

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

**Miniorgane humaner nasaler Mukosa als Modell zur
Evaluierung genotoxischer Effekte von Umweltstoffen in
Zielzellen der Karzinogenese**

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

vorgelegt von
Michael Bührlen
aus München
2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser

2. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. Axel Imhof

Mitberichtersteller:
Prof. Dr. med. vet. Elmar Richter
Prof. Dr. rer. nat. Michael Schleicher
Prof. Dr. rer. nat. Thomas Brocker

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. Ulrich Harréus

Dekan: Prof. Dr. med. Dietrich Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 22.06.2006

„Das was aus Bestandteilen so zusammengesetzt ist, dass es ein einheitliches Ganzes bildet, nicht nach Art eines Haufens, sondern wie eine Silbe, das ist offenbar mehr als bloß die Summe seiner Bestandteile.“

Aristoteles, Metaphysik

Inhaltsverzeichnis

Kapitel 1 Einleitung		7
1.1	Anatomie, Funktion und Tumore des sinonasalen Raums und des Nasopharynx	7
1.1.1	Anatomische und histologische Grundlagen	7
1.1.2	Malignome in sinonasalem Raum und Nasopharynx	8
1.1.3	Modell der Miniorgankulturen zur Untersuchung genotoxischer Umwelteinflüsse auf humane nasale Schleimhaut	11
1.2	Verwendete Substanzen mit genotoxischem Schädigungspotenzial	12
1.2.1	Natriumdichromat	12
1.2.2	<i>N</i> -Nitrosodiethylamin	13
1.2.3	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin	14
1.3	Nachweis von DNS-Schäden mit dem Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay	15
1.3.1	Funktionsprinzip der Technik	15
1.3.2	Quantifizierung genotoxischer Effekte mit dem <i>Olive Tail Moment</i>	16
1.4	Nachweis apoptotischer Vorgänge mit dem Annexin-V-Affinitätstest	17
1.4.1	Biologischer Hintergrund	17
1.4.2	Funktionsprinzip der Technik	19
1.5	Nachweis von Cytochrom P450 2A6 mit dem Durchflusszytometer	19
1.5.1	Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers	19
1.5.2	Funktionsprinzip der intrazellulären Antigenfärbung	21
1.6	Arbeitshypothese und Ziele der Arbeit	24
Kapitel 2 Material und Methoden		25
2.1	Technik der Miniorgankulturen	25
2.1.1	Verwendetes Gewebe	25
2.1.2	Herstellung der Miniorgane und Ablauf der Kultivierung	25
2.2	Technik der Zellseparation und des Vitalitätstests	26
2.2.1	Mechanische und enzymatische Zellseparation	26
2.2.2	Vitalitätstest und Zellzählung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest	26
2.3	Technik der Fremdstoffinkubation	27
2.3.1	Inkubationsschemata	27

2.3.2	Ablauf der Inkubationen an Tag 7 und 9 der Kultivierung	28
2.3.3	Ablauf der Inkubationen an Tag 11 der Kultivierung	28
2.3.4	Verwendete Schadstoffkonzentrationen	29
2.4	Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay	29
2.4.1	Verwendetes Protokoll	29
2.4.2	Ablauf der Versuche	30
2.4.3	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	31
2.5	Apoptosenachweis mit dem Annexin-V-Affinitätstest	33
2.5.1	Verwendeter Chemikaliensatz	33
2.5.2	Ablauf der Versuche	33
2.5.3	Fluoreszenzmikroskopische Auswertung	33
2.6	Durchflusszytometrische CYP2A6-Bestimmung	34
2.6.1	Verwendete Zellen	34
2.6.2	Verwendete Materialien	34
2.6.3	Primärantikörpertitration	35
2.6.4	Sekundärantikörpertitration	36
2.6.5	Bestimmung der CYP2A6-Konzentration im Zeitverlauf der Kultivierung	38
2.6.6	Durchflusszytometrische Auswertung	39
2.7	Graphische Darstellung der Ergebnisse und statistische Analyse	40
2.7.1	Diagramme	40
2.7.2	Statistische Testverfahren	42
2.8	Verwendete Geräte und Reagenzien	43
2.8.1	Reagenzien	43
2.8.2	Verbrauchsmaterialien	44
2.8.3	Software und Geräte	44

Kapitel 3 Ergebnisse **46**

3.1	Zellvitalität	46
3.2	Genotoxische Schäden nach Fremdstoffinkubation	46
3.2.1	Genotoxische Schäden bei Ein- und Dreifachinkubation von Miniorganen	47
3.2.2	Genotoxische Schäden bei Ein- und Dreifachinkubation von Einzelzellen	50
3.2.3	Vergleich der genotoxischen Schäden bei einfacher Inkubation von Miniorganen und Einzelzellen	53
3.3	Genotoxische Schäden und Apoptose nach Fremdstoffinkubation	56
3.3.1	Apoptose bei Ein- und Dreifachinkubation der Miniorgane	56
3.3.2	Genotoxische Schäden und Apoptose bei Ein- und Dreifachinkubation der Miniorgane	59

3.4	Cytochrom-P450-2A6-Konzentration in Miniorganen	62
3.4.1	Fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Untersuchung	62
3.4.2	Titration des Primärantikörpers	63
3.4.3	Titration des Sekundärantikörpers	64
3.4.4	Cytochrom-P450-Konzentration im Verlauf der Kultivierung	65

Kapitel 4 Diskussion 68

4.1	Genotoxikologie - eine Forschungsrichtung im Wandel	68
4.2	Diskussion der Ergebnisse mit Natriumdichromat	69
4.2.1	Toxikologischer Hintergrund	69
4.2.2	Diskussion der Ergebnisse des Annexin-V-Affinitätstests	71
4.2.3	Diskussion der Ergebnisse des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay	72
4.2.4	Beurteilung des Gefahrenpotenzials für den Menschen	74
4.3	Diskussion der Ergebnisse mit N-Nitrosodiethylamin	76
4.3.1	Toxikologischer Hintergrund	76
4.3.2	Diskussion der Ergebnisse des Annexin-V-Affinitätstests	77
4.3.3	Diskussion der Ergebnisse des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay	78
4.3.4	Diskussion der Ergebnisse der durchflusszytometrischen CYP2A6-Bestimmung	79
4.3.5	Beurteilung des Gefahrenpotenzials für den Menschen	82
4.4	Diskussion der Ergebnisse mit N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin	83
4.4.1	Toxikologischer Hintergrund	83
4.4.2	Diskussion der Ergebnisse des Annexin-V-Affinitätstests	83
4.4.3	Diskussion der Ergebnisse des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay	84
4.4.4	Beurteilung des Gefahrenpotenzials für den Menschen	85
4.5	Diskussion der Miniorgane als Modell humaner nasaler Mukosa	86
4.5.1	Gebräuchliche <i>in-vitro</i> -Systeme nasaler Mukosa	86
4.5.2	Stellenwert von Miniorganen	87

Kapitel 5 Anhang 90

5.1	Zusammenfassung	90
5.2	Abkürzungen und chemische Formeln	91
5.3	Bildnachweis	92
5.4	Literaturverzeichnis	93
5.5	Danksagung	110
5.6	Lebenslauf	111

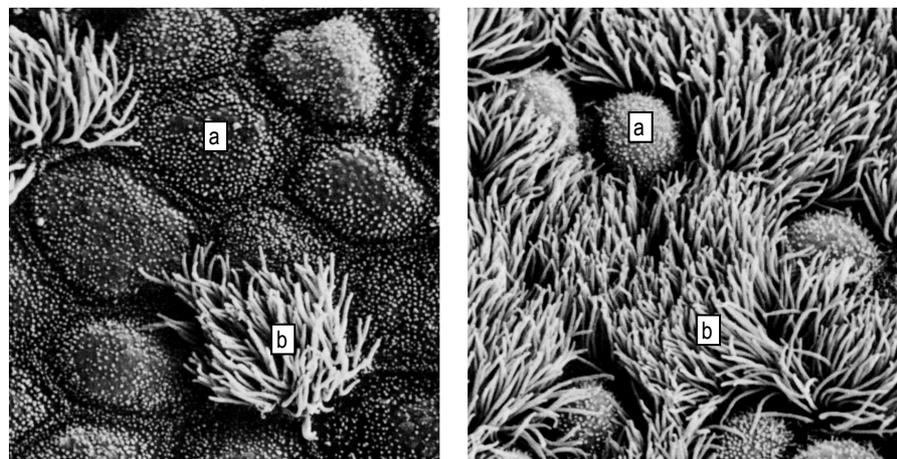
1.1 Anatomie, Funktion und Tumore des sinonasalen Raums und des Nasopharynx

1.1.1 Anatomische und histologische Grundlagen

Die luftleitenden Abschnitte der Atmungsorgane dienen der Anfeuchtung, Anwärmung und Reinigung der einströmenden Luft. Diese Aufgaben werden durch die respiratorische Schleimhaut, ihre zahlreichen mukösen und serösen Drüsen sowie das dichte subepitheliale Gefäßnetz erfüllt [Junqueira und Carneiro, 1996]. Anatomisch umfassen die luftleitenden Abschnitte den Bereich von Nase, Nasennebenhöhlen, Rachen, Kehlkopf und Luftröhre bis in das Bronchialsystem. Nase und Nasennebenhöhlen werden zusammen als sinonasaler Raum bezeichnet. Durch die Choanen wird dieser Raum mit dem Nasopharynx verbunden. Die Hinterwand des Nasopharynx bilden der Clivus und die beiden ersten Halswirbel. Nach oben hin wird er durch das Keilbein abgeschlossen, nach unten geht er auf Höhe der freien Kante des weichen Gaumens in den Oropharynx über [Dahl und Mygind, 1998; Lin et al., 2005].

Der sinonasale Raum ist von respiratorischem Epithel ausgekleidet. Dabei handelt es sich um ein mehrreihiges hochprismatisches Epithel, das bewegliche Kinozilien trägt und mit Becherzellen durchsetzt ist [Augusto et al., 2001]. Der exakte histologische Aufbau variiert in Abhängigkeit von der Lokalisation: Während sich in der Nasenhaupthöhle viele Becherzellen und eine dicke Basalmembran befinden, ist in den Nasennebenhöhlen die Schleimhaut eher dünn und mit wenig Becherzellen ausgestattet. Dies zeigen exemplarisch die beiden rasterelektronischen Aufnahmen in Abbildung 1-1. Die Schleimhaut des Nasopharynx ist in ihrem Aufbau komplex. In der Nähe der Choanen und den angrenzenden Teilen des Rachendachs besteht sie zum größten Teil aus respiratorischem Epithel. In den hinteren und unteren Anteilen des Nasopharynx überwiegt an Stellen besonderer mechanischer Beanspruchung metaplastisch umgewandeltes mehrschichtiges unverhorntes Plattenepithel. Die oralen und laryngealen Pharynxanteile sind vollständig von diesem Plattenepithel ausgekleidet. Ab der Epiglottis bis zu den Bronchioli terminales ist wieder typisches respiratorisches Epithel vorherrschend [Junqueira und Carneiro, 1996; Dahl und Mygind, 1998; Lin et al., 2005].

Abbildung 1-1 Rasterelektronische Aufnahmen der Oberfläche respiratorischer Schleimhaut in verschiedenen Bereichen der luftleitenden Atemwege. Links überwiegen schleimproduzierende Becherzellen (a), rechts mit Kinozilien besetzte Zellen (b).



1.1.2 Malignome in sinonasalem Raum und Nasopharynx

1.1.2.1 Nasenhöhle und Nasennebenhöhlen

Krebserkrankungen des sinonasalen Raumes sind selten und histologisch uneinheitlich. Die meisten bösartigen Neubildungen treten in der vierten und fünften Lebensdekade auf [Shao und Adams, 2002]. Epidemiologische Studien schätzen die jährliche Inzidenz maligner Tumoren der Nasenhaupt- und Nasennebenhöhlen in den Vereinigten Staaten von Amerika auf 0,5 bis 1,0 Fälle pro 100.000 Einwohner. Damit machen sie nur 3 % aller Krebserkrankungen des oberen Aero-digestivtrakts aus. In asiatischen Staaten liegt die Inzidenz mit jährlich bis zu 5 Fällen pro 100.000 Einwohnern deutlich höher [Bogdanffy et al., 1997; Götte und Hörmann, 2004]. Die Ursache der unterschiedlichen Erkrankungshäufigkeit wird vor allem in der geographisch variierenden Exposition gegenüber verschiedenen Umweltfaktoren gesehen. Als primärer Schädigungsmechanismus gilt dabei nach epidemiologischen und experimentellen Untersuchungen die lokale Wirkung inhalierter Stoffe [Bogdanffy et al., 1997; Feron et al., 2001].

Zu den epidemiologisch gesicherten Risikofaktoren zählt die Exposition gegenüber Tabakrauch, Chrom-, Nickel- und anderen Metallsalzen, Chemikalien wie Isopropylalkohol und Senfgas sowie Holz-, Leder- und Textilstäuben. Durch das vermehrte Vorkommen dieser Stoffe lässt sich auch die erhöhte Inzidenz sinonasaler Karzinome bei Beschäftigten bestimmter Industriesparten erklären [Bogdanffy et al., 1997; Feron et al., 2001; Götte und Hörmann, 2004]. Unter anderem sind Arbeiten in der Landwirtschaft, der Nahrungsmittelkonservierenden Industrie und der Verarbeitung von Chrom, Nickel, polyzyklischen Kohlenwasserstoffen und anderen organischen Chemikalien mit einem erhöhten Risiko für Plattenepithelkarzinome assoziiert [Cody und Lawrence, 1999; Götte und Hörmann, 2004]. Nach zehn- bis zwanzigjähriger Nickelexposition ist es gegenüber der Normalbevölkerung um das 870fache erhöht [Pedersen et al., 1973]. Auch das Zigarettenrauchen ist mit einem zwei- bis dreifach erhöhten Krebsrisiko assoziiert [Götte und Hörmann, 2004; Galati, 2005].

Eine zentrale Rolle bei der direkten Wirkung inhalierter Stoffe spielt die Kapazität nasalen Epithels zur Metabolisierung zahlreicher Fremdstoffe. Dazu zählen Medikamente, Lösungsmittel, Karzinogene, Pestizide und Pheromone [Brittebo, 1993]. Als Korrelat dieser Stoffwechselaktivität konnte bereits eine große Anzahl Xenobiotika-metabolisierender Enzyme des Phase-I- und Phase-II-Systems in nasaler Mukosa nachgewiesen werden. Im Bereich der Nasenmuscheln sind die relevanten Enzyme in den zilienträgenden Zellen des respiratorischen Epithels und den prismatischen Zellen des Übergangsepithels nachweisbar, in Plattenepithelzellen und Becherzellen dagegen nicht [Brittebo, 1997; Thornton-Manning und Dahl, 1997]. Die biologische Aufgabe dieser Biotransformationskapazität liegt vermutlich zum einen in der Schärfung des Geruchssinns, da eine Akkumulation flüchtiger Geruchsstoffe im Bereich des olfaktorischen Epithels durch die Überführung in hydrophilere Metabolite vermieden wird [Brittebo, 1993; Thornton-Manning und Dahl, 1997]. Weil die relevanten Enzyme in der Mukosa des gesamten Respirationstrakts vorkommen, ist zum anderen die Existenz eines lokalen Entgiftungssystems für inhalede Stoffe zum Schutz des Organismus anzunehmen. Im Rahmen dieser Biotransformationsprozesse kommt es allerdings auch zur metabolischen Aktivierung von Stoffen mit daraus resultierender lokaler toxischer Wirkung [Brittebo, 1997].

Seit etwa zehn Jahren werden auch die zytogenetischen Veränderungen in den Malignomen untersucht. Dabei konnten in nahezu allen Untersuchungen komplexe karyotypische Veränderungen mit zahlreichen chromosomalen Veränderungen nachgewiesen werden [Götte und Hörmann, 2004]. In der Untersuchung molekulargenetischer Veränderungen zeigten sich heterozygote Deletionen, Mutationen und eine veränderte Proteinexpression von Onkogenen wie k-ras und c-erbB2 und Tumorsuppressorgenen wie p53. Die eindeutige Assoziation einer speziellen molekulargenetischen Veränderung mit dem Auftreten sinonasaler Karzinome konnte jedoch noch nicht herausgearbeitet werden [Götte und Hörmann, 2004].

Insgesamt entstammen etwa 55 % der sinonasalen Tumoren den Kieferhöhlen, 35 % der Nasenhaupthöhle, 9 % den Siebbeinzellen und 1 % den Stirn- und Keilbeinhöhlen sowie dem Nasenseptum. Die 5-Jahres-Überlebensrate für Patienten, die an einem sinonasalen Karzinom leiden, beträgt 50 % [Cody und Lawrence, 1999]. Plattenepithelkarzinome bilden mit knapp 80 % den größten Teil aller histologischen Subtypen, sie entspringen meistens der lateralen Nasenwand. Adenokarzinome und adenoidzystische Karzinome liegen in je etwa 10 % der Fälle vor, sie sind häufiger in der oberen Nasenhöhle und den Siebbeinhöhlen zu finden. Zahlreiche andere Tumoren komplettieren die Liste in kleinen Prozentzahlen [Cody und Lawrence, 1999; Shah et al., 1999].

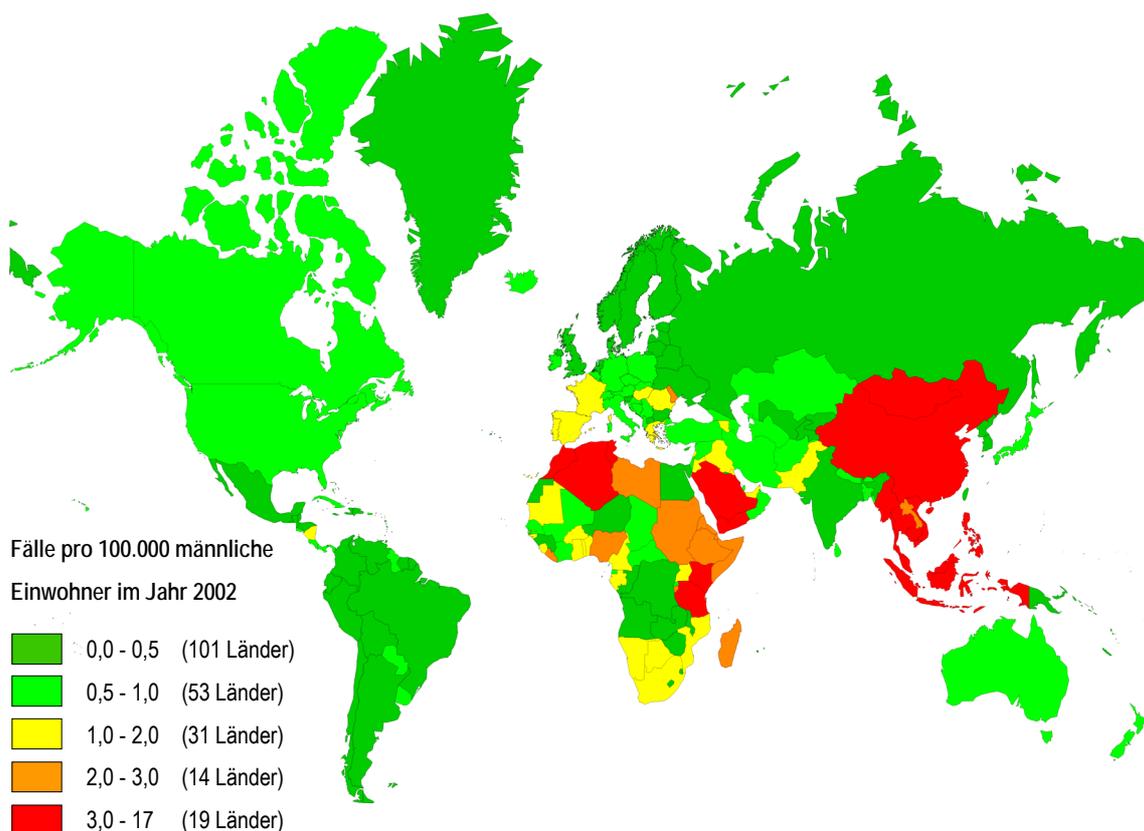


Abbildung 1-2 Überblick über geographische Unterschiede in der Inzidenz von Nasopharynxkarzinomen nach altersstandardisierten Daten des Globocan-2002-Reports der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) der Weltgesundheitsorganisation WHO. Eine Altersstandardisierung ist erforderlich, um eine Vergleichbarkeit der Daten unabhängig von der Altersstruktur der gegenübergestellten Staaten zu gewährleisten. Die angegebenen Inzidenzen beziehen sich jeweils auf eine hypothetische Population von 100.000 Männern mit einer normierten Altersverteilung (Weltstandardpopulation) im Jahr 2002.

1.1.2.2 Nasopharynx

Nasopharynxkarzinome sind in westlichen Ländern relativ selten. Ihre Inzidenz liegt bei 0,2 bis 1,0 Fällen pro 100.000 Einwohner und Jahr. Wie in Abbildung 1-2 dargestellt, ist im Gegensatz dazu die Inzidenz in südostasiatischen Ländern wie China, Hongkong, Singapur, Malaysia und Taiwan weit höher. Sie wird mit Werten zwischen 10 und 53 Fällen pro 100.000 Einwohner angegeben. In Alaska und Grönland ist die Inzidenz bei der Bevölkerungsgruppe der Eskimos mit 15 bis 20 Fällen pro 100.000 Einwohner ebenfalls erhöht [Ferlay et al., 2004; Lin et al., 2005].

Die Ätiologie der Nasopharynxkarzinome ist noch nicht vollständig geklärt. Als entscheidend gilt das Zusammenspiel von genetischer Suszeptibilität und Umweltfaktoren. Hinweis auf eine genetische Komponente ist beispielsweise die Assoziation von Malignomen mit den Genotypen HLA-A2 und HLA-Bsin2. Diese liegen bei Menschen aus Südchina deutlich häufiger vor als bei Kaukasiern.

Möglicherweise beteiligte Umwelt- und Kulturfaktoren werden im Verzehr gesalzener Fische und konservierter Lebensmittel gesehen, die reich an karzinogenen Nitrosaminen sind. Außerdem scheint die Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus zu frühen Transformationsvorgängen beizutragen, wie der Nachweis von Epstein-Barr-Virus-DNS (Desoxyribonukleinsäure) in nahezu allen Nasopharynxkarzinomen nahe legt [Lin et al., 2005].

Das Zusammenspiel genetischer und umweltbedingter Faktoren zeigt sich auch in der Beobachtung der Inzidenz von Nasopharynxkarzinomen bei in den USA geborenen Kindern chinesischer Einwanderer. Bei diesen Personen liegt die Erkrankungshäufigkeit zwar unter der einer chinesischen Vergleichspopulation, aber noch immer höher als bei der kaukasischen Bevölkerung in den USA [Lin et al., 2005]. Histologisch finden sich in 70 % der Fälle undifferenzierte, lymphoepitheliale Karzinome. In 20 % der Fälle liegen nicht-verhornende Plattenepithelkarzinome vor, die übrigen 10 % bilden verhornende Plattenepithelkarzinome.

1.1.3 Modell der Miniorgankulturen zur Untersuchung genotoxischer Umwelteinflüsse auf humane nasale Schleimhaut

Zur Untersuchung der Wirkung verschiedener Umweltstoffe auf die Erbinformation nasaler Schleimhautzellen wurden Miniorgankulturen eingesetzt. Diese Form der Gewebekultivierung basiert auf einer Arbeit von Steinsvåg und Mitarbeitern, die erstmals die Anzucht von Epithel der Atemwege auf seiner nativen Basalmembran einschließlich tiefer liegender Stromaanteile beschreibt [Steinsvåg et al., 1991]. Die Autoren verwendeten zur Anlage der Kulturen Untersuchungsmaterial, das bei Adenotomien von Kindern gewonnenen worden war. Die kubischen Bindegewebsfragmente dieses adenoiden Gewebes hatten keinen Kontakt zum umgebenden Trägermaterial, sondern schwammen frei in einer Nährlösung. Innerhalb von fünf Tagen bildeten sich sphäroide Miniorgane, die anfangs von flachen Epithelzellen, später von respiratorischem Epithel bedeckt waren. In mikroskopischen Untersuchungen ließen sich Becherzellen und Inseln von Zellen, die mit motilen Zilien besetzt waren, erkennen. Das Innere der Fragmente bestand initial aus lymphoidem Gewebe. Im Verlauf der Kultivierung wurde es durch Kollagen und verstreut liegende Fibroblasten ersetzt. Das Epithel der Miniorgane blieb über einen Beobachtungszeitraum von 40 Tagen morphologisch intakt und vital [Steinsvåg et al., 1991].

Für die vorliegende Arbeit wurde diese Art der Kultivierung auf das Gewebe menschlicher Nasenschleimhäute entsprechend einer von Kleinsasser und Mitarbeitern beschriebenen Methode übertragen [Kleinsasser et al., 2001; Kleinsasser et al., 2004a]. Die Modifikationen bestehen in zusätzlichen Waschschritten vor dem Anlegen der Kultur und der Verwendung eines speziellen Kulturmediums für respiratorisches Epithel. Außerdem werden einige Nährstoffe und Zusätze nicht dem Medium beigelegt, sondern der Agarose, mit der die Böden der Kulturplatten beschichtet sind. Abbildung 1-3 zeigt das inversmikroskopische Bild eines Miniorgans an Tag 5 der Kultivierung.

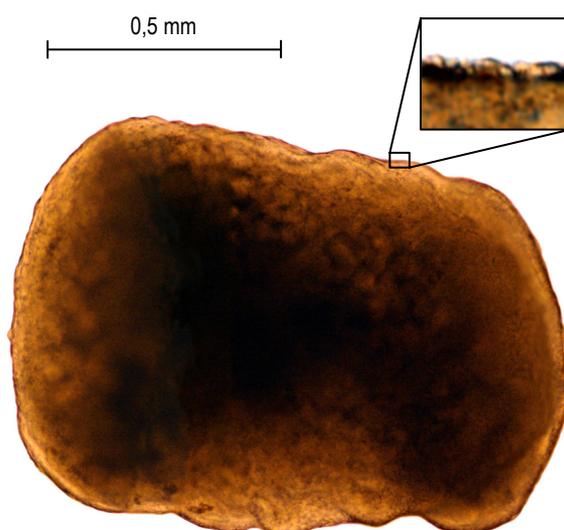


Abbildung 1-3 Inversmikroskopisches Bild eines Miniorgans an Tag 5 der Kultivierung (aufgenommen mit 40facher bzw. 100facher Vergrößerung).

Das Bindegewebsfragment ist abgerundet und vollständig epithelisiert. Bei stärkerer Vergrößerung sind auf der Oberfläche die metachronal-wellenförmig schlagenden Zilien des respiratorischen Epithels zu erkennen.

1.2 Verwendete Substanzen mit genotoxischem Schädigungspotenzial

1.2.1 Natriumdichromat

1.2.1.1 Stoffcharakteristika

Chrom ist ein natürlich vorkommendes Element, das in verschiedenen Oxidationsstufen existieren kann. In der Umwelt treten aufgrund ihrer chemischen Stabilität ausschließlich trivalente und hexavalente Cr(III)- und Cr(VI)-Derivate auf [Minister of Supply and Services Canada, 1994]. Cr(III)-Salze sind in Erzen, oberflächlichem Gestein und Böden natürlicherweise in erheblichen Mengen eingelagert. Sie sind in der Regel schlecht wasserlöslich und bilden schnell chemisch inerte Präzipitate. Im Gegensatz dazu werden Cr(VI)-Verbindungen in der Umwelt zum überwiegenden Teil durch den Menschen freigesetzt. Sie sind wirksame Oxidanzien und meist gut wasserlöslich [ATSDR, 2000a]. In den Versuchen der vorliegenden Arbeit wird Natriumdichromat als Vertreter dieser Stoffgruppe eingesetzt.

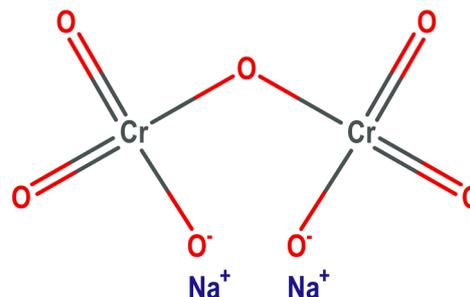


Abbildung 1-4 Chemische Struktur von Natriumdichromat ($\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$, CAS-Nr. 10588-01-9).

1.2.1.2 Expositionsquellen für den Menschen

Chrom wird seit mehr als einem Jahrhundert industriell genutzt, sein Auftreten ist in vielen Umweltbereichen durch den Menschen verursacht. Allein im Jahr 1995 wurden in Großbritannien 60 Tonnen Chrom in Form von Cr(III)- und Cr(VI)-Verbindungen in die Atmosphäre freigesetzt [IARC, 1997; Rowbotham et al., 2000]. Die Cr(III)-Emission beruht vor allem auf der Verbrennung fossiler Brennstoffe, der Verhüttung von Erzen und der Herstellung und Bearbeitung von Chromlegierungen und Stahl. Der Ausstoß von Cr(VI)-Derivaten ist vor allem auf die Chromverarbeitung sowie die Produktion und Verwendung von Chrom in der chemischen Industrie zurückzuführen. Natriumdichromat wird hauptsächlich in der chemischen Industrie, in der Metallveredelung, in Holzschutzmitteln, Textilien, anorganischen Pigmenten und Bauteilen für Ölbohrungen verwendet [Rowbotham et al., 2000].

Beruflich sind mehrere Millionen Arbeiter Rauch, Nebel und Staub ausgesetzt, die Chrom oder Chromverbindungen enthalten. Der Hauptteil der hierbei absorbierten Chrommenge wird durch Inhalation aufgenommen. In der Vergangenheit wurden in einigen Arbeitsbereichen Cr(VI)-Belastungen der Luft von über 1 mg/m^3 gefunden. Moderne Emissions-Kontrolltechnologien haben in den letzten Jahrzehnten diese Werte merklich reduziert [IARC, 1997]. Hohe Cr(VI)-Belastungen treten aber nach wie vor bei der Arbeit mit Chromstahllegierungen, beim Schweißen von rostfreiem Stahl, bei der Chromatproduktion und der Arbeit mit Chrompigmenten auf. In diesen Industriebereichen wurden in nordamerikanischen Betrieben Cr(VI)-Konzentrationen zwischen 10 und $600 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ Luft erreicht [National Toxicology Program, 2004a]. In der Umgebungsluft städtischer und ländlicher Gebiete in Großbritannien wurden dagegen nur Gesamtchromkonzentrationen von 0,9 bis $17,2 \text{ ng/m}^3$ Luft gemessen [National Toxicology Program, 2004a].

Für die Gesamtbevölkerung spielt damit die Inhalation von Chrom nur eine geringe Rolle. Die Hauptquelle bilden hier Cr(III)-Salze, die in der Nahrung und in geringerem Maße im Trinkwasser vorkommen. Messungen in Großbritannien ergaben, dass 99 % der 246 bis 344 µg Chrom, die jeder Erwachsene pro Tag aufnimmt, aus der Nahrung stammen. Auch über Hautkontakt werden wohl nur vernachlässigbar geringe Chrommengen aufgenommen, da in Konsumprodukten zum allergrößten Teil kaum resorbierbare Cr(III)-Verbindungen vorliegen [Rowbotham et al., 2000].

1.2.2 N-Nitrosodiethylamin

1.2.2.1 Stoffcharakteristika

N-Nitrosodiethylamin (NDEA) gehört zur Gruppe der *N*-Nitroso-Verbindungen. Mit einem Siedepunkt von 176,9 °C liegt es bei einer Temperatur von 20 °C aufgrund des Sättigungsdampfdrucks von 0,86 mmHg als gelbliche Flüssigkeit vor. Seine molare Molekülmasse beträgt 102,14 g/mol. NDEA ist löslich in Wasser, Ethanol, Diethylether und organischen Lösungsmitteln [Verna et al., 1996; Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz, 2004; National Toxicology Program, 2004c].

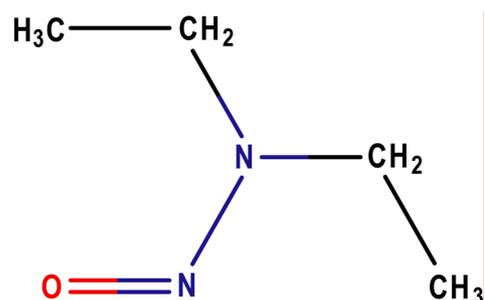


Abbildung 1-5 Chemische Struktur von *N*-Nitrosodiethylamin (C₄H₁₀N₂O, CAS-Nr. 55-18-5).

1.2.2.2 Expositionsquellen für den Menschen

Der menschliche Körper wird über zwei Wege mit *N*-Nitrosaminen belastet: Zum einen werden präformierte *N*-Nitrosamine aus der Umwelt aufgenommen, zum anderen werden sie im Gastrointestinaltrakt durch die Nitrosierung von Aminen gebildet. Nach einer groben Schätzung beträgt diese *in-vivo*-Bildung von *N*-Nitrosaminen 40-75 % der Gesamtbelastung [Vermeer und van Maanen, 2001].

Die exogene Zufuhr von *N*-Nitroso-Verbindungen erfolgt durch Exposition am Arbeitsplatz, Tabakrauchen oder -kauen und durch verschiedene Haushaltsprodukte wie Kosmetika und Shampoos. Abgesehen von den tabakspezifischen Nitrosaminen werden als Hauptquelle jedoch belastete Lebensmittel angenommen. Vertreter der Stoffgruppe sind vor allem in gepökeltem und geräuchertem Fleisch und Fisch, aber auch in Käse, Bier und Whisky zu finden. Die Gesamtmenge exogen zugeführter *N*-Nitrosamine wird in der Größenordnung von 1 µg pro Person und Tag angenommen, wobei die individuelle Belastung stark ernährungsabhängig ist [Verna et al., 1996; Lijinsky, 1999; Vermeer und van Maanen, 2001].

Die berufliche Belastung mit den als krebserzeugend eingestufteten *N*-Nitrosaminen ist in Deutschland durch die Gefahrstoffverordnung gesetzlich begrenzt. Grundsätzlich dürfen Arbeitnehmer karzinogenen *N*-Nitrosaminen nicht ausgesetzt sein. Als Grenzwert gilt dabei die ubiquitäre Luftverunreinigung, die mit einer Konzentration von bis zu 0,1 µg/m³ Luft angenommen wird [Ausschuss für Gefahrstoffe, 1996]. Dieses generelle Expositionsverbot gilt nicht für die Industriebereiche, in denen *N*-Nitrosamine nach heutigem Wissen unvermeidbar während technischer Abläufe entstehen. Davon betroffen sind Arbeitsprozesse in Gießereien, die Verwendung von Kühlschmierstoffen in der Eisen- und Stahlindustrie, Vulkanisationsprozesse und die Produkt-

lagerung in der Gummiindustrie sowie die chemische und lederverarbeitende Industrie. Als Technische Richtkonzentrationen (TRK) gelten hier $1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ bzw. $2,5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ in besonderen Arbeitsbereichen. Der Arbeitgeber ist verpflichtet zu prüfen, ob Austauschstoffe mit einem geringeren gesundheitlichen Risiko verfügbar sind [Ausschuss für Gefahrstoffe, 1996]. Insgesamt hat in Deutschland die Nitrosaminproblematik durch ein angepasstes Regelwerk und Anstrengungen von Wissenschaft, Industrie und Aufsichtsbehörden in den vergangenen Jahren an Brisanz verloren. Die Zahl der betroffenen Arbeitsplätze ist zurückgegangen und bei den verbliebenen Arbeitsplätzen hat sich die Höhe der Nitrosaminbelastung verringert [Breuer und van Gelder, 2001].

1.2.3 *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin

1.2.3.1 Stoffcharakteristika

Das Nitrosamid *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) ist ein blass-gelbes kristallines Pulver, das grün oder orange werden kann, wenn es dem Licht ausgesetzt wird. MNNG ist in polaren organischen Lösungsmitteln löslich. Es zersetzt sich bei Temperaturen von $118\text{-}124^\circ\text{C}$. MNNG ist empfindlich gegenüber Hitze, Licht und Feuchtigkeit [National Toxicology Program, 2004b].

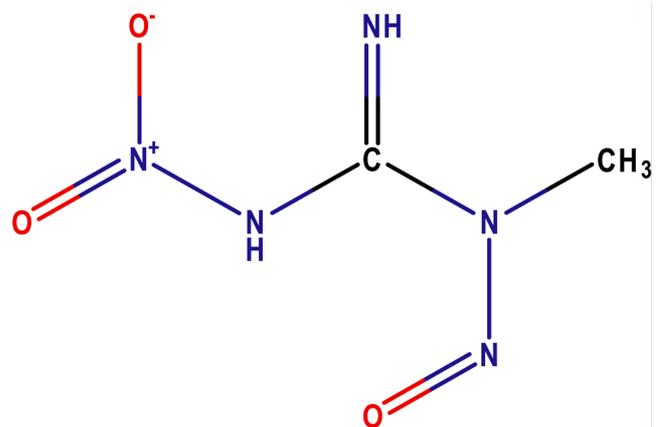


Abbildung 1-6 Chemische Struktur von *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin ($\text{C}_2\text{H}_5\text{N}_5\text{O}_3$, CAS-Nr. 70-25-7).

1.2.3.2 Expositionsquellen für den Menschen

Die Anwendung von MNNG beschränkt sich gegenwärtig auf den Einsatz als experimentelles Mutagen, Teratogen und Karzinogen in der medizinischen und biologischen Forschung. Eine potenzielle Exposition betrifft daher nur Personen, die als Forschungs- oder Reinigungspersonal in entsprechenden Laboratorien arbeiten [National Toxicology Program, 2004b].

1.3 Nachweis von DNS-Schäden mit dem Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay

1.3.1 Funktionsprinzip der Technik

Die Exposition von Zellen gegenüber Mutagenen resultiert in chemischen Modifikationen der DNS, die entweder irreversibel sind oder von spezialisierten nukleären Reparatursystemen behoben werden können. Bei einem Teil der überlebenden Zellen bleiben durch eine Störung der DNS-Replikation Mutationen zurück [Slamenova et al., 1997].

Die quantitative Erfassung von DNS-Schäden auf der Ebene von Einzelzellen gelang erstmals

Rydberg und Johanson [Rydberg und Johanson, 1978]. Die angewendete Methode basierte auf dem Nachweis von DNS-Strangbrüchen, die durch eine Vielzahl verschiedener Reaktionen induziert werden können [Slamenova et al., 1997]. Um die Sensitivität der Methode zu erhöhen, entwickelten Ostling und Johanson eine Mikrogel-Elektrophoresetechnik, die später unter dem Namen *Comet Assay* bekannt wurde [Ostling und Johanson, 1984]. In der ursprünglich beschriebenen Technik werden die Zellen zuerst auf Objektträgern in Agarose eingebettet. Daraufhin werden ihre Membranstrukturen durch Detergenzien und hohe Salzkonzentrationen lysiert [Rojas et al., 1999]. Die so freigelegten DNS-Doppelstränge werden unter leicht alkalischen Bedingungen denaturiert und einem elektrischen Feld ausgesetzt. In Zellen mit einer erhöhten Frequenz an DNS-Doppelstrangbrüchen kommt es zu einer Entspiralisierung der DNS-Schleifen und durch die größere Beweglichkeit zu einer DNS-Migration in Richtung der Anode [Klaude et al., 1996]. Nach Anfärbung der DNS mit Ethidiumbromid bietet sich im

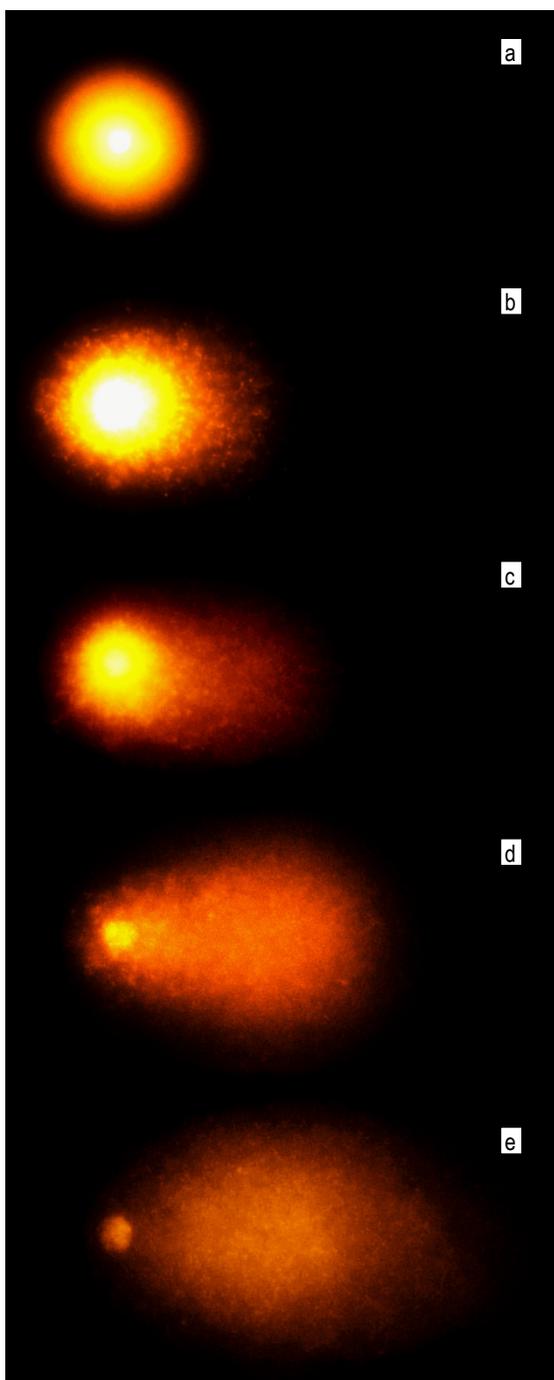


Abbildung 1-7: Fluoreszenzmikroskopische Bilder von Zellkernen verschiedenen genetischen Fragmentierungsgrades (aufgenommen mit 1.000facher Vergrößerung).

Bild a: Kometenkopf ohne Schweif entsprechend einem Zellkern mit weitgehend intakter DNS.

Bilder b-e: Mit zunehmender DNS-Fragmentierung steigt die relative Fluoreszenzintensität und die Länge des Schweifes.

Fluoreszenzmikroskop bei geschädigten Zellen das Bild eines Kometen. Wie in Abbildung 1-7 dargestellt, bildet dabei der Zellkern den Kopf und die aus dem Kern gewanderten DNS-Schleifen den Schweif. Die Einführung der alkalischen Mikrogelelektrophorese durch Singh und Mitarbeiter bedeutete eine weitere Erhöhung der Sensitivität für genotoxische Effekte [Singh et al., 1988]. Da in dem stark alkalischen Milieu mit einem pH-Wert über 13 die DNS vollständig denaturiert und entspiralisiert vorliegt, werden neben Doppelstrangbrüchen weitere DNS-Schäden erfasst [Kohn, 1991; Tice et al., 2000]. Dazu zählen Einzelstrangbrüche durch Radikale, interkalierende Substanzen oder alkalilabile DNS-Addukte. Vor allem aber werden DNS-Strangbrüche erfasst, die als Resultat einer metabolischen Beteiligung der Zellen auftreten, beispielsweise der Basen- und Nukleotidexzisionsreparatur oder der enzymatischen Aktivität von Endonukleasen, Topoisomerasen und DNS-Hydrolasen [Slamenova et al., 1997]. Anders als in der neutralen Version des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assays besteht der Schweif dabei nicht aus DNS-Schleifen, die im Zellkern fixiert sind. Er wird vielmehr von freien, einzelsträngigen DNS-Fragmenten unterschiedlicher Größe gebildet, die im elektrischen Feld aus dem Zellkern wandern [Klaude et al., 1996].

Der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay (EMGE-Assay) gilt als einfacher, schneller und sensitiver Test zur Detektion genotoxischer Schäden. Er erlaubt die Quantifizierung von DNS-Schäden auf der Ebene einzelner Zellen und ist bei praktisch allen eukaryotischen Zellen anwendbar [Speit et al., 1996; Slamenova et al., 1997; Rundell et al., 2003]. Seit seiner Einführung ist der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay einer Vielzahl von Anwendungen angepasst worden. Als relativ einfache Methode findet er Anwendung in Genotoxizitätsstudien [Tice et al., 2000; Kleinsasser et al., 2001; Sasaki et al., 2002] und DNS-Reparatur-Untersuchungen [Spanswick et al., 2002; Harréus et al., 2002]. Er wird aber auch in klinischen Anwendungen und zur Überwachung von Giftstoffen in ökologischen Systemen oder an Arbeitsplätzen eingesetzt [Djuzenova et al., 1999; Undeger und Basaran, 2002]. Veränderungen der Technik betreffen in der Regel die Zusammensetzung und den pH-Wert von Lyselösung und Elektrophoresepuffer sowie die technischen Variablen der Elektrophorese, also Spannung, Stromstärke, Entwindungs- und Laufzeit [Rojas et al., 1999]. Die von Singh und Mitarbeitern beschriebene Technik gilt heute als Methode der Wahl, wenn mit dem Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay Genotoxizitätsstudien durchgeführt werden sollen [Singh et al., 1988; Tice et al., 2000].

1.3.2 Quantifizierung genotoxischer Effekte mit dem *Olive Tail Moment*

Zur Abschätzung des Ausmaßes der DNS-Fragmentierung können verschiedene Parameter herangezogen werden. Neben der Angabe von Schweiflänge und prozentualem DNS-Anteil im Schweif gilt das in dieser Arbeit verwendete *Olive Tail Moment* (OTM) als etabliertes Maß für den Grad der DNS-Schädigung [Hartmann et al., 2003]. Das *Olive Tail Moment* wurde 1990 von Olive und Mitarbeitern vorgestellt [Olive et al., 1990; Tice et al., 2000]. Es errechnet sich als Produkt aus der relativen DNS-Menge im Schweif und der Schweiflänge. Bei einem niedrigen OTM ist damit ein niedriger, bei einem hohen OTM ein hoher Fragmentierungsgrad der DNS anzunehmen. Das OTM wird in der Regel dimensionslos angegeben.

1.4 Nachweis apoptotischer Vorgänge mit dem Annexin-V-Affinitätstest

Bei der experimentellen Untersuchung genotoxischer Effekte mit dem Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay kann eine Erhöhung der Apoptoserate zu einer Erhöhung der gemessenen DNS-Fragmentierung führen. Um direkte Auswirkungen von Fremdstoffen auf das Erbgut korrekt zu erfassen, ist also neben dem Nachweis der Vitalität der Zellen die Quantifizierung apoptotischer Abbauvorgänge notwendig.

1.4.1 Biologischer Hintergrund

1.4.1.1 Aufgaben der Apoptose

Die Apoptose ist eine kontrollierte Form des Zelluntergangs im Körper. Sie stellt einen essenziellen physiologischen Prozess dar, der eine wichtige Rolle bei der Kontrolle der Zellzahl während der Entwicklung und während des Lebens eines Organismus spielt [Zimmermann et al., 2001]. Als Beispiele seien der morphogenetische Zelltod während der Embryogenese, die Zerstörung autoreaktiver T-Zellen während der T-Zell-Selektion und die Beteiligung an der normalen Gewebeerneuerung genannt. Durch die Elimination geschädigter Zellen sorgt der apoptotische Zellabbau für die Entfernung infizierter, genetisch veränderter oder beschädigter Zellen [Sgonc und Gruber, 1998; Gupta, 2001]. Wenn in diesem Prozess eine Fehlregulation auftritt, können transformierte und geschädigte Zellen überleben und durch klonale Expansion die Entwicklung von Malignomen verursachen [Wesierska-Gadek et al., 2003].

1.4.1.2 Ablauf der Apoptose

Im kontrollierten Ablauf des apoptotischen Zelluntergangs nimmt die Enzymfamilie der Caspasen einen zentralen Platz ein. Bei diesen handelt es sich um Proteasen, die als inaktive Vorstufen gebildet werden und sich durch die Spaltung spezifischer Peptidbindungen gegenseitig aktivieren [Saraste und Pulkki, 2000; Chen et al., 2001].

Das Startsignal für diese Enzymkaskade kann durch äußere oder innere Einflüsse erfolgen. Im Falle des extrinsischen Weges wird Caspase 8 durch Rezeptoren aus der Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor-Gen-Superfamilie (TNFR) in der Zellmembran aktiviert [Gupta, 2001]. Am Beginn des intrinsischen Weges steht dagegen die Aktivierung von Caspase 9, die durch die Integration verschiedener proapoptotischer Signale ausgelöst wird. Zu den relevanten Faktoren zählen zytotoxische Stoffe, reaktive Stressmoleküle und die Aktivität nukleärer Transkriptionsfaktoren. Überwiegen die proapoptotischen Einflüsse, kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen Caspase-aktivierenden Faktoren aus den Mitochondrien und zur Aktivierung von Caspase 9 [Saraste und Pulkki, 2000; Gupta, 2001; Zimmermann et al., 2001]. Alle Wege der Apoptoseinduktion münden schließlich in der kaskadenartigen Aktivierung von Caspase 3 und weiteren Effektor-Caspasen, die die Exekutionsphase steuern [Chen et al., 2001; Zimmermann et al., 2001]. In dieser Phase erfolgt die Spaltung nukleärer und zytoplasmatischer Proteine, die für die Aufrechterhaltung der zellulären Integrität, der Progression des Zellzyklus und die DNS-Reparatur verantwortlich sind [Gupta, 2001]. Die DNS wird durch Endonukleasen fragmentiert [Zimmermann et al., 2001]. Der Beginn dieses Abbaus ist bereits 15 min nach dem Start der

Apoptosekaskade nachweisbar, innerhalb einer Stunden ist die DNS hochgradig fragmentiert [Bacso et al., 2000]. In der Endphase kommt es zur Desintegration der Zelle, die durch distinkte morphologische Merkmale gekennzeichnet ist. Zu diesen Merkmalen zählt eine zytoplasmatische Kontraktion, der Verlust des Zellkontakts mit der Matrix und eine Blasenbildung der Zellmembran. Diese Veränderungen sind innerhalb der ersten zwei Stunden erkennbar [Saraste und Pulkki, 2000; Gupta, 2001]. Im Rahmen der kontrollierten Zellfragmentierung werden keine intrazellulären Bestandteile freigesetzt, die eine lokale Entzündungsreaktion durch Zytokine auslösen könnten. Stattdessen werden die abgeschnürten Zellreste durch spezialisierte Phagozyten und Nachbarzellen abgeräumt [Hale et al., 1996; Saraste und Pulkki, 2000]. *In vivo* dauert der gesamte Vorgang des apoptotischen Zelluntergangs zwischen 6 und 24 Stunden [Saraste und Pulkki, 2000; Gupta, 2001].

1.4.1.3 Membranveränderungen während der Apoptose

Der apoptotische Zelltod wird auch von Veränderungen der Plasmamembran begleitet, die eine experimentelle Differenzierung vitaler von apoptotischen Zellen erlauben. Lebensfähige Zellen besitzen eine asymmetrische Verteilung verschiedener Phospholipide zwischen innerer und äußerer Membranseite [Bretscher, 1972]. Diese Verteilung wird aktiv durch Membranproteine aufrechterhalten, die die Translokation spezifischer Lipidmoleküle erleichtern [Higgins, 1994; Diaz und Schroit, 1996]. Zu diesen Lipidmolekülen zählt auch das Aminophospholipid Phosphatidylserin, das sich in lebensfähigen Zellen ausschließlich auf der Innenseite der Membran befindet.

Im Rahmen einer frühen Phase der Apoptose kommt es zu einer kontrollierten Translokation von Phosphatidylserin von der Innen- auf die Außenseite der Membran. Die Membranintegrität bleibt dabei unbeeinträchtigt [van Engeland et al., 1998]. Der physiologische Sinn dieser Translokation

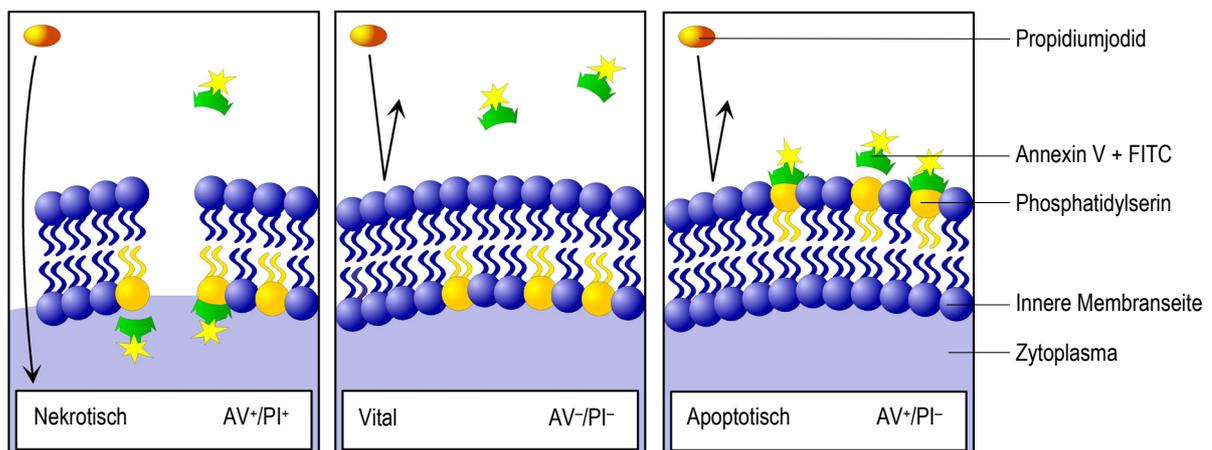


Abbildung 1-8: Prinzip des Annexin-V-Affinitätstests und Färbeverhalten bei vitalen, apoptotischen und nekrotischen Zellen.

Links: Bei einer nekrotischen Zelle kann Annexin V durch Membrandefekte in die Zelle eindringen. Obwohl Phosphatidylserin nur auf der Membraninnenseite vorliegt, kann eine Bindung stattfinden (AV⁺). Die Gegenfärbung mit Propidiumjodid ist ebenfalls positiv (PI⁺).

Mitte: Bei einer vitalen Zelle kann Annexin V nicht in die Zelle gelangen. Da Phosphatidylserin aber nur auf der Membraninnenseite vorliegt, kann keine Bindung stattfinden (AV⁻). Auch die Gegenfärbung mit Propidiumjodid ist negativ (PI⁻).

Rechts: Bei einer apoptotischen Zelle bindet Annexin V an exponiertes Phosphatidylserin auf der Außenseite der Zellmembran (AV⁺). Da die Membranintegrität dabei erhalten bleibt, ist die Gegenfärbung mit Propidiumjodid aber negativ (PI⁻).

liegt in einer Markierung der apoptotischen Zelle, die zur Erkennung und Abräumung durch Makrophagen und Nachbarzellen führt [Fadok et al., 1992]. Die Externalisation von Phosphatidylserin wird als integrierter und universeller Teil des Zellsuizids angesehen, der unabhängig vom Zelltyp und dem Auslöser der Apoptose auftritt [Martin et al., 1995]. Sie ist innerhalb der ersten Stunde nach Beginn der Exekutionsphase nachweisbar und bleibt bis zur Endphase erhalten [Florent et al., 1999; Bacso et al., 2000; Zimmermann et al., 2001].

1.4.2 Funktionsprinzip der Technik

Der Annexin-V-Affinitätstest erlaubt die Detektion von Phosphatidylserin auf der Zelloberfläche und damit die Entdeckung apoptotischer Vorgänge [van Engeland et al., 1998; Sgonc und Gruber, 1998; Bacso et al., 2000]. Erstmals von Koopman und Mitarbeitern vorgestellt, basiert er auf der Bindungsfähigkeit des humanen Proteins Annexin V an negativ geladene Phospholipide [Koopman et al., 1994]. Die höchste Affinität besitzt es dabei für Phosphatidylserin [Andree et al., 1990]. Annexin V kann rekombinant in bakteriellen Systemen hergestellt und mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert werden, das fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar ist. Bei der Färbung mit Annexin V wird in der Regel mit dem DNS-bindenden Propidiumjodid gegengefärbt. Da weder Annexin V noch Propidiumjodid intakte Plasmamembranen durchdringen können, erlaubt diese Doppelfärbung die Unterscheidung vitaler, apoptotischer und nekrotischer Zellen. Abbildung 1-8 zeigt schematisch die Differenzierung der Zellen nach ihrem durchflusszytometrisch oder fluoreszenzmikroskopisch erfassten Färbeverhalten [Koopman et al., 1994].

1.5 Nachweis von Cytochrom P450 2A6 mit dem Durchflusszytometer

1.5.1 Funktionsprinzip eines Durchflusszytometers

Die Durchflusszytometrie kann definiert werden als Technik der Messung und Analyse von Streulicht- und Fluoreszenzsignalen, die erzeugt werden, wenn Partikel in einem Flüssigkeitsstrom durch einen Lichtstrahl fließen [Givan, 1992b]. Sie erlaubt die quantitative und multiparametrische Erfassung physikalischer und chemischer Eigenschaften einzelner Zellen einer Zellsuspension [Weaver, 2000]. Abbildung 1-9 zeigt die wichtigsten Bauteile eines Durchflusszytometers. Im Folgenden wird ihre Funktion kurz dargestellt.

1.5.1.1 Flüssigkeitssystem

Das Flüssigkeitssystem eines Zytometers besteht aus zwei Leitungssystemen: Über eine Zuleitung strömt kontinuierlich Hüllflüssigkeit in laminarem Fluss durch eine Messkammer. In das Zentrum dieses Stroms wird über eine Kapillare aus dem Probenröhrchen die Zellsuspension gepresst. Unmittelbar nach dem Verlassen der Kapillare erfasst der Strom der Hüllflüssigkeit die Zellsuspension. Dadurch wird ein coaxialer Fluss erzeugt, in dessen zentralem Strahl die Zellen einander folgen. So passiert jede Zelle einzeln den Messpunkt, an dem der fokussierte Lichtstrahl auf den Flüssigkeitsstrahl trifft [Raffael et al., 1994].

1.5.1.2 Optisches System

Das optische System besteht aus einem Anregungs- und einen Detektionsteil: Der Anregungsteil arbeitet meistens mit einem 488-nm-Argon-Laser als Lichtquelle. In der Messkammer kreuzt dieser gebündelte und ausgerichtete Laserstrahl rechtwinklig den Flüssigkeitsstrom. Trifft er dabei auf einen Partikel, so wird er einerseits gestreut und regt andererseits Farbstoffmoleküle zur Fluoreszenz an [Radcliff und Jaroszeski, 1998; Hahn, 2000].

Nach dem Passieren des Messpunkts bündeln im Detektionsteil zwei Linsensysteme das Licht, das den Flüssigkeitsstrom passiert hat: Das erste Linsensystem lenkt das Licht auf eine Photodiode in der Lichtstrahlachse. Sie misst Licht der Wellenlänge des ausgesandten Laserstrahls. Die Photodiode ist dabei so angeordnet, dass sie nur ein Signal registrieren kann, wenn das Licht durch die Passage eines Partikels im Flüssigkeitsstrom um einen kleinen Winkel gebeugt worden ist. Der gemessene Parameter wird als Vorwärtsstreulicht (*Front Scatter*, FSC) bezeichnet. Seine Größe hängt hauptsächlich von der Querschnittsfläche und damit dem Volumen des Partikels ab [Radcliff und Jaroszeski, 1998; Hahn, 2000].

Das zweite Linsensystem steht rechtwinklig zur Ausbreitungsrichtung des Laserstrahls und wird von einer Reihe doppelbrechender Spiegel gefolgt. Diese separieren das Farbgemisch, das durch Streuung und Fluoreszenz entstanden ist, in definierte Spektralbereiche und lenken es auf Lichtverstärkungsrohren. Einer dieser Photodetektoren misst Licht der gleichen Farbe wie der ausgesandte Lichtstrahl. Er erfasst so jede Streuung des Laserstrahls um 90° zur Seite, die ein Partikel im Strom erzeugt. Man spricht von Seitwärtsstreulicht (*Side Scatter*, SSC). Die Intensität dieser Streuung zur Seite liefert Informationen über die Granuliertheit, die Membranfaltung und die

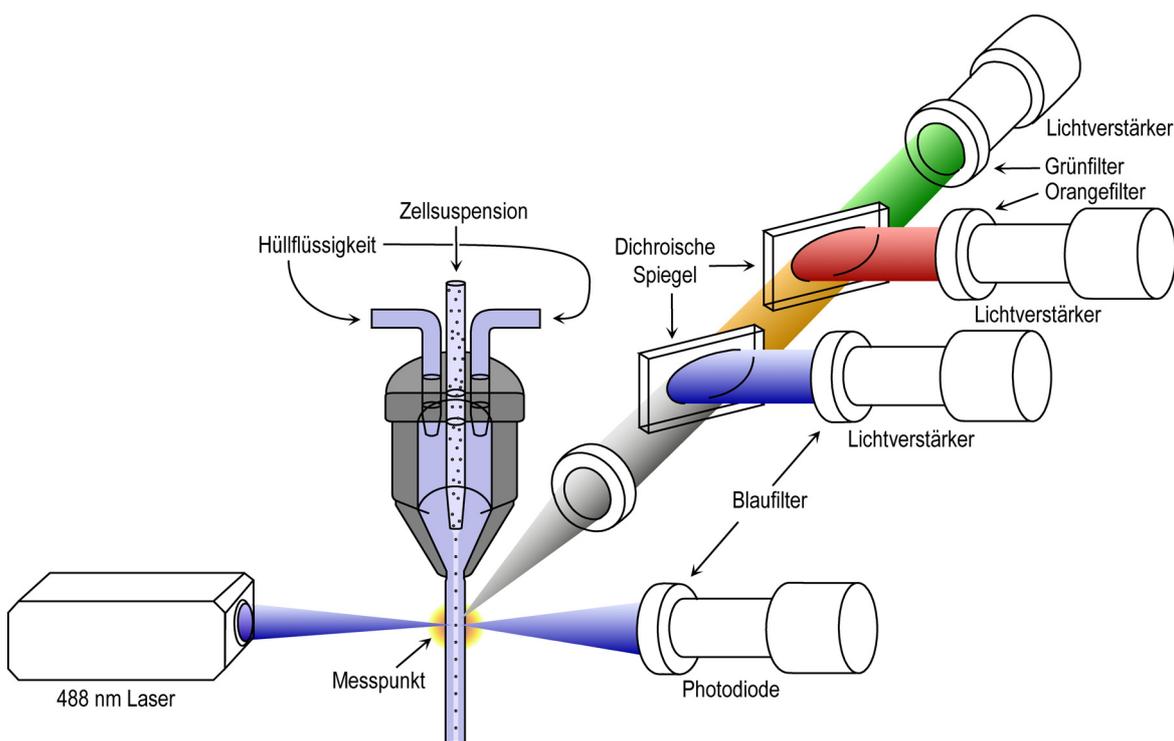


Abbildung 1-9 Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers.

äußere Form der Zellen [Raffael et al., 1994]. Die übrigen im rechten Winkel zum Lichtstrahl angeordneten Detektoren besitzen Filter für oranges, grünes oder rotes Licht. Sie können nur ein Signal erfassen, wenn der Partikel, angeregt durch den blauen Laserstrahl, selbst Licht der entsprechenden Farbe emittiert. Dies ist entweder der Fall, wenn er endogene fluoreszierende Komponenten enthält, oder aber, wenn er exogen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert worden ist [Givan, 1992b]. Die Fluoreszenz-Intensität jedes Partikels ist proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge [Hahn, 2000].

1.5.1.3 Signalverarbeitung und -speicherung

Photonen, die auf die Photokathode des Detektors treffen, erzeugen Elektronen und damit einen elektrischen Stromfluss. Dieser Impuls wird durch nachgeschaltete Verstärker linear oder logarithmisch verstärkt. Bei linearer Verstärkung ist die Ausgangsspannung des Verstärkers der Eingangsspannung direkt proportional. Bei logarithmischer Verstärkung dagegen ist das Ausgangssignal dem Zehnerlogarithmus des Eingangssignals proportional. Dabei werden eine bis vier Zehnerpotenzen abgedeckt [Givan, 1992b; Givan, 2001; Shapiro, 2001].

Die verstärkten Signale werden anschließend durch einen Analog-Digital-Konverter diskreten Kanälen zugeordnet. Jeder dieser 256 (2^8) oder 1.024 (2^{10}) Kanäle repräsentiert einen spezifischen Lichtintensitätsbereich. Verunreinigungen, die eine Messung verfälschen können, lassen sich durch die Definition einer Intensitätsschwelle, die ein Signal überschreiten muss, um als Ereignis registriert zu werden, ausschließen. Ausgehend von 1.024 Kanälen erhält man pro gemessenem Partikel für FSC, SSC und die verschiedenen Fluoreszenzen je eine Zahl zwischen 0 und 1.023. Die Messwerte jedes einzelnen Partikels werden im *Flow-Cytometry-Standard-Format* unkomprimiert gespeichert. Dadurch können bei der nachfolgenden Datenanalyse alle erfassten Parameter miteinander korreliert werden [Givan, 1992b; Givan, 2001; Shapiro, 2001].

1.5.2 Funktionsprinzip der intrazellulären Antigenfärbung

1.5.2.1 Permeabilisierung und Fixierung

Um intrazelluläre Antigene für Antikörper und Antikörperkonjugate zugänglich zu machen, muss die Zellmembran permeabilisiert werden. Der dadurch drohende Verlust löslicher Antigene wird durch die gleichzeitige Fixierung der Bestandteile in Zytoplasma und Zellorganellen verhindert.

Sander und Mitarbeiter stellten 1991 eine Methode zum Nachweis intrazellulären Cytokins vor, die eine Permeabilisierung durch Saponin mit einer Fixierung durch Formaldehyd verband, um intrazelluläre Strukturen zu konservieren [Sander et al., 1991]. Inzwischen gibt es verschiedene kommerzielle Chemikaliensätze, die diese Saponin/Formaldehyd-Prozedur als Permeabilisierungs- und Fixierungstechnik nutzen [Pala et al., 2000]. Wie in Abbildung 1-10 schematisch dargestellt, erzeugt das steroidbasierte Detergens Saponin, wahrscheinlich durch die Bindung an Cholesterinmoleküle, porenähnliche Strukturen in der Zellmembran [Bomford et al., 1992]. Dabei bleiben die Antigene der Zelloberfläche und des Zytoplasmas und die Zellmorphologie, also FSC- und SSC-Charakteristika, erhalten [Lecoeur et al., 1998]. Formaldehyd wirkt quervernetzend, wodurch intrazelluläre Antigene verankert und stabilisiert werden. Der Antigen-Verlust wird durch die Fixierung auf ein Minimum reduziert [Koester und Bolton, 2000].

1.5.2.2 Antigenfärbung

Zur gezielten Anfärbung von Antigenen werden in der Regel spezifische monoklonale Antikörper verwendet [Herzenberg und De Rosa, 2000]. Bei der direkten Färbemethode sind diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff konjugiert. Ist der primäre, spezifische Antikörper unmarkiert, so muss er durch einen markierten Sekundärantikörper nachgewiesen werden. Diese indirekte Färbemethode ist in Abbildung 1-11 dargestellt. Indirekte und direkte Färbemethode sind mit der Saponin/Formaldehyd-Prozedur kompatibel.

1.5.2.3 Negativkontrollen

Bei Anwendung der indirekten Fluoreszenzfärbung lassen sich verschiedene Negativkontrollen durchführen, um falsch positive Ergebnisse zu erkennen: Der Versuchsablauf der Primärantikörper-Auslasskontrolle übergeht die Zugabe des Primärantikörpers nach dem Fixierungs- und Permeabilisierungsschritt. Dadurch lässt sich eine unspezifische Bindung des Sekundärantikörpers in der Zelle detektieren [Assenmacher et al., 1994]. Die Isotypkontrolle erfasst die Möglichkeit einer unspezifischen Bindung des Primärantikörpers. Dafür wird statt des spezifischen Primärantikörpers ein Kontrollantikörper verwendet. Dieser gleicht dem eingesetzten spezifischen Antikörper in Ursprungstier, Immunglobulin-Klasse und -Subklasse, besitzt aber keine Affinität für Antigene, die in menschlichen Zellen vorkommen [Jung et al., 1993].

1.5.2.4 Antikörpertitration

Unterschiede in der Antigenkonzentration sind nur dann detektierbar, wenn bei der verwendeten Antikörperkonzentration alle für den Antikörper erkennbaren Epitope mit Antikörpermolekülen besetzt sind. Folglich muss eine ausreichend hohe Antikörperkonzentration eingesetzt werden. Mit großem Antikörperüberschuss zu arbeiten, wäre jedoch sehr unökonomisch [Reilly, 1996; Givan, 2000]. Um die optimale Antikörperkonzentration zu bestimmen, werden serielle Verdünnungsreihen mit halbierenden Konzentrationen durchgeführt. Nach der durchflusszytometrischen Messung wird das Ergebnis in zwei Diagrammen dargestellt: Im ersten wird der Median der Fluoreszenzintensität gegen die eingesetzte Antikörperkonzentration aufgetragen. Der resultierende Graph zeigt idealerweise eine Sättigungskinetik. Bei steigender Antikörperkonzentration kommt es zu einer Erhöhung der mittleren Fluoreszenz, da mehr Antigenstellen besetzt werden können. Bei

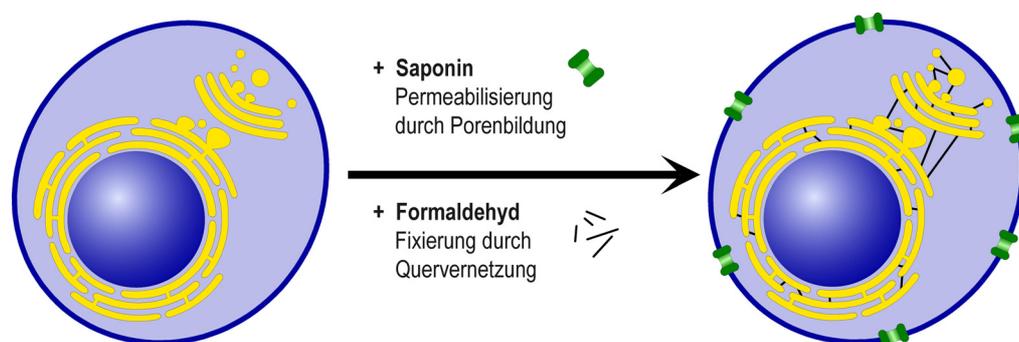


Abbildung 1-10 Funktionsprinzip der Zellfixierung und -permeabilisierung durch Formaldehyd und Saponin.

spezifischer Bindung der Antikörper flacht die Kurve jedoch aufgrund der begrenzten Anzahl der Antikörperbindungsstellen zunehmend ab und nähert sich asymptotisch einem Maximum an. Ein Ausbleiben dieser Plateaubildung spricht für eine unspezifische Akkumulation der Antikörper in der Zelle [Reilly, 1996]. Im zweiten Diagramm wird der Prozentsatz der Zellen, die nach dem Setzen einer Markierung in der Negativkontrolle als positiv anzusehen sind, gegen die jeweilige Antikörperkonzentration aufgetragen. Auch diese Kurve sollte sich asymptotisch einem Maximum annähern. Die letztlich in den Versuchen verwendete Konzentration sollte im Plateaubereich beider Kurven in der Nähe der Sättigungskonzentration liegen. Bei dieser Konzentration ist die maximale Anzahl von Antigen-Bindungsstellen besetzt, ein weiterer Anstieg der Antikörperkonzentration führt also zu keinem signifikanten Anstieg der Fluoreszenz mehr [Reilly, 1996]. Bei indirekter Färbung müssen beide Antikörper titriert werden, um eine maximale Sensitivität und Spezifität der Messung zu erreichen [Reilly, 1996; Givan, 2000].

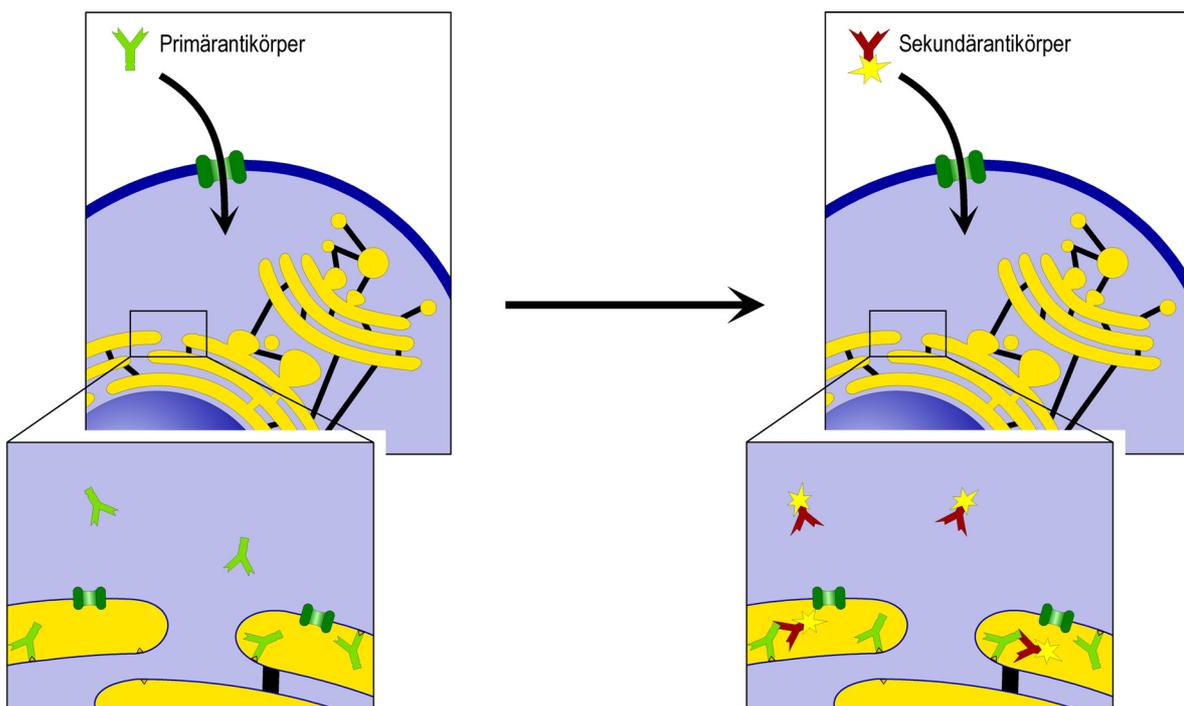


Abbildung 1-11 Schematischer Ablauf der indirekten Fluoreszenzfärbung eines intrazellulären Antigens.

Links: Inkubation mit Primärantikörper:

Durch die Membran gelangen die Primärantikörper zu den korrespondierenden Antigen-Bindungsstellen im Inneren des endoplasmatischen Retikulums (gelb) einer fixierten und permeabilisierten Zelle. Ungebundene Primärantikörpermoleküle werden anschließend in mehreren Waschstufen entfernt.

Rechts: Inkubation mit Sekundärantikörper:

Auf die Inkubation mit dem Primärantikörper folgt die Färbung mit dem fluoreszenzmarkierten Sekundärantikörper, der an den Fc-Teil gebundener Primärantikörpermoleküle binden kann.

1.6 Arbeitshypothese und Ziele der Arbeit

Malignome des sinonasalen und nasopharyngealen Raums entstehen aus dem Zusammenspiel individueller Suszeptibilität und exogener Noxen. Zur Untersuchung dieses Zusammenwirkens *in vitro* wird ein Versuchssystem gefordert, das die Verhältnisse *in vivo* optimal nachbildet und die kontrollierte und wiederholte Exposition der Zielzellen gegenüber potenziell schädigenden Einflüssen erlaubt. Das Modell der Miniorgankulturen humaner nasaler Schleimhaut soll diese Anforderungen erfüllen. Exemplarisch wird die ein- und mehrfache Inkubation der Miniorgane mit den genotoxischen Substanzen Natriumdichromat, *N*-Nitrosodiethylamin und *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin untersucht. Um den direkten Vergleich mit etablierten Versuchssystemen zu ermöglichen, werden parallel zu diesen Versuchen auch Einzelzellen in Suspension inkubiert.

Die induzierten genetischen Schäden lassen sich durch die alkalische Version des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay quantifizieren. Der Anteil apoptotischer Vorgänge an hohen DNS-Schäden im Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay soll durch den Einsatz des Annexin-V-Affinitätstests erfasst werden. Die Aufrechterhaltung der metabolischen Kompetenz der Zellen der Miniorgane im Verlauf der Kultivierung wird durch die durchflusszytometrische Quantifizierung des Enzyms Cytochrom P450 2A6 demonstriert.

2.1 Technik der Miniorgankulturen

2.1.1 Verwendetes Gewebe

Zur Anlage der Miniorgankulturen wurden Gewebeproben humaner nasaler Schleimhaut verwendet. Das entnommene Material stammte von Patienten, die sich bei erschwelter Nasenatmung einer operativen Korrektur der vorliegenden Nasenmuschelhyperplasie unterzogen. Bei diesem Eingriff wurden in der Regel etwa 5 x 15 mm große Schleimhautstücke der Concha nasalis inferior entfernt. Die Operationen fanden alle an der Klinik für Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde der Ludwig-Maximilians-Universität in München statt. Die Patienten wurden über die wissenschaftliche Verwendung der Operationspräparate aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis entsprechend einem von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät empfohlenen Aufklärungsbogen (Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, Projekt Nr. 073/00).

2.1.2 Herstellung der Miniorgane und Ablauf der Kultivierung

Innerhalb von vier Stunden nach Explantation wurden die Operationspräparate gekühlt und lichtgeschützt in das Labor gebracht und dort zügig weiterverarbeitet. Zur Vermeidung bakterieller oder viraler Kontaminationen erfolgten alle weiteren Schritte unter den aseptischen Bedingungen einer Sterilbank. Zunächst wurden tiefer liegende Knochenstrukturen mit einem sterilen Skalpell herauspräpariert und wie avitale, narbige oder entzündlich veränderte Anteile verworfen. Das verbleibende Schleimhautgewebe wurde in etwa 1 mm³ große Würfel zerteilt, so dass mindestens eine Seitenfläche von makroskopisch intakter Mukosa bedeckt war. Nach dreimaligen Waschen in *Bronchial Epithelial Basal Medium* (BEBM; Promocell, Heidelberg) wurden diese Würfel auf Kulturplatten mit je 24 Vertiefungen (Falcon, Heidelberg) verteilt. Um ein Anhaften der Gewebsfragmente am Plastikrand der Vertiefungen zu vermeiden und ein freies Schweben im Kulturmedium zu gewährleisten, waren die einzelnen Vertiefungen im Vorfeld mit jeweils 200 µl 0,7 %iger Agaroselösung beschichtet worden. Die dabei verwendete Agaroselösung setzte sich aus 0,45 g Agarose (Agar Noble; Difco, Detroit, MI, USA), 30 ml Aqua bidestillata und 30 ml Dulbeccos modifiziertem Eagles Medium inklusive *N*-2-Hydroxyethylpiperazin-*N'*-2-ethansulfonsäure (DMEM inkl. HEPES; Gibco Lifetechnologies, Eggenstein) sowie 6 ml fetalem Kälberserum (FCS; Gibco Lifetechnologies, Eggenstein) zusammen. Neben 75 µl nicht-essenzieller Aminosäuren (Gibco Lifetechnologies, Eggenstein) wurden außerdem 120 µl Amphotericin B (Gibco Lifetechnologies, Eggenstein) und 240 µl Penicillin-Streptomycin-Lösung (Sigma, Steinheim) zugesetzt, um die Miniorgane vor Infektionen zu schützen.

Nach Zugabe von 250 µl des Nährmediums BEBM zu jeder Vertiefung wurden die Kulturplatten in einem Inkubator bei konstanten Umweltbedingungen aufbewahrt (37 °C, 5 % CO₂, Luftfeuchtigkeit 100 %). Jeden zweiten Tag wurde das Nährmedium unter aseptischen Bedingungen vollständig abgesaugt und durch 250 µl frisches BEBM ersetzt.

2.2 Technik der Zellseparation und des Vitalitätstests

2.2.1 Mechanische und enzymatische Zellseparation

Die angewandte Technik der Zellisolation aus menschlicher Schleimhaut für die Anwendung des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay wurde von Kuchenmeister sowie Pool-Zobel und Mitarbeitern eingeführt [Pool-Zobel et al., 1994; Kuchenmeister, 1994]. Die Auftrennung des epithelialen Zellverbandes in einzelne Zellen erfolgt dabei enzymatisch und mechanisch. Die für die Versuche verwendete Enzymlösung enthielt Kollagenase P (1 mg/ml; Boehringer, Mannheim), Hyaluronidase (1 mg/ml; Boehringer, Mannheim) und Protease (5 mg/ml; Sigma, Steinheim). Vor der Zugabe der Gewebestücke wurde die Enzymlösung steril filtriert. Zur Vermeidung einer Schädigung zellulärer DNS durch ultraviolettes Licht wurden die Einzelzellen nur langwelligem roten Licht ausgesetzt.

Zur Gewinnung einer Einzelzellsuspension wurden die Miniorgane der Versuchsansätze in Eppendorfgläser mit je 600 µl der proteolytischen Enzymlösung überführt und für 45 Minuten im bewegten Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Um weitere Stoffwechsel- und Reparaturvorgänge zu minimieren, wurden die Zellen nach Ablauf dieser Zeit auf Eis gekühlt. Nach kurzem Durchmischen des Inkubationsgefäßes auf dem Vortex-Schüttler und manueller Entfernung makroskopisch sichtbarer Bindegewebsreste mit einer Kanüle folgten mehrere Waschschriffe. Zunächst wurden dazu 600 µl kaltes FCS zugesetzt. An das Zentrifugieren (10 min, 4 °C, Drehzahl 800 min⁻¹ bzw. 150 x g) und Abpipettieren des Überstands schlossen sich zwei weitere Waschschriffe mit je 1 ml kalter Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS, Gibco Lifetechnologies, Eggenstein) an.

Am Ende der Zellisolation wurde die Suspension noch einmal zentrifugiert (10 min, 4 °C, Drehzahl 800 min⁻¹ bzw. 150 x g), so dass nach Abpipettieren des Überstandes nur ein Zellpellet am Boden jedes Eppendorfgläses verblieb.

2.2.2 Vitalitätstest und Zellzählung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest

Der Farbstoff Trypanblau kann bei intakter Zellmembran nicht ins Zytoplasma von Zellen gelangen. Geht die Membranintegrität aber verloren, so kommt es zu einem Eindringen des Farbstoffs, was im Mikroskop an einer Blaufärbung der Zelle erkennbar ist. Bei den durchgeführten Versuchen diente der Trypanblau-Ausschlusstest der Bestimmung des Anteils vitaler Zellen bei der Zellzählung [Phillips, 1973]. Dazu wurde das bei der Separation gewonnene Zellpellet in 50 µl Trypanblau-Lösung (Trypan Blue Stain 0,4 %, Gibco Lifetechnologies, Eggenstein) vorsichtig resuspendiert. Unter dem Durchlichtmikroskop konnte dann mittels einer Zählkammer nach Neubauer bei 400facher Vergrößerung die Gesamtzellzahl und der prozentuale Anteil blau gefärbter und damit avitaler Zellen bestimmt werden.

2.3 Technik der Fremdstoffinkubation

2.3.1 Inkubationsschemata

Die etwa 100 Miniorgane, die aus dem exzidierten nasalen Gewebe eines Patienten hergestellt werden konnten, wurden nach sechstägiger Kultivierung randomisiert und einem der beiden folgenden Versuchsschemata zugeteilt. Die im Ergebnisteil angegebene Gesamtzahl der Versuchsansätze N entspricht damit jeweils der Anzahl der teilnehmenden Probanden.

2.3.1.1 Vergleich der genetischen Fragmentierung bei Miniorganen und Einzelzellen

Ziel des ersten Versuchsschemas war der Vergleich der genetischen Fragmentierung nach ein- oder mehrfacher Inkubation der Zellen im Gewebeverband der Miniorgane oder als Einzelzellsuspension. Dazu wurde ein Viertel der angelegten Miniorgane einmal an Tag 11 mit der mutmaßlich genotoxischen Substanz in Kontakt gebracht. Diese Ansätze erhielten die Kennzeichnung *Mok 1x*. Das zweite Viertel der Miniorgane wurde dreimal hintereinander an den Tagen 7, 9 und 11 inkubiert. Diese Ansätze erhielten die Kennzeichnung *Mok 3x*. Das dritte Viertel der Miniorgane wurde an Tag 11 nicht als Zellverband inkubiert, sondern erst in Einzelzellen separiert und dann dem Fremdstoff ausgesetzt. Diese Ansätze erhielten die Kennzeichnung *Ez 1x*. Das letzte Viertel wurde an den Tagen 7 und 9 als Miniorgane inkubiert, an Tag 11 dagegen als Einzelzellsuspension. Diese Ansätze erhielten die Kennzeichnung *Ez 3x*. Abbildung 2-1 stellt dieses Inkubationsschema graphisch dar.

2.3.1.2 Schema zur Bestimmung von genetischer Fragmentierung und Apoptoserate bei Miniorganen

Ziel des zweiten Versuchsschemas war der Vergleich der genetischen Auswirkungen und der Apoptoserate nach ein- oder mehrfacher Inkubation der Zellen der Miniorgane. Wie in

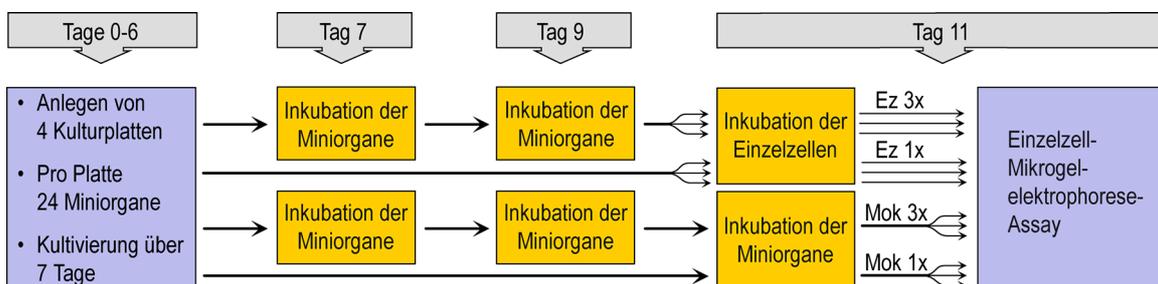


Abbildung 2-1 Inkubationsschema zur Bestimmung der genetischen Fragmentierung bei Miniorganen und Einzelzellen.

Ez 1x: Einmalige Exposition der Einzelzellen an Tag 11.

Ez 3x: Exposition der Einzelzellen an Tag 11 nach zweimaliger Exposition der Miniorgane an Tag 7 und 9.

Mok 1x: Einmalige Exposition der Miniorgane an Tag 11.

Mok 3x: Dreimalige Exposition der Miniorgane an Tag 7, 9 und 11.



Enzymatische und mechanische Auftrennung des Zellverbands in Einzelzellen (Separation).

Abbildung 2-2 dargestellt, wurde die Hälfte der angelegten Miniorgane nur einmal an Tag 11 mit den Schadstoffen in Kontakt gebracht. Diese Ansätze erhielten die Kennzeichnung *Mok 1x*. Die andere Hälfte wurde dagegen dreimal hintereinander an den Tagen 7, 9 und 11 inkubiert. Diese Ansätze erhielten die Kennzeichnung *Mok 3x*. Um Unterschiede im individuellen Versuchsablauf zu vermeiden, wurden die Miniorgane, die dem Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assays bzw. dem Annexin-V-Affinitätstest zugeführt werden sollten, bis zum Vitalitätstest parallel verarbeitet.

2.3.2 Ablauf der Inkubationen an Tag 7 und 9 der Kultivierung

Bei beiden Versuchsschemata fand an den Tagen 7 und 9 eine Inkubation der Miniorgane von zwei Kulturplatten statt. Die Gewebestücke wurden dabei auf den Kulturplatten mit den entsprechenden Noxen in Kontakt gebracht. Zum Erreichen der gewünschten Endkonzentration der Xenobiotika wurde den 250 µl Nährmedium pro Vertiefung 25 µl des entsprechend verdünnten Fremdstoffs zugesetzt. Dabei wurde darauf geachtet, die teilweise photolabilen Substanzen dem Licht möglichst wenig auszusetzen. Für die folgenden 60 Minuten befanden sich die Platten in einem Wasserbad bei 37 °C und Bewegung im Dunklen. Als Negativkontrolle diente das Nährmedium BEBM. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Miniorgane auf der Platte gewaschen, indem nach Absaugen aller Flüssigkeit 250 µl frisches BEBM pro Vertiefung zugegeben wurde.

Um einer möglichen Kontamination der Agarosebeschichtung vorzubeugen, wurden die betreffenden Miniorgane nach dem Waschen vorsichtig auf neue Kulturplatten umgesetzt und nach Zugabe von 250 µl BEBM wieder in den Inkubator verbracht.

2.3.3 Ablauf der Inkubationen an Tag 11 der Kultivierung

2.3.3.1 Miniorgan-Inkubation

An Tag 11 wurden die Miniorgane der Ansätze *Mok 3x* und *Mok 1x* auf den Kulturplatten inkubiert. Beim ersten Schema handelt es sich dabei nur um zwei Platten, beim zweiten Schema um vier. Wie zuvor wurde zum Erreichen der gewünschten Endkonzentration pro Vertiefung 25 µl des entsprechend verdünnten Fremdstoffs zugesetzt. Nach 60 Minuten Inkubationszeit im

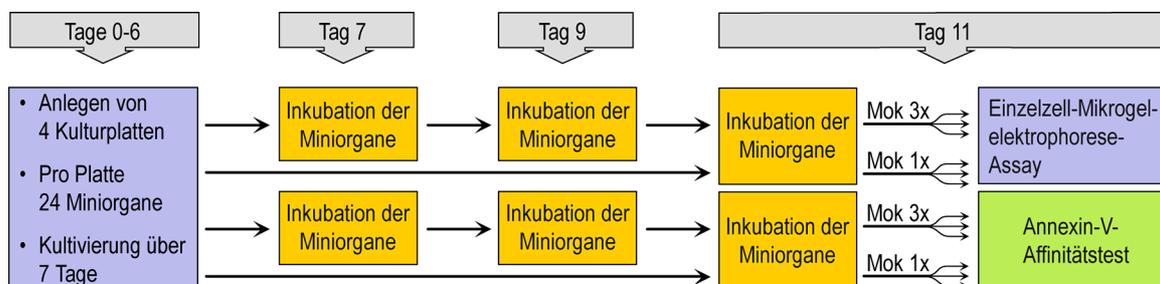


Abbildung 2-2 Inkubationsschema zur Bestimmung von DNS-Fragmentierungsgrad und Apoptoserate bei Miniorganen.

Mok 1x: Einmalige Exposition der Miniorgane an Tag 11.

Mok 3x: Dreimalige Exposition der Miniorgane an Tag 7, 9 und 11.



Enzymatische und mechanische Auftrennung des Zellverbands in Einzelzellen (Separation).

Wasserbad bei 37 °C und Bewegung im Dunklen wurden die Miniorgane wieder auf der Platte gewaschen, indem nach Absaugen aller Flüssigkeit 250 µl frisches BEBM pro Vertiefung zugegeben wurde. Im Unterschied zur Inkubation der Miniorgane an den Tagen 7 und 9 wurden die Miniorgane daraufhin aber nicht auf neue Kulturplatten übertragen, sondern in Einzelzellen aufgetrennt und nach Durchführung des Vitalitätstests dem Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay oder dem Annexin-V-Affinitätstest zugeführt.

2.3.3.2 Einzelzell-Inkubation

Bei Verfahren nach dem ersten Versuchsschema erfolgte die Inkubation der Ansätze *Ez 3x* und *Ez 1x* an Tag 11 erst nach der Separation der Miniorgane in Einzelzellen. Dazu wurden die Zellpellets, die nach der Zellisolation in den Eppendorfgläsern verblieben, in je 250 µl BEBM resuspendiert. Die Inkubation der hergestellten Einzelzellsuspensionen mit den entsprechenden Noxen erfolgte dann wie bei der Inkubation der Miniorgane durch Zugabe von je 25 µl Fremdstofflösung. Dadurch wurde eine identische Konzentration der Noxen wie bei der Inkubation der Miniorgane erreicht. Nach Ablauf der 60minütigen Inkubationszeit im Wasserbad bei 37 °C und Bewegung im Dunklen wurden die Eppendorfgläser mit den Einzelzellsuspensionen auf Eis gekühlt. An die folgende Zentrifugation (10 min, 4 °C, Drehzahl 800 min⁻¹ bzw. 150 x g) schlossen sich zügig Vitalitätstest und Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay an.

2.3.4 Verwendete Schadstoffkonzentrationen

Tabelle 2-1 gibt die Schadstoffkonzentrationen wieder, die für die Inkubationen verwendet wurden. Grundlage für die Wahl dieser Konzentrationen waren Vorversuche mit Miniorganen und Einzelzellen, Dosis-Wirkungskurven und Literaturangaben [Kleinsasser et al., 2001]. Als Lösungsmittel diente im Falle von Natriumdichromat und NDEA das Kulturmedium BEBM, bei MNNG Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck, Darmstadt). Bei allen Substanzen wurde mit Doppelansätzen gearbeitet. Negativkontrollen wurden für jeden Versuchszeitpunkt parallel zur Inkubation mit den Noxen durchgeführt. In den Ansätzen der Negativkontrollen wurde ein identisches Volumen des Mediums BEBM zugesetzt.

Tabelle 2-1 Eingesetzte Schadstoffkonzentrationen.

Schadstoff	Konzentration	Herstellerfirma
Natriumdichromat	1,0 µmol/ml (0,26 mg/ml)	Sigma, Steinheim
<i>N</i> -Nitrosodiethylamin	50 µmol/ml (5,1 mg/ml)	Sigma, Steinheim
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> -nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin	0,07 µmol/ml (10,3 µg/ml)	Fluka, Neu-Ulm

2.4 Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay

2.4.1 Verwendetes Protokoll

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Variante des Protokolls nach Singh angewandt. Im speziellen wurde darauf geachtet, die Leitlinien für die Untersuchung genotoxischer Einflüsse umzusetzen, die 1999 im Rahmen des *International Workshop on Genotoxicity Test Procedures*

(IWGTP) von einer Expertenkommission erarbeitetet wurden [Tice et al., 2000]. Diese Leitlinien empfehlen die alkalische Version des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay. Sie beinhalten darüber hinaus technische und verfahrensmäßige Regeln zu Versuchsdurchführung, Auswertung und Dokumentation.

2.4.2 Ablauf der Versuche

2.4.2.1 Herstellung der beschichteten Objektträger

Um eine elektrophoretische Auftrennung der DNS zu ermöglichen, müssen die Zellkerne auf dem Objektträger von Agarose umschlossen sein. Die Zellen liegen deshalb, in Agarose aufgenommen, zwischen einer Grund- und einer Deckschicht aus Agarose. Die verwendeten Agaroseprodukte wurden durch kurzes Erhitzen in der Mikrowelle in PBS gelöst und bis zur weiteren Verwendung im Wasserbad bei 37 °C aufbewahrt.

Nach Nummerierung mit einem Diamantstift erhielten die Objektträger die Grundbeschichtung mit Agarose. Um ein Ablösen der unteren Agaroseschicht vom Glas bei der späteren Elektrophorese zu vermeiden, wurden seitlich mattierte Objektträger verwendet. Diese gewährleisteten eine bessere Haftung der Grundsicht und verhindern so den Verlust der gesamten Objektträgerbeschichtung inklusive der aufgetragenen Zellen. Für die Grundbeschichtung wurden 85 µl *Normal-Melting-Agarose 0,5 %* (Seakem LE agarose, FMC-Bio Products, Rockland, MA, USA) auf die Objektträger getropft und mit einem Deckglas bedeckt. Es folgte eine Trocknung der Objektträger über mindestens 24 Stunden und die Aufbewahrung bei Zimmertemperatur. Kurz vor der weiteren Verwendung wurden die Deckgläser entfernt. Die zweite Agaroseschicht enthielt die zu analysierenden Zellen. Das Zellpellet, das nach dem letzten Waschschrift übrig blieb, wurde dafür in 75 µl *Low-Melting-Temperature-Agarose 0,7 %* (Sea-Plaque GTG agarose, FMC-Bio Products, Rockland, MA, USA) aufgenommen und auf die Grundsicht aufgetragen. Die gleichmäßige Verteilung erfolgte wieder durch Auflegen eines Deckglases. Das Erstarren der Agarose erforderte etwa zehn Minuten und erfolgte auf Eis. Nach dem vorsichtigen Abziehen des Deckglases konnte eine weitere Deckschicht mit 85 µl *Low-Melting-Temperature-Agarose 0,7 %* aufgetragen werden. Entsprechend dem vorhergehenden Schritt wurde auch hier ein Deckglas bis zum Erstarren der Agarose auf dem Objektträger belassen.

2.4.2.2 Auflösung der zellulären Membranen

Um ein unbehindertes Wandern der Nukleinsäuren in der Elektrophorese zu gewährleisten, wurden die Objektträger im Anschluss in einen Puffer überführt, der zelluläre Membranen auflöst. Dieser Lysepuffer wurde für jeden Versuch aus 1 ml des Detergens Triton-X 100 (Sigma, Steinheim), 10 ml DMSO und 89 ml Lysestammlösung frisch angesetzt und mit einem Magnetrührer gemischt. Die Lysestammlösung bestand aus 46,4 g Natriumchlorid (2,5 M; Sigma, Steinheim), 1,2 g Trishydroxymethylaminomethan (Trizma-Base, 10 mM; Merck, Darmstadt), 37,2 g Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na₂EDTA, 100 mM; Serva, Heidelberg), 10 g *N*-Lauroylsarcosin-Natriumsalz (1 %; Sigma, Steinheim), mit Aqua bidestillata auf 1 l aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 10 eingestellt. Die Objektträger wurden nach vorsichtiger Entfernung der Deckgläser vertikal in eine Glasküvette gestellt, die bis zur vollständigen Bedeckung der Objektträger mit Lysepuffer gefüllt wurden. Bei 4 °C im Dunklen verblieben sie dort mindestens eine Stunde bis maximal fünf Tage lang.

2.4.2.3 Inkubation mit alkalischem Elektrophoresepuffer

Um alkalilabile Stellen in Einzelstrangbrüche umzuwandeln und einzelsträngige, entspiralisierte DNS zu erzeugen, wurden die Objektträger vor der Elektrophorese für 20 Minuten in alkalischem Elektrophoresepuffer (pH-Wert > 13) inkubiert [Klaude et al., 1996]. Die Objektträger wurden dafür aus der Küvette entnommen und nach der Entfernung des überschüssigen Lysepuffers an der Anode beginnend auf das Bett der vorgekühlten horizontalen Gelelektrophoresekammer verteilt. Die Präparate wurden mit kaltem Elektrophoresepuffer überschichtet, bis der Puffer etwa 0,5 cm über den Objektträgern stand. Der Elektrophoresepuffer wurde jeden Tag frisch angesetzt und vor Verwendung auf 4 °C gekühlt. Er bestand aus 24 g Natriumhydroxid-Plätzchen (300 mM; Merck, Darmstadt) und 0,744 g Na₂EDTA (1 mM), mit Aqua bidestillata auf 2 l aufgefüllt.

2.4.2.4 Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen

Nach Ablauf der 20minütigen Entspiralisierungszeit wurde für weitere 20 Minuten eine Spannung (25 V, 300 mA, ~1,0 V/cm) an die Elektroden des Beckens angelegt, um im Falle einer Fragmentierung der DNS Bruchstücke im elektrischen Feld zur Anode hin aus dem Zellkern hinauswandern zu lassen. Bei konstanter Spannung wurde die Einstellung der Stromstärke auf 300 mA innerhalb der ersten Minuten durch vorsichtiges Hinzufügen oder Abpipettieren des Elektrophoresepuffers erreicht [Speit und Hartmann, 1996].

2.4.2.5 Neutralisation

Nach Abschluss der Elektrophorese wurden die Objektträger aus der Elektrophoresekammer entnommen, auf Abtropfgestellen platziert und dreimal mit Neutralisationspuffer gespült. Dieser bestand aus 48,5 g Trizma-Base (400 mM), die mit Aqua bidestillata auf 1 l aufgefüllt und auf einen pH-Wert von 7,5 eingestellt war.

2.4.2.6 Fluoreszenzfärbung

Um eine Analyse der DNS-Wanderung unter dem Fluoreszenzmikroskop zu ermöglichen, folgte die Färbung der in Agarose eingebetteten DNS. Dafür wurden auf jeden Objektträger 75 µl Ethidiumbromid-Färbelösung (51 µM; Sigma, Steinheim) aufgetropft und mit einem Deckglas eingedeckt. Die Färbelösung wurde aus einer Stammlösung aus 0,20 mg/ml Ethidiumbromid (0,51 mM) durch 1:10-Verdünnung mit Aqua bidestillata und Sterilfiltration hergestellt. Die gefärbten Präparate konnten bis zu eine Woche lang in einer feuchten Kammer bei 4 °C lichtgeschützt aufbewahrt werden.

2.4.3 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Objektträger geschah computerassistent mittels eines Fluoreszenzmikroskops unter Verwendung eines Filtersystem mit Grünanregung (515-560 nm Bandpass) und Ausgangssperrfilter (590 nm Langpass) bei 400facher Vergrößerung. Zunächst wurde das mikroskopische Bild über eine zugeschaltete Monochrom-CCD-Kamera digitalisiert. Das Programm Komet 3.1 (Kinetic Imaging, Liverpool, Großbritannien) ermittelte dann automatisch an einem vom Auswerter gewählten Zellkern im Gesichtsfeld das *Olive Tail Moment* (OTM). Wie in Abbildung 2-3 dargestellt, fließt in dessen Höhe, neben dem relativen Anteil der Fluoreszenzintensität des Schweifs, die Schweiflänge in Mikrometern ein [Olive et al., 1990; Tice et al., 2000]. Um korrekte

Messergebnisse zu gewährleisten, wurde es vermieden, Zellen im Randbereich des Objektträgers auszuwerten [Tice et al., 2000]. Pro Versuchsansatz wurde das Fluoreszenzmuster von insgesamt 80 Zellkernen auf zwei identisch behandelten Objektträgern bestimmt. Die Messergebnisse wurden in einer Datei im Microsoft Excel-Format (Microsoft GmbH, Unterschleißheim) gespeichert.

Die Messung der Fluoreszenzverteilung erfolgte bei diesem Verfahren also weitgehend automatisch. Der Auswerter musste jedoch pro Objektträger 40 Zellen auswählen, die für das Schädigungsniveau des Versuchsansatzes repräsentativ waren. Um eine subjektive Verfälschung dieser Auswahl auszuschließen und somit die Beobachtungsgleichheit bei der Versuchsauswertung zu gewährleisten, wurden die Objektträger der Versuchsansätze blind ausgewertet. Die Auswahl der Zellen erfolgte also ohne das Wissen, um welchen Versuchsansatz es sich handelt [Tice et al., 2000]. Zu diesem Zweck wurden die einzelnen Objektträger mehrerer Versuche, die durch die eingravierte Nummer mit einer eindeutigen Kodierung versehen waren, randomisiert und dann ausgewertet. Die erzeugte Ergebnisdatei wurde unter der jeweiligen Objektträgernummer gespeichert. Nach Abschluss der Auswertung aller Objektträger wurden die OTM-Werte jedes Versuchs mittels eines Microsoft Excel-Makros in einer neuen Tabelle zusammengefasst, statistisch ausgewertet und gespeichert.

Pro Versuchsansatz ging der arithmetische Mittelwert der OTM-Werte der jeweils gemessenen 80 Zellen in die weiteren Berechnungen ein.

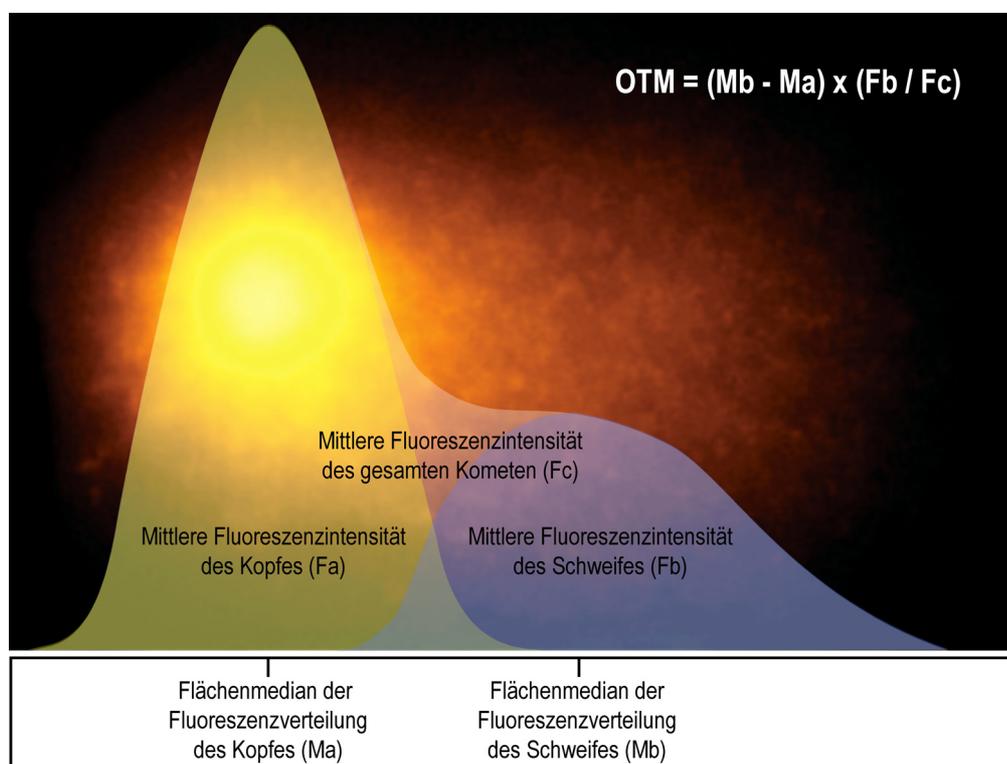


Abbildung 2-3 Mikroskopisches Bild eines Zellkerns nach der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (aufgenommen mit 1.000facher Vergrößerung) und Formel zur Berechnung des *Olive Tail Moment* (OTM).

2.5 Apoptosenachweis mit dem Annexin-V-Affinitätstest

2.5.1 Verwendeter Chemikaliensatz

Die Untersuchung apoptotischer Vorgänge nach Giftstoffexposition erfolgte mit dem *ApoAlert Annexin-V-FITC Apoptosis Kit* (BD Clontech, Heidelberg). Dieser Chemikaliensatz bestand aus Annexin-V-FITC-Färbelösung (20 µg/ml Annexin-V-FITC in Trizma-Base/NaCl), einem Bindungspuffer und Propidiumjodidlösung (50 µg/ml in Bindungspuffer).

2.5.2 Ablauf der Versuche

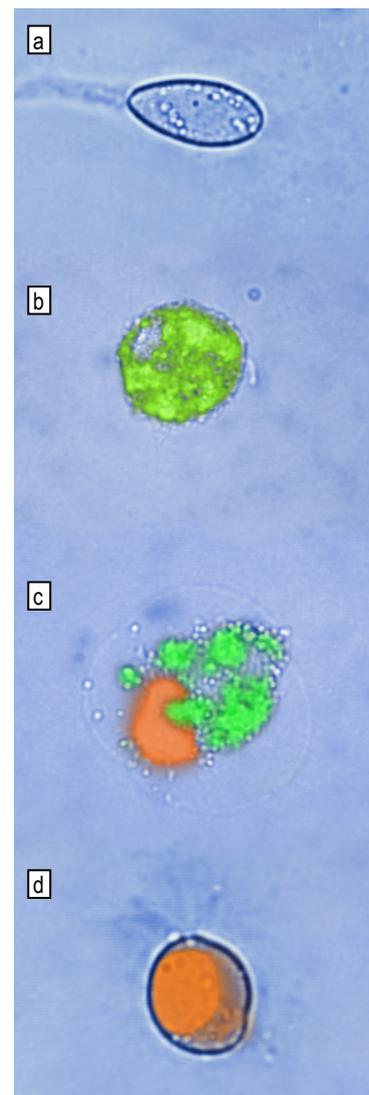
Das Pellet mit den zu analysierenden Zellen, das nach dem letzten Waschschrift der Zellisolierung und dem Abpipettieren des Überstandes verblieb, wurde in 200 µl Bindungspuffer resuspendiert, gewaschen und zentrifugiert. Nach dem Abpipettieren des Überstandes folgte die Resuspendierung in nochmals 200 µl Bindungspuffer. Im Färbeschritt wurden anschließend jedem Ansatz 5 µl Annexin-V-FITC-Färbelösung und 10 µl Propidiumjodidlösung zugegeben. Nach einer zehnminütigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunklen wurden 100 µl der Zellsuspension auf einen Objektträger übertragen und mit einem Deckglas bedeckt. Die Auswertung folgte unverzüglich.

2.5.3 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Da die Apoptose ein dynamisches Geschehen darstellt, erfolgte die Auswertung aller Objektträger eines Versuchs innerhalb der ersten Stunde nach Abschluss der Inkubation. Zuerst wurde dabei durchlichtmikroskopisch bei 400facher Vergrößerung die Gesamtzahl der Zellen im auszuwertenden Gesichtsfeld bestimmt. Daraufhin wurde in demselben Gesichtsfeld im fluoreszenzmikroskopischen Bild unter Verwendung eines Filtersystem mit Blauanregung und einem Ausgangs-Sperrfilter (450-490 nm Bandpass und 515 nm Langpass) die grün und/oder rot fluoreszierenden Zellen gezählt. Pro Versuchsansatz wurden 100 Zellen ausgewertet. Diese Zellen wurden, wie in Abbildung 2-4 dargestellt, nach ihrem Färbeverhalten in vier Kategorien eingeteilt. In die weiteren Berechnungen ging der prozentuale Anteil vitaler und apoptotischer sowie spät-apoptotischer, nekrotischer und beschädigter Zellen ein.

Abbildung 2-4 Fluoreszenzmikroskopische Bilder von Zellen nach Doppelfärbung mit Annexin V und Propidiumjodid (Falschfarbenbilder durch Überlagern von drei Monochrombildern. blau: durchlichtmikroskopisches Bild; grün: Annexin-V-Färbung, rot: Propidiumjodid-Färbung; aufgenommen mit 1.000facher Vergrößerung).

- Bild a: AV-/PI⁻ vitale Zelle,
 Bild b: AV⁺/PI⁻ apoptotische Zelle,
 Bild c: AV⁺/PI⁺ spät-apoptotische oder nekrotische Zelle,
 Bild d: AV⁻/PI⁺ beschädigte oder nekrotische Zelle.



2.6 Durchflusszytometrische CYP2A6-Bestimmung

2.6.1 Verwendete Zellen

Für alle Vorversuche und die Titration von Primär- und Sekundärantikörper fanden aus frischen Nasenmuschelproben gewonnene Schleimhautzellen Verwendung. Zur Bestimmung der intrazellulären Konzentration von Cytochrom P450 2A6 (CYP2A6) im Verlauf der Kultivierung wurden Miniorgankulturen angelegt. Um Einzelzellen zu isolieren, wurde das mit einem Skalpell zerkleinerte Operationspräparat bzw. 10-15 Miniorgane in ein Reaktionsgefäß mit 10 ml Enzymlösung für die Zellseparation überführt. In beiden Fällen betrug die Inkubationszeit 60 Minuten im bewegten Wasserbad bei 37 °C, um die Zellausbeute zu maximieren. Nach Ablauf dieser Zeit wurde das Inkubationsgefäß kurz auf dem Vortex-Schüttler gemischt, bis eine Trübung der Zellsuspension eintrat. Dann erfolgte die Filterung über dreifach gelegte Gaze, um grobe Verunreinigungen und Bindegewebsreste zu entfernen. Die anschließende Spülung des Gazeetzes mit 10 ml BEBM diente der Vermeidung weiterer Zellverluste. Es folgte ein Zentrifugationsschritt (10 min, 4 °C, Drehzahl 1070 min⁻¹ bzw. 250 x g) und das Abgießen des Überstands. Das Zellpellet wurde in 5 ml kaltem PBS resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation, Abgießen und Resuspendierung in 2 ml kaltem PBS wurden 50 µl der Zellsuspension entnommen und der Zellzählung zugeführt.

2.6.2 Verwendete Materialien

2.6.2.1 Chemikaliensatz zur Zellfixierung und -permeabilisierung

In den durchgeführten Versuchen wurde das *Cytofix/Cytoperm-Kit* der Firma Becton Dickinson eingesetzt (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA). Bei diesem Chemikaliensatz wird die Permeabilisierung mit Saponin und die Fixierung mit Formaldehyd in einem einzigen Schritt durch Inkubation mit der gelieferten Cytofix/Cytoperm-Lösung erreicht. Der in den Waschsritten und zur Verdünnung der Antikörperlösungen verwendete Perm/Wash-Puffer wurde vor Verwendung im Verhältnis 1:10 mit Aqua bidestillata verdünnt.

2.6.2.2 Primärantikörper und Isotypantikörper

Als Primärantikörper wurde ein monoklonaler IgG₁-Antikörper der Maus gegen humanes Cytochrom P450 2A6 gewählt (CYP2A6, Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA). Die Proteinkonzentration betrug 9,86 mg/ml TBS mit 0,1 % Natriumazid, der Immunglobulingehalt 1,90 mg/ml. Kreuzreaktionen mit rekombinantem menschlichem Cytochrom P450 1A1, 1A2, 2B6, 2C8, 2C9, 2C19, 2D6, 2E1, 3A4, 3A5 wurden durch die Herstellerfirma ausgeschlossen. Um wiederholtes Auftauen und Wiedereinfrieren des Antikörpers zu vermeiden, wurde die Antikörperlösung in 4 µl-Portionen aufgeteilt und bis zur Verwendung bei -80 °C aufbewahrt. Als Antikörper für die Isotypkontrollen kam ein monoklonaler IgG₁-Antikörper der Maus zum Einsatz, der gegen ein Antigen gerichtet ist, das im menschlichen Organismus nicht auftritt (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

2.6.2.3 Sekundärantikörper

Als Sekundärantikörper diente ein Fluoreszein-markierter polyklonaler Antikörper der Ziege gegen Maus-IgG₁, -IgG_{2a}, -IgG_{2b} und -IgG₃ (BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA).

2.6.3 Primärantikörpertitration

Vor Beginn der Messung des zeitlichen Verlaufs des Cytochrom-P450-2A6-Gehalts der Zellen wurde durch eine serielle Verdünnungsreihe das Färbeverhalten frischer Schleimhautzellen bei fünf verschiedenen Primärantikörper-Konzentrationen untersucht. Durch diesen Versuch konnte die optimale Konzentration des Primärantikörpers ermittelt werden.

2.6.3.1 Herstellung der Verdünnungsreihe

Am Beginn dieser Titrationsreihe stand die Vorbereitung von sechs Eppendorfgefäßen und ihre Beschriftung entsprechend der Verdünnung mit *1:1*, *1:2*, *1:4*, *1:8*, *1:16* und *0* als Negativkontrolle. Im ersten Eppendorfgefäß wurden dann 100 µl einer Antikörperlösung der Startkonzentration von 107 µg/ml durch Mischen von 11,26 µl unverdünnter Antikörperlösung mit 98,74 µl Perm/Wash-Puffer hergestellt. In den übrigen Eppendorfgefäßen wurden je 50 µl Perm/Wash-Puffer vorgelegt. Wie in Abbildung 2-5 dargestellt, wurden dann die Verdünnungen durch seriellen Übertrag von 50 µl auf das jeweils folgende Eppendorfgefäß erzielt. Auf das Gefäß für die Negativkontrolle wurde keine Antikörperlösung übertragen.

2.6.3.2 Herstellung der Teströhrchen

Ein frisches Nasenmuschelpräparat wurde ohne Anlage einer Miniorgankultur in Einzelzellen aufgetrennt. Nach Zellzählung und Vitalitätsbestimmung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest wurden je $0,8 \times 10^6$ Zellen auf sechs 5 ml Rundbodenröhrchen (BD Falcon, Heidelberg) verteilt [Owens et al., 2000]. Entsprechend der Antikörperverdünnung, die dem jeweiligen Ansatz zugegeben werden sollte, wurden sie mit *1:1*, *1:2*, *1:4*, *1:8*, *1:16* und *0* als Negativkontrolle beschriftet.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand über dem Zellpellet in einem Zuge abgegossen. Alle weiteren Versuchsschritte geschahen unter Lichtabschluss oder langwelligem Rotlicht, um eine Zellschädigung oder ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden.

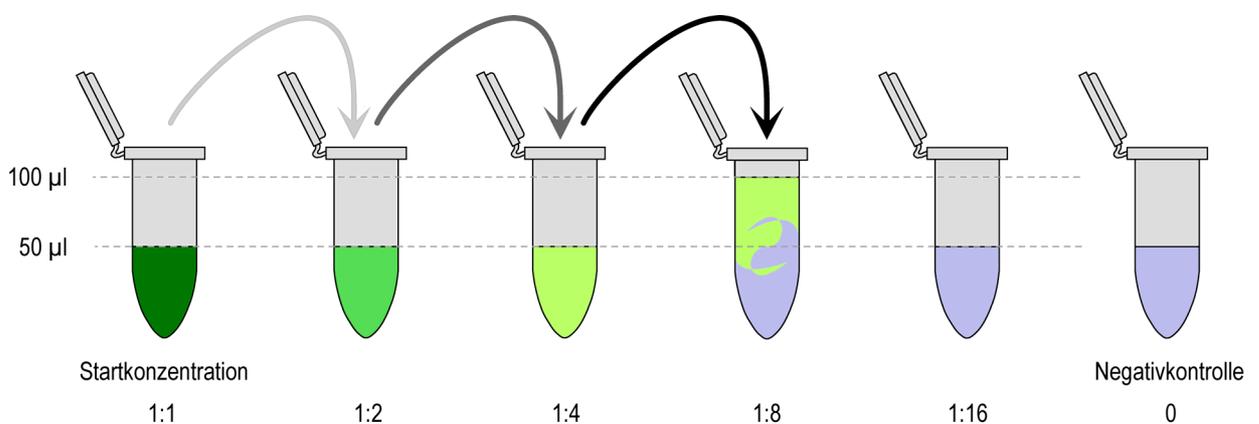


Abbildung 2-5 Schema zur Erstellung einer Verdünnungsreihe.

Dargestellt ist die Übertragung von 50 µl Antikörperlösung der Verdünnung 1:4 auf das nächste Eppendorfgefäß, in dem schon 50 µl Perm/Wash-Puffer vorgelegt sind (blau). Nach gründlichem Mischen werden aus diesem wieder 50 µl in das nächste Eppendorfgefäß überführt.

2.6.3.3 Fixierung und Permeabilisierung der Zell- und Organellmembranen

Nach vorsichtigem Resuspendieren der Zellpellets in der Restflüssigkeit wurden unter weiterem Mischen auf dem Vortex-Schüttler jedem Ansatz langsam 250 µl kalter Cytofix/Cytoperm-Lösung zugesetzt. Dadurch ließ sich die Aggregation der Zellen während der Fixierung vermeiden. Der anschließenden zwanzigminütigen Inkubation der Versuchsgefäße auf Eis folgte die Zentrifugation und nach Abgießen des Überstandes ein Waschschrift mit 1 ml kaltem Perm/Wash-Puffer.

2.6.3.4 Färbung mit Primärantikörper

Nach Resuspendieren in 1 ml kaltem Perm/Wash-Puffer und Zentrifugation wurde die überstehende Flüssigkeit bis auf ein Restvolumen von ca. 50 µl abgesaugt. Durch Zugabe von je 50 µl der unterschiedlich verdünnten Antikörperlösung zu den sechs für die Färbung vorbereiteten und beschrifteten Röhrchen wurde ein Färbevolumen von 100 µl erreicht.

Dem vorsichtigen Mischen der Ansätze folgte die Inkubation für 30 Minuten auf Eis im Dunklen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden durch mehrere Waschschriffe nicht gebundene Antikörper aus der Zellsuspension entfernt. Dazu wurde jeweils 1 ml kalter Perm/Wash-Puffer zugegeben und gründlich mit den Zellen vermischt, dann wurden die Ansätze zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Waschvorgang wurde ein zweites Mal in gleicher Weise wiederholt.

2.6.3.5 Färbung mit Sekundärantikörper

Dem Abgießen des Überstandes nach dem letzten Waschschrift folgte die Zugabe von 10 µl unverdünnter Antikörperlösung zu jedem Ansatz. Diese Sekundärantikörperkonzentration von 10 µl/100 µl Zellsuspension wurde nach Herstellerangaben und Literaturstudium gewählt, da noch keine Titrationsergebnisse für den Sekundärantikörper vorlagen [Smith und Ellis, 1999].

Die Inkubation fand wieder auf Eis im Dunklen für 30 Minuten statt. Danach folgten zwei Waschschriffe mit je 1 ml kaltem Perm/Wash-Puffer und zwei weitere Waschschriffe mit je 2 ml kaltem PBS.

2.6.3.6 Fixierung und Filtrierung

Auf die Resuspendierung des Zellpellets folgte die Zugabe von je 1 ml kalter 2 %iger Formaldehydlösung. Diese wurde durch Mischung 4 %iger Formaldehydlösung (Otto Fischer, Saarbrücken) mit PBS im Verhältnis 1:1 unter Rühren mit einem Magneten hergestellt und auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Sofort nach der Zugabe wurde die Zellsuspension kräftig durch Auf- und Abpipettieren unter Vermeidung von Blasenbildung gemischt. Bei 4 °C und Lichtabschluss konnten die Ansätze bis zur durchflusszytometrischen Auswertung aufbewahrt werden. Vor der Messung wurden die Zellen gründlich resuspendiert und durch einen Nylonfilter mit einer Porenweite von 35 µm (BD Falcon, Heidelberg) gesiebt, um größere Zellaggregate zu entfernen, die das Zytometer verstopfen und Messfehler verursachen könnten [Owens et al., 2000]. Auf die Zentrifugation und das Verwerfen des Überstandes folgte die durchflusszytometrische Messung.

2.6.4 Sekundärantikörpertitration

Nach Auswertung der Titrationsversuche zur Primärantikörperkonzentration konnte die optimale Sekundärantikörperkonzentration bestimmt werden.

2.6.4.1 Herstellung der Teströhrchen

Auch bei der Titration des Sekundärantikörpers wurde ein frisches Nasenmuschelpräparat ohne Anlage einer Miniorgankultur in Einzelzellen aufgetrennt. Nach Zellzählung und Vitalitätsbestimmung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest wurden fünf 5 ml Rundbodenröhrchen mit je $0,8 \times 10^6$ Zellen vorbereitet [Owens et al., 2000]. Je nachdem, welches Volumen der unverdünnten Sekundärantikörperlösung später zugegeben werden sollte, wurden die Röhrchen mit *20 µl*, *10 µl*, *5 µl*, *2,5 µl* und *0* als Negativkontrolle beschriftet.

Nach dem Zentrifugieren der Ansätze wurde der Überstand in einem Zuge abgegossen. Alle weiteren Versuchsschritte geschahen unter Lichtabschluss oder langwelligem Rotlicht.

2.6.4.2 Fixierung und Permeabilisierung der Zell- und Organellmembranen

Die Zellpellets wurden vorsichtig resuspendiert und mit 250 µl langsam zugegebener kalter Cytofix/Cytoperm-Lösung gründlich gemischt. Die Versuchsgefäße wurden dann für 20 Minuten auf Eis im Dunklen inkubiert. Nach Zentrifugation und Abgießen des Überstandes in einem Zuge folgte ein Waschschrift mit 1 ml kaltem Perm/Wash-Puffer.

2.6.4.3 Färbung mit Primärantikörper

An das Waschen schloss sich die Resuspendierung in 1 ml kaltem Perm/Wash-Puffer und die Zentrifugation an. Daraufhin wurde die überstehende Flüssigkeit bis auf ein Restvolumen von ca. 50 µl abpipettiert und das verbliebene Zellpellet resuspendiert. Nach Zugabe von 1 µl der unverdünnten Primärantikörperlösung wurden die Ansätze vorsichtig gemischt und 30 Minuten lang auf Eis im Dunklen inkubiert. Im Anschluss an die Inkubation konnten nicht gebundene Antikörpermoleküle durch zwei Waschschrift aus der Zellsuspension entfernt werden. Jeder Waschschrift bestand aus der Zugabe von je 1 ml kaltem Perm/Wash-Puffer, gründlichem Mischen, Zentrifugation und der Entfernung des Überstandes durch zügiges Abgießen.

2.6.4.4 Färbung mit Sekundärantikörper

Das verbleibende Restvolumen über den Zellpellets nach dem abschließenden Waschschrift betrug etwa 100 µl. Entsprechend der Beschriftung der Rundbodenröhrchen wurde den Ansätzen 20 µl, 10 µl, 5 µl bzw. 2,5 µl der unverdünnten Sekundärantikörperlösung zugegeben. Dadurch wurden Mischungsverhältnisse von 16,67 µl, 9,09 µl, 4,76 µl und 2,44 µl pro 100 µl erreicht. Das Rundbodenröhrchen der Negativkontrolle blieb ohne Sekundärantikörper. Die Inkubationszeit betrug wieder 30 Minuten und geschah auf Eis im Dunklen. Es folgten zwei Waschschrift mit je 1 ml kaltem Perm/Wash-Puffer und zwei weitere Waschschrift mit je 2 ml kaltem PBS.

2.6.4.5 Fixierung und Filtrierung

Der resuspendierten Zellsuspension wurde je 1 ml kalter 2 %iger Formaldehydlösung zugegeben. Nach kräftigem Mischen unter Vermeidung von Blasenbildung konnten die Ansätze bis zur Auswertung bei 4 °C und Lichtabschluss aufbewahrt werden. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen resuspendiert und durch einen Nylonfilter der Porenweite 35 µm gesiebt [Owens et al., 2000]. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen. Danach schloss sich die durchflusszytometrische Analyse der Proben an.

2.6.5 Bestimmung der CYP2A6-Konzentration im Zeitverlauf der Kultivierung

2.6.5.1 Untersuchungszeitpunkte

Aus Nasenschleimhautproben wurden Miniorgankulturen angelegt. Zu verschiedenen Zeitpunkten der Kultivierung wurden Aliquots dieser Kulturen in Einzelzellsuspensionen aufgetrennt und auf ihren Gehalt an Cytochrom P450 2A6 untersucht. Der Ablauf der Kultivierung und die Versuchszeitpunkte sind in Abbildung 2-6 dargestellt.

2.6.5.2 Herstellung der Teströhrchen

An die Gewinnung der Einzelzellsuspension schloss sich die Zellzählung und Vitalitätsbestimmung mit dem Trypanblau-Ausschlusstest an. Die Suspension wurde dann auf drei 5 ml Rundbodenröhrchen mit je $0,8 \times 10^6$ Zellen verteilt [Owens et al., 2000]. Das erste Röhrchen enthielt die Zellen für die spätere Inkubation mit dem Anti-Cytochrom-P450-2A6-Antikörper. Der zweite Ansatz diente als Isotypkontrolle und der dritte als Primärantikörper-Auslasskontrolle. Die drei Rundbodenröhrchen wurden entsprechend mit *Test*, *Isotyp* und *Primär* beschriftet. Es wurde besonders darauf geachtet, im Ansatz der Isotypkontrolle und in dem Ansatz, der mit dem CYP 2A6-Antikörper inkubiert wurde, die Zellkonzentration identisch zu halten, um das Verhältnis von Zellen zu Primär- bzw. Isotyp-Antikörper gleich zu halten [Smith und Ellis, 1999]. Zu jedem Rundboden-Röhrchen wurden dann 2 ml PBS zugegeben, daran schlossen sich die Zentrifugation und das Abgießen des Überstandes an. Alle Versuchsschritte geschahen unter Lichtabschluss oder langwelligem Rotlicht, um eine Zellschädigung oder ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffs zu vermeiden.

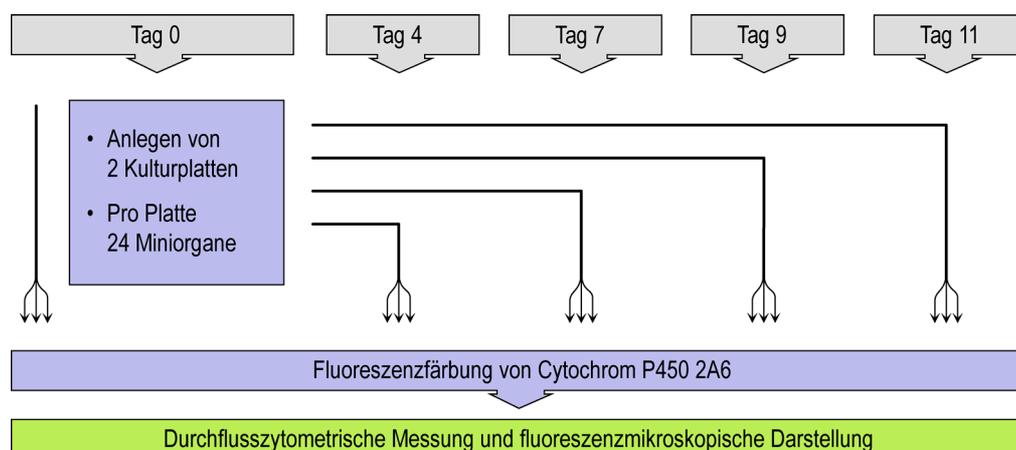


Abbildung 2-6 Versuchsschema zur Quantifizierung von Cytochrom P450 2A6 im Verlauf der Kultivierung der Miniorgane.



Enzymatische und mechanische Aufteilung des Zellverbands in Einzelzellen.

2.6.5.3 Fixierung und Permeabilisierung der Zell- und Organellmembranen

Die Zellpellets wurden zuerst vorsichtig mit dem Vortex-Schüttler in der Restflüssigkeit resuspendiert, darauf folgte die langsame Zugabe von 250 µl kalter Cytofix/Cytoperm-Lösung pro Ansatz. Dabei befand sich die Zellsuspension weiter auf dem Vortex-Schüttler in Bewegung, um die Aggregation der Zellen während der Fixierung zu vermeiden. Die Versuchsgefäße wurden dann für 20 Minuten auf Eis im Dunklen inkubiert. Es schlossen sich Zentrifugation, Abgießen und ein Waschschrift mit 1 ml kaltem Perm/Wash-Puffer an.

2.6.5.4 Färbung mit Primärantikörper und Anfertigung der Kontrollen

Bei den Ansätzen, denen der Anti-CYP2A6-Antikörper zugegeben werden sollte, wurde nach Zugabe von 1 ml kaltem Perm/Wash-Puffer, gründlichem Mischen und Zentrifugation die überstehende Flüssigkeit bis auf ein Restvolumen von ca. 50 µl abgesaugt. Daraufhin wurden die Ansätze resuspendiert und 1 µl der unverdünnten Primärantikörperlösung beigefügt. Eine identische Antikörperkonzentration der Isotypkontrolle konnte erreicht werden, indem die Ansätze der Isotypkontrolle bis auf ca. 12 µl abgesaugt und nach Zugabe von 38 µl unverdünnter Isotyp-Antikörperlösung resuspendiert wurden. Bei der Primärantikörper-Auslasskontrolle unterblieb nach Absaugen des Überstandes die Zugabe eines Antikörpers. An die folgende Inkubationszeit von 30 Minuten auf Eis im Dunklen schlossen sich zwei Waschschriffe zur Entfernung nicht gebundener Antikörpermoleküle aus der Zellsuspension an. Dazu wurde jeweils 1 ml kalter Perm/Wash-Puffer zugegeben, die Suspension zentrifugiert und der Überstand verworfen.

2.6.5.5 Färbung mit Sekundärantikörper

Auf das Abgießen des Überstandes nach dem letzten Waschschrift folgte die Zugabe von je 10 µl unverdünnter Antikörperlösung pro Ansatz. Die Inkubation fand wieder auf Eis im Dunklen für 30 Minuten statt. Daran schlossen sich zwei Waschschriffe mit je 1 ml kaltem Perm/Wash-Puffer und zwei weitere Waschschriffe mit je 2 ml kaltem PBS an.

2.6.5.6 Fixierung und Filtrierung

Den Zellsuspensionen wurde je 1 ml kalter 2 %iger Formaldehydlösung zugegeben. Nach kräftigem Mischen unter Vermeidung von Blasenbildung konnten die Ansätze bis zur Auswertung bei 4 °C und Lichtabschluss aufbewahrt werden. Vor der durchflusszytometrischen Messung wurden die Zellen gründlich resuspendiert und durch einen Nylonfilter der Porenweite 35 µm gesiebt. Die Zellsuspension wurde anschließend zentrifugiert, der Überstand verworfen. Darauf folgte die durchflusszytometrische Messung.

2.6.6 Durchflusszytometrische Auswertung

Das Absorptionsspektrum von FITC besitzt ein Maximum bei einer Wellenlänge von 495 nm. Als Fluoreszenzfarbstoff emittiert es Licht, wenn es durch Bestrahlung angeregt wird. Das Maximum der relativen emittierten Fluoreszenz liegt bei 519 nm. Mit einem FACSort Durchflusszytometer wurden die Zellsuspensionen unter Nutzung der CellQuest-Software (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert. Die Messung aller Ansätze eines Versuchs erfolgte in derselben Sitzung. Typischerweise wurden 10.000 Partikel gemessen. Der Detektor des Zytometers für das Vorwärtsstreulicht wurde auf E -1 eingestellt, d.h. das registrierte FSC-Signal wurde vor der Weiterverarbeitung

mit 10^{-1} multipliziert. Eine Intensitätsschwelle für die Signale des Vorwärtsstreulichts wurde bei Kanal 410 gesetzt, um Verunreinigungen suffizient aus der Messung auszublenden. An den Detektor für das Seitwärtsstreulicht wurde eine Spannung von 251 V angelegt, an die Lichtverstärkungsrohre des Fluoreszenzkanals FL1 eine Spannung von 430 V. Der Detektionsbereich des Kanals FL1, 515 nm bis 545 nm, beinhaltet das Maximum der von FITC emittierten Fluoreszenz. Alle Werte wurden über eine vier Dekaden umfassende Intensitätsskala logarithmisch erfasst.

2.7 Graphische Darstellung der Ergebnisse und statistische Analyse

2.7.1 Diagramme

2.7.1.1 Boxplots

Beim Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay ging für jeden Versuchsansatz der arithmetische Mittelwert der OTM-Werte der gemessenen 80 Zellen in die weiteren Berechnungen ein. Die Ergebnisse wurden graphisch durch Boxplots dargestellt, die mit dem Programm SPSS 11.0.1 (SPSS GmbH Software, München) erzeugt wurden.

In den Boxplots zeigt die untere Begrenzung des Kastens das erste Quartil, d.h. 25 % aller Werte liegen unterhalb dieser Linie. Die Mittellinie wird durch den Median gebildet, d.h. 50 % aller Werte liegen unterhalb und 50 % oberhalb der Linie. Die obere Begrenzung des Kastens wird schließlich durch das dritte Quartil festgelegt, d.h. 75 % aller Werte liegen unterhalb dieser Linie. Werte, die mehr als drei Seitenlängen außerhalb des Kastens liegen, werden als Extremwerte mit einem Stern gekennzeichnet. Werte, die zwischen anderthalb und drei Seitenlängen außerhalb des Kastens liegen, werden als Ausreißer mit einem Kreis gekennzeichnet. Die nach oben und unten reichenden Linien zeigen den Maximal- und den Minimalwert im Bereich von anderthalb Seitenlängen ober- und unterhalb des Kastens.

2.7.1.2 Stapelbalkendiagramme

Mit dem Programm Sigmaplot 2000 Version 6.0 (SPSS GmbH Software, München) erstellte Stapelbalkendiagramme wurden zur Illustration der kumulativen Anteile apoptotischer (AV^+/PI^-), nekrotischer (AV^+/PI^+), beschädigter (AV^-/PI^+) und vitaler Zellen (AV^-/PI^-) eingesetzt.

2.7.1.3 Konturdiagramme und Analysefenster

Die durchflusszytometrisch gewonnenen Daten wurden in Konturdiagrammen dargestellt. Im Gegensatz zu Punktdiagrammen, in denen zwei Parameter als Punktwolke direkt gegeneinander aufgetragen werden, wird in Konturdiagrammen die Punktedichte durch konzentrische Konturlinien ähnlich den Höhenlinien in einer Landkarte dargestellt. Diese Form der Darstellung liefert also zusätzlich Informationen über die Häufigkeit jeder Parameterkombination. Die Diagramme wurden mit dem Programm WinMDI Version 2.8 (Joseph Trotter, La Jolla, CA, USA) erzeugt.

Zu Beginn der Datenanalyse wurden die Parameter Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht eines Kontrollansatzes in einem Konturdiagramm gegeneinander aufgetragen. Der Abstand zwischen zwei Konturlinien entsprach dabei einem linearen Anstieg der Häufigkeit des Auftretens um 10 %. In diesem Diagramm wurde graphisch die Region selektiert, in der sich der Hauptteil der gemess-

senen Partikel befand. Die Definition dieses Analysefensters (*Gating*) erlaubte die Auswahl der relevanten Zellpopulationen unter Ausblendung von Verunreinigungen und Zelltrümmern. Das gewählte Fenster konnte zur Analyse aller Ansätze eines Versuchs beibehalten werden, da sich Vorwärtsstreulicht und Seitwärtsstreulicht in Kontrollen und spezifisch gefärbten Ansätzen nicht unterschieden. Nur die durch das Fenster eingegrenzten Partikel wurden in den nächsten Analyseschritt miteinbezogen [Weaver, 2000].

2.7.1.4 Histogramme und Markierungen

Waren die gewünschten Partikel im Konturdiagramm ausgewählt, so wurde ihre Verteilung mit dem Programm WinMDI Version 2.8 in Histogrammen weiter analysiert. In diesen Graphiken wird in einer Kurve dargestellt, wie viele Partikel pro Fluoreszenzkanal registriert worden sind. Bei allen Versuchen wurde von der gewählten Zellpopulation die Häufigkeitsverteilung der Fluoreszenzintensitäten im Fluoreszenzkanal FL1 im Histogramm dargestellt. Aus dieser Kurve errechnete das Analyseprogramm für jeden Versuchsansatz den geometrischen Mittelwert, der in die weiteren Berechnungen einging. Der geometrische Mittelwert ergibt sich aus dem Produkt aller n Werte und anschließender n -ter Wurzelbildung. Er ist im Vergleich zum arithmetischen Mittelwert robuster gegen Ausreißer und besser für logarithmisch verstärkte Daten geeignet [Werner, 1992a; Osborne, 2001].

Bei den Titrationsversuchen wurde zusätzlich im Histogramm der Isotypkontrolle der Kanal bestimmt, von dem aus gesehen 99 % der Partikel links und 1 % der Partikel rechts lagen. Dieser Kanal galt in den Histogrammen der spezifisch gefärbten Ansätze als Grenze zwischen CYP 2A6-negativ und -positiv gefärbten Zellen. Aus der Anzahl positiv gefärbter Zellen und der Gesamtzahl der Zellen errechnete das Programm den prozentualen Anteil CYP 2A6-positiver Zellen [Givan, 1992a]. Die resultierenden Werte wurden in eine Microsoft Excel-Tabelle überführt und mit dem Programm Sigmaplot 2000 Version 6.0 in einem Punktdiagramm graphisch dargestellt.

2.7.1.5 Punktdiagramme

Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde mit dem Programm Sigmaplot 2000 Version 6.0 in Punktdiagrammen gegen das *Olive Tail Moment* als Maß für die DNS-Fragmentierung aufgetragen. Um Unterschiede in der Verteilung der Punkte zwischen Negativkontrollen und genotoxischen Testsubstanzen zu veranschaulichen, wurden die Diagramme in vier Quadranten eingeteilt. Die vertikalen und horizontalen Linien wurden dabei so gesetzt, dass sich alle Werte der Negativkontrolle gerade im linken unteren Quadranten befanden.

Die in Konturdiagrammen und Histogrammen aus den Daten der Titrationsreihen errechneten Werte wurden ebenfalls in Punktdiagrammen dargestellt. Dabei wurde der geometrische Mittelwert und der Anteil CYP2A6-positiver Zellen in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration aufgetragen. Die Punkte wurden dann durch Regressionskurven verbunden. Diese wurden wie die Punktdiagramme mit dem Programm Sigmaplot 2000 Version 6.0 erstellt. Der gewählte Funktionstyp nimmt dabei einen exponentiellen Anstieg bis zu einem Maximum an (Gleichung: $y = a \cdot (1 - e^{-bx})$). Das Programm bestimmt dann mit dem Marquardt-Levenberg-Algorithmus die Koeffizienten der Formel, bei denen sich der Graph dem Verlauf der gemessenen Werte optimal anpasst. Als Optimierungskriterium gilt bei diesem Algorithmus die Minimierung

der Summe der quadratischen Abweichungen der gemessenen von den berechneten Werten der abhängigen Variablen. Die abhängigen Variablen waren im vorliegenden Fall die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität und der prozentuale Anteil positiver Zellen [Werner, 1992a; Werner, 1992c].

2.7.2 Statistische Testverfahren

Für die statistischen Tests zu Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay, Annexin-V-Affinitätstest und CYP2A6-Gehalt wurde das Programm SPSS 11.0.1 verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit α wurde als allgemeines Signifikanzniveau (p -Wert) vor den Testverfahren mit 0,05 festgelegt [Werner, 1992c].

2.7.2.1 Wilcoxon-Test

Beim Wilcoxon-Test handelt es sich um einen nichtparametrischen Test. Er überprüft zwei verbundene Variablen auf die Hypothese hin, nach der beide Variablen dieselbe Verteilung haben. Dabei werden keine Annahmen über die Form der Verteilung der beiden Variablen gemacht. Der Wilcoxon-Test berücksichtigt für jedes Variablenpaar die Größe der Differenz zwischen den beiden Variablen. So fallen Paare mit größeren Differenzen stärker ins Gewicht als Paare mit kleineren Differenzen [Werner, 1992b].

Wegen der langen Dauer der Versuche und der Vielzahl der Untersuchungen, die an einem Versuchspräparat durchgeführt wurden, waren die bei Einzelzellversuchen und Miniorganversuchen gewonnenen Datenmengen in ihrer Anzahl unausgeglichen. Deshalb wurde zur Berechnung aller Testergebnisse die exakte SPSS-Methode angewendet, die im Gegensatz zur asymptotischen Standard-Berechnungsmethode keine großen Datenmengen oder lückenlose und ausgeglichene Datensätze voraussetzt. Mit dem Wilcoxon-Test wurden die arithmetischen Mittelwerte der OTM-Werte bzw. der prozentualen Anteile apoptotischer Zellen in Testansätzen und Negativkontrollen verglichen. Der Wilcoxon-Test wurde auch für den Vergleich der arithmetischen Mittelwerte bei ein- und dreifacher Inkubation von Miniorganen und Einzelzellen angewandt.

Bei den Versuchen zum Nachweis von CYP2A6 im Zeitverlauf konnte ebenfalls der Wilcoxon-Test eingesetzt werden. Verglichen wurden dabei die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensität der Testansätze mit denen der Antikörper-Auslass- und der Isotypkontrollen. Da die Aussage, die mittlere Fluoreszenzintensität der Kontrollen sei höher als die der gefärbten Proben, von vorneherein als unzutreffend angenommen werden konnte, wurde die Nullhypothese in diesen Tests einseitig formuliert [Werner, 1992c].

2.7.2.2 Friedman-Test

Auch beim Friedman-Test handelt es sich um einen nichtparametrischen Test. Er überprüft mehrere verbundene Variablen auf die Hypothese hin, nach der alle Variablen dieselbe Verteilung haben. Der Friedman-Test wird bei Versuchen mit Messwiederholungen bei einer Stichprobe angewendet [Werner, 1992b]. Er wurde bei der Untersuchung des CYP2A6-Gehalts eingesetzt, um herauszufinden, ob sich die geometrischen Mittelwerte der Fluoreszenzintensitäten im Zeitverlauf voneinander unterscheiden. Auch für diese Berechnungen wurde die exakte SPSS-Methode gewählt.

2.8 Verwendete Geräte und Reagenzien

2.8.1 Reagenzien

Chemikalien	
Dimethylsulfoxid (DMSO, C ₂ H ₆ OS)	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid (C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃)	Sigma, Steinheim
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Na ₂ EDTA, C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈)	Serva, Heidelberg
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Formaldehydlösung 4 % (CH ₂ O)	Otto Fischar, Saarbrücken
Low-Melting-Temperature-Agarose 0,7 % (Sea-Plaque GTG agarose)	FMC-Bio Products, Rockland, MA, USA
<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin (MNNG, C ₂ H ₅ N ₅ O ₃ , CAS-Nr. 70-25-7)	Fluka, Neu-Ulm
<i>N</i> -Nitrosodiethylamin (NDEA, C ₄ H ₁₀ N ₂ O, CAS-Nr. 55-18-5)	Sigma, Steinheim
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Steinheim
Natriumdichromat (Na ₂ Cr ₂ O ₇ , CAS-Nr. 10588-01-9)	Sigma, Steinheim
Natriumhydrogenkarbonat (NaHCO ₃)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid-Plättchen (NaOH)	Merck, Darmstadt
<i>N</i> -Lauroylsarcosin-Natriumsalz 1 % (C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br)	Sigma, Steinheim
Normal-Melting-Agarose 0,5 % (Seakem LE agarose)	FMC-Bio Products, Rockland, MA, USA
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS, ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbikarbonat)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Trishydroxymethylaminomethan (Trizma-Base, C ₄ H ₁₁ NO ₃)	Merck, Darmstadt
Triton-X 100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol, C ₃₄ H ₆₂ O ₁₁)	Sigma, Steinheim
Trypanblau-Lösung 0,4 % (C ₃₄ H ₂₃ N ₆ O ₁₄ S ₄ Na ₄)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Enzyme	
Hyaluronidase aus Schafshoden	Boehringer, Mannheim
Kollagenase P aus Clostridium histolyticum	Boehringer, Mannheim
Protease aus Streptomyces griseus	Sigma, Steinheim
Medien und Zusätze	
Bronchial Epithelial Basal Medium (BEBM) mit Supplement Pack	Promocell, Heidelberg
Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium (DMEM)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Amphotericin B (Fungizone)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N</i> '-2-ethansulfonsäure (HEPES)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Nicht-essenzielle Aminosäuren	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin-Lösung	Sigma, Steinheim
Chemikaliensätze	
ApoAlert Annexin-V-FITC Apoptosis Kit: Annexin V-FITC (20 µg/ml in Trizma-Base/NaCl) Bindungspuffer Propidiumjodid-Lösung (50 µg/ml Bindungspuffer)	BD Clontech, Heidelberg
Cytofix/Cytoperm-Kit: Cytofix/Cytoperm-Lösung Perm/Wash-Puffer (10x konzentriert)	BD Pharmingen, San Diego, CA, USA

Antikörper	
Anti-human P450 2A6, monoklonaler Maus-IgG ₁ -Antikörper: Proteinkonzentration 9,86 mg/ml TBS mit 0,1 % Natriumazid Immunglobulingehalt 1,90 mg/ml	Assay Designs, Ann Arbor, MI, USA
Fluoreszein-markierter polyklonaler Sekundärintikörper der Ziege: Antigen: Maus-IgG ₁ , -IgG _{2a} , -IgG _{2b} und -IgG ₃	BD Immunocytometry Systems, San Jose, CA, USA
Monoklonaler Maus-IgG ₁ -Antikörper für Isotypkontrollen: Antigen: Keyhole limpet hemocyanin (KLH) Klon X40 (Maus IgG ₁ schwere und kappa leichte Ketten) Immunglobulingehalt: 1 µg IgG / 20 µl	BD Biosciences, San Jose, CA, USA

2.8.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	
Combitipps	Eppendorf, Hamburg
Deckgläser zum Mikroskopieren (76 x 26 mm, Glasdicke 0,08-0,12 mm)	Langenbrinck, Emmendingen
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg
Einwegfiltereinheiten Millex-GV und Millex-GS (steril, Porenweite 0,22 µm)	Millipore, Eschborn
Kulturplatten mit 24 Vertiefungen	BD Falcon, Heidelberg
Objektträger	Merck, Darmstadt
Objektträger (70 x 24 mm, je 5 mm seitlich mattiert)	Langenbrinck, Emmendingen
Objektträgerkasten für 50 Objektträger (76 x 26 mm)	GLW, Würzburg
Pipettenspitzen (10 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäß (1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Röhrchen mit Schraubverschluss (50 ml)	Greiner, Frickenhausen
Rundbodenröhrchen (12 x 75 mm, 5 ml, Polystyrol)	BD Falcon, Heidelberg
Rundbodenröhrchen (12 x 75 mm, 5 ml, Polystyrol) und Kappe mit Zellsieb (Porenweite 35 µm, Nylon)	BD Falcon, Heidelberg
Schreibdiamant	Renner, Dannstadt

2.8.3 Software und Geräte

Software	
CellQuest	Becton Dickinson, Heidelberg
Sigmaplot 2000 Version 6.0	SPSS Software, München
Microsoft Excel Version 7.0	Microsoft, Unterschleißheim
Komet 3.1	Kinetic Imaging, Liverpool, Großbritannien
WinMDI Version 2.8	Joseph Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA, 2000
SPSS Version 11.0.1	SPSS Software, München
Geräte	
Analysenwaage Voyager	Ohaus, Gießen
Durchlichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen

Elektrophoresekammer, horizontal (23,7 x 18,0 cm)	Renner, Dannstadt
Elektrophoresenetzgerät E 865	Renner, Dannstadt
FACSort Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg
Fluoreszenzmikroskop DM LB Lichtquellen: Hg-Gasentladungslampe 100 W Halogenlampe 12 V, 100 W	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Fluoreszenzmikroskop DM LB: Filter- & Reflektordaten Filtersystem A: Eingangs-Bandfilter: 340-380 nm Bandpass, dichroitischer Teilerspiegel: 400 nm, Ausgangs-Sperrfilter: 425 nm Langpass Filtersystem I 3 (Blauanregung für FITC und Propidiumjodid): Eingangs-Bandfilter: 450-490 nm Bandpass dichroitischer Teilerspiegel: 510 nm, Ausgangs-Sperrfilter: 515 nm Langpass Filtersystem N 2.1 (Grünanregung für Ethidiumbromid) Eingangs-Bandfilter: 515-560 nm Bandpass dichroitischer Teilerspiegel: 580 nm, Ausgangs-Sperrfilter: 590 nm Langpass	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Fluoreszenzmikroskop DM LB: Objektive 100x / 1,25 Öl 40x / 0,5 10x / 0,22 4x / 0,1	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Gefrierschrank (-80 °C)	New Brunswick Scientific, Nürtingen
Hochleistungs-Monochrom-CCD-Kamera Cohu 4912 (0,02 Lux, 1/2" Sensor)	Cohu, San Diego, CA, USA
Inverses Labormikroskop Leica DM IL für Hellfeld (Durchlichtbeleuchtung)	Leica Mikrosysteme, Bensheim
Kühlschrank (+ 4 °C) und Gefrierschrank	Bosch, Stuttgart
Magnetrührer Combimag RCT	IKA, Staufen
Mikrowelle MWS 2819	Bauknecht, Schorndorf
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Schüttelwasserbad 1083	GFL, Burgwedel
Schüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, NY, USA
Spiegelreflexkamera	Minolta, Japan
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Waage 1419	Sartorius, Gießen
Zellzählkammer nach Neubauer	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen
Zentrifuge Varifuge 3.0 RS und 3.0 R	Heraeus, Hanau

3.1 Zellvitalität

Zum Ausschluss einer Verfälschung der Ergebnisse wurde der Anteil avitaler Zellen bei jedem Versuch mit dem Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Die Vitalität der Zellen lag bei allen durchgeführten Versuchen über 86 %.

3.2 Genotoxische Schäden nach Fremdstoffinkubation

Im Folgenden werden die Versuchsergebnisse präsentiert, die mit dem Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay bei Ein- und Dreifachinkubation von Miniorganen und Einzelzellsuspensionen mit den untersuchten Xenobiotika gewonnen wurden. Nach getrennter Darstellung der Ergebnisse von Miniorgan- und Einzelzellversuchen werden die erzielten stoffspezifischen Resultate direkt gegenübergestellt. Abbildung 3-1 zeigt exemplarisch den Ausschnitt eines Objektträgers nach einmaliger Exposition der Zellen im Gewebeverbund der Miniorgane gegenüber MNNG. Neben Zellkernen, die nach der Elektrophorese einen Schweif fragmentierter DNS bilden, sind auch Zellkerne ohne messbare Schädigung erkennbar. In die statistische Analyse ging pro Versuchsansatz der arithmetische Mittelwert der OTM-Werte von 80 zufällig ausgesuchten Zellen ein.

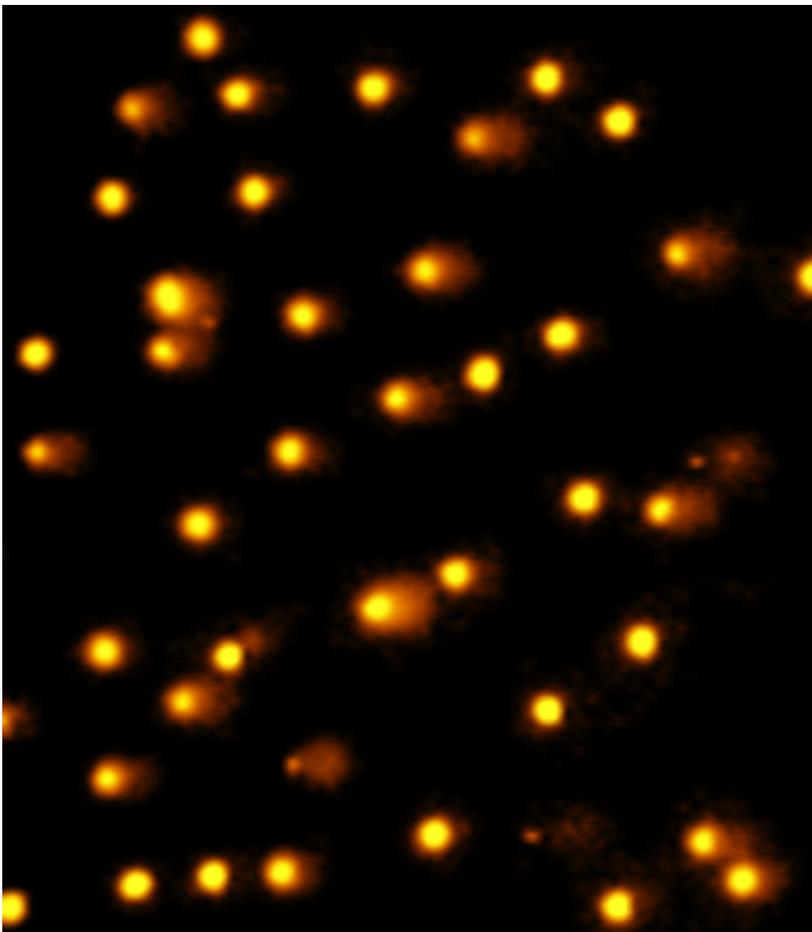


Abbildung 3-1 Ausschnitt des fluoreszenzmikroskopischen Bildes eines Objektträgers nach einmaliger Exposition der Zellen im Gewebeverbund der Miniorgane gegenüber *N*-Methyl-*N*'-nitro-*N*-nitrosoguanidin (aufgenommen mit 400facher Vergrößerung).

3.2.1 Genotoxische Schäden bei Ein- und Dreifachinkubation von Miniorganen

3.2.1.1 Natriumdichromat

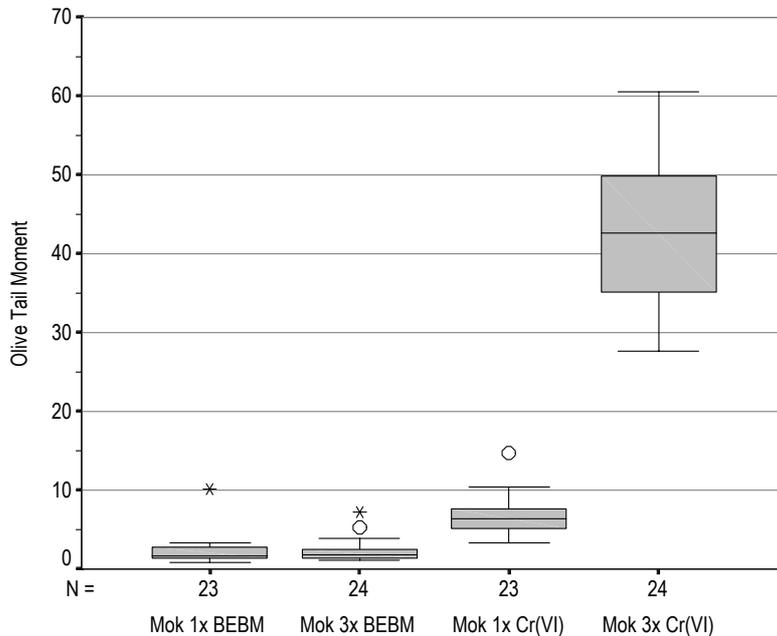


Abbildung 3-2 Boxplot-Darstellung des Ausmaßes der genetischen Schädigung durch Natriumdichromat.

Mok 1x: Einmalige Exposition der Miniorgane an Tag 11,

Mok 3x: Dreimalige Exposition der Miniorgane an Tag 7, 9 und 11,

BEBM: *Bronchial Epithelial Basal Medium*, Cr(VI): Natriumdichromat (1 mM, 1 h),

N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer,

×: Extremwert.

Die ein- bzw. dreimal mit dem Kulturmedium BEBM inkubierten Miniorgane dienen in den durchgeführten Versuchen als Negativkontrollen. Im Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay präsentieren sie mit medianen OTM-Werten von 1,7 und 1,9 niedrige DNS-Fragmentierungsgrade.

Im Gegensatz dazu bewirkt die einmalige Inkubation der Miniorgane mit Natriumdichromat ein deutlich erhöhtes DNS-Schädigungsniveau. Der OTM-Median beträgt hier 6,3. Bei dreimaliger Inkubation kommt es zu einer weiteren starken Zunahme der Schädigung mit einem Anstieg des OTM-Medians auf 42,6.

Tabelle 3-1 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

Mok 1x BEBM vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x Cr(VI) vs. Mok 1x BEBM	Mok 3x Cr(VI) vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x Cr(VI) vs. Mok 3x Cr(VI)
$p=0,917$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$

3.2.1.2 N-Nitrosodiethylamin

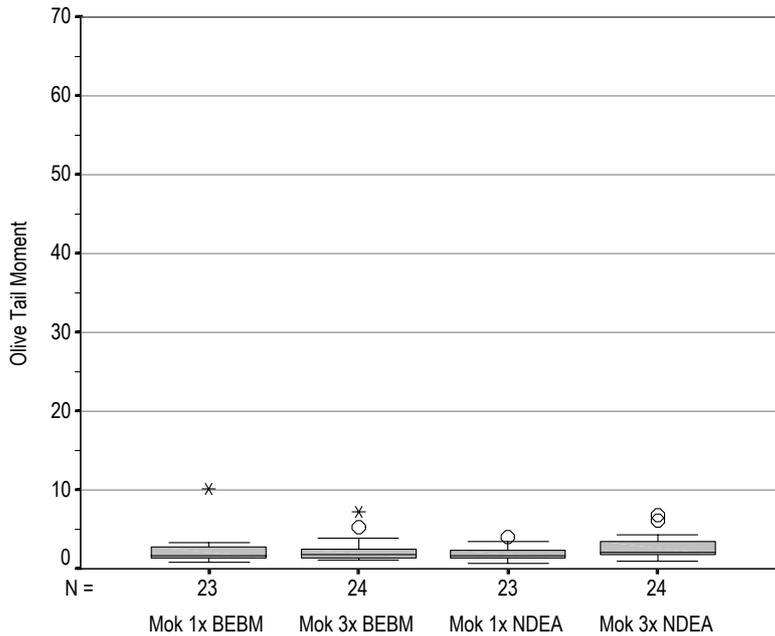


Abbildung 3-3 Boxplot-Darstellung des Ausmaßes der genetischen Schädigung durch NDEA.

Mok 1x: Einmalige Exposition der Miniorgane an Tag 11,

Mok 3x: Dreimalige Exposition der Miniorgane an Tag 7, 9 und 11,

BEBM: *Bronchial Epithelial Basal Medium*,

NDEA: *N-Nitrosodiethylamin* (50 mM, 1 h),

N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer,

✖: Extremwert.

Bei Inkubation mit NDEA zeigt sich ein deutlich anderes Ergebnis als bei Einsatz von Natriumdichromat. Weder nach einmaliger, noch nach dreimaliger Durchführung lässt sich hier ein signifikant erhöhtes Schädigungsniveau gegenüber den Negativkontrollen nachweisen. Die Mediane der OTM-Werte betragen 1,6 und 2,1 gegenüber 1,7 und 1,9 in den Negativkontrollen.

Im Vergleich des DNS-Fragmentierungsgrades bei NDEA-Exposition zu drei Zeitpunkten mit der einmaligen Exposition ergibt sich allerdings ein signifikanter Unterschied.

Tabelle 3-2 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

Mok 1x BEBM vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x NDEA vs. Mok 1x BEBM	Mok 3x NDEA vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x NDEA vs. Mok 3x NDEA
$p=0,917$	$p=0,273$	$p=0,107$	$p=0,007$

3.2.1.3 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

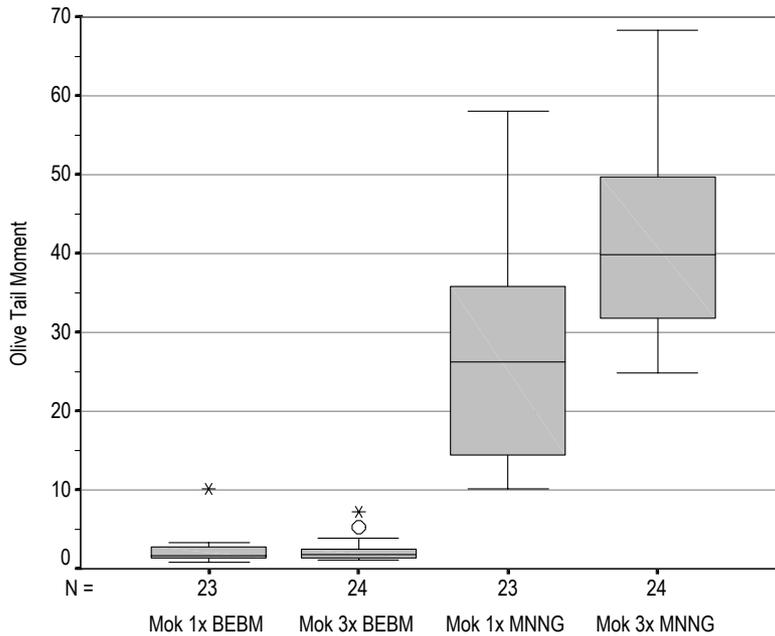


Abbildung 3-4 Boxplot-Darstellung des Ausmaßes der genetischen Schädigung durch MNNG.

Mok 1x: Einmalige Exposition der Miniorgane an Tag 11,

Mok 3x: Dreimalige Exposition der Miniorgane an Tag 7, 9 und 11,

BEBM: *Bronchial Epithelial Basal Medium*,
 MNNG: *N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin* (0,07 mM, 1 h),

N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer,

* : Extremwert.

Für die Dreifachinkubation ergibt sich in den Versuchen mit MNNG bei größerer Streubreite ein ähnliches Schädigungsniveau wie mit Natriumdichromat. Der mediane OTM erreicht 39,9. Anders als Natriumdichromat bewirkt MNNG aber bereits nach einmaliger Inkubation bei ebenfalls großer Streubreite einen sehr hohen Grad der DNS-Fragmentierung. Der OTM-Median beträgt für diesen Versuchsansatz 26,2.

Sowohl im Vergleich mit den Negativkontrollen als auch im Vergleich der Ein- und Dreifachinkubation werden bei Einsatz von MNNG signifikante Unterschiede erzielt.

Tabelle 3-3 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

Mok 1x BEBM vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x MNNG vs. Mok 1x BEBM	Mok 3x MNNG vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x MNNG vs. Mok 3x MNNG
$p=0,917$	$p<0,001$	$p<0,001$	$p<0,001$

3.2.2 Genotoxische Schäden bei Ein- und Dreifachinkubation von Einzelzellen

3.2.2.1 Natriumdichromat

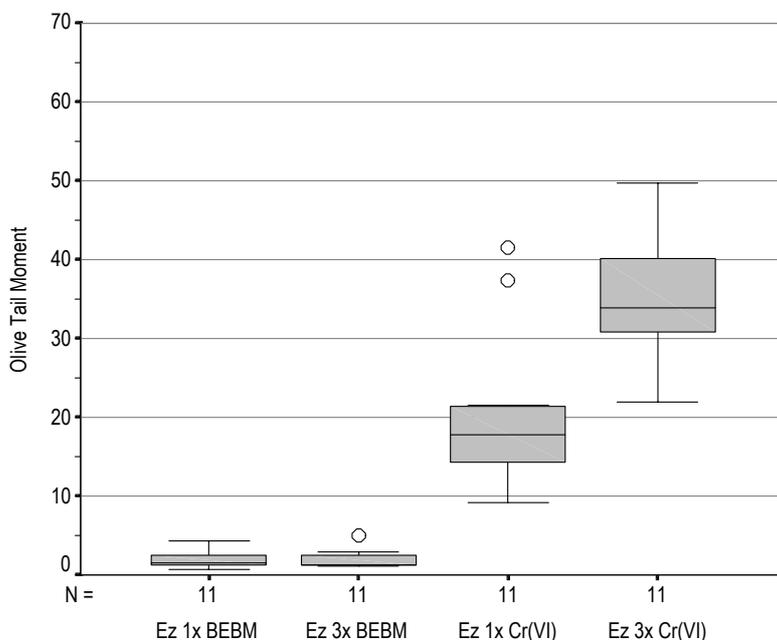


Abbildung 3-5 Boxplot-Darstellung des Ausmaßes der genetischen Schädigung durch Natriumdichromat.

Ez 1x: Einmalige Exposition der Einzelzellen an Tag 11,
 Ez 3x: Exposition der Einzelzellen an Tag 11 nach zweimaliger Exposition der Miniorgane an Tag 7 und 9,
 BEBM: *Bronchial Epithelial Basal Medium*,
 Cr(VI): Natriumdichromat (1 mM, 1 h),
 N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer.

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Versuche mit Einzelzellsuspensionen dargestellt, die parallel zu den Miniorganversuchen an Präparaten derselben Spender durchgeführt wurden.

Wie bei den Miniorgan-Versuchen wurde hier das Kulturmedium BEBM für die Negativkontrollen eingesetzt. In Analogie zu den Negativkontrollen der Miniorgane ergeben sich mit medianen OTM-Werten von 1,5 und 1,3 niedrige DNS-Fragmentierungsgrade.

Die einfache Inkubation der Einzelzellen mit Natriumdichromat bewirkt dagegen eine deutliche Erhöhung der gemessenen DNS-Schädigung. Der Median der OTM-Werte beträgt 17,7. Bei zweifacher Vorinkubation der Zellen als Miniorgane steigt der OTM-Median auf 33,8 und liegt damit erheblich über dem Schädigungsgrad der Negativkontrolle und dem Ergebnis bei einmaliger Exposition.

Tabelle 3-4 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

Ez 1x BEBM vs. Ez 3x BEBM	Ez 1x Cr(VI) vs. Ez 1x BEBM	Ez 3x Cr(VI) vs. Ez 3x BEBM	Ez 1x Cr(VI) vs. Ez 3x Cr(VI)
$p=0,570$	$p=0,001$	$p=0,001$	$p=0,012$

3.2.2.2 N-Nitrosodiethylamin

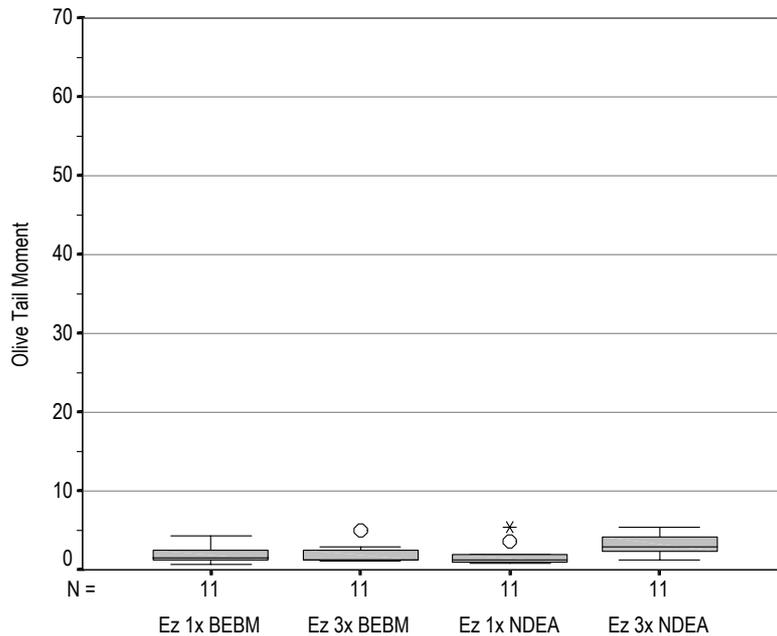


Abbildung 3-6 Boxplot-Darstellung des Ausmaßes der genetischen Schädigung durch NDEA.

Ez 1x: Einmalige Exposition der Einzelzellen an Tag 11,
 Ez 3x: Exposition der Einzelzellen an Tag 11 nach zweimaliger Exposition der Miniorgane an Tag 7 und 9,
 BEBM: *Bronchial Epithelial Basal Medium*,
 NDEA: *N-Nitrosodiethylamin* (50 mM, 1 h),
 N: Anzahl der Versuche, ○ : Ausreißer,
 * : Extremwert.

Wie schon bei der Inkubation der Miniorgane festgestellt, ergibt sich bei Exposition der Einzelzell-suspensionen gegenüber NDEA keine statistisch signifikante DNS-Schädigung.

Bei einmaliger Inkubation der Einzelzellen mit NDEA liegt der OTM-Median bei 1,3 im Vergleich zu 1,5 in der Negativkontrolle mit BEBM. Bei zweimaliger Vorinkubation als Miniorgane vor der dritten Inkubation mit NDEA ist ein im Gegensatz zur Negativkontrolle leicht erhöhter OTM-Median von 3,0 messbar. Das Signifikanzniveau wird in diesem Fall nur knapp verfehlt.

Im Vergleich der einfachen mit der dreifachen NDEA-Inkubation mit ergibt sich kein statistisch signifikanter Unterschied.

Tabelle 3-5 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert.

Ez 1x BEBM vs. Ez 3x BEBM	Ez 1x NDEA vs. Ez 1x BEBM	Ez 3x NDEA vs. Ez 3x BEBM	Ez 1x NDEA vs. Ez 3x NDEA
$p=0,570$	$p=0,465$	$p=0,054$	$p=0,074$

3.2.2.3 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

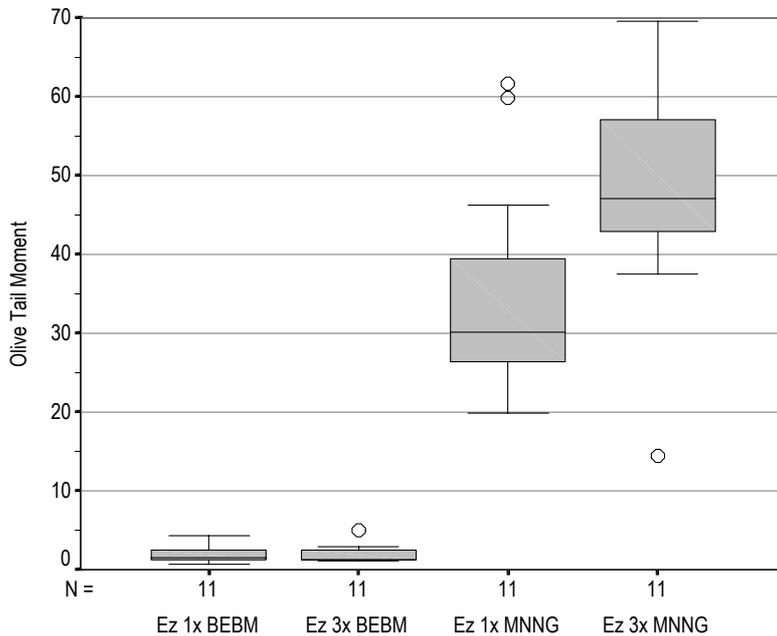


Abbildung 3-7 Boxplot-Darstellung des Ausmaßes der genetischen Schädigung durch MNNG.

Ez 1x: Einmalige Exposition der Einzelzellen an Tag 11,

Ez 3x: Exposition der Einzelzellen an Tag 11 nach zweimaliger Exposition der Miniorgane an Tag 7 und 9,

BEBM: *Bronchial Epithelial Basal Medium*,
 MNNG: *N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin* (0,07 mM, 1 h),

N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer.

Bei Einsatz von MNNG ergibt sich ein ähnliches Muster der DNS-Fragmentierung wie bei den Versuchen mit Natriumdichromat. Insgesamt liegt das Schädigungsniveau aber erheblich höher. Bei einfacher bzw. dreifacher Inkubation der Einzelzellen mit MNNG ergeben sich OTM-Medianwerte von 30,2 bzw. 47,1.

Sowohl beim Vergleich mit den Negativkontrollen als auch beim Vergleich der Ein- und Dreifachinkubation ergeben sich in den Versuchen mit MNNG signifikante Unterschiede.

Tabelle 3-6 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

Ez 1x BEBM vs. Ez 3x BEBM	Ez 1x MNNG vs. Ez 1x BEBM	Ez 3x MNNG vs. Ez 3x BEBM	Ez 1x MNNG vs. Ez 3x MNNG
$p=0,570$	$p=0,001$	$p=0,001$	$p=0,020$

3.2.3 Vergleich der genotoxischen Schäden bei einfacher Inkubation von Miniorganen und Einzelzellen

3.2.3.1 Natriumdichromat

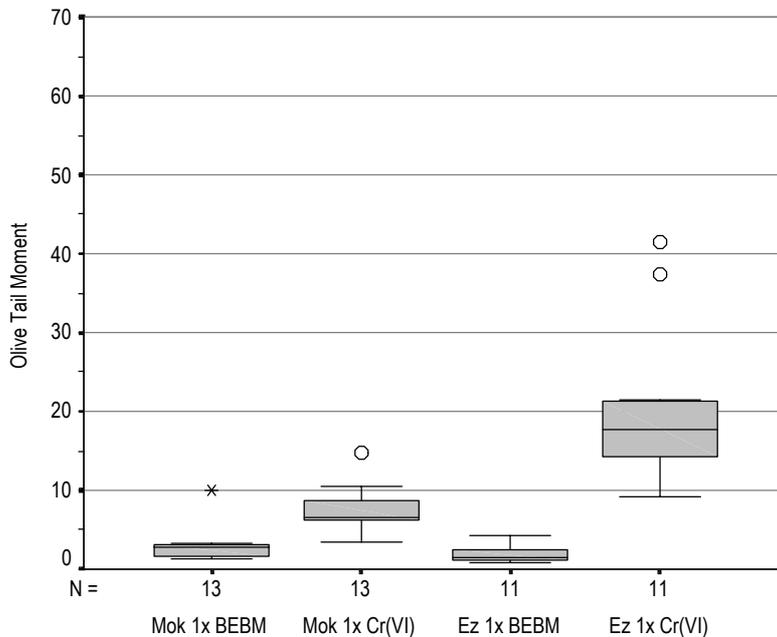


Abbildung 3-8 Boxplot-Darstellung des Ausmaßes der genetischen Schädigung durch Natriumdichromat.

Mok 1x: Einmalige Exposition der Miniorgane an Tag 11,

Ez 1x: Einmalige Exposition der Einzelzellen an Tag 11,

BEBM: *Bronchial Epithelial Basal Medium*,

Cr(VI): Natriumdichromat (1 mM, 1 h),

N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer,

* : Extremwert.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Einzelzellversuche bei einmaliger Inkubation den Ergebnissen der entsprechenden Miniorganversuche gegenübergestellt.

Hinsichtlich der Negativkontrollen liegen die OTM-Mediane bei den Miniorganen mit 2,8 etwas höher als bei den Einzelzellen mit 1,5. Dieser Unterschied ist signifikant.

Im Vergleich der Ansätze mit Natriumdichromat zeigt sich eine weitaus höhere Schädigung der Zellen der Einzelzellsuspensionen als der Zellen der Miniorgane. Die medianen OTM-Werte betragen 17,7 bzw. 6,6.

Tabelle 3-7 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

Mok 1x BEBM vs. Ez 1x BEBM	Mok 1x Cr(VI) vs. Ez 1x Cr(VI)
$p=0,042$	$p=0,001$

3.2.3.2 N-Nitrosodiethylamin

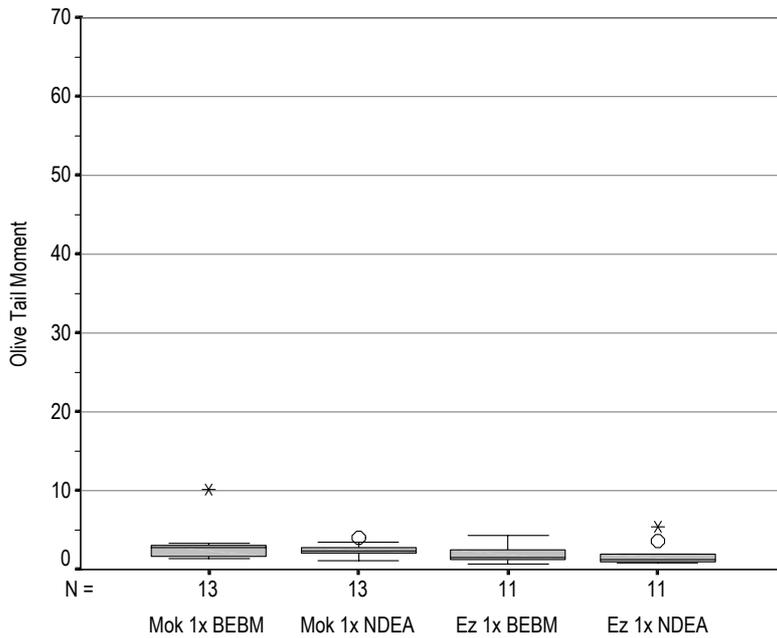


Abbildung 3-9 Boxplot-Darstellung des Ausmaßes der genetischen Schädigung durch NDEA.

Mok 1x: Einmalige Exposition der Miniorgane an Tag 11,

Ez 1x: Einmalige Exposition der Einzelzellen an Tag 11,

BEBM: *Bronchial Epithelial Basal Medium*,

NDEA: *N*-Nitrosodiethylamin (50 mM, 1 h),

N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer,

*: Extremwert.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Natriumdichromat ist bei der Exposition gegenüber NDEA kein Unterschied im Schädigungsausmaß feststellbar. Bei einmaliger Inkubation der Miniorgane resultiert ein OTM-Median von 2,3 gegenüber einem Wert von 1,3 bei der Inkubation der Einzelzellen.

Tabelle 3-8 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

Mok 1x BEBM vs. Ez 1x BEBM	Mok 1x NDEA vs. Ez 1x NDEA
$p=0,042$	$p=0,206$

3.2.3.3 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

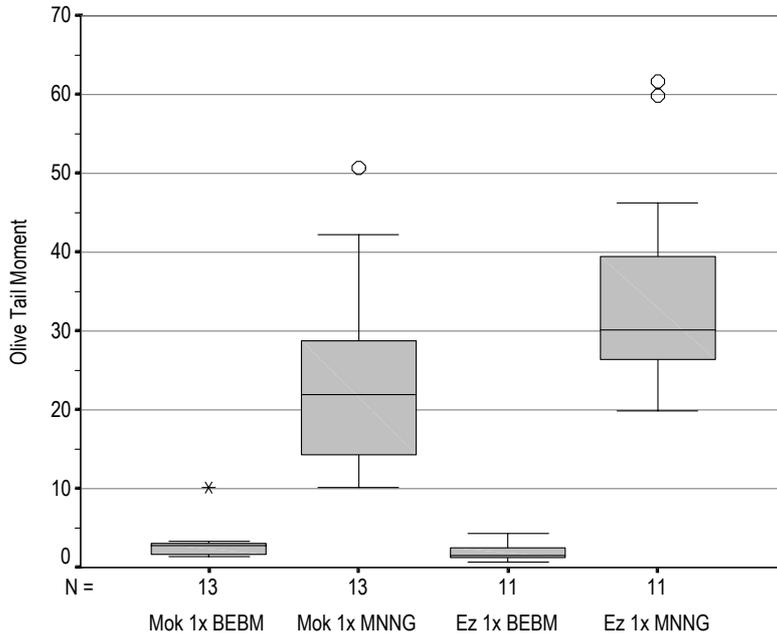


Abbildung 3-10 Boxplot-Darstellung des Ausmaßes der genetischen Schädigung durch MNNG.

Mok 1x: Einmalige Exposition der Miniorgane an Tag 11,

Ez 1x: Einmalige Exposition der Einzelzellen an Tag 11,

BEBM: *Bronchial Epithelial Basal Medium*,
 MNNG: *N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin* (0,07 mM, 1 h),

N: Anzahl der Versuche, ○: Ausreißer,

×: Extremwert.

Im Vergleich der Versuche mit MNNG ergibt sich ein ähnliches Bild wie bei den Versuchen mit Natriumdichromat. Das Schädigungsniveau und die Streubreite der Ergebnisse sind allerdings deutlich höher. Die einmalige Exposition der Miniorgane gegenüber MNNG resultiert in einem medianen OTM von 21,9. Dieser Wert wird in den Einzelzellversuchen deutlich übertroffen. Hier liegt der mediane OTM bei 30,2.

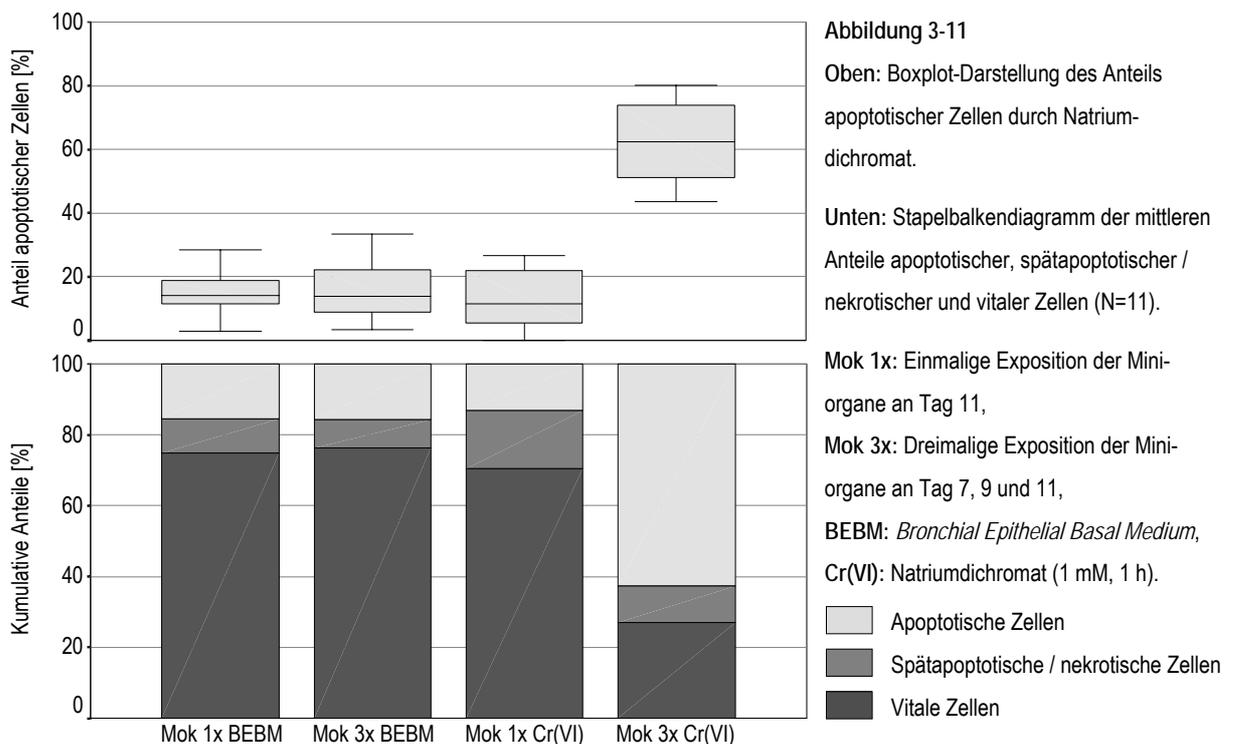
Tabelle 3-9 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

Mok 1x BEBM vs. Ez 1x BEBM	Mok 1x MNNG vs. Ez 1x MNNG
$p=0,042$	$p=0,005$

3.3 Genotoxische Schäden und Apoptose nach Fremdstoffinkubation

3.3.1 Apoptose bei Ein- und Dreifachinkubation der Miniorgane

3.3.1.1 Natriumdichromat



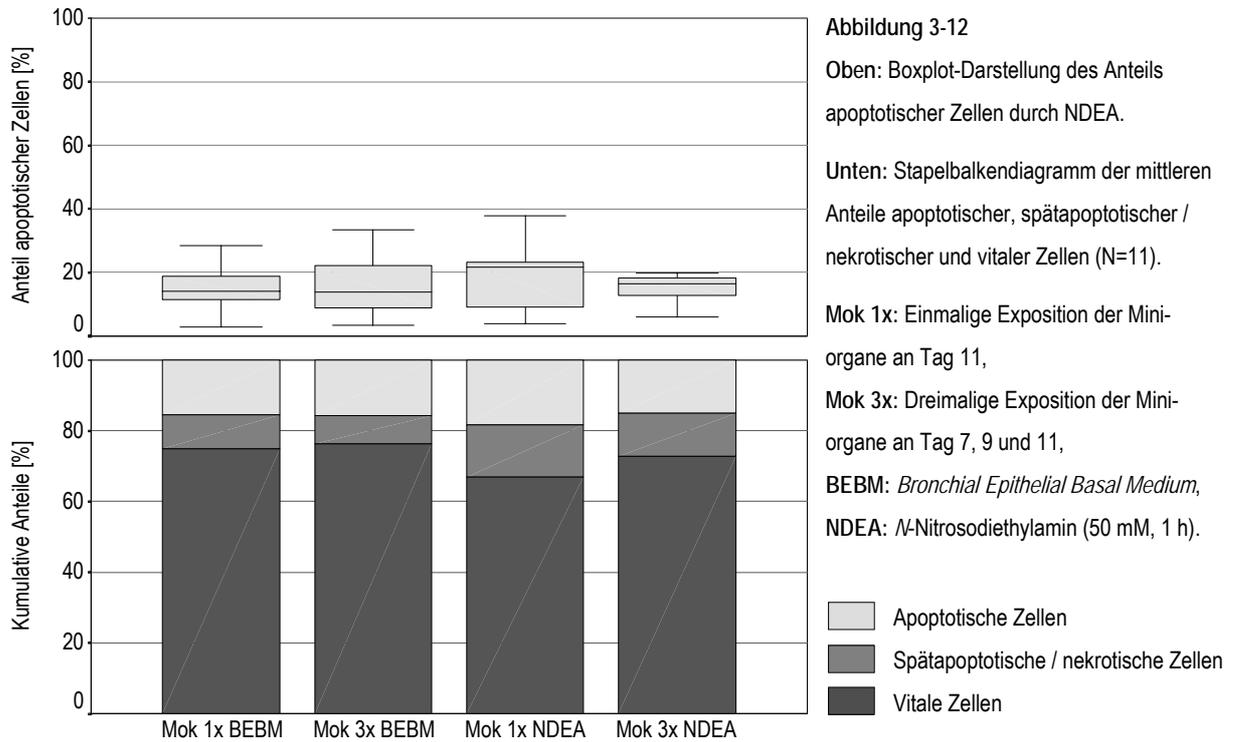
Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen bei den durchgeführten Miniorgan-Versuchen wurde der Annexin-V-Affinitätstest eingesetzt. Bei den Negativkontrollen mit BEBM ergibt die einfache bzw. dreifache Inkubation der Miniorgane sehr ähnliche Ergebnisse. Der mediane Anteil apoptotischer Zellen liegt bei 14,0 % bzw. 13,9 %.

Auch bei einmaliger Natriumdichromat-Exposition liegt keine erhöhte Apoptoserate vor. Der Anteil apoptotischer Zellen liegt mit 11,4 % sogar etwas niedriger als in der Negativkontrolle. Ein ganz anderes Bild bietet sich bei dreimaliger Natriumdichromat-Exposition: Gegenüber Negativkontrolle und Einfachinkubation erhöht sich die Fraktion apoptotischer Zellen drastisch auf 62,5 %.

Tabelle 3-10 α -Werte der Vergleiche des Anteils apoptotischer Zellen (AV⁺/PI⁻). Das lokale α -Niveau wird als <0,050 definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

Mok 1x BEBM vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x Cr(VI) vs. Mok 1x BEBM	Mok 3x Cr(VI) vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x Cr(VI) vs. Mok 3x Cr(VI)
$p=1,000$	$p=0,278$	$p=0,001$	$p=0,001$

3.3.1.2 N-Nitrosodiethylamin

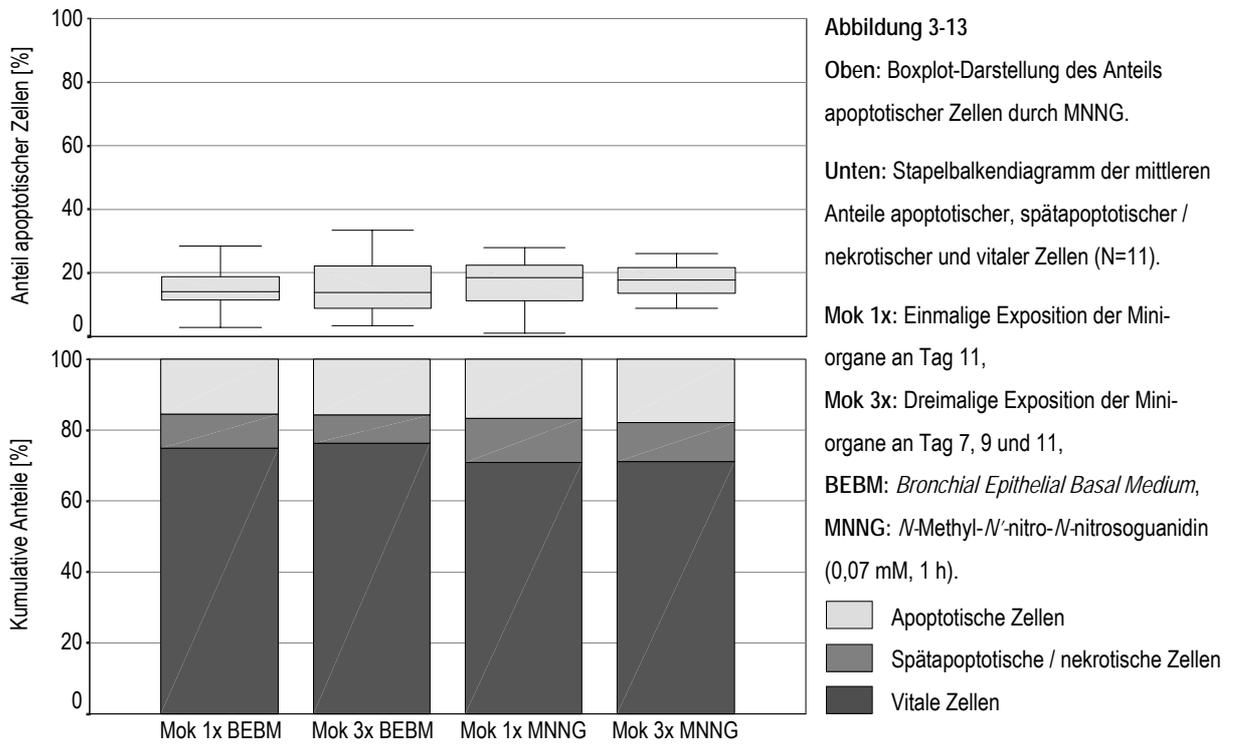


Wie bei den Versuchen mit Natriumdichromat ist auch bei einmaliger Inkubation mit NDEA keine Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen gegenüber der Negativkontrolle nachweisbar. Es ergibt sich ein medianer Anteil apoptotischer Zellen von 21,8 %. Im Gegensatz zu den Versuchen mit Natriumdichromat tritt aber keine Erhöhung der Fraktion apoptotischer Zellen bei Dreifachinkubation auf. Mit 16,5 % liegt der Anteil sogar unter dem Ergebnis der Einfachinkubation.

Tabelle 3-11 α -Werte der Vergleiche des Anteils apoptotischer Zellen (AV⁺/PI⁻). Das lokale α -Niveau wird als <0,050 definiert.

Mok 1x BEBM vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x NDEA vs. Mok 1x BEBM	Mok 3x NDEA vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x NDEA vs. Mok 3x NDEA
$p=1,000$	$p=0,465$	$p=0,831$	$p=0,278$

3.3.1.3 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin



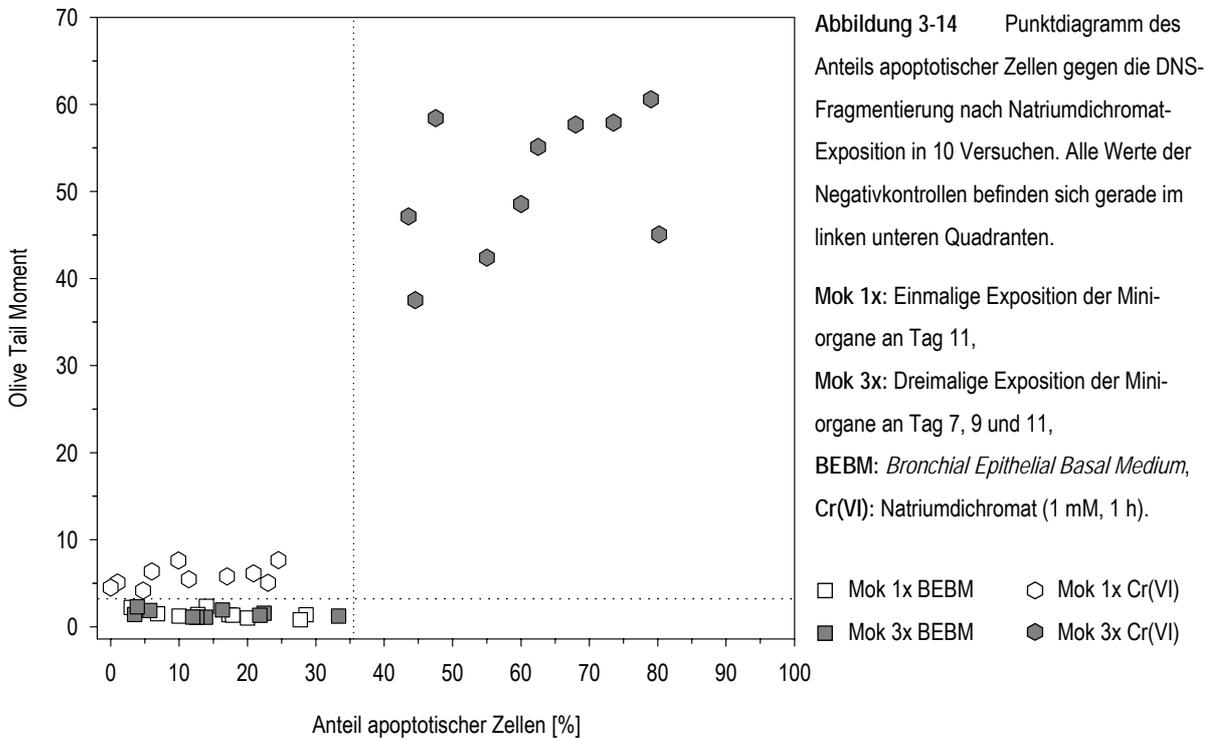
Die Ergebnisse bei Einsatz von MNNG ähneln den Ergebnissen der Negativkontrolle und der Versuche mit NDEA: Weder die einmalige noch die dreimalige Inkubation der Miniorgane mit MNNG bewirkt eine relevante Veränderung des Anteils apoptotischer Zellen. Die medianen Fraktionen apoptotischer Zellen sind mit 18,6 % und 17,7 % gegenüber der Negativkontrolle mit 14,0 % und 13,9 % leicht erhöht.

Tabelle 3-12 α -Werte der Vergleiche des Anteils apoptotischer Zellen (AV+/PI-). Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert.

Mok 1x BEBM vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x MNNG vs. Mok 1x BEBM	Mok 3x MNNG vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x MNNG vs. Mok 3x MNNG
$p=1,000$	$p=0,770$	$p=0,320$	$p=0,831$

3.3.2 Genotoxische Schäden und Apoptose bei Ein- und Dreifachinkubation der Miniorgane

3.3.2.1 Natriumdichromat



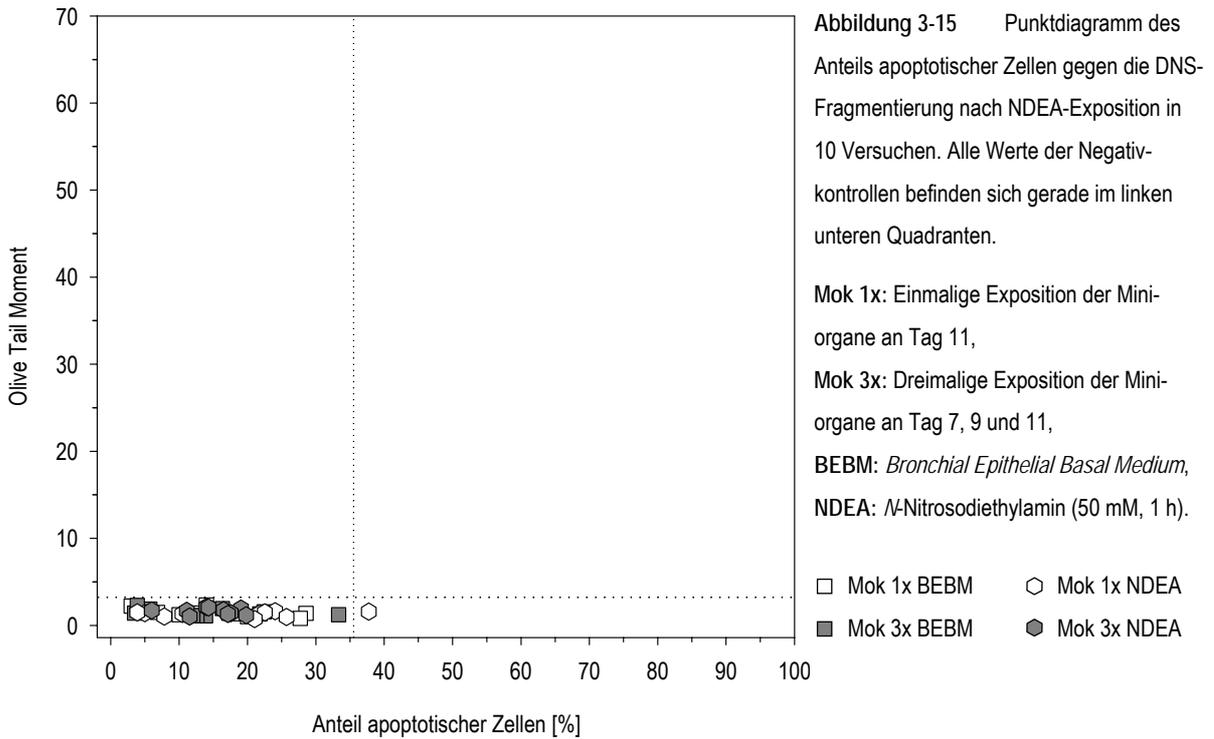
Bei einer einfachen Natriumdichromat-Exposition ist eine klar erhöhte DNS-Fragmentierung mit einem OTM von 5,6 gegenüber 1,4 in der zugehörigen Negativkontrolle messbar. Dabei findet sich in den entsprechenden Zellpopulationen keine signifikante Erhöhung des Anteils apoptotischer Zellen.

Bei dreifacher Inkubation mit Natriumdichromat resultiert eine weitere starke Erhöhung der DNS-Fragmentierung mit einem OTM von 51,8 gegenüber 1,4 in der Negativkontrolle. Im Gegensatz zur Einfachinkubation ist dabei aber zusätzlich eine drastisch erhöhte Apoptoserate von 62,5 % messbar.

Tabelle 3-13 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane und des Anteils apoptotischer Zellen (AV⁺/PI⁻). Das lokale α -Niveau wird als <0,050 definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

	Mok 1x BEBM vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x Cr(VI) vs. Mok 1x BEBM	Mok 3x Cr(VI) vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x Cr(VI) vs. Mok 3x Cr(VI)
OTM	$p=0,770$	$p=0,002$	$p=0,002$	$p=0,002$
Anteil apoptotischer Zellen	$p=1,000$	$p=0,278$	$p=0,001$	$p=0,001$

3.3.2.2 N-Nitrosodiethylamin



Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Natriumdichromat findet sich bei ein- und dreifacher Inkubation mit NDEA weder eine Erhöhung der Apoptoserate noch eine Erhöhung der DNS-Fragmentierung. Die medianen OTM-Werte betragen 1,4 gegen 1,4 in der Negativkontrolle für die Einfachinkubation und 1,7 gegen 1,4 für die Dreifachinkubation.

Für die DNS-Fragmentierung bei Dreifachinkubation ergibt sich jedoch ein Anstieg bei der dreimaligen gegenüber der einmaligen Inkubation.

Tabelle 3-14 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane und des Anteils apoptotischer Zellen (AV⁺/PI⁻). Das lokale α -Niveau wird als <0,050 definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

	Mok 1x BEBM vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x NDEA vs. Mok 1x BEBM	Mok 3x NDEA vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x NDEA vs. Mok 3x NDEA
OTM	$p=0,770$	$p=0,250$	$p=0,537$	$p=0,010$
Anteil apoptotischer Zellen	$p=1,000$	$p=0,465$	$p=0,831$	$p=0,278$

3.3.2.3 N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin

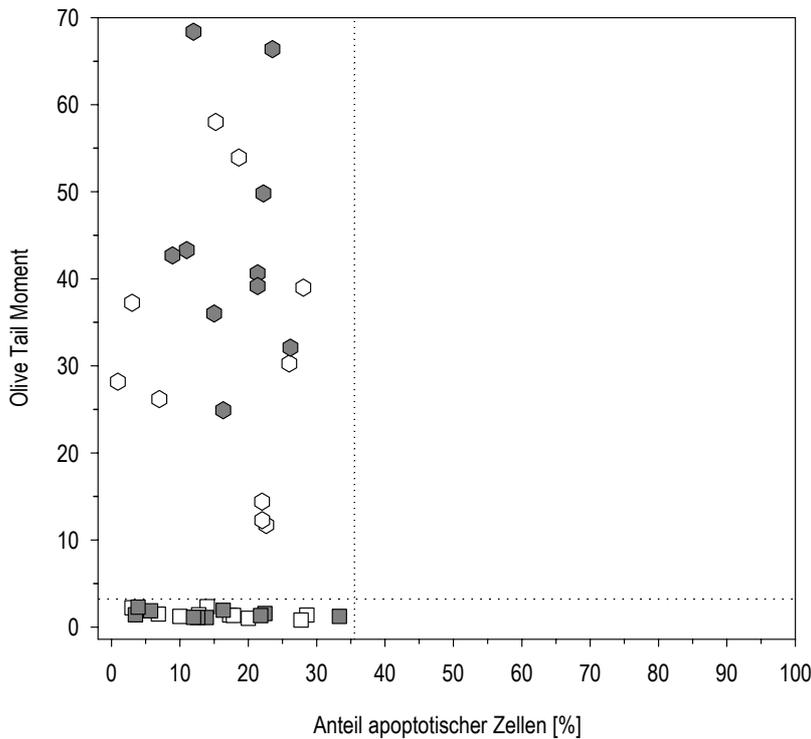


Abbildung 3-16 Punktdiagramm des Anteils apoptotischer Zellen gegen die DNS-Fragmentierung nach MNNG-Exposition in 10 Versuchen. Alle Werte der Negativkontrollen befinden sich gerade im linken unteren Quadranten.

Mok 1x: Einmalige Exposition der Miniorgane an Tag 11,
 Mok 3x: Dreimalige Exposition der Miniorgane an Tag 7, 9 und 11,
 BEBM: *Bronchial Epithelial Basal Medium*,
 MNNG: *N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin* (0,07 mM, 1 h).
 □ Mok 1x BEBM ◻ Mok 1x MNNG
 ■ Mok 3x BEBM ◼ Mok 3x MNNG

MNNG ruft bei Ein- und Dreifachinkubation der Miniorgane eine starke DNS-Fragmentierung hervor. Die OTM-Mediane betragen 29,2 und 41,7 im Vergleich zu 1,4 in den zugehörigen Negativkontrollen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Natriumdichromat, das ähnlich hohe DNS-Schäden wie MNNG erzeugen kann, ist jedoch keine Erhöhung der Apoptoserate zu erfassen.

Tabelle 3-15 α -Werte der Vergleiche der OTM-Mediane und des Anteils apoptotischer Zellen (AV⁺/PI⁻). Das lokale α -Niveau wird als <0,050 definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

	Mok 1x BEBM vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x MNNG vs. Mok 1x BEBM	Mok 3x MNNG vs. Mok 3x BEBM	Mok 1x MNNG vs. Mok 3x MNNG
OTM	$p=0,770$	$p=0,002$	$p=0,002$	$p=0,049$
Anteil apoptotischer Zellen	$p=1,000$	$p=0,770$	$p=0,320$	$p=0,831$

3.4 Cytochrom-P450-2A6-Konzentration in Miniorganen

3.4.1 Fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Untersuchung

Abbildung 3-17 zeigt exemplarisch das fluoreszenz- und durchlichtmikroskopische Bild je einer Zelle der Primärantikörper-Auslasskontrolle, der Isotypkontrolle und des Testansatzes.

Morphologisch sind die Zellen von Testansatz und Negativkontrollen unter dem Durchlichtmikroskop nicht zu unterscheiden. Wie in Abbildung 3-17a zu sehen, sind neben Zellkern und Plasmamembran häufig vakuoläre Strukturen im Zytoplasma erkennbar. Bei Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigen die Zellen der Negativkontrollen teilweise eine sehr schwache, diffuse Fluoreszenz des Zytoplasmas. Lokale Floreszenzverdichtungen finden sich aber nicht. Zwischen den Zellen der Primärantikörper-Auslasskontrolle und der Isotypkontrolle ist kein Unterschied festzustellen.

Im Gegensatz dazu weist ein Großteil der Zellen des Testansatzes, bei dem Cytochrom-P450-2A6 spezifisch angefärbt werden sollte, neben einer ähnlich geringgradigen diffusen Fluoreszenz deutliche Ansammlungen lokaler fluoreszierender Depots auf. Wie in Abbildung 3-17c gezeigt, korrelieren diese meist mit den durchlichtmikroskopisch erkennbaren vakuolären Zellstrukturen.

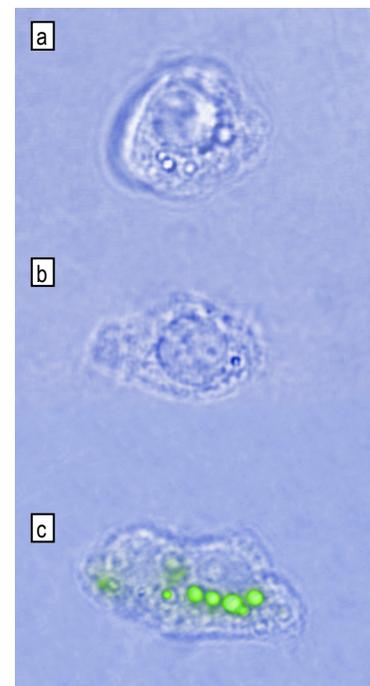


Abbildung 3-17 Mikroskopische Bilder von Zellen der Negativkontrollen und des Testansatzes (Falschfarbenbilder durch Überlagern von zwei Monochrombildern. blau: durchlichtmikroskopisches Bild; grün: FITC-gefärbtes Cytochrom P450 2A6 im fluoreszenzmikroskopischen Bild; aufgenommen mit 1.000facher Vergrößerung).

- Bild a: Zelle der Primärantikörper-Auslasskontrolle (*Primär*),
 Bild b: Zelle der Isotypkontrolle (*Isotyp*),
 Bild c: Zelle des Testansatzes (*Test*).

3.4.2 Titration des Primärantikörpers

Die beiden Regressionskurven in Abbildung 3-18 zeigen eine Sättigungskinetik in Abhängigkeit von der Konzentration des Primärantikörpers. Sowohl die Kurve für die mittlere Fluoreszenzintensität als auch die Kurve für den Anteil CYP2A6-positiv gefärbter Zellen flacht nach einem starker Anstieg im niedrigen Konzentrationsbereich ab und erreicht ein Plateau. Die für die folgenden Versuche gewählte Primärantikörperkonzentration von 38 $\mu\text{g/ml}$ liegt im flachen Bereich beider Kurven. Abbildung 3-19 zeigt die Histogramme zur Verteilung der Fluoreszenzintensitäten bei verschiedenen Primärantikörperkonzentrationen. Die Markierung ist so gesetzt, dass in der Negativkontrolle weniger als 1 % der Zellen als CYP2A6-positiv gewertet werden.

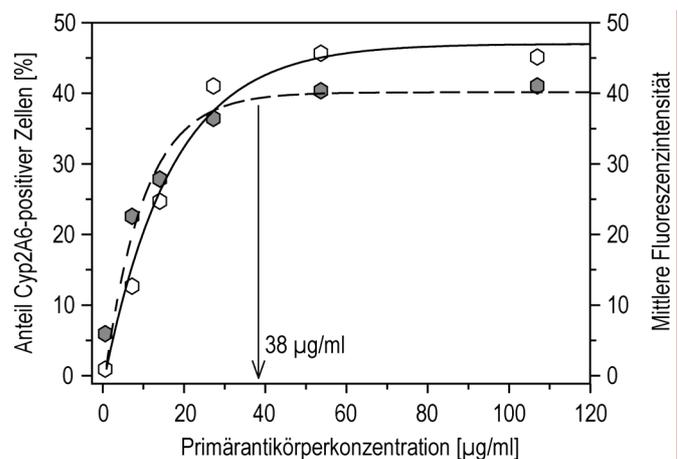
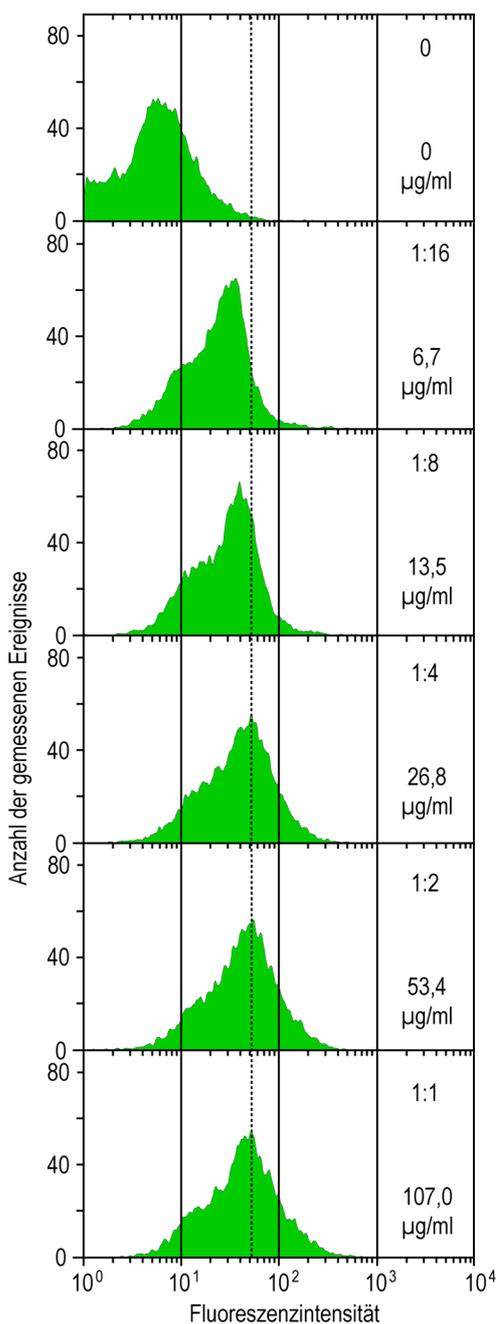


Abbildung 3-18 Punktdiagramm zur Titration des Primärantikörpers. Abhängig von der Primärantikörperkonzentration sind die mittleren Fluoreszenzintensitätswerte und der Anteil CYP2A6-positiver Zellen aufgetragen. Die Punkte sind durch Regressionskurven verbunden. Der Pfeil markiert die gewählte Konzentration von 38 $\mu\text{g/ml}$.

—●— Mittlere Fluoreszenzintensitätswerte
—○— Anteil positiv gefärbter Zellen

Abbildung 3-19 Histogramme zur Verteilung der Fluoreszenzintensitätswerte bei verschiedenen Primärantikörperkonzentrationen. Die Konzentrationen und Verdünnungsstufen sind neben den Histogrammen angegeben. Die Markierung ist bei <1 % CYP2A6-positiver Zellen in der Negativkontrolle gesetzt.

▲ Testansätze
⋮ Markierung

3.4.3 Titration des Sekundärantikörpers

Die Titration des Sekundärantikörpers ergibt einen konzentrationsabhängigen Anstieg der mittleren Fluoreszenzintensität. Wie bei der Titration des Primärantikörpers ist auch hier eine Sättigungskinetik erkennbar. Diese spiegelt sich auch im Anstieg des Anteils CYP2A6-positiver Zellen in Abhängigkeit von der Antikörperkonzentration wider.

Die in den folgenden Versuchen eingesetzte Sekundärantikörperkonzentration von 100 µl/ml liegt im flachen Bereich beider Titrationskurven.

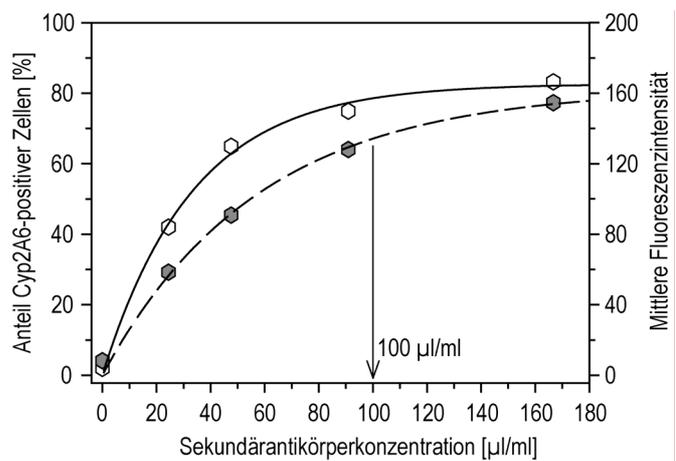
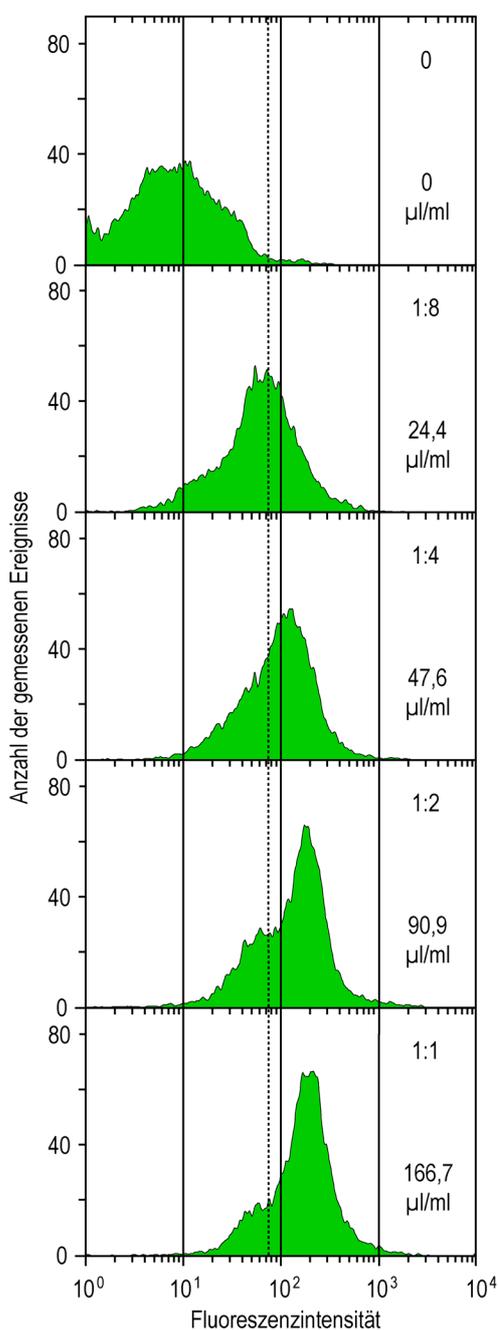


Abbildung 3-20 Punktdiagramm zur Titration des Sekundärantikörpers. Abhängig von der Sekundärantikörperkonzentration sind die mittleren Fluoreszenzintensitätswerte und der Anteil CYP2A6-positiver Zellen aufgetragen. Die Punkte sind durch Regressionskurven verbunden. Der Pfeil markiert die gewählte Konzentration von 100 µl/ml

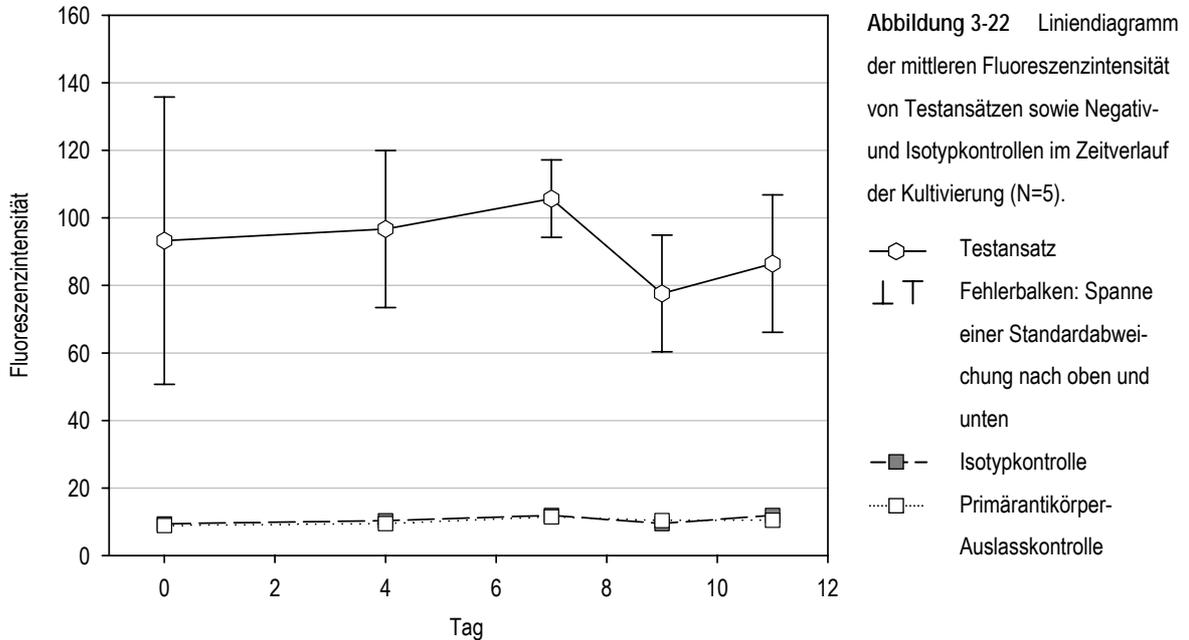
- Mittlere Fluoreszenzintensitätswerte
- Anteil positiv gefärbter Zellen

Abbildung 3-21 Histogramme zur Verteilung der Fluoreszenzintensitätswerte bei verschiedenen Sekundärantikörperkonzentrationen. Die Konzentrationen und Verdünnungsstufen sind neben den Histogrammen angegeben. Die Markierung ist bei <math>< 1\%</math> CYP2A6-positiver Zellen in der Negativkontrolle gesetzt.

- Testansätze
- Markierung

3.4.4 Cytochrom-P450-Konzentration im Verlauf der Kultivierung

3.4.4.1 Vergleich der Fluoreszenzintensitätswerte von Testansätzen und Kontrollen zu verschiedenen Zeitpunkten



Beide Negativkontrollen zeigen an allen fünf Versuchstagen niedrige mittlere Fluoreszenzintensitäten. In der Isotypkontrolle werden Werte zwischen 8,62 und 13,13 erreicht, in der Primärantikörper-Auslasskontrolle Werte zwischen 7,65 und 13,51.

Wie aus Abbildung 3-22 ersichtlich weisen die Zellen des spezifisch gefärbten Testansatzes dagegen über den gesamten Untersuchungszeitraum bei einer großen Streubreite weit höhere Signalintensitäten auf. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten bewegen sich in diesen Ansätzen zwischen 54,03 und 159,69. Ein eindeutiger Trend der Fluoreszenzintensitätswerte und somit des Gehalts der Zellen an CYP2A6 ist nicht erkennbar.

Tabelle 3-16 α -Werte der Vergleiche der mittleren Fluoreszenzintensitäten von Testansätzen und Isotypkontrollen. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

	Tag 0	Tag 4	Tag 7	Tag 9	Tag 11
Testansätze vs. Isotypkontrollen	$p=0,031$	$p=0,031$	$p=0,031$	$p=0,031$	$p=0,031$
Testansätze vs. Negativkontrollen	$p=0,031$	$p=0,031$	$p=0,031$	$p=0,031$	$p=0,031$
Isotypkontrollen vs. Negativkontrollen	$p=0,156$	$p=0,156$	$p=0,406$	$p=0,406$	$p=0,063$

3.4.4.2 Verhältnis der Fluoreszenzintensitätswerte der Testansätze zu denen der Isotypkontrollen im Zeitverlauf

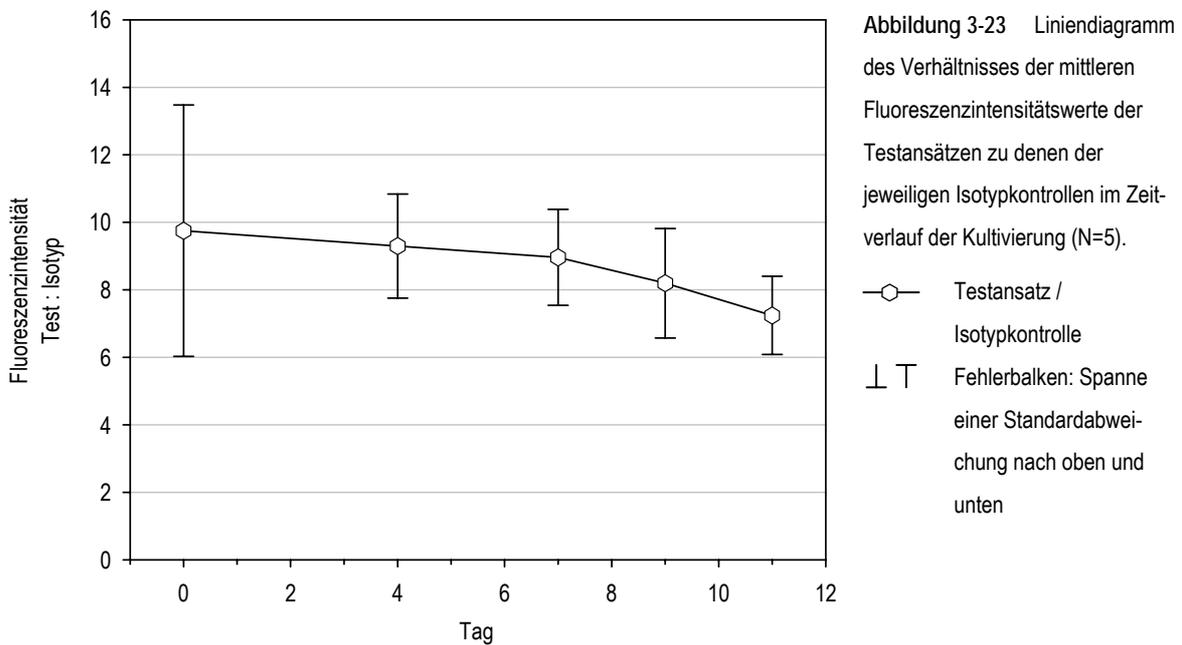


Abbildung 3-23 zeigt für jeden Untersuchungszeitpunkt den Mittelwert des Verhältnisses der mittleren Fluoreszenzintensität des Testansatzes zur mittleren Fluoreszenzintensität der Isotypkontrolle. Dadurch werden Verfälschungen der Messergebnisse eliminiert, die auf der Autofluoreszenz der Zellen und der Verstärkung von Störeinflüssen bei Versuchsdurchführung und Messvorgang beruhen [Ogino et al., 2003].

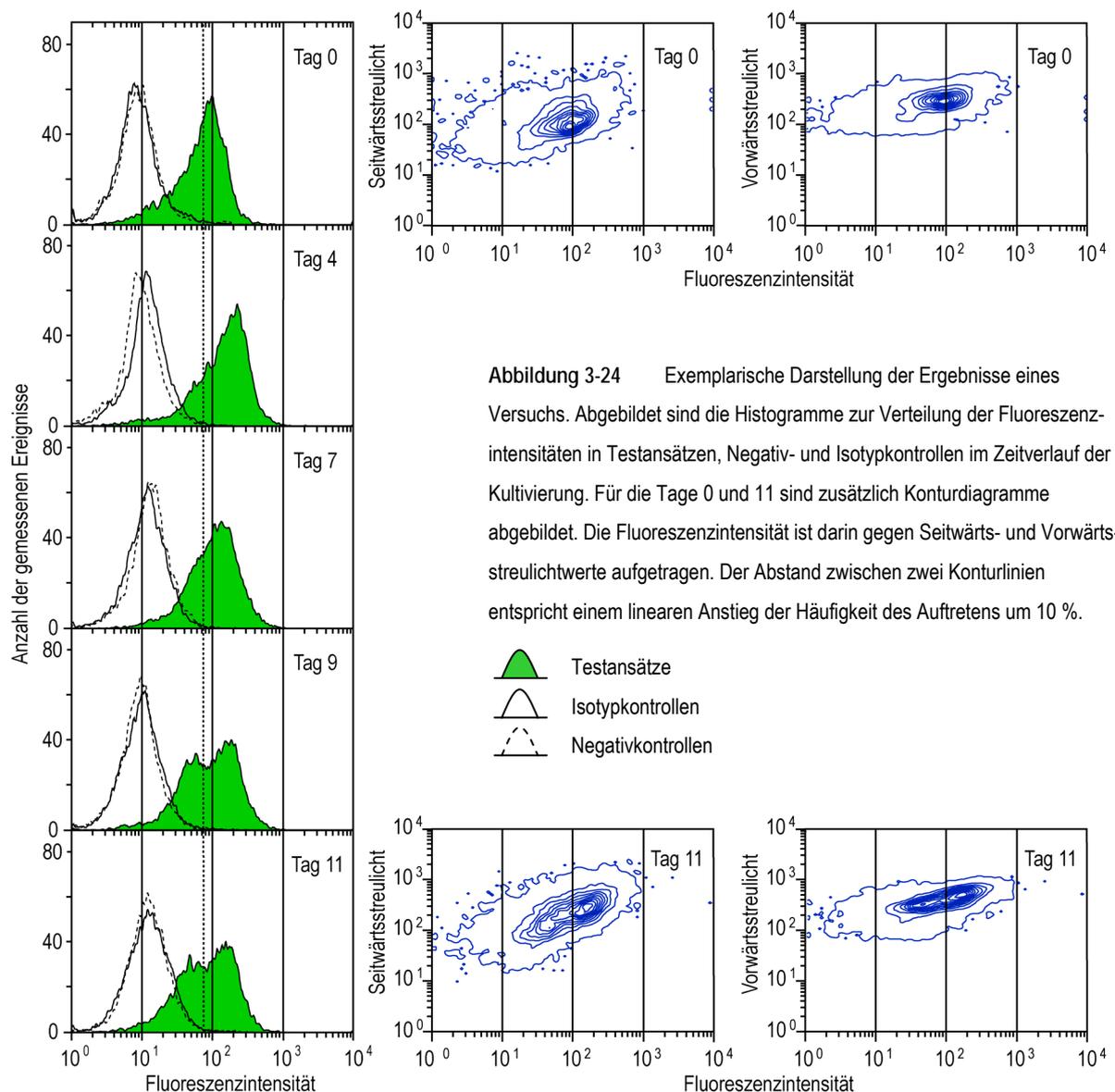
Bei Untersuchung der Zellen frisch explantierter Mukosaproben an Tag 0 zeigt sich die Fluoreszenzintensität der Testansätze im Vergleich zur jeweiligen Isotypkontrolle im Mittel 9,75 mal größer. Zu diesem Zeitpunkt ist Schwankungsbreite des Faktors mit einem Bereich von 6,20 bis 14,98 am größten. Der CYP2A6-Gehalt der Zellen variiert damit interindividuell um das 2,42fache. Für die folgenden Versuchszeitpunkte ergibt sich ein stetiger Abfall des mittleren Multiplikationsfaktors. Am letzten Messpunkt an Tag 11 ist die Fluoreszenzintensität der Testansätze aber im Mittel noch immer 7,24 mal größer als die der Isotypkontrolle. Statistisch lässt sich keine signifikante Veränderung des Multiplikationsfaktors nachweisen.

Tabelle 3-17 α -Werte der Vergleiche der Multiplikationsfaktoren (Fluoreszenzintensität Test:Isotyp) zu verschiedenen Zeitpunkten. Das lokale α -Niveau wird als $<0,050$ definiert. α -Werte unterhalb dieses Niveaus sind grau hinterlegt.

	Fluoreszenzintensität Test:Isotyp
Tag 0 vs. Tag 4 vs. Tag 7 vs. Tag 9 vs. Tag 11	$p=0,398$

3.4.4.3 Veränderung der Zellpopulationen im Zeitverlauf

Im Zeitverlauf ist in allen fünf Versuchen eine Veränderung der Kurvenform des Testansatzes im Histogramm zu erkennen. Abbildung 3-24 zeigt dies exemplarisch an den Histogrammen zu einem Versuch. Man sieht im Zeitverlauf eine Verbreiterung und Abflachung der Kurvenform mit einer angedeuteten Ausbildung zweier Gipfel. Die Konturdiagramme zu den Testansätzen von Tag 0 und 11 setzen diese Verteilung der Fluoreszenzintensität ins Verhältnis zu Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht. Die Verbreiterung des Gipfels der Fluoreszenzintensitätswerte korreliert mit einer leichten Erhöhung und Verbreiterung des Gipfels der Seitwärtsstreulichtwerte. Die Vorwärtsstreulichtwerte ändern sich nicht eindeutig.



4.1 Genotoxikologie - eine Forschungsrichtung im Wandel

Wie sich am Umfang der weltweit größten chemischen Datenbank ersehen lässt, wächst die Zahl patentierter und industriell eingesetzter chemischer Verbindungen exponentiell [Chemical Abstracts Service, 2005]. Da für zahlreiche maligne Erkrankungen des Menschen ein kausaler Zusammenhang mit der Exposition gegenüber bestimmten Noxen gezeigt werden konnte, gewinnt die frühzeitige Identifikation potenziell gefährlicher Stoffe eine erhebliche Bedeutung. Entscheidend für die Beurteilung von Risikostoffen erscheint die Klärung ihrer pathogenetischen Wirkmechanismen und gegebenenfalls die Quantifizierung ihrer karzinogenen Potenz. Für Verbindungen, die einen signifikanten Nutzen erbringen und nicht einfach aus dem Gebrauch eliminiert werden können, müssen valide Grenzwerte toxischer Effekte festgesetzt werden, die eine frühe Erkennung gefährdeter Berufsgruppen und das Ergreifen sinnvoller Schutzmaßnahmen erlauben [Subcommittee On Environmental Mutagenesis, 1977].

Um dem Ziel einer realistischen Bewertung des Gefahrenpotenzials chemischer Verbindungen gerecht zu werden, ist auch die Klassifikation von Karzinogenen in den letzten Jahren in der Diskussion. Bei der Definition zulässiger Expositionswerte entfernt man sich langsam von der dichotomen Einteilung in genotoxische und nicht-genotoxische Verbindungen [Kirkland und Muller, 2000; Bolt, 2003; Bolt et al., 2004]. Stattdessen strebt man eine Klassifikation der Karzinogene nach den jeweiligen Wirkmechanismen an, die die schädigende Potenz und mutmaßliche Schwellenwerte berücksichtigen [Bolt, 2003; Bolt et al., 2004]. In Deutschland hat die Senatskommission der Deutschen Forschungsgemeinschaft zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe (MAK-Kommission) 1998 neue Empfehlungen herausgegeben, die zwischen fünf Gruppen gesicherter und verdächtigter Karzinogene unterscheiden. Dieser Vorschlag beinhaltet

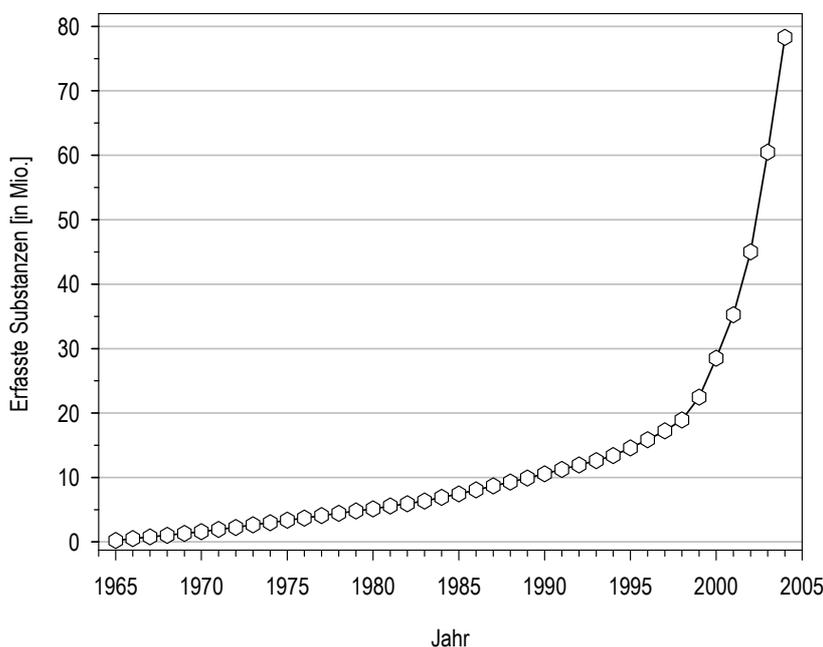


Abbildung 4-1 Zahl der chemischen Substanzen, die in der *Chemical Abstracts Service*-Datenbank (CAS) der *American Chemical Society* in den Jahren 1965 bis 2003 erfasst worden sind. Die CAS-Datenbank stellt nach eigenen Angaben die weltweit umfangreichste chemische Datenbank dar [Chemical Abstracts Service, 2005].

zwei neue Kategorien von Stoffen, für die „bei Einhaltung des MAK-Wertes kein signifikanter Beitrag zum menschlichen Krebsrisiko zu erwarten“ ist. Das ist zum einen eine Gruppe von „Stoffen mit karzinogenem Potenzial, für das Genotoxizität keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielt“, zum anderen ein Gruppe von „Substanzen mit karzinogenem und genotoxischem Potenzial, deren Potenz als sehr gering eingestuft wird“ [Neumann et al., 1998; Greim und Reuter, 2001; Bolt et al., 2004]. Zu den nicht-genotoxischen Karzinogenen zählen beispielsweise Hormone und Tumorpromotoren. Für diese Stoffe lässt sich entsprechend den Richtlinien anderer toxikologischer Disziplinen ein maximales Expositionsniveau herleiten, bei dem kein relevantes Krebsrisiko für den Menschen zu erwarten ist. In die Gruppe genotoxischer Karzinogene mit geringer Potenz fallen Verbindungen, die nicht direkt mit der DNS reagieren, beispielsweise Inhibitoren des Spindelapparats. Für einen Teil dieser Substanzen ist die Existenz von Schwellenwerten anzunehmen, die je nach dem vorliegenden Schädigungsmechanismus durch differenzierte Methoden extrapoliert werden können [Bolt et al., 2004]. Die Existenz von Schwellenwerten für direkt mit der DNS interagierende genotoxische Substanzen, zu denen die drei untersuchten Verbindungen Natriumdichromat, *N*-Nitrosodiethylamin und *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin zählen, ist derzeit noch umstritten [Zito, 2001; Hengstler et al., 2003; Waddell, 2003c; Sanner und Dybing, 2005]. Trotz interessanter Anhaltspunkte für die Forschung hat sich für regulatorische Zwecke die Anwendung von Extrapolationsmethoden zur Schwellenwertbestimmung aus Sicherheitsgründen noch nicht durchgesetzt [Bolt, 2003]. Es besteht allerdings ein Konsens über die Notwendigkeit, gegenwärtige Regulierungsinstrumente weiter anzupassen, um die Karzinogenität von Chemikalien adäquat darzustellen [Bolt, 2003].

4.2 Diskussion der Ergebnisse mit Natriumdichromat

4.2.1 Toxikologischer Hintergrund

4.2.1.1 Mögliche Aufnahmewege von Natriumdichromat

Eine systemische Aufnahme von Chrom ist durch Ingestion, Inhalation und Hautkontakt möglich. Ihr Ausmaß hängt von der Oxidationsstufe des Chroms und den verfügbaren Schutzmechanismen des Organismus ab.

Trivalentes Chrom liegt bei einem physiologischen pH-Wert um 7,4 als Kation vor und kann Plasmamembranen nur schwer überwinden. Nur chemisch inerte organische Cr(III)-Komplexe, wie sie bei der präsystemischen und systemischen Reduktion von hexavalentem Chrom entstehen, können in geringen Mengen passiv in Zellen diffundieren [Kerger et al., 1996; Rowbotham et al., 2000]. Trivalentes Chrom ist ein essenzieller Nahrungsbestandteil, der eine wichtige physiologische Rolle im Glukose- und Lipidmetabolismus spielt [Anderson, 1997]. Laut Ernährungsempfehlung des *Food and Nutrition Board of the U.S. National Research Council* sollte die tägliche Cr(III)-Aufnahme bei 50-200 µg pro Person liegen [Minister of Supply and Services Canada, 1994]. Eine karzinogene Wirkung dieser Valenzform konnte nicht nachgewiesen werden. Auch Einnahmen des 1.000fachen der empfohlenen Dosis erwiesen sich als nicht toxisch [Minister of Supply and Services Canada, 1994; Felter und Dourson, 1997].

Hexavalentes kann im Gegensatz zu trivalentem Chrom leicht in Zellen eindringen, da es bei einem physiologischen pH-Wert in wässriger Lösung hauptsächlich als Chromation (CrO_4^{2-}) vorliegt und

in dieser Form über unspezifische Anionen-Transporter problemlos ins Zytoplasma befördert wird [De Flora, 2000; Bagchi et al., 2001]. Unter experimentellen Bedingungen wird Cr(VI) auch bei niedrigen extrazellulären Konzentrationen unter $10 \mu\text{mol/l}$ in humane Lungenepithelzellen aufgenommen. In Dosis-Wirkungsexperimenten ist diese Aufnahme dosisabhängig, ohne eine Maximalschwelle zu erreichen [Liu et al., 2001]. *In vivo* wirkt dieser Form der Aufnahme das gewaltige extrazelluläre Reduktionspotenzial des Körpers entgegen. Bei Ingestion reagiert das hexavalente Chrom in Magen und Dünndarm vor der Resorption vollständig mit organischen Substraten und wird dabei reduziert [Minister of Supply and Services Canada, 1994; Kerger et al., 1996]. Nur etwa 10 % der eingebrachten Chrommenge wird dann in Form organischer Cr(III)-Komplexe resorbiert, zu einem kleinen Teil utillisiert und zum größten Teil renal wieder ausgeschieden [Kerger et al., 1996]. In den terminalen Atemwegen, der Lungenflüssigkeit und Alveolarmakrophagen finden diese extrazellulären Redoxreaktionen ebenfalls statt. Die Reduktionskapazität dieser Systeme ist aber geringer als die des Gastrointestinaltrakts, die Resorptionsquote nach Inhalation von Cr(VI) liegt mit 30 % höher als nach Ingestion [Minister of Supply and Services Canada, 1994; De Flora et al., 1997]. Jede systemische Verbreitung von Cr(VI) wird durch die unverzügliche Reduktion durch Bestandteile des Blutes und nicht kernhaltiger Zellen unterbunden [IARC, 1997].

4.2.1.2 Biotransformation und zelluläre Wirkung von Natriumdichromat

Während die präsystemische und extrazelluläre Reduktion von hexavalentem Chrom einen wichtigen Schutzmechanismus darstellt, können dieselben Redoxprozesse eine komplexe deletäre Wirkung entfalten, wenn sie im Inneren der Zellen ablaufen [Minister of Supply and Services Canada, 1994; ATSDR, 2000b; Liu et al., 2001]. Nach der Aufnahme in die Zelle reagiert Cr(VI) mit zellulären Antioxidantien wie Glutathion, Ascorbat und NADPH. In diesem Prozess wird das freie Radikal Superoxidanion ($\text{O}_2^{\cdot-}$) aus elementarem Sauerstoff gebildet. Durch die Superoxid-dismutase wird daraus Wasserstoffperoxid (H_2O_2) gebildet. H_2O_2 kann mit Cr(V) reagieren, dabei ein Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) freisetzen und Cr(VI) regenerieren [Wang und Shi, 2001]. Experimentell ist diese Hydroxylradikalbildung im Konzentrationsbereich von 0,125 bis 2 mmol/l innerhalb kurzer Zeit nach Expositionsbeginn dosisabhängig messbar. Im Rahmen der weiter ablaufenden Redoxreaktionen entsteht letztlich über Cr(IV) die stabile Oxidationsstufe Cr(III) [Shi et al., 1999; Zhang et al., 2001].

Die im Rahmen der Redoxreaktionen entstehenden freien Sauerstoffradikale erzeugen durch Lipid- und Proteinmodifikationen oxidativen Stress [Baeuerle und Henkel, 1994; Baldwin, 1996; Wang und Shi, 2001; Gupta, 2001]. Oxidative Veränderungen der Desoxyribosen führen häufig zu Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen oder Fehlpaarungen bei der Replikation [Gupta, 2001]. Daneben induzieren die Chrommetabolite vielfältige DNS-Schäden, die zu einer signifikanten Erhöhung der Mutationsfrequenz beitragen. So führt Cr(V) durch kovalente Bindung zu einer Quervernetzung zwischen Bestandteilen der DNS und anderen Makromolekülen, während das intrazellulär gebildete Cr(III) DNS-Addukte bildet [Wang und Shi, 2001; Chen et al., 2001]. Diese Veränderungen sind durch eine erhöhte DNS-Fragmentierung mit dem Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay auf der Ebene einzelner Zellen erfassbar [Liu et al., 2001; Zhang et al., 2001].

4.2.2 Diskussion der Ergebnisse des Annexin-V-Affinitätstests

Seit der Entdeckung der proapoptotischen Wirkung von hexavalentem Chrom haben sich zahlreiche Studien mit den zugrunde liegenden Mechanismen beschäftigt [Blankenship et al., 1994]. Dabei konnten mindestens zwei verschiedene Wege identifiziert werden, über die Cr(VI) die Apoptose auslösen kann. Wie in Abbildung 4-2 gezeigt, führt zum einen die exzessive Bildung reaktiver Sauerstoffradikale während der Reduktion von Cr(VI) schnell zu einer direkten Schädigung der Mitochondrien mit Freisetzung Caspase-aktivierender Faktoren. Apoptosezeichen sind bereits innerhalb der ersten Stunde postexpositionell detektierbar [Shi et al., 1999; Wang und Shi, 2001]. In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen ist unmittelbar nach einer einstündigen Inkubation der Miniorgane mit einer extrazellulären Natriumdichromatkonzentration von 1 mmol/l keine Erhöhung der Apoptoserate nachweisbar. Offenbar wird also durch die exogen induzierten Sauerstoffradikale nicht genug oxidativer Stress ausgeübt, um akut die Apoptose der Zellen auszulösen [Martindale und Holbrook, 2002].

Zum anderen rufen Chrommetabolite und reaktive Sauerstoffradikale oft DNS-Schäden hervor, die zeitversetzt eine Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren bewirken, darunter p53 und NF- κ B [Wang und Shi, 2001; Chen und Shi, 2002]. Diese Transkriptionsfaktoren binden an spezifische Sequenzen der DNS und regulieren dadurch die Expression ihrer Zielgene. Das Tumorsuppressorgen p53 kann die Zelle in einen Zellzyklusarrest führen, der die Reparatur zellulärer Schäden vor der nächsten Zellteilung ermöglicht. Sind die Schäden zu ausgeprägt, induziert p53 über die Freisetzung Caspase-aktivierender Faktoren aus den Mitochondrien die Apoptose. Auch NF- κ B, das als intrazellulärer Sensor für oxidativen Stress gilt, kann die Apoptose entweder induzieren oder aufhalten [Liu et al., 2001; Wang und Shi, 2001; Zhang et al., 2001; Chen et al., 2001; Gupta, 2001]. Da in den durchgeführten Versuchen der Annexin-V-Affinitätstest unmittelbar nach dem Ende der Inkubationszeit durchgeführt wurde, kann eine verzögerte Erhöhung der Apoptoserate durch die Aktivierung nukleärer Transkriptionsfaktoren nach einmaliger Inkubation nicht direkt beurteilt werden. Die drastische Erhöhung der Fraktion apoptotischer Zellen auf 62,5 % nach dreimaliger Inkubation spricht aber für eine Kumulation intrazellulärer Schäden durch die mehrfache Cr(VI)-Exposition, die auch über diesen Weg zur Apoptoseinduktion führt.

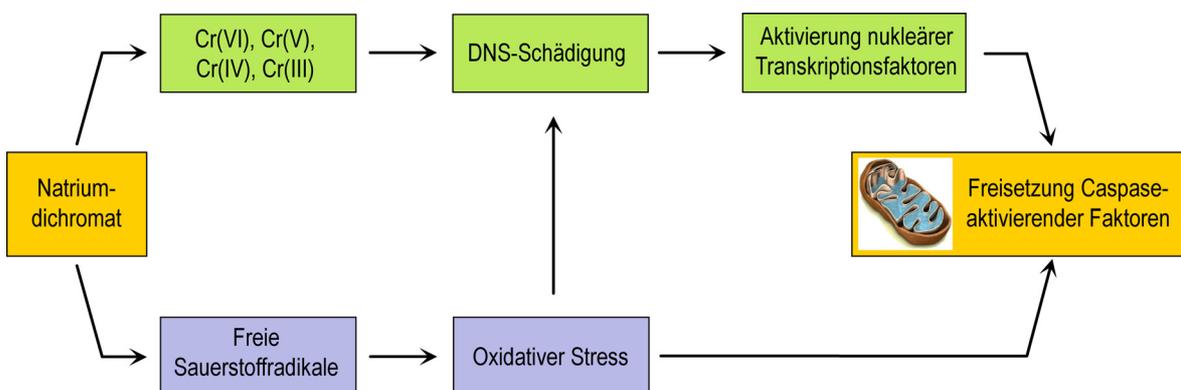


Abbildung 4-2 Wege der Apoptoseinduktion durch Natriumdichromat.

4.2.3 Diskussion der Ergebnisse des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay

4.2.3.1 Ergebnisse bei Mehrfachinkubation

Die einmalige Inkubation von Miniorganen nasaler Mukosa mit Natriumdichromat führt zu einer signifikanten Erhöhung der DNS-Fragmentierung im Vergleich zur Negativkontrolle. Diese Schäden sind wohl das Ergebnis der direkten Wirkung reaktiver Cr(VI)-Metabolite, für einen Einfluss apoptotischer Abbauvorgänge fand sich kein Hinweis. Nach dreimaliger Inkubation der Miniorgane mit Natriumdichromat erhöht sich der DNS-Fragmentierungsgrad der Zellen entsprechend früheren Untersuchungen an diesem Modell weiter [Kleinsasser et al., 2001]. Angesichts des damit einhergehenden hohen Anteils apoptotischer Zellen ist von einer Kumulation der Schäden an DNS und anderen vitalen Strukturen bei wiederholter Inkubation auszugehen. Ist ein bestimmter Schädigungsgrad erreicht, kann es über die zuständigen nukleären Transkriptionsfaktoren zur Einleitung der Apoptose kommen [Zhang et al., 2001; Wallner, 2003]. Den entscheidenden Einfluss der Art des induzierten zellulären und genetischen Schadens belegen die durchgeführten Versuche mit MNNG, in denen trotz hohen DNS-Fragmentierungsgrades keine erhöhte Apoptoserate beobachtet wurde. Der unmittelbare Beitrag der direkten DNS-schädigenden Cr(VI)-Wirkung von der apoptotisch bedingten Fragmentierung lässt sich nach mehreren Inkubationen nicht mehr voneinander abgrenzen [Chen et al., 2001].

4.2.3.2 Ergebnisse bei Inkubation von Einzelzellen im Vergleich zu Miniorganen

Entsprechend früheren Vermutungen weisen die in Suspension exponierten Einzelzellen im Vergleich zu den Zellen der Miniorgane bei einmaliger Inkubation mit Natriumdichromat ein deutlich erhöhtes DNS-Fragmentierungsniveau auf [Wallner, 2003]. Durch die Gewinnung der Einzelsuspension aus Miniorganen an Tag 11 und die zeitgleiche Inkubation beider Versuchsansätze konnten Alterungsvorgänge als Ursache für Unterschiede in der Suszeptibilität als Störfaktor ausgeschaltet werden. Dieses Ergebnis spricht für eine höhere Resistenz der Miniorgane gegenüber der deletären Wirkung von Natriumdichromat. Angesichts des Wirkungsmechanismus von Cr(VI) trägt wohl eine verminderte Aufnahme von Cr(VI) aus dem Extrazellulärraum zu dem geringeren Schädigungspotenzial bei. Dieser Schutz wird zum einen durch die muköse Bedeckung der Miniorgane gewährleistet, die von eingestreuten Becherzellen gebildet wird [Edsman und Hagerstrom, 2005]. Da für zahlreiche Körpersekrete einschließlich Speichel und bronchioalveolärer Flüssigkeit eine erhebliche Reduktionskapazität nachgewiesen wurde, kann diese Eigenschaft auch für nasalen Schleim angenommen werden [IARC, 1997; De Flora et al., 1997]. Zum anderen begrenzt die mukoziliäre Reinigungsfunktion die Resorption inhalierter Stoffe, die Transitzeit beträgt *in vivo* 12-15 min [Merkus et al., 1998]. Sind diese Barrieren überschritten, wird Cr(VI) wegen der großen exponierten Zelloberfläche und aufgrund unspezifischer Anionenkanäle rasch aufgenommen [Bagchi et al., 2001; Turker et al., 2004].

Neben den extrazellulären Schutzmechanismen gibt das Modell der Miniorgane auch Effekte wieder, die auf der Modifikation toxischer Einflüsse durch die interzelluläre Kommunikation im Gewebeverband beruhen. Eine zentrale Rolle beim direkten Informationsaustausch zwischen benachbarten Zellen nehmen Maculae communicantes (*gap junctions*) ein [Azzam et al., 2003; Physikalisch-Technische Bundesanstalt, 2004]. Wie in Abbildung 4-3 gezeigt, werden diese

Kommunikationszonen von porenbildenden Proteinkomplexen gebildet, die das Zytoplasma zweier Zellen membranübergreifend verbinden und eine metabolische und ionale Koppelung der Zellen erlauben. Die im Zentrum der Proteine gelegenen Kanäle haben Durchmesser von 1,5 bis 2,0 nm und erlauben damit den direkten Übertritt von Wasser, Ionen und kleinen Moleküle wie Zucker, Aminosäuren oder Nukleotiden von einer Zelle zur anderen. Die tunnelförmigen Verbindungen, die als *Konnexone* bezeichnet werden, bestehen aus sechs hexagonal angeordneten *Connexin*-Untereinheiten [Koval, 2002; Saez et al., 2003]. Deren Expression konnte auch in epithelialen und submukösen Zellen nasaler Mukosa nachgewiesen werden [Yeh et al., 2003]. Die Bedeutung dieser direkten Zell-Zell-Kontakte zeigen Untersuchungen, die sich mit der Wirkung niedrig dosierter radioaktiver Bestrahlung auf multizelluläre *in-vitro*-Modelle beschäftigen. Dabei werden auch bei nicht exponierten Zellen in der Umgebung direkt bestrahlter Zellen komplexe Reaktionen beobachtet, die über multiple zelluläre Signalwege ausgelöst werden. Je nachdem, ob destruktive oder protektive Mechanismen überwiegen, können genetische Instabilität und die Einleitung apoptotischer Vorgänge oder die Induktion von Schutz- und Reparaturprozessen die Folge sein [Prise et al., 2003; Waldren, 2004]. Die Kommunikation über *Maculae communicantes* nimmt auf die Steuerung von mitotischer Aktivität, Zelldifferenzierung und Apoptose Einfluss. Im Falle respiratorischen Epithels wird Ihnen eine Beteiligung an der Koordination des metachronalen Zilienschlags zugesprochen, der für einen gerichteten Sekrettransport entscheidend ist [Ruch et al., 2001; Yeh et al., 2003]. In den Zellen humaner Malignome verschiedenen Ursprungsgewebes ist der Informationsaustausch durch eine verminderte Expression der *Connexin*-Bausteine der *Maculae communicantes* oft herabgesetzt. Dies wird als wichtiger Faktor für die Proliferations- und Invasionskapazität maligner Zellen gesehen [Mesnil, 2002; Carruba et al., 2004; Trosko et al., 2004]. Als Reaktion auf die Exposition eines Zellverbands gegenüber hexavalentem Chrom kommt es dagegen zu einer Verstärkung des interzellulären Informationsflusses, was möglicherweise protektive Mechanismen in Gang setzt und Unterschiede zu den Einzelzellversuchen erklären kann [Mikalsen, 1990].

Neben den *Maculae communicantes* spielen auch interzelluläre Adhäsionsmoleküle eine Rolle bei der Regulierung der Zellhomöostase. Als wichtiger Vertreter gilt das interzelluläre Adhäsionsmolekül 1 (*ICAM-1*), ein Glykoprotein der Zelloberfläche, dessen Expression auch in Zellen humaner nasaler Mukosa nachgewiesen werden konnte [Shirasaki et al., 2004; Rosette et al., 2005]. Als wichtiger Rezeptor für die Zell-Zell-Interaktion nimmt es im Gewebeverbund Einfluss auf den Ablauf apoptotischer und lokaler inflammatorischer Prozesse [Gorgoulis et al., 2003]. Darüber

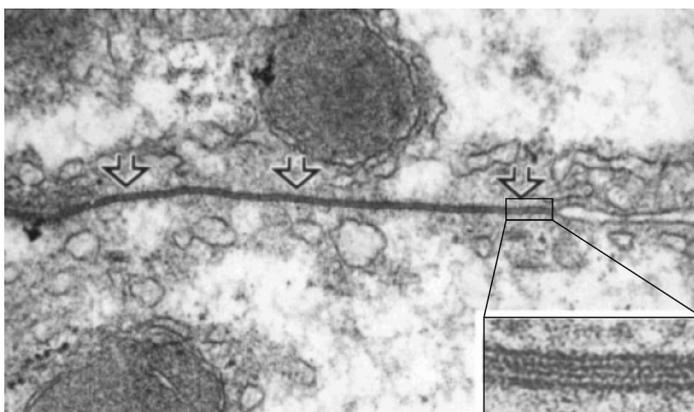


Abbildung 4-3 Elektronenmikroskopisches Bild eines Leberdünnschnitts der Ratte (aufgenommen mit 18.000facher Vergrößerung): Die Pfeile deuten auf eine langstreckige Membranverdickung zwischen zwei Hepatozyten, die einem Areal mit *Maculae communicantes* entspricht. In der Ausschnittsvergrößerung lässt sich die schematische Anordnung der Kommunikationskanäle erkennen.

hinaus besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der Expression von ICAM-1 und der Invasions- und damit Metastasierungsfähigkeit epithelialer Tumorzellen [Rosette et al., 2005]. Seine Expression wird durch nukleäre Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B und p53 vermittelt, deren Aktivität durch hexavalentes Chrom und eine Vielzahl weiterer schädigender Einflüsse reguliert wird [Pritchard et al., 2000; Gorgoulis et al., 2003; Rosette et al., 2005]. Die vielschichtigen interzellulären Kommunikationswege, die durch die Chromexposition beeinflusst werden, modifizieren die Wirkung auf den Gewebeverband in erheblichem Maße. In den durchgeführten Einzelzellversuchen kommen diese Mechanismen im Gegensatz zu den Versuchen mit Miniorganen nicht zum Tragen, was einen weiteren Erklärungsansatz für die Unterschiede im Schädigungsniveau bietet.

4.2.4 Beurteilung des Gefahrenpotenzials für den Menschen

4.2.4.1 Derzeitige Einschätzung der karzinogenen Potenz

Ein Risiko für den Menschen durch oral aufgenommene Cr(VI)-Derivate besteht wegen der großen Reduktionskapazität des Gastrointestinaltrakts nur bei sehr hohen Dosen [Rowbotham et al., 2000]. Nach längerer beruflicher Exposition gegenüber Cr(VI)-Verbindungen in der Atemluft kann es jedoch zu Schleimhautschäden im Aerodigestivtrakt und einer chronischen Reizung der Atemwege kommen. Im Bereich der Nase können Schleimhautulzerationen bis hin zur Septumperforation auftreten. An der Haut kann Chrom nekrotische Hautläsionen sowie eine allergische oder irritative Kontaktdermatitis verursachen [Minister of Supply and Services Canada, 1994; Felter und Dourson, 1997; ATSDR, 2000b]. Die industrielle Cr(VI)-Exposition wird zudem mit einem erhöhten Krebsrisiko in Verbindung gebracht: In Tierexperimenten mit Ratten, Mäusen und Hamstern erzeugten die meisten getesteten Cr(VI)-Verbindungen Tumoren. Natriumdichromat erzeugte in Ratten bei Inhalation und intratrachealer Applikation benigne und maligne Lungentumoren. Eine intrabronchiale, intrapleurale und intramuskuläre Applikation erzeugte dagegen kein erhöhtes Auftreten lokaler Tumoren. Epidemiologische Studien bei Arbeitern in der Produktion von Chromat, Chrompigment und Zinkchromat und der Verchromung zeigen durchweg ein erhöhtes Lungenkrebsrisiko. Bei diesen Arbeitern treten auch sinonasale Malignome vermehrt auf [IARC, 1997]. Für die Gesamtbevölkerung liegen die aufgenommenen Chrommengen in der Regel weit unter den Bereichen, bei denen eine chronische Toxizität und ein erhöhtes Krebsrisiko anzunehmen ist [Rowbotham et al., 2000].

Die *International Agency for Research on Cancer* der Weltgesundheitsorganisation WHO sieht ausreichende Beweise für die Karzinogenität von Cr(VI)-Verbindungen, wie sie in der Chromatproduktion, der Chromatpigmentproduktion und der Verchromung angetroffen werden. Cr(VI)-Derivate werden deshalb als karzinogen für Menschen (Gruppe 1) eingestuft. Für die Karzinogenität von metallischem Chrom und Cr(III)-Verbindungen gibt es nur ungenügende Beweise. Sie werden deshalb als hinsichtlich ihrer Karzinogenität nicht klassifizierbar (Gruppe 3) eingeordnet [IARC, 1997].

4.2.4.2 Neuere Aspekte bei der Einschätzung der karzinogenen Potenz

Die Frage, ob eine Festlegung von Schwellenwerten für Karzinogene zulässig ist, wird sehr kontrovers diskutiert. Im Besonderen gilt dies für Verbindungen mit direkter genotoxischer Wirkung. Im Falle von Chromverbindungen ist seit mehr als 100 Jahren eine Assoziation mit

sinonasalen Krebserkrankungen des Menschen bekannt [De Flora, 2000]. Hexavalentes Chrom ist in der überwiegenden Zahl der *In-vitro*-Untersuchungen, die den Effekt auf tierische und humane Zellen untersuchen, konsistent und eindeutig genotoxisch wirksam [De Flora et al., 1997; De Flora, 2000]. Zu den gesicherten Effekten zählen DNS-Fragmentierung, Genmutationen, Schwesterchromatidaustausch, chromosomale Aberrationen, Aneuploidie und Zelltransformationen [Minister of Supply and Services Canada, 1994; IARC, 1997]. Trotzdem gehören Cr(VI)-Verbindungen zu den genotoxischen Karzinogenen, die aufgrund von toxikokinetischen Beschränkung der zellulären Cr(VI)-Exposition durch präsystemische und extrazelluläre Faktoren wahrscheinlich einem Schwellenwertmechanismus unterliegen [Minister of Supply and Services Canada, 1994; De Flora, 2000]. Für diese Hypothese spricht der im Verhältnis zu den zahlreichen positiven *in-vitro*-Tests niedrige Anteil tierexperimenteller Studien, die karzinogene Effekte für Cr(VI)-Verbindungen nachweisen konnten. Um diese Effekte zu erreichen, mussten oft extrem hohe Dosen über Applikationswege angewendet werden, die die Expositionssituation des Menschen nicht abbilden und physiologische Schutzmechanismen umgehen [De Flora et al., 1997; De Flora, 2000]. Auch die Ergebnisse epidemiologischer Studien sprechen für wirksame Schutzmechanismen, da nur Lunge und sinonasaler Raum bei langjähriger hochdosierter Exposition zu den Zielorganen der Wirkung von Cr(VI)-Derivaten zählen [Minister of Supply and Services Canada, 1994; IARC, 1997; De Flora et al., 1997; De Flora, 2000]. In niedrigen Dosen hat dagegen auch eine langjährige Exposition gegenüber Chromdämpfen und -stäuben keine signifikanten Veränderungen der nasalen Mukosa und keinen Anstieg nukleärer Schädigungsparameter zur Folge [Huvinen et al., 2002].

Die lokale Barriere gegen inhalede Cr(VI)-Verbindungen wird durch den oberflächlichen Schleimfilm im Bereich des Respirationstrakts und dessen gerichteten Transport gebildet [De Flora, 2000]. Bei inhalativer Exposition von Versuchstieren hat Cr(VI) deshalb erst ab einer Konzentration von $0,1 \text{ mg/m}^3$ lokale toxische Effekte und gilt nur als schwaches Karzinogen [Minister of Supply and Services Canada, 1994]. Auch innerhalb der Zielzellen stellt die Reduktion von Cr(VI) häufig eine Entgiftungsleistung dar. Wegen der extremen Reaktivität der bei der Redoxreaktion erzeugten Metaboliten und reaktiven Sauerstoffspezies ist eine deletäre Wirkung auf die DNS nur bei direkter räumlicher Nähe möglich. So existiert das Hydroxylradikal ($\cdot\text{OH}$) intrazellulär maximal 1 ns und kann in dieser Zeit nicht mehr als 1 nm zurücklegen [De Flora, 2000].

Wird eine gewisse Expositions-dosis überschritten, dann können die vorhandenen Schutzmechanismen trotzdem überwunden werden. Die vielfältigen deletären Wirkungen beeinflussen die Expression von mehr als 220 Genen [Wang und Shi, 2001]. An humanen Lungene-pithelzellen konnte die Bildung von 8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin (8-oxodGuo) durch Natriumdi-chromat nachgewiesen werden. 8-oxodGuo wirkt hochgradig mutagen und kann durch eine Fehlpaarung mit Adenin während der DNS-Replikation eine G→T-Transition bewirken. Diese Punktmutation wird unter anderem häufiger im Tumorsuppressorgen p53 von Zellen aus malignem Gewebe gefunden [Hodges et al., 2001; Hailer-Morrison et al., 2003; Slade et al., 2005]. Die ausgelöste Fehlregulation der Apoptose kann die maligne Transformation von Zellen beeinflussen. Dieser Effekt stellt möglicherweise einen entscheidenden Mechanismus bei der Tumorentstehung dar [Chen et al., 2001; Gupta, 2001]. Das Ausmaß der Bildung von 8-oxodGuo ließe sich durch Anwendung einer modifizierten Version der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese quantifizieren, in der oxidierte Basen durch das Enzym Formamidopyrimidin-DNS-Glykosylase (FPG) in Strangbrüche umgewandelt werden [Merzenich et al., 2001; Lee et al., 2005].

4.3 Diskussion der Ergebnisse mit *N*-Nitrosodiethylamin

4.3.1 Toxikologischer Hintergrund

4.3.1.1 Mögliche Aufnahmewege von *N*-Nitrosodiethylamin

Die Hauptaufnahmewege für *N*-Nitrosodimethylamin (NDEA) sind Inhalation, Ingestion sowie Hautkontakt. In der Lunge des Menschen wird es vollständig resorbiert. Auch im Gastrointestinaltrakt ist mit einer totalen Aufnahme zu rechnen. Bei Hautkontakt geht man analog zu Untersuchungsergebnissen mit *N*-Nitrosodimethylamin (NDMA) von einer effektiven Resorption von mindestens 30 % der aufgetragenen Menge aus [Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz, 2004].

4.3.1.2 Biotransformation und zelluläre Wirkung von *N*-Nitrosodiethylamin

Wie *in-vitro*-Studien zeigen konnten, sind verschiedene Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen (P450) in der Lage, durch die Biotransformation von NDEA dessen Aktivierung oder Inaktivierung auszulösen [Camus et al., 1993]. Bei der Inaktivierung von NDEA entstehen Nitrat und Ethylamin, die keine weitere Gefährdung für den Körper darstellen. Kommt es dagegen zur metabolischen Aktivierung, so können DNS-Addukte gebildet werden, die in der Lage sind, Mutationen auszulösen. Dieser Vorgang ist in Abbildung 4-4 dargestellt. Beim Menschen sind neben CYP2E1 vor allem die Cytochrom-P450-Isoenzyme CYP2A6 und CYP2A13 in der Lage, den entscheidenden Schritt zu katalysieren, der in einer Hydroxylierung am α -C-Atom besteht [Svenberg et al., 1991; Camus et al., 1993; Koskela et al., 1999].

Die folgenden Reaktionen laufen spontan ab: Nach Abspaltung von Acetaldehyd entsteht durch Dissoziation ein Ethyldiazoniumium. Dieses kann mit den vier DNS-Basen Adenin (A), Thymin (T), Guanin (G) und Cytosin (C) an Positionen mit hoher Elektronendichte reagieren. Unter Eliminierung von N_2 und H_2O werden so Ethylgruppen als Addukte auf Sauerstoff- oder Stickstoffatome der Basen übertragen [Singer, 1985].

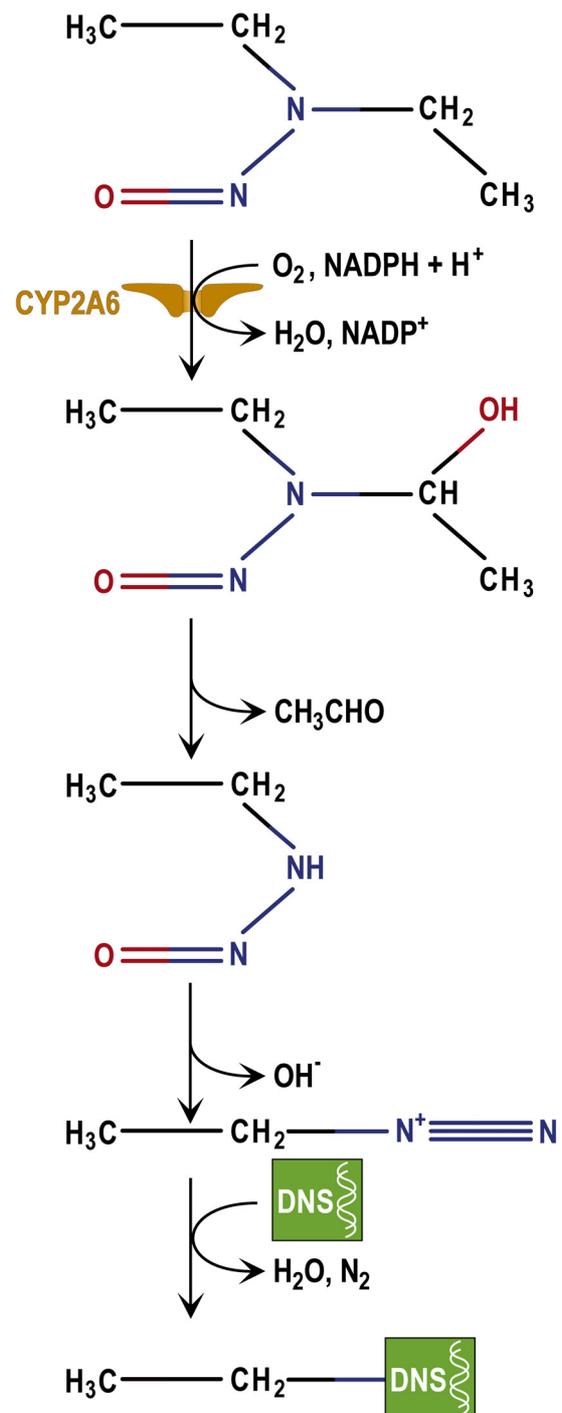


Abbildung 4-4 Bildung von DNS-Addukten durch *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA).

Die erzeugten Basenmodifikationen besitzen unterschiedliches mutagenes Potenzial. Ausschlaggebend ist hierbei, ob durch die Basenmodifikation eine Veränderung der Basenfolge eintritt, und wie schnell diese gegebenenfalls repariert werden kann. Ein Lesefehler während der DNS-Replikation kann durch die modifizierten Basen O^4 -Ethyldeoxythymidin und O^6 -Ethyldeoxyguanosin auftreten, wodurch es zu einer T→C- bzw. G→A-Transition kommt. Konsekutiv wird ein TA- gegen ein CG- bzw. ein CG- gegen ein TA-Basenpaar ausgetauscht [Richardson et al., 1987]. Das Addukt an O^6 -Ethyldeoxyguanosin kann durch ein spezialisiertes Reparaturenzym rasch entfernt werden [Dyroff et al., 1986]. Da dieses Enzym aber nicht in der Lage ist, O^4 -Addukte zu reparieren, kommt es zu einer Akkumulation von O^4 -Ethyldeoxythymidin. Dies wird als Ursache für ein höheres mutagenes Potenzial dieser Basenmodifikation angenommen [Svenberg et al., 1984]. Mit dieser Hypothese decken sich Ergebnisse von tierexperimentellen Untersuchungen, denen zufolge O^4 -Ethyldeoxythymidin das Addukt ist, welches mit der Ausbildung hepatischer Karzinome am besten korreliert [Dyroff et al., 1986].

Durch die vorgestellten Alkylierungsmechanismen kann NDEA in verschiedenen Organen DNS-Addukte bilden. Da das intermediäre Diazoniumion zu reaktiv ist, um in signifikanten Mengen systemisch verteilt zu werden, ist jedoch eine lokale Aktivierung notwendig. Das Ausmaß dieser Aktivierung hängt von der organspezifischen Bioverfügbarkeit und Induzierbarkeit der notwendigen P450-Isoenzyme ab [Camus et al., 1993]. Da nicht nur die bioaktivierenden Cytochrome, sondern auch die beteiligten DNS-Reparaturenzyme in ihrer Konzentration variabel sind, ist die organspezifische mutagene Wirkung insgesamt nur schwer abzuschätzen [Yamazaki et al., 1992].

4.3.2 Diskussion der Ergebnisse des Annexin-V-Affinitätstests

In den Experimenten zur vorliegenden Arbeit findet sich weder bei ein- noch bei dreifacher Inkubation mit NDEA ein Hinweis für eine vermehrte Induktion apoptotischer Vorgänge in den Zellen der Miniorgane. Zur Wirkung von NDEA auf die Mechanismen der Apoptose liegen nur Ergebnisse von *in-vivo*-Experimenten mit Ratten vor. Eine einmalige hochdosierte NDEA-Exposition (10-200 mg/kg) verursachte dabei eine erhöhte Apoptoserate von Hepatozyten [Daoust und Morais, 1986]. Da die Apoptoserate mit der NDEA-Dosis positiv korreliert war, wurde die Möglichkeit einer physiologischen Strategie des Körpers zur Elimination DNS-geschädigter Zellen postuliert [Tessitore, 2000]. Diese Hypothese wird gestützt durch Untersuchungen, die neben der Aktivierung weiterer Apoptosemechanismen eine massive Induktion des Tumorsuppressorgens p53 bei einmaliger hochdosierter NDEA-Exposition zeigen konnten. Diese bewirkt entweder einen Arrest des Zellzyklus, um DNS-Reparaturen zu ermöglichen, oder leitet die Apoptose ein [Lim, 2003; Silins et al., 2004]. Niedrige Expositionsdosen bewirken dagegen eine abgeschwächte p53-Antwort, die weder akute nekrotische, noch apoptotische Prozesse initiiert [Silins et al., 2004]. Das Fehlen einer erhöhten Apoptoserate könnte in Analogie zu diesen Ergebnissen durch eine subkritische Expositionsdosis bedingt sein, die noch keine apoptotischen Reaktionen induziert. Die in den durchgeführten Versuchen eingesetzte Inkubationsdosis von 50 mM liegt dabei deutlich oberhalb des Expositionsniveaus, das unter realen Bedingungen erreicht wird.

4.3.3 Diskussion der Ergebnisse des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay

Eine einstündige Inkubation mit NDEA führte weder bei den Zellen der Miniorgane, noch der Einzelzellsuspension zu einer signifikanten Erhöhung des DNS-Fragmentierungsgrades gegenüber den Negativkontrollen. Bei dreimaliger Inkubation wird das Signifikanzniveau ebenfalls nicht erreicht, mit α -Werten von $p=0,054$ und $p=0,104$ weist der Trend jedoch auf eine erhöhte DNS-Fragmentierung bei mehrmaliger Inkubation hin. Dies würde den Ergebnissen von Untersuchungen entsprechen, die Hinweise für eine genotoxische Wirkung von NDEA an oropharyngealer, laryngealer und nasaler Mukosa sowie periphere Lymphozyten nachweisen konnten [Harréus et al., 1999; Kleinsasser et al., 2001; Wallner, 2003; Kleinsasser et al., 2004b]. In einer Untersuchung, in der Miniorgane nasaler Mukosa zum Einsatz kamen, wurde bei wiederholter Inkubation ebenfalls eine geringgradige, aber signifikante Erhöhung der DNS-Fragmentierung gezeigt [Kleinsasser et al., 2001; Wallner, 2003]. Für das höhere Fragmentierungsniveau in den vorangegangenen Versuchen könnte das verwendete organische Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) verantwortlich sein. DMSO findet bei experimentellen Studien häufig Verwendung. In jüngerer Zeit sind allerdings zahlreiche Nebeneffekte beschrieben worden, die die Wirkung von NDEA modifizieren könnten. So wurde in verschiedenen Untersuchungen an humanen Zellen eine dosisabhängige Inhibition der Expression und Aktivität verschiedener P450-Isoenzyme inklusive CYP2A6 und anderer am Fremdstoffmetabolismus beteiligter Enzyme gezeigt [Chauret et al., 1998; Hickman et al., 1998; Busby et al., 1999; Easterbrook et al., 2001; Nishimura et al., 2003]. Zu den weiteren beobachteten Effekten von DMSO auf zellulärer Ebene zählt die Störung von Membranpermeabilität, Zellzyklus, Zelldifferenzierung und Apoptose [Santos et al., 2003; Schäffer, 2003]. Durch die Verwendung des Nährmediums BEBM wurde in der vorliegenden Arbeit ein organisches Lösungsmittel als möglicher Störfaktor vermieden. Obwohl vom Vorhandensein eines Enzyms nicht direkt auf seine metabolische Aktivität geschlossen werden kann, spricht der Nachweis des Schlüsselenzyms CYP2A6 während des gesamten Kultivierungszeitraums gegen einen Verlust der Stoffwechselkompetenz als Erklärung für die geringe durch NDEA induzierte DNS-Fragmentierung.

Letztlich muss in Anbetracht der von Vorergebnissen partiell divergierenden Resultate auch ein systematischer Fehler bei Versuchsdurchführung und Auswertung in Betracht gezogen werden [Kleinsasser et al., 2001; Wallner, 2003]. Für eine Fehlerquelle bei der Exposition besteht kein Hinweis, da verschiedene Chargen von NDEA eingesetzt wurden, die Verdünnung nach einem innerhalb des Labors standardisierten Protokolls erfolgte und auf strengen Lichtschutz angesichts der Photolabilität der Substanz geachtet wurde. Möglicherweise ist die gewählte Inkubationszeit von 60 min zu kurz für die Einleitung der komplexen Stoffwechselforgänge, die notwendig sind, um eine genotoxische Wirkung von NDEA hervorzurufen. Eine objektive Analyse wurde durch die randomisierte Auswertung der Objektträger garantiert.

4.3.4 Diskussion der Ergebnisse der durchflusszytometrischen CYP2A6-Bestimmung

4.3.4.1 CYP2A6-Konzentration im Verlauf der Kultivierung

Die hepatische Bioaktivierung des Prokarzinogens NDEA erfolgt primär durch CYP2A6, das in der Leber 5-10 % des gesamten mikrosomalen Cytochrom-P450-Gehalts ausmacht [Raunio et al., 2001; Le Gal et al., 2003]. Daneben konnte CYP2A6-mRNS und das CYP2A6-Enzym in nasaler, bronchialer und ösophagealer Mukosa nachgewiesen werden [Thornton-Manning und Dahl, 1997; Crawford et al., 1998; Godoy et al., 2002]. Da der CYP2A6-Gehalt eng mit der enzymatischen Aktivität korreliert, kann eine lokale Metabolisierung von NDEA angenommen werden [Venkatakrisnan et al., 2001; Le Gal et al., 2003].

Während CYP2A6 die vorherrschende CYP2A-Isoform in hepatischem Gewebe ist, scheint CYP2A13 bei ähnlicher metabolischer Aktivität und Affinität gegenüber NDEA vor allem in Zellen des Respirationstrakts produziert zu werden. Die höchste Expressionsrate wurde in Zellen nasaler Mukosa gemessen, dort liegt die Bildungsrate fünfmal höher als die von CYP2A6 [Koskela et al., 1999; Su et al., 2000]. Die beiden Isoenzyme besitzen eine zu 95,4 % identische Aminosäuresequenz, besitzen eine große strukturelle Ähnlichkeit und überschneiden sich hinsichtlich ihres Substratspektrums im Bereich der tabakspezifischen Nitrosamine [Su et al., 2000; Bao et al., 2005]. Durch die strukturelle Ähnlichkeit wird eine immunzytochemische Differenzierung der beiden Proteine erschwert. Spezifische Antikörper gegen CYP2A13 sind kommerziell nicht verfügbar, eine Kreuzreaktion des in dieser Arbeit verwendeten monoklonalen Anti-CYP2A6-Antikörpers mit CYP2A13 kann nicht ausgeschlossen werden.

In den durchgeführten Versuchen konnte bei allen Probanden die Expression von CYP2A6 in Zellen nasaler Mukosa nachgewiesen werden. Nach Anlage der Miniorgane bleibt die Konzentration des Enzyms über den Kultivierungs- und Untersuchungszeitraum von elf Tagen nachweisbar. Bei sinkender Tendenz zeigt der errechnete mittlere Multiplikationsfaktor keine wesentliche Veränderung der Konzentration im Verlauf. Im gewählten Kulturmedium BEBM sind Glukokortikoide und Insulin enthalten, die bei Organkulturen aus Leberschnitten das Absinken verschiedener Cytochrom-P450-Isoenzyme stabilisieren [Renwick et al., 2000]. Der Nachweis von CYP2A6 in den Zellen der Miniorgane spricht für eine stabile Konservierung eines *in-vivo*-nahen Zustands des fremdstoffverarbeitenden Systems unter den Kulturbedingungen.

Die verwendeten Techniken der Fixierung, Permeabilisierung, indirekten Immunfluoreszenzfärbung und durchflusszytometrischen Analyse haben sich bei der Untersuchung verschiedener intrazellulärer Antigene bewährt. Unter anderem wurden sie zum Nachweis von Zytokinen, viralen Partikeln, Enzymen und Rezeptoren eingesetzt [Kallas et al., 1999; Krutzik et al., 2004]. Sie sind auch zur Detektion von Strukturen innerhalb von Zellorganellen geeignet, beispielsweise im Golgi-Apparat oder im endoplasmatischen Retikulum [Mrkoci et al., 1997; Ogino et al., 2003]. Der Einsatz eines durchflusszytometrischen Verfahrens zum Nachweis eines intrazellulären Cytochrom-P450-Isoenzyms ist bisher nur in einer verfügbaren Arbeit beschrieben. In dieser wurde erfolgreich das Vorhandensein von CYP1A1 in epidermalen Zellen der Maus gezeigt [Stauber et al., 1995]. Da CYP2A6 für die Aktivierung von zahlreichen Prokarzinogenen eine Rolle spielt, könnte sein Nachweis in nasalem Epithel auch für die lokale Wirkung anderer Xenobiotika toxikologische Relevanz besitzen [Thornton-Manning und Dahl, 1997; Omiecinski et al., 1999].

4.3.4.2 Interindividuelle Variabilität der CYP2A6-Konzentration

In der durchflusszytometrischen Analyse ergab sich für die Zellen frisch explantierter nasaler Mukosa eine interindividuelle Variationsbreite der zellulären CYP2A6-Konzentration um das 2,4fache. Für den Gesamtgehalt nasaler Schleimhautzellen an Cytochrom P450 wird in früheren Studien eine Schwankungsbreite um den Faktor 10-15 angegeben, die Konzentration der Phase-II-Enzyme schwankt dabei um das 4-6fache [Thornton-Manning und Dahl, 1997]. Bei Untersuchungen des hepatischen CYP2A6-Gehalts lag die Variationsbreite mit einem Faktor von 24 für die CYP2A6-Konzentration bzw. 68 für die enzymatische Aktivität weitaus höher [LeCluyse, 2001; Xu et al., 2002; Le Gal et al., 2003]. Die Ursache für diese große interindividuelle Variabilität der Enzymexpression und -aktivität liegen vor allem im genetischen Polymorphismus des CYP2A6-Gens, der in den letzten Jahren entdeckt wurde [Xu et al., 2002; Fujieda et al., 2004]. Die meisten der genetischen Varianten resultieren in einer reduzierten metabolischen Kapazität [Venkatakrisnan et al., 2001]. Der Stellenwert dieser Polymorphismen könnte für verschiedene Bevölkerungsgruppen erheblich differieren, da die Frequenz der defekten Allele in Abhängigkeit von der ethnischen Abstammung erhebliche Unterschiede zeigte [Raunio et al., 2001; Xu et al., 2002]. Während die bekannten Deletionen bei Menschen asiatischer Herkunft in bis zu 20 % der untersuchten Proben gefunden werden, liegt die Häufigkeit bei Kaukasiern unter 1 % [Raunio et al., 2001; Ariyoshi et al., 2002]. Die begrenzte Anzahl der untersuchten Probanden, die zudem alle kaukasischer Abstammung waren, könnte die im Vergleich zu anderen Untersuchungen relativ geringe Variationsbreite der gemessenen initialen CYP2A6-Konzentration in der vorliegenden Arbeit erklären.

Praktische Auswirkungen genetischer CYP2A6-Varianten ergeben sich beispielsweise für den Zigarettenkonsum von Rauchern. Das Rauchverhalten wird durch genetische Faktoren und Umweltfaktoren beeinflusst, wobei genetische Faktoren mehr als 70 % zum Erhalt der Abhängigkeit und der Menge gerauchter Zigaretten beitragen [Xu et al., 2002; Benowitz et al., 2002]. Als entscheidender Parameter bei der Aufrechterhaltung der Zigarettenabhängigkeit wird ein konstanter Nikotinspiegel im Blut gesehen [Xu et al., 2002; Benowitz et al., 2002]. Da CYP2A6 mehr als 90 % des Nikotinabbaus leistet, führt eine verminderte CYP2A6-Aktivität durch Defektvarianten des kodierenden Gens zu einem signifikant geringeren Zigarettenkonsum [Venkatakrisnan et al., 2001; Xu et al., 2002; Fujieda et al., 2004]. In einer groß angelegten Studie mit insgesamt 1.705 Rauchern konnten je nach dem homozygoten oder heterozygoten Vorliegen der defekten Allele Gruppen gebildet werden, die einen signifikant unterschiedlichen Zigarettenkonsum aufwiesen. Den geringsten Konsum von durchschnittlich 15 Zigaretten pro Tag hatten dabei Personen mit einer homozygoten Deletion des CYP2A6-Gens (CYP2A6*4/*4). Der höchste Zigarettenkonsum lag dagegen bei Personen mit dem homozygoten Wildtyp des Gens (CYP2A6*1/*1) vor [Ariyoshi et al., 2002; Fujieda et al., 2004]. Der nasale Metabolismus von Nikotin ist auch für die Dosierung von Nikotinsprays zur Raucherentwöhnung interessant. Genetisch bedingte Unterschiede in der Kapazität des lokalen Nikotinabbaus führen hier zu einer erheblichen interindividuellen Variationsbreite des Nikotinspiegels im Blut bei nasaler Applikation identischer Dosen [Benowitz et al., 1997].

Auch das individuelle Risiko für Krebserkrankungen scheint durch das Vorliegen bestimmter CYP2A6-Allele beeinflusst zu werden. Nach neuem Verständnis werden die meisten Krebserkrankungen durch chemische Karzinogene verursacht, die in unserer Umwelt präsent sind

[Fujieda et al., 2004]. Die verantwortlichen Stoffe üben ihre deletäre Wirkung oft erst nach metabolischer Aktivierung durch körpereigene Enzyme aus. Die Kapazität dieser Enzyme zur Aktivierung chemischer Karzinogene wird deshalb als einer der Hauptfaktoren bei der Determinierung des individuellen Krebsrisikos gesehen [Fujieda et al., 2004]. Da genetische Polymorphismen über die Kapazität der relevanten Schlüsselenzyme maßgeblich entscheiden, müssten sie das Risiko der chemischen Karzinogenese beeinflussen [Ingelman-Sundberg, 2001; Fujieda et al., 2004]. Epidemiologische Auswirkungen sind allerdings nur bei einer ausreichend hohen Inzidenz der Defektmutationen zu erwarten, wie sie beispielsweise in asiatischen Populationen vorliegen.

Im Gegensatz zu Polymorphismus-abhängigen Medikamentennebenwirkungen konnten diese Zusammenhänge zwischen CYP-Polymorphismen und der individuellen Suszeptibilität gegenüber toxischen Umweltstoffen bis vor kurzem nicht nachgewiesen werden [Ingelman-Sundberg, 2001]. Da CYP2A6 neben Nikotin und NDEA auch für die Aktivierung zahlreicher weiterer Giftstoffe und Prokarzinogene in Tabakrauch zuständig ist, wurde die Rolle seiner Polymorphismen in den letzten Jahren intensiv untersucht [Xu et al., 2002]. In einer Studie zeigte sich bei Personen mit den Defektmutationen auch nach Korrektur der Zahlen um Zigarettenkonsum und Alter ein signifikant erniedrigtes Risiko, an Lungenkrebs zu erkranken [Fujieda et al., 2004]. Zu dem geschilderten Konzept passend ergab sich bei Stratifizierung der histologischen Subtypen der Lungenkrebs-erkrankungen vor allem eine Reduktion des Risikos für Plattenepithelzellkarzinome und kleinzellige Bronchialkarzinome, deren Assoziation mit Tabakrauchen epidemiologisch gut belegt ist [Ariyoshi et al., 2002; Fujieda et al., 2004]. Für einen Zusammenhang zwischen CYP2A6-Aktivität und den genannten Karzinomtypen sprechen auch Untersuchungen, denen zufolge CYP2A6 in bronchialem Epithel nachweisbar war, in peripherem Lungengewebe jedoch nicht. Diese Verteilung entspricht der Lokalisation der vor allem zentral gelegenen tabakassoziierten histologischen Krebstypen [Mace et al., 1998; Crawford et al., 1998; Hukkanen, 2002]. Die dargestellten Ergebnisse stützen die Idee, nach der genetische Polymorphismen von CYP2A6 in bestimmten Populationen nicht nur eine Determinante des Rauchverhaltens, sondern auch der Suszeptibilität gegenüber den assoziierten Lungenkarzinomen sein können [Raunio et al., 2001; Xu et al., 2002; Fujieda et al., 2004]. Für diese Ansicht sprechen auch Studien, die sowohl hinsichtlich der von Rauchern täglich benötigten Menge an Zigaretten, als auch hinsichtlich des Risikos, an einem Lungenkarzinom zu erkranken, ethnische Unterschiede zeigen konnten. Dabei weisen Chinesen aufgrund einer im Vergleich mit Kaukasiern etwa 35 % langsameren Metabolisierungsrate eine signifikant geringere Abbaugeschwindigkeit für Nikotin auf. Diese ist am ehesten durch eine erhöhte Frequenz defekter CYP2A6-Allele mit geringerer CYP2A6-Aktivität erklärbar [Benowitz et al., 2002]. In Folge dessen ist sowohl die Zahl gerauchter Zigaretten, als auch das Risiko an Lungenkrebs zu erkranken für chinesische Raucher signifikant niedriger als für kaukasische. Das relative Risiko gegenüber Nichtrauchern beträgt bei Chinesen 2,5-4,0, bei Kaukasiern dagegen 10,0-20,0 [Benowitz et al., 2002]. Auch das Risiko für sinonasale Karzinome ist bei Zigarettenrauchern zwei- bis dreifach erhöht. In Analogie zu den angeführten Untersuchungen könnte dies durch die lokale CYP2A6-Aktivität erklärt werden [Götte und Hörmann, 2004; Galati, 2005].

4.3.5 Beurteilung des Gefahrenpotenzials für den Menschen

4.3.5.1 Derzeitige Einschätzung der karzinogenen Potenz

Vor mehr als 40 Jahren wurde bei Nagetieren ein Zusammenhang zwischen der Entstehung sino-nasaler Karzinome und ihrer Exposition gegenüber verschiedenen Nitrosaminen festgestellt [Druckrey et al., 1963; Herrold, 1964]. NDEA ist in zahlreichen tierexperimentellen Studien an mehr als 40 Spezies untersucht worden. In den meisten dieser Untersuchungen induzierte es benigne oder maligne Tumoren [IARC, 1998b; Lijinsky, 1999]. Die hauptsächlich betroffenen Organe sind die Leber, der Respirationstrakt mit Trachea, Bronchien, Lunge und Nasenhöhle, der obere Verdauungstrakt mit Ösophagus und Magen sowie die Nieren [IARC, 1998b; Lijinsky, 1999]. Hinsichtlich der betroffenen Zielorganen und der Dosen, die zur Karzinominduktion notwendig sind, gibt es jedoch Unterschiede zwischen den verschiedenen Tierarten. Dieser ausgeprägte speziesabhängige Organotropismus von NDEA wird als Ausdruck von Unterschieden in Konzentration, Zusammensetzung und Aktivität der fremdstoffverarbeitenden und reparierenden Enzyme in Zielzellen gesehen [Chauret et al., 1997; Xu et al., 2002; Le Gal et al., 2003]. Die Extrapolation von Effekten bei einer Spezies auf eine andere muss also die organabhängige Verfügbarkeit und Induzierbarkeit beteiligter Enzyme einschließen [Camus et al., 1993]. Die *International Agency for Research on Cancer* der Weltgesundheitsorganisation WHO stuft NDEA wegen seiner Karzinogenität im Tierversuch nur in die Stoffgruppe 2A ein, weil keine eindeutigen epidemiologischen Daten zur Tumorinduktion beim Menschen vorliegen. In diese Kategorie fallen Stoffe, die bei einem ausreichenden Expositionsgrad „wahrscheinlich karzinogen für den Menschen“ sind [IARC, 1998b].

4.3.5.2 Neuere Aspekte bei der Einschätzung der karzinogenen Potenz

Die Diskussion der letzten Jahre über die Anwendbarkeit von Schwellenwerten auf Karzinogene hat sich nicht zuletzt an Reanalysen älterer Studiendaten entsponnen [Peto et al., 1991]. In diesen konnten bei logarithmischer Darstellung der Dosis und Darstellung der Skala bis 10^0 Moleküle für die Wirkung von mehr als 30 verschiedenen Karzinogenen Schwellenwerte hergeleitet werden, unter anderem für NDEA [Waddell, 2003a; Waddell, 2003b; Waddell, 2003c]. Die Annahme eines Schwellenwerts wird durch Untersuchungen unterstützt, die bei Exposition von Ratten gegenüber niedrigen Dosen von NDEA keine Läsionen nachweisen konnten, die ein erhöhtes Krebsrisiko vermuten lassen [Fukushima et al., 2002]. Bei Bakterien ist NDEA dagegen auch in niedriger Konzentration von 7,3-357 μM (0,75-36,46 $\mu\text{g/ml}$) mutagen wirksam. Die Existenz eines Schwellenwerts kann damit nur durch biologische Schutz- und Reparaturmechanismen erklärt werden, die die genotoxische Aktivität reduzieren und erst ab einer bestimmten Dosis überwältigt werden [Aiub et al., 2003]. Die Reparatur NDEA-typischer DNS-Veränderungen durch Basenexzision und Nukleotidexzision konnte bei niedrigen Dosen von NDEA nachgewiesen werden [Aiub et al., 2004]. Zu den weiteren Schutzmechanismen zählt eine Stimulation des Immunsystems, die Induktion von Entgiftungs- und Reparaturenzymen sowie die Hochregulation von Tumorsuppressoren [Fukushima et al., 2002]. Vor diesem Hintergrund ergibt sich die Notwendigkeit einer weiteren Erforschung der spezies- und organspezifisch differierenden Ausstattung an Aktivierungs- und Schutzmechanismen, die eine komplett neue Risikobewertung chemischer Karzinogene für den Menschen bedeuten könnte. Eine abschließende Beurteilung des Gefahrenpotenzials ist derzeit nicht möglich [Waddell, 2003a; Waddell, 2003b; Waddell, 2003c].

4.4 Diskussion der Ergebnisse mit *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin

4.4.1 Toxikologischer Hintergrund

4.4.1.1 Mögliche Aufnahmewege von *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin

Eine Exposition gegenüber MNNG ist durch Hautkontakt und durch die Inhalation oder Ingestion von Staubpartikeln möglich [National Toxicology Program, 2004b].

4.4.1.2 Biotransformation und zelluläre Wirkung von *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin

MNNG stellt als monofunktionell alkylierender Stoff ein experimentell häufig eingesetztes Modellkarzinogen und Mutagen dar [Slamenova et al., 1997; Shi et al., 2004]. In wässriger Umgebung setzt es durch spontane hydrolytische Spaltung das aktive Intermediat Methyl Diazohydroxid frei, das alkylierende Eigenschaften besitzt und an alle Sauerstoff- und die meisten Stickstoffatome der DNS binden kann [Kumaresan et al., 1995; Slamenova et al., 1997]. Schon in niedrigen Konzentrationen erzeugt es massive DNS-Schäden [Wesierska-Gadek et al., 2003]. Vor allem *O*⁶-Methylguanin stellt eine der mutagensten und zytotoxischsten Läsionen dar, die durch Alkylanzien gebildet werden kann [Kwak et al., 2000; Tomita-Mitchell et al., 2000]. Obwohl es unter den zahlreichen MNNG-induzierten Läsionen nur 8 % aller Addukte ausmacht, ist es hauptsächlich für seine Genotoxizität, Mutagenität und Karzinogenität verantwortlich [Dunkern et al., 2003]. Das zelluläre Reparatursystem der *O*⁶-Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT) ist in seiner Kapazität limitiert und kann nur eine begrenzte Anzahl modifizierter Basen wiederherstellen [Edara et al., 1999; Zuo et al., 2004]. Wird die Veränderung in der Folge nicht rechtzeitig durch Basenexzision- oder Mismatchreparatur behoben, kommt es an den betroffenen G:C-Basenpaaren zu Basensubstitutionen [Wesierska-Gadek et al., 2003; Shi et al., 2004]. Die prädominante Form der Mutation ist dabei die G→A-Transition, die durch eine Fehlpaarung von *O*⁶-Methylguanin und Thymin während der DNS-Replikation hervorgerufen wird [Tomita-Mitchell et al., 2000; Wesierska-Gadek et al., 2003]. Die *O*⁴-Position des Thymidin stellt einen weiteren Angriffspunkt dar. Hier kann allerdings die direkte Dealkylierung durch Methyltransferasen zu einer raschen Reparatur ohne Ausbildung von DNS-Strangbrüchen führen [Slamenova et al., 1997].

MNNG induziert in menschlichen Zelllinien DNS-Strangbrüche, chromosomale Aberrationen, Schwesterchromatidaustausche und Veränderungen der DNS-Synthese. Es ist an Ratten, Mäusen, Hamstern, Hasen und Hunden auf seine Karzinogenität hin untersucht worden und erzeugt dort Tumoren in zahlreichen Organen. Auch durch Einzeldosen können Karzinome induziert werden [IARC, 1998a]. Der karzinogene Effekt tritt vor allem lokal am primär exponierten Gewebe auf [Brault et al., 1999].

4.4.2 Diskussion der Ergebnisse des Annexin-V-Affinitätstests

Xenobiotika, die *O*⁶-Addukte induzieren, sind nicht nur hochgradig mutagen und karzinogen, sondern in der Regel auch proapoptotisch wirksam [Dunkern et al., 2003; Wesierska-Gadek et al.,

2003]. In den Zellen humaner nasaler Mukosa, die in der vorliegenden Arbeit eingesetzt wurden, konnte jedoch weder nach einmaliger, noch nach dreimaliger Inkubation mit MNNG eine erhöhte Apoptoserate nachgewiesen werden. Diese überraschende Beobachtung entspricht den Ergebnissen anderer Untersuchungen, in denen trotz starker DNS-Schäden eine Aktivierung des p53-Systems und apoptotische Vorgänge bei Exposition humaner Zellen gegenüber MNNG ausblieb [Roser et al., 2001; Wesierska-Gadek et al., 2003a; Wesierska-Gadek et al., 2003b]. Offensichtlich reicht die isolierte Generierung starker genetischer Schäden in ruhenden Zellen durch rein genotoxisch wirkende Substanzen nicht aus, um über das Tumorsuppressorgen p53 akut apoptoseinduzierend zu wirken [Roser et al., 2001]. Zugefügte genetische Schäden gewinnen nur dann eine proapoptotische Wirkung, wenn eine rechtzeitige präreplikative Reparatur der O^6 -Addukte durch die O^6 -Methylguanin-DNS-Methyltransferase (MGMT) vor der nächsten Replikationsphase ausbleibt. In diesem Fall häufen sich Doppelstrangbrüche, die durch DNS-Replikation und insuffiziente Mismatch-Reparatur auftreten [Kaina, 2004]. Diese Doppelstrangbrüche führen zu einem Absinken der intrazellulären Konzentration des antiapoptotischen Proteins Bcl-2. Dadurch kommt es zur vermehrten Freisetzung von Cytochrom c und anderer proapoptotischer Faktoren aus den Mitochondrien und schließlich zu einer Aktivierung der apoptotischen Kaskade über Caspase 9. Das p53-System ist an diesen Vorgängen offenbar nicht beteiligt [Ochs und Kaina, 2000; Kaina, 2004]. Der Zeitpunkt der Apoptoseeinleitung ist also entscheidend von Zellproliferations- und DNS-Replikationsrate abhängig [Kaina, 2004]. Da nasale Schleimhaut eine niedrige Proliferationsgeschwindigkeit besitzt, treten apoptotische Vorgänge, die auf einem Erschöpfen der zellulären Reparaturmechanismen beruhen, möglicherweise erst nach dem 96stündigen Beobachtungszeitraum auf [Calderon-Garciduenas et al., 1999].

4.4.3 Diskussion der Ergebnisse des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay

4.4.3.1 Ergebnisse bei Mehrfachinkubation

MNNG stellt ein Modellkarzinogen und -mutagen dar. Als monofunktionell alkylierender Stoff besitzt es keine direkte DNS-spaltende Wirkung. Die im alkalischen EMGE-Assay detektierten Strangbrüche resultieren teilweise aus der Aktivität von Endonukleasen im Rahmen der Basenexzisions- und Nukleotidexzisionsreparatur. Daneben führen DNS-Addukte bei der angewendeten alkalischen Form des EMGE-Assays ebenfalls zu einer Erhöhung des messbaren DNS-Fragmentierungsgrades [Slamenova et al., 1997]. Für eine vermehrte Apoptoseinduktion fand sich im Annexin-V-Affinitätstest kein Hinweis [Roser et al., 2001; Rundell et al., 2003]. Bei einstündiger Inkubation der Miniorgane nasaler Mukosa mit MNNG ist im EMGE-Assay unmittelbar postexpositionell ein signifikant erhöhter DNS-Fragmentierungsgrad im Vergleich zur Negativkontrolle darstellbar. Dies entspricht zahlreichen anderen Untersuchungen an verschiedenen Geweben, die ebenfalls innerhalb der ersten Stunde nach Exposition einen maximalen primären DNS-Schaden nachweisen konnten [Brault et al., 1999; Wallner, 2003; Rundell et al., 2003].

An verschiedenen Geweben konnte nach dem Erreichen des maximalen Schädigungsgrads ein rascher Abfall des messbaren Schädigungsniveaus gezeigt werden [Rundell et al., 2003]. Bei gastraler Mukosa der Ratte sank das Schädigungsniveau bereits zwei Stunden postexpositionell wieder und erreichte nach 72 Stunden das Niveau der Kontrollansätze [Brault et al., 1999]. Dies

entspricht Ergebnissen mit Zellen verschiedener humaner Zelllinien [Slamenova et al., 1997]. Der schnelle Abfall des nachweisbaren DNS-Schadens lässt sich durch Reparaturvorgänge erklären, beispielsweise die Abspaltung induzierter DNS-Addukte durch protektive Methyltransferasen. Daneben gehen geschädigte Zellen in Geweben, die einem raschen Zellumsatz unterliegen, durch präreplikative Elimination rasch verloren [Brault et al., 1999]. Im Falle der Miniorgane kam es trotz des zeitlichen Intervalls von 48 Stunden zwischen den Inkubationen mit den wiederholten Expositionen zu einem Anstieg des medianen Schädigungsniveaus. Dies erklärt sich möglicherweise durch einen relativ langsamen Zellumsatz nasaler Mukosa, der die Kumulation von Zellen mit MNNG-induzierten DNS-Läsionen bei repetitiver Inkubation erlaubt [Calderon-Garciduenas et al., 1999; Kleinsasser et al., 2004a]. Diese Annahme wird durch Ergebnisse von Untersuchungen an Zellen nasaler Mukosa gestützt, die 24 Stunden nach Exposition gegenüber MNNG nur einen geringen Rückgang des Schädigungsniveaus zeigten [Wallner, 2003]. In gastraler Mukosa konnte zudem eine Fixierung des DNS-Schadens durch einen erhöhten Anteil stabiler Genmutationen infolge fehlerhafter Reparaturvorgänge nachgewiesen werden [Brault et al., 1999]. Wenn diese Mutationen die Funktion der zellulären Reparatursysteme stören, wäre ebenfalls eine Kumulation von DNS-Schäden bei mehrfacher Inkubation denkbar.

4.4.3.2 Ergebnisse bei Inkubation von Einzelzellen im Vergleich zu Miniorganen

Ähnlich den Ergebnissen mit Natriumdichromat ist das DNS-Schädigungsniveau der Zellen, die in Suspension mit MNNG inkubiert wurden, signifikant höher als das der Miniorganzellen. Neben einer kleineren exponierten Oberfläche und der schützenden Mukusschicht könnten die Zellen der Miniorgane durch den intakten Zellverbund eine höhere Aktivität des Reparaturenzyms O^6 -Methylguanin-DNS-Methyltransferase besitzen. Bei Blockierung dieses Enzymsystems konnte eine Erhöhung des Grades der DNS-Schädigung gezeigt werden [Dunkern et al., 2003].

4.4.4 Beurteilung des Gefahrenpotenzials für den Menschen

MNNG ist ein potentes, direkt mit der DNS reagierendes Karzinogen, das bei Versuchstieren Tumoren an exponierten Organen induziert [Kwak et al., 2000]. Glutathion im Kulturmedium ist in der Lage, die deletäre Wirkung von MNNG um den Faktor 100 zu verstärken. Der verantwortliche Mechanismus ist offensichtlich in der intrazellulären Aktivierung von MNNG durch von den Zellen aufgenommenes Glutathion oder Glutathiondisulfid zu sehen. Eine eindeutig ungefährliche Substanz dient damit als mächtiger Aktivator eines potenziellen Mutagens oder Karzinogens. Es zeigt die Notwendigkeit auf, nicht nur die direkte Wirkung einer Substanz zu betrachten, sondern auch die Interaktionen mit anderen Substanzen mit einzubeziehen [Kumaresan et al., 1995].

Es gibt keine Daten zu genetischen oder anderen Effekten von MNNG beim Menschen. Aus einem Forschungslabor wurden allerdings drei Fälle von Gehirntumoren und ein Kolonkarzinom innerhalb von 13 Jahren berichtet. Alle Personen waren mindestens sechs bis fünfzehn Jahre vor ihrem Tode MNNG ausgesetzt. In besagtem Labor waren allerdings auch andere Karzinogene im Einsatz [IARC, 1998a]. Die *International Agency for Research on Cancer* der WHO stuft MNNG deshalb nur als „wahrscheinlich karzinogen für Menschen“ ein (Gruppe 2A) [IARC, 1998a].

4.5 Diskussion der Miniorgane als Modell humaner nasaler Mukosa

4.5.1 Gebräuchliche *in-vitro*-Systeme nasaler Mukosa

Die chemische Karzinogenese läuft über komplexe stoff- und gewebespezifische Prozesse ab [Brault et al., 1999]. Damit ein karzinogener Fremdstoff tatsächlich eine maligne Erkrankung beim Menschen induzieren kann, muss seine Wirkung zahlreiche Schutzmechanismen überwinden. Nach dem Versagen der systemischen und zellulären Exkretions- und Entgiftungssysteme muss er in der Lage sein, DNS-Schäden zu verursachen, die nicht korrekt repariert werden können. Wenn irreversibel geschädigten Zellen der Apoptose entgehen, können in der Folge maligne Zellklone entstehen. Ist der Organismus nicht in der Lage, die entstehende abnormale Zellproliferation auszulöschen, können diese Zellklone maligne Tumoren bilden [Kwak et al., 2000]. Speziesunterschiede hinsichtlich der Anatomie des nasalen Raums, der Zellzusammensetzung und der Enzymausstattung schränken die Aussagekraft von tierexperimentellen Untersuchungen stark ein [Hoang et al., 2002]. Für Toxizitätsstudien werden deshalb zunehmend *in-vitro*-Modelle unterschiedlichen Komplexitätsgrades eingesetzt, die humanes Gewebe verwenden [Reed, 1997]. Die Vielschichtigkeit der ineinandergreifenden metabolischen Vorgänge stellt an *in-vitro*-Systeme, die die Wirkung auf den Menschen valide imitieren sollen, hohe Anforderungen.

4.5.1.1 Isolierte Zellbestandteile und Einzelzellen aus Zelllinien

Als einfachste Modelle finden isolierte Zellfraktionen und gereinigte Enzyme sowie Zellkulturen aus transformierten Zellen Verwendung [Reed, 1997]. Isolierte Zellbestandteile und gereinigte Enzyme sind vor allem zum Nachweis von Reaktionsabläufen geeignet, deren schädigender Effekt durch Untersuchungen an anderen Organen schon bekannt ist. Um Schädigungsmechanismen toxischer Stoffe aufzudecken, sind Untersuchungen isolierter Enzymsysteme oder Zellfraktionen angesichts der komplexen und mutmaßlich gewebespezifischen Stoffwechselwege nur wenig aussagekräftig [Reed, 1997]. Als komplizierteres Testsystem werden in solchen Fällen oft humane nasale Einzelzellen aus Zelllinien eingesetzt. Dabei handelt es sich entweder um transformierte Zellen oder um Zellen aus nasalen Tumoren, die sich durch eine relativ lange Lebensdauer und eine hohe Proliferationsaktivität auszeichnen [Merkle et al., 1998]. Hinsichtlich Gewebearchitektur, Zellzusammensetzung und -differenzierung entsprechen die Zellen aber nicht mehr ihrem Ursprungsorgan [Merkle et al., 1998]. Besonders das Fehlen der phänotypischen Expression stoffwechselrelevanter Gene begrenzt meist die Einsetzbarkeit immortalisierter Zelllinien [LeCluyse, 2001].

4.5.1.2 Primäre Zellkulturen

Größere Zellverbände können durch primäre Zellkulturen aus humanem nasalem Epithel erzeugt werden. Dabei werden Gewebefragmente angezüchtet, die durch intravitale Bürstenabstriche, bei chirurgischen Eingriffen oder durch postmortale Biopsien gewonnen werden. Die Kultivierung der Zellen beginnt dann entweder durch direktes Ausplattieren einer Einzelzellsuspension oder durch das Auswachsen der Epithelzellen von einem Explantat auf organische oder anorganische Trägermedien [Reed, 1997; Merkle et al., 1998]. Die erzeugten Zellkulturen sind unkompliziert in der Handhabung und führen zu reproduzierbaren Resultaten [Hoang et al., 2002]. Nachteilig ist vor

allem die begrenzte Lebensdauer der primären Zellkulturen. Außerdem wird der Einfluss verschiedener Träger- und Nährmedien auf Wachstum und Differenzierungsmuster der Zellen unterschiedlich bewertet [Merkle et al., 1998]. Führt der Weg zu einer Zellkultur über die Separierung des Ausgangsgewebes in eine Einzelzellsuspension, so gehen ursprüngliche Gewebearchitektur und interzelluläre Kommunikation verloren [Hoang et al., 2002]. Die Bedeutung dieser Strukturen konnte in vergleichenden Untersuchung der Permeabilität von frisch exzidiertem Gewebe gegenüber humanen nasalen primären Zellkulturen gezeigt werden. Die primäre Zellkultur wies dabei eine deutlich geringere Permeabilität auf, was auf eine Behinderung des parazellulären Transportweges durch das unphysiologische Vorherrschen weniger Zelltypen und die daraus resultierende hohe Dichte an interzellulären *tight junctions* zurückgeführt wurde [Merkle et al., 1998]. Die bisher für Permeabilitäts-, Metabolismus- und Toxizitätsstudien verfügbaren primären menschlichen Zellkulturen nasaler Mukosa variieren noch erheblich von der Situation *in vivo* [Merkle et al., 1998]. Sie liefern zwar eine beträchtliche Menge an Informationen zu möglichen Schädigungsmechanismen von Xenobiotika, eine Quantifizierung des tatsächlichen Gefahrenpotenzials der untersuchten Verbindungen *in vivo* ist aufgrund der gewonnenen Informationen aber in der Regel nicht möglich [Reed, 1997; Merkle et al., 1998]. Um die prädiktive Aussagekraft zu erhöhen, müssen die artspezifischen physiologischen, histologischen, zellulären und die enzymatischen Charakteristika des nasalen Fremdstoffmetabolismus für eine längere Versuchsdauer erhalten bleiben [Reed, 1997].

4.5.2 Stellenwert von Miniorganen

Die bedeutende Rolle des zellulären und extrazellulären Kontextes für die Differenzierung von Zellen wurde bereits Anfang des 20. Jahrhunderts erkannt [Spemann und Mangold, 1924]. Die dafür verantwortlichen Adhäsionsmoleküle und extrazellulären Matrixproteine werden seit den 1980er Jahren beschrieben und in ihrer Funktion für die Zellhomöostase charakterisiert. Trotz der etablierten Einsicht in die bedeutsamen Funktionen von extrazellulärer Matrix und interzellulärer Kommunikation finden Kulturmodelle, die diese gewebespezifisch nachbilden, erst seit relativ kurzer Zeit Verbreitung [Edelman und Keefer, 2005]. Der Einsatz dreidimensionaler Zellkultursysteme aus Gewebestücken intakten Ursprungsgewebes erlaubt im Vergleich zu isolierten Einzelzellen und primären Zellkulturen den Erhalt der ursprünglichen Gewebearchitektur, des Fremdstoffmetabolismus und der interzellulären Kommunikation [Hoet et al., 1997; Bates et al., 2000]. In den letzten Jahren sind sie zur Untersuchung zahlreicher Organe verwendet worden, darunter Lungen- und Nervengewebe, Darm- und Wangenschleimhaut [Hoet et al., 1997; Stacey und Viviani, 2001; Colon et al., 2001; Abud et al., 2005]. Den breitesten Einsatz finden derzeit Organkulturen aus Lebergewebe als Werkzeug bei der Untersuchung hepatischer Stoffwechselfvorgänge [Drahushuk et al., 1996; Battle und Stacey, 2001].

4.5.2.1 Histologische Eigenschaften

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Technik zur Kultivierung von Miniorganen wurde erstmals von Kleinsasser und Mitarbeitern auf nasale Schleimhaut übertragen, um die Auswirkung potenziell genotoxischer Stoffe auf menschliches Zielgewebe zu untersuchen [Steinsvåg et al., 1991; Kleinsasser et al., 2001]. Daneben werden Explantatkulturen humaner nasaler Mukosa für infektiologische Fragestellungen verwendet [Jackson et al., 1996; Soane et al., 2000; Middleton et

al., 2004]. Das verwendete Gewebe aus der Region der mittleren und unteren Nasenmuschel gilt unter Berücksichtigung des Ablagerungsmusters in der Nasenhöhle für die Untersuchung der Wirkung inhalierter Stoffe als besonders geeignet [Merkle et al., 1998]. Das dortige Epithel weist im Gegensatz zum uniformen respiratorischen Flimmerepithel tieferer Abschnitte des Respirationstrakts eine heterogene Zellzusammensetzung auf. Neben teilweise zilienbesetzten Zylinderepithelzellen besteht es aus Becherzellen, Basalzellen und Plattenepithelzellen [Augusto et al., 2001; Berger et al., 2003]. Im Verlauf der Entstehung der Miniorgane aus den eingesetzten Gewebefragmenten zeigt sich die große Regenerationsfähigkeit nasaler Schleimhaut. Entsprechend Untersuchungen an Miniorganen bronchialer Mukosa von Bals und Mitarbeitern laufen bei der Kultivierung nasalen Epithels dieselben Schritte der Wundheilung ab, wie *in vivo* [Ohashi et al., 1991; Bals et al., 1998; Wallner, 2003]. Dabei werden zunächst die nicht epithelisierten Schnittländer der exzidierten Gewebstücke durch Proliferation der verbleibenden Schleimhautanteile überwachsen. Innerhalb von sieben Tagen ist die bindegewebige Matrix lückenlos von mehrschichtigem Plattenepithel umschlossen. In der Folge differenzieren sich die Zellen zum histologischen Bild von Mukosa des vorderen Teils der Nase [Jahnke, 1992; Wallner, 2003]. Die Miniorgane sind von serösem Schleim bedeckt, das Epithel besteht partiell aus zilientragenden Zellen, deren Aktivität das physiologische metachronal-wellenförmige Schlagmuster mit einer Frequenz von etwa 10 Hz aufweist [Edsman und Hagerstrom, 2005]. Daneben finden sich Bereiche mit nicht-zilientragenden Zylinder- und Plattenepithelzellen [Augusto et al., 2001; Yi et al., 2003]. Diese Proliferations- und Differenzierungsvorgänge ließen sich in stichprobenartigen Kontrollen der für diese Arbeit verwendeten Miniorgane mit Hilfe eines inversen Labormikroskops nachvollziehen. Die Miniorgane können über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen morphologisch intakt kultiviert werden. Dieser Zeitraum entspricht ähnlichen Untersuchungen an Miniorganen bronchialer Mukosa [Fjellbirkeland et al., 1996; Bals et al., 1998; Kleinsasser et al., 2001; Wallner, 2003].

4.5.2.2 Funktionelle Eigenschaften, Perspektiven

Angesichts der zahlreichen und oft widersprüchlichen Ergebnisse genotoxikologischer Untersuchungen erscheint es dringend notwendig, für den Menschen relevante von irrelevanten Resultaten zu unterscheiden [Kirkland und Muller, 2000]. Die angewendete Technik der Kultivierung dreidimensionaler Gewebeverbänden humaner nasaler Mukosa liefert für das Erzielen valider Ergebnisse optimales Untersuchungsmaterial. Sie erhält die native bindegewebige Matrix und die epitheliale Basalmembran, die eine elementare Rolle für die Ausbildung der ursprünglichen Gewebearchitektur und Zelldifferenzierung spielen [Agha-Mir-Salim et al., 1993; Neugebauer et al., 2003]. Da die verschiedenen Zelltypen in ihrer ursprünglichen Funktion und interzellulären Kommunikation erhalten bleiben, wird auch die Permeabilität der Schleimhaut und ihre metabolische Barriere-Funktion *in vivo* gut abgebildet [Merkle et al., 1998]. Zudem ist die Kultivierungsmethode robust gegen Infektionen und andere Störeinflüsse und erzeugt reproduzierbares Untersuchungsmaterial. Durch den mehrwöchigen Kultivierungszeitraum bietet sie die Möglichkeit der wiederholten Inkubation mit Xenobiotika zur Erfassung von Reparaturvorgängen und kumulativen toxischen Effekten. Das eingesetzte Kulturmedium enthält relevante Hormone und Nährstoffe, die für die Aufrechterhaltung der metabolischen Leistung der Zellen unerlässlich sind [Borek et al., 1983; Renwick et al., 2000]. Eine Möglichkeit zur Optimierung der Untersuchungsbedingungen könnte die Kultivierung der Präparate nasaler Schleimhaut auf

semipermeablen Membranen darstellen. Dadurch ließe sich eine Rekonstruktion der *in vivo* vorliegenden Polarität des Gewebes mit einer versorgenden basalen Seite und einer exponierten apikalen Seite erreichen.

Um eine weitere Verbesserung der Aussagekraft zu erzielen, erscheint der Einsatz realitätsnaher Expositionstechniken sinnvoll. Neuere Entwicklungen in diesem Bereich erlauben die direkte Exposition epithelialer Zellen gegenüber Versuchsatmosphären und komplexen Mischungen wie Dieselabgasen an einer Luft-Flüssigkeits-Grenzschicht [Knebel et al., 2002; Aufderheide et al., 2003]. Die Kombination dieser Expositionsmethoden mit dem Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay wurde bereits erfolgreich realisiert [Wolz et al., 2002].

5.1 Zusammenfassung

Die Schleimhaut des nasalen Raums stellt das primäre Kontaktorgan für inhalede Stoffe dar. Um den Körper vor toxischen Wirkungen zu schützen und den Geruchssinn zu unterstützen, besitzen die Epithelzellen der respiratorischen Anteile erhebliche metabolische Kompetenz. Interindividuelle Unterschiede im Fremdstoffmetabolismus können in Verbindung mit einer beruflichen Exposition gegenüber inhalativen Karzinogenen zur Entstehung von Malignomen des sinonasalen Raums führen. Um gefährliche Stoffe und gefährdete Populationen anhand von *in-vitro*-Versuchen identifizieren zu können, wurde ein dreidimensionales Kultursystem humaner nasaler Mukosa vorgestellt, das die Verhältnisse *in vivo* möglichst realistisch abbildet.

Dazu wurden Resektate humaner nasaler Mukosa in 1 mm³ großen Fragmenten unter optimierten Umweltbedingungen kultiviert. Innerhalb einer Woche bildeten sich daraus vollständig epithelierte Miniorgane mit physiologischen histomorphologischen und funktionellen Eigenschaften.

Um die Leistungsfähigkeit der Miniorgane zu evaluieren, wurden sie ein- oder mehrfach gegenüber den bekannt genotoxischen Substanzen Natriumdichromat, *N*-Nitrosodiethylamin (NDEA) und *N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin (MNNG) exponiert. Parallel dazu wurden zum Vergleich Einzelzellsuspensionen mit diesen Stoffen inkubiert. Die induzierten genetischen Schäden wurden mit Hilfe der alkalischen Version des Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay quantifiziert. Der Anteil apoptotischer Vorgänge an hohen DNS-Schäden im Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay wurde durch den Annexin-V-Affinitätstest erfasst. Um den Erhalt der metabolischen Kompetenz der Zellen der Miniorgane im Verlauf der Kultivierung zu belegen, wurde die Konzentration von Cytochrom P450 2A6, einem Schlüsselenzym im Metabolismus zahlreicher inhalativer Giftstoffe, durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Miniorgane blieben über den Kulturzeitraum strukturell und funktionell intakt. Die einmalige Exposition gegenüber Natriumdichromat und MNNG verursachte erhebliche genetische Schäden, die bei wiederholter Inkubation trotz 48stündiger Reparaturphasen weiter zunahmen. Im Falle von Natriumdichromat stieg analog dazu der Anteil apoptotischer Zellen rasant an. Bei MNNG war dagegen keine erhöhte Apoptoserate nachweisbar. Die wiederholte Inkubation der Miniorganen mit NDEA ergab weder einen signifikanten genotoxischen Effekt, noch einen Anstieg der Apoptoserate, obwohl das für die Aktivierung von NDEA entscheidende Apoenzym Cytochrom P450 2A6 über den gesamten Untersuchungszeitraum in den Zellen nachgewiesen werden konnte. Im Vergleich der DNS-Fragmentierung erwiesen sich die in Suspension inkubierten Einzelzellen als empfindlicher gegenüber der Wirkung von Natriumdichromat und MNNG.

Miniorgane nasaler Mukosa sind für toxikologische Studien optimal geeignet, da sie Untersuchungen an humanem Zielgewebe über einen längeren Untersuchungszeitraum erlauben. Dies eröffnet vielfältige Versuchsanordnungen hinsichtlich Expositionsfrequenz und Reparaturintervallen. Zudem erscheinen die Kulturen ausreichend robust, um zukünftig verschiedene realistische Expositionsmodelle, wie Begasungsanlagen und komplexe Mischungen, einzusetzen.

5.2 Abkürzungen und chemische Formeln

8-oxodGuo	8-Oxo-7,8-dihydro-2'-desoxyguanosin
A	Adenin
ATSDR	<i>Agency for Toxic Substances and Disease Registry</i>
BEBM	<i>Bronchial Epithelial Basal Medium</i>
BGIA	Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz
C	Cytosin
C ₂₁ H ₂₀ N ₃ Br	<i>N</i> -Lauroylsarcosin-Natriumsalz
CAS	<i>Chemical Abstracts Service</i>
Cr(VI), Cr(V), Cr(IV), Cr(III)	Hexa-, penta-, tetra-, trivalentes Chrom
CrO ₄ ²⁻	Chromation
CYP2A6	Cytochrom P450 2A6
DMEM	Dulbeccos modifiziertes Eagles Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EMGE-Assay	Einzelzell-Mikrogelelektrophorese-Assay
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FPG	Formamidopyrimidin-DNS-Glykosylase
FSC	<i>Front Scatter</i> (Vorwärtsstreulicht)
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G	Guanin
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazin- <i>N</i> '-2-ethansulfonsäure
HLA	<i>Human Lymphocyte Antigen</i>
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
ICAM-1	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IWGTP	<i>International Workshop on Genotoxicity Test Procedures</i>
MGMT	<i>O</i> ⁶ -Methylguanin-DNS-Methyltransferase
MNNG	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
mRNS	Boten-Ribonukleinsäure
N	Anzahl
N ₂	Stickstoff
Na ₂ Cr ₂ O ₇	Natriumdichromat
Na ₂ EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz
NaHCO ₃	Natriumhydrogenkarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NDEA	<i>N</i> -Nitrosodiethylamin
NDMA	<i>N</i> -Nitrosodimethylamin
NF-κB	Nekrosefaktor kappa B

O ₂ ^{·-}	Superoxidanionradikal
OH [·]	Hydroxylradikal
OTM	<i>Olive Tail Moment</i>
p	Allgemeines Signifikanzniveau
P450	Cytochrom P450
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphatgepufferte Salzlösung)
SSC	<i>Side Scatter</i> (Seitwärtsstreulicht)
T	Thymin
TNFR	Tumor-Nekrosefaktor-Rezeptor
Trizma-Base	Trishydroxymethylaminomethan
TRK	Technische Richtkonzentration
α	Irrtumswahrscheinlichkeit

5.3 Bildnachweis

- Abbildung 1-1: Abbildung verändert nach Junqueira LC, Carneiro J: Atmungsorgane - Luftleitende Abschnitte. In: *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*, 4. Auflage. Schiebler TH (Hrsg.). Springer, Berlin - Heidelberg. 1996:442, Abb. 19.4.
- Abbildung 1-2: Eigene Abbildung nach Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM: Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. In: *IARC CancerBase No.5, version 2.0*. IARC Press, Lyon. 2004.
- Abbildung 1-4: Eigene Abbildung nach Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitssicherheit: Natriumdichromat. In: *Gefahrstoffinformationssystem der gewerblichen Berufsgenossenschaften - Stoffdatenbank (GESTIS)*. im Internet verfügbar unter URL <http://www.hvbg.de/bgia/stoffdatenbank> (Stand: 12.2004, Letzter Zugriff: 05.10.2005).
- Abbildung 1-5: Eigene Abbildung nach National Toxicology Program: N-nitrosodiethylamine. In: *Report on Carcinogens, Eleventh Edition*. U.S. Department of Health and Human Services - Public Health Service. 2004.
- Abbildung 1-6: Eigene Abbildung nach National Toxicology Program: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. In: *Report on Carcinogens, Eleventh Edition*. U.S. Department of Health and Human Services - Public Health Service. 2004.
- Abbildung 1-9: Eigene Abbildung nach Givan AL: Principles of flow cytometry: an overview. *Methods Cell Biol* 2001;63:19-50.
- Abbildung 4-1: Eigene Abbildung nach Chemical Abstracts Service: CAS statistical summary 1907-2004. American Chemical Society, Columbus. 2005.
- Abbildung 4-3: Abbildung verändert nach Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC: Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003;83:1359-1400.
- Eigene Abbildungen: Abbildung 1-3, 1-7, 1-8, 1-10 bis 3-24, 4-2, 4-4

5.4 Literaturverzeichnis

- Abud HE, Watson N, Heath JK: Growth of intestinal epithelium in organ culture is dependent on EGF signalling. *Exp Cell Res* 2005;303:252-262.
- Agha-Mir-Salim P, Rauhut O, Merker HJ: Electron and fluorescence microscopic investigations on composition and structure of the epithelial basement membrane of the human inferior nasal concha. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 1993;250:401-407.
- Aiub CA, Mazzei JL, Pinto LF, Felzenszwalb I: Participation of BER and NER pathways in the repair of DNA lesions induced at low N-nitrosodiethylamine concentrations. *Toxicol Lett* 2004;154:133-142.
- Aiub CA, Pinto LF, Felzenszwalb I: N-Nitrosodiethylamine mutagenicity at low concentrations. *Toxicol Lett* 2003;145:36-45.
- Anderson RA: Chromium as an essential nutrient for humans. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997;26:35-41.
- Andree HA, Reutelingsperger CP, Hauptmann R, Hemker HC, Hermens WT, Willems GM: Binding of vascular anticoagulant α (VAC α) to planar phospholipid bilayers. *J Biol Chem* 1990;265:4923-4928.
- Aristoteles: Das Wesen. In: *Metaphysik*. VII. Buch, Kapitel 17, 1041 b 10
- Ariyoshi N, Miyamoto M, Umetsu Y, Kunitoh H, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Nemoto N, Sato K, Kamataki T: Genetic polymorphism of CYP2A6 gene and tobacco-induced lung cancer risk in male smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2002;11:890-894.
- Assenmacher M, Schmitz J, Radbruch A: Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon- γ and in interleukin-4-expressing cells. *Eur J Immunol* 1994;24:1097-1101.
- ATSDR: Chemical and physical information. In: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry - Toxicological profile for chromium*. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta. 2000a;259.
- ATSDR: Health effects. In: *Agency for Toxic Substances and Disease Registry - Toxicological profile for chromium*. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta. 2000b;13-257.
- Aufderheide M, Knebel JW, Ritter D: An improved in vitro model for testing the pulmonary toxicity of complex mixtures such as cigarette smoke. *Exp Toxicol Pathol* 2003;55:51-57.
- Augusto AGLBS, Bussolotti Filho I, Dolci JEL, König B: Structural and ultrastructural study of the anterior portion of the nasal septum and inferior nasal concha. *Ear Nose Throat J* 2001;80:325-328.

- Ausschuss für Gefahrstoffe: TRGS 552 - N-Nitrosamine. In: *Technisches Regelwerk für Gefahrstoffe*. Bundesministerium für Arbeit und Sozialordnung. 1996.
- Azzam EI, de Toledo SM, Little JB: Expression of connexin 43 is highly sensitive to ionizing radiation and other environmental stresses. *Cancer Res* 2003;63:7128-7135.
- Bacso Z, Everson RB, Eliason JF: The DNA of annexin V-binding apoptotic cells is highly fragmented. *Cancer Res* 2000;60:4623-4628.
- Baeuerle PA, Henkel T: Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1994;12:141-179.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ: Chromium (VI)-induced oxidative stress, apoptotic cell death and modulation of p53 tumor suppressor gene. *Mol Cell Biochem* 2001;222:149-158.
- Baldwin AS: The NF- κ B and I κ B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996;14:649-683.
- 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* 1998;293:573-577.
- Bao Z, He XY, Ding X, Prabhu S, Hong JY: Metabolism of nicotine and cotinine by human cytochrome P450 2A13. *Drug Metab Dispos* 2005;33:258-261.
- Bates RC, Edwards NS, Yates JD: Spheroids and cell survival. *Crit Rev Oncol Hematol* 2000;36:61-74.
- Battle T, Stacey G: Cell culture models for hepatotoxicology. *Cell Biol Toxicol* 2001;17:287-299.
- Benowitz NL, Perez-Stable EJ, Herrera B, Jacob P: Slower metabolism and reduced intake of nicotine from cigarette smoking in Chinese-Americans. *J Natl Cancer Inst* 2002;94:108-115.
- Benowitz NL, Zevin S, Jacob P: Sources of variability in nicotine and cotinine levels with use of nicotine nasal spray, transdermal nicotine, and cigarette smoking. *Br J Clin Pharmacol* 1997;43:259-267.
- Berger G, Balum-Azim M, Ophir D: The normal inferior turbinate: histomorphometric analysis and clinical implications. *Laryngoscope* 2003;113:1192-1198.
- Berufsgenossenschaftliches Institut für Arbeitsschutz (bia@hvb.de): N-Nitrosodiethylamin. In: *Gefahrstoffinformationssystem der gewerblichen Berufsgenossenschaften - Stoffdatenbank (GESTIS)*. im Internet verfügbar unter URL <http://www.hvb.de/bgia/stoffdatenbank> (Stand: 12.2004, Letzter Zugriff: 05.10.2005).
- Blankenship LJ, Manning FC, Orenstein JM, Patierno SR: Apoptosis is the mode of cell death caused by carcinogenic chromium. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994;126:75-83.
- Bogdanffy MS, Mathison BH, Kuykendall JR, Harman AE: Critical factors in assessing risk from exposure to nasal carcinogens. *Mutat Res* 1997;380:125-141.

- Bolt HM: Genotoxicity - threshold or not? Introduction of cases of industrial chemicals. *Toxicol Lett* 2003;140-141:43-51.
- Bolt HM, Foth H, Hengstler JG, Degen GH: Carcinogenicity categorization of chemicals-new aspects to be considered in a european perspective. *Toxicol Lett* 2004;151:29-41.
- Bomford R, Stapleton M, Winsor S, Beesley JE, Jessup EA, Price KR, Fenwick GR: Adjuvanticity and ISCOM formation by structurally diverse saponins. *Vaccine* 1992;10:572-577.
- Borek C, Guernsey DL, Ong A, Edelman IS: Critical role played by thyroid hormone in induction of neoplastic transformation by chemical carcinogens in tissue culture. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1983;80:5749-5752.
- Brault D, Renault D, Tombolan F, Thybaud V: Kinetics of induction of DNA damage and lacZ gene mutations in stomach mucosa of mice treated with β -propiolactone and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, using single-cell gel electrophoresis and Muta-Mouse models. *Environ Mol Mutagen* 1999;34:182-189.
- Bretscher MS: Asymmetrical lipid bilayer structure for biological membranes. *Nat New Biol* 1972;236:11-12.
- Breuer D, van Gelder R: Nitrosamine in Arbeitsbereichen - ein gelöstes Problem? *Gefahrstoffe - Reinhaltung der Luft* 2001;61:49-55.
- Brittebo EB: Metabolism of xenobiotics in the nasal olfactory mucosa: Implications for local toxicity. *Pharmacol Toxicol* 1993;72:50-52.
- Brittebo EB: Metabolism-dependent activation and toxicity of chemicals in nasal glands. *Mutat Res* 1997;380:61-75.
- Busby WF, Ackermann JM, Crespi CL: Effect of methanol, ethanol, dimethyl sulfoxide, and acetonitrile on in vitro activities of cDNA-expressed human cytochromes P-450. *Drug Metab Dispos* 1999;27:246-249.
- Calderon-Garciduenas L, Rodriguez-Alcaraz A, Garcia R, Barragan G, Villarreal-Calderon A, Madden MC: Cell proliferation in nasal respiratory epithelium of people exposed to urban pollution. *Carcinogenesis* 1999;20:383-389.
- Camus AM, Geneste O, Honkakoski P, Bereziat JC, Henderson CJ, Wolf CR, Bartsch H, Lang MA: High variability of nitrosamine metabolism among individuals: role of cytochromes P450 2A6 and 2E1 in the dealkylation of N-nitrosodimethylamine and N-nitrosodiethylamine in mice and humans. *Mol Carcinog* 1993;7:268-275.
- Carruba G, Cocciadiferro L, Bellavia V, Rizzo S, Tsatsanis C, Spandidos D, Muti P, Smith C, Mehta P, Castagnetta L: Intercellular communication and human hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1028:202-212.
- Chauret N, Gauthier A, Martin J, Nicoll-Griffith DA: In vitro comparison of cytochrome P450-mediated metabolic activities in human, dog, cat, and horse. *Drug Metab Dispos* 1997;25:1130-1136.

- Chauret N, Gauthier A, Nicoll-Griffith DA: Effect of common organic solvents on in vitro cytochrome P450-mediated metabolic activities in human liver microsomes. *Drug Metab Dispos* 1998;26:1-4.
- Chemical Abstracts Service: CAS statistical summary 1907-2004. American Chemical Society, Columbus. 2005.
- Chen F, Shi X: Intracellular signal transduction of cells in response to carcinogenic metals. *Crit Rev Oncol Hematol* 2002;42:105-121.
- Chen F, Vallyathan V, Castranova V, Shi X: Cell apoptosis induced by carcinogenic metals. *Mol Cell Biochem* 2001;222:183-188.
- Cody DT, Lawrence WD: Neoplasms of the nasal cavity. In: *Otolaryngology-Head and Neck Surgery, CD-ROM*. Cummings CW, Fredrickson JM, Harker LA, Richardson MA, Krause CJ, Schuller DE (Hrsg.). Mosby. 1999.
- Colon JE, Bhol KC, Razzaque MS, Ahmed AR: In vitro organ culture model for mucous membrane pemphigoid. *Clin Immunol* 2001;98:229-234.
- Crawford EL, Weaver DA, DeMuth JP, Jackson CM, Khuder SA, Frampton MW, Utell MJ, Thilly WG, Willey JC: Measurement of cytochrome P450 2A6 and 2E1 gene expression in primary human bronchial epithelial cells. *Carcinogenesis* 1998;19:1867-1871.
- Dahl R, Mygind N: Anatomy, physiology and function of the nasal cavities in health and disease. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;29:3-12.
- Daoust R, Morais R: Degenerative changes, DNA synthesis and mitotic activity in rat liver following single exposure to diethylnitrosamine. *Chem Biol Interact* 1986;57:55-64.
- De Flora S: Threshold mechanisms and site specificity in chromium (VI) carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2000;21:533-541.
- De Flora S, Camoirano A, Bagnasco M, Bennicelli C, Corbett GE, Kerger BD: Estimates of the chromium (VI) reducing capacity in human body compartments as a mechanism for attenuating its potential toxicity and carcinogenicity. *Carcinogenesis* 1997;18:531-537.
- Diaz C, Schroit AJ: Role of translocases in the generation of phosphatidylserine asymmetry. *J Membr Biol* 1996;151:1-9.
- Djuzenova CS, Schindler D, Stopper H, Hoehn H, Flentje M, Oppitz U: Identification of ataxia telangiectasia heterozygotes, a cancer-prone population, using the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *Lab Invest* 1999;79:699-705.
- Drahushuk AT, McGarrigle BP, Tai HL, Kitareewan S, Goldstein JA, Olson JR: Validation of precision-cut liver slices in dynamic organ culture as an in vitro model for studying CYP1A1 and CYP1A2 induction. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;140:393-403.
- Druckrey H, Schildbach AB, Schmähl D, Preussmann R, Ivankovic S: Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin. *Arzneimittelforschung* 1963;13:841-851.

- 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* 2003;544:167-172.
- Dyroff MC, Richardson FC, Popp JA, Bedell MA, Swenberg JA: Correlation of O⁴-ethyldeoxythymidine accumulation, hepatic initiation and hepatocellular carcinoma induction in rats continuously administered diethylnitrosamine. *Carcinogenesis* 1986;7:241-246.
- Easterbrook J, Lu C, Sakai Y, Li AP: Effects of organic solvents on the activities of cytochrome P450 isoforms, UDP-dependent glucuronyl transferase, and phenol sulfotransferase in human hepatocytes. *Drug Metab Dispos* 2001;29:141-144.
- Edara S, Kanugula S, Pegg AE: Expression of the inactive C145A mutant human O⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase in *E. coli* increases cell killing and mutations by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Carcinogenesis* 1999;20:103-108.
- Edelman DB, Keefer EW: A cultural renaissance: in vitro cell biology embraces three-dimensional context. *Exp Neurol* 2005;192:1-6.
- Edsman K, Hagerstrom H: Pharmaceutical applications of mucoadhesion for the non-oral routes. *J Pharm Pharmacol* 2005;57:3-22.
- Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM: Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207-2216.
- Felter SP, Dourson ML: Hexavalent chromium-contaminated soils: options for risk assessment and risk management. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997;25:43-59.
- Ferlay J, Bray F, Pisani P, Parkin DM: Globocan 2002: Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. In: *IARC CancerBase No.5, version 2.0*. IARC Press, Lyon. 2004.
- Feron VJ, Arts JHE, Kuper CF, Slootweg PJ, Woutersen RA: Health risks associated with inhaled nasal toxicants. *Crit Rev Toxicol* 2001;31:313-347.
- Fjellbirkeland L, Bjerkgvig R, Steinsvag SK, Laerum OD: Nonadhesive stationary organ culture of human bronchial mucosa. *Am J Respir Cell Mol Biol* 1996;15:197-206.
- Florent M, Godard T, Ballet JJ, Gauduchon P, Sola B: Detection by the comet assay of apoptosis induced in lymphoid cell lines after growth factor deprivation. *Cell Biol Toxicol* 1999;15:185-192.
- Fujieda M, Yamazaki H, Saito T, Kiyotani K, Gyamfi MA, Sakurai M, Dosaka-Akita H, Sawamura Y, Yokota J, Kunitoh H, Kamataki T: Evaluation of CYP2A6 genetic polymorphisms as determinants of smoking behavior and tobacco-related lung cancer risk in male Japanese smokers. *Carcinogenesis* 2004;25:2451-2458.
- Fukushima S, Wanibuchi H, Morimura K, Wei M, Nakae D, Konishi Y, Tsuda H, Uehara N, Imaida K, Shirai T, Tatematsu M, Tsukamoto T, Hirose M, Furukawa F, Wakabayashi K, Totsuka Y: Lack of a dose-response relationship for carcinogenicity in the rat liver with low doses of 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline or N-nitroso-diethylamine. *Jpn J Cancer Res* 2002;93:1076-1082.

- Galati LT: Malignant tumors of the sinuses. Lydiatt WM, Talavera F, Calhoun KH, Slack CL und Meyers SD (Hrsg.). im Internet verfügbar unter URL <http://www.emedicine.com/ent/topic254.htm> (Stand: 06.06.2005, Letzter Zugriff: 05.10.2005).
- Givan AL: Information: Harnessing the data. In: *Flow Cytometry: First Principles*. Wiley-Liss, New York. 1992a;41-54.
- Givan AL: Instrumentation: Beyond the black box. In: *Flow Cytometry: First Principles*. Wiley-Liss, New York. 1992b;15-40.
- Givan AL: Critical aspects of staining for flowcytometry. In: *Living Color: Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting*. Diamond RA, DeMaggio S (Hrsg.). Springer, Berlin. 2000;142-164.
- Givan AL: Principles of flow cytometry: an overview. *Methods Cell Biol* 2001;63:19-50.
- Godoy W, Albano RM, Moraes EG, Pinho PR, Nunes RA, Saito EH, Higa C, Filho IM, Kruel CD, Schirmer CC, Gurski R, Lang MA, Pinto LF: CYP2A6/2A7 and CYP2E1 expression in human oesophageal mucosa: regional and inter-individual variation in expression and relevance to nitrosamine metabolism. *Carcinogenesis* 2002;23:611-616.
- Gorgoulis VG, Zacharatos P, Kotsinas A, Kletsas D, Mariatos G, Zoumpourlis V, Ryan KM, Kittas C, Papavassiliou AG: p53 activates ICAM-1 (CD54) expression in an NF- κ B-independent manner. *EMBO J* 2003;22:1567-1578.
- Götte K, Hörmann K: Sinonasal malignancy: what's new? *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2004;66:85-97.
- Greim H, Reuter U: Classification of carcinogenic chemicals in the work area by the german MAK commission: current examples for the new categories. *Toxicology* 2001;166:11-23.
- Gupta S: Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life Sci* 2001;69:2957-2964.
- Hahn P: Apoptoseinduzierende und antimutagene Wirkung von *Viscum album L.* auf humane Zellkulturen. *Dissertation in der Abteilung für Humanbiologie und Humangenetik, Fachbereich Biologie, Kaiserslautern*. 2000.
- Hailer-Morrison MK, Kotler JM, Martin BD, Sugden KD: Oxidized guanine lesions as modulators of gene transcription. Altered p50 binding affinity and repair shielding by 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine lesions in the NF- κ B promoter element. *Biochemistry* 2003;42:9761-9770.
- Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, Williams GT: Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem* 1996;236:1-26.
- Harréus U, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H: Genotoxische Wirkung auf menschliche Schleimhautbiopsien des oberen Aerodigestivtraktes. *Laryngorhinootologie* 1999;78:176-181.

- Harréus UA, Kastenbauer ER, Wallner BC, Kleinsasser NH: Stellenwert der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese in der Ökogenotoxikologie. *Laryngorhinootologie* 2002;81:528-533.
- Hartmann A, Agurell E, Beevers C, Brendler-Schwaab S, Burlinson B, Clay P, Collins A, Smith A, Speit G, Thybaud V, Tice RR: Recommendations for conducting the in vivo alkaline comet assay. 4th international comet assay workshop. *Mutagenesis* 2003;18:45-51.
- Hengstler JG, Bogdanffy MS, Bolt HM, Oesch F: Challenging dogma: thresholds for genotoxic carcinogens? The case of vinyl acetate. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2003;43:485-520.
- Herrold K: Effect of route of administration on the carcinogenic action of diethylnitrosamine (N-nitrosodiethylnitrosamine). *Br J Cancer* 1964;18:763-767.
- Herzenberg LA, De Rosa SC: Monoclonal antibodies and the FACS: complementary tools for immunobiology and medicine. *Immunol Today* 2000;21:383-390.
- Hickman D, Wang JP, Wang Y, Unadkat JD: Evaluation of the selectivity of In vitro probes and suitability of organic solvents for the measurement of human cytochrome P450 monooxygenase activities. *Drug Metab Dispos* 1998;26:207-215.
- Higgins CF: Flip-flop: the transmembrane translocation of lipids. *Cell* 1994;79:393-395.
- Hoang VD, Uchenna AR, Mark J, Renaat K, Norbert V: Characterization of human nasal primary culture systems to investigate peptide metabolism. *Int J Pharm* 2002;238:247-256.
- 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* 2001;16:467-474.
- Hoet PH, Demedts M, Nemery B: In vitro modulation of the P450 activities of hamster and human lung slices. *Cell Biol Toxicol* 1997;13:185-192.
- Hukkanen J, Pelkonen O, Hakkola J, Raunio H: Expression and regulation of xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 (CYP) enzymes in human lung. *Crit Rev Toxicol* 2002;32:391-411.
- Huvinen M, Makitie A, Jarventaus H, Wolff H, Stjernvall T, Hovi A, Hirvonen A, Ranta R, Nurminen M, Norppa H: Nasal cell micronuclei, cytology and clinical symptoms in stainless steel production workers exposed to chromium. *Mutagenesis* 2002;17:425-429.
- IARC: Monographs Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: Chromium and chromium compounds. *Monographs series 1990*. im Internet verfügbar unter URL <http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol49/chromium.html> (Stand: 05.11.1997, Letzter Zugriff: 05.10.2005).
- IARC: Monographs Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *Monographs series 1987*. im Internet verfügbar unter URL <http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/suppl7/mnng.html> (Stand: 11.02.1998a, Letzter Zugriff: 05.10.2005).

- IARC: Monographs Programme on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans: N-nitrosodiethylamine. *Monographs series 1978*. im Internet verfügbar unter URL <http://www-cie.iarc.fr/htdocs/monographs/vol17/n-nitrosodiethylamine.html> (Stand: 27.03.1998b, Letzter Zugriff: 05.10.2005).
- Ingelman-Sundberg M: Genetic susceptibility to adverse effects of drugs and environmental toxicants. The role of the CYP family of enzymes. *Mutat Res* 2001;482:11-19.
- Jackson AD, Cole PJ, Wilson R: Comparison of haemophilus influenzae type b interaction with respiratory mucosa organ cultures maintained with an air interface or immersed in medium. *Infect Immun* 1996;64:2353-2355.
- Jahnke V: Der feingewebliche Aufbau der Nase und der Nasennebenhöhlen. In: *Nase, Nasennebenhöhlen, Gesicht, Mundhöhle und Pharynx, Kopfspeicheldrüsen*. Kastenbauer ER (Hrsg.). Thieme Verlag, Stuttgart. 1992;34-41.
- Jung T, Schauer U, Heusser C, Neumann C, Rieger C: Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J Immunol Methods* 1993;159:197-207.
- Junqueira LC, Carneiro J: Atmungsorgane - Luftleitende Abschnitte. In: *Zytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter Berücksichtigung der Histophysiologie*, 4. Auflage. Schiebeler TH (Hrsg.). Springer, Berlin - Heidelberg. 1996;438-451.
- Kaina B: Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. *Cytogenet Genome Res* 2004;104:77-86.
- Kallas EG, Gibbons DC, Soucier H, Fitzgerald T, Treanor JJ, Evans TG: Detection of intracellular antigen-specific cytokines in human T cell populations. *J Infect Dis* 1999;179:1124-1131.
- Kerger BD, Paustenbach DJ, Corbett GE, Finley BL: Absorption and elimination of trivalent and hexavalent chromium in humans following ingestion of a bolus dose in drinking water. *Toxicol Appl Pharmacol* 1996;141:145-158.
- Kirkland DJ, Muller L: Interpretation of the biological relevance of genotoxicity test results: the importance of thresholds. *Mutat Res* 2000;464:137-147.
- Klaude M, Eriksson S, Nygren J, Ahnstrom G: The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 1996;363:89-96.
- 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 epithelia and the comet assay. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 2001;63:141-147.
- Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harréus UA, Gamarra F, Bührlen M, Huber RM, Rettenmeier AW: The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat Res* 2004a;561:63-73.
- Kleinsasser NH, Wallner BC, Wagner C, Kastenbauer ER, Harréus UA: DNA repair capacity in lymphocytes of nasopharyngeal cancer patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004b.

- Knebel JW, Ritter D, Aufderheide M: Exposure of human lung cells to native diesel motor exhaust - development of an optimized in vitro test strategy. *Toxicol In Vitro* 2002;16:185-192.
- Koester SK, Bolton WE: Intracellular markers. *J Immunol Methods* 2000;243:99-106.
- Kohn KW: Principles and practice of DNA filter elution. *Pharmacol Ther* 1991;49:55-77.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, van Oers MH: Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 1994;84:1415-1420.
- Koskela S, Hakkola J, Hukkanen J, Pelkonen O, Sorri M, Saranen A, Anttila S, Fernandez-Salguero P, Gonzalez F, Raunio H: Expression of CYP2A genes in human liver and extrahepatic tissues. *Biochem Pharmacol* 1999;57:1407-1413.
- Koval M: Sharing signals: connecting lung epithelial cells with gap junction channels. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002;283:875-893.
- Krutzik PO, Irish JM, Nolan GP, Perez OD: Analysis of protein phosphorylation and cellular signaling events by flow cytometry: techniques and clinical applications. *Clin Immunol* 2004;110:206-221.
- Kuchenmeister F: Etablierung und Erprobung einer Technik, die es erlaubt, DNA-Schäden an einzelnen Schleimhautzellen der Ratte und des Menschen nachzuweisen. *Dissertation an der Fakultät für Theoretische Medizin der Medizinischen Gesamtfakultät der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg*. 1994.
- Kumaresan KR, Springhorn SS, Lacks SA: Lethal and mutagenic actions of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine potentiated by oxidized glutathione, a seemingly harmless substance in the cellular environment. *J Bacteriol* 1995;177:3641-3646.
- Kwak H, Lee M, Cho M: Interrelationship of apoptosis, mutation, and cell proliferation in N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)-induced medaka carcinogenesis model. *Aquatic Toxicol* 2000;50:317-329.
- Le Gal A, Dreano Y, Lucas D, Berthou F: Diversity of selective environmental substrates for human cytochrome P450 2A6: alkoxyethers, nicotine, coumarin, N-nitrosodiethylamine, and N-nitrosobenzylmethylamine. *Toxicol Lett* 2003;144:77-91.
- LeCluyse EL: Human hepatocyte culture systems for the in vitro evaluation of cytochrome P450 expression and regulation. *Eur J Pharm Sci* 2001;13:343-368.
- Lecoecur H, Ledru E, Gougeon ML: A cytofluorometric method for the simultaneous detection of both intracellular and surface antigens of apoptotic peripheral lymphocytes. *J Immunol Methods* 1998;217:11-26.
- Lee AJ, Hodges NJ, Chipman JK: Interindividual variability in response to sodium dichromate-induced oxidative DNA damage: role of the Ser326Cys polymorphism in the DNA-repair protein of 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine DNA glycosylase 1. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14:497-505.
- Lijinsky W: N-Nitroso compounds in the diet. *Mutat Res* 1999;443:129-138.

- Lim IK: Spectrum of molecular changes during hepatocarcinogenesis induced by DEN and other chemicals in Fisher 344 male rats. *Mech Ageing Dev* 2003;124:697-708.
- Lin HS, Fee WE, Sewall EC, Sewall AH: Malignant Nasopharyngeal Tumors. Gosselin BJ, Talavera F, van Waes C, Slack CL und Meyers AD (Hrsg.). im Internet verfügbar unter URL <http://www.emedicine.com/ent/topic269.htm> (Stand: 22.07.2005, Letzter Zugriff: 05.10.2005).
- Liu K, Husler J, Ye J, Leonard SS, Cutler D, Chen F, Wang S, Zhang Z, Ding M, Wang L, Shi X: On the mechanism of Cr (VI)-induced carcinogenesis: dose dependence of uptake and cellular responses. *Mol Cell Biochem* 2001;222:221-229.
- Mace K, Bowman ED, Vautravers P, Shields PG, Harris CC, Pfeifer AM: Characterisation of xenobiotic-metabolising enzyme expression in human bronchial mucosa and peripheral lung tissues. *Eur J Cancer* 1998;34:914-920.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, Green DR: Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 1995;182:1545-1556.
- Martindale JL, Holbrook NJ: Cellular response to oxidative stress: signaling for suicide and survival. *J Cell Physiol* 2002;192:1-15.
- Merkle HP, Ditzinger G, Lang SR, Peter H, Schmidt MC: In vitro cell models to study nasal mucosal permeability and metabolism. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;29:51-79.
- Merkus FW, Verhoef JC, Schipper NG, Martin E: Nasal mucociliary clearance as a factor in nasal drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 1998;29:13-38.
- Merzenich H, Hartwig A, Ahrens W, Beyersmann D, Schlepegrell R, Scholze M, Timm J, Jockel KH: Biomonitoring on carcinogenic metals and oxidative DNA damage in a cross-sectional study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10:515-522.
- Mesnil M: Connexins and cancer. *Biol Cell* 2002;94:493-500.
- Middleton AM, Chadwick MV, Nicholson AG, Wilson R, Thornton DJ, Kirkham S, Sheehan JK: Interaction between mycobacteria and mucus on a human respiratory tissue organ culture model with an air interface. *Exp Lung Res* 2004;30:17-29.
- Mikalsen SO: Effects of heavy metal ions on intercellular communication in syrian hamster embryo cells. *Carcinogenesis* 1990;11:1621-1626.
- Minister of Supply and Services Canada: Chromium and its compounds - Summary of information critical to assessment of "toxic". In: *Canadian Environmental Protection Act (CEPA): Priority Substances List Assessment Report*. Government of Canada (Hrsg.), Ottawa. 1994;5-24.
- Mrkoci FK, Niederer E, Berger EG: Flow cytometric detection of the Golgi apparatus using antibodies to glycosyltransferases. *Cytometry* 1997;28:50-57.

- National Toxicology Program: Chromium Hexavalent Compounds. In: *Report on Carcinogens, Eleventh Edition*. U.S. Department of Health and Human Services - Public Health Service. 2004a.
- National Toxicology Program: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. In: *Report on Carcinogens, Eleventh Edition*. U.S. Department of Health and Human Services - Public Health Service. 2004b.
- National Toxicology Program: N-Nitrosodiethylamine. In: *Report on Carcinogens, Eleventh Edition*. U.S. Department of Health and Human Services - Public Health Service. 2004c.
- Neugebauer P, Endepols H, Mickenhagen A, Walger M: Ciliogenesis in submersion and suspension cultures of human nasal epithelial cells. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2003;260:325-330.
- Neumann HG, Vamvakas S, Thielmann HW, Gelbke HP, Filser JG, Reuter U, Greim H, Kappus H, Norpoth KH, Wardenbach P, Wichmann HE: Changes in the classification of carcinogenic chemicals in the work area. Section III of the German list of MAK and BAT values. *Int Arch Occup Environ Health* 1998;71:566-574.
- Nishimura M, Ueda N, Naito S: Effects of dimethyl sulfoxide on the gene induction of cytochrome P450 isoforms, UGT-dependent glucuronosyl transferase isoforms, and ABCB1 in primary culture of human hepatocytes. *Biol Pharm Bull* 2003;26:1052-1056.
- Ochs K, Kaina B: Apoptosis induced by DNA damage O⁶-methylguanine is Bcl-2 and caspase-9/3 regulated and Fas/caspase-8 independent. *Cancer Res* 2000;60:5815-5824.
- Ogino T, Wang X, Ferrone S: Modified flow cytometry and cell-ELISA methodology to detect HLA class I antigen processing machinery components in cytoplasm and endoplasmic reticulum. *J Immunol Methods* 2003;278:33-44.
- Ohashi Y, Nakai Y, Ikeoka H, Furuya H: Regeneration of nasal mucosa following mechanical injury. *Acta Otolaryngol Suppl* 1991;486:193-201.
- Olive PL, Banath JP, Durand RE: Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the "comet" assay. *Radiat Res* 1990;122:86-94.
- Omiecinski CJ, Rimmel RP, Hosagrahara VP: Concise review of the cytochrome P450s and their roles in toxicology. *Toxicol Sci* 1999;48:151-156.
- Osborne GW: Flow Cytometry Software Workshop. im Internet verfügbar unter URL <http://jcsmr.anu.edu.au/facslab/analysis.html> (Stand: 10.12.2001, Letzter Zugriff: 05.10.2005).
- Ostling O, Johanson KJ: Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1984;123:291-298.
- Owens MA, Vall HG, Hurley AA, Wormsley SB: Validation and quality control of immunophenotyping in clinical flow cytometry. *J Immunol Methods* 2000;243:33-50.

- Pala P, Hussell T, Openshaw PJ: Flow cytometric measurement of intracellular cytokines. *J Immunol Methods* 2000;243:107-124.
- Pedersen E, Hogetveit AC, Andersen A: Cancer of respiratory organs among workers at a nickel refinery in Norway. *Int J Cancer* 1973;12:32-41.
- Peto R, Gray R, Brantom P, Grasso P: Effects on 4080 rats of chronic ingestion of N-nitroso-diethylamine or N-nitrosodimethylamine: a detailed dose-response study. *Cancer Res* 1991;51:6415-6451.
- Phillips HJ: Dye exclusion test for cell viability. In: *Tissue Culture Methods and Applications*. Kruse PF, Patterson MK (Hrsg.). Academic Press, New York. 1973;406-408.
- Physikalisch-Technische Bundesanstalt: Untersuchung von radiobiologischen Phänomenen im niedrigen Dosisbereich mit dem Mikro-Ionenstrahl. In: *Aktuelle Forschungsnachrichten aus der Abteilung 6 "Ionisierende Strahlung"*, Berlin - Braunschweig. 2004;1-3.
- Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambertz R, Leucht U, Schröder HG, Schmezer P: Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ Mol Mutagen* 1994;24:23-45.
- Prise KM, Folkard M, Michael BD: A review of the bystander effect and its implications for low-dose exposure. *Radiat Prot Dosimetry* 2003;104:347-355.
- Pritchard KA, Ackerman A, Kalyanaraman B: Chromium (VI) increases endothelial cell expression of ICAM-1 and decreases nitric oxide activity. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 2000;19:251-260.
- Radcliff G, Jaroszeski MJ: Basics of flow cytometry. *Methods Mol Biol* 1998;91:1-24.
- Raffael A, Nebe CT, Valet G: Grundlagen der Durchflußzytometrie. In: *Durchflußzytometrie in der klinischen Zelldiagnostik*. Schmitz G, Rothe G (Hrsg.). Schattauer, Stuttgart. 1994;3-49.
- Raunio H, Rautio A, Gullsten H, Pelkonen O: Polymorphisms of CYP2A6 and its practical consequences. *Br J Clin Pharmacol* 2001;52:357-363.
- Reed CJ: In vitro models of nasal cavity toxicity. *Mutat Res* 1997;380:97-111.
- Reilly JT: Use and evaluation of leucocyte monoclonal antibodies in the diagnostic laboratory: a review. *Clin Lab Haematol* 1996;18:1-5.
- Renwick AB, Watts PS, Edwards RJ, Barton PT, Guyonnet I, Price RJ, Tredger JM, Pelkonen O, Boobis AR, Lake BG: Differential maintenance of cytochrome P450 enzymes in cultured precision-cut human liver slices. *Drug Metab Dispos* 2000;28:1202-1209.
- Richardson FC, Beauchamp RO, Swenberg JA: Properties and biological consequences of alkylpyrimidine deoxyribonucleosides. *Pharmacol Ther* 1987;34:181-213.
- Rojas E, Lopez MC, Valverde M: Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1999;722:225-254.

- Roser S, Pool-Zobel BL, Rechkemmer G: Contribution of apoptosis to responses in the comet assay. *Mutat Res* 2001;497:169-175.
- Rosette C, Roth RB, Oeth P, Braun A, Kammerer S, Ekblom J, Denissenko MF: Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2005;26:943-950.
- Rowbotham AL, Levy LS, Shuker LK: Chromium in the environment: an evaluation of exposure of the UK general population and possible adverse health effects. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 2000;3:145-178.
- Ruch RJ, Porter S, Koffler LD, Dwyer-Nield LD, Malkinson AM: Defective gap junctional intercellular communication in lung cancer: loss of an important mediator of tissue homeostasis and phenotypic regulation. *Exp Lung Res* 2001;27:231-243.
- Rundell MS, Wagner ED, Plewa MJ: The comet assay: genotoxic damage or nuclear fragmentation? *Environ Mol Mutagen* 2003;42:61-67.
- Rydberg B, Johanson KJ: Estimation of single strand breaks in single mammalian cells. In: *DNA Repair Mechanisms*. Hanawalt PC, Friedberg EC, Fox CF (Hrsg.). Academic Press, New York. 1978;465-468.
- Saez JC, Berthoud VM, Branes MC, Martinez AD, Beyer EC: Plasma membrane channels formed by connexins: their regulation and functions. *Physiol Rev* 2003;83:1359-1400.
- Sander B, Andersson J, Andersson U: Assessment of cytokines by immunofluorescence and the paraformaldehyde-saponin procedure. *Immunol Rev* 1991;119:65-93.
- Sanner T, Dybing E: Comparison of carcinogenic and in vivo genotoxic potency estimates. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005;96:131-139.
- Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C: Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol* 2003;65:1035-1041.
- Saraste A, Pulkki K: Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 2000;45:528-537.
- Sasaki Y, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, Taniguchi K, Tsuda S: The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res* 2002;519:103.
- Schäffer KK: Untersuchungen zur Zytotoxizität des Farnesyltransferaseinhibitors FTI-277 im Knochenmarks-Stammzell-Assay CFUc. *Dissertation an der Universitätsklinik für Kinderheilkunde und Jugendmedizin der Medizinischen Fakultät der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen*. 2003.
- Sgonc R, Gruber J: Apoptosis detection: an overview. *Exp Gerontol* 1998;33:525-533.
- Shah UK, Hybels RL, Dugan J: Endoscopic management of low-grade papillary adenocarcinoma of the ethmoid sinus: case report and review of the literature. *Am J Otolaryngol* 1999;20:190-194.

- Shao W und Adams GL: Malignant tumors of the nasal cavity. Lydiatt WM, Talaver F, van Wees C, Slack CL und Meyers SD (Hrsg.). im Internet verfügbar unter URL <http://www.emedicine.com/ent/topic252.htm> (Stand: 17.09.2002, Letzter Zugriff: 05.10.2005).
- Shapiro HM: Optical measurements in cytometry: light scattering, extinction, absorption, and fluorescence. *Methods Cell Biol* 2001;63:107-129.
- Shi BS, Cai ZN, Yang J, Yu YN: N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine sensitivity, mutator phenotype and sequence specificity of spontaneous mutagenesis in FEN-1-deficient cells. *Mutat Res* 2004;556:1-9.
- Shi X, Chiu A, Chen CT, Halliwell B, Castranova V, Vallyathan V: Reduction of chromium (VI) and its relationship to carcinogenesis. *J Toxicol Environ Health B Crit Rev* 1999;2:87-104.
- Shirasaki H, Watanabe K, Kanaizumi E, Sato J, Konno N, Narita S, Himi T: Effect of glucocorticosteroids on tumour necrosis factor- α -induced intercellular adhesion molecule-1 expression in cultured primary human nasal epithelial cells. *Clin Exp Allergy* 2004;34:945-951.
- Silins I, Stenius U, Hogberg J: Induction of preneoplastic rat liver lesions with an attenuated p53 response by low doses of diethylnitrosamine. *Arch Toxicol* 2004;78:540-548.
- Singer B: In vivo formation and persistence of modified nucleosides resulting from alkylating agents. *Environ Health Perspect* 1985;62:41-48.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL: A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184-191.
- Slade PG, Hailer MK, Martin BD, Sugden KD: Guanine-specific oxidation of double-stranded DNA by Cr (VI) and ascorbic acid forms spiroiminodihydantoin and 8-oxo-2'-deoxyguanosine. *Chem Res Toxicol* 2005;18:1140-1149.
- Slamenova D, Gabelova A, Ruzekova L, Chalupa I, Horvathova E, Farkasova T, Bozsakyova E, Stetina R: Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations. *Mutat Res* 1997;383:243-252.
- Smith KB, Ellis SA: Standardisation of a procedure for quantifying surface antigens by indirect immunofluorescence. *J Immunol Methods* 1999;228:29-36.
- Soane MC, Jackson A, Maskell D, Allen A, Keig P, Dewar A, Dougan G, Wilson R: Interaction of Bordetella pertussis with human respiratory mucosa in vitro. *Respir Med* 2000;94:791-799.
- Spanswick VJ, Craddock C, Sekhar M, Mahendra P, Shankaranarayana P, Hughes RG, Hochhauser D, Hartley JA: Repair of DNA interstrand crosslinks as a mechanism of clinical resistance to melphalan in multiple myeloma. *Blood* 2002;100:224-229.
- Speit G, Hanelt S, Helbig R, Seidel A, Hartmann A: Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicol Lett* 1996;88:91-98.

- Spemann H, Mangold H: Über die Induktion von Embryonalanlagen durch Implantation artfremder Organisatoren. *Arch Mikrosk Anat Entwickl Mech* 1924;599-638.
- Stacey G, Viviani B: Cell culture models for neurotoxicology. *Cell Biol Toxicol* 2001;17:319-334.
- Stauber KL, Laskin JD, Yurkow EJ, Thomas PE, Laskin DL, Conney AH: Flow cytometry reveals subpopulations of murine epidermal cells that are refractory to induction of Cytochrome P-4501A1 by β -Naphthoflavone. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;273:967-976.
- Steinsvåg SK, Strand M, Berg O, Miaguchi M, Olofsson J: Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. *Laryngoscope* 1991;101:1323-1331.
- Su T, Bao Z, Zhang QY, Smith TJ, Hong JY, Ding X: Human cytochrome P450 CYP2A13: predominant expression in the respiratory tract and its high efficiency metabolic activation of a tobacco-specific carcinogen, 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone. *Cancer Res* 2000;60:5074-5079.
- Subcommittee On Environmental Mutagenesis: Approaches to determining the mutagenic properties of chemicals: Risk to future generations. *U.S. Department of Health Education and Welfare, Committee to Coordinate Toxicology and Related Programs* 1977;1-58.
- Swenberg JA, Dyroff MC, Bedell MA, Popp JA, Huh N, Kirstein U, Rajewsky MF: O⁴ethyldeoxythymidine, but not O⁶-ethyldeoxyguanosine, accumulates in hepatocyte DNA of rats exposed continuously to diethylnitrosamine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984;81:1692-1695.
- Swenberg JA, Hoel DG, Magee PN: Mechanistic and statistical insight into the large carcinogenesis bioassays on N-nitrosodiethylamine and N-nitrosodimethylamine. *Cancer Res* 1991;51:6409-6414.
- Tessitore L: Apoptosis and cell proliferation are involved in the initiation of liver carcinogenesis by a subnecrogenic dose of diethylnitrosamine in refed rats. *J Nutr* 2000;130:104-110.
- Thornton-Manning JR, Dahl AR: Metabolic capacity of nasal tissue interspecies comparisons of xenobiotic-metabolizing enzymes. *Mutat Res* 1997;380:43-59.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF: Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206-221.
- Tomita-Mitchell A, Kat AG, Marcelino LA, Li-Sucholeiki XC, Goodluck-Griffith J, Thilly WG: Mismatch repair deficient human cells: spontaneous and MNNG-induced mutational spectra in the HPRT gene. *Mutat Res* 2000;450:125-138.
- Trosko JE, Chang CC, Upham BL, Tai MH: Ignored hallmarks of carcinogenesis: stem cells and cell-cell communication. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1028:192-201.
- Turker S, Onur E, Ozer Y: Nasal route and drug delivery systems. *Pharm World Sci* 2004;26:137-142.
- Undeger U, Basaran N: Assessment of DNA damage in workers occupationally exposed to pesticide mixtures by the alkaline comet assay. *Arch Toxicol* 2002;76:430-436.

- van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP: Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry* 1998;31:1-9.
- Venkatakrishnan K, Von Moltke LL, Greenblatt DJ: Human drug metabolism and the cytochromes P450: application and relevance of in vitro models. *J Clin Pharmacol* 2001;41:1149-1179.
- Vermeer IT, van Maanen JM: Nitrate exposure and the endogenous formation of carcinogenic nitrosamines in humans. *Rev Environ Health* 2001;16:105-116.
- Verna L, Whysner J, Williams GM: N-nitrosodiethylamine mechanistic data and risk assessment: bioactivation, DNA-adduct formation, mutagenicity, and tumor initiation. *Pharmacol Ther* 1996;71:57-81.
- Waddell WJ: Comparison of human exposures to selected chemicals with thresholds from NTP carcinogenicity studies in rodents. *Hum Exp Toxicol* 2003a;22:501-506.
- Waddell WJ: Threshold for carcinogenicity of N-nitrosodiethylamine for esophageal tumors in rats. *Food Chem Toxicol* 2003b;41:739-741.
- Waddell WJ: Thresholds in chemical carcinogenesis: what are animal experiments telling us? *Toxicol Pathol* 2003c;31:260-262.
- Waldren CA: Classical radiation biology dogma, bystander effects and paradigm shifts. *Hum Exp Toxicol* 2004;23:95-100.
- Wallner B: Ökogenotoxikologische Testverfahren an Miniorgankulturen humaner nasaler Mukosa und Lymphozyten des peripheren Blutes. *Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkranke der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München*. 2003.
- Wang S, Shi X: Molecular mechanisms of metal toxicity and carcinogenesis. *Mol Cell Biochem* 2001;222:3-9.
- Weaver JL: Introduction to flow cytometry. *Methods* 2000;21:199-201.
- Werner J: Deskriptive Statistik. In: *Biomathematik und medizinische Statistik*, 2. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore. 1992a;23-60.
- Werner J: Klassische Tests - Übungen zur Auswahl und Anwendung. In: *Biomathematik und medizinische Statistik*, 2. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore. 1992b;125-231.
- Werner J: Testverfahren. In: *Biomathematik und medizinische Statistik*, 2. Auflage. Urban & Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore. 1992c;110-121.
- Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Schloffer D, Uhl M, Wojciechowski J: Non-apoptogenic killing of hela cervical carcinoma cells after short exposure to the alkylating agent N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). *J Cell Biochem* 2003a;89:1222-1234.

- Wesierska-Gadek J, Gueorguieva M, Wojciechowski J: MNNG induces dramatic DNA damage and non-apoptotic changes in cervical carcinoma hela cells. *Ann N Y Acad Sci* 2003b;1010:278-282.
- Wolz L, Krause G, Scherer G, Aufderheide M, Mohr U: In vitro genotoxicity assay of sidestream smoke using a human bronchial epithelial cell line. *Food Chem Toxicol* 2002;40:845-850.
- Xu C, Goodz S, Sellers EM, Tyndale RF: CYP2A6 genetic variation and potential consequences. *Adv Drug Deliv Rev* 2002;54:1245-1256.
- Yamazaki H, Inui Y, Yun CH, Guengerich FP, Shimada T: Cytochrome P450 2E1 and 2A6 enzymes as major catalysts for metabolic activation of N-nitrosodialkylamines and tobacco-related nitrosamines in human liver microsomes. *Carcinogenesis* 1992;13:1789-1794.
- Yeh TH, Su MC, Hsu CJ, Chen YH, Lee SY: Epithelial cells of nasal mucosa express functional gap junctions of connexin 43. *Acta Otolaryngol* 2003;123:314-320.
- Yi WJ, Park KS, Lee CH, Rhee CS: Correlation between ciliary beat frequency and metachronal wave disorder using image analysis method. *Med Biol Eng Comput* 2003;41:481-485.
- Zhang Z, Leonard SS, Wang S, Vallyathan V, Castranova V, Shi X: Cr (VI) induces cell growth arrest through hydrogen peroxide-mediated reactions. *Mol Cell Biochem* 2001;222:77-83.
- Zimmermann KC, Bonzon C, Green DR: The machinery of programmed cell death. *Pharmacol Ther* 2001;92:57-70.
- Zito R: Low doses and thresholds in genotoxicity: from theories to experiments. *J Exp Clin Cancer Res* 2001;20:315-325.
- Zuo C, Ai L, Ratliff P, Suen JY, Hanna E, Brent TP, Fan CY: O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene: epigenetic silencing and prognostic value in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:967-975.

5.5 Danksagung

An dieser Stelle bedanke ich mich bei allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, und ganz besonders bei...

... *Herrn Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser* für die Möglichkeit, im Labor für klinisch-experimentelle Onkologie zu promovieren. Seine fachliche Kompetenz, sein unermüdliches Interesse und sein freundschaftlicher Beistand waren für den Erfolg dieser Arbeit unentbehrlich.

... *Herrn Prof. Dr. med. Ernst Kastenbauer und Herrn Prof. Dr. med. Alexander Berghaus* für die Unterstützung der Laborarbeit durch Bereitstellung von Räumlichkeiten und finanziellen Mitteln.

... *Herrn PD Dr. med. Ulrich Harréus*, der stets ein offenes Ohr für Fragen hatte und den Nachschub an Probenmaterial sicherstellte.

... *den Operateuren der HNO-Abteilung und ihren Teams* aus den Kliniken Innenstadt und Großhadern. Ohne ihre Kooperation bei der Gewinnung von Gewebeproben hätte kein einziger Versuch stattgefunden.

... *Frau Dr. hum. biol. Barbara Wallner*, die mich in die gängigen Labormethoden einwies, bei der Etablierung neuer Verfahren unterstützte und immer Zeit für eine Tasse Kaffee fand.

... *Frau Sabina Zieger und Frau Tatjana Baluschko*, die bei allen Problemen des Laboralltags mit Rat und Tat zur Seite standen und eine zuverlässige Versorgung mit rasch verfügbaren Kohlenhydraten garantierten.

... *Herrn Prof. Dr. med. vet. Fritz Krombach und Frau Silvia Münzing* für die praktische Einführung in die Durchflusszytometrie und die Möglichkeit der Gerätenutzung.

... *meinen Mitdoktoranden*, die während der Arbeit im Labor für klinisch-experimentelle Onkologie soziale Kontakte jenseits der Miniorgane gewährleisteten.

... *meinen Eltern*, deren Liebe und Unterstützung mir bis heute Halt und Sicherheit geben.

... *meiner Frau Uli* für das geduldige Ertragen meiner Schwächen in anstrengenden Zeiten - ich freue mich auf ein Leben an ihrer Seite.

5.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Michael Bührlen
Geburtsdatum	12. April 1977
Geburtsort	München
Familienstand	verheiratet mit Ulrike Bührlen, geb. Schröppel
Nationalität	deutsch
Eltern	Dr. med. Eckart Bührlen, Internist und Brigitte Bührlen, geb. Valet, Physiotherapeutin

Schulbildung und Grundwehrdienst

09/1983 - 07/1987	Martin-Kneidl-Volksschule Grünwald
09/1987 - 07/1996	Theresien-Gymnasium München, humanistischer Zweig
07/1996	Allgemeine Hochschulreife (Endnote 1,2)
10/1996 - 06/1997	Sanitätssoldat im SanZentrum 612 der Sanitätsakademie der Bundeswehr, München

Medizinstudium

11/1997 - 05/2004	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität München, Abschluss mit der Gesamtnote 1,49
08/1999	Physikum (Endnote 2,0)
08/2000	Erstes Staatsexamen (Endnote 2,0)
03/2003	Zweites Staatsexamen (Endnote 1,66)
05/2004	Drittes Staatsexamen (Endnote 1,0)

Praktisches Jahr

04/2003 - 08/2003	Chirurgie im Städtischen Krankenhaus München-Neuperlach bei Herrn Prof. Dr. med. B. Günther, Herrn Dr. med. R. Ruppert, Herrn Dr. med. H. Niedermeier und Herrn Prof. Dr. med. K. Kunze
08/2003 - 10/2003	Innere Medizin im Städtischen Krankenhaus München-Schwabing, 1. Medizinische Abteilung bei Herrn Prof. Dr. med. C. Nerl
10/2003 - 11/2003	Innere Medizin im Städtischen Krankenhaus München-Neuperlach, 3. Medizinische Abteilung bei Herrn Prof. Dr. med. K.-D. Palitzsch
12/2003 - 03/2004	Pädiatrie im Städtischen Klinikum Rosenheim bei Herrn Dr. med. T. Uhlig

Arzt im Praktikum / Assistenzarzt

Seit 05/2004	Assistenzarzt zur Weiterbildung zum Facharzt für Innere Medizin. Städtisches Klinikum München GmbH - Klinikum Neuperlach, 3. Medizinische Abteilung bei Herrn Prof. Dr. med. K.-D. Palitzsch
--------------	--