

Aus der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. A. Berghaus

Entwicklung eines Modells zur Testung der Genotoxizität von Umweltstoffen
anhand von Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosazellen

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

vorgelegt von
Jutta Birgitta Ihbe

aus
Würzburg

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. N. Kleinsasser -----

Mitberichterstatter: Prof. Dr. R. Mocikat -----
Prof. Dr. E. Richter-----

Mitbetreuung durch den Prof. A. Berghaus -----
promovierten Mitarbeiter: Dr. U. Harréus -----

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.11.2004 -----

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Umwelteinflüsse und Kanzerogenese	1
1.2.	Anforderungen an ein Testsystem zur lebensnahen Untersuchung von Genotoxizität	2
1.3.	Testsubstanzen	4
1.3.1.	Nitrosoverbindungen	4
1.3.2.	Natriumdichromat	6
1.3.3.	Phthalate	7
1.3.4.	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe	8
1.4.	Arbeitshypothese und Aufgabenstellung	8
2.	PATIENTENGUT, MATERIAL UND METHODEN	10
2.1.	Patientengut	10
2.2.	Miniorgankulturen	13
2.2.1.	Präparation der Schleimhaut	13
2.2.2.	Anzüchtung der Miniorgankulturen	13
2.2.3.	Fremdstoffinkubation der Kulturen	14
2.2.4.	Gewinnung von Einzelzellen	17
2.2.5.	Vitalitätstest	17
2.3.	Einzelzellen aus Frischbiopsaten	18
2.3.1.	Präparation der Schleimhaut und Gewinnung von Einzelzellen	18
2.3.2.	Fremdstoffinkubation	18
2.4.	Wirkung genotoxischer Substanzen auf Zellen im Organverband und auf Einzelzellen nach gleichartiger Kultivierung	19
2.4.1.	Präparation der Schleimhaut und Kultivierung	20
2.4.2.	Behandlung der Miniorgankulturen	20
2.4.3.	Behandlung der Einzelzellen	20
2.5.	Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)	21
2.5.1.	Präparation der Objektträger und Auftragen der Zellen	22
2.5.2.	Lyse der Zell- und Kernmembranen	22
2.5.3.	Elektrophorese	22

2.6.	Ergebnis Analyse	23
2.6.1.	Olive-Tail-Moment als Maß für DNA-Migration	23
2.6.2.	Ergebnisdarstellung in Boxplots.....	24
2.6.3.	Statistische Testverfahren.....	24
3.	ERGEBNISSE	25
3.1.	Darstellungen von DNA-Schädigungen nach Fremdstoffinkubation	25
3.1.1.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Dimethylsulfoxid	28
3.1.2.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit N-Nitrosodiethylamin	30
3.1.3.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Natriumdichromat.....	32
3.1.4.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat	33
3.1.5.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Benzo[a]pyren-Diolepoxid.....	35
3.1.6.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin	36
3.2.	Vergleich Einzelzellen und Miniorgankulturen.....	38
3.2.1.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Dimethylsulfoxid	38
3.2.2.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit N-Nitrosodiethylamin	39
3.2.3.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Natriumdichromat.....	41
3.2.4.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat	42
3.2.5.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Benzo[a]pyren-Diolepoxid.....	44
3.2.6.	Genotoxische Effekte nach Inkubation mit N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin	45
4.	DISKUSSION	47
4.1.	Diskussion der Methodik.....	47
4.1.1.	Miniorgankulturen	47
4.1.2.	Comet Assay.....	53
4.2.	Diskussion der Testsubstanzen.....	56
4.2.1.	DNA-Migration nach Inkubation mit Dimethylsulfoxid	57
4.2.2.	DNA-Migration nach Inkubation mit N-Nitrosodiethylamin.....	57
4.2.3.	DNA-Migration nach Inkubation mit Natriumdichromat	59
4.2.4.	DNA-Migration nach Inkubation mit Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat	61
4.2.5.	DNA-Migration nach Inkubation mit Benzo[a]pyren-Diolepoxid	62

4.2.6.	DNA-Migration nach Inkubation mit N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin	63
5.	ZUSAMMENFASSUNG	65
6.	LITERATUR	67
7.	ANHANG	81
7.1.	Abkürzungen.....	81
7.2.	Wissenschaftliche Beiträge mit Auszügen aus der vorliegenden Arbeit....	82
7.2.1.	Originalarbeiten	82
7.2.2.	Abstrakts.....	82
7.3.	Lebenslauf	84
7.4.	Danksagung.....	85

1. EINLEITUNG

1.1. Umwelteinflüsse und Kanzerogenese

Maligne Tumoren stehen heute in der Statistik der Todesursachen an zweiter Stelle [Statistisches Bundesamt, 2003]. Durch den Rückgang anderer Krankheiten und aufgrund der zunehmenden Lebenserwartung haben Tumoren mehr Zeit sich zu entwickeln. Bei der Krebsentstehung kommt es zu einem unkontrollierten Wachstum von Körperzellen, das auf einer Veränderung des genetischen Materials beruht. Äußere Faktoren, wie Fremdstoffe, Umwelteinflüsse und verschiedene Lebensgewohnheiten, Ernährungsverhalten oder Tabakkonsum, spielen eine wichtige Rolle. Obwohl exogene Faktoren als Auslöser einer Tumorerkrankung gelten, kann doch die individuelle Empfindlichkeit gegenüber bestimmten Noxen je nach genetischer Disposition unterschiedlich sein [Cloos et al., 1996]. So gibt es Abweichungen bei der Reparaturkapazität von DNA-Schäden [Mohankumar et al., 2002]. Auch wirken die meisten Stoffe nicht als solche Erbgut verändernd, sondern benötigen eine metabolische Aktivierung durch den Organismus. Diesen Vorgang bezeichnet man als Biotransformation. Die an Phase I und II dieses Metabolismus beteiligten Enzyme, wie das Cytochrom P-450-System [Hong und Yang, 1997] bzw. die Glutathion-S-Transferasen [Kihara et al., 1997] oder die Alkohol-Dehydrogenase 3 [Coutelle et al., 1997], können individuelle Unterschiede aufweisen [Eisenbrand und Metzler, 2002].

Für zahlreiche Stoffe aus unserer Umwelt, die zum Beispiel als Dampf oder in Form von Staub eingeatmet werden, stellen die Mukosazellen des oberen Aerodigestivtraktes das primäre Kontaktorgan dar. Will man die karzinogene Wirkung bestimmter Substanzen auf humane Zellsysteme untersuchen, sind daher diese Mukosazellen als Zielorgan der Kanzerogene von Bedeutung.

Zur Abschätzung des Risikos, an einem malignen Tumor zu erkranken, muss also sowohl die Wirkung von äußeren Kanzerogenen, als auch die individuelle, genetisch bedingte Empfindlichkeit des Einzelnen berücksichtigt werden. Für die

Prävention von Krebserkrankungen ist also die Entwicklung von spezifischen Testsystemen zur Evaluierung des individuellen Risikoprofils wünschenswert.

1.2. Anforderungen an ein Testsystem zur lebensnahen Untersuchung von Genotoxizität

Viele Menschen sind durch Umwelteinflüsse oder die Exposition am Arbeitsplatz einer erhöhten Belastung durch Schadstoffe ausgesetzt, die eine Erbgut schädigende Wirkung haben können. Bei den Schadstoffen kann es sich sowohl um synthetisch hergestellte, als auch um natürlich vorkommende Stoffe handeln. Eine Substanz, die eine Veränderung der DNA bewirkt, wird als genotoxisch bezeichnet. Genotoxische Substanzen sind in der Lage, genetische Information zu verändern. Genotoxizität stellt sich dar in DNA-Veränderungen wie Einzelstrang- und Doppelstrangbrüchen, Punktmutationen und Chromosomenveränderungen. Auch der Entstehung von bösartigen Tumoren liegt eine DNA-Veränderung zugrunde.

Um die Auswirkung solcher genotoxischen Stoffe abschätzen zu können, ist es nötig ein Testsystem zu entwickeln, das DNA-Schäden an humanen Zellen aufzeigen kann und in der Lage ist, eine wiederholte oder chronische Fremdstoffexposition zu simulieren. In einigen Modellen wurde der Einfluss genotoxischer Substanzen auf humane Zellsysteme gezeigt [Kleinsasser et al., 2000a; Faccioni et al., 2003; Harréus et al., 1999]. Dabei wurden einmalige Fremdstoffinkubationen an separierten Mukosazellen vorgenommen. Auf diese Weise kann man Rückschlüsse auf mögliche genotoxische Wirkungen einer Substanz auf den lebenden Organismus ziehen.

Jedoch haben Einzelzellen eine eingeschränkte Stoffwechselfunktion [Teissier et al., 1998]. Im Vergleich zu Zellen im Zellverband besitzen sie eine andere genotoxische Sensitivität und eingeschränkte DNA-Reparaturmechanismen. Führt man die Tests an isolierten Lymphozyten durch [Kleinsasser et al., 2000b], so muss man berücksichtigen, dass diese Zellen nicht aus dem primären Kontaktorgan eines Xenobiotikums stammen. Möglicherweise sind Lymphozyten den Metaboliten, nicht aber dem Fremdstoff in seiner ursprünglichen Form ausgesetzt. Ebenso wird

bei der Einzelzellinkubation von Mukosazellen oder Lymphozyten eine Reparatur von DNA-Schäden nicht nachgewiesen. Entsprechende Reparaturintervalle fehlen, die Ergebnisse geben insofern nur einen momentanen Status von Schädigung und gleichzeitiger Reparatur während der Schädigung an.

Bei in vivo Studien ist es demgegenüber schwierig, Rückschlüsse auf Ausmaß und Art der durch ein bestimmtes Xenobiotikum hervorgerufenen Schädigung zu ziehen, da das einzelne Individuum verschiedenen Stoffen der Umwelt gleichzeitig ausgesetzt ist und genauere Informationen über frühere Xenobiotikaexpositionen in ungenügend quantifizierbarem Ausmaß vorliegen.

Im Gegensatz zu den Beobachtungen in vivo können die Bedingungen für in vitro Versuche standardisiert werden. Daher soll in der vorliegenden Arbeit versucht werden, ein in vitro Modell zur wiederholten Inkubation humaner Mukosazellen zu etablieren, das den wahren Bedingungen für die Aufnahme von Xenobiotika über den oberen Aerodigestivtrakt möglichst nahe kommt. Durch ein solches System ließe sich die wiederkehrende oder chronische Exposition eines Individuums gegenüber einem Schadstoff nachahmen.

Die für die Versuche verwendete Schleimhaut wurde durch Abtragung von Mukosa vom unteren Nasenschwellkörper gewonnen. Diesen Eingriff führte man bei Patienten mit einer Nasenatmungsbehinderung aufgrund einer Nasenmuschelhyperplasie durch. Um den Bedingungen im lebenden Organismus möglichst nahe zu kommen, wurden die Zellen in ihrem natürlichen Zellverband belassen und in Form von ca. 1 mm³ Schleimhautstücken, sogenannten Miniorganen untersucht. Die Gewinnung von Miniorgankulturen aus nasaler Schleimhaut stellt eine modifizierte Methode dar, die im Original von Steinsvag beschrieben worden war [Steinsvag et al., 1991]. Zur quantifizierenden Darstellung der durch die Testsubstanzen hervorgerufenen DNA-Schäden diente die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese, die wegen der Bildung von typischen kometenförmigen DNA-Konglomeraten in der Literatur als Comet Assay bekannt wurde. Der Comet Assay stellt eine von Oestling und Johanson entwickelte Methode zur Untersuchung von DNA-Migration dar [Oestling und Johanson, 1984]: Durch Einzel-Strang-Brüche herausgelöste DNA-Fragmente wandern durch elektrische

Polarisierung Richtung Anode und können später durch Fluoreszenzfärbung sichtbar gemacht werden.

Ein Ziel der Studie war es, zu prüfen, ob der Comet Assay auch bei Zellen aus Organkulturen des oberen Aerodigestivtraktes Anwendung finden kann und ob durch Verbindung der beiden Methoden eine Möglichkeit besteht, die Wirkung genotoxischer Substanzen auf den Organismus nachzuweisen. Die Verbindung der beiden Methoden bietet die Möglichkeit DNA-Schäden nach mehrmaliger Fremdstoffinkubation und dazwischen liegenden Reparaturintervallen zu betrachten.

1.3. Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden Vertreter aus verschiedenen Gruppen typischer Umwelttoxene gewählt: N-Nitrosodiethylamin (NDEA) für die Nitrosamine, Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) für die Chromverbindungen, Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat (MEHP) für die Phthalate und Benzo[a]pyren-Diolepoxid (BPDE) für die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe. Als Negativkontrolle diente Dimethylsulfoxid (DMSO) und als Positivkontrolle N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG).

1.3.1. Nitroverbindungen

N-Nitrosodiethylamin (NDEA) gehört zur Gruppe der Nitrosamine. Sie entstehen durch eine Reaktion von Nitrit mit Aminen, die vor allem im sauren Milieu stattfindet. Nitrit wird durch Reduktion von Nitrat mit Hilfe des Enzyms Nitratreduktase gebildet.

Nitrate befinden sich in einigen Düngemitteln und somit auch im Trinkwasser und verschiedenen pflanzlichen Lebensmitteln. Vor allem Salat, Spinat oder rote Beete haben einen hohen Anteil an Nitrat. Bereits im Speichel wird daraus eine große Menge Nitrit gebildet. Nitrit wird zum Beispiel eingesetzt in der Lebensmittelherstellung zur Erhaltung der roten Farbe von Fleisch, da es die Umwandlung von Myoglobin zu Oxymyoglobin verhindert.

Sind in Lebensmitteln beide Ausgangsstoffe Nitrit und Amine enthalten, kann es besonders bei der Erwärmung zur Bildung von Nitrosaminen kommen. Amine sind in höherer Konzentration beispielsweise in Käse und Fisch enthalten und entstehen außerdem beim Braten und Schmoren durch Abbau von Aminosäuren. Nitrosamine sind also bereits in Fisch, gepökeltem oder geräuchertem Fleisch und in Käse enthalten. Neu entstehen können sie sowohl bei der Zubereitung von Speisen durch Erwärmen als auch im menschlichen Körper, vor allem im sauren Milieu, wie in Magen und Speichel. Auch in Tabakrauch sind erhebliche Mengen von Nitrosaminen enthalten.

Um ihre karzinogene Wirkung entfalten zu können, müssen Nitrosamine durch das Cytochrom P-450 System aktiviert werden [Hecht, 1997]. Dabei findet zunächst eine Cytochrom P-450 abhängige Hydroxylierung statt, in deren Verlauf das eigentliche Karzinogen, ein elektrophiles Alkylkation entsteht.

Bei allen getesteten Tierarten erweisen sich Nitrosamine als kanzerogen [Brown, 1999]. Epidemiologisch wurde ein Zusammenhang von Nitrosaminen mit Kanzerogenese im Bereich von Ösophagus- und Magenschleimhaut beschrieben: So konnte zum Beispiel ein erhöhtes Risiko für Magenkarzinome nach dem Verzehr von gepökeltem und gegrilltem Fleisch festgestellt werden [De Stefani et al., 1998]. Eine italienische Fall-Kontroll-Studie zeigte einen Zusammenhang zwischen Nitrosaminen in der Nahrung und dem Auftreten von Magenkrebs [La Vecchia et al., 1995]. Eine erhöhte Belastung des Trinkwassers trat zusammen mit einer erhöhten Inzidenz von Magenkarzinomen auf [Morales-Suarez-Varela et al., 1995]. Auch bei der Untersuchung von Enzymssystemen nasaler Schleimhaut wurden Nitrosamine im Tierversuch als kanzerogene Testsubstanzen eingesetzt [Bereziat et al., 1995].

Eine weitere Gruppe der Nitrosoverbindungen stellen Nitrosamide wie N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) dar. Nitrosamide sind direkt alkylierende Substanzen. Es handelt sich um monosubstituierte Acylamide, die aufgrund ihrer alkaliempfindlichen Eigenschaften auch ohne enzymatische Hydrolyse reaktive Agenzien bilden. Durch Bindung an DNA-Basen kann eine fehlerhafte DNA-Struktur hervor gerufen werden. MNNG stellt eine Modellsubstanz dar, die zur experimentellen Darstellung von Karzinogenese oder Teratogenese verwendet wird.

Daher besteht eine Exposition nur für Beschäftigte in den jeweiligen Forschungslaboren [IARC, 1974]. In experimentellen Studien war MNNG an der Entwicklung bösartiger Veränderungen der Magenschleimhaut beteiligt [Tanakamaru et al., 1997; Aoyagi et al., 2000; Ohara et al., 2002].

1.3.2. Natriumdichromat

Natriumdichromat stellt eine sechswertige Chromverbindung dar und gehört zur Gruppe der Metalle, die besonders bei industriellen Arbeitsprozessen vorkommen. Als Ausgangsmaterial dient das Mineral Chromit. Toxikologisch relevant sind vor allem dreiwertige und sechswertige Chromverbindungen. Chrom(IV)-Verbindungen können besser durch die Zellmembranen gelangen. Intrazellulär werden sie zu Chrom(III) reduziert.

Chrom findet Verwendung in der Galvanoindustrie, zur Herstellung nicht rostender Chromstähle oder Keramikmetalle. Es ist außerdem in Holzschutzmitteln, Baustoffen, vor allem Beton, und Reinigungsmitteln enthalten. Eine erhöhte Konzentration durch Aufnahme über die Atemwege wird so möglich. Die Internationale Gesellschaft für die Forschung gegen Krebs (IARC) stuft sehr leicht in Wasser lösliche Chromverbindungen wie Natriumdichromat in die Gruppe 2 der krebserzeugenden Stoffe ein, das heißt als wahrscheinlich kanzerogen [IARC, 1990].

Eine mutagene Wirkung chromenthaltender anorganischer Verbindungen wurde vielfach nachgewiesen: So genügen bei chronischer Verabreichung schon geringe Dosen Natriumdichromat, um einen gewebescheidenden Effekt herbeizuführen, der zur Kanzerogenese beitragen kann [Bagghi et al., 1997]. Ein Anstieg der Lungenkrebsrate bei Ratten konnte gezeigt werden [Steinhoff et al., 1986], ebenso wie ein genotoxischer Effekt auf Magenschleimhautzellen von Mensch und Ratte [Pool-Zobel et al., 1994]. Einen Überblick über die durch Chromat induzierte Genotoxizität findet man bei Singh et al. [1998].

1.3.3 Phthalate

Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat (MEHP) gehört zur Gruppe der Phthalate. Es stellt das Abbauprodukt von Di(2-Ethylhexyl)phthalat (DEHP) dar, das im Körper mit Hilfe des Enzyms Lipase zu Alkohol und MEHP umgewandelt wird. Phthalate werden bei der Verarbeitung von Kunststoffen, besonders Polyvinylchlorid (PVC), eingesetzt und dienen dazu, diese weich, biegsam und resistent gegenüber Temperaturschwankungen zu machen. Sie kommen vor in Kinderspielzeug, Babybeißringen, Farben, Lacken, Kosmetika, Pestiziden, Verpackungen und medizinischen Produkten wie Filtermembranen, Blutbeuteln oder intravenösem Kathetermaterial. Im Laufe der Zeit können sie sich aus ihren ursprünglichen Materialien herauslösen und in die Umwelt oder in Kontaktstoffe übertreten. So wurden sie zu ubiquitären Arbeits- und Umweltstoffen [Fracasso et al., 1999].

Bei Nagetieren wirken Phthalate als Peroxisomen-Proliferatoren und regen so Organwachstum und DNA-Synthese an. Dies konnte an Leberzellen nachgewiesen werden [Huber et al., 1996]. Endgültige Erkenntnisse über direkte gesundheitliche Schädigungen beim Menschen liegen noch nicht vor. Aufgrund von Studien gibt es jedoch Hinweise auf eine Gesundheitsgefährdung. Ein antiandrogener bzw. xenoöstrogener Effekt kann aus einer wachstumsverstärkenden Wirkung der Phthalate auf Zelllinien eines Mammakarzinoms abgeleitet werden [Blom et al., 1998]. Eine Fall-Kontroll-Studie ergab eine steigende Hodenkrebsinzidenz bei vermehrter PVC-Exposition [Hardell et al., 1997]. Bei Patienten, an denen eine extrakorporale Blutoxygenation durch phthalathaltige Membranen vorgenommen wurde, konnten zwar kurzzeitig erhöhte Plasmaspiegel für diese Xenobiotika festgestellt werden, Langzeitschäden wurden jedoch nicht beobachtet [Karle et al., 1997].

Diese Hinweise führten dennoch zu einem Verbot von Phthalaten in Kinderspielzeug durch die Entscheidungen 1999/815/EG und 2003/368/EG der Europäischen Union [ABl L 125, 2003].

1.3.4 Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe

Bei Benzo[a]pyren-Diolepoxid (BPDE) handelt es sich um einen aus 5 Benzolringen bestehenden polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoff. Es ist ein Metabolit von Benz[a]pyren (B[a]P), welches als Leitsubstanz für die Gruppe der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) gilt. PAH werden vorwiegend an Staub- und Rußpartikel gebunden inhaliert. BPDE tritt in der Umwelt vielseitig auf: bei der Müllverbrennung, in Tabakrauch, beim Grillen auf offenem Holzfeuer, als Nebenprodukt beim Gießen von Eisen und Stahl sowie bei Verbrennungsprozessen in Heizkraftwerken bei unvollständiger Verbrennung.

PAH werden durch Cytochrom P-450 abhängige Polyoxxygenasen aktiviert. Dabei kommt es zur Bildung von DNA-Addukten. Diese sind in der Lage durch promutagene Eigenschaften während der DNA-Replikation Mutationen auszulösen. Bereits 1936 wurde eine erhöhte Mortalitätsrate durch Lungen- und Larynxkarzinome bei Gaswerks- und Kokereiofenarbeitern festgestellt [Kennaway und Kennaway, 1936]. Inzwischen gilt BPDE unabhängig von der Art der Applikation als potentes Kanzerogen. So konnte ein erhöhtes Risiko für Pharynxkarzinome bei Arbeitern der Kohle- und Teerindustrie nachgewiesen werden [Maier et al., 1994]. Bei der Untersuchung von Lymphozytenkulturen wurden eine hohe Rate BPDE induzierter Strangbrüche sowie eine ineffiziente DNA-Reparatur gezeigt [Wei et al., 1996]. Die IARC stuft es als Kanzerogen der Stufe 2A ein [IARC, 2001].

1.4 Arbeitshypothese und Aufgabenstellung

Erbgut schädigende Umweltstoffe stellen einen Baustein bei der multifaktoriellen Karzinogenese im oberen Aerodigestivtrakt dar. Um die Wirkung dieser Stoffe auf die DNA zu quantifizieren, werden Vertreter verschiedener Stoffe auf ihr genotoxisches Potential hin untersucht: NDEA als Beispiel für Nitrosoverbindungen, Natriumdichromat als Repräsentant für Metallverbindungen, BPDE als Vertreter der polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe und MEHP aus der Stoffgruppe der Phthalate.

Als Untersuchungsmaterial dient nasale Schleimhaut, die für viele aus der Umwelt aufgenommenen Stoffe das erste Kontaktorgan darstellt. Um möglichst lebensnahe Bedingungen nachzuahmen, erfolgt die Inkubation an strukturell intakten Mukosazellen im Zellverband. Dieses Testsystem der Miniorgankulturen ermöglicht auch eine wiederholte Inkubation von Zellen in ihren epithelialen Strukturen mit zwischen geschalteten Reparaturintervallen.

In der vorliegenden Arbeit soll zum einen untersucht werden, ob die genannten Stoffe Schäden an der Erbsubstanz in Form von Einzelstrangbrüchen hervorrufen, zum anderen, ob Miniorgankulturen humaner Schleimhaut zur repetitiven Inkubation mit Fremdstoffen herangezogen werden können und ob sie sich nach mehrfacher Inkubation zur Schädigungsanalyse in einem Mikrogel-Elektrophorese-Assay eignen. Weiterhin soll getestet werden, ob die Inkubation von Zellen im Zellverband und die Inkubation von Zellen nach Separation zu DNA-Schäden unterschiedlichen Ausmaßes führt.

2. PATIENTENGUT, MATERIAL UND METHODEN

2.1. Patientengut

Die zur Anzucht von Miniorgankulturen gewählte Nasenschleimhaut stammte von Patienten, die sich aufgrund einer eingeschränkten Nasenatmung bei Nasenmuschelhyperplasie einer Conchotomie unterzogen hatten. Bei dieser Operation entfernte man vom unteren Nasenschwellkörper ein etwa 3 mm x 20 mm großes Mukosastück. Aus diesem wurden ca. 1 mm³ große Schleimhautstücke gewonnen, die anschließend in einem Nährmedium über 14 Tage kultiviert wurden. Die Eingriffe wurden in der Klinik und Poliklinik für Hals- Nasen- Ohrenheilkunde der Universität München vorgenommen. Verwendung fand nur makroskopisch gesunde Schleimhaut der Concha nasalis inferior, die aus operationstechnischen Gründen entfernt werden musste. Die Patienten hatten keine chronischen Allgemeinerkrankungen und keine Tumorerkrankungen. Auch eine außergewöhnliche berufliche Schadstoffbelastung lag nicht vor.

Die Biopsiegewinnung und die Durchführung der Versuche waren von der Ethikkommission (Ethikkommissionsantrag Projekt Nr. 104/98) genehmigt worden und geschahen nach Aufklärung mit dem schriftlichen Einverständnis der Patienten.

Im Anschluss an die Operation wurden die Biopsate in physiologischer Kochsalzlösung eingelegt und umgehend in das Labor gebracht.

Tabelle 1: Spender nasaler Schleimhaut

Nummer	Alter	Geschlecht	Nikotinkonsum	Alkoholkonsum
1	41	w	-	0
2	28	w	20 Z/Tag	0
3	20	m	40 Z/Tag	1
4	52	w	-	0
5	44	m	-	1
6	28	w	-	0
7	38	m	-	0

Patientengut, Material und Methoden

8	25	m	-	1
9	61	m	-	1
10	29	m	-	1
11	42	m	-	0
12	25	w	-	1
13	39	m	-	1
14	56	m	-	0
15	26	w	-	0
16	27	m	-	1
17	44	m	20 Z/Tag	0
18	44	m	-	1
19	27	m	-	1
20	62	m	-	2
21	69	w	-	0
22	25	m	-	0
23	35	m	-	1
24	43	w	-	1
25	21	m	40 Z/Tag	0
25	28	m	-	1
26	30	w	-	1
27	59	m	10 Z/Tag	0
28	36	w	-	0
29	23	m	10 Z/Tag	1
30				
31	43	m	-	1
32	59	m	3 Z/Tag	1
33	45	m	-	0
34	44	m	-	1
35	54	w	-	1
36	23	m	-	1
37	59	m	-	2
38	44	m	15 Z/Tag	1
39	47	m	-	0
40	37	w	-	0
41	16	w	20 Z/Tag	0
42	33	m	15 Z/Tag	0
43	26	w	-	1

44	39	m	-	2
45	25	m	15 Z/Tag	0
46	67	w	-	0
47	19	m	-	0
48	53	w	-	0
49	49	w	-	0
50	28	m	-	0
51	34	m	-	0
52	34	m	-	0
53	57	m	-	0
54	64	m	-	0
55	37	m	10 Z/Tag	1
56	31	m	-	1
57	39	w	-	0
58	32	w	-	1
59	61	m	o.A.	o.A.
60	63	w	-	0
61	56	w	-	0
62	42	m	-	1
63	23	m	-	0
64	36	m	o.A.	o.A.
65	35	m	5 Z/Tag	1
66	46	w	o.A.	o.A.
67	72	m	o.A.	o.A.

- Zuordnung der Spender:

1-30: Tests mit NDEA und Natriumdichromat

31-55: Tests mit MEHP und BPDE

56-67: Vergleich Miniorgane und Einzellzellen

- Nikotinkonsum in Zigaretten pro Tag, -: kein Nikotinkonsum

- Menge des Alkoholkonsums in Gramm pro Tag:

Kategorie 0: 0-24 g/Tag

Kategorie 1: 25-50 g/Tag

Kategorie 2: 51-75 g/Tag

- m: männlich, w: weiblich

- o.A.: ohne Angaben

2.2. Miniorgankulturen

Um die Auswirkung genotoxischer Substanzen auf die Zellen in ihrem natürlichen Zellverband untersuchen zu können, mussten aus nasaler Schleimhaut kleine, vitale Gewebestücke, sogenannte Miniorgane gezüchtet werden.

2.2.1. Präparation der Schleimhaut

Unter sterilen Arbeitsbedingungen (Sterilbank Herasafe, Heraeus, Hanau) wurde die Schleimhaut von bindegewebigen Strukturen und Knochenfragmenten abpräpariert. Die äußeren Schichten der Mukosa wurden in ca. 1 mm große Fragmente geschnitten und dreimal mit Bronchial Epithelial Cell Growth Medium (BEGM, Promocell, Heidelberg) gereinigt. Anschließend konnten die Schleimhautstücke auf agarbeschichtete 24-Well-Multiwell-Platten (Multiwell Tissue Culture Plate, 24 Well, Falcon, Lincoln Park, New Jersey, USA) aufgetragen und in 250 µl BEGM pro Well kultiviert werden.

Die Platten waren zuvor mit 0,75% Agar Noble (Difco Laboratories, Detroit, USA) beschichtet worden, der in dem Nährmedium Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco BRL, Lifetechnologies, Eggenstein) gelöst und mit 10% fetalen Kälberserum (FCS, Gibco BRL), nicht essentiellen Aminosäuren und den Antibiotika Streptomycin, Amphotericin B und Fungizin (Gibco BRL) supplementiert worden war.

2.2.2. Anzüchtung der Miniorgankulturen

Um Miniorgankulturen zu erhalten, mussten mehrreihige Gewebestücke mit zilientragendem Epithel sieben bzw. elf Tage in einem Brutschrank (Heracell, Heraeus, Hanau) bei 37 °C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit inkubiert werden. Ein Medienwechsel fand an jedem 2. Tag statt und ein Plattenwechsel nach 7 und 9 Tagen. Eine Epithelialisierung konnte nach etwa fünf bis sechs Tagen festgestellt werden. Zilienaktivität diente als Nachweis für die Vitalität der Miniorgankulturen während der kulturellen Anzüchtung. Die Dauer der Kultivierung betrug für die eine Hälfte der Gewebestücke 7 Tage, für die andere Hälfte 11 Tage.

Miniorgankulturen können bis zu 40 Tagen bei nahezu gleichbleibenden Bedingungen in Kultur belassen werden [Steinsvag et al. 1991].

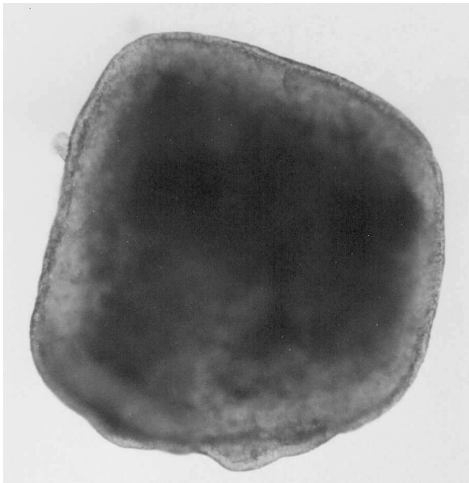


Abbildung 1A

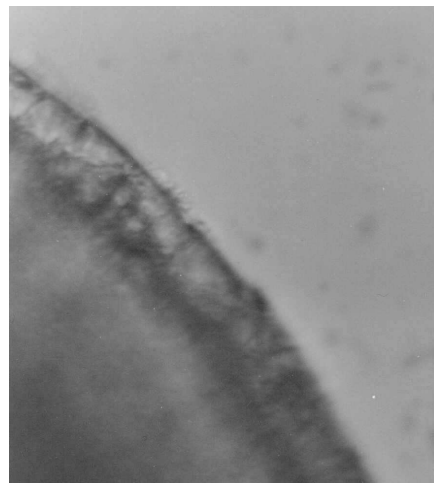


Abbildung 1B

Abbildung 1A: Miniorgan aus humaner nasaler Schleimhaut nach 7-tägiger Anzuchtung bei inverser Mikroskopie.

Abbildung 1B: Schleimhautepithel eines Miniorgans mit Zilien unter 400-facher Vergrößerung

2.2.3. Fremdstoffinkubation der Kulturen

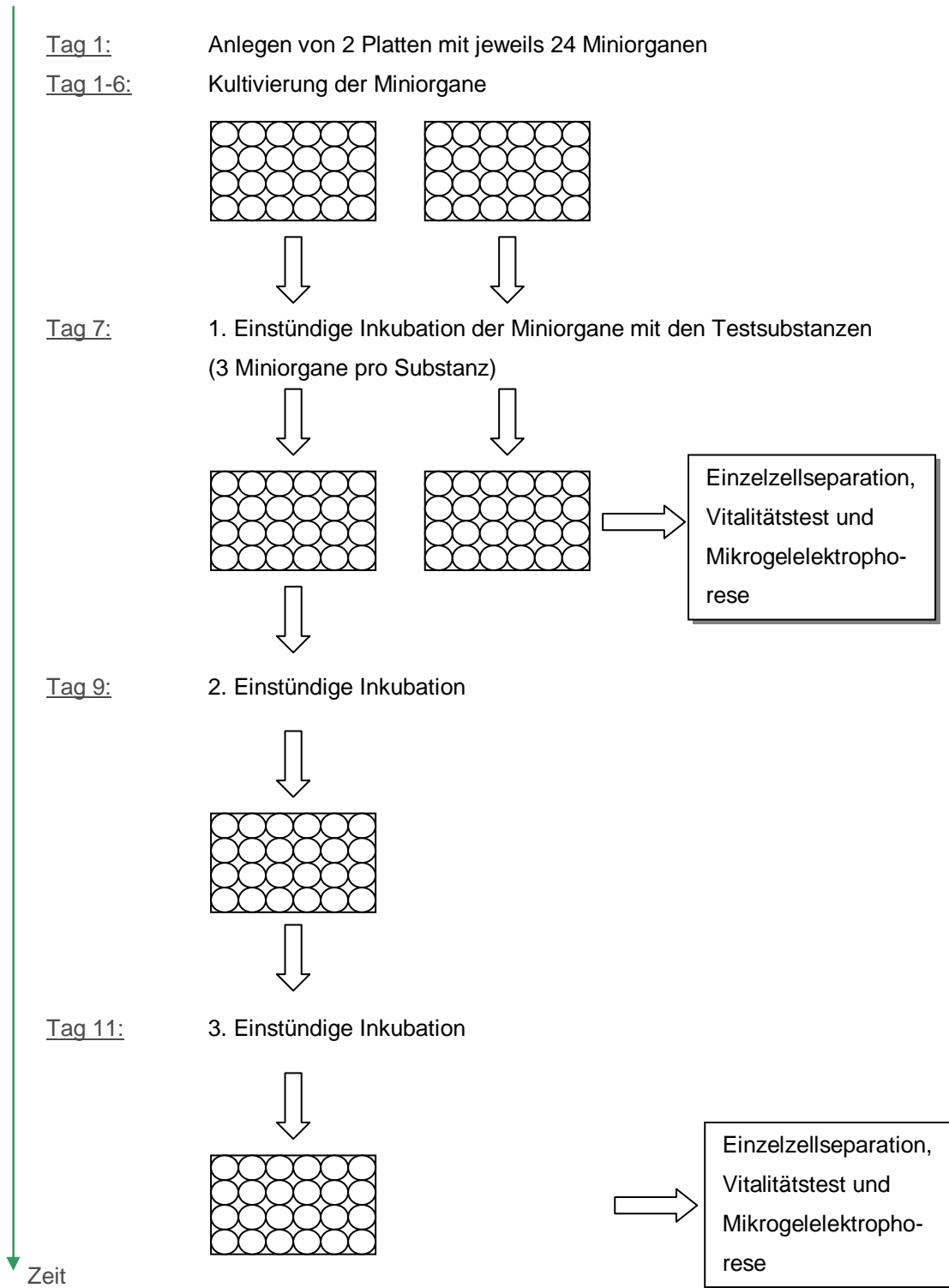
Nach sieben Tagen Kulturdauer wurde eine einstündige Inkubation bei 37 °C mit folgenden Fremdstoffen vorgenommen:

50 mM N-Nitrosodiethylamin (NDEA, Sigma, Deisenhofen), 1 mM Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7 \times \text{H}_2\text{O}$, Merck, Darmstadt), 5 μM Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat (MEHP, Institut für Hygiene und Arbeitsmedizin, Universitätsklinik Essen) und 9 μM Benzo[a]pyren-r-7,t-8-Dihydrodiol-t9,10-Epoxid (BPDE, Midwest Research Institute, NCI Chemical Repository, Kansas City/ Missouri, USA). Zusätzlich erfolgte die Inkubation der Zellen mit dem Lösungsmittel der Testsubstanzen Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck) als Negativkontrolle sowie mit 0,0035 mM N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG, Fluha, Buchs, Schweiz) als Positivkontrolle. Die verwendeten Konzentrationen basieren auf Vorversuchen aus unserem Labor und auf anderen Veröffentlichungen [Harréus et al., 1999, Kleinsasser et al., 1999].

Von der Testsubstanz wurden je 25 µl pro Miniorgan gelöst in 250 µl BEGM auf die Multiwell-Platte aufgetragen. Für jede Testsubstanz wurden drei Ansätze pro Patient durchgeführt. Davon dienten 2 der Genotoxizitäts- und ein Ansatz der Vitalitätsbestimmung. Dann wurden die Miniorgane im Wasserbad bei 37 °C über eine Stunde inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abpipettiert und die Miniorgane zweimal in BEGM von toxischen Restbeständen gereinigt.

Ein Teil der Miniorgane wurde schon nach der ersten Inkubation zur enzymatischen Einzelzellgewinnung verwendet, der andere Teil erst nach dreimaliger Fremdstoffinkubation am 11. Tag der Kultivierung. An Tag 9 fand im Anschluss an die Inkubation ein Plattenwechsel statt, an Tag 11 führte man die Analyse der genotoxischen Effekte ebenso wie oben an Tag 7 beschrieben durch.

Abbildung 2: Schematisches Versuchsprotokoll über das Anlegen und die wiederholte Inkubation von Miniorgankulturen



2.2.4. Gewinnung von Einzelzellen

Die Isolierung von Einzelzellen aus dem Zellverband geschah durch enzymatische Auflösung mit Kollagenase P (1 mg/ml, Boehringer, Mannheim), Hyaluronidase (1 mg/ml, Boehringer) und Protease E Typ 14 von *Streptomyces griseus* (5 mg/ml, Sigma, Deisenhofen) gelöst in BEGM [Pool-Zobel et al., 1994].

Je zwei Miniorgane wurden in ein Eppendorf Cup (Safe Lock Tubes, 1,5 ml, Eppendorf Biopur, Hamburg) mit 600 µl Enzymlösung überführt. Nach einer 45-minütigen Inkubation bei 37 °C wurden die gelösten Zellen durch kurzes Rütteln mit einem Minishaker (MS1, IKA, Wilmington, USA) vom umgebenden Bindegewebe getrennt. Die Bindegewebsreste wurden mittels einer sterilen Nadel entfernt und die Enzymlösung mit 600 µl zupipettiertem FCS neutralisiert.

Es folgte eine Zentrifugation der aus dem Zellverband gelösten Einzelzellen (Varifuge 3.0 RS, Heraeus, Hanau) mit 800 Umdrehungen/Min. bei 4 °C über 10 Minuten. Anschließend wurde je 1 ml Überstand abpipettiert, 1 ml Phosphat Buffered Saline (PBS, Gibco-Lifetechnologies LTD, Pais Ley, Scotland) zugegeben, der Gefäßinhalt durchmischt und erneut zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde zweimal wiederholt. Die Zentrifugation fand bei 4 °C statt und die Pipettiervorgänge wurden auf Eis durchgeführt.

2.2.5. Vitalitätstest

Zur Vitalitätsbestimmung der Einzelzellen konnte man den Trypanblau-Ausschlusstest (Bio Whittaker, Walkersville, USA) verwenden. Dabei wurden 50 µl Zellsuspension aus einem Eppendorf-Cup mit 50 µl Trypanblau gemischt, ein Tropfen davon auf einer Neubauer-Zählkammer (Merck, Darmstadt) verteilt. Unter 400-facher Vergrößerung (Lichtmikroskop, Zeiss, Oberkochen) erfolgte die Bestimmung der Gesamtzellzahl sowie des prozentualen Anteils der avitalen, blau angefärbten Zellen [Phillips, 1973].

2.3. Einzelzellen aus Frischbiopsaten

2.3.1. Präparation der Schleimhaut und Gewinnung von Einzelzellen

Die Schleimhaut wurde zuerst unter sterilen Bedingungen von Bindegewebsresten gesäubert und anschließend zerkleinert. Die Fragmente befanden sich zur Lösung der Einzelzellen aus dem Zellverband in einer Enzymlösung aus Protease (5 mg/ml), Hyaluronidase (1 mg/ml) und Kollagenase (1 mg/ml) gelöst in Joklik-Medium (Linaris, Bettingen am Main). Der Isolationsvorgang fand bei 37 °C über 60 Minuten statt.

Anschließend folgte eine Filtration, um die Bindegewebsreste zu eliminieren und Einzelzellen zu erhalten. Die Zellsuspension wurde in einem Blue-cap-Röhrchen (Greiner, Frickenhausen) in 1ml Joklik gelöst und mit 400Umdrehungen/Min. bei Raumtemperatur 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen in 1 ml Joklik resuspendiert. Danach konnte eine Vitalitätsprüfung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest und eine anschließende Zellzahlbestimmung in einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt werden (vgl.2.1.6.). Dabei sollte die Anzahl der Zellen zwischen 50.000 und 100.000 pro 100 µl liegen.

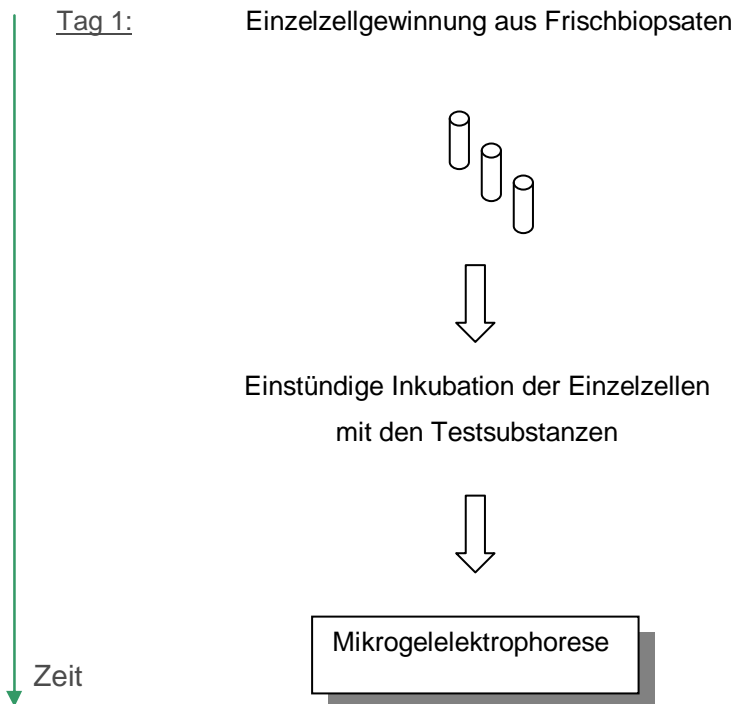
2.3.2. Fremdstoffinkubation

Die Fremdstoffinkubation wurde mit folgenden Stoffen vorgenommen: 166mM DMSO als Negativkontrolle, 50 mM NDEA, 5 µM MEHP, 9 µM BPDE und 0,0035 mM MNNG als Positivkontrolle. Die Stoffe waren in DMSO gelöst.

Es wurden je 10 µl der Testsubstanz auf 100 µl Zellsuspension auf einer 96-Multiwellplatte verteilt und bei 37 °C über 60 Minuten inkubiert. Anschließend pipettierte man 100 µl in ein 15 ml-Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht) ab und spülte die Multiwell-Platte mit je 100 µl Joklik-Medium pro Well aus, um die Inkubation zu beenden und Restbestände toxischer Substanzen zu entfernen. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei Raumtemperatur mit 2000 Umdrehungen/Min. über 5 Minuten.

Der Überstand wurde dann abpipettiert und die Zellen wurden auf einen Objektträger gebracht, um für den Comet Assay weiterbehandelt zu werden (vgl. 2.4.).

Abbildung 3: Schematisches Versuchsprotokoll über die Inkubation von Einzelzellen aus Frischbiopsaten



2.4. Wirkung genotoxischer Substanzen auf Zellen im Organverband und auf Einzelzellen nach gleichartiger Kultivierung

Im folgenden Versuchsabschnitt wurde ein direkter Vergleich zwischen Zellen vorgenommen, die als Miniorgane inkubiert wurden und inkubierten Einzelzellen. Dazu wurden Miniorgane eine Woche kultiviert. Die darauffolgende Inkubation mit toxischen Substanzen wurde zum einen Teil an Zellen durchgeführt, die im Organverband belassen wurden, zum anderen Teil an zuvor gelösten Einzelzellen.

2.4.1. Präparation der Schleimhaut und Kultivierung

Die frische Schleimhaut wurde in 1 mm³ große Fragmente geschnitten, dreimal in Bronchial Epithelial Cell Growth Medium gewaschen und eine Woche auf einer agarbeschichteten 24-Well-Multiwell-Platte in 250 µl BEGM pro Well kultiviert (vgl. 2.1.2.).

2.4.2. Behandlung der Miniorgankulturen

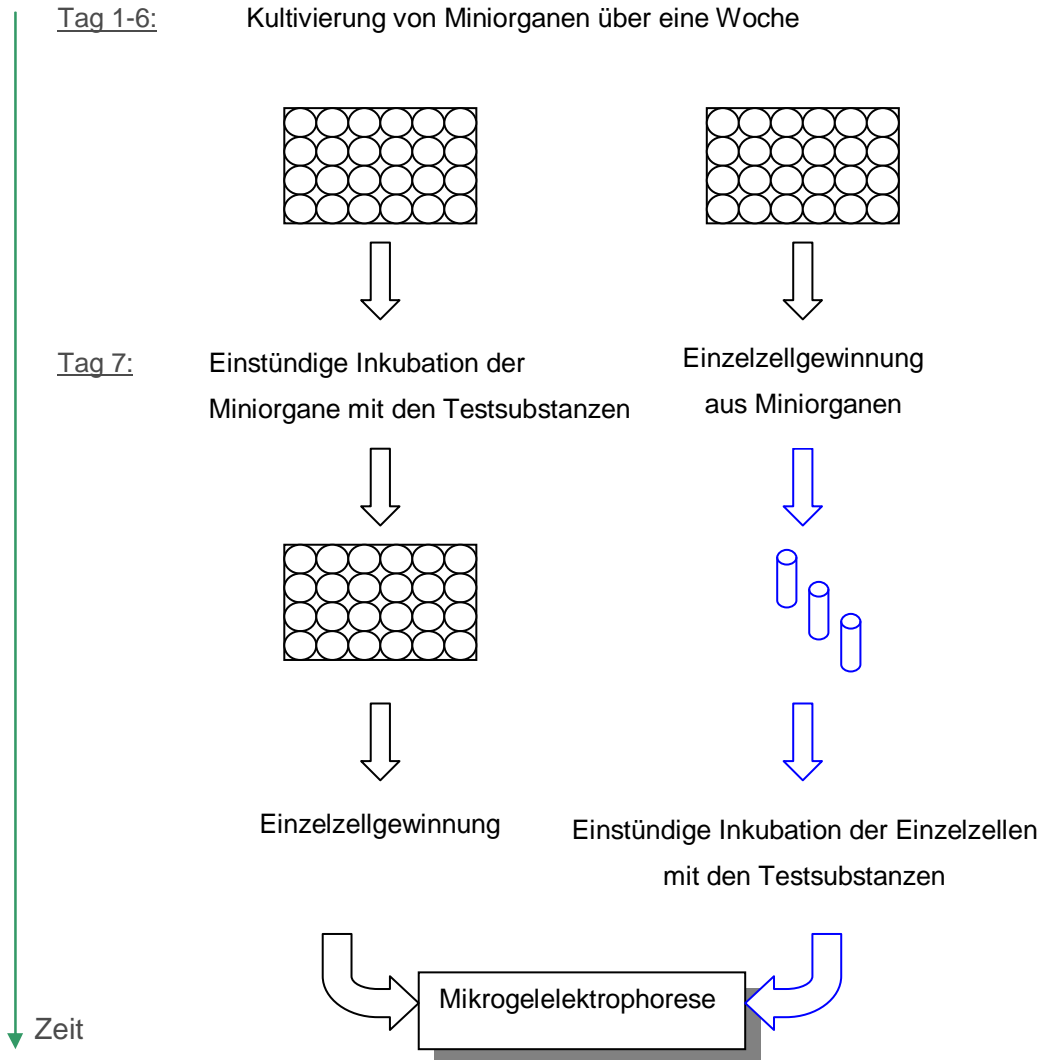
Die eine Hälfte der Miniorgane wurde nach sieben Tagen mit folgenden Fremdstoffen inkubiert: DMSO, NDEA, Na₂Cr₂O₇, MEHP, BPDE und MNNG (vgl. 1.4.). Anschließend fand die enzymatische Zellisolation statt.

2.4.3. Behandlung der Einzelzellen

Die andere Hälfte der Miniorgankulturen wurde zuerst der enzymatischen Einzelzellgewinnung zugeführt. Dazu wurden je zwei Gewebstücke in ein Eppendorf-Cup mit 600 µl Enzymlösung transferiert, um die Zellen aus dem Zellverband zu lösen. Nach 45 Minuten im Wasserbad entnahm man das restliche Bindegewebe, neutralisierte mit FCS und wusch zweimal mit PBS (vgl. 1.5.).

Dann erfolgte die Fremdstoffinkubation mit DMSO, NDEA, Na₂Cr₂O₇, MEHP, BPDE und MNNG. Anschließend erfolgte die Zentrifugation und das Auftragen auf die Agarose beschichteten Objektträger.

Abbildung 4: Schematisches Versuchsprotokoll über Inkubation von Miniorganen und Einzelzellen nach 7-tägiger Kultivierung



2.5. Mikrogelelektrophorese (Comet Assay)

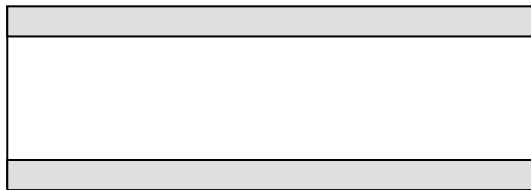
Die nach Inkubation der Zellen und Lösung der Zellverbände durchgeführte Mikrogelelektrophorese und eine daran anschließende Anfärbung der Zellkerne ermöglichten es, DNA-Schäden unter dem Mikroskop sichtbar zu machen und zu bewerten.

2.5.1. Präparation der Objektträger und Auftragen der Zellen

An die enzymatische Auflösung der Miniorgankulturen bzw. die Inkubation der Einzelzellen anschließend wurden die Zellen in 75 µl 0,7% Low Melting Agarose (Biozym, Hameln) in PBS resuspendiert und auf 24 mm x 70 mm große Objektträger mit spezieller Mattierung entlang beider Längskanten (Fa. Langenbrinck, Emmendingen) aufgetragen. Diese Objektträger waren zuvor numeriert und mit 0,5% Normal Melting Agarose (Biozym) gelöst in PBS beschichtet worden, um eine bessere Haftung zu ermöglichen.

Daraufhin folgte das Auftragen einer weiteren Schicht (85 µl) 0,7% Agarose.

Abbildung 5: Aufsicht auf Objektträger mit Mattierung entlang der Längskanten



2.5.2. Lyse der Zell- und Kernmembranen

Zur Auflösung der Zell- und Kernmembranen befanden sich die Objektträger eine Stunde in einem speziellen alkalischen Lysepuffer aus 2,5 M Natriumchlorid, 10 mM Trizma Base (Merck), 100 mM Na₂ EDTA (Natrium Ethylendiamintetraacetat, Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg), 1% N-Lauroylsarcosin Natrium Salz (Sigma, Steinheim) zu 1 l bidestilliertes Wasser, NaOH (Merck), einem pH-Wert von 10 und einer Endkonzentration von 1% Triton-X-100 (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim) und 10% DMSO.

2.5.3. Elektrophorese

Nach Auflösung der Zellmembranen folgten eine 20-minütige Entspiralisierung der DNA-Helix und eine ebenfalls 20 Minuten dauernde elektrophoretische Auftrennung (20 V, 300 mA). Dazu befanden sich die Objektträger in horizontalen Elektrophoresewannen (Fa. Renner, Dannstadt), die mit einer alkalischen Lösung gefüllt waren. Dieser Elektrophoresepuffer setzte sich zusammen aus 10 mM

NaOH, 200 mM Na₂ EDTA und bidestilliertem Wasser. Der pH-Wert betrug 13,2. Während der Elektrophorese wanderten die aus geschädigter DNA entstandenen, polarisierten Fragmente aus dem Kern zur Anode.

Nach einer Neutralisation mit einer Pufferlösung aus 400 mM Trizma Base, bidestilliertem Wasser und einem pH-Wert von 7,5, wurde die DNA mit 0,2 mg/ml Ethidium Bromid, gelöst in destilliertem Wasser, angefärbt.

2.6. Ergebnis Analyse

Um eine quantitative Aussage über die DNA-Schädigung treffen zu können, muss ein vergleichendes Maß angewandt werden. Durch Inkubation mit genotoxischen Substanzen erfolgte eine DNA-Schädigung. Dadurch entstanden polarisierte DNA-Fragmente, die im elektrischen Feld wandern und durch Anfärbung sichtbar gemacht werden konnten. Unterschiedlich lange Wanderungstrecken korrelierten dabei mit dem Ausmaß der durch die Testsubstanzen verursachten DNA-Schädigung.

2.6.1. Olive-Tail-Moment als Maß für DNA-Migration

Die Auswertung der angefärbten DNA erfolgte unter einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DMLB, Leica, Heerbrugg, Schweiz) mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (Komet 3.1, Kinetic Imaging, Liverpool, Großbritannien). Je größer die Rate der induzierten Strangbrüche war, desto schneller und weiter wanderten die DNA-Fragmente im elektrischen Feld. Durch diese Migration zeigte sich fluoreszenzmikroskopisch ein kometenähnliches Bild mit weitgehend intakter DNA im Kopf und geschädigter DNA im Schweif des Kometen.

Der Olive-Tail-Moment (OTM) diente als quantitatives Maß zur Bestimmung der DNA-Schädigung [Olive et al. 1993]. Dieser errechnet sich, indem die Dichte der DNA im Kometenschweif durch die Dichte im Kometenkopf geteilt und mit der Wanderungstrecke in der Elektrophorese multipliziert wird. Je stärker die DNA fragmentiert wurde, desto länger war die Laufstrecke der DNA-Stücke, die sich als Kometenschweif darstellen ließ. Der OTM wird ohne Einheit angegeben. Die Erfassung der Wegstrecke sowie die Berechnung des OTM-Wertes erfolgten

digital. Dabei wurden pro Substanz und Versuch zwei Objektträger erstellt, wobei insgesamt 80 Zellen ausgewertet wurden. Die Speicherung der Daten erfolgte im Microsoft Excel Format.

2.6.2. Ergebnisdarstellung in Boxplots

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden sogenannte Boxplots verwendet, die mit dem Datenanalyseprogramm SPSSTM 10.0 erstellt wurden. Die untere Begrenzung der Box wird durch die 25. Perzentile dargestellt, die Linie in der Box zeigt den Median und die obere Begrenzung der Box entspricht der 75. Perzentile. Die umgekehrte T-Markierung unterhalb der Box beschreibt den niedrigsten, die obere T-Markierung den höchsten Wert. Mit einem Kreis gekennzeichnete Werte liegen 1.5 Boxlängen außerhalb. Mit einem Stern sind Extremwerte versehen, die 3 Boxlängen entfernt liegen.

2.6.3. Statistische Testverfahren

Zur statistischen Auswertung wurde das Analyseprogramm SPSSTM 8.0 verwendet. Die verschiedenen Messzeitpunkte für Proben derselben Spender wurden mit dem Wilcoxon Test für abhängige Stichproben verglichen. In dieser Studie wurde das Signifikanzniveau bei $p \leq 0,05$ festgelegt.

3. ERGEBNISSE

Im folgenden werden die DNA-Schädigungen der Zellen aus Miniorgankulturen nach unterschiedlich häufiger Inkubation mit den getesteten Xenobiotika dargestellt.

3.1. Darstellungen von DNA-Schädigungen nach Fremdstoffinkubation

Um eine DNA-Schädigung nachweisen zu können, mussten genügend Zellen gewonnen werden, die fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden konnten. Dazu wurde die entnommene Nasenschleimhaut in Form von Miniorganen über 7 Tage kultiviert und danach in festgelegten Zeitabständen mit den entsprechenden Fremdstoffen inkubiert. Anschließend erfolgte eine enzymatische Auflösung des Zellverbandes und somit die Gewinnung von Einzelzellen. Am Tag der Entnahme wurde außerdem ein Teil der Schleimhaut desselben Patienten enzymatisch gelöst und die gewonnenen Einzelzellen inkubiert.

Im Rahmen des Comet Assay führte man eine alkalische Lyse der Kernmembran durch. Nach einer Entspiralisierung und Auftrennung der DNA-Helix wanderten die fragmentierten Anteile der DNA während einer Elektrophorese durch elektrische Polarisierung in Richtung Anode. Nach elektrophoretischer Auftrennung und Fluoreszenzfärbung konnte die DNA der Einzelkerne unter dem Mikroskop als eine Struktur sichtbar gemacht werden, die an einen Kometen erinnerte.

War die Erbsubstanz keinen schädigenden, sogenannten genotoxischen Einflüssen ausgesetzt, war ein Kometenschweif kaum sichtbar (Abb. 6A). Je stärker die Fragmentierung der DNA, d.h. je kleiner das Molekulargewicht der einzelnen Stücke, desto weiter wanderten diese im elektrischen Spannungsfeld. So ergaben sich abhängig vom Schädigungsgrad der DNA unterschiedlich stark ausgeprägte Kometenschweife. Da die Schädigung eines einzelnen Kerns nicht aussagekräftig ist, erfolgte eine Auswertung von 80 Zellen pro Substanz. So konnte eine durchschnittliche Schädigung ermittelt werden. In diese gingen die Ausprägung der

geschädigten Einzelkerne sowie das Verhältnis geschädigter zu ungeschädigter Zellen ein.

Bei 100-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop erhielt man eine Übersicht über das fremdstofftypische Schädigungsmuster. Zur digitalen Bildanalyse wurde eine 400-fache Vergrößerung gewählt (Abb. 6A).

Als Maß für die DNA-Fragmentierung der Einzelzelle wurde die Dichte der DNA im Kometenschweif durch die Dichte der DNA im Kometenkopf geteilt und mit der Wanderungsstrecke in der Elektrophorese multipliziert, wodurch sich der Olive Tail Moment (OTM) ergab [Olive et al. 1993]. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines speziellen Computerprogramms (Komet 3.1, Kinetic Imaging, Liverpool).



Abbildung 6A: DNA einer Schleimhautzelle ohne genotoxische Einflüsse nach Elektrophorese und Fluoreszenzfärbung bei 400-facher Vergrößerung.

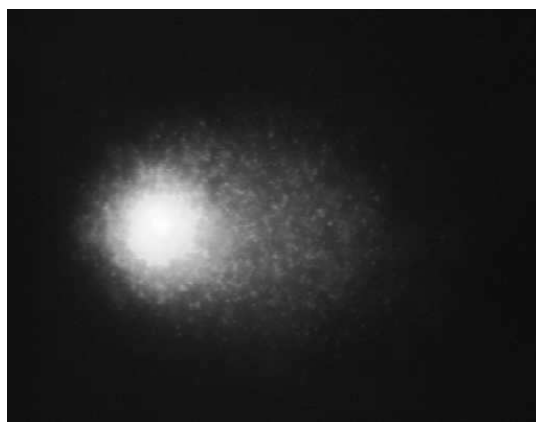


Abbildung 6B: DNA-Fragmentierung mittlerer Ausprägung einer Schleimhautzelle nach Elektrophorese und Fluoreszenzfärbung bei 400-facher Vergrößerung

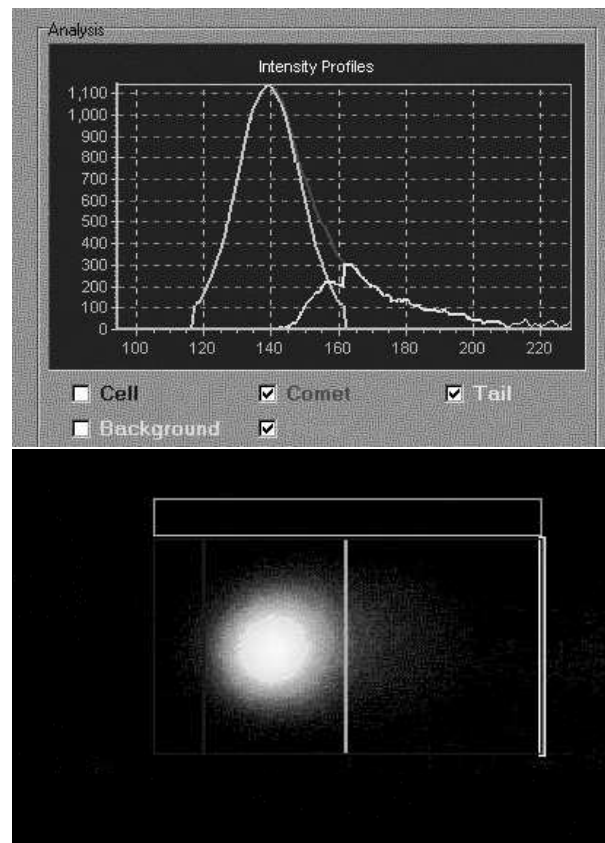


Abbildung 6c: Digitale Bildanalyse eines DNA-„Kometen“ bei 400-facher Vergrößerung
(Komet 3.1, Kinetic Imaging)

Die genotoxischen Effekte der einzelnen Substanzen wurden in Boxplots (Definition vgl. 2.6.2.) dargestellt (Abb. 5A-F). Dabei wird die Reaktion der DNA auf genotoxische Substanzen, die sogenannte Mutagensensitivität aufgezeigt, in Abhängigkeit von der Dauer der Kultivierung und der Anzahl der Inkubationen. In einem Graphen wurden die Schädigungen der Erbsubstanz zu drei unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten gezeigt: an Tag 1 nach einmaliger Fremdstoffinkubation der Frischbiopsate, an Tag 7 nach einmaliger Inkubation der Miniorgankulturen, an Tag 11 nach dreimaliger Inkubation der Miniorgankulturen.

3.1.1. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) diente als Lösungsmittel für N-Nitrosodiethylamin (NDEA), Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$), Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat (MEHP) und Benzo[a]pyren-Diolepoxid (BPDE).

Die genotoxischen Effekte, die durch DMSO hervorgerufen wurden, waren in beiden Versuchsreihen gleich: im Spannungsfeld der Elektrophorese konnte nur ein geringer Anteil an DNA-Molekülen herausgelöst werden.

Durch die Inkubation lediglich mit dem Lösungsmittel der Fremdstoffe zeigte sich die DNA-Fragmentierung, die durch die Methodik, unabhängig von den zugesetzten Fremdstoffen, oder eine erhöhte DNA-Empfindlichkeit des Individuums bedingt war.

In den Boxplot-Darstellungen ist die DNA-Schädigung zu drei unterschiedlichen Untersuchungszeitpunkten dargestellt. Daraus wird deutlich, dass nach einmaliger Inkubation in der ersten Versuchsreihe geringe und in der zweiten Versuchsreihe keine signifikanten Unterschiede bestehen zwischen der DNA-Fragmentierung der Zellen aus Frischbiopsaten am Tag der Probeentnahme und der DNA-Fragmentierung der Zellen aus Miniorgankulturen nach 7-tägiger Anzucht.

Die Olive-Tail-Moment-Werte unterschieden sich nach einmaliger Inkubation der Miniorgankulturen nach 7 Tagen nicht signifikant von den OTM-Werten nach dreimaliger Inkubation nach 11 Tagen.

Abbildung 7A: Abhängigkeit der Mutagensensitivität von der Dauer der Kultivierung und der Anzahl der Inkubationen: DMSO

Abb. 7A1

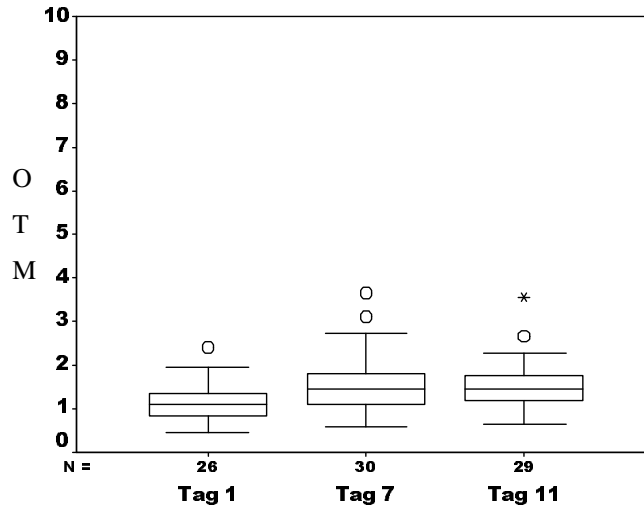
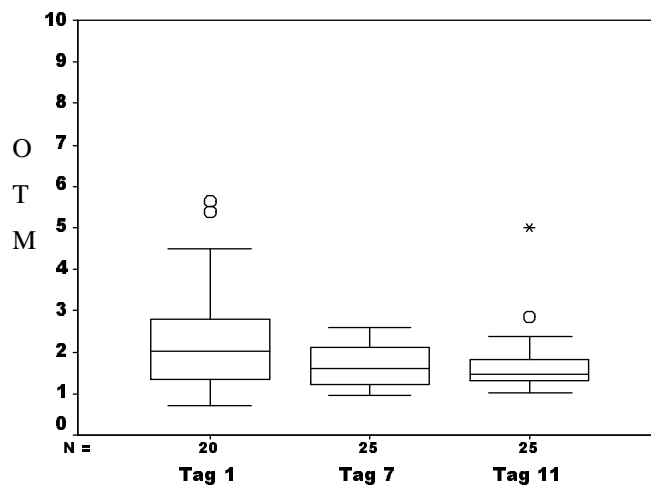


Abb. 7A2



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit DMSO als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Untersuchungszeitpunkte: Tag 1, Tag 7 und Tag 11.

Boxplot-Definition: Die untere Begrenzung der Box wird durch die 25. Perzentile dargestellt, die Linie in der Box zeigt den Median und die obere Begrenzung der Box entspricht der 75. Perzentile. Die umgekehrte T-Markierung unterhalb der Box beschreibt den niedrigsten, die obere T-Markierung den höchsten Wert.

Mit einem Kreis gekennzeichnete Werte liegen 1.5 Boxlängen außerhalb. Mit einem Stern sind Extremwerte versehen, die 3 Boxlängen entfernt liegen.

(7A1:1.Versuchsreihe 7A2: 2.Versuchsreihe)

Tabelle 2:

Vergleich genotoxischer Effekte durch das Lösungsmittel DMSO an Tag 1 und Tag 7 sowie an Tag 7 und Tag 11. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

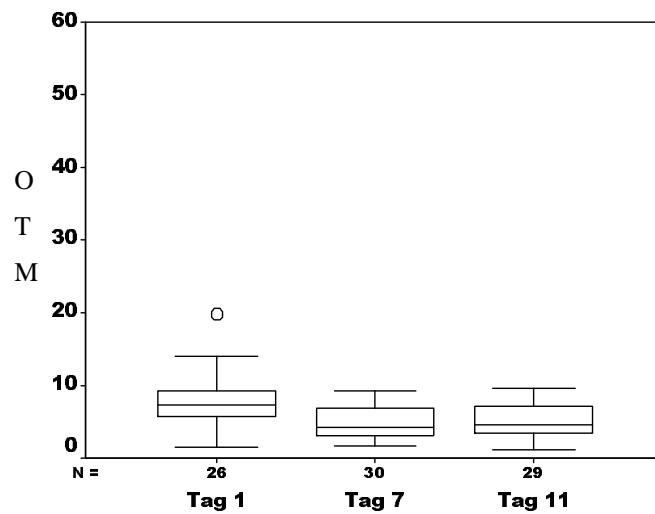
DMSO Tag 7 vs. DMSO Tag 1	DMSO Tag 11 vs. DMSO Tag 7
p= 0,046 (1. Versuchsreihe)	p= 0,837 (1. Versuchsreihe)
p= 0,076 (2. Versuchsreihe)	p= 0,989 (2. Versuchsreihe)

3.1.2. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit N-Nitrosodiethylamin

N-Nitrosodiethylamin (NDEA) bewirkte zu allen drei Zeitpunkten eine stärkere DNA-Migration als in der Kontrollinkubation mit DMSO ($p \leq 0.001$).

Es bestand zwischen der DNA-Fragmentierung nach Inkubation der Frischbiopsate und DNA-Fragmentierung nach einmaliger Inkubation der Miniorgankulturen an Tag 7 ein signifikanter Unterschied. Die Migration für den Tag 7 lag niedriger. Die Schädigungen nach einfacher und dreifacher Inkubation der Miniorgankulturen waren jedoch nicht signifikant unterschiedlich.

Abbildung 7B: Abhängigkeit der Mutagensensitivität von der Dauer der Kultivierung und der Anzahl der Inkubationen: NDEA



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit NDEA als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Untersuchungszeitpunkte: Tag 1, 7 und 11. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Mit einem Kreis gekennzeichnete Werte liegen 1.5 Boxlängen außerhalb.

Tabelle 3:

Vergleich genotoxischer Effekte durch NDEA an Tag 1 und Tag 7 sowie an Tag 7 und Tag 11. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

NDEA Tag 7 vs. NDEA Tag 1	NDEA Tag 11 vs. NDEA Tag 7
p= 0,006	p= 0,510

Tabelle 4:

Vergleich von Testsubstanz NDEA und Negativkontrolle DMSO. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

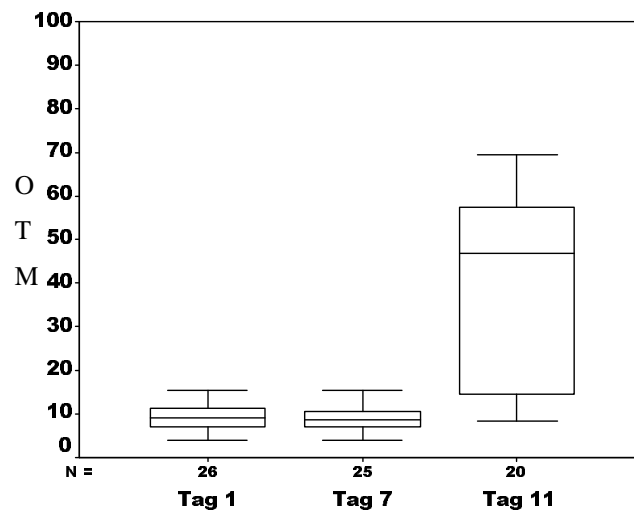
NDEA Tag 1 vs. DMSO Tag 1	NDEA Tag 7 vs. DMSO Tag 7	NDEA Tag 11 vs. DMSO Tag 11
p< 0,001	p< 0,001	p< 0,001

3.1.3. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Natriumdichromat

Nach einer Inkubation mit Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) zeigten sich an Tag 1 und Tag 7 relativ geringgradige Kometenausbildungen, während an Tag 11 bei 100-facher Vergrößerung ein stärkeres Schädigungsmuster auffiel.

Auch zwischen der einmaligen und der dreimaligen Inkubation der Miniorgankulturen bestand ein signifikanter Unterschied. Dagegen unterschieden sich die Ergebnisse der Tage 1 und 7 nicht signifikant.

Abbildung 7C: Abhängigkeit der Mutagensensitivität von der Dauer der Kultivierung und der Anzahl der Inkubationen: $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Untersuchungszeitpunkte: Tag 1, 7 und 11. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Tabelle 5:

Vergleich genotoxischer Effekte durch $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ an Tag 1 und Tag 7 sowie an Tag 7 und Tag 11. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Tag 7 vs. $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Tag 1	$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Tag 11 vs. $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Tag 7
p= 0,819	p< 0,001

Tabelle 6:

Vergleich von Testsubstanz $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ und Negativkontrolle DMSO an Tag 1, Tag 7 und Tag 11. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

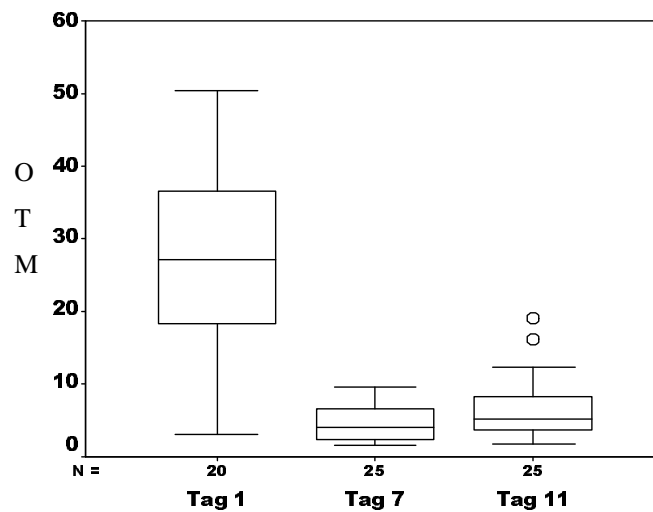
$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Tag 1 vs. DMSO Tag 1	$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Tag 7 vs. DMSO Tag 7	$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ Tag 11 vs. DMSO Tag 11
p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

3.1.4. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat

Bei der Testung von Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat (MEHP) konnte an Einzelzellen von Frischbiopsaten nach Inkubation mit MEHP eine höhere Genotoxizität festgestellt werden, als an den Tagen 7 und 11 nach Inkubation der Miniorgankulturen.

Die OTM-Werte nach einmaliger Inkubation der Miniorgankulturen nach 7 Tagen und nach dreimaliger Inkubation nach 11 Tagen lagen im gleichen Bereich. Die OTM-Werten der Einzelzellen zeigten hingegen signifikant höhere Werte.

Abbildung 7D: Abhängigkeit der Mutagensensitivität von der Dauer der Kultivierung und der Anzahl der Inkubationen: MEHP



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit MEHP als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Untersuchungszeitpunkte: Tag 1, 7 und 11. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Mit einem Kreis gekennzeichnete Werte liegen 1.5 Boxlängen außerhalb.

Tabelle 7:

Vergleich genotoxischer Effekte durch MEHP an Tag 1 und Tag 7 sowie an Tag 7 und Tag 11. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MEHP Tag 7 vs. MEHP Tag 1	MEHP Tag 11 vs. MEHP Tag 7
p < 0,001	p = 0,078

Tabelle 8:

Vergleich von Testsubstanz MEHP und Negativkontrolle DMSO an Tag 1, Tag 7 und Tag 11. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

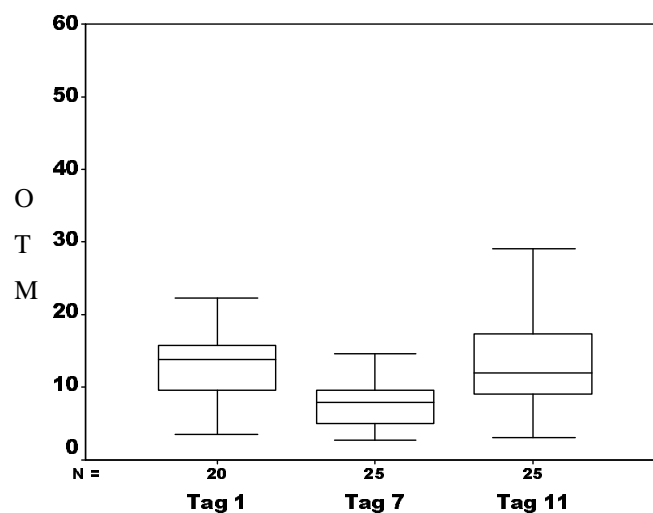
MEHP Tag 1 vs. DMSO Tag 1	MEHP Tag 7 vs. DMSO Tag 7	MEHP Tag 11 vs. DMSO Tag 11
p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

3.1.5. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Benzo[a]pyren-Diolepoxid

Zu allen drei Meßzeitpunkten bewirkte die Inkubation mit Benzo[a]pyren-Diolepoxid (BPDE) einen genotoxischen Effekt.

Nach Inkubation der Frischbiopsate mit BPDE wies die DNA eine signifikant höhere Schädigung auf als nach einmaliger Inkubation der Miniorgankulturen. Ebenso ergab sich nach dreimaliger Inkubation der Miniorgankulturen eine signifikant höhere Strangbruchrate als nach einmaliger Inkubation der Miniorgankulturen.

Abbildung 7E: Abhängigkeit der Mutagensensitivität von der Dauer der Kultivierung und der Anzahl der Inkubationen: BPDE



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit BPDE als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Untersuchungszeitpunkte: Tag 1, 7 und 11. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Tabelle 9:

Vergleich genotoxischer Effekte durch BPDE an Tag 1 und Tag 7, sowie an Tag 7 und Tag 11. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

BPDE Tag 7 vs. BPDE Tag 1	BPDE Tag 11 vs. BPDE Tag 7
p < 0,001	p < 0,001

Tabelle 10:

Vergleich von Testsubstanz BPDE und Negativkontrolle DMSO. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

BPDE Tag 1 vs. DMSO Tag 1	BPDE Tag 7 vs. DMSO Tag 7	BPDE Tag 11 vs. DMSO Tag 11
p < 0,001	p < 0,001	p < 0,001

3.1.6. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin

Ebenso wie das Lösungsmittel DMSO als Negativkontrolle wurde auch die Positivkontrolle N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) für beide Versuchsreihen verwendet. Nahezu jeder Zellkern wies eine massive DNA-Fragmentierung auf nachdem er mit MNNG in Kontakt gekommen war.

Wie im Versuchsprotokoll beschrieben, erfolgte die Untersuchung der Stoffe in zwei nacheinander durchgeführten Versuchsreihen. In der ersten wurden die Stoffe NDEA und Na₂Cr₂O₇ getestet, in der zweiten die Stoffe MEHP und BPDE. Die unten gezeigten Boxplot-Darstellungen zeigen die Ergebnisse der MNNG-Inkubation (Abb. 4G Positivkontrolle für NDEA und Na₂Cr₂O₇ ; Abb. 4H Positivkontrolle für MEHP und BPDE).

Die DNA-Migration an Tag 1 entsprach der an Tag 7. An Tag 11 konnte nach dreimaliger Inkubation nochmals ein signifikanter Anstieg der DNA-Schädigung registriert werden.

Abbildung 7F: Abhängigkeit der Mutagensensitivität von der Dauer der Kultivierung und der Anzahl der Inkubationen: MNNG

Abb. 7F1

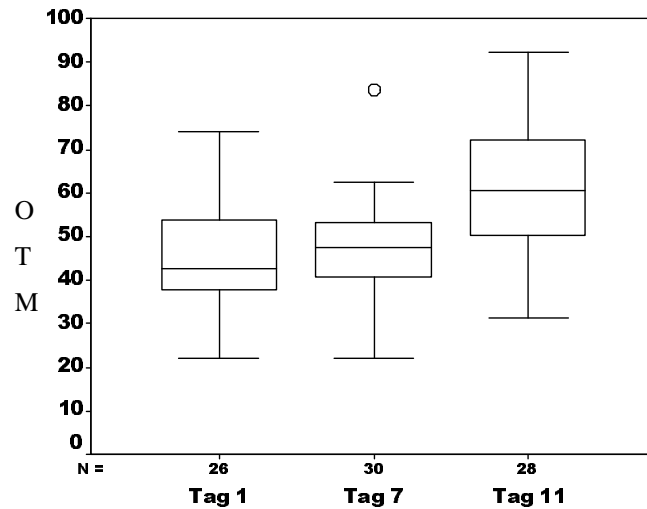
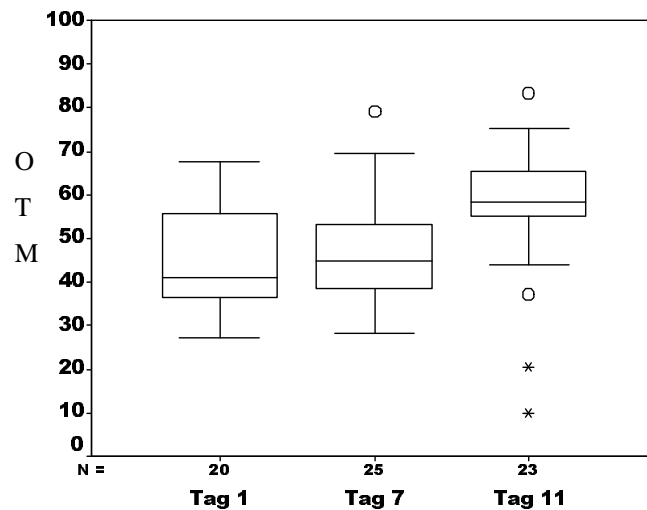


Abb. 7F2



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit MNNG als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Untersuchungszeitpunkte: Tag 1, 7 und 11. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Mit einem Kreis gekennzeichnete Werte liegen 1.5 Boxlängen außerhalb. Mit einem Stern sind Extremwerte versehen, die 3 Boxlängen entfernt liegen.

(7F1:1.Versuchsreihe 7F2: 2. Versuchsreihe)

Tabelle 11:

Vergleich genotoxischer Effekte durch die Positivkontrolle MNNG an Tag 1 und Tag 7 sowie an Tag 7 und Tag 11. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MNNG Tag 7 vs. MNNG Tag 1	MNNG Tag 11 vs. MNNG Tag 7
p= 0,585 (1.Versuchsreihe) p= 0,296 (2. Versuchsreihe)	p= 0,001 (1.Versuchsreihe) p= 0,031 (2. Versuchsreihe)

Tabelle 12:

Vergleich von Testsubstanz MNNG und Negativkontrolle DMSO. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MNNG Tag 1 vs. DMSO Tag 1	MNNG Tag 7 vs. DMSO Tag 7	MNNG Tag 11 vs. DMSO Tag 11
p< 0,001 (1.Versuchsreihe) p< 0,001 (2.Versuchsreihe)	p< 0,001 (1.Versuchsreihe) p< 0,001 (2.Versuchsreihe)	p< 0,001 (1.Versuchsreihe) p< 0,001 (2.Versuchsreihe)

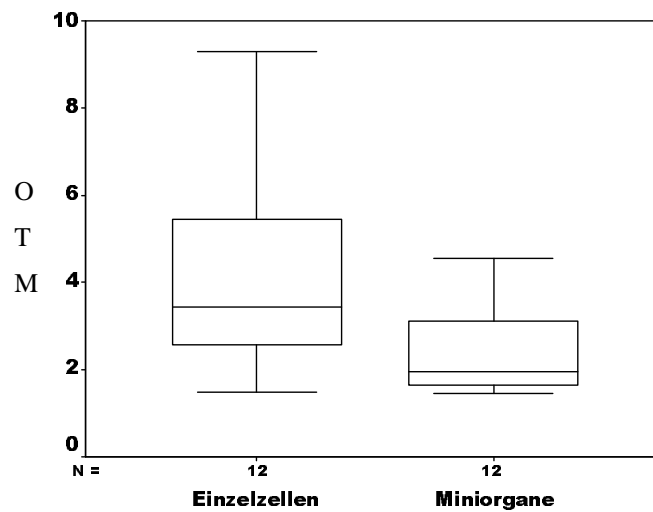
3.2. Vergleich Einzelzellen und Miniorgankulturen

In einem weiteren Versuchsabschnitt wurde die Zellkernschädigung von Miniorgankulturen und Einzelzellen nach einer Anzüchtung von 7 Tagen verglichen. Dazu wurde die eine Hälfte dieser Miniorgankulturen zuerst mit den Fremdstoffen inkubiert, die andere zuerst enzymatisch in Einzelzellen gelöst. Anschließend erfolgte die Lyse der Kernmembran sowie die elektrophoretische Auftrennung und die fluoreszenzmikroskopische Auswertung (vgl. 2.3.).

3.2.1. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Dimethylsulfoxid

Bei Inkubation mit der Negativkontrolle DMSO konnte bei den Einzelzellen eine höhere DNA-Fragmentierung festgestellt werden als bei den Miniorgankulturen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant.

Abbildung 8A: Mutagensensitivität von Einzelzellen und Miniorgankulturen nach Inkubation mit DMSO



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit DMSO als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Inkubationsform der Zellen: Einzelzellen oder Miniorgankulturen. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Tabelle 13:

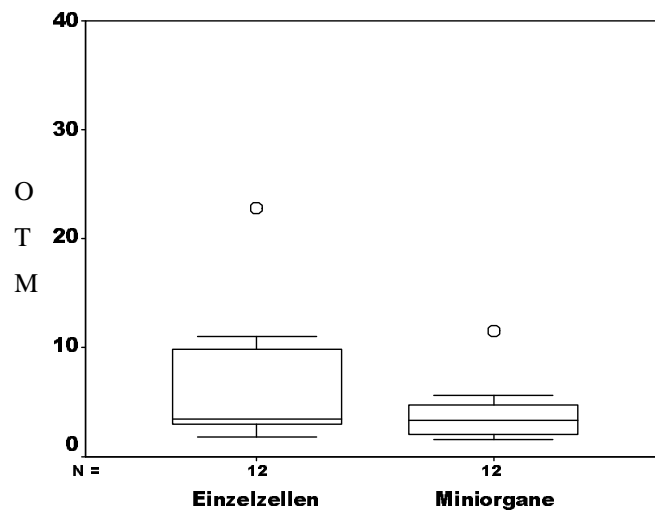
Vergleich genotoxischer Effekte durch das Lösungsmittel DMSO an Einzelzellen und Miniorgankulturen nach 7 Tagen. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK DMSO vs. EZ DMSO
p= 0,060

3.2.2. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit N-Nitrosodiethylamin

Das Nitrosamin NDEA rief an den Einzelzellen eine gleich hohe Schädigung hervor wie an den Miniorgankulturen.

Abbildung 8B: Mutagensensitivität von Einzelzellen und Miniorgankulturen nach Inkubation mit NDEA



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit NDEA als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Inkubationsform der Zellen: Einzelzellen oder Miniorgankulturen. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Mit einem Kreis gekennzeichnete Werte liegen 1.5 Boxlängen außerhalb.

Tabelle 14:

Vergleich genotoxischer Effekte durch NDEA an Einzelzellen und Miniorgankulturen nach 7 Tagen. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK NDEA vs. EZ NDEA
p= 0,272

Tabelle 15:

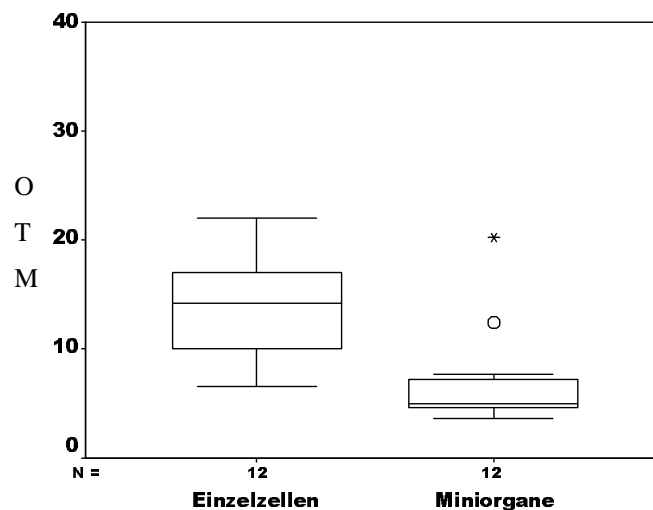
Vergleich von Testsubstanz NDEA und Negativkontrolle DMSO an MOK und EZ. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK NDEA vs. MOK DMSO	EZ NDEA vs. EZ DMSO
p= 0,060	p= 0,158

3.2.3. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Natriumdichromat

Die genotoxische Wirkung von Natriumdichromat war an den Einzelzellen signifikant höher als an Miniorgankulturen. Während die OTM-Werte der Miniorgankulturen unter 10 lagen, betrugen die OTM-Werte der Einzelzellen zwischen 10 und 20.

Abbildung 8C: Mutagensensitivität von Einzelzellen und Miniorgankulturen nach Inkubation mit $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Inkubationsform der Zellen: Einzelzellen oder Miniorgankulturen. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Mit einem Kreis gekennzeichnete Werte liegen 1.5 Boxlängen außerhalb. Mit einem Stern sind Extremwerte versehen, die 3 Boxlängen entfernt liegen.

Tabelle 16:

Vergleich genotoxischer Effekte durch $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ an Einzelzellen und Miniorgankulturen nach 7 Tagen. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ vs. EZ $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$
p= 0,028

Tabelle 17:

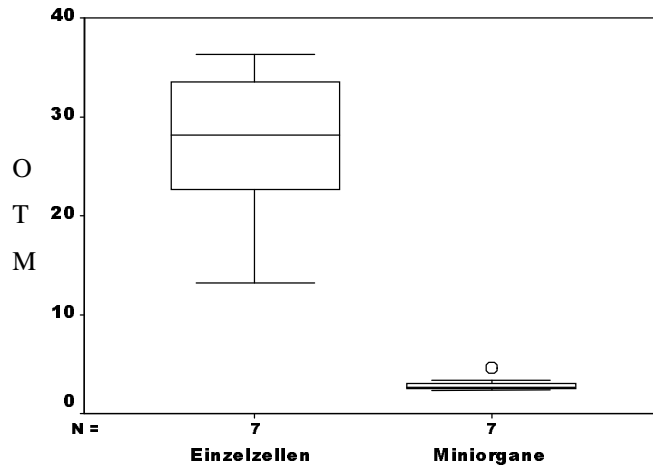
Vergleich von Testsubstanz $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ und Negativkontrolle DMSO an Miniorgankulturen und Einzelzellen. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ vs. MOK DMSO	EZ $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ vs. EZ DMSO
p= 0,002	p= 0,002

3.2.4. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat

Die Schädigung der Zellkerne, die MEHP an den Miniorgankulturen hervorrief, lag deutlich unter der Schädigung an den Einzelzellen. Dabei traten bei den Versuchen mit Miniorgankulturen OTM-Werte bis etwa 5 auf. Die Zellkerne der Einzelzellen wiesen OTM-Werte von über 20 auf.

Abbildung 8D: Mutagensensitivität von Einzelzellen und Miniorgankulturen nach Inkubation mit MEHP



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit MEHP als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Inkubationsform der Zellen: Einzelzellen oder Miniorgankulturen. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Mit einem Kreis gekennzeichnete Werte liegen 1.5 Boxlängen außerhalb.

Tabelle 18:

Vergleich genotoxischer Effekte durch MEHP an Einzelzellen und Miniorgankulturen nach 7 Tagen. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK MEHP vs. EZ MEHP
p= 0,018

Tabelle19:

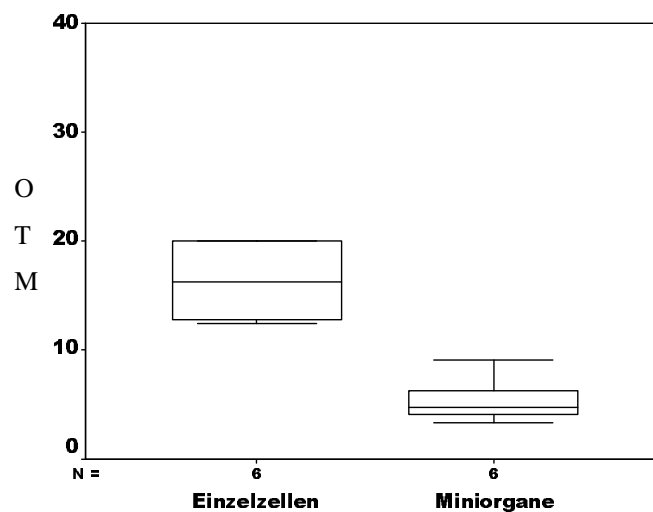
Vergleich von Testsubstanz MEHP und Negativkontrolle DMSO an Miniorgankulturen und Einzelzellen. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK MEHP vs. MOK DMSO	EZ MEHP vs. EZ DMSO
p= 0,063	p= 0,018

3.2.5. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit Benzo[a]pyren-Diolepoxid

Auch BPDE hatte bei den Einzelzellen eine wesentlich höhere genotoxische Wirkung als bei den Miniorgankulturen.

Abbildung 8E: Mutagensensitivität von Einzelzellen und Miniorgankulturen nach Inkubation mit BPDE



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit BPDE als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Inkubationsform der Zellen: Einzelzellen oder Miniorgankulturen. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Tabelle 20:

Vergleich genotoxischer Effekte durch BPDE an Einzelzellen und Miniorgankulturen nach 7 Tagen. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK BPDE vs. EZ BPDE
p= 0,028

Tabelle 21:

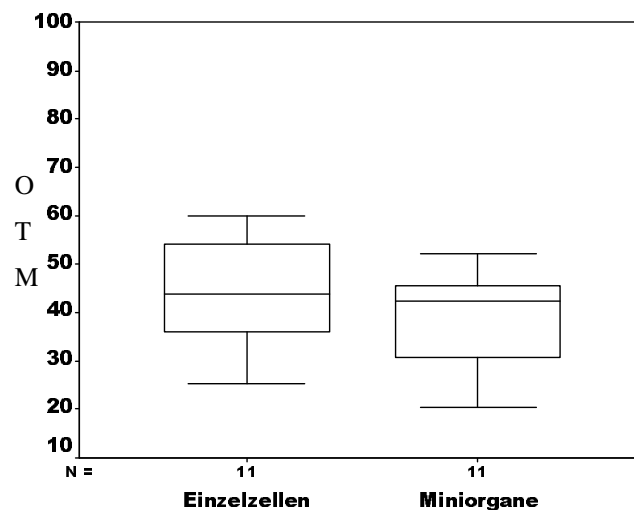
Vergleich von Testsubstanz BPDE und Negativkontrolle DMSO an Miniorgankulturen und Einzelzellen. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK BPDE vs. MOK DMSO	EZ BPDE vs. EZ DMSO
p= 0,028	p= 0,028

3.2.6. Genotoxische Effekte nach Inkubation mit N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin

Die OTM-Werte von MNNG lagen bei den Einzelzellen höher als bei den Miniorgankulturen. Jedoch waren hier keine signifikanten Unterschiede zu erkennen.

Abbildung 8F: Mutagensensitivität von Einzelzellen und Miniorgankulturen nach Inkubation mit MNNG



Y-Achse: Angabe der DNA-Migration nach Inkubation mit MNNG als Olive-Tail-Moment (OTM), einem quantitativen Maß für die genotoxische Schädigung.

X-Achse: Inkubationsform der Zellen: Einzelzellen oder Miniorgankulturen. Boxplot-Definition vgl. Abb. 7A.

Tabelle 22:

Vergleich genotoxischer Effekte durch MNNG an Einzelzellen und Miniorgankulturen nach 7 Tagen. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK MNNG vs. EZ MNNG
p= 0,182

Tabelle 23:

Vergleich von Testsubstanz MNNG und Negativkontrolle DMSO an Miniorgankulturen und Einzelzellen. Angabe der P-Werte aus dem Wilcoxon-Test.

MOK MNNG vs. MOK DMSO	EZ MNNG vs. EZ DMSO
p= 0,060	p= 0,158

4. DISKUSSION

4.1. Diskussion der Methodik

Die Anzüchtung nasaler Schleimhaut in Form von Miniorgankulturen zeigt erstmals in vitro Mehrfachinkubationen von humanen Mukosazellen in ihrem funktionellen Verbund mit Schadstoffen zur Darstellung genotoxischer Effekte. In der vorliegenden Arbeit wurden Miniorgankulturen kultiviert, in festgelegten Zeitintervallen mit genotoxischen Stoffen inkubiert und nach enzymatischer Auftrennung der Mikrogelelektrophorese, dem sogenannten Comet Assay zugeführt. Das Modell läßt die Beurteilung des zeitlichen Verlaufs von DNA-Schädigungen und Reparaturvorgängen zu.

4.1.1. Miniorgankulturen

Die in den Versuchen verwendeten Zellen stammten aus nasaler Schleimhaut. Aus dieser Schleimhaut wurden 1 mm³ Miniorgankulturen gewonnen, die über 7 bzw. 11 Tage in Nährmedium kultiviert wurden.

Erstmals wurden Miniorgankulturen aus respiratorischem humanem Epithel von Steinsvag 1991 beschrieben. Hierbei handelte es sich um Adenoide, die über einen Zeitraum von 40 Tagen kultiviert wurden. Während der Zeit der Kultivierung konnten eine Epithelialisierung der gesamten Oberfläche und ein intakter Zilienschlag beobachtet werden [Steinsvag et al., 1991].

Da die Zellen in ihrem organspezifischen Verband bleiben, stellt die Verwendung von Miniorgankulturen eine Möglichkeit dar, in einem in vitro durchgeführten Versuch Bedingungen zu schaffen, die denen im lebenden Organismus sehr nahe kommen. Obwohl Beobachtungen an einem solchen Modell nicht ohne Einschränkungen auf den lebenden Gesamtorganismus übertragen werden können, sind Miniorgankulturen dennoch ein geeignetes und anerkanntes Mittel, um bestimmte Eigenschaften eines Gewebes wiederzugeben. Dies zeigt sich in den vielseitigen Anwendungen der Miniorgankulturmodelle, die sich jedoch in

technischem Ansatz und Fragestellung unterscheiden. So wurden Miniorgankulturen aus verschiedenen Geweben untersucht:

Zur Beurteilung der Hormonproduktion wurde Schilddrüsengewebe kultiviert [Hayakawa et al., 1993]. Zur Untersuchung der durch Nasentropfen verursachten Effekte dienten Miniorgankulturen aus respiratorischer Schleimhaut [Berg et al., 1994]. An endometrialem Gewebe wurde die genotoxische Wirkung von Tamoxifen bestimmt [Carmichael et al., 1996]. Kulturen aus Brustdrüsengewebe wurden zur Beurteilung des Einflusses von Östrogen bei der Entstehung des Mammakarzinoms herangezogen [Fishman et al., 1995]. Die Wirkung topischer Steroide testete man an Gewebekulturen aus respiratorischer Schleimhaut [Steinsvag et al., 1996]. Eine Epithelialisierung, Sekretionsprozesse, Differenzierungsprozesse und Proliferation von Gewebe konnten an Bronchialepithel nachgewiesen werden [Bals et al., 1998]. Respiratorische Mukosa wurde auch verwendet, um Untersuchungen zur Ausbreitung des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms durchzuführen [Al-Batran et al., 1999]. Ebenso wurde Bronchialepithel dazu herangezogen, um die Auswirkungen von Strahlentherapie auf die Lunge zu untersuchen [Bergner et al., 2003].

In der vorliegenden Arbeit ermöglichte die Weiterentwicklung von Gewebekulturen aus nasalen Mukosazellen ökogenotoxikologische Untersuchungen über die Auswirkung chronischer bzw. wiederholter Schadstoffbelastungen auf die DNA humaner Schleimhautzellen. Bei der Risikoermittlung durch kanzerogene Stoffe spielt nämlich nicht nur die kanzerogene Potenz des Stoffes eine Rolle, sondern auch die Höhe und die Dauer der Exposition.

Die Anzucht von Miniorganen ermöglichte über einen längeren Zeitraum die Kultivierung von Zellen im natürlichen Zellverband wie sie auch im lebenden Organismus vorliegen. Es zeigte sich, dass während einer 7-tägigen Kultivierung eine vollständige Epithelialisierung der Organkulturen eintrat sowie ein intakter Zilienschlag zu erkennen war. Ein regelmäßiger Wechsel des Mediums garantierte sowohl die Zufuhr von Nährstoffen als auch die Entfernung von Stoffwechselprodukten. Als Nachweis für die Vitalität der Zellen diente auch der an den später separierten Einzelzellen durchgeführte Trypanblau-Ausschlusstest. Da sich die Zellen im Organverband länger kultivieren ließen als Einzelzellen, erwies

sich dass Miniorganmodell als geeignet zur wiederholten Fremdstoffexposition mit dazwischen liegenden Reparaturintervallen. Die eine Hälfte der Miniorgankulturen aus einer Probe wurde bereits nach einmaliger Inkubation am 7. Tag der Anzüchtung auf vorhandene DNA-Schäden untersucht. Die andere Hälfte erst nach dreimaliger Exposition nach insgesamt 11 Tagen. Um eine solche Teilung vornehmen zu können, war es erforderlich, ausreichend viele Miniorgane aus einer Probe zu gewinnen. Insgesamt wurde die Kultivierung der Miniorgane auf 11 Tage begrenzt. So konnte ausgeschlossen werden, dass mögliche Mangelercheinungen, die an Zellen nach zu langer in vitro Kultivierung auftreten zu einer Beeinflussung der Ergebnisse führen konnten. Von Steinsvag wird jedoch eine mögliche Kultivierungsdauer von 40 Tagen beschrieben [Steinsvag et al., 1991].

Der Vergleich der DNA-Schäden nach einmaliger und dreimaliger Inkubation ließ Rückschlüsse auf Reparaturvorgänge in den Zellen oder kumulative Schädigungseffekte zu. Um diesen Vergleich ziehen zu können und eine DNA Schädigung messbar zu machen, wurde das Modell der Miniorgankulturen mit dem Comet Assay verbunden. Nach der Inkubation erfolgte eine enzymatische Gewebeauflösung in Einzelzellen, eine Lyse der Kernmembran und die Durchführung der Mikrogelelektrophorese. Um Reparaturvorgänge während weiterer Versuchsschritte zu vermeiden und standardisierte Bedingungen herzustellen, wurden alle weiteren Arbeitsschritte bei einer Kühlung der Zellen auf 4 °C durchgeführt. Der Comet Assay bot sich an als relativ schnelle und kostengünstige Methode, um Erbgut schädigende Wirkungen zu vergleichen. Allerdings ließen sich hiermit nur quantitative Aussagen über das Ausmaß der Schädigungen treffen. Eine genaue Lokalisation der Schäden auf einzelne Genorte war nicht möglich und ist nicht Endpunkt des Messverfahrens.

Den meisten Schadstoffen ist man im Alltag oder Berufsleben über einen längeren Zeitraum mehrfach oder chronisch ausgesetzt. So liegt zwar eine wiederholte Exposition vor, jedoch hat der Körper auch die Möglichkeit für Reparaturmaßnahmen. Zu den Mechanismen der DNA-Reparatur der Zellen gehören Basenexzisionsreparatur, die Nukleotid-Exzisions- und die Mismatch-Reparatur [de Boer und Hoeijmakers, 2000]. Die schädigende Wirkung einiger

Substanzen kann in vivo einen anderen Verlauf nehmen, als es an Einzelzellmodellen gezeigt wird.

Das Modell der Miniorgankulturen stellt eine Annäherung an den lebenden Organismus dar. Jedoch ist auch die Reaktion der Zellen im Miniorgankulturmodell nicht mit der von Zellen im lebenden Organismus identisch: Zum Beispiel fehlt den Zellen die Gesamtversorgung mit Nährstoffen durch den Organismus. Durch ein spezielles Nährmedium, in dem die Zellen kultiviert werden, versucht man die Lebensbedingungen der Zellen möglichst naturgetreu nachzuahmen.

Auch müssen die am Fremdstoffmetabolismus beteiligten Enzyme, die die chemische Struktur der Fremdstoffe verändern in den Zellen der Miniorgane vorhanden und intakt sein. Dieser Metabolismus wird Biotransformation genannt. Die Biotransformation führt zu einer Erhöhung der Polarität und dient der erleichterten Ausscheidung einer Substanz. Bei toxischen Stoffen entstehen jedoch häufig reaktionsfähige Metaboliten, die mit den nukleophilen Stellen von Zellbestandteilen reagieren und diese schädigen [Eisenbrand und Metzler, 2002]. Es kann also sowohl zu einer Entgiftung kommen, als auch zu einer Giftung, d.h. das Endprodukt wird zum eigentlichen Schadstoff aktiviert und ist schädlicher als die Ausgangssubstanz [van Iersel et al., 1999]. Die Biotransformation wird in 2 Phasen unterteilt. Die erste Phase stellt eine Oxidation, Reduktion oder Hydrolyse dar. In der zweiten Phase erfolgt eine Konjugation mit Glukuronsäure, Schwefelsäure, Essigsäure, Aminosäuren oder Glutathion. Diese Phasen werden von bestimmten Enzymen vermittelt. Die fremdstoffmetabolisierenden Enzyme können jedoch auf vielfältige Weise beeinflusst und in ihrer Wirkung beeinträchtigt werden: zum Beispiel durch Organschäden, Störung der Biosynthese eines Proteins, Mangel an Cosubstraten oder Inaktivierung durch reaktive Metaboliten. Es ist Aufgabe weiterer Studien zu prüfen, ob beispielsweise die Enzymaktivitäten in den kultivierten Zellen ausreichend sind zur Aktivierung bestimmter toxischer Substanzen und Informationen über die metabolische Aktivität der Zellen zu gewinnen. Die metabolische Kompetenz von Miniorgankulturen könnte zum Beispiel über den Nachweis von Entzündungsmediatoren wie Interleukinen gezeigt werden.

Viele Erbgut schädigende Substanzen, wie beispielsweise N-Nitrosodiethylamin müssen erst durch Enzymsysteme wie Cytochrom P-450 aktiviert werden [Teissier et al., 1998]. Diese Cytochrom P-450-Monooxygenasen kommen in allen Geweben vor, weisen jedoch unterschiedliche enzymatische Aktivität auf. Eine geringere DNA-Schädigung könnte also auch auf die verminderte Aktivierung der Testsubstanz aufgrund einer schwächeren Enzymaktivität zurück zu führen sein. Auch gibt es individuelle Unterschiede bezüglich der Enzymaktivitäten [Eisenbrand und Metzler, 2002]. Ein weiterer Versuchsansatz könnte also der Nachweis der Aktivität des Cytochrom P-450-Enzyms in respiratorischer Schleimhaut sein.

Auch ist es fraglich, ob der genotoxische Effekt einzelner Schadstoffe auf Miniorgankulturen repräsentativ ist für die Lebens- und Arbeitssituation. Die eingesetzten Konzentrationen der xenobiotischen Substanzen basieren auf Vorversuchen aus unserem Labor und auf anderen Veröffentlichungen [Harréus et al., 1999; Kleinsasser et al., 1999]. Zwar waren die Stoffkonzentrationen höher als die tägliche Belastung mit diesen Substanzen in der Umwelt oder am Arbeitsplatz, dafür war die Exposition von geringerer Dauer. Eine jahrelange Schadstoffbelastung konnte aufgrund der begrenzten Haltbarkeit von Miniorganen nicht simuliert werden. Dies ist bislang nur im Tierversuch möglich. Allerdings ist es im Vergleich zu Einzelzellversuchen möglich, mehrfache Inkubationen mit festgelegten Abständen durchzuführen.

Obwohl keine absolute Übereinstimmung mit der Situation der Zellen im lebenden Organismus hergestellt werden kann, bietet das vorgestellte Modell dennoch die Möglichkeit, die Wirkung ökogenotoxischer Substanzen auf Zellen in ihrem organspezifischen Zellverband zu analysieren.

Die Intervalle zwischen den Xenobiotikainkubationen bieten Zeit zu Reparaturvorgängen. Abhängig von der Reparaturkapazität kommt es dadurch im Anschluss zu einer verminderten Wanderung der DNA in der Elektrophorese. Schäden korrespondierender Basen (Doppelbasenschäden) und Doppelstrangbrüche stellen beim Menschen weitgehend irreversible DNA-Schäden dar. Die häufigeren substanzinduzierten Formen stellen jedoch Einzelstrangbrüche dar, die durch die Abspaltung von Basenaddukten entstehen. Die Mehrzahl dieser Primärläsionen kann die Zelle reparieren, unter Umständen dabei aber selbst Fehler machen

[Neumann, 1998]. Eine verminderte Reparaturfähigkeit der Zellen konnte zum Beispiel bei Patienten mit bösartigen Tumoren beobachtet werden [Cheng, 1998; Palyvoda et al., 2002]. Aufgrund vererbter Faktoren können individuelle Unterschiede in der Reparaturfähigkeit bestehen [Mohankumar et al., 2002]. Aus genetischen Polymorphismen bestimmter Gene resultieren Unterschiede der Aktivität von Reparaturenzymen, was eine Entstehung von Tumoren begünstigen kann [Collins und Harrington, 2002]. Solche Polymorphismen von Genen beeinflussen die Reparaturkapazität und können einen erhöhten genotoxischen Effekt durch Umweltstoffe, zum Beispiel durch Tabakrauch bei den betroffenen Individuen hervorrufen [Abdel-Rahman und El-Zein, 2000]. Eine DNA-Reparatur nach der Inkubation mit Xenobiotika wurde bereits mit Anwendung des Comet Assays beschrieben [Bock et al., 1998; Blasiak et al., 1999]. Das Auftreten von DNA-Kometen kann allerdings auch durch die sogenannte Exzisionsreparatur bedingt sein [Speit und Hartmann, 1995]. Daten über eine mögliche Reparaturfähigkeit der Zellen während der enzymatischen Auftrennung des Zellverbandes liegen nicht vor. Man könnte jedoch annehmen, dass auch hier Reparaturvorgänge in den einzelnen Zellen ablaufen.

Das Modell der Miniorgankulturen läßt weitere Ansätze zur Darstellung von DNA-Reparatur zu. Um die Aktivität von Enzymen in Zellen der Miniorgankulturen genauer beurteilen und so konkretere Aussagen über den Einfluss von Reparaturvorgängen treffen zu können, ist der Einsatz von Reparaturinhibitoren möglich. Der direkte Vergleich von Miniorgankulturen mit dem Einzelzellmodell läßt Aussagen über eine veränderte Reparaturkapazität im Organverband zu.

Die getesteten Einzelzellen wurden aus respiratorischer Schleimhaut gewonnen und am Tag der Entnahme mit den Testsubstanzen inkubiert. Die Exposition der Miniorgane erfolgte hingegen erst nach 7-tägiger Anzucht. Um einen direkten Vergleich zwischen Einzelzellen und Miniorgankulturen unter gleichen Bedingungen ziehen zu können, wurden in einer zusätzlichen Versuchsreihe Miniorgane über 7 Tage kultiviert. Anschließend wurde der eine Teil der Miniorgane mit den Fremdstoffen inkubiert. Aus dem anderen Teil wurden durch enzymatische Auftrennung des Gewebes zuerst Einzelzellen gewonnen. Daraufhin folgte die Inkubation dieser Einzelzellen mit den gleichen Testsubstanzen. Hierbei

zeigte sich eine insgesamt höhere Sensitivität von Einzelzellen. Auf jeden der getesteten Stoffe reagierten die Einzelzellen mit einer weiteren DNA-Migration im elektrischen Feld, was eine höhere Schädigung des Erbgutes bedeutet. Durch die Erhaltung des Organverbandes scheinen die Zellen weniger anfällig auf die Belastung mit Schadstoffen zu reagieren. Dies kann als Hinweis gesehen werden auf eine vermehrte metabolische Aktivität der Zellen und einen höheren Schutz im Zellverband. Das Ergebnis bestätigt die Feststellung, dass Einzelzellen einen veränderten oder aufgehobenen Fremdstoffmetabolismus aufweisen [De Leve et al., 1997]. Um genauere Aussagen über die Ähnlichkeit zwischen Miniorgankulturen und den Verhältnissen im lebenden Organismus treffen zu können, ist es weiterhin nötig, DNA-Schäden und Reparaturmechanismen während der Kultivierungsphase genauer zu untersuchen und zu analysieren. Möglicherweise werden allein während der Zeit der Anzucht ohne die Einwirkung der Testsubstanzen DNA-Schäden verursacht oder Reparaturmechanismen eingeschränkt. Ursächlich dafür könnte die Trennung der Schleimhaut von der Versorgung durch den Organismus sein.

4.1.2. Comet Assay

Der alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay, kurz Comet Assay, kann zur Evaluierung DNA-schädigender Potentiale verschiedener Stoffgruppen herangezogen werden. Er stellt eine Methode zur Darstellung von DNA-Schäden an Einzelzellen dar. Mit dem Comet Assay wird der Nachweis von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und von Fragmenten, die aus der sogenannten Exzisionsreparatur stammen, ermöglicht [Speit und Hartmann, 1995]. Erstmals wurde der Comet Assay von Oestling und Johanson beschrieben. Das Verfahren wurde von ihnen herangezogen, um die Migration von DNA von Brustdrüsenzellen nach Bestrahlung beurteilen zu können [Oestling und Johanson, 1984]. Separierte Einzelzellen werden in einem Agarosegel suspendiert und die Kern- und Zellmembranen lysiert. Bei Schädigung des Kerninhaltes und durch Auflösung der Verdrillung (Supercoiling) der DNA-Helix werden die durch Strangbrüche gelösten DNA-Fragmente frei. Die Moleküle sind polarisiert und können so im elektrischen Feld Richtung Anode wandern. Durch anschließende Anfärbung mit einem fluoreszierenden Farbstoff kann diese Migration unter dem

Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden: Unfragmentierte DNA befindet sich im Kopf der kometenartigen Konfiguration, der Schweif besteht aus Fragmenten. Die Wanderung der DNA-Fragmente im elektrischen Feld weist eine Proportionalität zur induzierten Schädigung auf.

Verschiedene Maße können zum Vergleich einzelner Schädigungsmuster herangezogen werden. Unter anderem die Intensität der Fluoreszenz im Kometenschweif, die Wanderungstrecke der Fragmente im elektrischen Feld sowie der Anteil der geschädigten Zellen unterteilt in Schädigungsstufen. Der hier als quantitatives Maß für DNA-Strangbrüche gewählte Olive-Tail-Moment [Olive et al., 1993] integriert diese unterschiedlichen Aspekte der DNA-Migration im elektrischen Feld. Er errechnet sich, indem man die Dichte der DNA im Schweif des Kometen durch die Dichte der DNA im Kometenkopf teilt und mit dem Median der Wanderungstrecke multipliziert. In der vorliegenden Arbeit wurde er stets als Mittelwert aus 80 Zellen pro Probe verteilt auf zwei Objektträger angegeben.

Der Comet Assay fand bislang auf verschiedenen Gebieten Anwendung: Er wurde z.B. als Möglichkeit zur Darstellung radioaktiver Strahlungseffekte an hypoxischen Zellen bei der Beurteilung von Brustkrebs herangezogen [Olive et al., 1993]. Ebenso diente er zur Quantifizierung des Anteils hypoxischer Zellen in soliden Tumoren [Olive et al., 1999] oder zur Beurteilung bei der Therapie von Tumoren [Olive und Banath, 1992]. Im Deutschen Krebsforschungszentrum in Heidelberg wurde das Modell etabliert, um DNA-Schäden an nasalen Epithelzellen der Ratte und des Menschen nachzuweisen [Kuchenmeister, 1994]. An oralen Mukosazellen wurden mit Hilfe des Comet Assays Tests zur biologischen Verträglichkeit, Zytotoxizität und Genotoxizität kieferorthopädisch eingesetzter Metalle durchgeführt [Faccioni et al., 2003].

Die Erbgut schädigende Wirkung verschiedener Stoffgruppen kann erfolgen durch DNA-Strangbrüche, Genmutationen oder Chromosomenveränderungen [Yumei et al., 1998]. Möglichkeiten zur Bestimmung der Erbgut verändernden Wirkungen von Xenobiotika stellen beispielsweise Zellkulturen, Tierversuche oder Chromosomenanalysen, wie der Mikrokerntest oder Schwesterchromatid-austauschtest dar. Im Gegensatz zu zeit- und kostenaufwendigen Chromosomenanalysen oder umstrittenen Tierversuchen bietet der Comet Assay

die Möglichkeit, im Kurzzeittest innerhalb von ca. 6 Stunden mit einem Materialaufwand von ca. 150 Euro pro Probe Aussagen treffen zu können über die DNA-schädigende Wirkung biologischer, physikalischer oder chemischer Noxen. Der Comet Assay ist ein geeignetes Biomonitoring-Verfahren, das verschiedene DNA-Schäden aufzeigen kann und einfach anzuwenden ist [Speit et al., 2003]. Mit Hilfe des Comet Assays können vor allem Einzelstrangbrüche als häufigste substanzinduzierte Form der DNA-Schädigung nachgewiesen werden. Auch ohne den Zusatz von Xenobiotika kann der Comet Assay zum Biomonitoring eingesetzt werden, um eine chronische oder spezifische Empfindlichkeit des Spenders zu messen [Plappert et al., 1995].

Bisher fand der Comet Assay nur für Einzelzellen Verwendung. Einzelzellkulturen zeigen jedoch einen anderen oder aufgehobenen Fremdstoffmetabolismus [De Leve et al., 1997, Teissier et al., 1998]. In der vorliegenden Arbeit wurde der Comet Assay erstmals in Verbindung mit Miniorganen eingesetzt. Durch vorherige Kultivierung von Miniorgankulturen ist es möglich, DNA-Schädigungen und Reparaturvorgänge im natürlichen epithelialen Zellverband zu beurteilen. Ein solches Miniorgankulturmodell kommt einem in vivo-Modell nahe. Es erlaubt, Aussagen zu treffen über die Reaktionen auf Zellschädigungen, Reparaturvorgänge und Wundheilungsvorgänge des Epithelgewebes [Resau et al., 1987]. Die Verbindung mit dem Comet Assay ermöglicht somit in relativ kurzer Zeit eine Darstellung von DNA-Schäden durch Xenobiotika an humaner Schleimhaut. Eine Testung mehrerer verschiedener Substanzen ist parallel möglich. Durch die Inkubation der Zellen im natürlichen Zellverband ist die Reaktion der DNA auf die eingesetzten Xenobiotika auf den lebenden Organismus eher zu übertragen als im Einzelzellmodell.

Genotoxische Stoffe sind in der Lage, DNA-Replikationen und genetische Informationen zu verändern. Es können geno- und zytotoxische Schäden auftreten. Im Gegensatz zu genotoxischen Effekten, bei denen eine Veränderung bzw. Schädigung der DNA auftritt, die Zelle als solche aber vital bleibt, hat ein zytotoxischer Effekt den Zelltod zur Folge. Hier unterscheidet man zwei Formen: Eine davon ist die Apoptose, d.h. der programmierte physiologische Zelltod durch das allmähliche Erlöschen einzelner Zellfunktionen [Fairbairn et al., 1996]. Diese

ist abzugrenzen vom provozierten Zelltod, bei dem ein schädigender exogener oder endogener Reiz eine Schrumpfung und einen Zerfall des Kerns bewirken.

Bei apoptotischen oder nekrotischen Zellen wandert im Comet Assay ein Großteil der DNA vom Kopf zum Schweif des Kometen. Der OTM-Wert ist höher als 30, oft sogar über 60 [Fairbairn et al. 1995]. Solche zytotoxischen Effekte könnten insgesamt die Aussagekraft über die Genotoxizität einer bestimmten Substanz beeinflussen. Im Comet Assay ist es jedoch möglich, die Bestimmung von DNA-Effekten in einzelnen Zellen durchzuführen. Nach Anfärbung können nicht vitale Zellen erkannt und ausgeschlossen werden. Dadurch kann ein störender Einfluss zytotoxischer Effekte auf das Testergebnis vermieden werden [Hartmann und Speit 1997]. Um solche zytotoxischen von einer genotoxischen Substanzwirkungen abgrenzen bzw. nekrotische Zellen ausfindig machen zu können, wurde vor der Lysierung der Zellmembran ein Vitalitätstest (Trypanblau-Ausschlusstest) durchgeführt. Dieser ermöglicht es, einen prozentualen Anteil nekrotischer Zellen zu bestimmen. In der vorliegenden Arbeit gingen ausschließlich Versuche in die statistische Auswertung ein, in denen der Anteil vitaler Zellen mindestens 80% betrug. Dies sollte ausschließen, dass ein Kometenschweif im Comet Assay von einem eigentlich zytotoxischen Effekt herrührte.

4.2. Diskussion der Testsubstanzen

Als Testsubstanzen wurden Stoffe ausgewählt, denen man in der Umwelt oder durch berufliche Exposition vielfach ausgesetzt ist. Für zahlreiche dieser Stoffe stellt die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes das erste Kontaktorgan im menschlichen Organismus dar. Es wurden Substanzen aus verschiedenen Stoffklassen gewählt: Nitroverbindungen, Metalle, Phthalate und aromatische Kohlenwasserstoffe. Eine gesundheitsgefährdende Wirkung dieser Xenobiotika ist teilweise bekannt.

4.2.1. DNA-Migration nach Inkubation mit Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) wurde in den vorliegenden Versuchen als Lösungsmittel für die anderen Testsubstanzen verwendet. Es hat keine genotoxische Wirkung. Dennoch nach Inkubation mit DMSO auftretende DNA-Schäden waren somit auf eine bereits vorliegende Zellschädigung oder einen Fehler bei der Methode zurückzuführen. Solche Versuchsreihen wurden nicht für die Auswertung verwendet. DMSO diene als Negativkontrolle. Nach der Inkubation mit DMSO zeigten sich nur niedrige OTM-Werte und eine gute Vitalität der Zellen. Wie man daraus ableiten kann, ist das Modell in der Lage, ausreichend vitale Zellen zu liefern, um den Comet Assay durchführen zu können und so bestimmte Substanzen auf ihre Genotoxizität zu untersuchen. Die geringe Migration der DNA in dieser Negativkontrolle gilt als Indiz dafür, dass eine erhöhte DNA-Migration von Zellen desselben Spenders auf die eingesetzten Xenobiotika zurückzuführen ist. Die im Vergleich zu DMSO bei den Testsubstanzen auftretenden höheren OTM-Werte sind demnach nicht durch Lösungsmittel oder Methodik bedingt.

4.2.2. DNA-Migration nach Inkubation mit N-Nitrosodiethylamin

Das Nitrosamin N-Nitrosodiethylamin (NDEA) ist ein Schadstoff, der vor allem in der Nahrung, bei deren Zubereitung und im Tabakrauch vorkommt. Nitrosamine sind anerkannte Kanzerogene, die von der internationalen Gesellschaft zur Forschung gegen Krebs (IARC) in die Gruppe 2 eingestuft werden [IARC, 2001]. So ist zum Beispiel der Zusammenhang mit Ösophagus- [Lu, 1988] und Leberneoplasien [Tsujiuchi et al., 2002] gesichert. In China zeigte sich eine starke Relation zwischen dem Verzehr von gepökeltem Fisch und dem Auftreten von Nasopharynxkarzinomen [Zou et al., 1994]. Auch an humaner Mukosa des oberen Aerodigestivtraktes konnte eine genotoxische Wirkung von NDEA gezeigt werden [Harréus et al., 1999; Kleinsasser et al., 2000b].

Auch in der vorliegenden Studie konnte eine genotoxische Wirkung durch NDEA festgestellt werden. Der Zellschaden nach Inkubation der Frischbiopsate war signifikant höher als die Schädigung der Zellen aus Miniorgankulturen nach

einmaliger Inkubation. Dies könnte auf den Umstand zurückzuführen sein, dass die Zellen aus den Organkulturen nach der Inkubation in einem 45-minütigen Abschnitt aus dem Zellverband gelöst wurden und diese Zeitspanne eventuell zur Reparatur nutzen konnten. Der Informationsaustausch zwischen den Zellen im Organverband könnte ebenfalls zu einer gesteigerten Reparaturfähigkeit der DNA führen. Bislang existieren keine Daten darüber, ob eine DNA-Reparatur auch während der enzymatischen Separation möglich ist. Reparaturvorgänge von Lymphozyten und Mukosazellen in einem festgelegten Zeitintervall sind jedoch bereits beschrieben worden [Blasiak et al., 1999; Bock et al., 1998]. Ebenso könnte das Ergebnis auf der Exposition der Zellen im Gewebeverband zurück zu führen sein, da zunächst vor allem die äußeren Zellen des Zellverbandes bei der Inkubation den Fremdstoff aufnehmen. Die Dauer der Exposition sollte jedoch auch eine Penetration der tieferen Zellschichten ermöglichen. Weitere Untersuchungen in diese Richtung erscheinen sinnvoll.

Es war auch fraglich, ob Einzelzellen, die aus Miniorganen nach 7-tägiger Anzucht gewonnen werden, eine höhere Empfindlichkeit aufweisen als Einzelzellen aus Frischbiopsaten. Aus diesem Grund wurde die DNA-Fragmentation verglichen zwischen zwei Inkubationsformen. Zum einen wurden Einzelzellen inkubiert, die zuvor nach 7-tägiger Kultur aus Miniorganen herausgelöst wurden. Zum anderen wurden die Miniorgane inkubiert und die Zellen erst nach dieser Inkubation aus dem Zellverband gelöst. Hierbei zeigten sich kaum Unterschiede in der DNA-Fragmentierung durch NDEA. Wie bereits erwähnt zeigen die Einzelzellen am Tag der Entnahme eine wesentlich höhere DNA-Schädigung als die Zellen aus den Miniorganen nach 7 Tagen. Diesen Unterschied kann man jedoch beim Vergleich zwischen Einzelzellen und Miniorganen nach 7-tägiger Kultivierung nicht mehr feststellen. Somit könnte in diesem Fall auch eine erhöhte Empfindlichkeit der Zellen aus Frischbiopsaten ursächlich sein für die gesteigerte DNA-Fragmentierung an Tag 1. Auch ein Verlust der Aktivität von Cytochrom P-450 in den Miniorganen ist denkbar.

Nach dreimaliger Inkubation lagen keine höheren Werte als nach einmaliger Inkubation vor. Für einen additiven oder kumulativen Effekt der genotoxischen Wirkung auf die Zellen bestehen demnach keine Anhaltspunkte. Vielmehr läßt auch

dieses Ergebnis bei den eingesetzten Konzentrationen auf Reparaturvorgänge schließen. Da nach der ersten und zweiten Inkubation jeweils eine 2-tägige Ruhephase bestand, konnten die Zellen diese Zeit möglicherweise zur Reparatur entstandener Schäden nutzen.

Bei der Bewertung der Ergebnisse muss auch der Schädigungsmechanismus durch NDEA berücksichtigt werden: Um seine Genotoxizität zu entfalten, wird NDEA in vivo durch eine α -C-Hydroxylierung über Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenasen aktiviert [Habib et al., 1998]. Während dieses Schrittes entsteht ein elektrophiles Alkylkation, welches das eigentliche Karzinogen darstellt. Auch in niedrigen Dosen konnte eine mutagene Aktivität von NDEA gezeigt werden, wenn eine metabolische Aktivierung durch Cytochrom P-450 gegeben war [Aiub et al., 2003]. Da NDEA auch in den vorliegenden Versuchen in der Lage war, eine Zellschädigung der Miniorgankulturen herbeizuführen, ist von einem Funktionieren des Cytochrom P-450-Systems in den Miniorgankulturen auszugehen. Insgesamt sind jedoch zusätzliche verfeinerte Studien notwendig, um genauere Aussagen über die Expression der Cytochrom P-450-Isoenzyme und die enzymatische Aktivität von Zellen im Organverband der Miniorgankulturen treffen zu können.

4.2.3. DNA-Migration nach Inkubation mit Natriumdichromat

Das hexavalente Chromat Natriumdichromat wurde ausgewählt als relevantes Beispiel für die Stoffgruppe der Metalle. Es entsteht bei der Chromherstellung und ist beispielsweise enthalten in chromhaltigen Metallen, Holzschutzmitteln, Baustoffen, Reinigungsmitteln und wird verwendet bei der Betonverarbeitung. Hexavalente Chromatverbindungen sind als humane Karzinogene bekannt: Sie führen zum Beispiel zu einem gehäuften Auftreten von Tumoren im Respirationstrakt [Klein et al., 2001]. Natriumdichromat wird als Karzinogen der Gruppe 2 eingestuft [IARC, 1990].

Chrom (IV) gelangt durch ein spezielles Transportsystem in die Zielzelle. Dort erfolgt über Zwischenprodukte und die Freisetzung von Radikalen die Reduktion zu Chrom (III). Diese kann Komplexe mit DNA, RNA, Proteinen oder Lipiden bilden und stellt das eigentliche Karzinogen dar. Ebenso zu DNA-Schäden kommt es durch die Bildung von Sauerstoffradikalen [De Flora et al., 1990]. Auch

fünfwertige Chromzwischenprodukte können zu Schäden führen [Jones et al., 1991; Shi und Dalal, 1992].

Die Fähigkeit von Natriumdichromat, DNA-Strangbrüche herbeizuführen, wurde bereits an isolierten peripheren Lymphozyten und Lungenepithelzellen gezeigt [Hodges et al., 2001]. Ein Zusammenhang zwischen Karzinomen der Nase und der Nasennebenhöhlen und einer Exposition von Chromat besteht [Hernberg et al., 1983]. Auch mit dem Comet Assay wurden an der DNA von Nasen- und Nasennebenhöhlschleimhaut starke genotoxische Schäden nachgewiesen [Harréus et al., 1999].

In den hier dargestellten Versuchen unterschieden sich die OTM-Werte der Einzelzellen an Tag 1 kaum von denen der Miniorgankulturen an Tag 7. Im Gegensatz dazu traten nach dreimaliger Inkubation signifikant höhere Werte auf.

Das läßt auf einen additiven Effekt von DNA-Schäden durch wiederholte Exposition schließen. Auch ist es möglich, dass der schädigende Effekt auch ohne weiteres Einwirken von Natriumdichromat weiter zunimmt. Eventuell sorgen die Sauerstoffradikale zur ständigen Bildung weiterer Radikale, die zu einer weiteren DNA-Schädigung führen. Ein solcher Effekt stellt eine erhebliche Gefahr in vivo dar: Bei länger dauernder Exposition durch Umwelteinflüsse oder am Arbeitsplatz könnte es auch hier zu einer kumulativen Wirkung kommen. Außerdem scheint in diesem Fall während der Separation der Zellen eine inhibierte Reparaturkapazität zu bestehen, die ebenfalls für die Zunahme der DNA-Fragmentierung nach dreimaliger Inkubation verantwortlich ist.

Beim direkten Vergleich der Schädigungen von Einzelzellen und Miniorgankulturen nach 7 Tagen weisen die Einzelzellen eine höhere Sensitivität auf. Das spricht dafür, dass der epitheliale Zellverband einen gewissen Schutz bietet. Es könnte jedoch auch davon ausgegangen werden, dass die äußeren Zellen der Miniorgane einer höheren Belastung ausgesetzt sind als die Zellen im Inneren, da diese erst nach einer längeren Inkubationsdauer erreicht werden.

Auch die Genotoxizität von Natriumdichromat hängt von der Bioverfügbarkeit in den Zellen ab. Diese steht in engem Zusammenhang mit dem Oxidationsgrad, wie dem pH-Wert des Gewebes. Bei geeignetem pH-Wert liegen Chromate in einem reaktiven Zustand vor und sind in der Lage, leicht die Zellmembranen zu

durchdringen [Bagchi et al., 1997]. Auch hier könnte ein erweiterter Versuchsaufbau, der die Messung des pH-Wertes berücksichtigt, zu einer Bestätigung der Ergebnisse führen.

4.2.4. DNA-Migration nach Inkubation mit Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat

Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat (MEHP) gehört zur Stoffklasse der Salze der Phthalsäure, der sogenannten Phthalate. Die am häufigsten eingesetzten Phthalate sind Di(2-Ethylhexyl)phthalat (DEHP) und Dibutylphthalat. DEHP wird zum Monoester MEHP hydrolysiert. DEHP wird der Gruppe 3 zugewiesen [IARC, 2001]. Darunter fallen Stoffe, die bezüglich der Krebsentstehung beim Menschen nicht klassifiziert sind [McGregor et al., 2000].

Phthalate sind weit verbreitete Weichmacher von Kunststoffen. Für eine durch sie hervorgerufene Gesundheitsgefährdung gibt es bereits eine Vielzahl von Anhaltspunkten:

So wurde zum Beispiel das genotoxische Potential von MEHP an menschlichen Lymphozyten dargestellt [Anderson et al., 1999]. Kinder, die über längere Zeit an Plastikspielzeug kauen, könnten Weichmacher in ausreichender Menge zu sich nehmen, um eine Konzentration im Speichel nachzuweisen [Steiner et al., 1998]. Bei chronischer per os Applikation von DEHP in hohen Dosen wurden Lebertumoren bei Ratten und Mäusen induziert [IARC, 1982]. Eine hepatokarzinogene Wirkung bei Nagern zeigten auch Huber et al. [1996]. Diese wurde darauf zurückgeführt, dass Phthalate Peroxisomen-Proliferatoren darstellen und so möglicherweise auch andere Stoffe, wie zum Beispiel Nitrosamine in ihre karzinogene Form überführen können. Diese Wirkung ist beim Menschen aufgrund biochemischer und morphologischer Parameter geringer. Ebenfalls bei Nagern zeigten DEHP und MEHP reproduktionstoxische Wirkungen [Thomas und Thomas, 1984]. Einschränkend sei hierbei erwähnt, dass in den genannten Tierversuchen sehr hohe Phthalatkonzentrationen eingesetzt wurden. Genotoxische Effekte durch Phthalate mit Hilfe des Comet Assays wurden an oropharyngealer und nasaler Schleimhaut [Kleinsasser et al., 2000c] sowie an menschlichen Lymphozyten [Kleinsasser et al., 2001] gezeigt.

Auch die vorliegenden Ergebnisse zeigen einen genotoxischen Effekt von MEHP in vitro. Dabei erwiesen sich die Einzelzellen von Frischbiopsaten als empfindlicher als die Zellen aus Miniorgankulturen. Ebenso zeigten die aus Organkulturen an Tag 7 gewonnenen Einzelzellen ein höheres Schädigungsmuster als die Vergleichszellen aus dem Zellverband. Daraus lässt sich eine erhöhte Empfindlichkeit der Einzelzellen ableiten.

Die Reaktionen der Zellen nach einmaliger Inkubation unterschieden sich hingegen kaum von denen nach dreimaliger Inkubation. Auch hier könnten Reparaturvorgänge zur Erklärung herangezogen werden. Eine mögliche Rolle von Phthalaten bei der Karzinogenese in vivo bedarf weiterer Untersuchungen. Allerdings erschweren die beobachteten genotoxischen Effekte eine Festlegung zum Beispiel von Werten für die maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK-Werte).

Die akute Toxizität von Phthalaten ist sehr gering [Layton et al., 1987]. Chronische Gaben induzierten hingegen bei Nagern eine toxische Wirkung. Da das Miniorganmodell die Simulation einer chronischen-repetitiven Einwirkung von Schadstoffen möglich macht, erweist es sich als geeignet für weitere Untersuchungen der Phthalatwirkung auf humane Schleimhaut.

4.2.5. DNA-Migration nach Inkubation mit Benzo[a]pyren-Diolepoxid

Benzo[a]pyren-Diolepoxid (BPDE) ist ein durch Pyrolyse entstandener Metabolit des Karzinogens Benz[a]pyren (B[a]P). Benzo[a]pyren dient als Leitsubstanz für die Gruppe der polyzyklischen Kohlenwasserstoffe (PAH). Von der IARC wird es als Kanzerogen der Gruppe 2A eingestuft [IARC, 2001].

BPDE kommt vor in Tabakrauch, gegrillten Speisen und als ubiquitär verbreiteter Umweltschadstoff. Arbeiter in der Eisen-, Steinkohle-, Stahl- und Teerindustrie sind verstärkt einer genotoxischen Belastung durch PAH ausgesetzt [Maier et al., 1994].

In vivo werden PAH durch Cytochrom P-450 und eine Peroxidase aktiviert. Dabei entstehen freie Radikale, wie BPDE, das durch kovalente Bindung oder Oxidation einen DNA-Schaden hervorrufen kann [Gelboin, 1980; MacLeod und Selkirk, 1982]. Ein erhöhtes Krebsrisiko wurde im Tierversuch nach oraler Zufuhr von

B[a]P nachgewiesen [Culp et al., 1998]. Genotoxische Effekte mit dem Comet Assay konnten festgestellt werden an einer Fibroblastenzelllinie [Hanelt et al., 1997].

Auch bei den hier durchgeführten Versuchen erwies sich BPDE als genotoxisch. Sowohl die Einzelzellen aus Frischbiopsaten als auch die aus Miniorganen gewonnenen Einzelzellen zeigten eine erhöhte Sensitivität. Dies kann als weiterer Beleg für einen veränderten Metabolismus der Zellen im epithelialen Zellverband angesehen werden.

Auch bei der Inkubation mit BPDE trat nach dreimaliger Inkubation der Miniorgankulturen eine deutliche und höhere DNA-Migration als nach einmaliger Inkubation. Eine Erklärung hierfür könnte ein kumulativer genotoxischer Effekt von BPDE liefern. Auch ein Verlust der Enzymaktivität in den Zellen ist denkbar.

Auch ein ineffizientes DNA-Reparatursystem durch Schädigung oder eine verminderte metabolische Aktivität der Zellkulturen oder eine längere Reparaturphase kommen ursächlich in Frage. Genauere Ergebnisse könnten beispielsweise erzielt werden durch den Einsatz von Reparaturinhibitoren oder die Verlängerung der Reparaturintervalle.

4.2.6. DNA-Migration nach Inkubation mit N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin

Das als Positivkontrolle eingesetzte N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) gehört in die Gruppe der Nitrosamide. Während bei anderen Nitrosoverbindungen wie zum Beispiel bei NDEA das eigentliche Karzinogen, ein Alkylkation, erst durch Hydroxylierung gebildet werden muss, wirkt MNNG als Alkylkation direkt auf die DNA. Reaktionsfähige Gruppen können mit DNA-Basen eine kovalente Bindung eingehen und so zu fehlerhaften DNA-Strukturen führen. MNNG stellt eine Modellschubstanz dar, die zur experimentellen Darstellung von Karzinogenese oder Teratogenese verwendet wird. Daher besteht eine Exposition nur für Beschäftigte in den jeweiligen Forschungslaboren [IARC, 1974].

MNNG gilt als erwiesen karzinogen: So wurden zum Beispiel Veränderungen des Gastrointestinaltrakts beschrieben [Taniguchi et al., 2002] oder gehäuftes Auftreten von Hautkrebs bei Mäusen [Rehman et al., 2000]. Die IARC stuft MNNG in die

Gruppe 2A, als wahrscheinlich karzinogen beim Menschen ein [IARC, 2001]. Es konnte an Lymphoblasten gezeigt werden, dass MNNG nicht nur mutagene und karzinogene Wirkung hat, sondern auch zytotoxisch ist, da es zum programmierten Zelltod, zur Apoptose, führen kann [Dunkern et al., 2003].

In den vorliegenden Versuchen wies MNNG eine massive DNA-Fragmentierung auf. Die genotoxische Wirkung von MNNG auf Einzelzellen aus Frischbiopsien entsprach in etwa der Wirkung auf Miniorganzellen nach der ersten Inkubation.

Auch im direkten Vergleich von Einzelzellen und Miniorganzellen war keine eindeutig höhere Sensitivität zu beobachten, was aber auf eine insgesamt hohe Genotoxizität zurück zu führen sein könnte.

Nach dreimaliger Inkubation konnte nochmals ein signifikanter Anstieg bei den OTM-Werten festgestellt werden. Die Reaktion der alkylierenden Substanz mit der DNA der Zelle scheint so stark zu sein, dass Reparaturmechanismen der Zelle keinen Einfluss mehr haben. Ein kumulativer Effekt liegt bei wiederholter Exposition durch starke Bindung reaktionsfähiger Gruppen an die DNA vor.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Umwelt- und Arbeitsstoffe stellen wichtige Faktoren bei der Kanzerogenese im menschlichen Körper dar. In der vorliegenden Arbeit wurden einige Vertreter von Umweltstoffen ausgewählt und auf ihre kanzerogene Wirkung hin untersucht: N-Nitrosodiethylamin (NDEA) für die Nitrosamine, Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) für die Chromverbindungen, Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat (MEHP) für die Phthalate und Benzo[a]pyren-Diolepoxid (BPDE) für die polyzyklischen Kohlenwasserstoffe. Als Negativkontrolle diente Dimethylsulfoxid (DMSO) und als Positivkontrolle N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG). Da viele dieser Stoffe über die Atemwege aufgenommen werden, ist die Schleimhaut des oberen Aerodigestivtraktes besonders exponiert. Als Untersuchungsmaterial diente deshalb humane nasale Schleimhaut. Um möglichst lebensnahe Bedingungen zu schaffen, wurden aus dieser ca. 1 mm^3 große Miniorgane gewonnen, die über eine Woche kultiviert wurden, was zu einer vollständigen Epithelialisierung führte. Die im natürlichen Zellverband verbliebenen Zellen konnten daraufhin mehrmals mit Fremdstoffen inkubiert werden. Die dazwischenliegenden Zeitintervalle ließen Reparaturvorgänge zu. Die Schädigungsmuster von Miniorganzellen wurden auch mit denen von Einzelzellen verglichen, die vor der Inkubation separiert worden waren. Dabei wurden sowohl Einzelzellen aus Frischbiopsaten als auch Einzelzellen aus Miniorganen nach 7-tägiger Kultivierung getestet. Zur quantitativen Schädigungsanalyse wurde die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) angewandt, bei der es zu einer Wanderung von gelösten DNA-Bruchstücken im elektrischen Feld kommt. Diese Wanderung konnte durch anschließende Anfärbung unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar gemacht werden.

Die Ergebnisse zeigten unterschiedliche Fragmentierungen der DNA nach einmaliger und dreimaliger Fremdstoffinkubation: Die DNA-Schädigungen der Miniorgane blieben nach ein- und dreimaliger Inkubation mit NDEA und MEHP auf gleichem Niveau. Dagegen traten bei jeder Inkubation mit $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, BPDE und MNNG zunehmende DNA-Fragmentierungen auf. Die aus Frischbiopsaten gewonnenen Einzelzellen zeigten bei jeder der getesteten Substanzen eine erhöhte

Empfindlichkeit. Der direkte Vergleich zwischen Einzelzellen und Miniorganen nach 7 Tagen ergab eine gleich hohe Schädigung für NDEA. Bei den anderen getesteten Stoffen wiesen die Einzelzellen höhere DNA-Fragmentierungen auf.

Es konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Stoffe Schädigungen an der Erbsubstanz in Form von Einzelstrangbrüchen hervorrufen. Im Vergleich zwischen Miniorganen und Einzelzellen wiesen Einzelzellen überwiegend eine höhere Empfindlichkeit gegenüber Fremdstoffen auf, als die im epithelialen Strukturverband belassenen Zellen der Miniorgane. Das Miniorganmodell bot mehrfache Inkubationsmöglichkeiten und ließ so Reparaturphasen zu.

Durch die Verwendung von Miniorgankulturen können lebensnahe Bedingungen geschaffen werden, die die Vorgänge im menschlichen Körper besser widerspiegeln als ein Einzelzellmodell. Die Verwendung von Miniorgankulturen eignet sich somit zur Untersuchung der metabolischen Kompetenz von Zellen und der DNA-Reparaturmechanismen. Dadurch kann die hier vorgestellte Methode zur Prävention von malignen Tumoren des oberen Aerodigestivtraktes einen wichtigen Beitrag leisten.

Auch die hier erstmals in Verbindung mit Miniorganen eingesetzte alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (Comet Assay) erwies sich als geeigneter Kurzzeittest zur Schädigungsanalyse. Das gezeigte Modell ermöglicht die Weiterentwicklung einer Screeningmethode für die Genotoxizität von Umweltstoffen unter Berücksichtigung individueller Empfindlichkeiten.

6. LITERATUR

Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA: The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett* 159: 63-71 (2000)

Aiub CA, Pinto LF, Felzenszwalb I: N-Nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. *Toxicol Lett* 145: 36-45 (2003)

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

Amtsblatt der Europäischen Union: ABl L 125 vom 21.5.2003, S 12-13

Anderson D, Yu TW, Hincal F: Effect of some phthalate esters in human cells in the comet assay. *Teratog Carcinog Mutagen* 19: 275-280 (1999)

Aoyagi K, Kohfuji K, Yano S, Murakami N, Hori H, Terasaki Y, Takeda J, Tanaka M, Shirouzu K: Morphological change in the MNNG-treated rat gastric mucosa. *Kurume Med J* 47: 31-36 (2000)

Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassoun EA, Tran MX, Tang L, Stohs SJ: Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate and cadmium chloride to rats. *Free Radic Biol Med* 22: 471-478 (1997)

- Bals R, Gamarra F, Kaps A, Grundler S, Huber RM, Welsch U: Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system. *Cell Tissue Res* 293: 573-577 (1998)
- Bereziat JC, Raffalli F, Schmezer P, Frei E, Geneste O, Lang MA: Cytochrome P450 2A of nasal epithelium: regulation and role in carcinogen metabolism. *Mol Carcinog* 14: 130-139 (1995)
- Berg OH, Lie K, Steinsvag SK: The effect of decongestive nosedrops on human respiratory mucosa in vitro. *Laryngoscope* 104: 1153-1158 (1994)
- Bergner A, Stief J, Holdenrieder S, Stieber P, Haimerl W, Passlick B, Waldschmidt A, Kummermehr J, Gamarra F, Huber RM: Effects of Single-Dose Irradiation on Bronchial Epithelium: A Comparison of BEAS 2B Cell Monolayers, Human Organ Cultures, and Goettinger Minipigs. *Radiat Res* 160: 647-654 (2003)
- Blasiak J, Trzeciak A, Malecka-Panas E, Drzewoski J, Iwanienko T, Szumiel I, Wojewodzka M: DNA damage and repair in human lymphocytes and gastric mucosa cells exposed to chromium and curcumin. *Teratog Carcinog Mutagen* 19: 19-31 (1999)
- Blom A, Ekman E, Johannisson A, Norrgren L, Pesonen M: Effects of xenoestrogenic environmental pollutants on the proliferation of a human breast cancer cell line (MCF-7). *Arch Environ Contam Toxicol* 34: 306-310 (1998)
- Bock C, Dittmar H, Gemeinhardt H, Bauer E, Greulich KO: Comet assay detects cold repair of UV-A-damages in a human B-lymphoblast cell line. *Mutat Res* 408: 111-120 (1998)

-
- Brown JL: N-Nitrosamines. *Occup Med* 14: 839-848 (1999)
- Carmichael PL, Ugwumado AHN, Neven P, Hewer AJ, Poon GK, Phillips DH: Lack of genotoxicity of tamoxifen in human endometrium. *Cancer Res* 56: 1475-1479 (1996)
- Cheng L, Eicher SA, Guo Z, Hong WK, Spitz MR, Wei Q: Reduced DNA repair capacity in head and neck cancer patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 7: 465-468 (1998)
- Cloos J, Spitz MR, Schantz SP, Hsu TC, Zhang Z, Tobi H, Braakhuis BJM, Snow GB: Genetic susceptibilities to Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *J Nat Cancer Inst* 88: 530-534 (1996)
- Collins A, Harrington V: Repair of oxidative DNA damage: assessing its contribution to cancer prevention. *Mutagenesis* 17: 489-493 (2002)
- Coutelle C, Ward PJ, Fleury B, Quatrocchi P, Chambrin H, Iron A, Couzigou P, Cassaigne A: Laryngeal and oropharyngeal cancer, and alcohol dehydrogenase 3 and glutathione S-transferase M1 polymorphisms. *Hum Genet* 99: 319-325 (1997)
- Culp SJ, Gaylor DW, Sheldon WG, Goldstein LS, Beland FA: A comparison of the tumors induced by coal tar and benzo[a]pyrene in a 2-year bioassay. *Carcinogenesis* 19: 117-124 (1998)
- De Boer S, Hoeijmakers JHJ: Nucleotide excision repair and human syndromes. *Carcinogenesis* 21: 453-460 (2000)
- De Flora S, Bagnasco M, Serra D, Zancchi P: Genotoxicity of chromium compounds. A review. *Mutat Res* 238: 1339-1345 (1990)

- De Leve LD, Wang X, Kaplowitz N, Shulman HM, Bart JA, van der Hoek A: Sinusoidal endothelial cells as a target for acetaminophen toxicity. Direct action versus requirement for hepatocyte activation in different mouse strains. *Biochem Pharmacol* 53: 1339-1345 (1997)
- De Stefani E, Boffetta P, Mendilaharsu M, Carzoglio J, Deneo-Pellegrini H: Dietary nitrosamines, heterocyclic amines, and risk of gastric cancer: a case-control study in Uruguay. *Nutr Cancer* 30: 158-162 (1998)
- Dunkern T, Roos W, Kaina B: Apoptosis induced by MNNG in human TK6 lymphoblastoid cells is p53 and Fas/CD95/Apo-1 related. *Mutat Res* 544: 167-172 (2003)
- Eisenbrand G, Metzler M: *Toxikologie für Chemiker: Stoffe, Mechanismen, Prüfverfahren. Mit einer Einführung in das Chemikalien- und Gefahrenstoffrecht* von Hennecke F. Thieme Verlag Stuttgart, New York (2002)
- Faccioni F, Franceschetti P, Cerpelloni M, Fracasso ME: In vivo study on metal release from fixed orthodontic appliances and DNA damage in oral mucosa cells. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 124: 687-693 (2003)
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL: The comet assay : a comprehensive review. *Mutat Res* 339: 37-59 (1995)
- Fairbairn DW, Walburger DK, Fairbairn JJ, O'Neill KL: Key morphologic changes and DNA strand breaks in human lymphoid cells: discriminating apoptosis from necrosis. *Scanning* 18: 407-416 (1996)
- Fishman J, Osborne MP, Telang NT: The role of estrogen in mammary carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 768: 91-100 (1995)

- Fracasso ME, Francechetti P, Mossini E, Tieghi S, Perbellini L, Romeo L: Exposure to mutagenic airborne particulate in a rubber manufacturing plant. *Mutat Res* 441: 43-51 (1999)
- Gelboin HV: Benzo[alpha]pyrene metabolism, activation and carcinogenesis: role and regulation of mixed-function oxidases and related enzymes. *Physiol Rev* 60: 1107-1166 (1980)
- Habib SL, Badawi AF, Aweny HA, Mostafa MH: Modifications in the carcinogen-metabolizing capacity of mouse liver treated with N-nitroso compounds. *Oncol Rep* 5: 965-969 (1998)
- Hanelt S, Helbig R, Hartmann A, Lang M, Seidel A, Speit G: A comparative investigation of DNA adducts, DNA strand breaks and gene mutations induced by benzo[a]pyrene and (+/-)-anti-benzo[a]pyrene-7,8-diol 9,10-oxide in cultured human cells. *Mutat Res* 390: 179-188 (1997)
- Hardell L, Ohlson CG, Fredrikson M: Occupational exposure to polyvinyl chloride as a risk factor for testicular cancer evaluated in a case-control study. *Int J Cancer* 73: 828-830 (1997)
- Harréus U, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H: Genotoxische Wirkung auf menschliche Schleimhautbiopsien des oberen Aerodigestivtraktes. *Laryngorhinootologie* 78: 176-181 (1999)
- Hartmann A, Speit G: The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett* 90: 183-188 (1997)

-
- Hayakawa N, Hirakawa S, Nakai H, Suzuki S, Ota Z: The effects of thyroid-stimulating hormone and thyroid microsomal antibody on thyroid peroxidase activity in human follicular cells: a mini organ culture study. *Endocr J* 40: 149-161 (1993)
- Hecht SS: Approaches to cancer prevention based on an understanding of N-nitrosamine carcinogenesis. *Proc Soc Exp Biol Med* 216: 181-191 (1997)
- Hernberg S, Westerholm P, Schultz-Larsen K, Degerth R, Kuosma E, Englund A, Engzell U, Hansen HS, Mutanen P: Nasal and sinonasal cancer. Connection with occupational exposures in Denmark, Finland and Sweden. *Scand J Work Environ Health* 9: 315-326 (1983)
- Hodges NJ, Adam B, Lee AJ, Cross HJ, Chipman JK: Induction of DNA-strand breaks in human peripheral blood lymphocytes and A549 lung cells by sodium dichromate: association with 8-oxo-2-deoxyguanosine formation and inter-individual variability. *Mutagenesis* 16: 467-474 (2001)
- Hong JY, Yang CS: Genetic polymorphism of Cytochrom P-450as a Biomarker of Susceptibility to enviromental Toxicity. *Environ Hlth Persp* 105: 759-762 (1997)
- Huber WW, Grasl-Kraupp B, Schulte-Hermann R: Hepatocarcinogenic potential of di(2-ethylhexyl)phthalate in rodents and its implications on human risk. *Crit Rev Toxicol* 26: 365-481 (1996)
- IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Chromium, nickel and welding. IARC, Lyon, 49: 49-411 (1990)

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some aromatic amines, hydrazine and related substances, N-nitroso compounds and miscellaneous alkylating agents. IARC, Lyon, 4: 183-195 (1974)

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Programmed on the Evaluation of Carcinogenic. <http://monographs.iarc.fr>. (2001)

IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. IARC, Lyon, 29: 269-294 (1982)

Jones P, Kortenkamp A, O'Brien P, Wang G, Yang G: Evidence for the generation of hydroxyl radicals from a chromium (V) intermediate isolated from the reaction of chromate and glutathione. *Arch Biochem Biophys* 286: 652-655 (1991)

Karle VA, Short BL, Martin GR, Bulas DI, Getson PR, Luban NL, O'Brien AM, Rubin RJ: Extracorporeal membrane oxygenation exposes infants to the plasticizer, di(2-ethylhexyl)phthalate. *Crit Care Med* 25: 696-703 (1997)

Kennaway NM, Kennaway EL: A study of the incidence of cancer of the lung. *J Hyg* 36: 236-267 (1936)

Kihara M, Kubota A, Furukawa M, Kimura H: GSTM1 gene polymorphism as a possible marker for susceptibility to head and neck cancers among Japanese smokers. *Cancer Lett* 112: 257-262 (1997)

Klein RG, Schmezer P, Amelung F, Schroeder HG, Woeste W, Wolf J: Carcinogenicity assays of wood dust and wood additives in rats exposed by long-term inhalation. *Int Arch Occup Environ Health* 74: 109-118 (2001)

Kleinsasser NH, Harréus UA, Münzenrieder RK, Weissacher H, Kastenbauer ER:
Weichmacher in Kunststoffen- gefährden sie den Menschen? MMW-
Fortschr Med 141: 660-663 (1999)

Kleinsasser NH, Weissacher H, Kastenbauer ER, Dirschedl P, Wallner BC, Harréus
UA: Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer
patients due to enviromental pollutants. Eur Arch Otorhinolaryngol 257:
337-342 (2000a)

Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Münzenrieder RK, Harréus UA:
Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood
lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the
comet assay. Mutat Res 467: 21-30 (2000b)

Kleinsasser NH, Kastenbauer ER, Weissacher H, Münzenrieder RK, Harréus UA:
Phthalates Demonstrate Genotoxicity on Human Mucosa of the Upper
Aerodigestive Tract. Environ Mol Mutagen 35: 9-12 (2000c)

Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harréus UA, Juchhoff J,
Kastenbauer ER, Huber RM: Genotoxicity of nitroso compounds and
sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal
epithelium and the Comet assay. ORL 63: 141-147 (2001)

Kuchenmeister F: Etablierung und Erprobung einer Technik, die es erlaubt, DNA-
Schäden an einzelnen Nasenschleimhautzellen der Ratte und des
Menschen nachzuweisen. Inauguraldissertation zur Erlangung des
medizinischen Doktorgrades der Fakultät für Theoretische Medizin der
Medizinischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg.
(1994)

-
- La Vecchia C, D'Avanzo B, Airoldi L, Braga C, Decarli A: Nitrosamine intake and gastric cancer risk. *Eur J Cancer Prev* 4: 469-474 (1995)
- Layton DW, Mallon BJ, Rosenblatt DH, Small MJ: Deriving allowable daily intakes for systemic toxicants lackin chronic toxicity data. *Regul Toxicol Pharmacol* 7: 96-112 (1987)
- Lu SX: N-nitrosamines in gastric juice of subjects from high incidence area of esophageal cancer. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* 10: 322-325 (1998)
- MacLeod MC, Selkirk JK: Physical interactions of isomeric benzo[a]pyrene diol-epoxides with DNA. *Carcinogenesis* 3: 287-292 (1982)
- Maier H, Fischer G, Sennewald E, Heller WD: Berufliche Risikofaktoren für Rachenkrebs. *HNO* 42: 530-540 (1994)
- McGregor DB, Baan RA, Partensky C, Rice JM, Wilbourn JD: Evaluation of the carcinogenic risks to humans associated with surgical implants and other foreign bodies – a report of an IARC Monographs Programme Meeting. International Agency for Research on Cancer. *Eur J Cancer* 36: 307-313 (2000)
- Mohankumar MN, Janani S, Prabhu BK, Kumar PR, Jeevanram RK: DNA damage and integrity of UV- induced DNA repair in lymphocytes of smokers analysed by the comet assay. *Mutat Res* 520: 179-187 (2002)
- Morales-Suarez-Varela MM, Llopis-Gonzalez A, Tejerizo-Perez MI: Impact of nitrates in drinking water on cancer mortality in Valencia, Spain. *Eur J Epidemiol* 11: 15-21 (1995)

- Neumann HG: Entstehung und Behandlung von Tumoren, Immunsuppressiva; in Forth W, Henschler D, Rummel W, Starke K: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg (1998)
- Oestling O, Johanson KJ: Microgelelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual cells. *Biochem Biophys Res Commun* 123: 291-298 (1984)
- Ohara M, Lu H, Shiraki K, Ishimura Y, Uesaka T, Katoh O, Watanabe H: Inhibition by long-term fermented miso of induction of gastric tumors by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in CD (SD) rats. *Oncol Rep* 9: 613-616 (2002)
- Olive PL, Banath JP: Growth fraction measured using the comet assay. *Cell Prolif* 25: 447-457 (1992)
- Olive PL, Durand RE, Jackson SM, Le Riche JC, Luo C, Ma R, McLaren DB, Aquino-Parsons C, Thomson TA, Trotter T: The comet assay in clinical practice. *Acta Oncol* 38: 839-844 (1999)
- Olive PL, Durand RE, Le Riche J, Olivotto IA, Jackson SM: Gel electrophoresis of individual cells to quantify hypoxic fraction in human breast cancer. *Cancer Res* 53: 733-736 (1993)
- Palyvoda O, Mukalov I, Polanska J, Wygoda A, Drobot L, Widel M, Rzeszowska-Wolny J: Radiation-induced DNA damage and its repair in lymphocytes of patients with head and neck cancer and healthy donors. *Anticancer Res* 22: 1721-1725 (2002)

- Phillips HJ: Dye exclusion test for cell viability. In: Tissue culture. Kruse PF (Hrsg.). Academic Press, New York: 407-408 (1973)
- Plappert U, Raddatz K, Molt S, Rieth W, Flidner TM: Der Comet Assay - ein neuer Indikatorrest zum Nachweis genotoxischer Beanspruchung. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 30: 60-65 (1995)
- Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambertz R, Leucht U, Schroder HG, Schmezer P: Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ Mol Mutagen* 24: 23-45 (1994)
- Rehman I, Lowry DT, Adams C, Abdel-Fattah R, Holly A, Yuspa SH, Hennings H: Frequent codon 12 Ki-ras mutations in mouse skin tumors initiated by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and promoted by mezerein. *Mol Carcinog* 27: 298-307 (2000)
- Resau JH, Cottrell JR, Elligett KA, Hudson EA: Cell injury and regeneration of human epithelium in organ culture. *Cell Biol Toxicol* 3: 441-458 (1987)
- Shi X, Dalal NS: The role of superoxide radical in chromium (VI)-generated hydroxyl radical: The Cr (VI) Haber-Weiss-Cycle. *Arch Biochem Biophys* 292: 323-327 (1992)
- Singh J, Carlisle DL, Pritchard DE, Patierno SR: Chromium-induced genotoxicity and apoptosis: relationship to chromium carcinogenesis (review). *Oncology Reports* 5: 1307-1318 (1998)
- Speit G, Hartmann A: The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis* 10: 555-559 (1995)

Speit G, Witton-Davies T, Heepchantree W, Trenz K, Hoffmann H: Investigations on the effect of cigarette smoking in the comet assay. *Mutat Res* 542: 33-42 (2003)

Statistisches Bundesamt:

<http://www.destatis.de/presse/deutsch/pm2003/p0130092.htm>

Steiner I, Scharf L, Fiala F, Washuttl J: Migration of di-(ethylhexyl) phthalate from PVC child articles into saliva and saliva simulat. *Food Addit Contam* 15: 812-817 (1998)

Steinhoff D, Gad SC, Hatfield GK, Mohr U: Carcinogenicity study with sodium dichromate in rats. *Exp Pathol* 30: 129-141 (1986)

Steinsvag SK, Bjerknes R, Berg OH: Effects of topical nasal steroids on human respiratory mucosa and human granulocytes in vitro. *Acta Otolaryngol* 116: 868-875 (1996)

Steinsvag SK, Strand M, Berg O, Miaguchi M, Olofsson J: Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* 101: 1323-1331 (1991)

Tanakamaru Z, Nischikawa A, Furukawa F, Imazawa T, Lee IS, Kasahara K, Tanaka T, Takahashi M: Failure of dietary alpha-difluoromethylornithine to inhibit gastric carcinogenesis in rats after 8 weeks of treatment with N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and sodium chloride. *Cancer Lett* 120: 95-100 (1997)

- Taniguchi E, Nakajima H, Hongyo T, Fukuda K, Li LY, Kurooka M, Matsuda H, Nomura T: Effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on the human colorectal polyps consecutively maintained in SCID mice. *Cancer Lett* 182: 127-133 (2002)
- Teissier E, Fennrich S, Strazielle N, Daval JL, Ray D, Schlosshauer B, Gherzi-Egea JF: Drug metabolism in in vitro organotypic and cellular models of mammalian central nervous system: activities of membrane-bound epoxide hydrolase and NADPH-cytochrome P450 (C) reductase. *Neurotoxicology* 19: 347-355 (1998)
- Thomas JA, Thomas MJ: Biological effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate and other phthalatic acid esters. *Crit Rev Toxicol* 13: 283-317 (1984)
- Tsujiuchi T, Sasaki Y, Kubozoe T, Tsutsumi M, Konishi Y, Nakae N: Alterations of the Fhit gene in hepatocellular carcinomas induced by N-nitrosodiethylamine in rats. *Mol Carcinog* 34: 19-24 (2002)
- Van Iersel M, Verhagen H, van Bladeren PJ: The role of biotransformation in dietary (anti)-carcinogenesis. *Mutat Res* 443: 259-270 (1999)
- Wei Q, Gu J, Cheng L, Bondy ML, Jiang H, Hong WK, Spitz MR: Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced chromosomal aberrations and risk of lung cancer. *Cancer Res* 56: 3975-3979 (1996)
- Yumei W, Jinfeng J, Xiaohong Z, Baoshan Y: Genotoxicity of the dust organic extract and its fractions derived from an aluminium electrolytic plant. *Toxicol Lett* 98: 147-153 (1998)

Zou XN, Lu SH, Liu B: Volatile N-nitrosamines and their precursors in Chinese salted fish- a possible etological factor for NPC in china. Int J Cancer 59: 155-158 (1994)

7. ANHANG

7.1. Abkürzungen

BEGM	Bronchial Epithelial Cell Growth Medium
BPDE	Benzo[a]pyren-Diolepoxid
ca.	circa
°C	Grad Celsius
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal calves' serum
MEHP	Mono(2-Ethylhexyl)-Phthalat
mg	Milligramm
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MNNG	N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin
NDEA	N-Nitrosodiethylamin
OTM	Olive Tail Moment
PBS	Phosphat Buffered Saline

7.2. Wissenschaftliche Beiträge mit Auszügen aus der vorliegenden Arbeit

7.2.1. Originalarbeiten

Kleinsasser NH, Gamarra F, Bergner A, Wallner BC, Harréus UA, Juchhoff J, Kastenbauer ER, Huber RM: Genotoxicity of nitroso compounds and sodium dichromate in a model combining organ cultures of human nasal epithelium and the Comet assay. *ORL* 63: 141-147 (2001)

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

7.2.2. Abstrakts

Kleinsasser NH, Juchhoff J, Gamarra F, Huber RM: Genotoxicity of nitrosamines and chromates in a new model of human nasal epithelium organ cultures and the comet assay. *Laryngorhinootol* 79: 147 (2000)

Kleinsasser NH, Harréus UA, Huber RM, Juchhoff J, Bergner A, Wallner BC, Gamarra F: DNA-Schädigung und -Reparatur in Miniorgankulturen menschlicher Mukosa: *Otorhinolaryngol Nova* 10: (2000)

Kleinsasser NH, Harréus UA, Wallner BC, Juchhoff J, Bühlren M, Gamarra F, Rettenmeier AW: Differential mutagen sensitivities of human nasal mucosal cells from fresh specimens and mini organ cultures. *J Cancer Res Clin Oncol* 127: 20 (2001)

Kleinsasser N, Bührlen M, Juchhoff J, Gamarra F, Harréus U, Wallner B:
Dreidimensionale humane Schleimhautkulturen in der
Ökogenotoxikologie. Otorhinolaryngol Nova 11: 250 (2002)

Kleinsasser N, Juchhoff J, Gamarra F, Rettenmeier AW, Huber R, Wallner B,
Harréus U: Miniorgankulturen humaner nasaler Epithelien in der
Ökogenotoxikologie. Verh Dtsch Ges Arbeitsmed Umweltmed 42: 193-
194 (2002)

7.3. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Jutta Birgitta Ihbe, geb. Juchhoff
geboren am 20.11.1975 in Würzburg

Familienstand: verheiratet mit Peter Ihbe

Eltern: Marlies Juchhoff, geb. Pavelec
Helmut Juchhoff

Schulbildung:

1982-1986 Volksschule Bechtolsheimer-Hof Würzburg

1986-1995 Wirsberg-Gymnasium Würzburg, humanistischer
Zweig

Universitätsausbildung:

1995-1997 Studium der Rechtswissenschaften an der Universität
Augsburg und der LMU-München (3 Semester)

1997-2003 Studium der Humanmedizin an der LMU-München

1999 Beginn der Arbeiten zur Dissertation im Labor für
klinisch experimentelle Onkologie der Klinik und
Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Berufliche Tätigkeit:

seit Oktober 2003 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Innere
Medizin des Klinikums Starnberg

7.4. Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde durchgeführt im Labor für klinisch experimentelle Onkologie der Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Anleitung von Herrn PD Dr. Norbert Kleinsasser.

Mein Dank gilt an erster Stelle Herrn PD Dr. Norbert Kleinsasser, der mir jederzeit als Ansprechpartner zur Verfügung stand. Im Rahmen seiner wissenschaftlichen Betreuung der vorliegenden Arbeit hat er durch konstruktive Kritik und kompetente Anregungen einen wichtigen Beitrag zum Ergebnis geleistet.

Herrn Prof. Dr. Ernst Kastenbauer und seinem Nachfolger Herrn Prof. Dr. A. Berghaus möchte ich Dank sagen für die Möglichkeit einer Dissertation an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke sowie für die Bereitstellung der Arbeitsmöglichkeiten.

Bei Herrn Dr. Ulrich Harréus bedanke ich mich für die wissenschaftliche Mitbetreuung und die organisatorische Unterstützung bei der Beschaffung von Schleimhautproben.

Frau Dipl. Biol. Dr. Barbara Wallner möchte ich danken für die Einarbeitung in die Arbeitsmethoden und ihre stete Hilfsbereitschaft und kollegiale Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

Mein Dank gilt auch den medizinisch-technischen Assistentinnen Sabina Zieger, Tatjana Baluschko und Gabi Holzer für die freundschaftliche Zusammenarbeit und dem gesamten Laborteam für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Meinem Mann Peter Ihbe möchte ich danken für seine moralische Unterstützung, seine Geduld und seinen Optimismus, die mir das Schreiben erleichterten sowie für die Hilfe bei der Formatierung der Arbeit.

Abschließend gilt großer Dank meinen Eltern, die mir auf meinem Werdegang immer mit Rat und Tat zur Seite standen und mein Studium und diese Arbeit mit Zuversicht, Geduld und auch finanzieller Unterstützung ermöglichten.