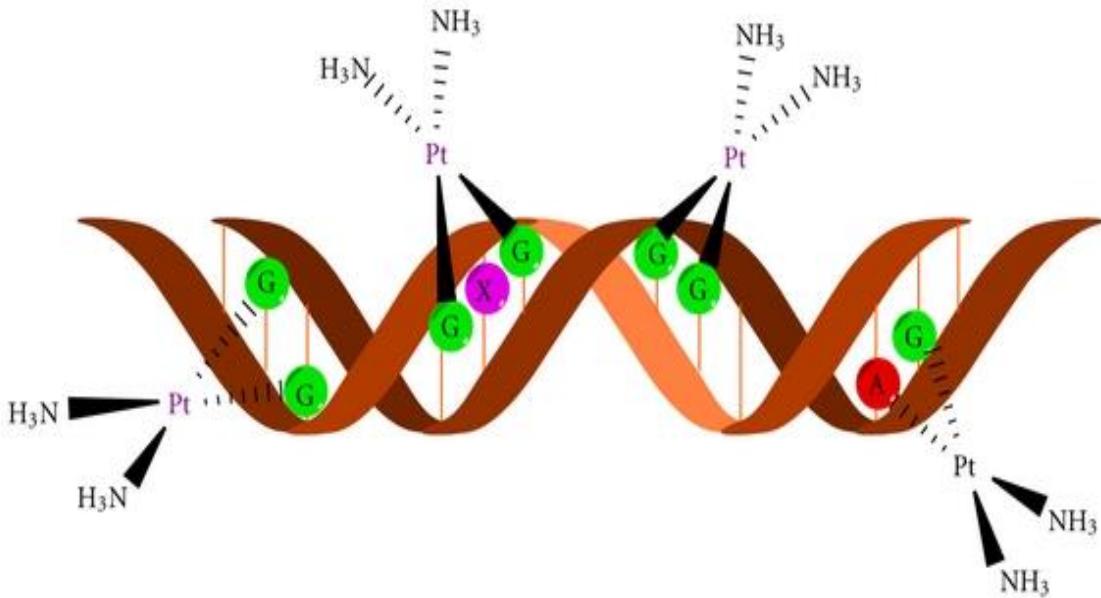


Abbildung 1: Darstellung eines Cisplatin- DNA- Komplexes. Wie dargestellt kommt es zu Querverknüpfungen zwischen Guaninen der DNA und dem zentralen Platinion (27).

In Analogie zu anderem Chemotherapeutika sind viele unerwünschte Wirkungen von Cisplatin beschrieben. Unter anderem verursacht es meist passagere Schädigungen im Knochenmark mit Anämie, Thrombozytopenie und Neutropenie bis hin zur Agranulozytose. Zudem können Schädigungen an Herz, Nieren, Muskeln, Hör- und Sehorganen sowie an der Leber und Haut entstehen (28). Die hohe emetische Potenz des Medikamentes erfordert eine prophylaktische antiemetische Therapie vor jeder Gabe.

Aufgrund seines breiten Wirkspektrums und seiner Effektivität ist Cisplatin ein weit verbreitetes Chemotherapeutikum in der Therapie solider Tumoren. In verschiedenen Therapielinien kommt Cisplatin sowohl in (neo-) adjuvanten als auch in palliativen Therapiekonzepten zum Einsatz. So werden Hoden-, Ovarial-, Harnblasen-, Zervix- und nicht kleinzellige Bronchialkarzinome sowie Plattenepithelkarzinome von Hals und Kopf hiermit behandelt (43). In der Gastroenterologie wird Cisplatin beispielsweise zusammen mit Gemcitabine in der palliativen Therapie der Cholangiozellulären Karzinome eingesetzt (54). In Kombination mit anderen Zytostatika wird Cisplatin sowohl in der primären als auch ad-

juvanten Therapie nach einer operativen Behandlung oder Bestrahlung eingesetzt (44). Bislang gibt es keine ausreichenden Untersuchungen in Bezug auf die Auswirkung des Cisplats auf die Lungenfunktion oder die mukoziliäre Funktion des respiratorischen Epithels. Wir wissen, dass Cisplatin eine toxische Auswirkung hat, einhergehend mit einer Funktionseinschränkung der Nieren (55). Ebenso ist eine progrediente Innenohrschwerhörigkeit als Nebenwirkung beschrieben. Da das Cisplatin bei nicht-kleinzeligen Bronchialkarzinomen in der Therapie genutzt wird, sollen die Auswirkungen von Cisplatin auf die mukoziliäre Funktion von humanen Nasenepithelzellen untersucht werden.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkung von Cisplatin auf die mukoziliäre Funktion bei gesunden Probanden *in vitro* zu untersuchen. Der Fragestellung zugrunde liegt die Annahme, dass die ziliäre Dysfunktion, die an renalen Zilien *in vivo* und *in vitro* unter Cisplatingabe beobachtet werden konnte und die zu einer signifikanten Funktionseinschränkung der Niere führen kann, auf den Zilienapparat des respiratorischen Epithels übertragen werden kann. Ein vermehrtes Auftreten respiratorischer Infekte in den klinischen Studien, die zur Etablierung von Cisplatin als Bestandteil von Polychemotherapien geführt haben, legt den Schluss nahe, dass neben einer insgesamt erhöhten Infektneigung infolge einer Myelodepression auch Funktionsstörungen des Flimmerepithels ursächlich sein können (28). An renalen Zilien konnte gezeigt werden, dass die Zilien in ihrer Funktion deutlich beeinträchtigt werden unter einer Cisplatinbehandlung. Wang et al konnten zeigen, dass die Zilien nach zwei bis vier Stunden nach Exposition mit Cisplatin keine Veränderung der Zilienlänge und der Flimmerfrequenz aufwiesen. Erst die Behandlung mit Cisplatin über 8-16 Stunden führte zu einer signifikanten Abnahme der Flimmerlänge und Flimmerhäufigkeit im Vergleich zur Kontrollgruppe. Hier wurde gezeigt, dass die ziliäre Dysfunktion ein genereller Pathomechanismus beim akuten Nierenversagen ist (88).

In Anbetracht dieser Erkenntnisse, dass Cisplatin eine schädigende Auswirkung auf die Zilien im Nierengewebe aufweist und das Calcium eine wichtige Rolle in der Apoptose Einleitung spielt, war es Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, welche Auswirkung Cisplatin auf die Funktion respiratorischer Flimmerepithelien bzw. deren Zilien ausübt und wie sich die mukoziliäre Funktion verändert. Ebenso sollte die Dynamik des Eintretens von Veränderungen nach Exposition mit Cisplatin untersucht werden. Unklar ist, ob die deutlich erhöhten Cisplatinkonzentrationen des renal eliminierten Medikamentes im Primärharn einen im Vergleich zur geringeren Exposition des respiratorischen Flimmerepithels toxischen Effekt auf die nasalen Zilien hat. Funktionelle Analogien der Zilienapparate beider Organe lassen die Hypothese einer toxischen Schädigung auch der respiratorischen Zilien zu.

Als Modell der Funktionsmessung wurden in dieser Arbeit dreidimensionale Sphäroide verwendet. Hiermit wurde die Rotationsfrequenz von Nasalepithel-Sphäroiden als Messparameter für die mukoziliäre Funktion analysiert (20).

Für das gewählte ex- vivo Modell legten wir in Anlehnung an die Arbeit von Schrödl et al die eine Plasmakonzentration drei Stunden nach Cisplatinbehandlung zwischen 0,5-2 µg/ml bei Lungenkrebspatienten gemessen hatten (97), eine Konzentration von 1 mg/ml Cisplatin unter der Annahme, dass der Effekt auf die Rotationsgeschwindigkeit der Sphäroide deutlicher darstellbar wird und die Apoptose schneller eingeleitet würde, fest.

In dieser Arbeit soll die Auswirkung von Cisplatin auf die mukoziliäre Funktion von humanen Epithelzellen bei gesunden Probanden untersucht werden. Folgende Fragestellungen wurden untersucht.

- Bestimmung der basalen Rotationsfrequenz der Sphäroide ohne kontinuierliche Zugabe von Medium unter Kontrollbedingungen in vitro

- Bestimmung der basalen Rotationsfrequenz ohne kontinuierliche Zugabe von Cisplatin *in vitro*
- Bestimmung der Rotationsfrequenz unter kontinuierlicher Cisplatin-Zugabe über 30 Minuten

2. Material und Methoden

2.1. Kohorte

Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt und wurde nach den Prinzipien der good clinical practice (GCP) unter Berücksichtigung der Deklaration von Helsinki durchgeführt. Alle Probanden unterschrieben vor Studienteilnahme nach mindestens 24-stündiger Bedenkzeit und mündlicher Aufklärung einen Aufklärungsbogen. Das respiratorische Epithel wurde von freiwilligen, gesunden Personen entnommen, die nach Aufklärung der Probeentnahme zugestimmt hatten.

Die Einschlusskriterien waren ein Mindestalter von 18 Jahren, vollkommene psychische und körperliche Gesundheit sowie die Bereitschaft, sich mittels einer Zytologiebürste etwas Nasenepithel entnehmen zu lassen. Zudem sollten die Patienten keinen regelmäßigen Medikamentengebrauch aufweisen.

Die Ausschlusskriterien waren das Vorhandensein von Allergien, chronischen Atemwegserkrankungen, akuten respiratorischen Infektionen, Nikotinkonsum und Bedingungen, die einer Probeentnahme aus dem Nasenepithel entgegenstanden, wie zum Beispiel Gerinnungsstörungen.

Die folgende Tabelle stellt eine Übersicht der Probanden dar:

Proband	Geschlecht	Alter	Zellkultur kontaminiert
1	W	27	nein
2	W	23	nein
3	W	23	nein

4	W	24	nein
5	M	23	nein
6	M	26	nein
7	M	23	ja
8	M	22	ja
9	W	23	ja
10	M	30	ja

Tabelle 1: Übersicht der Probanden

2.1.1. Gewinnung von Nasenepithel

Mit einer Zytologiebürste erfolgte die Probeentnahme aus dem Nasengang. Dabei wurde die Zytologiebürste in den unteren Nasengang eingeführt und vor- und zurückbewegt. Das so gewonnene Probematerial (Zellen, Epithelstreifen, Schleim) wurde von der Zytologiebürste in ein Zentrifugalröhrchen (14 ml, # 188 261 Fa. Grainer Labortechnik, Solingen, Germany) mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % Natriumchloridlösung von Braun Melsungen AG, Hessen, Germany) abgestreift. Hierbei wurde die Zytologiebürste mehrfach aus ihrer Hülle heraus- und wieder hineinbewegt. Dieser Vorgang wurde mehrfach wiederholt, um genügend Probematerial zu gewinnen (50).

2.1.2. Kultivierung des nasalen respiratorischen Epithels

Nachdem das Probematerial entsprechend der oben beschriebenen Methode entnommen worden war, wurde zunächst eine Ruhezeit von 15 Minuten eingehalten, bevor es dreimalig gewaschen wurde. Es wurden sechs Inserts (Cell Culture Insert FALCON® #353097 Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) in eine Gewebekulturplatte (Tissue Culture Plate, 24 Wells FALCON® #353047 Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) mit einer sterilen Pinzette

ingelegt. Das gewonnene und gewaschene Probenmaterial, bestehend aus Mukus und Epithelzellstreifen, wurde mit einer 30 µl Pipette (Eppendorf, Hamburg, Germany) in den Inserts gleichmäßig verteilt. In die Multiwell-Platte wurden 400 µl Medium um die Inserts herum pipettiert. Zudem wurde in die Inserts jeweils 50 µl Medium hinzugegeben.

Die angefertigten Zellkulturen wurden beschriftet und im Brutschrank (Typ B 5060 EC/CO₂, Heraeus, Hanau, Germany) unter 37°C mit 5 % CO₂ und nahezu 100 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Jeden Tag wurde die Kultur mikroskopisch begutachtet und die Entwicklung der Sphäroide dokumentiert. Dazu wurden täglich 50 µl Medium in die Inserts pipettiert, um den Verlust zu kompensieren und der Austrocknung vorzubeugen. Hiermit konnte ein optimaler Nährboden für die Epithelzellstreifen erzielt werden. Bereits nach einigen Stunden bildeten sich die ersten rotierenden Sphäroide aus den Epithelzellen (50).

2.1.3. Herstellung der Zellkulturen

Für die Zellkulturherstellung wurden zunächst 36 ml AECBM (Airway Epithel Cell Basal Medium, C-21260, Fa. Promo Cell, Heidelberg, Germany) mit 4 ml NES (Neugeborenen Kälberserum, hitzenaturiert, 26010-041, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) gemischt.

Des Weiteren wurden 80 µg Penstrep (Penicillin, Streptomycin, 10000 IU/ml – 10000 µg/ml, #15140114, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) sowie 160 µg Fungizone (Amphotericin B, 250 µg/ml, #15290-026, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) hinzugegeben, um ein Überwachsen infolge einer möglichen Kontamination zu vermeiden. Alle Medien wurden in ein Blue Cap (Modified polystyrene conikal tube 50 ml # 352074 Becton Dickinson and Company, Franklin Lakes, USA) gegeben und unter Zentrifugation vermischt. Die hergestellte Lösung konnte eine Woche lang bei einer Temperatur von 4°C gelagert werden (50).

Nachdem das Medium vorbereitet worden ist, wurde das zuvor gewonnene und gewaschene Probenmaterial, bestehend aus Mukus und Epithelzellstreifen, mit einer 30µl Pipette (Eppendorf, Hamburg, Germany) in den Inserts gleichmäßig verteilt. In die Multiwell-Platte wurden 400 µl Medium um die Inserts herum pipettiert. Zudem wurde in die Inserts jeweils 50 µl Medium hinzugegeben.

2.1.4. Zählung und Beurteilung der entstandenen Sphäroide

Die Beurteilung der Zellkultur erfolgte täglich am Phasenkontrastmikroskop. Die Anzahl der entstandenen Sphäroide wurde gezählt und dokumentiert. Eine Einteilung erfolgte in rotierende und nicht rotierende Sphäroide. Eine Zugabe von 50 µl Medium erfolgte pro Insert um einer Austrocknung vorzubeugen. Zudem erfolgte eine mikroskopische Beurteilung auf Kontamination mit Bakterien oder Pilzen. Bei Infektionszeichen wurde die jeweilige Zellkultur verworfen.

Basierend auf früheren Arbeiten (6, 20, 50) unserer Arbeitsgruppe, aus denen hervorging, dass sich in einer funktionierenden Zellkultur nach drei Tagen ausreichend Sphäroide für die Bestimmung der Rotationsgeschwindigkeit gebildet haben, wurden Zellkulturen, in denen sich nach drei Tagen keine rotierenden Sphäroide gebildet haben, ebenfalls verworfen.

2.2. Grundmedienherstellung

Im Folgenden sollen die Arbeitsabläufe und die verwendeten Materialien beschrieben werden.

Alle Arbeitsschritte wurden unter einer sterilen Abzugshaube (Laminar Airflow, HB 24725, Fa. Haereus, München, Germany) durchgeführt.

2.2.1. Herstellung von AECGM

In die 500 ml Airwas epithelial cell growth medium (AECGM-Grundlösung) (#C-21260, Fa. Promo Cell, Heidelberg, Germany) wurde eine Supplement-Packung (#C39160, Fa. Promo Cell, Heidelberg, Germany) mit folgendem Inhalt gegeben: 2 ml Rinder-Hypophysenextrakt, 0,5 µg/ml EGF, humaner rekombinanter Epidermal growth factor, 5,0 mg/ml Rinder-Insulin, 500 µg/ml Hydrocortison, 500 mg/ml Epinephrin, 6,5 ng/ml Trijodthyronin, 10 mg/ml Transferrin, 100 ng/ml Retinolsäure.

Zudem wurden Penicillin-Streptomycin (Penstrep ® # 15140114 Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) mit einer Endkonzentration von Penicillin 10 U/ml und Streptomycin 10 µg/ml sowie Amphotericin B (Fungizone ® # 15290-026, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe,

Germany) mit einer Konzentration von 1 µg/ml dazugegeben. Des Weiteren erfolgte die Zumi-
schung von 10% NCS (Neugeborenen Kälberserum, hitzedenaturiert, #26010-041, Fa. Life Tech-
nologies GmbH, Karlsruhe, Germany). Die so zusammengestellte Nährlösung konnte über zwei
Wochen lang bei 4°C aufbewahrt werden (50).

2.2.2. Herstellung von DMEM

Das Dulbecco`s modified eagle medium pulver (DMEM), #52100-021, Fa. Life Technologies
GmbH, Karlsruhe, Germany) wurde mit N-2-Hydroxyethylpiperracin-N-2-Ethansulfonsäure, (HE-
PES Pulver), (#11344-025, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) auf einen pH-Wert
von $7,3 \pm 0,1$ gepuffert. Mit Hilfe eines Bakterienfilters (Minisart, Porengröße 0,2 µm, #16534, Fa.
Sartorius AG, Göttingen, Germany) wurde die Lösung steril filtriert und bei einer Temperatur von
4°C gelagert (50).

2.3. Bestimmung der mukoziliären Funktion

Die Rotationsfrequenz der Sphäroide wurde als Parameter für die mukoziliäre Funktion genommen
(20). Jedes Sphäroid weist eine individuelle, charakteristische und nichtsymmetrische Form auf, auf-
grund dessen der Beginn und das Ende einer definierten Anzahl an Umdrehungen gezählt werden
kann. Die koordinierte Bewegung der Zilien verursacht eine Rotation der Sphäroide im umgebenden
Mukus (29), weshalb angenommen werden kann, dass eine höhere ziliäre Schlagfrequenz zu einer
schnelleren Rotation führt. Es wurde jeweils die Zeit, die ein Sphäroid für drei Drehungen um seine
eigene Achse braucht, gemessen. Die zuvor definierte Anzahl an Umdrehung wurde definiert, da in
Vorversuchen unserer Gruppe gezeigt werden konnte, dass die Rotationsfrequenz gleich ist, wenn
man fünf Umdrehungen oder, wie hier gewählt, drei Umdrehungen standardisiert misst. Die Ro-
tationsfrequenz (R) lässt sich entsprechend aus der Zeit (t), die für eine bestimmte Anzahl von Um-
drehungen (U) notwendig ist, nach der Formel $R=U/t$ berechnen.

2.3.1. Durchführung des Versuchs zur Messung der mukoziliären Funktion

Die hier verwendeten Methoden und Versuchsabläufe wurden bereits durch unsere Arbeitsgruppe etabliert und weiter verändert (6, 20, 50).

Die angelegten Kulturen wurden am dritten Tag bei mehr als drei Sphäroiden nach Randomisierung entweder mit Cisplatin oder mit cisplatinfreiem Medium (Kontrolle) inkubiert. Alle Materialien wurden auf einer Zytostatika-Unterlage (Spill Proof-Prep Mats Z+® Berner International GmbH, Elmshorn, Germany) und unter der Abzugshaube (Laminar Airflow, HB 24725, Fa. Haereus, München, Germany) bearbeitet. Zum Schutz vor Kontamination und zum Selbstschutz wurden spezielle LatexProtective-Handschuhe (CE 0299, Berner International GmbH, Elmshorn, Germany) getragen.

Zur Bestimmung der Rotationsgeschwindigkeit der Sphäroide wurden die Inserts mit den Sphäroiden in eine Doppelkammer eingelegt. Bei der Versuchsdoppelkammer handelte es sich um eine doppelwandige Metallkammer (siehe Abbildung 2), in deren Mitte sich die eigentliche Versuchskammer befindet. Als Boden für diese innere Kammer wurde vor jedem Versuch ein Deckgläschen (Durchmesser 15 mm, Stärke 3, #1001, Fa. Schultheiss, Heimsheim, Germany) mit Silikon-Paste (Baysilone mittelviskös, #3501 12071, Fa. Bayer über Fa. Labor Schubert und Weiss, München, Germany) angebracht. Zum Schutz vor Verdunstung wurde die Kammer mit einem weiteren Deckgläschen belegt. Mit ihrem gläsernen Boden wurde die Kammer auf ein Phasenkontrastmikroskop (Stemi 2000C, Fa. Carl Zeiss, Jena; Mikroskoplampe, NAG G/281243 40 VA, Fa. Carl Zeiss, Jena, Germany) gestellt. Mit Hilfe einer Pumpe (BP742 Fa. Fresenius Apparatebau, Bad Homburg, Germany) wurde erwärmtes Wasser durch die doppelte Außenwand der Kammer gepumpt, sodass in der inneren Kammer konstant eine Temperatur von $35 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ gehalten werden konnte. Die Kammer wurde durch Schläuche mit dem Wärmebad (Fa. Gesellschaft für Labortechnik, mbH, Burgwedel, Germany) verbunden, welches vor dem Einlegen der Inserts bereits temperiert war.

Die Temperatur konnte über ein fest in der inneren Kammer installiertes Messgerät (GTH 1200, Fa. GHM Messtechnik GmbH, Regenstauf, Germany) kontrolliert und bei Bedarf über Veränderung

der Temperatur im Wärmebad und Änderung der Durchlaufgeschwindigkeit korrigiert werden. Das Phasenkontrastmikroskop, auf dem die Versuchskammer lag, wurde an eine Videokamera angeschlossen, sodass die Rotation der Sphäroide auf Video aufgenommen werden konnte (Videokamera Typ EB 512, Fa. Ebro; Videorekorder, Ag7350, Fa. Panasonic, Monitor, WV BM1400, Fa.Panasonic, Titler, FX Titler WJ-AVE1, Kadoma, Japan) (50).

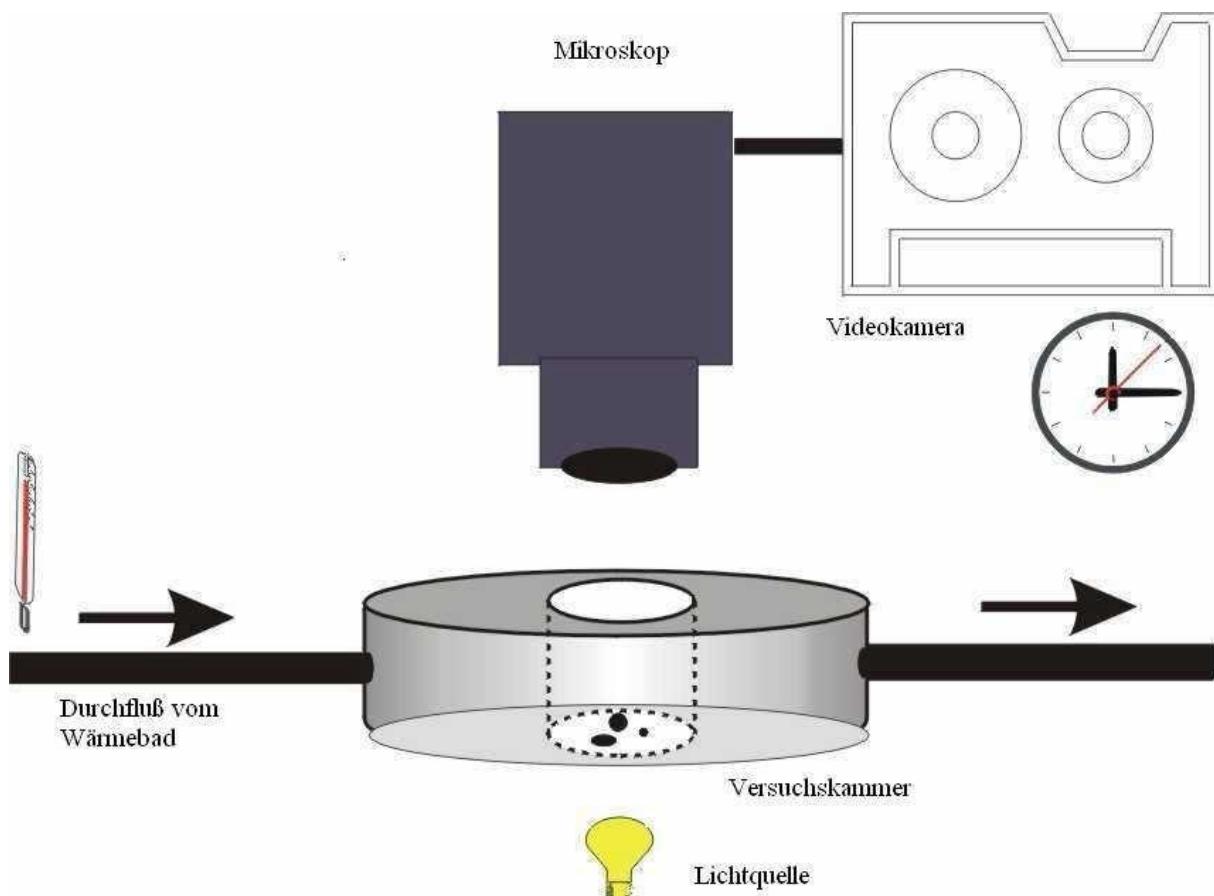


Abbildung 2: Versuchsaufbau: Doppelkammer mit über die Pumpe angeschlossenem Wasserbad und Thermometer (6). Im inneren Kreislauf fließt das Cisplatinmedium oder das cisplatinfreie Medium über eine separate Pumpe zur Behandlung der Sphäroide über einen Zeitraum von dreißig Minuten. Das in die Doppelkammer eingelegte Insert und die sich drin befindlichen Sphäroide wurden unter dem Mikroskop mit Videoaufnahme begutachtet und anschließend ausgewertet.

2.3.2. Messung der Rotationsfrequenz

Die Filmaufnahmen, die während der durchgeführten Versuche entstanden, wurden anschließend ausgewertet. Dazu wurde die Zeit, die ein Sphäroid für drei Drehungen um seine Achse benötigte, gemessen. Die Rotationsfrequenz (R) lässt sich aus der Zeit (t), die für eine bestimmte Anzahl von Umdrehungen (U) benötigt wird, nach folgender Formel berechnen: $R=U/t$

2.3.3. Erhebung der Durchmesser der Sphäroide

Mittels einer Neubauer-Kammer wurden die Sphäroiddurchmesser bestimmt. Zu Beginn jeder Versuchsaufnahme wurden die Inserts unter dem Phasenkontrastmikroskop bei immer gleicher Vergrößerung eingestellt. Unter der gleichen Vergrößerung erfolgte dann noch eine Aufnahme der Neubauer-Kammer. Der Durchmesser des jeweiligen Sphäroids wurde zunächst mittels eines Lineals auf dem Betrachtungsmonitor gemessen. Hiernach wurde die Länge eines unter derselben Vergrößerung wie das Sphäroid gefilmten Kleinstquadrates der Neubauer-Kammer ermittelt. Nach Umrechnung nach der Formel $d=0,05 k/s$ wurde der annähernd reale Durchmesser des Sphäroids ermittelt. Der gemessene Durchmesser und die ermittelte Rotationsfrequenz wurden zur Berechnung der mukoziliären Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide genutzt (50).

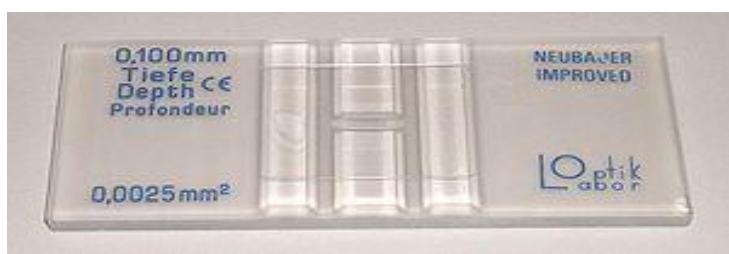


Abbildung 3: Neubauer-Kammer

Die Kante eines Kleinstquadrats entspricht einer Länge von 0,05 mm. In der oben genannten Formel entspricht k der Strecke der Kästchen bei der Vergrößerung und s dem gemessenen Sphäroidendurchmesser.

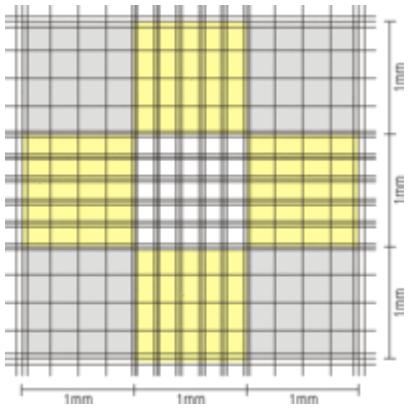


Abbildung 4: Aufbau des Zählerfeldes bei der Neubauer Kammer

Die Neubauer Kammer (Fa. Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany) hat eine doppelte Netzteilung. Das Zählnetz besteht aus neun Großquadranten von je ein mm^2 . Sie werden üblicherweise für die Leukozytenzählung verwendet.

2.3.4. Erhebung der mukoziliären Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide

Die mukoziliäre Transportgeschwindigkeit wird als Modell zur Beschreibung der Geschwindigkeit des Abtransports von Fremdkörpern infolge des Zilienschlages verwendet. Angenommen wurde hier eine kugelige Gestalt der Sphäroide (6, 20). Der Durchmesser der Sphäroide wurde gemessen und mit dem gemessenen Durchmesser und der ermittelten Rotationsfrequenz die mukoziliäre Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche der Sphäroide (MTV) nach folgender Formel berechnet:

$$V = d \times \pi \times R$$

(V) Geschwindigkeit, hier MTV, (d) Durchmesser des jeweiligen Sphäroids, (π) pi mathematische Konstante ($\pi=3,14$), Rotationsfrequenz (s^{-1}).

2.4. Versuchsreihen

2.4.1. Versuchsvorbereitungen und Aufbau

Die Zellkulturen wurden am dritten Kulturtag aus dem Brutschrank genommen und zunächst unter dem Mikroskop begutachtet. Bei fehlenden Infektionszeichen und mehr als drei sich gebildeten rotierenden Sphäroiden wurde die Kultur bzw. die Inserts randomisiert.

2.4.2. Aufteilung der Sphäroide

Nach Anlage der Zellkultur wurden am dritten Tag die Sphäroide gezählt und deren Anzahl pro Insert dokumentiert. Jede angelegte Kultur, in der sich rotierende Sphäroide befanden, wurde in die Studie aufgenommen und die Sphäroide nachfolgendem Schema aufgeteilt: in eine Gruppe, die mit Cisplatin behandelt wird und eine weitere Gruppe ohne Cisplatinbehandlung. Die Aufteilung erfolgte nach einem Zufallsprinzip. Indem eine Münze geworfen wurde, wurden die Sphäroide je nach angezeigter Zahl oder Kopf in eine der beiden Studiengruppen überführt. Nach diesem Prinzip wurden die Sphäroide in diese zwei Gruppen verteilt und die Insets mit den Sphäroiden entsprechend inkubiert.

1. Medium DMEM/NCS Versuchsreihe (Kontrollgruppe) n=29
2. Cisplatin-Versuchsreihe (Verumgruppe) n=38

Zur Auswertung der Rotationsgeschwindigkeit war zur Identifikation der vollständigen Rotationen eine morphologisch wiedererkennbare Oberfläche der Sphäroide essentiell, so dass nicht alle formal rotierenden Sphäroide verwendet werden konnten. Die ungleich verteilten Gruppen basieren auf den Ergebnissen des oben beschriebenen Zufallsprinzips bei der Aufteilung der rotierenden *und* morphologisch zu identifizierenden Sphäroide. Insgesamt wurden im Versuchsaufbau 67 Sphäroide identifiziert, die beide Kriterien erfüllten.

2.5. Medium DMEM/NCS-Versuchsreihe

In dieser Gruppe wurde die Rotationsfrequenz der nativen Sphäroide ohne Cisplatin nur mit Medium DMEM/NCS inkubiert und untersucht.

2.5.1. Kultivierung der nasalen Sphäroide für die DMEM/NCS-Versuchsreihe

Wie bereits oben beschrieben, wurden die Zellkulturen von ausschließlich gesunden Probanden entnommen und über drei Tage kultiviert.

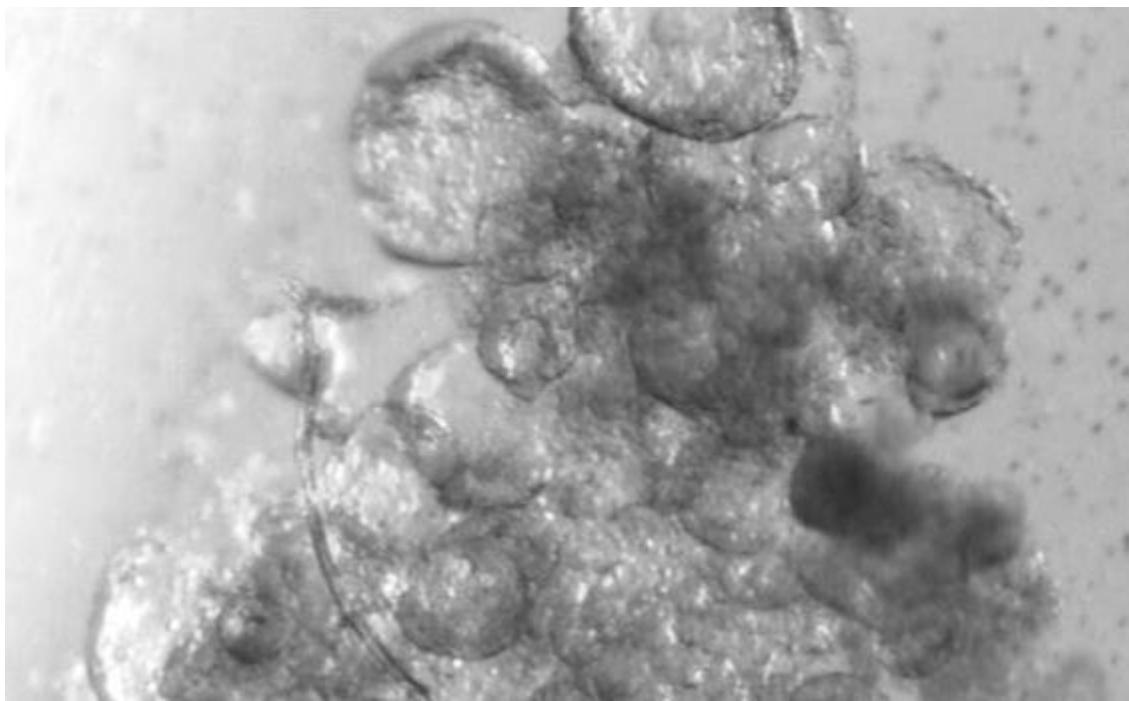


Abbildung 5: Versuch 5, Well 4, (Kultur DMEM/NCS); Vergrößerung 1:100

Exemplarische Darstellung mehrerer Nasenepithelsphäroide im eigenen Mukus unter dem Mikroskop in der Doppelkammer.

2.5.2. Versuchsaufbau für die Medium DMEM/NCS-Gruppe

Das Insert mit den sich drin befindenden rotierenden Sphäroiden wurde zunächst mit 50 µl DMEM (Dulbecco`s Modified Eagle Medium, Pulver, 52100-021, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) beimpft. Dieser Vorgang erfolgte unter der sterilen Dunstabzugshaube am Arbeitsplatz (Laminar Airflow, HB 24725, Fa. Haereus, München, Germany).

Die Doppelkammer wurde mit DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Pulver, 2100-021, Fa. Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Germany) befüllt. Das Wasserbad wurde zuvor, wie oben beschrieben, auf eine Temperatur von $35,0 \pm 0,5$ °C eingestellt.

Das Insert wurde in die Doppelkammer eingelegt. Nach einer fünfminütigen Pause wurde die Videoaufnahme gestartet. Die rotierenden Sphäroide wurden zunächst über drei Minuten aufgenommen ohne kontinuierliche Zufuhr von DMEM/NCS. Die Aufnahme wurde als basale Messung der Rotationsfrequenz verwendet. Anschließend erfolgte eine kontinuierliche Zufuhr von DMEM/NCS 0,1 ml/min über dreißig Minuten.

Nach durchgeföhrter Messung und Videoaufnahme wurden die Sphäroide verworfen. Die Rotationsgeschwindigkeitsauswertung erfolgte im Verlauf (siehe Kapitel 2.7).

2.6. Cisplatin Versuchsreihe

2.6.1. Versuchsaufbau für die Cisplatin-Gruppe

Wie oben beschrieben, erfolgte die Gewinnung des Kulturzellmaterials und die Randomisierung der Inserts bereits vor Versuchsbeginn. In das mit Cisplatin zu inkubierende Insert wurden 50 µl Cisplatin in einer Konzentration von 1mg/ml pipettiert. Diese Konzentration wurde auf Grund der Vorversuche aus unserer Arbeitsgruppe gewählt. Dabei wurde bei Lungenkrebs-Patienten nach Cisplatin-Chemotherapie eine Cisplatin-Plasmakonzentrationen von hauptsächlich 0,5–2,0 µg/ml Cisplatin über ca. 3h nach Chemotherapie beschrieben (97).

Das Insert wurde in die Doppelkammer eingelegt. Nach einer fünfminütigen Pause begann die Videoaufnahme. Die rotierenden Sphäroide wurden zunächst ohne kontinuierliche Zufuhr von Cisplatin über drei Minuten aufgenommen. Die Aufnahme wurde als die basale Messung der Rotationsfrequenz gewertet. Hiernach erfolgte eine kontinuierliche Zufuhr von Cisplatin in einer Konzentration von 1 mg/ml mit 0,1 ml/min über dreißig Minuten.

2.7. Bestimmung der Rotationsgeschwindigkeit

Anhand der Neubauer-Kammer wurde der Durchmesser der Sphäroide ermittelt (oben beschrieben). Hiernach wurde eine markante Stelle der Sphäroide gesucht. Eine speziell hierfür entwickelte Excel-Tabelle verfügte über alle dafür nötigen und oben beschriebenen Formeln. Zusätzlich wurden die erhobenen Daten in ein Makro-Programm in Excel eingetragen, um die Messung der Rotation zu berechnen (20, 50).

Während das Video der Rotation der Sphäroide in Echtzeit lief, hatte der Auswerter zu Beginn der Rotation eines Sphäroids einen Knopf zu betätigen, wodurch die Zeitmessung gestartet wurde. Der Auswerter stoppte nach Beginn der Rotation bis zur dritten vollendeten Umdrehung um die eigene Achse die Zeit. Nach der Zeiterfassung des Bewegungsablaufes wurde mit Hilfe der gestoppten Zeit die Rotationsgeschwindigkeit berechnet (50).

3. Ergebnisse

3.1 Anzahl der Gesamt-Sphäroide und der rotierenden Sphäroide an Tag 1/ Tag 2 / Tag 3

In den nachfolgenden Tabellen wird eine Übersicht der Gesamt-Sphäroid-Anzahl (ins) mit Hervorhebung der Anzahl der rotierenden Sphäroide (R) bzw. dem prozentualen Anteil der rotierenden Sphäroide an der Gesamtanzahl der nachweisbaren Sphäroide (%) an Tag 1-3 (d1, d2, d3) in Kultur dargestellt.

Proband 1	d 1/ins.	d 1/R (%)	d 2/ins.	d 2/R (%)	d 3/ins.	d 3/R (%)
Well 1	53	7 (13,2)	53	8 (15,1)	53	21 (39,6)
Well 2	46	11 (23,9)	46	7 (15,2)	46	10 (21,7)
Well 3	68	6 (8,8)	68	9 (13,2)	68	12 (17,7)
Well 4	56	10 (17,9)	56	15 (26,8)	56	16 (28,6)
Well 5	86	12 (13,9)	86	17 (19,7)	86	21 (24,4)
Well 6	50	3 (6)	50	6 (12)	50	17 (34)

Tabelle 2: Proband 1

Proband 2	d1/ins.	d 1/R (%)	d 2/ins.	d 2/R (%)	d 3/ins.	d 3/R (%)
Well 1	180	27 (15)	180	28 (15,5)	150	23 (15,3)
Well 2	120	15 (12,5)	120	11 (9,2)	100	17 (17)

Ergebnisse

Well 3	70	21 (30)	70	12 (17,1)	60	8 (13,3)
Well 4	190	22 (11,6)	150	15 (10)	100	14 (14)
Well 5	190	25 (13,2)	180	26 (14,4)	170	20 (11,8)
Well 6	100	10 (10)	100	14 (14)	100	11 (11)

Tabelle 2: Proband 2

Proband 3	d 1/ins.	d 1/R (%)	d 2/ins.	d 2/R (%)	d 3/ins.	d 3/R (%)
Well 1	60	10 (16,7)	70	12 (17,1)	85	10 (11,8)
Well 2	60	8 (13,3)	60	7 (11,7)	60	4 (6,7)
Well 3	30	2 (6,7)	46	5 (10,9)	45	5 (11,1)
Well 4	20	2 (10)	39	6 (15,4)	39	2 (5,1)
Well 5	50	5 (10)	50	5 (10)	65	9 (13,9)
Well 6	60	7 (11,7)	65	3 (4,6)	60	2 (3,3)

Tabelle 2: Proband 3

Proband 4	d1/ins.	d 1/R (%)	d 2/ins.	d 2/R (%)	d 3/ins.	d 3/R (%)
Well 1	52	2 (3,9)	51	5 (9,8)	52	10 (19,2)
Well 2	44	3 (6,8)	44	4 (9,1)	44	5 (11,4)

Ergebnisse

Well 3	73	3 (4,1)	73	2 (2,7)	73	3 (4,1)
Well 4	56	3 (5,4)	56	2 (3,6)	56	5 (8,9)
Well 5	54	2 (3,7)	54	4 (7,4)	54	4 (7,4)
Well 6	25	0 (0)	25	2 (8)	25	2 (8)

Tabelle 2: Proband 4

Proband 5	d 1/ins.	d 1/R (%)	d 2/ins.	d 2/R (%)	d 3/ins.	d 3/R (%)
Well 1	160	60 (37,5)	160	65 (40,6)	160	63 (39,4)
Well 2	36	7 (19,4)	36	7 (19,4)	36	9 (25)
Well 3	29	1 (3,45)	28	3 (10,7)	28	5 (17,9)
Well 4	20	2 (10)	21	1 (4,8)	21	3 (14,3)
Well 5	10	1 (10)	14	2 (14,3)	14	3 (21,4)
Well 6	10	3 (30)	13	6 (46,2)	11	7 (63,6)

Tabelle 2: Proband 5

Proband 6	d 1/ins.	d 1/R (%)	d 2/ins.	d 2/R (%)	d 3/ins.	d 3/R (%)
Well 1	13	1 (7,7)	12	2 (16,7)	12	1 (8,3)
Well 2	41	5 (12,2)	40	9 (22,5)	40	9 (22,5)

Well 3	2	0 (0)	2	1 (50)	1	1 (100)
Well 4	10	0 (0)	10	3 (30)	10	2 (20)
Well 5	20	0 (0)	20	2 (10)	20	2 (10)
Well 6	11	0 (0)	11	1 (9,1)	11	1 (9,1)

Tabelle 2: Proband 6

d 1/ins.: am ersten Tag Anzahl der gesamt sich gebildeten Sphäroide. d 1/R: am ersten Tag prozentueller Anteil der rotierenden Sphäroide. d 2/ins.: am zweiten Tag Anzahl der sich gebildeten Sphäroide. d 2/R: am zweiten Tag prozentueller Anteil der rotierenden Sphäroide. d 3/ins.: am dritten Tag Anzahl der sich gebildeten Sphäroide. d 3/R: am dritten Tag prozentueller Anteil der rotierenden Sphäroide.

In der Tabelle Nr. 1 aufgeführten Probanden 7-10, dessen Zellkultur kontaminiert war, wurden nicht ausgewertet.

3.2. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der Statistik-Software R, Version 3.4.4 (R Core Team, 2017, TIBCO Software Inc. Palo Alto, CA 94304, USA). Zur Berechnung der linearen gemischten Regressionsmodelle wurde das Zusatzpaket lme4 (Bates et al., 2015) verwendet. Für den Vergleich des Anteils rotierender Sphäroide über die Zeit wurde ein lineares gemischtes Regressionsmodell herangezogen. Die Ermittlung des Einflusses der Zeit erfolgte durch einen Vergleich mit einem Modell mit einer globalen Basisrate (Intercept) und einem Modell mit einer globalen Basisrate und einem Effekt der Zeit. Die Abhängigkeiten der vorliegenden drei Anteile für jeden Probanden wurde durch die Aufnahme einer probandspezifischen Basisrate (Random Intercept) berücksichtigt. Die Vergleiche zwischen den einzelnen Tagen erfolgt im Rahmen von Post-Hoc Tests (Tukey-Kontraste). Die daraus resultierenden p-Werte wurden zudem mit der Bonferroni-Holm-Korrektur adjustiert.

3.2.1. Vergleich des Anteils rotierender Sphäroide über die Zeit

Zum Vergleich des Anteils rotierender Sphäroide über die Zeit wurde zunächst für jeden Probanden der Anteil rotierender Sphäroide an der Gesamtzahl aller Sphäroide pro Tag und Well berechnet. Anschließend wurde dieser Anteil über die einzelnen Wells eines Probanden gemittelt, sodass für jeden Probanden und Tag ein Anteil rotierender Sphäroide resultierte. Dieser Anteil rotierender Sphäroide über die Zeit über alle Probanden ist nachfolgend graphisch dargestellt.

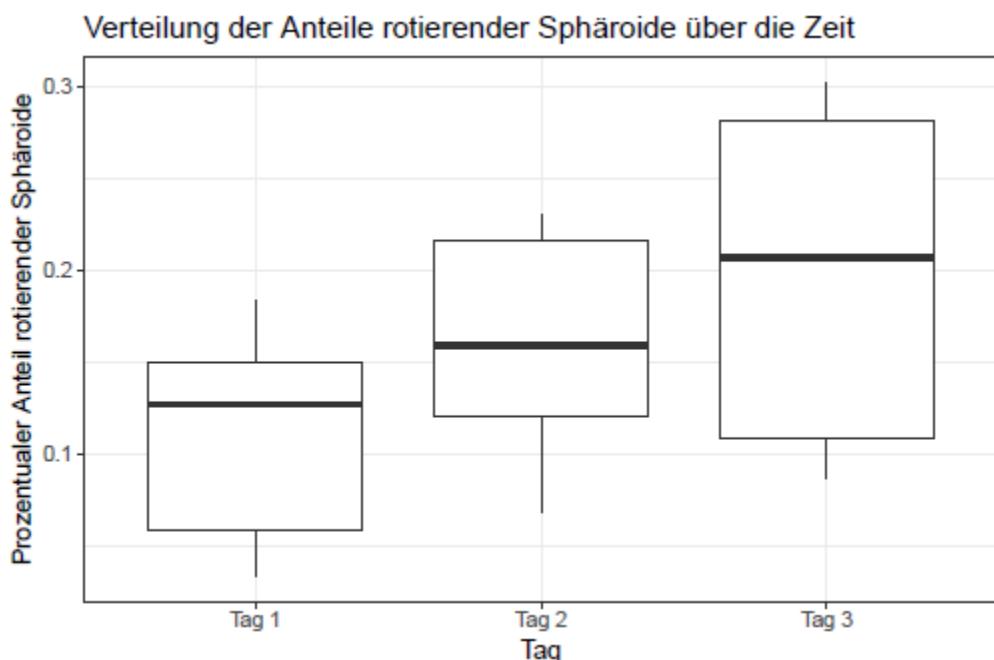


Abbildung 6: Vergleich des Anteils rotierender Sphäroide über die Zeit

Wie ersichtlich ist, stieg der Anteil rotierender Sphäroide über die Zeit an und erreichte am dritten Tag sein Maximum. Dieser Unterschied über die Zeit war signifikant ($p = 0.038$). In den Post-Hoc Tests erwies sich allerdings nur der Unterschied im Anteil rotierender Sphäroide zwischen Tag 1 und Tag 3 als statistisch signifikant ($p = 0.022$). Sowohl der Unterschied zwischen den Anteilen rotierender Sphäroide zwischen Tag 1 und Tag 2 ($p = 0.258$) als auch zwischen den Tagen 2 und 3 waren statistisch nicht signifikant ($p = 0.258$).

3.3. Statistische Auswertung der ausgewerteten Sphäroide

Die statistische Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit der Statistik-Software R, Version 3.3.3 (R Core Team, 2017, TIBCO Software Inc. Palo Alto, CA 94304, USA). Zur Berechnung der

linearen gemischten Regressionsmodelle wurde das Zusatzpaket lme4 (Bates et al., 2015) verwendet. Für den Vergleich der Rotationsfrequenz ohne Fluss für Sphäroide mit und ohne Cisplatin-Behandlung wurde ein linear gemischtes Regressionsmodell berechnet. Die Abhängigkeiten der vorliegenden drei Messungen für jedes Sphäroid wurden durch die Aufnahme einer sphäroid-spezifischen Basisrate (Random Intercept) berücksichtigt. Die Ermittlung eines Unterschieds zwischen den beiden Gruppen erfolgte durch den Vergleich eines Modells mit einer globalen Basisrate (Intercept) und eines Modells mit einer globalen Basisrate pro Gruppe (Interaktionsterm aus Gruppe und Intercept). Zur Durchführung des Vergleichs der Rotationsfrequenz mit Fluss für Sphäroide mit und ohne Cisplatin-Behandlung wurde ebenfalls ein lineares gemischtes Regressionsmodell gerechnet. Dieses berücksichtigt die Messwiederholungen pro Sphäroid über die Zeit durch die Aufnahme einer sphäroid-spezifischen Basisrate (Random Intercept) und einer linearen Steigung über die Zeit (Random Slope). Als Haupteffekte werden eine globale Basisrate (Intercept) und eine lineare Steigung über die Zeit modelliert (Slope). Die Ermittlung eines Gruppeneffekts erfolgte erneut durch einen Vergleich des beschriebenen Modells mit einem Modell, welches zusätzlich Gruppenunterschiede in der Basisrate und der linearen Steigung über die Zeit erlaubt. Zuvor erfolgt die Ermittlung einer Veränderung über die Zeit. Dies geschah ebenfalls über einen Vergleich eines Modells mit einer globalen Basisrate (Intercept) und einem zusätzlichen linearen Steigungsterm über die Zeit (Intercept). Beide Modelle wiesen zudem die zuvor beschriebenen zufälligen Effekte zur Berücksichtigung der Abhängigkeiten in den Daten auf.

3.3.1. Statistische Auswertung der Rotationsfrequenz der Sphäroide ohne kontinuierlicher Zugabe von Medium oder Cisplatin (ohne Flow)

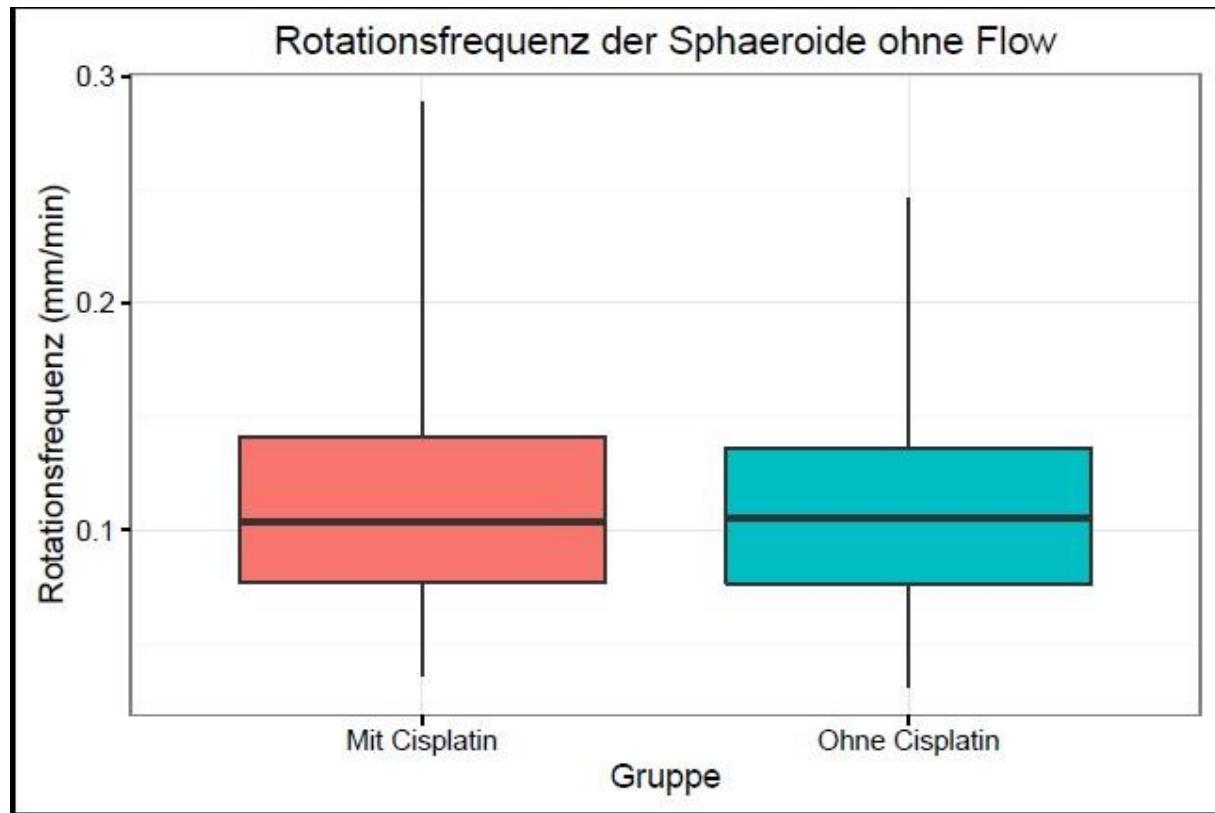


Abbildung 7: Rotationsfrequenz der Sphäroide ohne Flow

Die rotierenden Sphäroide wurden zunächst über drei Minuten ohne kontinuierliche Zufuhr von Cisplatin oder DMEM/NCS aufgenommen. Die Aufnahme wurde als die basale Messung der Rotationsfrequenz gewertet. Es zeigte sich kein überzufälliger Unterschied in der Rotationsfrequenz ohne Fluss zwischen den beiden Gruppen, $p = 0.827$.

3.3.2. Statistische Auswertung der Rotationsfrequenz der Sphäroide mit kontinuierlicher Zugabe (Flow) von 1 mg/ml Cisplatin mit einer Geschwindigkeit von 0,1 ml/min über 30 min.

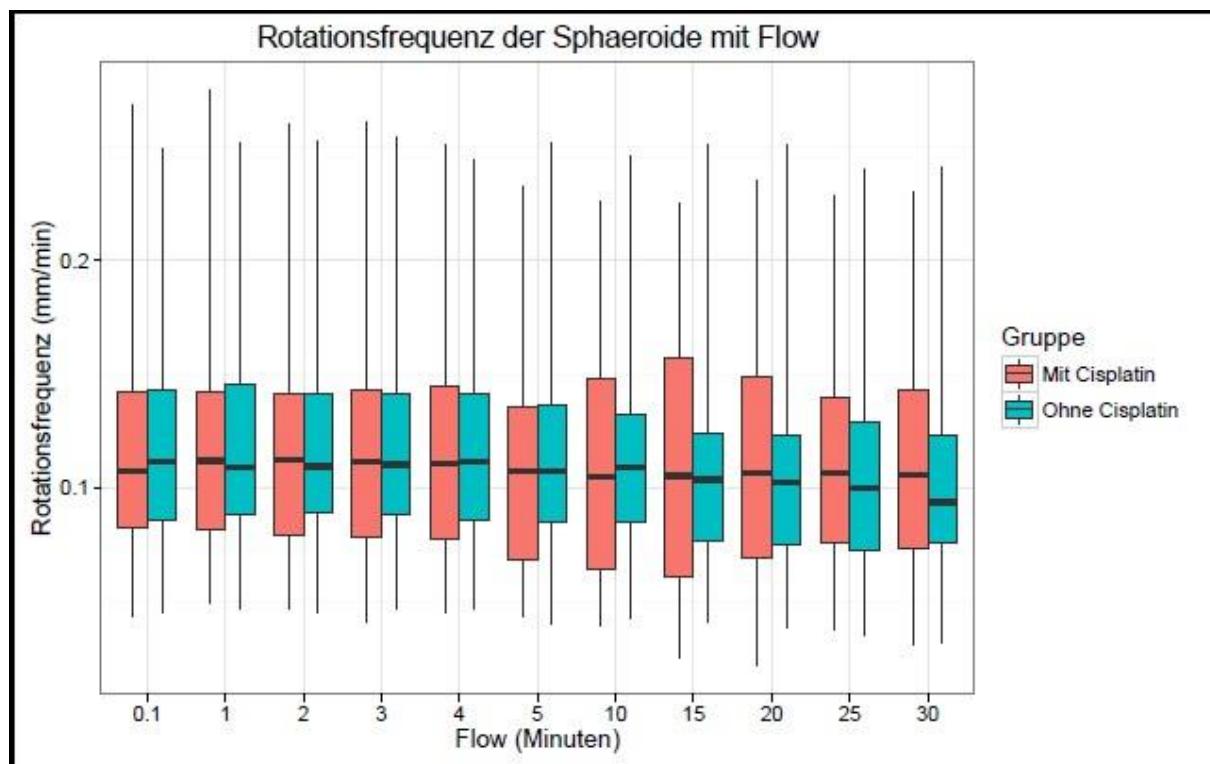


Abbildung 8: Rotationsfrequenz der Sphäroide mit Flow

Die roten Balken stellen die Gruppe der Sphäroide dar, die mit einer kontinuierlichen Zufuhr (Flow) von Cisplatin in einer Konzentration von 1 mg/ml mit 0,1 ml/min behandelt wurden. Die blauen Balken stellen die Kontrollgruppe dar, die eine kontinuierliche Zufuhr (Flow) von Medium DMEM/NCS bekam, jeweils über 30 Minuten.

In der Rotationsfrequenz der Sphäroide zeigte sich zwischen den beiden Gruppen bei entweder kontinuierlichen Zufuhr von Cisplatin in einer Konzentration von 1 mg/ml, oder Medium DMEM/NCS über 30 Minuten, kein signifikanter Unterschied, $p = 0.643$.

3.3.3. Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Anzahl der verwendeten Sphäroide in der Cisplatin-Gruppe war $n= 38$, in der Medium

DMEM/NCS-Gruppe n= 29. Die ausgewertete basale Rotationsfrequenz ohne kontinuierliche Zufuhr (ohne Flow) von Medium oder Cisplatin zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen, p = 0.827.

Die durchschnittliche Rotationsfrequenz der Sphäroide nahm über die Zeit nicht signifikant ab, β Zeit = -4×10^{-4} , p = 0.11. Weder die Abnahme über die Zeit noch die Basisrate unterschieden sich zwischen den Sphäroiden mit und ohne Cisplatin-Behandlung, p = 0.643.

4. Diskussion

4.1. Diskussion des Materials und der Methodik

Der in unserer Studie verwendete Versuchsaufbau ist ein etabliertes Modell zur ex- vivo Messung der mukoziliären Funktion an Zytologien aus humanen Nasenepithelien (6, 20). Der wenig invasive, einfache Zugang durch die Verwendung von Bürstenzytologien erlaubt die reproduzierbare und gefahrlose Materialgewinnung und ist in verschiedenen Studien unserer und anderer Gruppen hinsichtlich der Sicherheit und der Vergleichbarkeit mit Proben tieferer zilientragender Epithelien sehr gut etabliert.

Die Rotationsgeschwindigkeit der Nasenepithelsphäroide wurde, wie oben beschrieben, als Modell der Aktivität der ziliären Funktion des respiratorischen Epithels verwendet (20). Dieses Modell wurde schon in verschiedenen experimentellen Arbeiten verwendet. Bridges et al. kultivierten multizelluläre Sphäroide aus humanem Nasalepithel, welche aus Bürstenabstrichen gewonnen wurden. Sie zentrifugierten dabei die Zellcluster und resuspendierten die so gewonnenen Zellpellets im Kulturmedium.

Als Vorteil wurde hierbei besonders die Nichtinvasivität und einfache Reproduzierbarkeit der Methode aufgefasst, die keine Anästhesie erforderte und von den Probanden gut vertragen wurde. Weiterhin wiesen Bridges et al. auf eine Anwendungsmöglichkeit des Sphäroid-Modells zur Beobachtung pathologischer Zustände des Respirationstraktes hin (30). Diese Kultivierungsmethode wurde in den Laboren unserer Arbeitsgruppe in der Medizinischen Klinik 5 der LMU weiter modifiziert (20). Devalia et al. stellten fest, dass es keine signifikanten Unterschiede zwischen Zellen des respiratorischen Epithels aus der Nase und dem Bronchialsystem gibt (31). Durch den einfachen Zugang zu nasalen Epithelien weist diese Methode weitere Vorteile auf. Ein wesentlicher Vorteil entsteht durch die nicht-invasive Gewinnung des Materials. Die möglichen Komplikationen (z. B. Epistaxis) sind selten und schnell zu limitieren. Das Kollektiv kann nach klinischen Kriterien individuell aus-

gewählt werden (gesunde Probanden oder Patienten mit verschiedenen Erkrankungen des Respirations-Traktes). Folglich stellte es eine effiziente Methode dar, die viele Möglichkeiten zur Anwendung in der translationalen Forschung eröffnet. Mögliche Nachteile dieser Methode liegen in der sekundären Beeinflussung der Zilienfunktion durch verschiedene Faktoren. So wurde in vorausgegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe festgestellt, dass beispielsweise Temperaturschwankungen ebenso einen Einfluss auf die ziliäre Funktion haben. Die optimale Temperatur lag zwischen 35° C und 37° C (6, 20).

Weitere Untersuchungen zeigten, dass verschiedene Erkrankungen und Medikamenteneinnahmen einen erheblichen Einfluss auf die mukoziliäre Funktion nehmen (20, 35, 36, 37, 38). Zudem kann die Rotationsfrequenz durch die Konsistenz des Mukus beeinflusst werden (6, 20, 32, 33, 34). Bei Mukoviszidose-Patienten ist die Konsistenz des Mukus deutlich dickflüssiger, wodurch der Zilenschlag vermindert wird (33).

Um diese möglichen Störfaktoren auszuschließen, wurden in der vorgelegten Arbeit nur gesunde Probanden untersucht, die keine chronischen respiratorischen Erkrankungen hatten, keine bekannten Allergien aufwiesen, Nichtraucher waren und in den letzten 7-10 Tagen keine Medikamente eingenommen hatten. Zur Reduktion der Ergebnisse beeinflussender äußerer Störfaktoren wie Ershütterungen oder Temperaturschwankungen (20) waren die verwendeten Messgeräte auf stabile Tische montiert und unter regulierten, konstanten Temperaturbedingungen 35 +/- 0,5°C durchgeführt. Die Inserts mit den Sphäroiden wurden in die Doppelkammer unter das Phasenkontrastmikroskop gelegt und die Außenhülle der Doppelkammer wurde an das Wärmebad angeschlossen. Kontrolliert wurde die Temperatur durch die in der Innenwand angebrachte Messsonde. Wie Gamarra et al zeigten, ist die Rotationsgeschwindigkeit abhängig von der Temperatur. Die höchste Rotationsgeschwindigkeit erreichten die Sphäroide bei einer Temperatur zwischen 35-37°C (20).

Die zuvor randomisierten Inserts wurden zunächst in zwei Versuchsreihen aufgeteilt. Nach einer fünfminütigen Pause wurde die Videoaufnahme begonnen. Die rotierenden Sphäroide wurden zu-

nächst über drei Minuten aufgenommen ohne kontinuierliche Zufuhr von DMEM/NCS oder Cisplatin. Die Aufnahme wurde als die basale Messung der Rotationsfrequenz gewertet. Hiernach erfolgte eine kontinuierliche Zufuhr von DMEM/NCS oder von Cisplatin in einer Konzentration von 1 mg/ml mit 0,1 ml/min über dreißig Minuten. Einige vorausgegangene Arbeiten zeigten, dass die Rotationsfrequenz von der Anzahl der Zilien, deren Ausschlagsrichtung sowie Mukusbeschaffenheit abhängig war (20, 33). All diese Eigenschaften und deren Möglichkeit zur Beeinflussung der Rotationsfrequenz wurden in dieser Arbeit nicht als zentraler Fokus gesehen und daher nicht näher analysiert.

Wie aus der Tabelle 2 zu entnehmen ist bildeten sich unterschiedlich viele rotierende Sphäroide in den jeweiligen Inserts. Jedoch konnten für die Auswertung nicht alle rotierenden Sphäroide verwendet werden. Wie auf der exemplarisch dargestellten Abbildung 5 zu sehen ist, konnten alle rotierenden Sphäroide gezählt und dokumentiert werden. Allerdings war es nur möglich, morphologisch zu identifizierende Sphäroide mit einer markanten Oberflächenstruktur für die Kultivierungsexperimente zu verwenden, um die dritte vollendete Umdrehung zählen zu können, die relevanter Bestandteil der Auswertung war. Des Weiteren kam es bei einigen Sphäroiden vor, dass sie aufgrund der Rotation aus dem mikroskopisch eingestellten Sichtfeld herausrotierten und nicht mehr auswertbar waren. Für zukünftige Versuchsaufbauten ist zu überprüfen, ob man die einzelnen Sphäroide separieren könnte und in eine mukusfreie Umgebung überführen kann. Hierbei sind aber Verletzung der Epithelzellen und der darauf sitzenden Zilien sowie Veränderung der Rotationsfrequenz durch äußere Einwirkung möglich.

Die Anzahl der gewonnenen Sphäroide war bei jedem Probanden unterschiedlich. Dies ist methodisch zum einen auf die Menge des entnommenen Zellmaterials durch den jeden Bürstenabstrich zurückzuführen, zum anderen auf die zufällige Zusammenlagerung der einzelnen Epithelstreifen, welche die rotierenden Sphäroide bilden.

Alle entnommenen Proben wurden nach einem zuvor festgelegten Protokoll behandelt. Die Entnahme der Proben erfolgte immer unter gleichen äußeren Bedingungen im Labor unserer Klinik.

Die Probanden waren unterschiedlicher Herkunft, wiesen in wesentlichen keine großen Unterschiede auf, da sie alle nach den oben genannten Ein- und Ausschlusskriterien ausgewählt worden waren. Die Anzahl der Probanden berücksichtigte die potentiell mögliche Kontamination von Zellkulturen und die daraus resultierende Notwendigkeit des Verwerfens dieser Proben. Eine Fallzahlkalkulation wurde aufgrund des ex- vivo Ansatzes nicht durchgeführt. Wir konnten zeigen, dass die mukoziliäre Funktion durch die Verwendung von humanen Nasenepithelproben repräsentiert wird und ausgewertet werden kann.

In dieser Arbeit wurde die mukoziliäre Funktion des respiratorischen Gewebes anhand der Rotationsfrequenz der Sphäroide (20) mit und ohne Cisplatin-Behandlung gemessen.

Wie genau Cisplatin die Funktion des respiratorischen Flimmerepithels beeinflusst, ist bislang nicht ausreichend geklärt, weshalb diese Frage in der hier vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Cisplatin ist unter anderem die Standardtherapie in der Behandlung des nicht kleinzelligen Lungenkarzinoms, die 15% aller Lungenkrebsarten ausmachen (89). Lungenkrebs bleibt unverändert eine der häufigsten malignen Erkrankungen (90) mit einer sehr hohen Mortalität. Das Cisplatin wird wegen seiner starken Antitumoraktivität in vielen Erstlinientherapien verwendet, bringt aber viele Nebenwirkungen mit sich. Unter anderem ist neben der Ototoxizität die Nephrotoxizität (91) eine häufige therapielimittierende Nebenwirkung. Zu den relevantesten Nebenwirkungen des Cisplats zählen Gefäßschädigungen, welche zum akuten Nierenversagen führen können. Wang et al zeigten in ihrer Studie, dass die Zilien der Nierenzellen in ihrer Funktion deutlich beeinträchtigt waren. Hier wurde gezeigt, dass die ziliäre Dysfunktion ein genereller Pathomechanismus beim akuten Nierenversagen ist (88).

In Anbetracht dieser Erkenntnisse, dass Cisplatin eine schädigende Auswirkung auf die Zilien im Nierengewebe aufweist und das Calcium eine wichtige Rolle in der Apoptoseinduktion spielt, war Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, welche Auswirkung Cisplatin auf die Funktion respiratorischer Flimmerepithelien bzw. deren Zilien ausübt und wie sich die mukoziliäre Funktion verändert. Ebenso sollte die Dynamik des Eintretens von Veränderungen nach Exposition mit Cisplatin untersucht werden.

In meiner Arbeit konnte in der gewählten Konzentration und in der gewählten Beobachtungs- und Inkubationsdauer keine signifikante Abnahme der Rotationsfrequenz der Sphäroide nachgewiesen werden. Obgleich eine deutlich höhere Dosis als in den gängigen Chemotherapieschemata verwendet wurde (97), konnte in der Beobachtungsdauer keine erhöhte Toxizität gezeigt werden. Aus Vorarbeiten unserer Gruppe ist bekannt, dass nach einer längeren Inkubationsdauer mit Cisplatin über drei Stunden die Rotationen der Sphäroide mit gleicher Dosierung des Cisplatin reversibel gehemmt werden (50). In der gewählten Beobachtungszeit von dreißig Minuten während der Behandlung ergab sich keine Abnahme der Rotationsfrequenz, woraus man schließen könnte, dass die toxischen Effekte gegebenenfalls, in Analogie zu den Untersuchungen am Zilienapparat der Nieren, erst zu einem späteren Zeitpunkt einsetzen könnten. Möglicherweise ist die für diese Studie ausgewählte Konzentration von Cisplatin von insgesamt 3 mg bei 1mg/ml über 30 Minuten mit einer Flussrate von 0,1ml/min nicht ausreichend, um die erwarteten Effekte zu zeigen. Unklar ist, ob es bei einer höheren Dosierung, als der hier gewählten zu einer Abnahme der Rotationsfrequenz zu Beginn der Behandlung mit Cisplatin kommt. Damit kann die Frage, ob es einen direkten Einfluss von Cisplatin auf mukoziliären Funktion in den Nasalenepithelzellen *in vivo* analog zu Veränderungen der ziliären Funktion renaler Zilien als potentielles Risiko einer Cisplatintherapie gibt, an den vorliegenden Ergebnissen nicht beantwortet werden.

4.2. Diskussion der Ergebnisse

4.2.1. Vergleich der Kultur DMEM/NCS versus Cisplatin

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob das Cisplatin eine Auswirkung auf die mukoziliäre Funktion von nasalen Epithelzellen bei gesunden Probanden *ex vivo* aufweist. Untersucht wurden in der Cisplatin-Gruppe insgesamt 38 rotierende Sphäroide und in der DMEM/NCS Gruppe 29 rotierende Sphäroide. Wie aus der Tabelle 2 zu entnehmen ist, gab es am dritten Tag insgesamt 357 rotierende Sphäroide, jedoch war die Auswertung von nur 67 Sphäroiden möglich. Aufgrund ihrer Lage und ihrer Morphologie konnten nicht alle rotierenden Sphäroide beurteilt werden. Durch die

Randomisierung vor der Installation der Inserts unter Mikroskop ergab sich eine ungleiche Verteilung in der Anzahl der ausgewerteten Sphäroide in den jeweiligen Gruppen.

Weder die Abnahme der durchschnittlichen Rotationsfrequenz über die Zeit, noch deren Basisrate unterschieden sich zwischen den Sphäroiden mit und ohne Cisplatin-Behandlung signifikant, $p = 0.643$. Im ersten Auswertungsschritt der Versuchsreihe wurde die basale Rotationsfrequenz ohne kontinuierlicher Zufuhr von Medium oder Cisplatin (Flow) der Sphäroide gemessen. Hier zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Sphäroiden, die mit Cisplatin behandelt wurden und denen, die keine Cisplatinbehandlung hatten. Es ergab sich weiterhin kein überzufälliger Unterschied in der Rotationsfrequenz ohne Flow zwischen den beiden Gruppen, $p = 0.827$. Die errechnete mukoziliäre Transportgeschwindigkeit an der Oberfläche, die in diesem Versuch als Modell für die mukoziliäre Funktion verwendet wurde, entsprach mit $0:113 \text{ mm/min} \pm 0:052 \text{ mm/min}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei der mit Cisplatin behandelten Gruppe und $0:116 \text{ mm/min} \pm 0:055 \text{ mm/min}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) bei der Kontrollgruppe den Angaben der Literatur für gesunde Probanden (41, 42).

Bei Lungenkrebspatienten wurde eine Cisplatin-Plasmakonzentration drei Stunden nach Cisplatin-behandlung zwischen $0,5\text{-}2 \mu\text{g/ml}$ gemessen (97). Die in dieser Arbeit verwendete Konzentration war mit insgesamt 3 mg höher als die, die bei den Lungenkrebspatienten gemessen wurde. Die kontinuierliche Zugabe von 1mg/ml Cisplatin über 30 Minuten zeigte in der vorliegenden Arbeit keinen signifikanten Einfluss auf die mukoziliäre Funktion der Sphäroide unabhängig von der deutlich höheren Cisplatinkonzentration im Vergleich zur Plasmakonzentration bei therapierten Patienten. Die Rotationsfrequenz zwischen den mit Cisplatin behandelten und den nicht behandelten Sphäroiden nahm nahezu gleich ab, aber nicht signifikant, was zur Diskussion stellen kann, dass die mukoziliäre Funktion im von uns gewählten ex- vivo Modell im zeitlichen Verlauf abnimmt, wohl aber unabhängig von der Cisplatin- und der zytoplasmatischen Calciumkonzentration ist. Die ziliäre Funktion blieb in dem untersuchten Zeitraum unbeeinträchtigt. Wang et al benutzten in ihrer Studie eine Cisplatinkonzentration von 10mg/kg und 30 mg/kg in ihren in vivo Modell an Mäusen und in vitro

Modell an kultivierten menschlichen proximalen Epithelzellen benutzten sie verschiedene Konzentrationen von 50, 100 und 200 µmol/l Cisplatin. Sie konnten zeigen, dass die Zilien unter der Behandlung mit Cisplatin kürzer wurden, gefolgt von einer Apoptose. Die Runterregulation von Kif3a oder Polaris, beides ziliäre Proteine, reduzierte sich die Anzahl an Zilien und erhöhte die Apoptose während der Cisplatin-Behandlung. Zudem konnte sie zeigen, dass die Klone mit kürzeren Zilien empfindlicher gegen Cisplatin-induzierte Apoptose waren (88).

Aus unserer Arbeitsgruppe wurde in der Arbeit von Penger nachgewiesen, dass es nach direkter Cisplatingabe zunächst zu einem Abfall der zytoplasmatischen Calciumkonzentration kommt. 18-24 Stunden nach der 3-stündigen Inkubation mit Cisplatin zeigten sich jedoch in der Cisplatingruppe deutlich höhere zytoplasmatische Calciumwerte als in der Kontrollgruppe (45). Dieses Ergebnis deckt sich mit den Daten, die im Rahmen der Dissertationsarbeit von Robinzonow in unserer Arbeitsgruppe erhoben wurden (50). Auch da konnte ein Anstieg der zytoplasmatischen Calciumkonzentration 24 Stunden nach einer 3-stündigen Inkubation von Sphäroiden mit Cisplatin nachgewiesen werden. Für die Rotation der Sphäroide bzw. für den Zielschlag ist Calcium und Adenosintriphosphat notwendig (95). Die hier gewählte Cisplatin-Konzentration basiert auf die gemessenen Plasmakonzentration nach einer Standartchemotherapie und wurde in dieser Arbeit höher gesetzt als die gemessene Konzentration (97), weil aus Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe bekannt war, dass es nach einer initialen Inkubationszeit der Sphäroide mit Cisplatin über drei Stunden zu einen vollkommen Stillstand der Rotation zunächst kommt und erst nach einer 24stündigen Erholungsphase die Sphäroide wieder anfangen zu rotieren (50). Erwartet wurde unter der kontinuierlichen Cisplatinzufuhr eine signifikante Abnahme der Rotationsfrequenz der Sphäroide auch in Anbetracht der zunächst niedrigeren zytoplasmatischen Calciumkonzentration (45) durch die höher eingesetzte Cisplatindosis. Cisplatin führt in der Behandlung von Lungenkarzinomen über die DNA-Basenpaarvernetzung zur Apoptoseinduktion. Es kommt zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien. Das freigesetzte Cytochrom c setzt aus dem endoplasmatischen Retikulum Calcium frei, welches von den Mitochondrien aufgenommen wird. Es resultiert eine mitochondriale

Calcium-Überladung, welche zu einer Freisetzung von großen Mengen Cytochrom c führt und die Apoptose induziert. Teilresistente kleinzellige und nicht-kleinzellige Lungenkarzinomzellen schützen sich durch einen verminderten Calciumgehalt in endoplasmatischen Retikulum vor der Apoptose (97).

In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Calciumion, welches durch Cisplatin im Zytoplasma freigesetzt wird, eine schädigende Wirkung auf die Zellen hat. Orrenius et al. zeigten in ihrer Arbeit die enge Verknüpfung zwischen Calciumionen und den verschiedenen Mechanismen der Apoptose (51). Mandic et al. zeigten in ihren Untersuchungen an humanen Melanomzellen, dass die Wirkung von Cisplatin eine Erhöhung der zytoplasmatischen Calciumkonzentration eine Stunde nach der Cisplatininkubation aufweist und eine beginnende Apoptose induziert (52, 53).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit, dass im gewählten ex- vivo Modell zur Beurteilung der human mukoziliären Aktivität unter Hinzugabe von Cisplatin im Vergleich zu Kontrollgruppe keine signifikante Abnahme der Zilienfunktion festgestellt werden kann. Die in beiden Gruppen nachgewiesene Abnahme der Rotationsfrequenz kann ihre Ursache im unphysiologischen Aufbau des Modells haben.

5. Zusammenfassung

Das hochwirksame Cisplatin wird bei vielen onkologischen Erkrankungen eingesetzt, eine Limitierung zur Fortführung der Therapie beruht immer auf seinem ausgeprägten Nebenwirkungsprofil. So ist bekannt, dass vor allem die Nephrotoxizität (55) oft eine Dosislimitierung bedingt. Zudem erleiden viele Krebspatienten einen Tumorprogress bei beobachteter Cisplatinresistenz, bedingt durch Änderungen in der zellulären Aufnahme, des Metabolismus des Wirkstoffes in der Niere und der Leber sowie einer Steigerung der DNA-Reparatur und anti-apoptotischer Mechanismen (92). Wie Cisplatin zur Schädigung von gesunden Zellen führt, ist nicht im Detail bekannt. Die Auswirkung auf die mukoziliäre Funktion ist letztendlich bis heute nicht ausreichend geklärt, weshalb es in dieser Arbeit das Ziel war, anhand von humanen Nasalepithel-Sphäroiden die Auswirkung von Cisplatin auf die respiratorische mukoziliäre Funktion bei gesunden Probanden zunächst zu untersuchen, nachdem in Arbeiten aus unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden konnte, dass Cisplatin den Calcium Stoffwechsel und damit die Apoptoseinduktion in respiratorischen Zellen beeinflusst (45). Das Studienprotokoll wurde durch die Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität München genehmigt. Das respiratorische Epithel wurde von freiwilligen, gesunden Personen entnommen, die nach Aufklärung der Probeentnahme zugestimmt hatten. Bei Nasalepithel-Sphäroiden handelte es sich um kugelige, ovale, zilientragende Epithelzellen, die sich innerhalb von 24 Stunden aus nasalem respiratorischem Epithel zusammenlagern. Die Zellkultur wurde durch Bürstenabstriche aus dem unteren Nasengang gewonnen und im flüssigen Medium kultiviert. Durch die Zusammenlagerung der einzelnen zilientragenden Epithelzellen und durch die synchrone Ausschlagrichtung der Zilien, rotierten die Nasalepithel-Sphäroide indem sie umgebenen Schleim um ihre eigene Achse. Die angelegten Kulturen wurden am dritten Tag bei mehr als drei Sphäroiden nach Randomisierung entweder mit Cisplatin oder mit cisplatinfreiem Medium (Kontrolle) inkubiert. Die Frequenz ihrer Rotation wurde als Parameter für die mukoziliäre Funktion verwendet.

Die Anzahl der ausgewerteten rotierenden Sphäroide in der Cisplatin-Versuchsreihe betrug 38 und in der DMEM/NCS-Versuchsreihe 29. Weder die Abnahme über die Zeit noch die Basisrate der durchschnittlichen Rotationsfrequenz unterschieden sich zwischen den Sphäroiden mit und ohne Cisplatin-Behandlung signifikant, $p = 0.643$. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Rotationsfrequenz der Nasalepithel-Sphäroide bei gesunden Probanden nicht durch die Cisplatinbehandlung in einer Konzentration von 1 mg/ml Cisplatin (über 30 Minuten) beeinflusst wird. Ein besseres Verständnis wie Cisplatin in gesunden Zellen genau wirkt, könnte dazu beitragen, neue effizientere und nebenwirkungsärmere Chemotherapien für die Tumorbehandlung zu entwickeln. Resistenzentwicklungen könnten verhindert und so die Lebenserwartung von Tumorpatienten verbessert werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Welsch, U.: Lehrbuch Histologie, 1. Aufl., 2003
2. Foster WM Mucociliary transport and cough in humans. *Pulm Pharmacol Ther* 2002; 15(3):277-282.
3. Rutland J, Dawar A, Cox T, Cole P, Nasal brushing for the study of ciliary ultrastructure. *J Cim Pathol* 1982; 35(3):357-359.
4. Satir P, Sleigh MA. The physiology of cilia and mucociliary interactions. *Annu Rev Physiol* 1990; 52:137-155.
5. Wanner A, Salathe M, O'Riordan TG. Mucociliary clearance in the airways. *Am J Respir Crit Care Med* 1996; 154(6 Pt 1):1868-1902.
6. Elisabeth Striegl: Einfluss von IL 3 auf die mukoziliäre Funktion gemessen an Sphäroiden von nasalem Epithel von Allergikern und Normalpersonen nach Stimulation mit ATP. Dissertation LMU 2009
7. Übers. U. Hrsg. V. Annette G. Beck-Sickinger u. Ulrich Hahn: Lehrbuch der Biochemie Donald Voet Judith G- Voet Charlotte W. Pratt Verlag: Wiley-Vch 2010 2 aktualis.u.erw. Aufl. ISDN-10:3527326677
8. J.H. Evans, M.J. Sanderson: Intercellular calcium oscillation regulate ciliary frequency of air epithelial cell. Department of Physiology, University of Massachusetts Medical School, Worcester, MA 01655, USA
9. G M Corbo, A Foresi, P Bonfitto, A Mugnano, N Agabiti, P J Cole: Research Article: Measurement of nasal mucociliary clearance. *Arch Dis Child* 1989;64:546-550 doi:10.1136/adc.64.4.546.
10. Aracelli Osores, Heike Gustke, Dr. Bernd Hinrichs, Dr. Joachim Lemke, Prof. Dr. Frank Riedel, Prof. Dr. Udo Schumacher: Primäre Ziliendyskinesie: Seltene Ursache für Sinusitis, Bronchiektasie oder Infertilität <http://www.aerztekammerhamburg.de/funktionen/aebonline/pdfs/1199978772.pdf>
11. T. Nüßlein..F. Brinkmann.P. Ahrens.M. Ebsen. A. Jung. W. Kirchberger. A. Kneißl. C. Koerner-Rettberg. H. Linz-Keul. N.T. Loges. D. Theegarten. H. Seithe. J. Sendler. C. Werner. H. Omran.: Diagnostik der primären ziliären Dyskinesie. *Monatsschr Kinderheilkd* 2013 · 161:406–416 DOI 10.1007/s00112-012-2798-y Online publiziert: 28. April 2013 © Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2013
12. De Rossi, G: Radioisotope studies of mucociliary system function in otorhinolaryngology *Radiologia Diagnostica*; Journal Volume: 33; Journal Issue: 5; Other Information: PBD: 1992
13. Sun SS, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Kao CH.: The role of rhinoscintigraphy in the evaluation of nasal mucociliary clearance function in patients with sinusitis. *Nucl Med Commun*. 2000 Nov;21(11):1029-32
14. Sun SS, Hsieh JF, Tsai SC, Ho YJ, Kao CH.: Evaluation of nasal mucociliary clearance function in allergic rhinitis patients with technetium 99m-labeled macroaggregated albumin rhinoscintigraphy. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 2002 Jan;111(1):77-9
15. Chilvers MA, O'Callaghan C. Analysis of ciliary beat pattern and beat frequency using digital high speed imaging: comparison with the photomultiplier and photodiode methods. *Thorax* 2000; 55(4):314-317.
16. Yoshitsugu M, Rautiainen M, Matsune S, Nuutinen J, Ohya M. Effect of exogenous ATP on ciliary beat of human ciliated cells studied with differential interference microscope equipped with high speed video. *Acta Otolaryngol* 1993; 113(5):655-659.
17. Armengot M, Milara J, Mata M, Carda C, Cortijo J.: Cilia motility and structure in primary and secondary ciliary dyskinesia. *Am J Rhinol Allergy*. 2010 May;24(3):175-80.
18. Aracelli Osores, Heike Gustke, Dr. Bernd Hinrichs, Dr. Joachim Lemke, Prof. Dr. Frank Riedel, Prof. Dr. Udo Schumacher: Primäre Ziliendyskinesie: Seltene Ursache für Sinusitis, Bronchiektasie oder Infertilität <http://www.aerztekammerhamburg.de/funktionen/aebonline/pdfs/1199978772.pdf>
19. Thomas, A., Petro, W., Konietzko, N.: Untersuchungen zur zirkadianen Rhythmus der Schlagfrequenz menschlicher Nasenzilien bei Lungengesunden und Patienten mit chronisch obstruktiver

- Lungenerkrankung. Einschließlich der adrenergen Stimulation durch Terbutalin. Pneumologie. 1993 Sep; 47(9): 526-530.
20. Fernando Gamarra Albrecht Bergner Elisabeth Stauss Ingrid Stocker Stefan Grundler Rudolf Maria Huber: Rotation Frequency of Human Bronchial and Nasal Epithelial Spheroids as an Indicator of Mucociliary Respiration 2006; 73:664–672 DOI: 10.1159/000092672
21. Corssen, G., Allen, C.: Comparison of toxic effects of various local anesthetic drugs on human ciliated epithelium in vitro. Tex Rep Biol & Med 1958, 16:194.
22. Corssen, G., Allen, C.: Cultured human respiratory epithelium: its use in the comparison of the cytotoxic properties of local anesthetics. Anesthesiology 1960, 21:237-243.
23. Stefan Wild : Strukturelle und funktionelle Eigenschaften Neuer cis-Platin- Chelatkomplexe und ihrer DNA-Addukte: Relevanz für die cytotoxische Wirkung, Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Fakultät für Chemie und Pharmazie der Ludwig-Maximilians-Universität-München 2001
24. R. M. Huber : Tumoren der Lunge und des Mediastinums: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge Zuckschwerdt Verlag; 10. Auflage 2014 ISBN 978-3-86371-123-8
25. Wong, E., Giandomenico, C. M., Current Status of Platinum-Based Anti-tumor Drugs, Chemical reviews,1999 ,99, 2451 – 2466
26. Cervantes A, Roda D, Tarazona N, Roselló S, Pérez-Fidalgo JA: Current questions for the treatment of advanced gastric cancer. Cancer Treat Rev. 2013 Feb;39(1):60-7. doi: 10.1016/j.ctrv.2012.09.007. Epub 2012 Oct 25. 27. B. Lippert (Hrsg.): CISPLATIN – Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. 1999, WILEY-VCH, S. 84–85.
28. Fachinformation: Cisplatin 0,5 mg/ml Lösung medac. <http://www.fachinfo.de>
29. Böcker/Denk/Heitz: Pathologie 3 Auflage April 2004 © Elsevier GmbH, München; Urban&Fischer Verlag ISBN 3-437-42381-9
30. Bridges, M. A., Walker, D. C., Harris, R. A., Wilson, B. R., Davidson, A. G. F.: Cultured human nasal epithelial multicellular spheroids: polar cyst-like model tissues, Biochem Cell Biol 1991 Feb-Mar, 69 (2-3):102-108.
31. Devalia JL, Sapsford RJ, Wells CW, Richman P, Davies RJ. : Culture and comparison of human bronchial and nasal epithelial cells in vitro. Respir Med 1990; 84(4): 303-312.
32. Antunes MB, Gudis DA, Cohen NA: Epithelium, cilia, and mucus: their importance in chronic rhinosinusitis. Immunol Allergy Clin North Am. 2009 Nov;29(4):631-43.
33. Robinson M, Bye PT.: Mucociliary clearance in cystic fibrosis. Source Cystic Fibrosis Centre (E11S), Royal Prince Alfred Hospital, Missenden Road, Camperdown, New South Wales 2050, Australia. mr@mail.med.usyd.edu.au
34. Bermbach S1, Weinhold K, Roeder T, Petersen F, Kugler C, Goldmann T, Rupp J, König P.: Mechanisms of Cilia-Driven Transport in the Airways in the Absence of Mucus. Am J Respir Cell Mol Biol. 2014 Jan 27
35. J. Iravani und G. N. Melville: Mucociliäre Funktion und Inhalation des Zigarettenrauches Medizinische Abteilung des Silikose-Forschungsinstituts der Bergbau-Berufsgenossenschaft, Bochum Pneumologie 150, 211--216 (1974) © by Springer-Verlag 1974
36. Thomas Karow, Lang : Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 18 Auflage 2010 ©
37. Gertsberg I, Hellman V, Fainshtein M, Weil S, Silberberg SD, Danilenko M, Priel Z. Intracellular Ca²⁺ regulates the phosphorylation and the dephosphorylation of ciliary proteins via the NO pathway. J Gen Physiol 2004;124:527–540.
38. Cohen NA: Sinonasal mucociliary clearance in health and disease. Ann Otol Rhinol Laryngol Suppl. 2006 Sep;196:20-6

39. Produktinformation.<http://www.promocell.com/fileadmin/promocell/PDF/C-39160.pdf#p> age=&zoom=auto,0,849, Stand: 08.01.2014.
40. Mueller L, Brighton LE, Carson JL, Fischer Ii WA, Jaspers I. Culturing of Human Nasal Epithelial Cells at the Air Liquid Interface. 2013(80):e50646.
41. P.Thyberg, R. Rigler , K. Svartengren, and L. G. Wiman :Biophysical models of ciliary activity: Gaussian frequency distributions Department of Lung Medicine, Karolinska Institute, Huddinge University Hospital, Stockholm, 1989 Eur Biophys J (1990) 18:85-91
42. Armengot M, Basterra J, Garcia-Bartual E: The influence of anesthetics and vasoconstrictors on nasal mucociliary transport. Acta Otorhinolaryngol Belg 1989;43:149–156.
43. Dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, Dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. Archives of toxicology. 2012.
44. Basu A, Krishnamurthy S. Cellular responses to Cisplatin-induced DNA damage. Journal of nucleic acids. 2010;2010.
45. Andrea Penger 2017: Einfluss des Chemotherapeutikums Cisplatin auf die Calcium Konzentration in Zellen des respiratorischen Epithels. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
46. Bootman MD, Collins TJ, Peppiatt CM, Prothero LS, MacKenzie L, De Smet P, et al. Calcium signalling--an overview. Seminars in cell & developmental biology. 2001;12(1):3-10.
47. Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. Nature reviews Molecular cell biology. 2000;1(1):11-21.
48. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nature reviews Molecular cell biology. 2003;4(7):552-65.
49. Bergner A, Kellner J, Tufman A, Huber RM. Endoplasmic reticulum Ca²⁺-homeostasis is altered in Small and non-small Cell Lung Cancer cell lines. Journal of experimental & clinical cancer research : CR. 2009;28:25.
50. Robinzonow M. Der Einfluss von Cisplatin auf die mukoziliäre Funktion von gesunden Probanden. Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilian-Universität zu München. München 2014.
51. Orrenius S, Zhivotovsky B, Nicotera P. Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. Nature reviews Molecular cell biology. 2003;4(7):552-65.
52. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. The Journal of biological chemistry. 2003;278(11):9100-6.
53. Mandic A, Viktorsson K, Strandberg L, Heiden T, Hansson J, Linder S, et al. Calpain-mediated Bid cleavage and calpain-independent Bak modulation: two separate pathways in cisplatin-induced apoptosis. Molecular and cellular biology. 2002;22(9):3003-13.
54. Valle JW et al. Cediranib or placebo in combination with cisplatin and gemcitabine chemotherapy for patient with advanced biliary tract cancer (ABC-03): a randomised phase 2 trial. Lancet Oncol 2015;16:967-78
55. Dos Santos NA, Carvalho Rodrigues MA, Martins NM, Dos Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: an update. Archives of toxicology. 2012.
56. Wieland Voigt, Andrea Dietrich, Hans-Joachim Schmoll: Cisplatin und seine Analoga. Pharmazie in unserer Zeit 35(2), S. 134 - 143 (2006), ISSN 0048-3664
57. Markus Galanski, Bernhard K. Keppler: Tumorhemmende Metallverbindungen. Pharmazie in unserer Zeit 35(2), S. 118 - 122 (2006), ISSN 0048-3664
58. Bernhard Lippert (Ed.): Cisplatin, Chemistry and Biochemistry of a Leading Anticancer Drug. Wiley-VCH (1999), ISBN 3-906390-20-9
59. <https://www.teva.de/produkte/details/präparate/präparatedaten/detail/pzn-6559636.html>

60. [https://www.medizin.uni-muenster.de/pcd/forschung/primaere-ciliaere dyskinesie/informationen- pcd/](https://www.medizin.uni-muenster.de/pcd/forschung/primaere-ciliaere-dyskinesie/informationen-pcd/)
61. Thomas, A., Petro, W., Konietzko, N.: Untersuchungen zur zirkadianen Rhythmisierung der Schlagfrequenz menschlicher Nasenzilien bei Lungengesunden und Patienten mit chronisch obstruktiver Lungenerkrankung. Einschließlich der andrenogenen Stimulation durch Terbutalin, *Pneumonologie*, 1993 Sep, 47(9):526-30.
62. Devalia, J.L., Sapsford, R.J., Rusznak, C., Toumbis, M.J., Davies, R.J.: The effects of salmeterol and salbutamol on ciliary beat frequency of cultured human bronchial epithelial cells, *in vitro*, *Pulm Pharmacol* 1992, 5(4):257-263.
63. Lindberg, S., Runer, T.: Method for *in vivo* measurement of mucociliary activity in the human nose, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1994, 103:558-566.
64. Lopez-Vidriero, M. T., Jacobs, M., Clarke, S.W.: The effect of isoprenaline on the ciliary activity of an *in vitro* preparation of rat trachea, *Eur J Pharmacol.* 1985, 19;112(3):429-32.
65. Tomaoki, J., Chiyotani, A., Sakai, N., Konno, K.: Stimulation of ciliary motility mediated by atypical beta-adrenoceptor in canine bronchial epithelium, *Life Sci* 1993, 53(20):1509-15.
66. Schuil, P. J., Rosmalen, J. G., Graamans, K., Huizing, E. H.: Calcitonin gene-related peptide *in vitro* stimulation of ciliary beat in human upper respiratory cilia, *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1995, 252(8):462-464.
67. Schuil, P. J., Rosmalen, J. G., Graamans, K., Huizing, E. H.: Effects of prostaglandins D2 and E2 on ciliary beat frequency of human upper respiratory cilia *in vitro*, *Acta Otolaryngol* 1995 May, 115(3):438-442.
68. Corssen, G., Allen, C.: Comparison of toxic effects of various local anesthetic drugs on human ciliated epithelium *in vitro*. *Tex Rep Biol & Med* 1958, 16:194.
69. Roth, Y., Aharonson, E. F., Teichtahl, H., Baum, G. L., Priet, Z., Modan, M.: Human *in vitro* nasal and tracheal ciliary beat frequencies: comparison of sampling sites, combined effect of medication, and demographic relationships, *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1991, 100: 378-384.
70. Helleday, R., Hubermann, D., Blomberg, A., Sternberg, N., Sandström, T.: Nitrogen dioxide exposure impairs the frequency of the mucociliary activity in healthy subjects, *Eur Respir J* 1995, 8 (10):1664-1668.
71. Verra, F., Escudier, E., Lebargy, F., De Cremaux, H., Bignon, J., Ciliary abnormalities in bronchial epithelium of smokers ex smokers and non-smokers. *Am. J. Respir. Crit. Care. Med.* 151, 630-634 (1995)
72. Iravani, J., Melville, G.N. Wirkung von Pharmaka und Milieuveränderungen auf die Flimmertätigkeit der Atemwege. *Respiration*, 32, 157-164 (1975)
73. Classen, M., Diehl, V., Kocchsieck, K., Berdel, W.E., Böhm, M., Schmiegel, W. (Hrsg.): Innere Medizin, 5. Aufl., 2006.
74. Boucher, R. C.: New concepts of the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease, *Eur Respir J* 2004, 23:146-158.
75. Chmiel, J. F., Davis, P.B.: State of the Art: Why do the lungs of patients with cystic fibrosis become infected and why can't they clear the infection?, *Respir Res* 2003; 4:8. Epub 2003 Aug 27.
76. Gonzalez VM, Fuertes MA, Alonso C, Perez JM. Is cisplatin-induced cell death always produced by apoptosis? *Molecular pharmacology*. 2001;59(4):657-63.
77. Mandic A, Hansson J, Linder S, Shoshan MC. Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(11):9100-6.
78. Yu F, Megyesi J, Price PM. Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity. *American journal of physiology Renal physiology*. 2008;295(1):F44-52.
79. Park CM, Park MJ, Kwak HJ, Moon SI, Yoo DH, Lee HC, et al. Induction of p53-mediated apoptosis and recovery of chemosensitivity through p53 transduction in human glioblastoma cells by cisplatin. *International journal of oncology*. 2006;28(1):119-25.
80. Santos NA, Catao CS, Martins NM, Curti C, Bianchi ML, Santos AC. Cisplatin-induced nephrotoxicity is associated with oxidative stress, redox state unbalance, impairment of energetic metabolism and apoptosis in rat kidney mitochondria. *Archives of toxicology*. 2007;81(7):495-504.

81. Bergner A, Huber RM. Regulation of the endoplasmic reticulum Ca(2+)-store in cancer. Anti-cancer agents in medicinal chemistry. 2008;8(7):705-9.
82. Beucher J, Chambellan A, Segalen J, Deneuville E. [Primary ciliary dyskinesia: a retrospective review of clinical and paraclinical data]. Rev. Mal. Respir. 2011; 28:856–863. [PubMed: 21943530]
83. Pifferi M, Bush A, Michelucci A, Di Cicco M, Piras M, Caramella D, Mazzei F, Neri M, Pioggia G, Tartarisco G, Saggese G, Simi P, Boner AL. Mannose-binding lectin 2 gene polymorphism and lung damage in primary ciliary dyskinesia. Pediatr. Pulmonol. 2015; 50:179–186. [PubMed: 24753481]
84. Mullowney T, Manson D, Kim R, Stephens D, Shah V, Dell S. Primary ciliary dyskinesia and neonatal respiratory distress. Pediatrics. 2014; 134:1160–1166. [PubMed: 25422025]
85. Goutaki M, Meier A, Halbeisen FS, Lucas JSA, Dell SD, Maurer E, Casaulta C, Jurca M, Spycher BD, Kuehni CE. Clinical manifestations in Primary Ciliary Dyskinesia: a systematic review and metaanalysis. Eur Respir J. 2016 in press.
86. Steyerberg EW, Vergouwe Y. Towards better clinical prediction models: seven steps for development and an ABCD for validation. Eur. Heart J. 2014; 35:1925–1931. [PubMed: 24898551]
87. Walker WT, Jackson CL, Lackie PM, Hogg C, Lucas JS. Nitric oxide in primary ciliary dyskinesia. Eur. Respir. J. 2012; 40:1024–1032. [PubMed: 22408195]
88. Shixuan Wang^a, Qingqing Weia^a, Guie Donga^a, and Zheng Donga,b,*^a Department of Cellular Biology and Anatomy, Medical College of Georgia, ERK-mediated suppression of cilia in cisplatin-induced tubular cell apoptosis and acute kidney injury
89. Shaloam Dasari and Paul Bernard Tchounwou*^a Cellomics and Toxicogenomics Research Laboratory, Cisplatin in cancer therapy: molecular mechanisms of action
90. Youlden DR, Cramb SM, Baade PD. The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. J.Thorac.Oncol. 2008; 3:819–831. [PubMed: 18670299]
91. Iwasaki Y, Nagata K, Nakanishi M, Natuhara A, Kubota Y, Ueda M, Arimoto T, Hara H. Double- cycle, high-dose ifosfamide, carboplatin, and etoposide followed by peripheral blood stem-cell transplantation for small cell lung cancer. Chest. 2005; 128:2268–2273. [PubMed: 16236883]
92. Gottesman MM, Fojo T, Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat.Rev.Cancer. 2002; 2:48–58. [PubMed: 11902585]
93. Aggarwal SK. A histochemical approach to the mechanism of action of cisplatin and its analogues. J.Histochem.Cytochem. 1993; 41:1053–1073. [PubMed: 8515048]
94. Aggarwal SK. Calcium modulation of toxicities due to Cisplatin. Met.Based.Drugs. 1998; 5:77–81. [PubMed: 18475826]
95. Böcker/Denk/ Heitz: Pathologie 3 Auflage April 2004, Elsevier GmbH, München; Urban & Fischer Verlag ISBN 3-437-42381-9
96. Bautista Harris G1, Rodriguez Bermejo JC, Castillo Suarez M. Different frequency of cilia with transposition in human nasal and bronchial mucosa. A case of acquired ciliary dyskinesia.
97. Schrödl, Kathrin (2011): Die veränderte intrazelluläre Ca²⁺-Homöostase in der Resistenzentwicklung von kleinzelligen als auch nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomzellen auf die Behandlung mit Cisplatin. Dissertation, LMU München: Medizinische Fakultät.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe „Pneumologie“ unter der Betreuung des Arbeitsgruppenleiters Dr. med. Fernando Gamarra in der Medizinischen Klinik und Poliklinik V des Universitätsklinikums LMU München unter der Leitung von Prof. Dr. Dr. Rudolf M. Huber angefertigt. Ich danke Prof. Huber und Dr. Gamarra für die Möglichkeit, meine Dissertation an der Universitätsklinik München zu verfassen und für ihre Unterstützung dabei in den letzten Jahren.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der pneumologischen Abteilung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders danken möchte ich dabei Rosemarie Kiefl und Milena Robinzonov für die Einarbeitung in verschiedene Labortechniken und für die stets kollegiale und freundliche Zusammenarbeit. Ferner danke ich Herrn Prof. Dr. S. Endres, Leiter der Abteilung für klinische Pharmakologie der Medizinischen Klinik, sowie dessen Mitarbeitern für die Mitbenutzung der Räumlichkeiten und der Laborgeräte.

Herzlichen Dank an Herrn Basil Komboz für die großartige Hilfe bei allen statistischen Fragen.

Ebenfalls danke ich noch allen Probanden und Freunden, die mir Proben ihrer Nasenschleimhaut für diese Arbeit überlassen haben.

Ein ganz besonderer Dank geht an PD Dr. Christian Schulz. Lieber Christian, diese Worte drücken wohl kaum aus, wie dankbar ich Dir bin für Deine Unterstützung bei meiner Doktorarbeit. Vielen Dank für die vielen, anfangs sicherlich mühsamen Stunden, für Deine kreativen Ideen und für Deine Geduld, für die Korrektur dieser Arbeit und dafür, dass ich mich immer auf Dich verlassen konnte.

Mein weiterer Dank gilt den Kooperationspartnern, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren:

- Herr PD Dr. Dr. Kneidinger, Nikolaus
- Herr Prof. Dr. Behr, Jürgen

Zuletzt möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner Familie für die Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg bedanken.

Zelim zahvaliti prije svega svojim roditeljima, svom bratu i svojoj sestri na bez uvjetnoj ljubavi i podrsci u svim zivotnim situacijama.

Eidesstattliche Versicherung

Bučan-Dedić, Nermina
Name, Vorname

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

Die Auswirkung von Cisplatin auf die mukoziliäre Funktion von humanen Nasenepithelzellen

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

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

München, den 11.06.2019

Bučan-Dedić Nermina

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin bzw. Doktorand