

Aus der Medizinischen Klinik –Innenstadt
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reinke

**Vitalität und Proliferation in dreidimensionalen
Organkulturen humaner Nasenschleimhaut nach
Hyperthermie, mechanischer Schädigung und
serumfreier Kultivierung.
Untersuchungen zur Etablierung eines neuen
Schleimhautmodells.**

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

Vorgelegt von
Florian Thein
aus Augsburg

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Rudolf M. Huber

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. M. Kramer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. F. Gamarra

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 05.07.2007

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung und Zielsetzung	8
1.1	Einleitung	8
1.2	Zielsetzung	8
2	Material und Methoden	10
2.1	Kultur der dreidimensionalen Organkulturen	10
2.1.1	Verwendetes Epithel	10
2.1.2	Gewinnung der Nasenschleimhaut	10
2.1.3	Präparation der Organkulturen	11
2.1.4	Kulturbedingungen	11
2.2	Messung der Vitalität, der Zellzahl und der Proliferation	12
2.2.1	Lösen der Zellen aus dem Zellverband	12
2.2.2	Messung der Vitalität	13
2.2.3	Bestimmung der Zellzahl und Bildung eines Zellpools	13
2.2.3.1	Bildung eines Zellpools aus 12 einzelnen Organkulturen	14
2.2.3.2	Bestimmung der Zellzahl	14
2.2.4	Messung der Proliferation	15
2.2.4.1	5-Bromo-2-desoxy-Uridin (BrdU)	15
2.2.4.2	Inkubation der Kulturen mit BrdU	15
2.2.4.3	Präparation der Objektträger	15
2.2.4.4	Fixieren der Zellen	15
2.2.4.5	Ausschalten unspezifischer Bindungen	16
2.2.4.6	Inkubation mit dem primären Antikörper	16
2.2.4.7	Inkubation mit dem sekundären Antikörper	16
2.2.4.8	Färbung der proliferierenden Zellen	17
2.2.4.9	Negativkontrolle	17
2.2.4.10	Positivkontrolle	17
2.2.4.11	Auswertung	18
2.3	Schädigung der dreidimensionalen Organkulturen	18
2.3.1	Hyperthermie	19
2.3.2	Mechanische Schädigung	19
2.3.3	Vergleich serumhaltiger und serumfreier Kultivierung	20
2.4	Voruntersuchungen	20
2.4.1	Ermittlung der LD30 nach Hyperthermie	21
2.4.1.1	Messung der Vitalität unmittelbar nach 10 minütiger Hyperthermie bei verschiedenen Temperaturen	21
2.4.1.2	Messung der Vitalität unmittelbar nach Hyperthermie (47°C), verschiedene Behandlungszeiten	22
2.4.1.3	Messung der Vitalität nach 20 Minuten Hyperthermie bei 44°C und 47°C, 24 h nach der Behandlung	22
2.4.2	Ermittlung der Erholungszeit nach 20 Minuten Hyperthermie bei 44°C	22
2.4.3	Ermittlung der Reepithelialisierungszeit nach mechanischer Schädigung	23
2.4.4	Ermittlung der optimalen BrdU-Konzentration im Inkubationsmedium und der optimalen Inkubationsdauer	23
2.5	Hauptversuche	24

2.5.1	Messung der Vitalität sofort im Anschluss und 24 h nach 20 minütiger Hyperthermie bei 44°C _____	24
2.5.2	Messung der Vitalität sofort im Anschluss und 24 h nach mechanischer Schädigung _____	24
2.5.3	Messung der Proliferation innerhalb der ersten 24 h nach 20 minütiger Hyperthermie bei 44°C _____	24
2.5.4	Messung der Proliferation zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach mechanischer Schädigung _____	25
2.5.5	Vergleich der Zellzahlen nach serumhaltiger und serumfreier Kultivierung _____	25
2.5.6	Vergleich der Proliferation und der Vitalität nach serumhaltiger und serumfreier Kultivierung _____	25
2.6	Statistik _____	26
3	Ergebnisse	27
3.1	Ergebnisse der Vorversuche _____	28
3.1.1	Ermittlung der LD30 nach Hyperthermie _____	28
3.1.1.1	Messung der Vitalität nach 10 Minuten Hyperthermie sofort nach Behandlung bei verschiedenen Temperaturen _____	28
3.1.1.2	Messung der Vitalität sofort nach 47°C Hyperthermie. Verschiedene Behandlungszeiten _____	29
3.1.1.3	Messung der Vitalität 24 h nach der Behandlung mit Hyperthermie bei 44°C oder 47°C über 20 Minuten _____	30
3.1.1.4	Festlegen der Hyperthermiedosis für die Hauptversuche _____	31
3.1.2	Ermittlung der Erholungszeit nach 20 Minuten 44°C Hyperthermie _____	31
3.1.3	Ermittlung der Reepithelialisierungszeit nach mechanischer Schädigung _____	33
3.1.4	Ermittlung der optimalen BrdU-Konzentration im Inkubationsmedium und der optimalen Inkubationsdauer _____	33
3.2	Hauptversuche Hyperthermie _____	34
3.2.1	Ergebnisse der Vitalität _____	34
3.2.2	Ergebnisse der Proliferation _____	35
3.3	Hauptversuche mechanische Schädigung _____	36
3.3.1	Ergebnisse der Vitalität _____	36
3.3.2	Ergebnisse der Proliferation _____	37
3.4	Vergleich zwischen Hyperthermie und mechanischer Schädigung _____	38
3.4.1	Ergebnisse der Vitalität _____	38
3.4.2	Ergebnisse der Proliferation _____	39
3.5	Ergebnisse des Vergleichs zwischen serumhaltiger und serumfreier Kultivierung _____	40
3.5.1	Ergebnisse der Vitalität _____	40
3.5.2	Ergebnisse der Proliferation _____	41
3.6	Ergebnisse der Zellzahlbestimmung _____	42
4	Diskussion	43
4.1	Diskussion der Methodik und des Materials _____	43
4.1.1	Dreidimensionale Organkulturen _____	43
4.1.2	Diskussion der Gewinnung von Nasenschleimhaut _____	45
4.1.3	Vergleich des Kulturverhaltens von Nasen- und Bronchialschleimhaut _____	45
4.1.4	Diskussion der Epithelschädigung _____	46
4.1.5	Diskussion der Vitalitätsmessung _____	46
4.1.6	Diskussion der Messung der Proliferation _____	47

4.1.6.1	Ermittlung der optimalen BrdU-Konzentration im Inkubationsmedium und der Inkubationszeit _____	47
4.1.6.2	Auswertung der Proliferationstests _____	48
4.1.7	Diskussion der Zellpool-Bildung _____	49
4.1.8	Diskussion der Messung von Zellzahlen _____	50
4.1.9	Ermittlung der Reepithelisierungszeit nach mechanischer Schädigung _____	50
4.2	Diskussion der Ergebnisse _____	51
4.2.1	Wirkung von Hyperthermie auf die Vitalität und Proliferation dreidimensionaler Organkulturen _____	51
4.2.2	Wirkung der mechanischen Schädigung auf die Vitalität und Proliferation dreidimensionaler Organkulturen _____	53
4.2.3	Vergleich zwischen Hyperthermie und mechanischer Schädigung bezüglich Vitalität und Proliferation dreidimensionaler Organkulturen _____	54
4.2.4	Vergleich zwischen serumhaltiger und serumfreier Kultivierung bezüglich Vitalität, Proliferation und Zellzahl dreidimensionaler Organkulturen _____	55
5	Zusammenfassung	58
6	Literaturverzeichnis	60
7	Danksagung	67
8	Lebenslauf	68

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 1:	Aus dem Zellverband gelöste Zellen, gefärbt mit BrdU.....	18
Abb. 2:	Querschnitt durch eine Organkultur humanen Nasenepithels (HE-Färbung, ca. 350-fache Vergrößerung).....	27
Abb. 3:	Mehrreihiges respiratorisches Epithel einer Organkultur, aus Abb.1, ca. 2000-fache Vergrößerung).....	27
Abb. 4:	Messung der Vitalität sofort nach Hyperthermiebehandlung.....	28
Abb. 5:	Messung der Vitalität sofort nach 47°C Hyperthermie. Verschiedene Behandlungszeiten.....	29
Abb. 6:	Messung der Vitalität 24h nach der Behandlung mit Hyperthermie bei 44°C oder 47°C über 20 Minuten.....	30
Abb. 7:	Ermittlung der Erholungszeit nach 20 Minuten 44°C Hyperthermie.....	31
Abb. 8:	Prozent der vitalen Zellen in einer Kontrollgruppe und sofort bzw. 24h nach Hyperthermie bei 44°C,.....	34
Abb. 9:	Proliferation nach Hyperthermie 44°C, 20 Minuten.....	35
Abb. 10:	Vitalität nach mech. Schädigung, sofort und nach 24 h.....	36
Abb. 11:	Proliferation nach mech. Schädigung in verschiedenen Zeiträumen.....	37
Abb. 12:	Vitalität nach mech. Schädigung und Hyperthermie, sofort und 24 h nach der jeweiligen Behandlung.....	38
Abb. 13:	Proliferation nach mech. Schädigung und Hyperthermie.....	39
Abb. 14:	Vitalität nach serumhaltiger und serumfreier Kultivierung.....	40
Abb. 15:	Proliferation nach serumhaltiger und serumfreier Kultivierung.....	41
Abb. 16:	Zellzahlen nach serumhaltiger und serumfreier Kultivierung.....	42

Abkürzungsverzeichnis:

BEGM	Bronchial Epithel Growth Medium
BrdU	5-Bromo-2-desoxy Uridin
DMEM	Dulbeccos' Modified EageI Medium
HNO	Hals-Nasen-Ohren
KG	Kontrollgruppe
l	Liter
LD	Letalitätsdosis
mmol	Millimol
NCS	Newborn calf serum
PBS	Phosphat buffered saline
PCNA	Proliferating Cell Nuclear Antigen
Stabw	Standartabweichung
U/min	Umdrehungen pro Minute
vol%	Volumen Prozent

1 Einleitung und Zielsetzung

1.1 Einleitung

Die spezielle Differenzierung und die enorm große Oberfläche des respiratorischen Epithels der Atemwege und der Lunge sind die Voraussetzung eines suffizienten Gasaustausches unseres Organismus [44]. Aufgrund der damit verbundenen großen Angriffsfläche für pathogene Keime, sowie organische und anorganische Stoffe, befindet sich das respiratorische Epithel des gesamten Atemtraktes in einem permanenten Regenerationsprozess [55]. Bei Lungenerkrankungen, wie z.B. Asthma bronchiale, akuter und chronischer Bronchitis, können Epithelschäden nachgewiesen werden [13, 36]. Die Reparatur aufgetretener Schleimhautdefekte erfolgt zum einen durch Migrationsprozesse [8, 55, 57] innerhalb des mehrreihigen Epithels und zum anderen durch eine Steigerung der Proliferation [8, 32, 33, 34, 35].

Diese regenerativen Prozesse wurden in der Vergangenheit in vielen Versuchsreihen untersucht, jedoch meistens nur in Tierversuchen oder in Monolayer-Kulturen [3,55, 56, 57], welche aufgrund der eingeschränkten morphologischen Identität der einzelnen Zellen nur bedingt in vivo-Bedingungen widerspiegeln. Ursächlich dafür dürfte das Fehlen eines geeigneten humanen Schleimhautmodells sein, welches einfach und in ausreichender Menge zu kultivieren ist.

Diese Möglichkeit erschließt sich mit der Verwendung dreidimensional kultivierter Organkulturen des humanen respiratorischen Epithels. Diese Organkulturen sind leicht in größerer Menge zu reproduzieren und bestehen aus einem ca. 1-2mm großen bindegewebigen Kern, welcher von einem differenzierten, mehrreihigen, zum Teil ziliertem respiratorischen Epithel, welches eine Basalmembran besitzt, umschlossen wird. Vom morphologischem Aspekt entspricht dieses Bild exakt den Bedingungen in vivo.

1.2 Zielsetzung

Das Ziel unserer Arbeit war dreidimensional kultivierte Organkulturen des humanen respiratorischen Epithels als ein Schleimhautmodell zu etablieren, an welchem Vitalität und Proliferation im Sinne ablaufender Reparaturprozesse quantifiziert werden können.

Wir haben deswegen die Auswirkungen unterschiedlicher Schädigungsmuster untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Kultur der dreidimensionalen Organkulturen

2.1.1 Verwendetes Epithel

Als Untersuchungsmaterial wurde in einigen Vorversuchen humanes Bronchialepithel, später jedoch für alle folgenden Versuche ausschließlich humanes respiratorisches Epithel der Nase verwandt. Der große Vorteil der Verwendung des nasalen Epithels lag in der einfacheren Gewinnung und der vielfach größeren Menge vitalen humanen respiratorischen Gewebes, die uns zur Verfügung stand. Die Materialgewinnung und deren Verwendung in unseren Versuchen war sowohl von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU als auch von den Spendern genehmigt.

2.1.2 Gewinnung der Nasenschleimhaut

Das Nasenepithel stammte von gesunden Patienten, die sich zur Korrektur des Nasenhöhlenraumes in der HNO-Klinik der Universität München eine oder zwei Nasenmuscheln entfernen ließen (Conchotomia inferior). Diese Nasenmuscheln wurden uns freundlicherweise von OA Dr. med. Kleinsasser und Prof. Dr. med. Kastenbauer zur Verfügung gestellt, wofür wir uns an dieser Stelle ausdrücklich bedanken möchten. Der Vorteil des conchotomisch gewonnenen Nasenepithels bestand darin, dass aus einer Nasenmuschel pro Patient viel mehr Organkulturen zu kultivieren waren, während bei bronchoskopisch gewonnenen Biopsien maximal drei Organkulturen angelegt werden konnten.

Der Transport erfolgte in Bronchial Epithel Growth Medium (BEGM, Fa. PromoCell, Heidelberg, Deutschland) in das Labor unseres Hauses. Die Aufbereitung des Zellmaterials zur Kultivierung erfolgte in der Regel innerhalb von 30 bis 90 Minuten, gerechnet vom Zeitpunkt der operativen Entfernung.

2.1.3 Präparation der Organkulturen

Unter einem Abzug wurde die Nasenschleimhaut vorsichtig und unter sterilen Bedingungen mit einem Skalpell von Knochen- und Knorpelresten freipräpariert und anschließend in ca. 1-2mm³ große Stücke zerschnitten. Nachdem die so gewonnenen Organkulturen 2-3 mal vorsichtig mit Bronchial Epithel Growth Medium (BEGM, Fa PromoCell, Heidelberg, Deutschland) gewaschen worden waren, wurden sie auf 24 Well-Zellkulturplatten (Multiwell Tissue Culture Plate, 24 Well, Falcon, Lincoln Park, New Jersey, USA) überführt, deren einzelne Wells zuvor mit ca. 250 µl einer Agar-Medium-Mischung beschichtet worden waren.

2.1.4 Kulturbedingungen

Die 24-Multiwellplatten waren mit 0.75% Agar Noble (DIFCO-Laboratories, Detroit, USA) beschichtet.

Der Agar war in Dulbeccos Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco-Lifetechnologies LTD., Paisley Scotland) gelöst und mit 10% New-Born-Calf-Serum (NCS, Gibco-Lifetechnologies LTD., Paisley Scotland), nicht-essentiellen Aminosäuren (1.1µl/ml, Gibco-Lifetechnologies LTD., Paisley Scotland), Streptomycin (Penstrep, 1.8µl/ml, Gibco-Lifetechnologies LTD., Paisley Scotland) und Amphotericin B (Fungizone, 3.6µl/ml, Gibco-Lifetechnologies LTD., Paisley Scotland) supplementiert. Mit einer Pipette wurden jeweils 150µl BEGM pro Well auf den Agar gegeben.

Jeweils ein Schleimhautstück wurde pro Well kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in einem Inkubator (Typ B 5060EC/CO₂, Heraeus, Hanau) bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit. Das BEGM wurde alle 2 Tage, die agarbeschichtete Multiwellplatte alle 7 Tage gewechselt. Die Kultivierungsdauer lag zwischen mindestens 21 und maximal 28 Tagen.

2.2 Messung der Vitalität, der Zellzahl und der Proliferation

2.2.1 Lösen der Zellen aus dem Zellverband

Um an den behandelten und unbehandelten Organkulturen die Messungen der Vitalität und der Proliferation durchführen zu können, mussten die Zellen zuvor aus der normalen Zellarchitektur des respiratorischen Epithels gelöst und gereinigt werden. Aufgrund des für die vitalen Zellen schonenderen Vorganges wurde zur Lyse des Zellverbandes Protease und Kollagenase verwendet.

Für diese Methode mussten 5,5 mg Protease (Sigma Diagnostics, St. Luis, USA, Protease from *Streptomyces griseus*, P-8811) und 3 mg Kollagenase (Worthington biochemical corporation, New Jersey, USA, 216 U/mg ,M3M155) in 3 ml BEGM-Medium gelöst werden. Die zu disaggregierende Kultur wurde nun in einem Eppendorf-Gefäß mit 600 µl dieser Protease/Kollagenase-Medium-Mischung für 45 Minuten bei 37°C in einem Schüttelinkubator (Braun-Diessel-Biotech, Melsungen, Deutschland, Certomat® U) inkubiert. Danach wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 600 µl NCS abgeblockt. Anschließend wurde das Eppendorf-Gefäß mit der sich darin befindlichen Kultur für ein bis zwei Minuten kräftig mit einem Vortex-Gerät durchgeschüttelt. Der übrige Rest der Kultur, bestehend aus dem bindegewebigen Faserkern, wurde vorsichtig mittels einer Pipettenspitze entfernt und unter einem Durchlichtmikroskop auf eventuell verbliebene größere Zellreste kontrolliert. Die im Eppendorf-Gefäß verbliebene Suspension, bestehend aus den gelösten Zellen und der Lösungsreagenz-NCS-Mischung wurde nun für 10 Minuten bei 800 rpm und 37°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig bis auf 5-10 µl abgezogen und verworfen. In den verbliebenen 5-10 µl befand sich das gelöste Zellmaterial als am Boden haftendes Sediment, das zur weiteren Verwendung noch vorsichtig mit einer Pipettenspitze wiederaufgeschwemmt werden musste.

2.2.2 Messung der Vitalität

Um die Vitalität der Kulturen messen zu können, mussten die Zellen zunächst aus dem Epithelverband gelöst werden. Dabei wurde nach der Methode wie unter 2.2.1 beschrieben vorgegangen.

Das Zellsediment wurde in den verbliebenen 5-10 μl mittels einer Pipette wieder aufgeschwemmt und mit einer 10 μl Pipette als Tropfen auf einen Objektträger übertragen. Auf diesen Tropfen wurden 10 μl einer Färbungslösung gegeben. Die Färbungslösung bestand aus 50 μl einer Ethidiumbromidstammlösung (1mg Ethidiumbromid, Serva Feinbiochemica, Heidelberg), 50 μl einer Acridinorange-stammlösung (1mg Acridinorange, Serva Feinbiochemica, Heidelberg) und 900 μl PBS (Phosphat Buffered Saline, Gibco-Lifetechnologies LTD., Paisley Scotland). Sofort nach Zugabe des Farbsubstrates wurden die gefärbten Zellen mit einem Deckglas bedeckt und unter einem Fluoreszenz-Mikroskop (Diaphot-TMD, Nikon Corporation, Japan; Zubehör: Mercury-Lamp HB⁻¹⁰ 101 AF und 510 nm Emissionsfilter B-2A, beides Nikon Corporation, Japan) ausgezählt. Dabei erschienen die vitalen Zellen grün, die letalen Zellen orange. 1000 Zellen wurden ausgezählt und der prozentuale Anteil vitaler Zellen bestimmt.

2.2.3 Bestimmung der Zellzahl und Bildung eines Zellpools

Da die Zellzahl einzelner Kulturen aufgrund deren unterschiedlichen Formen und Größen eine relativ große Streubreite erwies, wurden die Zellen von bis zu 12 einzelnen Organkulturen zusammen aus dem Epithelverband gelöst und dadurch ein gemeinsamer Pool gebildet. Dadurch wurde zum einen eine höhere Zellzahl im Sediment erzielt, so dass genügend Zellmaterial für die Messung der Vitalität, der Proliferation und der Zellzahl, zur Verfügung stand. Zum anderen konnte durch die gleichmäßige Aufteilung verschieden großer Kulturen in getrennte Untersuchungsgruppen die unterschiedlichen Größen der Einzelkulturen ausgeglichen werden.

2.2.3.1 Bildung eines Zellpools aus 12 einzelnen Organkulturen

12 Einzelkulturen wurden mit 0,8 ml der Lösungsreagenz, wie unter 2.2.1 beschrieben, in ein Eppendorf-cup gegeben. Um das Optimum der Enzymaktivität zu erreichen, wurde das Eppendorf-cup zunächst für 20 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde das Eppendorf-cup für 1 Minute in einem Vortex kräftig geschüttelt und für 45 Minuten in einem Schüttelinkubator (Fa.B.Braun, Certomat®U) bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Eppendorf-cup für weitere 15 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert und abschließend für 1-2 Minuten in einem Vortex kräftig geschüttelt. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 0,8 ml NCS gestoppt. Da nach dem Lösen der Zellen aus dem Epithelverband die bindegewebigen Kerne als schwammiges Fasergeflecht imponieren, die viel Flüssigkeit und damit auch viel gelöstes Zellmaterial enthalten, wurde die Suspension samt der bindegewebigen Reste mittels einer möglichst großlumigen Kanüle in eine Spritze aufgezogen und gefiltert. Um zu gewährleisten, dass dabei nur die bindegewebigen Reste zurückgehalten werden, wurde ein Filter mit 40 µm großen Poren gewählt.

Die gefilterte Suspension wurde in ein neues Eppendorf-cup gefüllt und für 10 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment auf 150 µl resuspendiert.

Somit erhielten wir das Zellmaterial aus 12 Organkulturen gelöst in 150 µl.

2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Die Konzentration der Zellen in den Zellpools wurde mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer ermittelt. Im Phasenkontrastmikroskop (Diaphot-TMD, Nikon Corporation, Japan) wurden pro Versuchsgruppe vier Zählfelder zu je 0,1 µl ausgewertet. Mit Hilfe der Konzentration der Zellen in den Zellpools und dem Volumen der Zellpools ließ sich die Anzahl der Zellen pro Versuchsgruppe errechnen. Dividierte man die Anzahl der Zellen pro Versuchsgruppe durch die Anzahl der verwendeten Organkulturen pro Versuchsgruppe, erhielt man die durchschnittliche Zellzahl pro Organkultur.

2.2.4 Messung der Proliferation

2.2.4.1 5-Bromo-2-desoxy-Uridin (BrdU)

BrdU ist ein Thymidinanalogon, das von proliferierenden Zellen anstelle des Thymidins in neusynthetisierte DNA eingebaut wird. Mit Hilfe von spezifischen Antikörpern gegen BrdU können proliferierende Zellen auf diese Weise markiert werden. Diese Methode ist einfach und weit verbreitet. Durch die Wahl verschiedener primärer und sekundärer Antikörper kann die Färbung den jeweiligen Versuchsbedingungen optimal angepasst werden.

2.2.4.2 Inkubation der Kulturen mit BrdU

Die zu untersuchenden Kulturen wurden für 24 h mit BrdU (BrdU-Labeling and detection Kit II, Boehringer, Mannheim) inkubiert. Das BrdU war in einer Konzentration von 100 µmol/l in BEGM mit 5 Vol% NCS gelöst. Diese Lösung stellte die Nährlösung für die Zeit der Inkubation dar.

2.2.4.3 Präparation der Objektträger

Die Objektträger wurden in Ethanol gewaschen, für 5 Minuten in Poly-L-Lysin-Lösung (Sigma Diagnostics, St. Louis, USA) getaucht und anschließend für 1 h getrocknet. Dadurch wurde das Ablösen der Zellen vom Objektträger während der folgenden Schritte effektiv verhindert.

2.2.4.4 Fixieren der Zellen

Nach der Lyse der Zellen aus dem Epithelverband der behandelten Organkultur wurden Tropfen zu 10 µl der gewonnenen Zellsuspension auf die mit Poly-L-Lysin beschichteten Objektträger überführt und bei Raumtemperatur getrocknet. Anschließend erfolgte die Fixierung bei -20°C für 30 Minuten in einer Fixierlösung (70 Vol% Ethanol und 30 Vol% Glycinpuffer 50 mmol/l, Serva Feinbiochemica, Heidelberg) bei pH 2.0.

2.2.4.5 Ausschalten unspezifischer Bindungen

Nach der Fixierung wurden die Objektträger in PBS gewaschen und bis auf den Bereich der aufgetragenen Zellen vorsichtig abgetrocknet. Der Bereich der aufgetragenen Zellen wurde mit 70 µl NCS beschichtet und bei 100% Luftfeuchtigkeit und 37°C für 15 Minuten im Brutschrank inkubiert. Im Anschluss wurden die Objektträger erneut mit PBS gewaschen und, wie oben beschrieben, abgetrocknet.

2.2.4.6 Inkubation mit dem primären Antikörper

Nun erfolgte die Beschichtung des zu färbenden Bereiches mit Anti-BrdU-Arbeitslösung (aus dem BrdU-Labeling and detection Kit II, Boehringer, Mannheim). Diese Arbeitslösung besteht aus monoklonalen Maus-Antikörpern (Klon BMC 9318, IgG₁) mit einer hohen Spezifität gegen 5-Bromo-2-desoxy-Uridin. Die Inkubation mit der Anti-BrdU-Arbeitslösung erfolgte für 45 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank. Im Anschluss wurde der Objektträger dreimal mit PBS gewaschen und um die zu färbenden Bereiche herum abgetrocknet.

2.2.4.7 Inkubation mit dem sekundären Antikörper

Der zu färbende Bereich wurde nun mit der Anti-Maus-Antikörper-Lösung (aus dem BrdU-Labeling and detection Kit II, Boehringer, Mannheim) beschichtet. Dieser vom Schaf gewonnene polyklonale Anti-Maus-Antikörper ist immunosorptiv gereinigt und mit alkalischer Phosphatase konjugiert. Die Inkubation erfolgte für 45 Minuten bei 37°C, 5% CO₂ und 100% Luftfeuchtigkeit im Brutschrank, anschließend erfolgte erneut ein dreimaliger Waschgang mit PBS, wie bereits oben beschrieben.

2.2.4.8 Färbung der proliferierenden Zellen

Im dritten und letzten Schritt wurden die zu färbenden Bereiche mit der Farbsubstratlösung beschichtet. Die Farbsubstratlösung bestand aus Nitroblautetrazoliumsalz (NBT, zu 75 mg/ml in Dimethylformamid 70 Vol%), X-Phosphat (5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-Phosphat) und Toluidinsalz (50 mg/ml in Dimethylformamid), gelöst in Substrat-Puffer (Tris-HCL-Puffer, 100 mmol/l, NaCl, 100 mmol/l, MgCl₂, 50 mmol/l, pH 9.5 bei 20°C). Die Inkubation mit der Farbsubstratlösung erfolgte bei Raumtemperatur für 30 Minuten.

Abschließend wurde die Farbsubstratlösung mit ausreichend PBS gründlich abgewaschen, die Bereiche um den gefärbten Teil abgetrocknet und der gefärbte Teil mit Glycerin-Gelatine (Sigma Diagnostics, St. Luis, USA) unter einem Deckglas eingebettet.

Die Auswertung erfolgte unter einem Durchlichtmikroskop, wobei positiv gefärbte Zellen einen deutlichen bräunlich-bläulich gefärbten Zellkern aufwiesen. Ausgezählt wurden 1000 Zellen, die positiven wurden dabei in % angegeben.

2.2.4.9 Negativkontrolle

Als Negativkontrolle der BrdU-Färbung wurden Organkulturen ohne vorherige Inkubation mit BrdU-Lösung verwendet.

2.2.4.10 Positivkontrolle

Als Positivkontrolle der BrdU-Färbung dienten Zellen eines nichtkleinzelligen Bronchialkarzinoms (EPLC-32MI).

2.2.4.11 Auswertung

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe eines Durchlichtmikroskopes, wobei positiv gefärbte Zellen einen deutlichen bräunlich-bläulich gefärbten Zellkern aufwiesen. Pro Objektträger wurden 1000 Zellen ausgezählt und die Anzahl der proliferierenden Zellen in Prozent angegeben (siehe Abb.1).

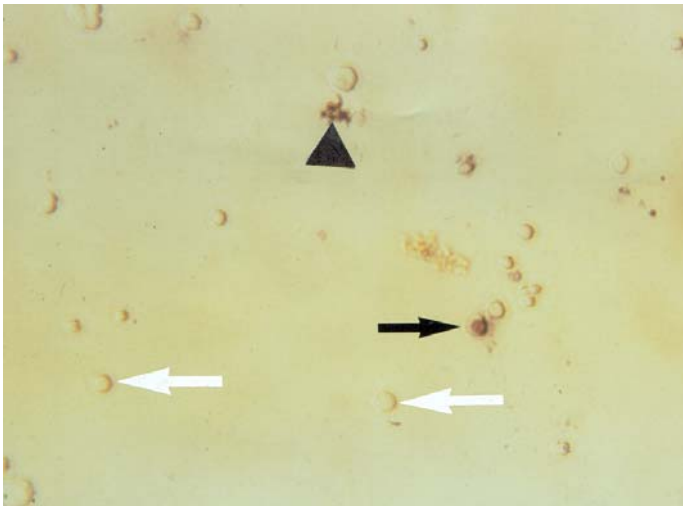


Abb. 1: Aus dem Zellverband gelöste Zellen, gefärbt mit BrdU

Schwarzer Pfeil: Positiv gefärbte (proliferierende) Zelle.

Weißer Pfeil: Negativ gefärbte (nicht proliferierende) Zellen.

Dicker schwarzer Pfeil: Immunpräzipitate, Zelldetritus

2.3 Schädigung der dreidimensionalen Organkulturen

Um die Proliferationsfähigkeit der dreidimensional kultivierten Organkulturen messen zu können, mussten zunächst Proliferationsanreize geschaffen werden. Daher wurden die Organkulturen auf verschiedene Weisen geschädigt, nämlich:

- physikalisch durch Hyperthermie,
- mechanisch durch das Zerteilen einer Organkultur und
- biochemisch durch serumfreie Kultivierung.

2.3.1 Hyperthermie

Mittels Hyperthermie wird die gesamte dreidimensionale Organkultur geschädigt. Die Hyperthermiebehandlung erfolgte in einem Wasserbad (GFL, Typ 1012) mit eingebautem Thermostat. Um die Temperatur auch über einen längeren Zeitraum auf einen gewünschten Wert konstant zu halten, wurde die Temperaturmesssonde eines Digitalthermometers (Fa. GTH 1200) mit einer Messgenauigkeit von $0,1^{\circ}\text{C}$ in das Wasserbad geführt. Die Messsonde befand sich in einem verschließbaren, mit BEGM-Medium gefüllten, Eppendorf-Cup. Dieser Eppendorf-Cup war von der gleichen Bauart wie der für die Organkulturen bestimmte Eppendorf-Cup. Der Cup mit der Temperaturmesssonde wurde zusammen mit dem 2. Eppendorf-Cup in einem Schwimmer in das Wasserbad gelegt. Dabei war zu beachten, dass die Eintauchtiefe der beiden Gefäße gleich war.

Sobald die gewünschte Temperatur, kontrolliert über das Digitalthermometer, in dem ersten Eppendorf-Cup erreicht war, konnte man die zu behandelnde Organkultur in den zweiten Eppendorf-Cup überführen. Dabei durfte man davon ausgehen, dass die Temperaturen in beiden Eppendorfgefäßen gleich war. Während des Ablaufs der gewünschten Behandlungsdauer (10-20 Minuten) kam es zu Thermostat-bedingten Temperaturschwankungen von bis zu $0,7^{\circ}\text{C}$ ($\pm 0,35^{\circ}\text{C}$). Diese Schwankungen konnten jedoch durch manuelle Korrektur auf $0,1-0,2^{\circ}\text{C}$ reduziert werden.

Nach Ablauf der Behandlungszeit wurden die Organkulturen vorsichtig mit einer 5ml-Pipette dem Bad entnommen und in ein weiteres Gefäß, das mit 37°C warmen BEGM-Medium gefüllt war, gegeben.

2.3.2 Mechanische Schädigung

Um eine lokal begrenzte Schädigung der dreidimensionalen Kulturen zu erreichen, wurde die mechanische Schädigung gewählt. Dazu wurden die dreidimensionalen Organkulturen mittels eines Skalpells in der Mitte durchgeschnitten. Die Schnittkante des Epithels stellt somit eine lokal begrenzte Läsion dar. Die Schnittfläche entsprach somit einer Wundfläche. Beide Kulturhälften wurden in die folgenden Versuche geführt.

2.3.3 Vergleich serumhaltiger und serumfreier Kultivierung

Um den Einfluss von Serum auf die Kultivierung von dreidimensionalen Schleimhautkulturen zu untersuchen, wurden einzelne Kulturen über einen Zeitraum von ein bis zwei Tagen serumfrei kultiviert, da auf diese Weise den Organkulturen die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren vorenthalten wurden.

Dazu wurden die zu untersuchenden Kulturen in zwei Gruppen aufgeteilt und in Petri-Schalen ohne Agar-Medium-Beschichtung gelegt. Zu der Ersten Gruppe wurde sodann nur BEGM-Medium zugegeben, zu der zweiten Gruppe BEGM-Medium mit zusätzlich 10% NCS.

Nach 48 h konnte man lichtmikroskopisch die Lösung einzelner Zellen aus dem Epithelverband beobachten.

Untersucht wurde der Einfluss des Serums auf Vitalität und Proliferation. Um abschätzen zu können, ob es sich bei einer Änderung der Proliferation um eine absolute oder relative Änderung handelt, wurde zusätzlich die Zellzahl der Untersuchungsgruppen bestimmt.

2.4 Voruntersuchungen

Da pro Organkultur nur eine Untersuchung durchgeführt werden konnte, mussten verschiedene Kulturen in die jeweiligen Versuchsreihen geführt werden. Um die Ergebnisse der jeweiligen Untersuchungen miteinander vergleichen zu können, war es nötig, Kulturen gleicher Qualität auszuwählen. Damit eine Kultur überhaupt für eine Untersuchung in Frage kommen konnte, mussten folgende Qualitätskriterien erfüllt sein, die lichtmikroskopisch erfasst werden konnten:

- vollkommen abgeschlossene Epithelialisierung über die gesamte Organkulturoberfläche
- glatter, scharf abgeschlossener Epithelsaum
- Alter zwischen 21 und 28 Tage nach Beginn der Kultivierung
- keine Lösung einzelner Zellen aus dem Epithelverband

Im Idealfall, als Zeichen höchster Differenzierung, zeigte sich lichtmikroskopisch auf der Epitheloberfläche der Zilienschlag. Da aber nur ca. $\frac{1}{3}$ - $\frac{1}{4}$ der Kulturen überhaupt dieses Merkmal aufzeigten, wurde entschieden, den Zilienschlag nicht zur Voraussetzung für eine Versuchstauglichkeit zu erklären.

Bei der Aufteilung der ausgewählten Kulturen in verschiedene Untersuchungsgruppen galten folgende Prinzipien:

- die Kulturen mussten von gleicher Qualität sein
- die Kulturen mussten von ungefähr gleicher Größe sein.

Die Auswahl der jeweiligen Kulturen erfolgte ansonsten zufällig.

2.4.1 Ermittlung der LD30 nach Hyperthermie

Ziel dieser Untersuchung war es, eine Hyperthermiedosis, bestehend aus der angewandten Temperatur und der Behandlungszeit, zu ermitteln, durch welche die behandelten Kulturen deutlich geschädigt wurden. Als Ziel wurde zunächst die Ermittlung der LD30 (siehe 3.1.1) gesetzt. Um die erreichte Schädigung beurteilen zu können, wurde die Vitalität der behandelten Kulturen entweder sofort nach erfolgter Behandlung, oder 24 h später ermittelt.

2.4.1.1 Messung der Vitalität unmittelbar nach 10 minütiger Hyperthermie bei verschiedenen Temperaturen

Die Vitalität wurde bei vier verschiedenen Gruppen gemessen, (n=Anzahl der behandelten Kulturen).

1. Gruppe: Kontrollgruppe, (n=14).
2. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (44°C, 10 min), Vitalitätsmessung sofort nach Behandlung, (n=6).
3. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (47°C, 10 min), Vitalitätsmessung sofort nach Behandlung, (n=8).
4. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (50°C, 10 min), Vitalitätsmessung sofort nach Behandlung, (n=2).

2.4.1.2 Messung der Vitalität unmittelbar nach Hyperthermie (47°C), verschiedene Behandlungszeiten

1. Gruppe: Kontrollgruppe, (n=14).
2. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (10 min, 47°C), Vitalitätsmessung sofort nach Behandlung, (n=5).
3. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (20 min, 47°C), Vitalitätsmessung sofort nach Behandlung, (n=5).
4. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (30 min, 47°C), Vitalitätsmessung sofort nach Behandlung, (n=4).
5. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (40 min, 47°C), Vitalitätsmessung sofort nach Behandlung, (n=4).

2.4.1.3 Messung der Vitalität nach 20 Minuten Hyperthermie bei 44°C und 47°C, 24 h nach der Behandlung

1. Gruppe: Kontrollgruppe, (n=14).
2. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (44°C, 20min), Vitalitätsmessung 24 h nach Behandlung, (n=12).
3. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (47°C, 20min), Vitalitätsmessung 24 h nach Behandlung, (n=2).

2.4.2 Ermittlung der Erholungszeit nach 20 Minuten Hyperthermie bei 44°C

Ziel dieses Versuches war es, die Zeit zu ermitteln, welche die Kulturen nach einer Hyperthermiebehandlung zur Erholung benötigen. Dazu wurden insgesamt 15 Kulturen, wie oben beschrieben, für 20 Minuten bei 44°C in einem Wasserbad inkubiert. Um die Vitalität der Kulturen zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Behandlung beurteilen zu können, wurde 1 h nach der Behandlung und im folgenden 24 h, 48 h, 72 h und 96 h später die Vitalität gemessen. Für jeden Zeitpunkt wurde die Vitalität an drei Kulturen gemessen.

1. Gruppe: 1 h nach Hyperthermie.
 2. Gruppe: 24 h nach Hyperthermie.
 3. Gruppe: 48 h nach Hyperthermie.
 4. Gruppe: 72 h nach Hyperthermie.
 5. Gruppe: 96 h nach Hyperthermie.
- Jeweils n=3.

2.4.3 Ermittlung der Reepithelisierungszeit nach mechanischer Schädigung

Drei Organkulturen wurden mit einem sterilen Skalpell zerteilt. Für diesen Versuch wurden Organkulturen ausgewählt, die den normalen Qualitätsanforderungen entsprachen und zusätzlich eine fast runde Form besaßen. Bei einer Organkultur wurde der Schnitt durch die Mitte geführt, bei den beiden anderen wurde mit Hilfe eines Stereomikroskopes ein rechtwinkliger Keil, der bis in den Mittelpunkt der Organkulturen reichte, entfernt. Grundlage dieser keilförmigen Incision war die Überlegung, die Schnittkanten unter dem Mikroskop besser identifizieren zu können. Nach dem Zerteilen wurden die Schnittkanten der Organkulturen unter einem Durchlichtmikroskop beurteilt, anschließend wurden die Kulturen sofort wieder unter die normalen Kulturbedingungen gebracht. Die Reepithelisierung der Schnittkanten wurde dreimal täglich begutachtet, bis die gesamte Organkulturoberfläche von einem gleichmäßig abgeschlossenen Epithel bedeckt war.

2.4.4 Ermittlung der optimalen BrdU-Konzentration im Inkubationsmedium und der optimalen Inkubationsdauer

In frühen Vorversuchen wurde die Proliferation der Organkulturen mit Hilfe des BrdU-Labeling and Detection KitII der Firma Boehringer (Mannheim) mit der empfohlenen BrdU-Konzentration und Inkubationsdauer untersucht. Zum Erhalt besser auswertbarer Färbungen wurde die Konzentration des BrdU-Inkubationsmediums um den Faktor 10 erhöht und die Inkubationsdauer auf 24 h verlängert.

2.5 Hauptversuche

2.5.1 Messung der Vitalität sofort im Anschluss und 24 h nach 20 minütiger Hyperthermie bei 44°C

1. Gruppe: Kontrollgruppe, (n=14).
2. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (44°C, 20 min), Vitalitätsmessung sofort nach Behandlung, (n=10).
3. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (44°C, 20 min), Vitalitätsmessung 24 h nach erfolgter Behandlung, (n=12).

2.5.2 Messung der Vitalität sofort im Anschluss und 24 h nach mechanischer Schädigung

1. Gruppe: Kontrollgruppe, d.h. nicht geschnittene Kulturen, (n=14).
2. Gruppe: Zerschnittene Kulturen, Vitalitätsmessung gleich im Anschluss an das Zerteilen, (n=10).
3. Gruppe: Zerschnittene Kulturen, Vitalitätsmessung 24 h nach dem Zerteilen, (n=10).

2.5.3 Messung der Proliferation innerhalb der ersten 24 h nach 20 minütiger Hyperthermie bei 44°C

1. Gruppe: Kontrollgruppe, (n=12).
2. Gruppe: Mit Hyperthermie behandelte Kulturen (44°C, 20 min), 24 h-BrdU-Inkubation sofort nach Behandlung, (n=9).

2.5.4 Messung der Proliferation zu den Zeitpunkten 24 h und 48 h nach mechanischer Schädigung

1. Gruppe: Kontrollgruppe, d.h. nicht geschnittene Kulturen, (n=14).
2. Gruppe: Zerschnittene Kulturen, 24 h-BrdU-Inkubation gleich im Anschluss an die Behandlung, Messung im Anschluss an die Inkubation, (n=9).
3. Gruppe: Zerschnittene Kulturen, 24 h-BrdU-Inkubation, beginnend 24 h nach der Behandlung über weitere 24 h. D.h., BrdU-Exposition von t=24 h bis t=48 h. Messung im Anschluss an die BrdU-Exposition, (n=4).

2.5.5 Vergleich der Zellzahlen nach serumhaltiger und serumfreier Kultivierung

Für diesen Versuch wurden die Messungen an insgesamt 6 Zellpools durchgeführt. Dazu wurden 36 Organkulturen nach einer Inkubationszeit von 48 h im serumfreien Medium in 3 Zellpools von je 12 einzelnen Organkulturen aufgeteilt. Diesen wurden weitere 36 Organkulturen, welche unverändert weiterhin im serumhaltigen Medium gehalten wurden, gegenübergestellt. Auch diese wurden zu je 12 Organkulturen in 3 Zellpools aufgeteilt.

10 µl jedes Zellpools wurden mit 10 µl Trypanblau in einem Eppendorf-cup gefärbt. Von dieser gefärbten Zellsuspension wurden wiederum 10 µl entnommen und auf eine Eppendorf-Zählkammer gegeben. Die ermittelten Zellzahlen setzten sich aus den gemittelten Ergebnissen der insgesamt 8 Zählquadrate zusammen.

2.5.6 Vergleich der Proliferation und der Vitalität nach serumhaltiger und serumfreier Kultivierung

Die Vitalität und die Proliferation wurde ebenfalls mit Hilfe der Zellpooltechnik bestimmt. Dazu wurden aus jedem Zellpool jeweils 10 µl der Zellsuspension entnommen und einerseits auf die Vitalität und andererseits auf die Proliferation hin untersucht.

2.6 Statistik

Für die statistische Auswertung wurde das Statistikprogramm Sigma Stat for Windows Version 1.0 (High Edit Professional ©1993, Micro Help, Inc. and heiler Software GmbH) verwandt.

Für den Nachweis signifikanter Unterschiede zwischen Kontrollgruppen und behandelter Gruppen verwandten wir die Einweg-Varianzanalyse nach Kruskal-Wallis.

Unterschiede zwischen den jeweiligen Behandlungsgruppen wurden mittels des paarweisen multiplen Vergleichs nach Dunn erfasst.

Der Vergleich der aus Organpools gebildeten Behandlungsgruppen erfolgte mittels des Mann-Whitney-Testes.

3 Ergebnisse

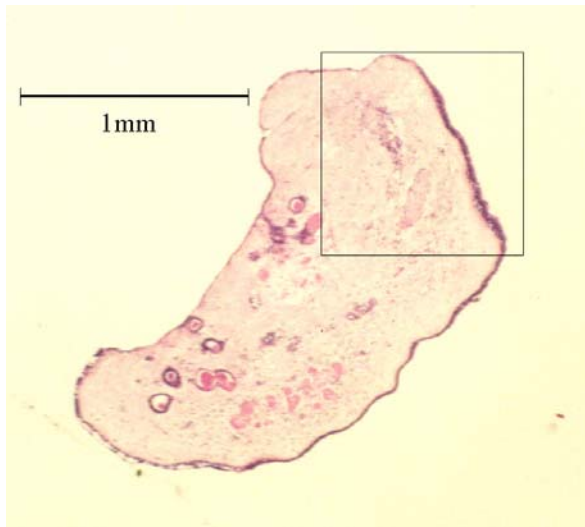


Abb. 2: Querschnitt durch eine Organkultur humanen Nasenepithels (HE-Färbung, ca. 350-fache Vergrößerung)

Der kollagenfaserreiche Kern der Organkultur ist hellrot gefärbt. Das Epithel stellt sich als violetter Saum an der Oberfläche des Kerns dar.

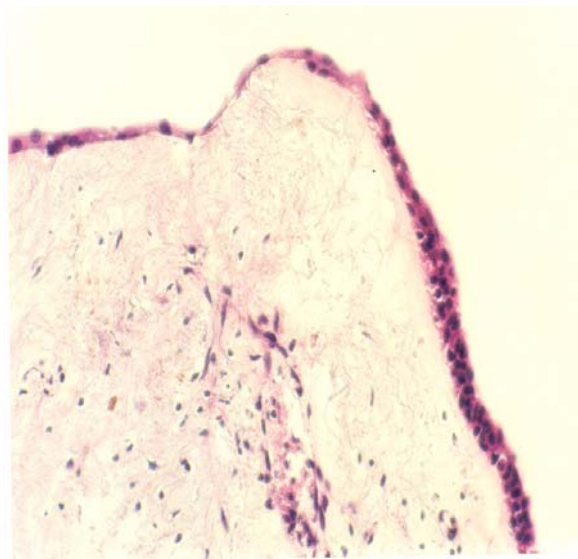


Abb. 3: Mehrreihiges respiratorisches Epithel einer Organkultur, aus Abb.1, ca. 2000-fache Vergrößerung)

In dem vergrößerten Ausschnitt erkennt man die dunkelviolettfärbten Zellkerne des mehrreihigen Epithels und der Fibrozyten des bindegewebigen Kerns.

3.1 Ergebnisse der Vorversuche

Bei den Vorversuchen wurde auf eine statistische Auswertung der Ergebnisse verzichtet.

3.1.1 Ermittlung der LD30 nach Hyperthermie

Die LD30, Kurzform für Letalitätsdosis 30%, entspricht der Dosis Hyperthermie, welche zum Absterben von ca. 30% aller Zellen einer Organkultur führt.

3.1.1.1 Messung der Vitalität nach 10 Minuten Hyperthermie sofort nach Behandlung bei verschiedenen Temperaturen

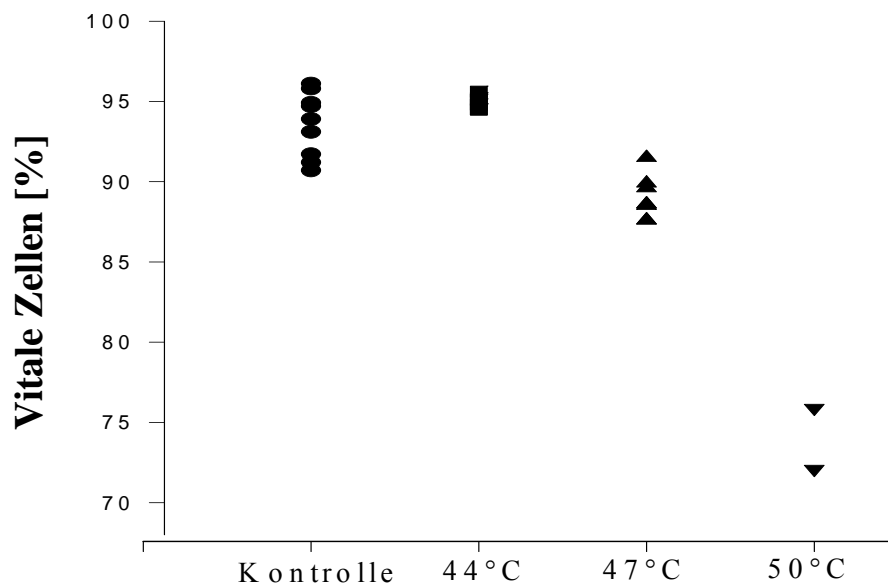


Abb. 4: Messung der Vitalität sofort nach Hyperthermiebehandlung.

Die Abbildung zeigt die prozentuelle Vitalität von Kontroll-Organokulturen und Organokulturen nach 10 Minuten Hyperthermie bei 44°C, 47°C und 50°C. Die Messung erfolgte unmittelbar nach Behandlungsende. Die Symbole stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der

einzelnen Kulturen dar, (n=14 für die Kontrolle, n=6 für die 44°C-Gruppe, n=8 für die 47°C-Gruppe und n=2 für die 50°C-Gruppe).

Es zeigte sich, dass sich nach 10 Minuten Hyperthermie mit 44°C oder 47°C kein deutlicher Abfall der Vitalität im Vergleich zu unbehandelten Kontrollgruppen messen ließ. Ein Anteil von ca. 25-30% toten Zellen wurde erst ab einer Temperatur von 50°C erreicht.

3.1.1.2 Messung der Vitalität sofort nach 47°C-Hyperthermie. Verschiedene Behandlungszeiten

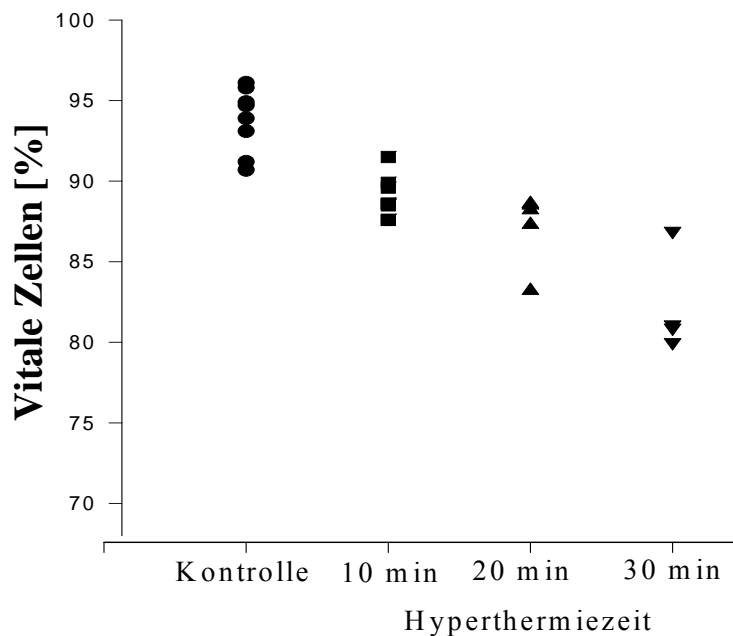


Abb. 5: Messung der Vitalität sofort nach 47°C-Hyperthermie. Verschiedene Behandlungszeiten.

Die Abbildung zeigt die Vitalität von Organkulturen nach 47°C-Hyperthermie für verschiedene Behandlungsdauern. Die Messung erfolgte unmittelbar nach Behandlungsende.

Auf der x-Achse befinden sich neben der Kontrollgruppe die Versuchsgruppen mit den Behandlungsdauern von 10 min, 20 min und 30 min. Auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen der einzelnen Organkultur aufgetragen. Die Werte verstehen sich als Mittelwerte der Auszählungen an jeder untersuchten Organkultur, (n=14 für die Kontrolle, n=5 für Behandlungszeit t=10 min, n=5 für t= 20 min, n=4 für t=30 min).

Aus Abbildung 5 wird ersichtlich, dass bei einer Temperatur von 47°C der Anteil toter Zellen nach 10 Minuten 8,5-12,4%, nach 20 Minuten 11,4-16,8%, nach 30 Minuten 13,1-20% betrug. Nach 40 Minuten war eine verlässliche Auszählung aufgrund massiver Zellschädigungen nicht mehr möglich.

3.1.1.3 Messung der Vitalität 24 h nach der Behandlung mit Hyperthermie bei 44°C oder 47°C über 20 Minuten

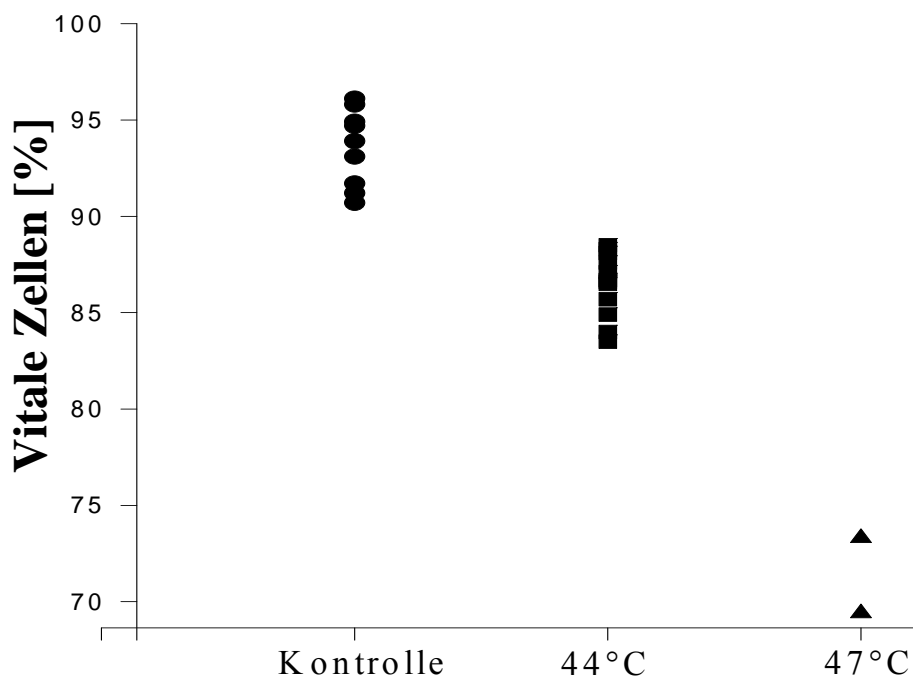


Abb. 6: Messung der Vitalität 24 h nach der Behandlung mit Hyperthermie bei 44°C oder 47°C über 20 Minuten

Die Abbildung zeigt die Vitalität von Organkulturen 24 h nach 20 minütiger Behandlung mit verschiedenen Temperaturen.

Auf der x-Achse befinden sich neben der Kontrollgruppe die Versuchsgruppen mit 44°C und 47°C-Hyperthermie, auf der y-Achse ist der prozentuale Anteil vitaler Zellen der einzelnen Organkulturen aufgeführt. Die Werte verstehen sich als Mittelwerte der Auszählungen an jeder untersuchten Organkultur. (n=14 für die Kontrolle, n=12 für die 44°C-Gruppe und n=2 für die 47°C-Gruppe).

Die Abbildung 6 zeigt, dass 24 h nach einer Hyperthermiebehandlung von 20 Minuten bei einer Temperatur von 44°C der Anteil toter Zellen 11,5-16% betrug. Bei einer Temperatur von 47°C erhöht sich der Anteil toter Zellen auf 26,7-30,6%.

3.1.1.4 Festlegen der Hyperthermiedosis für die Hauptversuche

Anhand der oben aufgeführten Versuchsergebnisse wurde die Hyperthermiedosis für die folgenden Versuche auf eine Temperatur von 44°C und 20 Minuten Behandlungszeit festgelegt. Die LD30 wurde zwar bei dieser Hyperthermiedosis nicht erreicht, jedoch ließ sich aus dem zeitlichen Verlauf der Vitalität sofort nach der Behandlung und 24 Stunden später ersehen, dass eine ausreichende Schädigung der Schleimhautkulturen erzielt werden konnte. Wurde eine Temperatur von 47°C oder höher gewählt, wurde die fluoreszenzmikroskopische Auswertung durch eine erhöhte Anzahl von Zelldetritus und Artefakten erschwert. Ebenso verhielt es sich bei Behandlungszeiten länger als 20 Minuten. Die gewählte Hyperthermiedosis von 44°C über 20 Minuten stellte somit das Optimum für die weiteren Versuche dar.

3.1.2 Ermittlung der Erholungszeit nach 20 Minuten 44°C-Hyperthermie

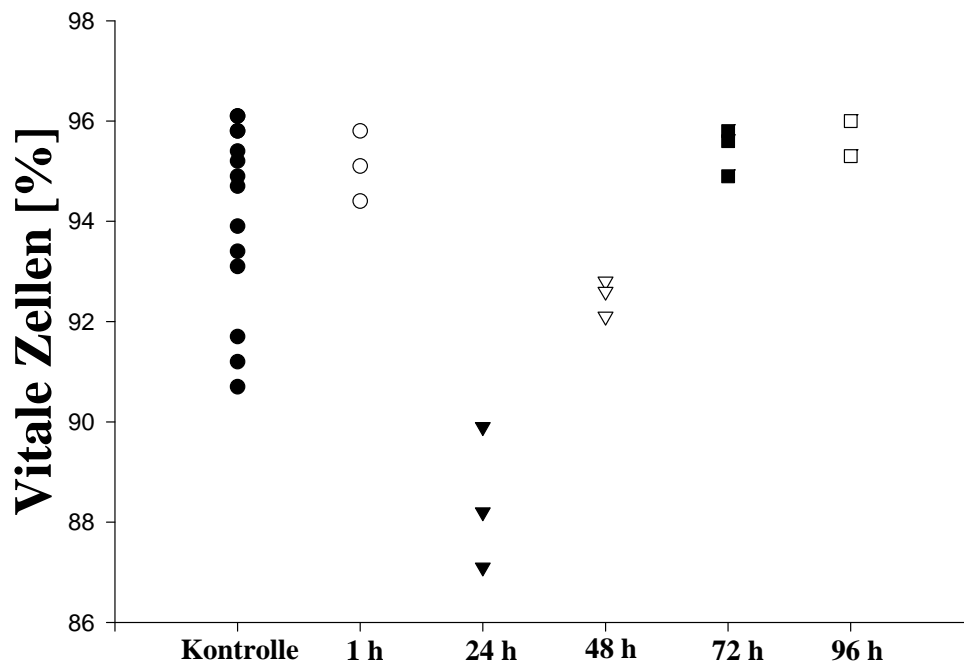


Abb. 7: Ermittlung der Erholungszeit nach 20 Minuten 44°C-Hyperthermie

Die Abbildung zeigt die Vitalität von Kontroll-Organokulturen und Organokulturen nach 20 Minuten Hyperthermie. Die Messungen in den behandelten Gruppen erfolgten nach 1 h, 24 h, 48 h, 72 h oder 96 h.

Die Werte stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der einzelnen Kulturen dar. (n=14 für die Kontrolle, n=3 für die jeweiligen Versuchsgruppen)

Die Abbildung 7 zeigt, dass der Anteil toter Zellen 1 Stunde nach der Hyperthermiebehandlung vergleichbar mit dem der Kontrolle war.

Nach 24 Stunden betrug der Anteil toter Zellen 10-13%,

nach 48 Stunden ca. 7%-8%,

nach 72 und 96 Stunden war kein Unterschied zu den Ergebnissen der Kontrollgruppen mehr messbar.

3.1.3 Ermittlung der Reepithelialisierungszeit nach mechanischer Schädigung

Kulturen, die mit einem Skalpell zerteilt wurden (mechanische Schädigung), zeigten nach 4-5 Tagen ein vollständig abgeschlossenes Epithel auf der gesamten Oberfläche. Die Beurteilung erfolgte anhand der Inversmikroskopie.

3.1.4 Ermittlung der optimalen BrdU-Konzentration im Inkubationsmedium und der optimalen Inkubationsdauer

Unter Verwendung der von der Firma Boehringer (Mannheim) empfohlenen BrdU-Konzentration im Inkubationsmedium und der Inkubationsdauer von 1 h zeigten sich bei den Kontrollgruppen und den mit Hyperthermie behandelten Gruppen ca. 0,0-0,2% der ausgezählten Zellen als eindeutig positiv gefärbt, bei mechanisch geschädigten Gruppen ca. 0,1-0,3% der Zellen.

Bei derart niedrigen Werten führte das Zählen falsch positiv gefärbter Zellen, ebenso wie das Nicht-Zählen falsch negativ gefärbter Zellen, zu starken Schwankungen innerhalb einzelnen Versuchsgruppen. Daher war es unser Ziel, proliferierende Zellen einerseits durch ein erhöhtes Angebot von BrdU im Inkubationsmedium stärker anzufärben, und andererseits durch eine verlängerte Inkubationszeit den gemessenen Anteil proliferierender Zellen zu erhöhen.

Unter Verwendung einer 10fach stärkeren Konzentration des BrdU-Inkubationsmediums und einer auf 24 h verlängerten Inkubationszeit konnte der Anteil der klar als positiv gefärbten Zellen um den Faktor 10 in allen Gruppen erhöht werden.

3.2 Hauptversuche Hyperthermie

3.2.1 Ergebnisse der Vitalität

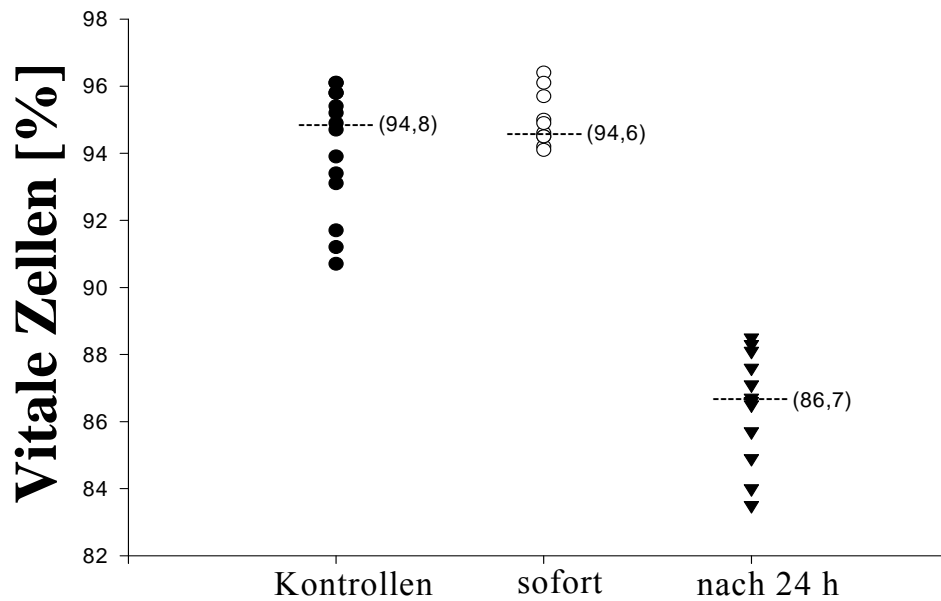


Abb. 8: Prozent der vitalen Zellen in einer Kontrollgruppe und sofort bzw. 24 h nach Hyperthermie bei 44°C

Die Abbildung zeigt die Vitalität in Kontrollgruppen und unmittelbar, bzw. 24 h nach Hyperthermie (44°C, 20 min Behandlungszeit).

Die Werte stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der einzelnen Kulturen dar. Zusätzlich sind die Mediane der Versuchsgruppen angegeben, $p < 0,05$.

Die statistische Auswertung mittels Kruskal-Wallis-Varianzanalyse und paariger post hoc-Vergleiche zeigte **einen signifikanten Abfall der Vitalität ($p < 0,05$) 24 h nach Hyperthermie.**

3.2.2 Ergebnisse der Proliferation

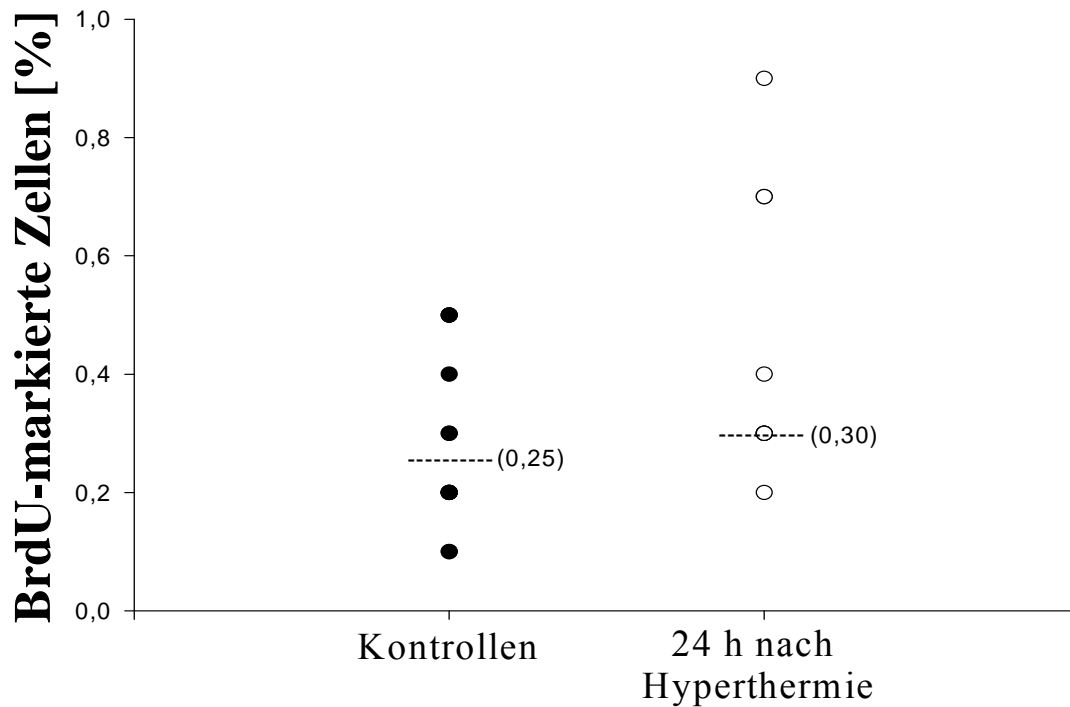


Abb. 9: Proliferation nach Hyperthermie 44°C, 20 Minuten

Die Abbildung zeigt die Proliferation in Organkulturen in den ersten 24 h nach Hyperthermie (44°C, 20 Minuten). Die Messung erfolgte unmittelbar nach Behandlungsende. Die Werte stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der einzelnen Kulturen dar. Zusätzlich sind die Mediane der Versuchsgruppen angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Kruskal Wallis - Varianzanalyse.

Dabei zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Proliferation in den Kontrollgruppen und der Proliferation der mit Hyperthermie behandelten Gruppen sofort nach Beendigung der Behandlung. D.h., in den ersten 24 h nach Hyperthermie kam es zu keinem Anstieg der BrdU-markierten Zellen. Nach Hyperthermie nahm somit der Anteil proliferierender Zellen nicht zu.

3.3 Hauptversuche mechanische Schädigung

3.3.1 Ergebnisse der Vitalität

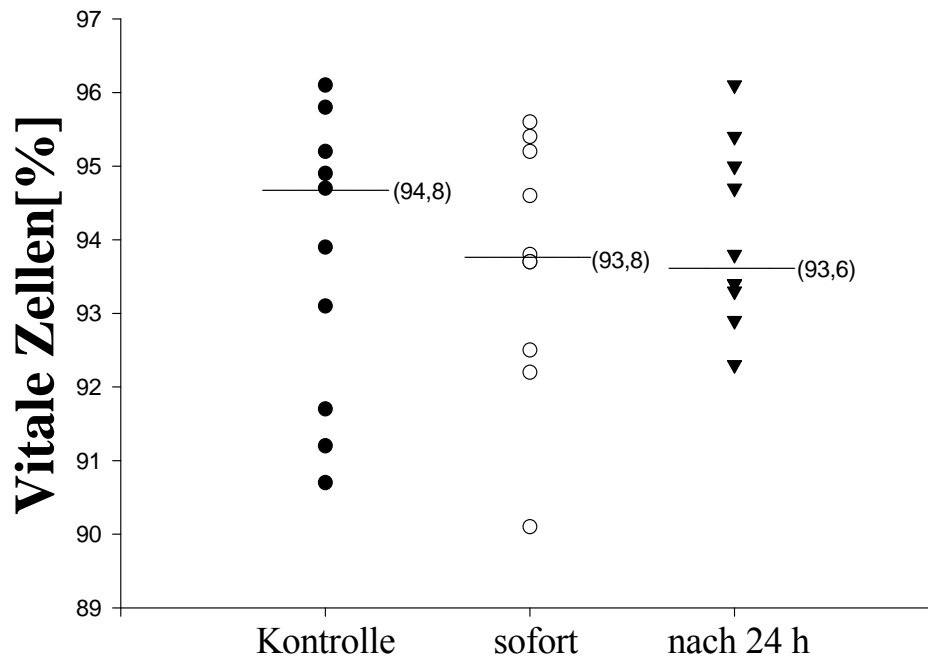


Abb. 10: Vitalität nach mech. Schädigung, sofort und nach 24 h

Die Abbildung zeigt den prozentualen Anteil vitaler Zellen in Organkulturen nach mechanischer Schädigung. Die Messung erfolgte unmittelbar nach der Schädigung und 24 h später. Die Werte stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der einzelnen Kultur dar. Zusätzlich sind die Mediane der Versuchsgruppen angegeben.

Die statistische Auswertung zeigte **keinen signifikanten Unterschied in der Vitalität der Kontrollgruppen und der mechanisch geschädigten Gruppen.**

3.3.2 Ergebnisse der Proliferation

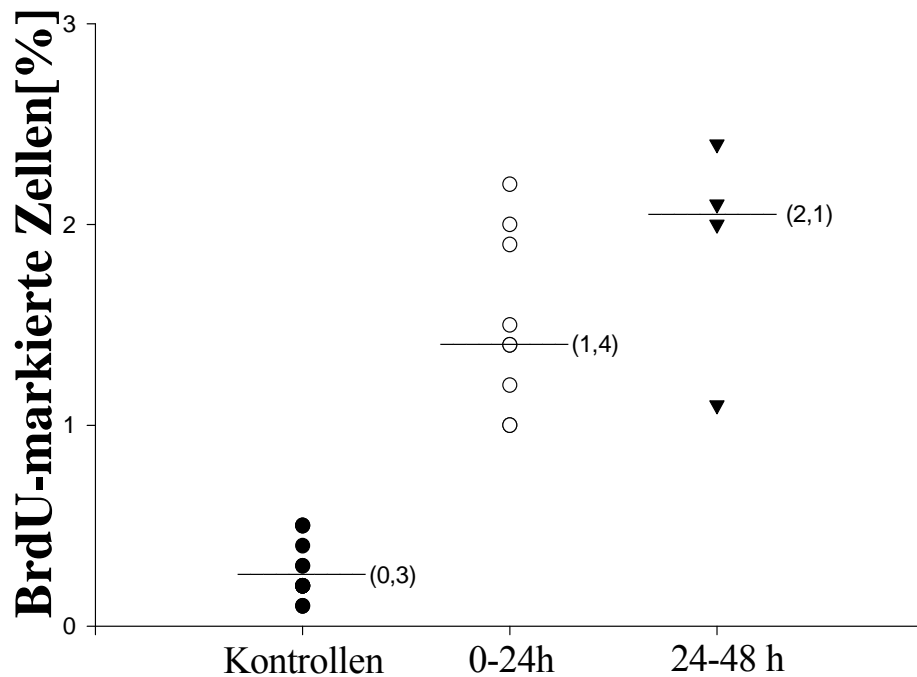


Abb. 11: Proliferation nach mech. Schädigung in verschiedenen Zeiträumen

Die Abbildung zeigt die Proliferation als prozentualer Anteil BrdU-markierter Zellen in Organkulturen nach mechanischer Schädigung. Die Messung erfolgte in den Zeiträumen 0 h bis 24 h und 24 h bis 48 h.

Die Werte stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der einzelnen Kulturen dar. Zusätzlich sind die Mediane der Versuchsgruppen angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse und paariger post hoc-Vergleiche und des paarweisen multiplen Vergleichs nach Dunn.

Dabei zeigte sich ein **signifikanter Anstieg der Proliferation nach mechanischer Schädigung gegenüber der Kontrollgruppe ($p < 0,05$), gemessen anhand der BrdU-markierten Zellen. Der Anteil BrdU-markierter (proliferierender) Zellen in den Intervallen 0 h bis 24 h und 24 h bis 48 h war gleich.**

3.4 Vergleich zwischen Hyperthermie und mechanischer Schädigung

3.4.1 Ergebnisse der Vitalität

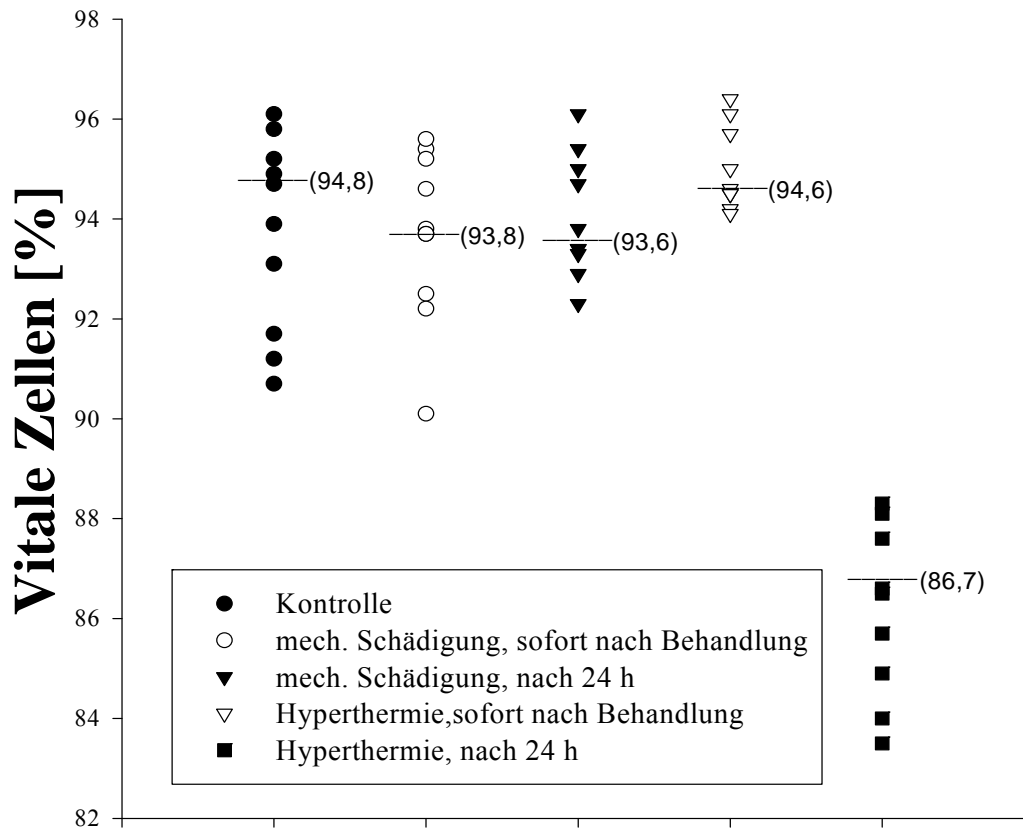


Abb. 12: Vitalität nach mech. Schädigung und Hyperthermie, sofort und 24 h nach der jeweiligen Behandlung

Die Abbildung zeigt die Vitalität von Organkulturen nach Hyperthermie oder mechanischer Schädigung. Die Messung erfolgte unmittelbar nach Behandlungsende oder nach 24 h. Die Werte stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der einzelnen Kulturen dar. Zusätzlich sind die Mediane der Versuchsgruppen angegeben.

Die statistische Auswertung erfolgte mittels der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse und paariger post hoc-Vergleiche.

Nur die Vitalität der mit Hyperthermie behandelten und 24 h nach Behandlungsende gemessenen Gruppe war im Vergleich zu allen anderen Gruppen statistisch signifikant erniedrigt ($p < 0,05$).

3.4.2 Ergebnisse der Proliferation

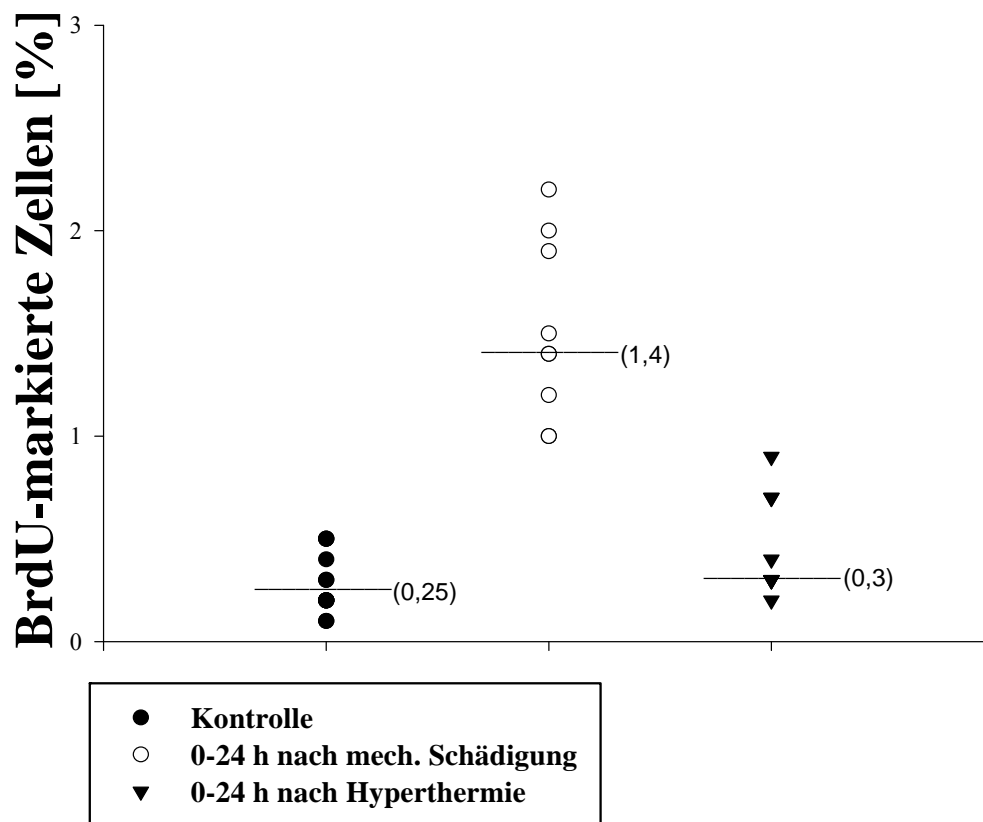


Abb. 13: Proliferation nach mech. Schädigung und Hyperthermie

Die Abbildung zeigt die Proliferation in Organkulturen nach Hyperthermie oder mechanischer Schädigung. Die Kulturen wurden im Zeitraum 0 h bis 24 h nach Behandlungsende mit BrdU inkubiert. Am Ende der 24-stündigen Inkubation erfolgte die Messung. Die Werte stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der einzelnen Kulturen dar. Zusätzlich sind die Mediane der Versuchsgruppen angegeben ($p < 0,001$ bezüglich des Gruppenvergleichs).

Die statistische Auswertung ergab mittels der Kruskal-Wallis-Varianzanalyse einen mit $p < 0,001$ signifikanten Unterschied. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen wurden mittels des paarweisen multiplen Vergleichs nach Dunn ermittelt. **Im Einzelvergleich zeigte die mechanisch geschädigte Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg der Proliferation ($p < 0,05$). Die mit Hyperthermie behandelte Gruppe zeigte gegenüber der Kontrollgruppe keine statistisch signifikant erhöhte Proliferation. Im Vergleich der beiden Behandlungsgruppen zeigt sich die Proliferation der mechanisch geschädigten**

Behandlungsgruppe gegenüber der mit Hyperthermie behandelten Gruppe statistisch signifikant erhöht ($p < 0,05$).

3.5 Ergebnisse des Vergleichs zwischen serumhaltiger und serumfreier Kultivierung

3.5.1 Ergebnisse der Vitalität

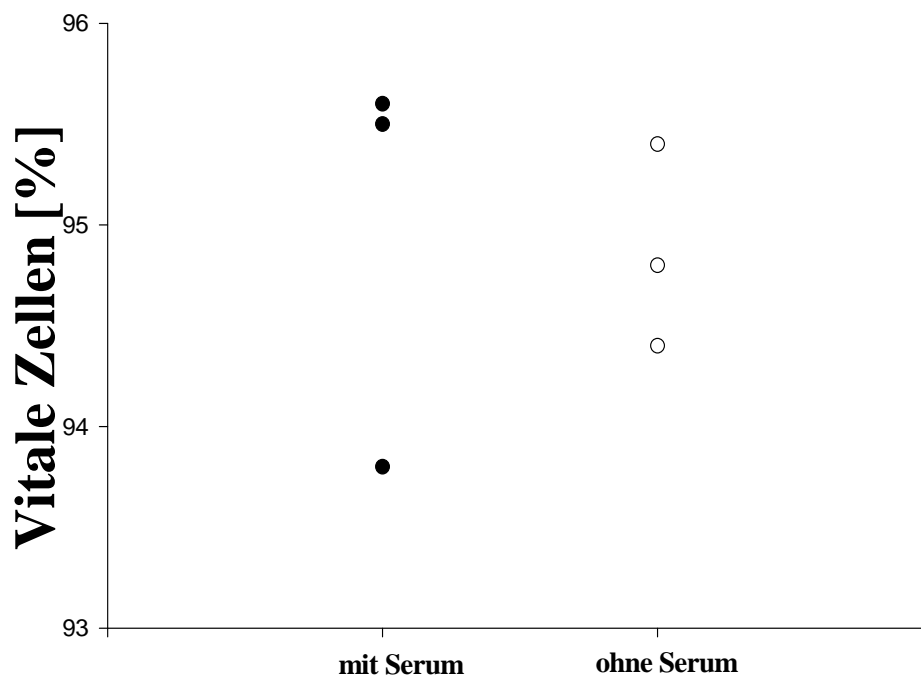


Abb. 14: Vitalität nach serumhaltiger und serumfreier Kultivierung

Die Abbildung zeigt die Vitalität von Organkultur-Pools nach serumhaltiger und serumfreier Inkubation. Jeder Pool bestand aus 12 einzelnen Kulturen und wurde wie unter 2.2.3.1 beschrieben gebildet. Die Messung erfolgte, wie unter 2.5.6 beschrieben, in der Versuchsgruppe (serumfreie Inkubation) nach 48 h serumfreier Inkubation. Die Werte stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der einzelnen Zellpools dar.

Ergebnisse (Anteil der vitalen Zellen in % Median, (Standardfehler des Mittelwertes)):

Ohne Serum: 95,4, (1,26); 94,4, (0,69); 94,8 (1,39)

Mit Serum: 95,6, (0,96); 93,8, (1,75); 95,5, (1,17)

Der Vergleich mittels des Mann-Whitney-Testes ergab **keinen signifikanten Unterschied** in den beiden Behandlungsgruppen.

3.5.2 Ergebnisse der Proliferation

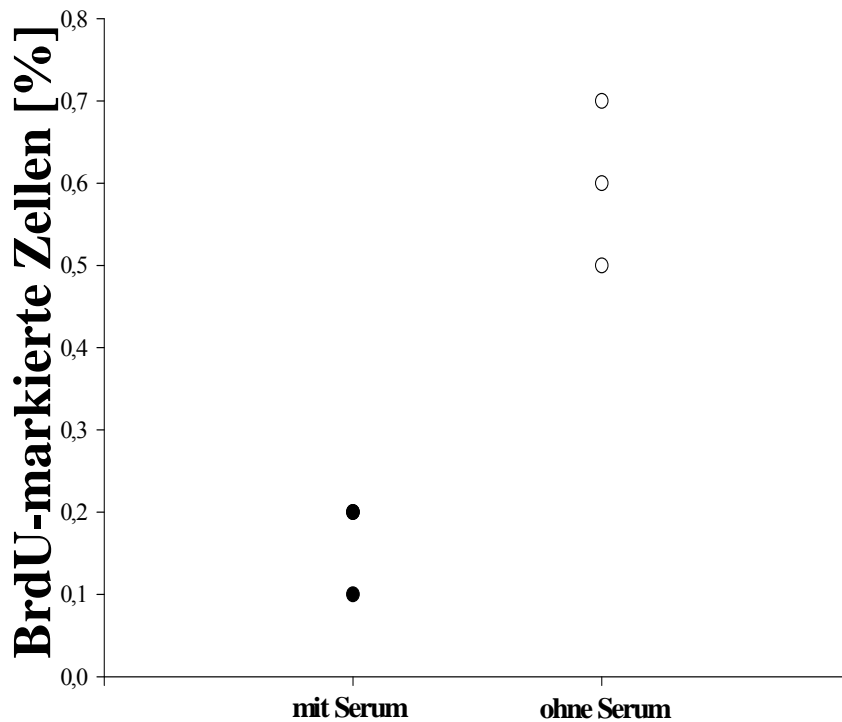


Abb. 15: Proliferation nach serumhaltiger und serumfreier Kultivierung

Die Abbildung zeigt die Proliferation in Organkultur-Pools nach serumhaltiger und serumfreier Inkubation. Die Messung erfolgte in der Versuchsgruppe nach 48 h serumfreier Inkubation. Die Werte stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der einzelnen Zellpools dar.

Ergebnisse (Anteil der proliferierenden Zellen in % Median, (Standardfehler des Mittelwertes)):

Mit Serum: 0,2, (0,42); 0,1, (0,31); 0,2, (0,42)

Ohne Serum: 0,6, (0,51); 0,7, (1,05); 0,5, (0,52)

Der Vergleich der Proliferationsergebnisse mittels des Mann-Whitney-Testes zeigte, dass in den serumfrei kultivierten Organkulturen die Proliferation gegenüber den mit Serum kultivierten Organkulturen signifikant vergrößert war ($p < 0,05$).

3.6 Ergebnisse der Zellzahlbestimmung

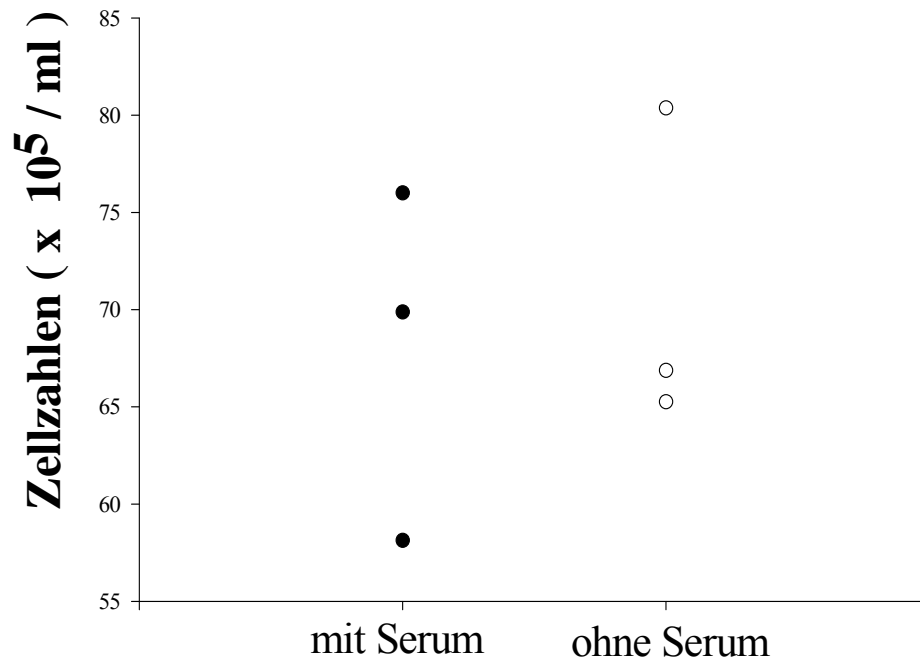


Abb. 16: Zellzahlen nach serumhaltiger und serumfreier Kultivierung

Die Abbildung zeigt die ermittelten Zellzahlen von Organkultur-Pools nach serumhaltiger und serumfreier Inkubation. Die Messung erfolgte in der Versuchsgruppe nach 48 h serumfreier Inkubation. Die aus dem Organverband abgelösten Zellen, d.h. die im Inkubationsmedium frei schwimmenden Zellen, wurden nicht mitgezählt. Die Werte stellen die ermittelten Mittelwerte der Auszählungen der einzelnen Zellpools dar.

Ergebnisse (Anteil der ermittelten Zellzahl als Median, (Standardfehler des Mittelwertes)):

Mit Serum: 58,1, (9,2); 76,0, (7,4); 69,9, (7,2)

Ohne Serum: 66,9, (10,2); 80,4, (11,4); 65,3, (9,6)

Der Vergleich der Zellzahlergebnisse beider Gruppen ergab keinen signifikanten Unterschied.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der Methodik und des Materials

4.1.1 Dreidimensionale Organkulturen

Dreidimensionale Organkulturen sind eine alternative Form der Kultivierung respiratorischen Epithels. S.K. Steinsvåg berichtete 1985 und 1986 über nicht adhäsive stationäre Organkulturen fetaler Rattenhirnhemisphären [45, 47] und 1991 über Organkulturen menschlicher Tonsillenschleimhaut [46]. 1996 folgten Ausführungen über Kulturen menschlicher Bronchialschleimhaut [11].

1993 wurde eine modifizierte Methode zur Kultivierung dreidimensionaler Organkulturen menschlichen respiratorischen Epithels an der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt, der Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelt [14].

Die morphologischen und funktionellen Eigenschaften dieser dreidimensionalen Organkulturen wurden licht- und elektronenmikroskopisch, histologisch und immunhistochemisch dokumentiert [5].

Folgende Ergebnisse liegen vor:

Die dreidimensionalen Organkulturen sind bereits nach 48 h bis 72 h vollkommen epithelialisiert und besitzen eine glatte rund-ovale Form. Die Größe beträgt einen Durchmesser von ca. 1 mm.

Nach 14 Tagen kann man lichtmikroskopisch sehen, dass ein mehrreihiges, teilweise ziliertes, respiratorisches Epithel einem zellarmen und faserreichen bindegewebigen Kern aufsitzt. Dabei entspricht die Organkultur der Morphologie respiratorischen Epithels in vivo: Basalzellen, sezernierende Becherzellen, zilierte und unzilierte Epithelzellen sind ebenso vorhanden wie die Basalmembran.

Der bei ca. 80 % der gewonnenen Organkulturen nachweisbare Zilienschlag erfolgt koordiniert.

Mit zunehmenden Alter, nach ca. 3-4 wöchiger Kultivierung, nimmt der Grad der Zilierung ab, ein langsamer Zellverlust setzt ein und nach ca. 8-10 Wochen degeneriert das respiratorische Epithel zu Plattenepithel.

Die dreidimensionalen Organkulturen [5] besitzen gegenüber Monolayerkulturen [27] folgende Vorteile:

- Die Differenzierung der verschiedenen Epithelzellen bleibt für mindestens 4 Wochen erhalten, in Monolayerkulturen erfolgt hingegen eine rasche Entdifferenzierung.
- Dreidimensionale Organkulturen bieten die dreidimensionale Epithelarchitektur der in vivo-Situation.
- Bei dreidimensional kultivierten Organkulturen interagieren die verschiedenen Epithelzellen untereinander.

In unseren Untersuchungen zeigen wir die experimentelle Stimulierbarkeit und Verwendbarkeit der Organkulturen. Folgende weitere Aspekte wurden untersucht:

- Kryokonservierung ist offenbar ohne Funktionsverlust möglich [17].
- Der Zilienschlag und die mukoziliäre Funktion lassen sich photometrisch gut reproduzierbar messen [19, 21, 23, 28].
- Die Organkulturen können Photosensibilisatoren aufnehmen und in entsprechende Versuchsreihen geführt werden. [15, 16, 22].
- Die Auswirkung ionisierender Strahlung bezüglich Proliferation und Vitalität kann untersucht werden [6, 25].
- Kokulturen zwischen Organkulturen und Tumorzelllinien können gebildet werden [1, 2].

Nachteile der Organkulturen sind:

- Quantitative Messungen werden durch die unterschiedlichen Größen, der unterschiedlichen Zellzahlen und der individuellen Verteilung von verschiedenen Zelltypen der einzelnen Organkulturen erschwert. Daher wurde in unserer Studie versucht, durch die Bildung von Zellpools aus mehreren Organkulturen, diese Unterschiede auszugleichen.
- Es ist nicht bekannt, ob individuelle Eigenschaften des Spenderepithels, zum Beispiel bezüglich degenerativer oder entzündlicher Prozesse, während der Kultivierung bestehen bleiben.

Trotz der aufgeführten Nachteile stellen dreidimensional kultivierte Organkulturen humanen respiratorischen Epithels eine mit geringem Aufwand zu reproduzierende in vitro-Methode dar, welche sich, im Vergleich zu Monolayerkulturen, deutlich näher an in vivo-Bedingungen befindet.

4.1.2 Diskussion der Gewinnung von Nasenschleimhaut

Die Verwendung humaner Nasenschleimhaut brachte den Vorteil der raschen Gewinnung großer Gewebemengen. Die verwendete Nasenschleimhaut wurde ausschließlich von Spendern gewonnen, die sich einer Conchotomia inferior mit oder ohne Septumplastik unterzogen. Die Indikation für diese Operation war in der Regel eine Behinderung der Nasenatmung. Eine behinderte Nasenatmung kann mit entzündlichen Prozessen innerhalb der Mukosa einhergehen, dies tritt jedoch nicht regelhaft auf. Die akute oder die atrophische Rhinitis werden sogar als Kontraindikationen für eine derartige Operation gesehen [48].

Es kann daher angenommen werden, dass der Großteil der verwendeten Nasenschleimhaut von entzündlichen oder degenerativen Prozessen weitgehend frei war.

4.1.3 Vergleich des Kulturverhaltens von Nasen- und Bronchialschleimhaut

Bei der Beurteilung mittels Invers-Phasenkontrastmikroskopie zeigten sich keine offensichtlichen Unterschiede zwischen Organkulturen nasalen oder bronchialen Ursprungs. Der Grad der Zillierung und die Epithelialisierung der Organkulturen erschien gleich zu sein. Auch die Untersuchungsergebnisse von S.K. Steinsvåg, der unter vergleichbaren Kulturbedingungen mit Tonsillen- und Bronchialepithel arbeitete, zeigten keine bedeutende Unterschiede [11, 46]. Ein tiefergehender Vergleich des Kulturverhaltens der beiden Epithelarten wäre jedoch ein interessanter Ansatzpunkt weiterführender Untersuchungen.

4.1.4 Diskussion der Epithelschädigung

Die Zellregeneration im Rahmen von Wundheilungsmechanismen des humanen respiratorischen Epithels wurden bereits von Zahm J.M. et al. [55, 57] an konfluenten Monolayern untersucht. In unseren Versuchsreihen wurde das zu untersuchende Gewebe auf drei verschiedene Weisen geschädigt.

Die mechanische Schädigung durch einmaliges Zerteilen einer Organkultur verursacht einen lokal begrenzten Epitheldefekt, alle umgebenden Zellen bleiben ungeschädigt.

Die Hyperthermie betrifft alle Zellen einer Organkultur, somit entspricht dieses Defektmodell einem generellen Epithelschaden.

Eine serumfreie Kultivierung enthält den Organkulturen Faktoren, die das Wachstum der Zellen beeinflussen, vor [12]. Diese biochemische Schädigung betrifft ebenso alle Zellen der geschädigten Organkultur.

Jedes dieser Schädigungsverfahren verursacht einen unterschiedlichen Epithelschaden und setzt damit unterschiedliche Voraussetzungen für die Regeneration.

Zur Untersuchung der Regenerierungsvorgänge bieten die dreidimensionalen Organkulturen folgende Vorteile:

- Das geschädigte Epithel liegt in der gleichen Zellarchitektur vor wie in vivo und besitzt eine Basalmembran.
- Geschädigte Zellen sind von differenzierten zur Heilung befähigten Zellen einschließlich der Basalzellen umgeben.
- Die Fläche eines künstlichen Epitheldefektes besteht nicht aus einer künstlichen Oberfläche sondern aus humanem Bindegewebe.

4.1.5 Diskussion der Vitalitätsmessung

Vitalitätsmessungen mit Ethidiumbromid und Acridinorange sind anerkannt und verbreitet [2, 20, 31].

Es handelt sich dabei um einen Membrantest, das heißt, dass nur Zellen mit einem Membrandefekt als letal dargestellt werden.

Prinzipiell bestand das Problem, dass nicht alle Zellen bei den Disaggregationsvorgängen mittels Kollagenase und Protease aus dem Zellverband gelöst werden

konnten. Außerdem wurden Zellen, die sich während der Inkubationsvorgänge aus dem Zellverband gelöst hatten, nicht erfasst. Zusätzlich muss auch eine Schädigung der Zellen durch die Separations- und Waschvorgänge selbst angenommen werden.

Die Ergebnisse der vitalen Zellen bei den Kontrollgruppen lagen aber immer über 90 %, und ein methodischer Fehler traf alle Versuchsgruppen im gleichen Ausmaß. Der Prozentsatz von 10 % nichtvitaler Zellen wurde möglicherweise durch die Separations- und Waschvorgänge hervorgerufen.

4.1.6 Diskussion der Messung der Proliferation

Die Messung der Proliferation mit Hilfe der Inkorporation von BrdU als Thymidinanalogon in neusynthetisierte DNA, ist eine anerkannte und etablierte Methode [37, 41]. Auf BrdU-Inkorporation basierende Methoden markieren alle in die S-Phase eingetretenen Zellen, welche durch verschiedene Antikörper-vermittelte Färbemethoden lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden können.

4.1.6.1 Ermittlung der optimalen BrdU-Konzentration im Inkubationsmedium und der Inkubationszeit

Die Proliferation wurde mit Hilfe des 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit II der Firma Boehringer Mannheim Biochemica gemessen. Der Hersteller empfiehlt in seiner Produktbeschreibung eine Endkonzentration von 10 μmol BrdU pro Liter im Inkubationsmedium und eine Inkubationszeit von 1 Stunde. Unter diesen Bedingungen ließen sich jedoch pro gefärbten Präparat nur sehr wenige proliferierende Zellen erfassen. Die Qualität der Auswertung hing daher im großen Ausmaß von einer gleichmäßigen Verteilung der positiv gefärbten Zellen ab, und das Übersehen einzelner positiv gefärbter Zellen, ebenso wie das Zählen falsch positiv gefärbter Zellen, konnte das Endergebnis leicht verfälschen. Daher wurde versucht, die Anzahl der erfassbaren proliferierenden Zellen zu erhöhen. Unter Verwendung einer 10fach erhöhten Konzentration von BrdU im Inkubationsmedium und einer verlängerten Inkubationszeit von 24 h wurde dieses Ziel erreicht.

Die Konzentration wurde erhöht, um das Bild der Färbung zu verstärken. Die Inkubationszeit wurde verlängert, um die Zahl der positiv gefärbten Zellen zu erhöhen. Die Erhöhung der Inkubationszeit auf 24 h führte jedoch dazu, dass die erzielten Werte nicht als absolut für einen festen Zeitpunkt gesehen werden konnten. Vielmehr stellten die ermittelten Werte eine Kumulation aller Zellen dar, die innerhalb der 24 stündlichen Inkubationszeit in den Zellteilungs-Zyklus eingetreten waren.

4.1.6.2 Auswertung der Proliferationstests

Die lichtmikroskopische Auswertung war von einigen Schwierigkeiten begleitet. Während die Abgrenzung negativer, d.h. nicht-proliferierender Zellen, gegenüber positiver Zellen auf dem Objektträger keinerlei Probleme verursachte, war es weitaus schwieriger, positiv gefärbte Zellen von falsch-positiv gefärbten Zellen zu unterscheiden. Aufgrund von gefärbten Immunpräzipitaten im Zellinneren oder Verunreinigungen im gefärbten Präparat, die gefärbte Zellkerne vortäuschten, obwohl bei genauerer Betrachtung keine als Zelle zu identifizierende Struktur vorlag, war es notwendig, ein Beurteilungsschema zu entwickeln, das strikt eingehalten werden musste. Um Artefakte besser erkennen zu können, wurde an zwei Kulturen, die zuvor nicht mit BrdU inkubiert wurden, die gleiche immunhistochemische Färbung durchgeführt, wie an den Kulturen, die mit BrdU inkubiert worden waren. Bei der Auswertung dieser Präparate zeigten sich einige Zellen als scheinbar positiv gefärbt, die nun aber mit Sicherheit als Artefakte bezeichnet werden konnten. Ebenso wurden Färbungen an Tumorzellen, die als Monolayer kultiviert wurden, unternommen, um eindeutige Positiv-Kontrollen zu erhalten. Das Bild der Positiv-Kontrollen aus gefärbten Tumorzellen unterschied sich vom Aspekt geringfügig von den positiv gefärbten Zellen der dreidimensional kultivierten Schleimhautkulturen. Die Ursache könnte nun darin liegen, dass die Zellen in unterschiedlichen Formationen (Monolayer) während der BrdU-Inkubation vorlagen. Zudem mussten die Zellen der Miniorgan-Kulturen nach ihrer BrdU-Inkubation zunächst enzymatisch aus dem Zellverband gelöst werden, bevor die immunhistochemische Färbung durchgeführt werden konnte. Dafür spricht die Beobachtung, dass die Qualität der Färbung im großen Maß davon abhing, wie schonend die Zellen aus dem Epithelverband gelöst wurden. Um die Beurteilung

positiv gefärbter Zellen so objektiv wie möglich durchzuführen, wurde folgendes Beurteilungsprinzip festgelegt: Eine positiv gefärbte Zelle musste

- eindeutige, lichtmikroskopisch erfassbare morphologische Kriterien einer Zelle aufweisen, d.h. sie musste einen erkennbaren Kern und eine eindeutig zu identifizierende Zellmembran besitzen.
- den zu erwartenden Größenordnungen entsprechen.
- einen deutlich gefärbten Kern in einem weitgehend ungefärbten Zytoplasma zeigen.

Unter Beachtung dieser Kriterien war es möglich, die Ergebnisse der Auszählungen frei von größeren Schwankungen innerhalb einer Untersuchungsgruppe zu halten (siehe Abb.3).

Es bleibt jedoch zu prüfen, ob die auf diese Weise gewonnenen Ergebnisse sich durch andere Nachweismethoden bestätigen lassen.

4.1.7 Diskussion der Zellpool-Bildung

Alle Organkulturen innerhalb einer Versuchsreihe stammten von einem Spender. Dadurch konnte ausgeschlossen werden, dass Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen aufgrund interindividueller Eigenschaften des Spenderepithels auftraten.

Die Aufteilung der einzelnen Organkulturen in die einzelnen Pools erfolgte unter der Voraussetzung, dass die Organkulturen in den verschiedenen Pools einander hinsichtlich der Qualität und der Größe weitgehendst gleicheten. Systematische Fehler aufgrund der Zusammensetzung der einzelnen Pools wurden durch die zufällige Zuordnung für die jeweilige Untersuchung ausgeglichen. Durch die Bildung der Pools konnten Unterschiede zwischen den einzelnen Organkulturen eliminiert werden.

4.1.8 Diskussion der Messung von Zellzahlen

Die Quantifizierung von Zellsuspensionen mittels einer Neubauerzählkammer ist ein allgemein bekanntes und etabliertes Verfahren. Die Auszählung der Zellen unter einem Phasenkontrastmikroskop ist unkompliziert, wurde jedoch durch Verschmutzungen der Zellsuspensionen erschwert. Die Hauptursache dieser Verschmutzungen lag in den Faserresten des bindegewebigen Kernes der Organkulturen. Dieses Verunreinigungsproblem konnte durch gründliches Waschen der Organkulturen, ausreichendes Zentrifugieren der lysierten Zellkultur und vorsichtiges Pipetieren des Zellüberstandes weitgehend minimiert werden.

Anhand der Zellkonzentrationen im Zellpool konnte man die durchschnittliche Zellzahl pro Organkultur errechnen. Dies konnte jedoch nur unter der Voraussetzung geschehen, dass bei den einzelnen Arbeitsschritten von der Entnahme der Organkultur aus dem Inkubationsmedium bis zu dem Zeitpunkt der Auszählung in der Neubauerzählkammer zu keinem relevanten Zellverlust kam. Es war jedoch nicht möglich, alle Zellen vom bindegewebigen Kern zu separieren, zudem kam es während des Lysevorganges, der Zentrifugierung und der Waschvorgänge zu einem zusätzlichen Zellverlust.

Die errechneten, absoluten Ergebnisse spielten jedoch nur eine untergeordnete Rolle für den Vergleich zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, denn dieser nicht gänzlich zu vermeidende Zellschwund betraf als methodischer Fehler alle Versuchsgruppen im gleichen Ausmaß.

Ein weiteres Problem lag in dem variierenden Volumenverlust des Suspensionsmediums, der bei der Entfernung des bindegewebigen Restes aus der Zellsuspension auftrat.

4.1.9 Ermittlung der Reepithelialisierungszeit nach mechanischer Schädigung

Die Ermittlung der Reepithelialisierungszeit wurde durch eine visuelle Kontrolle zerteilter Kulturen unter einem Lichtmikroskop durchgeführt. Die Kontrolle der Schnittkanten erfolgte in Abständen von 24 h, d.h. die Kontrollzeitpunkte lagen relativ weit auseinander. Da die Schnittkanten ausschließlich optisch beurteilt wurden, kann man also nur von einer grob geschätzten Reepithelialisierungszeit sprechen. Für unsere

Zwecke war es jedoch nicht nötig, eine objektivere Methodik, wie eine spezielle Anfärbung des Epithels und engere Zeiträume zwischen den Untersuchungszeitpunkten, zu verwenden, da es für uns nur wichtig war abzuschätzen, wann die mechanisch geschädigten Kulturen in die jeweiligen Versuche gesetzt werden mussten.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

Vergleiche von Literaturangaben bezüglich der Proliferationsrate respiratorischen Epithels in vivo mit den Proliferationsraten unserer unbehandelten Kontrollgruppen zeigten, dass der Anteil proliferierender Zellen unter steady state-Bedingungen nach 24 h BrdU-Inkubation sehr niedrig war. Ayers berichtete über eine durchschnittliche Growth fraction (GF), also dem in Zellteilung befindlichen Anteil des untersuchten Hamsterbronchialepithels, von 1,3 %-3,9 % [3]. In einer anderen Studie an humanem Bronchialepithel gesunder Probanden berichtete Leigh von einer Proliferationsrate unter 0,2 % [38]. Dieser Wert wurde an Paraffin-Schnitten humanen bronchialen Gewebes mittels einer PC10-Immunfärbung ermittelt. Keenan fand Mitoseraten von ca. 0,19% in histologischen Schnittpräparaten von Hamstertrachealepithel [32]. In unseren Studien wurden, nach einer 24 h währender BrdU-Inkubation kumulative Werte von 0,2 % bis 0,65 % nachgewiesen. Diese Werte entsprechen den an histologischen Paraffinschnitten humanen respiratorischen Epithels ermittelten Werten Leighs und Keenans.

4.2.1 Wirkung von Hyperthermie auf die Vitalität und Proliferation dreidimensionaler Organkulturen

Nach einer Behandlung der dreidimensionalen Organkulturen mit 44°C Hyperthermie für 20 Minuten schien die Vitalität sofort im Anschluss an die Behandlung nicht vermindert zu sein. Wurde jedoch die Messung 24 h später durchgeführt, war ein signifikanter Abfall der Vitalität messbar. Dies lässt vermuten, dass die geschädigten Zellen nicht unmittelbar während oder nach der Behandlung zugrunde gingen, sondern dass die Schädigung erst im Verlauf einiger Zeit danach ihre vollständige, letale Wirkung entfaltete. Man kann annehmen, dass die zellulären Reparaturmechanismen entweder versagten oder nicht ausreichten, den zugefügten Schaden zu kompensieren,

um das Überleben der Zelle zu sichern. Ebenso ist es möglich, dass anstelle von Reparaturen die Apoptose eingeleitet wurde.

Wählt man den Untersuchungszeitpunkt noch später, in unseren Versuchen nach 48 h, 72 h sowie nach 96 h, dann ließ sich zeigen, dass sich die behandelten Organkulturen in der Vitalität nicht mehr von den Kontrollgruppen unterschieden. Daraus kann man schließen, dass sich die Organkulturen von dem durch Hyperthermie induzierten Schaden erholten.

In einer Arbeit von Y. Iwagami et al. [26] wurden ultrastrukturelle Veränderungen humaner Zellen nach Hyperthermie an jeweils zwei Tumorzelllinien und Kontrollzelllinien untersucht. Dabei kamen die Autoren zu dem Ergebnis, dass die Tumorzelllinien sensibler auf Hyperthermie reagierten, wobei eine Begründung dafür nicht gegeben werden konnte. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass Veränderungen in der Membranstruktur als Frühereignisse nach Hyperthermie auftreten. Besonders zeigten sich die Mitochondrien, gefolgt vom endoplasmatischem Reticulum, als durch die Hyperthermie geschädigt. Als sogenannte Spätschäden traten Veränderungen im Nucleoplasma, an der nukleären (inneren) Membran und am intranucleärem Chromatin auf. Es konnte gezeigt werden, dass die frühen Veränderungen an den Mitochondrien sich vorübergehend zurückbildeten, dann aber in der Spätphase erneut mit letaler Wirkung, wiederauftraten.

Die Vitalität einer Organkultur wird jedoch durch den Anteil toter Zellen zu lebenden Zellen bestimmt. Die Vitalitätsbestimmung erfolgte zudem durch einen Membrantest, das heißt, nur Zellen mit einer zerstörten Zellmembran konnten als tote Zellen erfasst werden. Eine Aussage über eine beschleunigte Apoptose oder über stattfindende Reparaturmechanismen konnte somit nicht getroffen werden. Weiterhin wurden nur Zellen innerhalb des histologischen Zellverbandes erfasst. Abgeschilferte Zellen und Zelldetritus wurden nicht erfasst und konnten daher nicht den Anteil der toten Zellen beeinflussen.

Während die Vitalität nach 24 h messbar vermindert war, zeigte sich die Proliferation im Zeitraum der ersten 24 h nicht erhöht. Dies lässt auf einen funktionellen Schaden der überlebenden Zellen schließen. Diese Annahme wird unterstützt durch Untersuchungen von Zolzer, Devi und Streffer an humanen Melanom-Zellkulturen. Eine Stunde Hyperthermie bei 43°C hatte einen verspäteten Eintritt der S-Phase und eine bis auf 30 h verlängerte Dauer der S-Phase zur Folge [59].

Ob aber die Proliferation zu einem späteren Zeitpunkt ansteigen würde, müsste in weiteren Versuchen noch untersucht werden.

Der antiproliferative Effekt von Hyperthermie wurde im Jahr 2002 auch von der Arbeitsgruppe von K. Orihara et al. [40] an glatter Gefäßmuskulatur und Gefäßendothel untersucht. Nach 2 h 43°C Hyperthermie kam es zu einer deutlichen Verzögerung von 24 h in der Zellzyklusprogression der glatten Gefäßmuskelzellen. Die Verzögerung trat wiederum im Übergang von der S-Phase zur G₂/M-Phase auf. Weitere 24 h später zeigte sich dann, vergleichbar mit dem um 24 h verzögertem Vitalitätsverlust in unseren Versuchen, ein verzögerter Abfall in der Vitalität mit einem Anteil von ca. 19 % letaler Zellen. Auch diese Ergebnisse korrelieren gut mit unseren Resultaten. K. Orihara konnte diesen Effekt jedoch weder an Gefäßendothelzellen noch an im Ruhezustand befindlichen Gefäßmuskelzellen reproduzieren.

4.2.2 Wirkung der mechanischen Schädigung auf die Vitalität und Proliferation dreidimensionaler Organkulturen

Durchtrennte man eine dreidimensionale Organkultur mit einem scharfen Skalpell, zeigte sich die Vitalität der gesamten Organkultur weder sofort im Anschluss noch nach 24 h vermindert. Dadurch wird die Annahme bestätigt, dass es sich dabei um eine lokal begrenzte Schädigung handelte. Demgegenüber spiegelte sich der Wundheilungsmechanismus in einer signifikant gesteigerten Proliferation deutlich wieder. Die Proliferation zeigte sich dabei nicht nur unmittelbar im Anschluss erhöht, sondern blieb auch im Zeitraum von 24 h bis 48 h nach der mechanischen Schädigung auf einem gegenüber der Kontrollgruppe erhöhtem Niveau. Es ist davon auszugehen, dass die Proliferation erst wieder bei einer abnehmenden Wundfläche bis zur vollständigen Reepithelialisierung nach ca. 4-5 Tagen auf den Basiswert im steady state-Zustand zurückkehrt [32].

Wundheilungsmechanismen des respiratorischen Epithels wurden auch von Arbeitsgruppen unter der Leitung von E. Puchelle et al. an Monolayerkulturen untersucht [55, 56, 57]. Als hauptsächliche Mechanismen der Wundheilung wurden dort die Proliferation und die Migration genannt. Die Proliferation war dabei hauptsächlich in den wundrandnahen Zellen erhöht. Dies konnte in histologischen Untersuchungen

von mechanisch geschädigten und mit BrdU inkubierten Organkulturen bestätigt werden [4,5].

4.2.3 Vergleich zwischen Hyperthermie und mechanischer Schädigung bezüglich Vitalität und Proliferation dreidimensionaler Organkulturen

Die Vitalität der dreidimensionalen Organkulturen zeigte sich nach mechanischer Schädigung nicht vermindert, weder sofort im Anschluss an das Zerteilen noch 24 h später.

Nach Hyperthermie zeigte sich, direkt im Anschluss an die Behandlung, die Vitalität ebenso als nicht vermindert. Erfasste man jedoch die Vitalität nach Ablauf von 24 h, dann zeigte sich ein signifikanter Abfall der vitalen Zellen.

Dies zeigte, dass bei der mechanischen Schädigung nur die Zellen, welche beim Zerteilen der Organkulturen im unmittelbaren Bereich der Schnittführung liegen, zugrunde gingen. Die Hyperthermie schädigte jedoch alle Zellen auf der gesamten Oberfläche der dreidimensionalen Organkultur. Dabei führte die Hyperthermie jedoch nicht zu einem unmittelbaren Absterben der vital geschädigten Zellen, sondern leitete den Zelltod erst im Laufe der folgenden Stunden ein [26]. Da die Vitalitätsmessung in erster Linie ein Membrantest ist, ergab diese Untersuchungsmethode, dass die letal geschädigten Zellen nicht mehr in der Lage waren die Membranintegrität zu erhalten. Es kann jedoch keine Aussage getroffen werden, welcher zelluläre Reparaturmechanismus versagte. Da aber auch ein Regenerationsprozess, sichtbar durch eine erhöhte Proliferation, in den mit Hyperthermie behandelten Organkulturen ausblieb, scheint es sich um eine generalisierte Schädigung zu handeln. Zumindest erschienen die Fähigkeit der Membranstabilisierung und -reparatur und die Fähigkeit zur Zellteilung gestört bzw. verzögert zu sein [59]. Wenn auch die Proliferation der mit Hyperthermie geschädigten Gruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen nicht signifikant erhöht war, so schien doch die Proliferation leicht gesteigert zu sein. Es wäre ein mögliches Ziel, dies mit höheren Fallzahlen genauer zu untersuchen.

4.2.4 Vergleich zwischen serumhaltiger und serumfreier Kultivierung bezüglich Vitalität, Proliferation und Zellzahl dreidimensionaler Organkulturen

Alle Untersuchungen bezüglich dieser Frage wurden an Zellpools durchgeführt.

Im serumhaltigen Medium behält das respiratorische Epithel dreidimensionaler Organkulturen die morphologische Integrität des normalen Epithels *in vivo*. In serumfreiem Medium treten nach ca. 48 h einzelne Zellen aus dem Epithelverband aus.

S.J. Froud et al. beschrieben 1999 in einem Artikel die Vor- und Nachteile serumfreier Medien für die Zellkultur [12]. Sie nannten darin für serumfreie Medien mehrere Vorteile: Sie sind billiger, weniger mit infektiösen Partikeln (z.B. Viren) und störenden Proteinkontaminationen belastet, und ihre Zusammensetzung ist exakter zu definieren.

Nachteilig ist, dass serumfreie Medien oftmals wieder mit spezifischen Wachstumsfaktoren, Enzymen und Hormonen supplementiert werden müssen. Es gibt viele Beispiele in der Literatur, dass bestimmte Zelllinien in serumfreier Kultur eine verminderte Produktivität und Stabilität aufweisen.

Neben Froud et al. benannten auch Wessmann und Levings [53] die Hauptfunktionen des Serums im Kulturmedium als:

- Wachstumsregulation (Hormone, Insulin, verschiedene Wachstumsfaktoren)
- pH-Pufferung (Phosphate, Albumin)
- Bereitstellung von Transport- und Bindungsproteinen (Albumin, Globulin, Transferrin)
- Bereitstellung von Schutzfaktoren (z.B. schwermetallbindende Moleküle und Radikalfänger)
- Bereitstellung von gelösten Nahrungsstoffen (Nucleoside, Pyruvate, Aminosäuren)
- Bereitstellung ungelöster Nahrungsstoffe (Fettsäuren, Lipide, Cholesterol)
- Bereitstellung von Mineralien und Spurenelementen (Sulphate, Phosphate, Zink, Selen, Mangan, Cobalt, Kupfer)
- Bereitstellung von Vitamine und deren Co-Faktoren (Riboflavin, Pyridoxin)
- Bereitstellung von Protease-Inhibitoren (α -1-Antitrypsin)
- Bereitstellung von Befestigungsstoffen (Fibronectin, Laminin)

Unser Ziel war deswegen die Erfassung der Vitalität und Proliferation von dreidimensionalen Organkulturen in Abhängigkeit von der Zugabe von Serum im Medium.

Die Organkulturen wurden für 21 Tage in serumhaltigem Medium kultiviert. Nach Randomisierung wurden sie für 48 h mit oder ohne Serum weiter kultiviert, anschließend für 24 h mit 5-Bromo-2-Desoxy-Uridin als Proliferationsmarker serumhaltig oder serumfrei inkubiert.

Unter serumfreien Kulturbedingungen ließ sich kein Abfall der Vitalität messen, während sich jedoch ein signifikanter Anstieg der Proliferation nachweisen ließ.

Dieses Ergebnis bezieht sich aber ausschließlich auf die serumfrei Kultivierung humaner respiratorischer Organkulturen. Bei der Recherche in der diesbezüglichen Fachliteratur ließen sich viele unterschiedliche Ergebnisse bezüglich Proliferation und Vitalität bei serumfreier Kultivierung finden, je nachdem welche Gewebearten untersucht wurden.

So stehen unsere Ergebnisse zu den Experimenten von Creemers et al. [9] zur Proliferation und Vitalität von Typ A-Spermatogonien der Maus im Widerspruch: Isolierte Typ A-Spermatogonien der Maus wurden für 7 Tage serumfrei kultiviert. Am Tag 1, 3 und 7 erfolgten die Messungen der Vitalität und der Proliferation. Die Vitalität sank nach 7 Tagen auf 10 % des Ausgangswertes. Die Zugabe von FCS (fetal calf serum) hatte dabei keinerlei Einfluss auf die Vitalität, die Proliferation zeigte sich jedoch deutlich gesteigert.

Unsere Ergebnisse werden jedoch durch Untersuchungen einer chinesischen Arbeitsgruppe unter Zhao et al. [58] aus dem Jahr 2004 gestützt. Zhaos Ziel war es, eine geeignete, d.h. rasche und erfolgversprechende Zellkulturform für humanes Gingivaepithel zu finden. Unter der Vorkenntnis, dass serumhaltiges Kulturmedium einen positiven Einfluss auf die Adhäsion gingivalen Epithels und die Migration gingivaler Epithelzellen vom Rande gingivaler Epithelblöcke besitzt, kultivierte er die gingivalen Epithelzellen zunächst 7-10 Tage mit serumhaltigen Kulturmedium und setzte dann die Kultivierung serumfrei fort, um die Mitoserate, die Proliferation und die Migration der aus dem Gewebeverband ausgetretenen Epithelzellen zu beschleunigen. Dabei kam er zu dem Ergebnis, dass die gingivalen Epithelzellen während einer serumfreien Kultivierung eine höhere Migrations- und Proliferationsaktivität zeigten. Eine mögliche Schlussfolgerung wäre, dass die gesteigerte Proliferation im serumfreien Medium kompensatorisch zum Ausgleich des Zellverlustes bei

verminderter Zelladhärenz oder erhöhter Migration auftritt. Ebenso könnte auch der Verlust der Kontaktinhibition ursächlich für eine gesteigerte Proliferation sein.

Weiter wäre jedoch auch denkbar, dass der Anteil proliferierender Zellen in dreidimensionalen Organkulturen nach serumfreier Kultivierung durch die Abschilferung nicht-prolierender Zellen nur relativ erhöht ist.

Um diesen Sachverhalt genauer differenzieren zu können, gingen wir der Frage nach, ob sich die Zellzahlen der Organkulturen in Abhängigkeit von der Zugabe von Serum zum Inkubationsmedium unterscheiden. Da diese Frage aufgrund der individuellen Größenverhältnisse nicht an einzelnen Kulturen zu lösen war, wurden sogenannte Zellpools aus bis zu 12 einzelnen Organkulturen gebildet, deren Zellzahl ermittelt und die durchschnittliche Zellzahl der Einzelkulturen errechnet. Auf diese Weise versuchten wir die einzelnen Größenunterschiede der Organkulturen auszugleichen.

Da die Zellzahlen sich jedoch von der Anwesenheit des Serums im Inkubationsmedium unabhängig zeigen, kann man vermuten, dass zur Kompensation der aus dem Epithelverband ausscheidenden Zellen die Proliferation ansteigt. Diese Annahme, dass unter serumfreier Kultivierung die Proliferationsaktivität steigt, wird in zahlreichen Publikationen gestützt [39, 58].

Da aber in unseren Versuchsreihen nur jeweils drei Zellpools pro Versuchsgruppe ausgewertet wurden, konnten nur große Differenzen der Zellzahlen erfasst werden. Um geringere Differenzen messen zu können, müssten die Fallzahlen deutlich gesteigert werden.

5 Zusammenfassung

Das respiratorische Epithel der dreidimensionalen Organkulturen ist morphologisch dem respiratorischen Epithel in vivo sehr ähnlich, besitzt eine Basalmembran und sitzt einer bindegewebigen Matrix auf. Damit stellen dreidimensionale Organkulturen eine in vivo-nahe Kulturform dar und sind unter diesem Aspekt herkömmlichen Monolayer-Kulturen überlegen.

Es war unser Ziel, dreidimensionale Organkulturen des humanen respiratorischen Epithels als geeignetes Schleimhautmodell für in vitro-Untersuchungen zu etablieren. In dieser Arbeit sollte das Verhalten der Kulturen auf thermische, mechanische und biochemische Reize untersucht werden.

In unseren Untersuchungen kommen wir zu folgenden Ergebnissen:

1. Die Vitalität der unbehandelten Organkulturen lag stets über 90 %.
Wir führen den Anteil von bis zu 10 % toter Zellen hauptsächlich auf die zur Messung notwendigen Wasch- und Separationsvorgänge zurück.
Die Proliferation war bei unbehandelten Organkulturen niedrig, die Ergebnisse korrelieren gut mit Untersuchungsergebnissen anderer Arbeitsgruppen.
2. Eine Verminderung der Vitalität und ein Ansteigen der Proliferation ließen sich in dreidimensionalen Organkulturen messen und reproduzieren.
3. Die Vitalität sank nach Behandlung mit Hyperthermie. Bei einer Hyperthermiedosis von 44°C, 20 Minuten blieb die Vitalität zunächst unvermindert, sank aber nach 24 h signifikant. Bei höheren Dosen sank die Vitalität sofort.
Mechanische Schädigung und serumfreie Inkubation hatten keinen Einfluss auf die Vitalität.
4. Die Proliferation blieb nach Hyperthermie auf dem für in vivo-Bedingungen charakteristisch niedrigen Niveau.

Die Proliferation stieg signifikant nach mechanischer Schädigung und nach serumfreier Inkubation.

Das Epithel der dreidimensionalen Organkulturen besitzt somit, wie auch in vivo nachgewiesen, die Fähigkeit, auf schädliche Einflüsse mit Regenerationsprozessen zu reagieren. Diese Regenerationsvorgänge sind einfach zu quantifizieren und die Methoden sind mit geringem Aufwand reproduzierbar anzuwenden.

Dreidimensionale Organkulturen bieten aufgrund der nahen in vivo-Bedingungen deutliche Vorteile gegenüber herkömmlichen Kultursystemen. Einflüsse verschiedenster Substanzen können in vitro an lebendem humanem Gewebe getestet werden. Diese in vivo-nahen Bedingungen konnten bisher nicht in Monolayer-Kulturen erreicht werden. Es zeigen sich auch Vorteile gegenüber Tierversuchen. Bis jetzt kann allerdings in unserem System noch nicht die Durchblutung adäquat nachgestellt werden. Durch die Möglichkeit aus gesunden Organkulturen mit Tumorzelllinien Kokulturen zu bilden, eröffnet sich ein weites Feld für die onkologische Forschung.

6 Literaturverzeichnis

1. Al-Batran.S., Astner ST, Supthut M, Gamarra F., Brueckner K, Welsch U., Huber R.M.: *Three-dimensional in vitro cocultivation of lung carcinoma cells with human bronchial organ culture as a model for bronchial carcinoma. Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1999 Aug;21(2):200-8.
2. Al-Batran.S., Supthut, M.M., Brückner, K., Lang.S.M., Gamarra, F., Knüchel, R., Welsch, U, Huber, R.M: *Invasionscharakteristika von Tumorzellen in 3-dimensionaler Kokulturaus humanem Bronchialepithel und der Tumorzelllinie EPLC32M1. Atemw-Lungenerkr.;* 24:327-328, 1998
3. Ayers,M. M.; Jeffrey, P.M.: *Proliferation and Differentiation in mammalian airway epithelium. Eur. Respir. J.*, 58-80, 1988
4. Bals, R., Beck, A., Gamarra, F, Huber, R.M, Welsch, U: *Secretion and proliferation of human bronchial epithelium cultured in a mini-organ-culture system. Eur. Respir. J.*, 8 Supp: 296s, 1995.
5. Bals R., Gamarra F, Kaps, A., Grundler, S., Huber, R.M, Welsch, U.: *Secretory cell types and cell proliferation of human bronchial epithelial cells in an organ-culture system. Cell-and-tissue research*, 293: 573-577, 1998
6. Berger A., Stief J., Holdenrieder S., Stieber P., Haimerl W., Passlick B., Waldschmidt A., Kummermehr J., Gamarra F., Huber RM.: *Effects of single-dose irradiation on bronchial epithelium: a comparison of BEAS 2B cell monolayershuman organ cultures, and Göttinger minipigs. Radiat. Res.* 2003 Dec,160(6) 647-54
7. Chevillard, M., Hinnrasky,J., Zahm, J.M, Plotkowski, L., Puchelle, E.: *Proliferation, Differentiation and ciliary beating of human respiratory ciliated cells in primary cultures.Cell Tissue Res*, 264: 49-55, 1990
8. Coomber,B.L., Gotlieb, A.I.: *Of cell migration and proliferation. Arteriosclerosis.*10: 215-222, 1990

9. Creemers, L.B., den Ouden, K., Van Pelt, A.M., De Rooij: *Maintenance of adult mouse type A spermatogonia in vitro: influence of serum and growth factors and comparison with prepubertal spermatogonial cell culture. Reproduction* 2002 Dec;124(6):791-9
10. Crosson, C.E., Klyce, S.D., Beuermann, R.W.: *Epithelial wound closure in the rabbit cornea. A biphasic process. Invest ophtalmol. Vis. Sci.* 27: 464-473., 1986
11. Fjellbirkeland, L., Bjerkgvig, R., Steinsvag, S.K., Laerum, O.D.: *Nonadhesive stationary organ culture of human bronchial mucosa. Am. J. Respira. Cell Moll. Biol.*, 15: 197-206, 1996
12. Froud, S.J., Lonza Biologics plc, Slough, UK: *The Development, benefits and disadvantages of serum-free media.*, *Dev Biol Stand, Basel, Karger*, 1999;99:57-166
13. Gaillard, D., Jouet, J.B., Egrettau, L., Plotkowski, L., Zahm, J.M., Benali, R., Pierrot, D., Puchelle, E.: *Airway epithelial damage and inflammation in children with recurrent bronchitis. Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 150: 810-817, 1994
14. Gamarra, F., Baretton, G., Grundler, S., Christ, M., Wehling, M., Huber, R.M.: *A new technique to culture human bronchial epithelial cells as mini-organ system in vitro. Eur. Resp. J. Suppl*17,6: 182ws, 1993.
15. Gamarra F., Lingk P., Marmarova A., Edelmann M., Hautmann H., Stepp H., Baumgartner R., Huber RM: *5-Aminolevulinic acid-induced fluorescence in bronchial tumors: dependency on the patterns of tumor invasion. J. Photochem. Photobiol. B* 2004 Jan 23;73(1-2):35-42.
16. Gamarra F., Wagner S., Al-Batran S., Maier I., Castro M., Hautmann H., Bergner A., Baumgartner R., Huber RM.: *Kinetics of 5-aminolevulinic acid-induced fluorescence in organ cultures of bronchial epithelium and tumor. Respiration* 2002;69(5):445-50.
17. Gamarra, F., Grundler, S., Wehling, M., Huber, R.M.: *Vitalität und Zilienschlag in dreidimensionalen Kulturen des humanem Bronchialepithels nach Kryokonservierung. Pneumonologie*, 50, 127, 1996

18. Gamarra, F., Thein, F., Leberig, A., Kleinsasser, N., Wehling, M., Huber, R.M.: *Cell proliferation in threedimensionally cultured human respiratory epithelium. Am.J.Resp.Crit.Care Med., 153:A724,1996*
19. Gamarra, F., Ziesenis, A., Grundler, S., Josten, M., Wehling, M., Huber, R.M.: *Cultured, threedimensional mini organs of bronchial epithelial cells: a new method for studies on ciliary beat frequency (CBF). Eur.Resp.J.Suppl.18,7:77s,1994.*
20. Garcia, P., Rodriguez, J.L., Vinas, J.: *A new rapid and more sensitive microcytotoxicity test. J of Immun Meth, 1:303-307, 1971.*
21. Grundler, S., Gamarra, F, Wehling, M., Huber, R.M: *An easy quantification of mucociliary function of the human bronchial epithelium. Eur.Repir.F.Suppl.18,7: 76s, 1933*
22. Grundler, S., Heil,P., Gamarra, F., Huber, R.M: *Aufnahme von ALA und Bildung von Protoporphyrin IX an einer Mini -Organkultur des humanen Bronchialepithels. Lasermedizin, 10:105, 1994*
23. Grundler, S., Ziesenis, A., Gamarra, F, Josten, M., Wehling, M., Huber, R.M.: *Messung der ziliären Schlagfrequenz (ZSF) an dreidimensionalen Mini- Organkulturen von humanem Bronchialepithel. Pneumonologie, 48:614-615,1994*
24. Harrison, T.R. Innere Medizin 1., Blackwell-Wissenschaftsverlag: 13, 1441, 1995.
25. Huber, R.M, Gamarra, F, Bach,D., Leberig, A., Heimerl, W.: *HDR-Brachytherapie (AL): Dosis-Eskalation in 3-dimensionalen Miniorganen des menschlichen Bronchialepithels. Pneumonologie, 51:205,1997*
26. Iwagami, Y., Departement of Dentistry and Oral Surgery, Wakayama Medical College: *Changes in the ultrastructure of human cells related to certain biological responses under hyperthermic culture conditions. Hum Cell 1996 Dec;9(4): 353-66*
27. Jorrisen, M., Van der Schueren, B., Van der Berghe,H., Cassiman, J.J.: *Contribution of in vitro culture metzhods for respiratory epithelial cells to the study of the physiology of the respiratory tract. Eur.Respir.J., 4:210-217, 1991.*

28. Josten, M., Gamarra, F, Grundler, S., Huber, R.M, Ziesenis, A.: *A ciliary beat frequency (CBF) in cultivated bronchial epithelial biopsies: variability and reproducibility. Eur.Resp.J.Suppl.18,7:78s, 1994*
29. Kaliner, M.A., Barnes, P.J., Kunkel, G. H. H., Baraniuk, J.N.: *Neuropeptides in Respiratory medicine. New York, Marcel Dekker, 501-504, 1994.*
30. Kanzler, M.H., Gorsulowsky, D.C., Swanson, N.A.: *Basic Mechanisms in the Healing Cutaneous Wound. J. Dermatol.Surg.Oncol.,12:1156-1164, 1986.*
31. Karsten, U.: *Fluorometric estimation of dead cells in cell suspensions. Experientia, 36: 263-264, 1980.*
32. Keenan, K.P., Combs, J.W., McDowell, E.M.: *Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury. I. Focal lesions: quantitative morphologic study of cell proliferation. Virchows Arch.B. Cell.Pathol.Incl.Mol.Pathol., 41:193-214,1982.*
33. Keenan, K.P., Combs, J.W., McDowell, E.M.: *Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury.III. Large and small lesions: comparative stathmokinetic and autoradiographic studies. Virchows Arch.B. Cell.Pathol.Incl.Mol.Pathol.,4:231-252,1982.*
34. Keenan, K.P., Combs, J.W., McDowell, E.M.: *Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury.II. Multifocal lesions: stathmokinetic and autoradiographic studies of cell proliferation. Virchows Arch.B.Cell Pathol.Incl.Mol.Pathol., 41:215-229, 1982.*
35. Keenan, K.P., Wilson, T.S., McDowell, E.M.: *Regeneration of hamster tracheal epithelium after mechanical injury.IV. Virchows Arch. 43: 23-240, 1983.*
36. Laitinen, L.A., Heino,M., Laitinen, A., Kava,T., Haathela, T.: *Damage of the airway epithelium and bronchial reactivity in patients with asthma. Am.Rev.Respir.Dis., 131:599-606, 1985.*
37. Latt, S.A.: *Microfluorometric Detection of Desoxyribonucleic Acid replication in Human Metaphase Chromosomes. Proc.Nat.Acad.Sci.70:3395-3399, 1973.*

38. Leigh, M.W., Kylander, J.E., Yankaskas, J.R., Boucher, R.C.: *Cell Proliferation in Bronchial Epithelium and submucosal glands of Cystic Fibrosis Patients. Am.J.Respir.Cell.Mol.Biol.*, 2:605-612, 1995
39. Lubiniecki, A.S., SmithKline Beecham Pharmaceuticals, King of Prussia, PA 19406-0939, USA: *Elimination of serum from cell culture medium. Dev Biol Stand* 1999;99:153-6
40. Orihara, K., Biro, S., Hamasaki, S., Eto, H., Miyata, M., Ikeda, Y., Tei, C.: *Hyperthermia at 43 degrees C for 2h inhibits the proliferation of vascular smooth muscle cells, but not endothelial cells. J Mol Cell Cardiol* 2002 Sep;34(9):1205-15
41. Perry, P., Wolff, S.: *New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. Nature*, 251:156-158, 1974.
42. Sasse, M., Lengwinat, T., Henklein, P., Hlinak, A., Schade, R.: *Replacement of fetal calf serum in cell cultures by an egg yolk factor with an cholecystokinin/gastrin-like immunoreactivity. Altern Lab.Anim.* 2000 Nov-Dec;28(6):815-31
43. Schierhorn, K., Brunee, T., Paus, R., Schultz, K.D., Niehus, J., Agha-Mir, S.P., Kunkel, G.: *Gelatin sponge-supported histoculture of human nasal mucosa. In Vitro Cell Dev.Biol.Anim.*, 31: 215-220, 1995.
44. Schmidt, R.F, Thews, G.: *Physiologie des Menschen. Springer Verlag*, 27: 573, 1997
45. Steinsvag, S.K., Laerum, O.D.: *Fetal rat brain hemisphere tissue in nonadherent stationary organ culture. Experientia*, 41: 1517-1524, 1985
46. Steinsvag, S.K., Strand, M., Berg, O., Miaguchi, M., Olofson, J.: *Human respiratory mucosa in a nonadhesive stationary organ culture system. Laryngoskope*, 101: 1323-1331, 1991
47. Steinsvag, S.K.: *Ultrastructural Investigation of fetal rat brain hemisphere tissue in nonadherent stationary organ culture. Experientia*, 42: 798-803, 1986.
48. Theising, J.: *HNO-Operationslehre. Thieme-Verlag*, 3:66, 1996

49. Tsuruo, Y., Ishimura, K., Morita, K.: *Influence of serumfree culture conditions on subcellular localization of steroid 5-alpha-reductase in rat C6 glioma cells. Brain Res. 1998 Aug 10;801(1-2):130-6*
50. Van Langendonck, A., Donnay, I., Schuurbiers, N., Auquier, P., Carolan, C., Massip, A., Dessy, F.: *Effects of supplementation with fetal calf serum on development of bovine embryos in synthetic oviduct fluid medium. J.Reprod.Fertil.1997 Jan;109(1):87-93*
51. Von Euler, V.S., Gaddum, J.H.: *An unidentified depressor substance in certain tissue extracts. J.Physiol, 72:577-583, 1931.*
52. Wanner, A., Salathe, M., O'Riordan, T.G.: *Mucociliary Clearance in the Airways. Am.J.Respir.Crit.Care Med., 154:1868-1902, 1996.*
53. Wessman, S.J., Levings, R.L.: *Benefits and risks due to animal serum used in cell culture production. USDA, APHIS, VS, Center for Veterinary Biologics-Laboratory, Iowa, USA Dev Biol Stand 1999;99:3-8*
54. Wong, J.K., Kennedy, P.R., Belcher, S.M.: *Simplified serum- and steroidfree culture conditions for high-throughput viability analysis of primary cultures of cerebellar granule neurons. J Neurosci Methods 2001 Sep 30;110(1-2):45-55.*
55. Zahm, J.M., Chevillard, M., Puchelle, E.: *Wound repair of human surface respiratory epithelium. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol., 5:242-248, 1991.*
56. Zahm, J.M., Kaplam, H., Herad, A.L., Doriot, FG., Pierrot, D., Somelette, P., Puchelle, E.: *Cell migration and proliferation during the in vitro wound repair of the respiratory epithelium. Cell Motil.Cytoskeleton, 37:33-47, 1997.*
57. Zahm, J.M., Pierrot, D., Chevillard, M., Puchelle, E.: *Dynamics of cell movements during the wound repair of human surface respiratory epithelium. Biorheology , 29: 459-465, 1992*

58. Zhao, B.H., Bai, W., Feng, H.L., Li, S.L., Departement of Prosthodontics, Peking university School of Stomatology, Beijing 100081, China: *Human gingival epithelial cells cultured by a combined method of serum containing medium and serum free medium, in process citation, Beijing Da Xue Bao 2004 Feb 18;36(1): 102-5*
59. Zolzer, F., Devi, P.U., Streffer, C.: *Determination of potential doubling times in human melanoma cell cultures subjected to irradiation and/or hyperthermia by flow cytometry. Radiat.Res.1994 Jun;138(3):451-9*

7 Danksagung

In erster Linie gebührt mein prinzipieller Dank zunächst meinen Eltern, ohne deren steten Unterstützung und Opferbereitschaft das gesamte Studium und damit auch diese Doktorarbeit für mich nicht möglich gewesen wären. Zum anderen aber auch meiner lieben Gattin Vassia, welche es mir mit fast unermünder Kraft stets ermöglichte die Ruhe zur Verfassung dieser Arbeit zu finden.

Mein spezieller Dank richtet sich an Herrn Prof. Dr. R. M. Huber, Leiter der Pneumologie der Medizinischen Klinik, Klinikum Innenstadt der LMU. Durch die Aufnahme in seine Abteilung gewährte er mir die Möglichkeit in einem professionellen Team mit familiärem Charakter die Grundzüge wissenschaftlichen Arbeitens zu erlernen, und einen akademischen Dokortitel zu verdienen.

Insbesondere möchte ich mich auch bei Herrn Dr. med. F. Gamarra bedanken, welcher mich in idealer Weise sowohl in der experimentellen Phase, als auch beim Verfassen dieser Arbeit unterstützte. Darüber hinaus war Dr. Gamarra für mich ein sehr nützlicher Lehrmeister bezüglich der öffentlichen Präsentation wissenschaftlicher Inhalte. Davon profitiere ich noch heute.

8 Lebenslauf

<u>Persönliche Daten:</u>	Name:	Florian Thein
	Geburtsdatum/-ort:	26.01.1970, Augsburg
	Verheiratet seit dem	23.03.2002
<u>Schulbildung:</u>	1988 – 1989 5/1989	Gymnasium bei St. Stephan in Augsburg Abitur
<u>Wehrdienst:</u>	10/1989-10/1990	Grundwehrdienst in der Bundesmarine
<u>Studium:</u>	WS/1990-SS/1998 SS/1992 SS/1993 SS/1997 SS/1998	Humanmedizin an der LMU-München Physikum 1. Staatsexamen 2. Staatsexamen 3. Staatsexamen
<u>Ärztliche Tätigkeiten:</u>	06/1998-12/1999 Seit 01/2000 07/2000	AiP in der chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Traunstein unter der Leitung von Chefarzt Dr. med. F. Klein Assistenzarzt in der urologischen Abteilung des Krankenhauses der Barmherzigen Brüder München unter der Leitung von Prof. Dr. med. J.E. Altwein und ab 10/06 unter Chefarzt Dr.med H.P. Erwerb der Anerkennung zum Facharzt für Urologie.