

Aus der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde
der Universität Regensburg

Direktor: Prof. Dr. med Jürgen Strutz

Evaluation zyto- und genotoxischer Effekte von Trägersubstanzen für die Gewebezüchtung autologer Chondrozyten

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

Vorgelegt von
Amelie Sophia Lotz
aus
Heidelberg
2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. vet. Elmar Richter

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Matthias Schieker

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Peter Müller
Prof. Dr. Hans Hertlein

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Prof. Dr. med. Norbert Kleinsasser
PD Dr. med. Rainer Staudenmaier

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 07.10.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Ohrmuschelrekonstruktionen	1
1.2. Zusammensetzung des Polyurethanschaums	6
1.3. Aufgabenstellung und Ziel der Untersuchungen	7
1.4. Testverfahren	9
2. Material und Methoden	11
2.1. Verwendete Gewebe und Zellen	11
2.2. Methoden spezifische Labormaterialien	11
2.3. Testsubstanzen	15
2.3.1. Dextrose	15
2.3.2. Triethanolamin	16
2.3.3. PEG-PPG-PEG	16
2.3.4. Getestete Substanzkonzentrationen	17
2.3.5. Inkubationsschema	18
2.4. Methodik zum Zytotoxizitätsnachweis	18
2.4.1. Kultivierung von Chondrozyten	18
2.4.2. Vitalitätstest mit Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat	19
2.4.3. Proliferationstest mit Tetrazoliumsalzen	21
2.5. Methodik zum Genotoxizitätsnachweis	23
2.5.1. Lymphozytenisolierung	23
2.5.2. Genotoxizitätstest und Zytotoxizitätstest an humanen Lymphozyten	24
2.5.3. Digitale Auswertung	27
2.6. Grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Analyse	28
2.6.1. Boxplots	28
2.6.2. Statistische Testverfahren	29

3. Ergebnisse	31
3.1. Zytotoxizität und Genotoxizität von Dextrose	31
3.1.1. Zytotoxizität an humanen Chondrozyten	31
3.1.2. Zytotoxizität an humanen Lymphozyten	34
3.1.3. Genotoxizität an humanen Lymphozyten	36
3.2. Zytotoxizität und Genotoxizität von PEG-PPG-PEG.....	39
3.2.1. Zytotoxizität an humanen Chondrozyten	39
3.2.2. Zytotoxizität an humanen Lymphozyten	42
3.2.3. Genotoxizität an humanen Lymphozyten	43
3.3. Zytotoxizität und Genotoxizität von Triethanolamin.....	44
3.3.1. Zytotoxizität an humanen Chondrozyten	44
3.3.2. Zytotoxizität an humanen Lymphozyten	47
3.3.3. Genotoxizität an humanen Lymphozyten	48
4. Diskussion	51
4.1. Verwendete Gewebe und Zellen	51
4.1.1. Humane Chondrozyten	51
4.1.2. Humane Lymphozyten	52
4.2. Testsubstanzen	53
4.3. Methodik	54
4.3.1. Zytotoxizitätstests	54
4.3.2. Alkalische Mikrogel-Elektrophorese und Comet Assay	58
4.4. Substanzspezifische Ergebnisse	62
4.4.1. Dextrose	64
4.4.2. PEG-PPG-PEG	65
4.4.3. Triethanolamin	66
4.4.4. Biomaterialzusammensetzung	67
4.5. Zellspezifische Ergebnisse.....	69
4.5.1. Ergebnisse an Chondrozyten	69
4.5.2. Ergebnisse an Lymphozyten	71
4.6. Fazit und Ausblick	71

5. Zusammenfassung 73

6. Literatur 75

7. Anhang 87

7.1. Abbildungsverzeichnis 87

7.2. Abkürzungsverzeichnis..... 88

7.3. Daten zu den Ergebnissen..... 89

7.4. Publikationen aus der Arbeit..... 95

7.5. Danksagung..... 96

7.6. Lebenslauf..... 97

1. Einleitung

1.1. Ohrmuschelrekonstruktionen

Ohrmuschelrekonstruktionen werden bei Traumen und Ohrmuschelfehlbildungen vorgenommen. Traumen entstehen durch Biss-, Schnitt- und Stichwunden oder auch durch Quetschung und Abscherung. Ohrfehlbildungen kommen in der Bundesrepublik Deutschland mit einer Häufigkeit von ca. 1:10.000 bis 1:15.000 Geburten vor, d.h. etwa 150 Neuerkrankungen pro Jahr [Ganzer, 1999]. Doppelseitige Veränderungen finden sich nur in ca. 10% der betroffenen Fälle [Brent, 1992, Skouteris und Sotereanos, 1989]. Die natürliche Vielfalt der Ohrmuschel ist groß, so dass der Übergang zu Fehlbildungen oft fließend ist. Angeborene Ohrmuschelfehlbildungen werden in drei Schweregrade unterteilt. Grad 1 beschreibt Dysplasien, bei denen die wesentliche Struktur des Ohres erhalten ist. Grad 2 beinhaltet dagegen Dysplasien wie z.B. eine schwere Tassenohrdeformität. Zu Grad 3 zählt man die klassische Mikrotie und die Anotie, bei der eine Ohrmuschel nur rudimentär oder überhaupt nicht vorhanden ist. In Tabelle 1-1 ist die Einteilung der Ohrmuschelfehlbildungen dargestellt.

Tabelle 1-1: Einteilung von Ohrmuschelfehlbildungen [Weerda, 1988]

Klassifikation der Ohrmuschelfehlbildung nach Weerda	
Dysplasie Grad 1	Makrotie Abstehendes Ohr Kryptotie Fehlende obere Helix Kleinere Fehlformen Koloboma Ohrläppchendeformität Tassenohr Typ 1 und 2
Dysplasie Grad 2	Tassenohr Typ 3 Miniohr
Dysplasie Grad 3	Einseitige Mikrotie Beidseitige Mikrotie Anotie

Ohrmuschelfehlbildungen sind auf Störungen der Embryonalentwicklung zurückzuführen, wie z.B. im Fall einer Röteln-Embryopathie. Während der 5. bis 6. Schwangerschaftswoche entstehen entlang des 1. und 2. Kiemenbogens das äußere Ohr, das Mittelohr und der Unterkiefer. Die Folge von Entwicklungsstörungen in dieser Zeit ist die Mikrotie, häufig vergesellschaftet mit Atresien des äußeren Gehörgangs, Mittelohrfehlbildungen und einer Mandibulahypoplasie [Thorn, 1994]. 38% der Patienten haben zusätzlich ein Knochen- oder Weichteildefizit im Bereich des seitlichen Schädels der betroffenen Seite und 19% eine verschieden stark ausgeprägte Schwäche des N. facialis [Brent, 1992, 1999, Weerda, 1988]. Auch im Rahmen verschiedener Syndrome wie dem Franceschetti-, dem Treacher-Collins-, dem Albright- oder dem

Goldenhar-Syndrom kann es zu Ohrmuschelfehlbildungen kommen [Thorn, 1994]. Bei Mutationen von Hox-Genen oder Defekten auf Chromosom 10 wurden ebenfalls Mikrotien beschrieben [Kaur et al., 1992, Naora et al., 1994].



Abbildung 1-1: Mikrotie

Die Fehlbildungen werden meist als sehr störend empfunden, sind funktionell aber weniger bedeutsam, solange kein Gehörgangverschluss bzw. keine Mittelohrfehlbildung vorliegt [Berghaus et al., 1996]. Für den Patienten können soziale und berufliche Kontakte erschwert sein. Aufgrund der Ohrmuschelfehlbildung kann es vor allem im Kindesalter zu einer ausgeprägten Stigmatisierung kommen. Schwere kongenitale Fehlbildungen der Ohrmuschel sind dagegen oft mit einer knöchernen oder fibrösen Atresie des äußeren Gehörgangs, einem fehlenden Trommelfell oder einer Fehlbildung der Gehörknöchelchen vergesellschaftet, so dass sich neben den kosmetischen auch funktionelle Probleme ergeben [Kiefer et al., 2006]. Demnach sollte bei der Behandlung von Ohrmuschelfehlbildungen sowohl die kosmetische wie auch die funktionelle Komponente bedacht werden. Während bei doppelseitigen Störungen die Herstellung eines normalen

Hörvermögens angestrebt wird, steht bei einseitiger Fehlbildung und normaler Hörfähigkeit der Gegenseite der Wunsch des Patienten nach kosmetischer Verbesserung im Vordergrund.

Bis zum neunzehnten Jahrhundert fokussierten Ohrmuschelrekonstruktionen vor allem auf traumatische Deformitäten. Erste Ohrrekonstruktionen lassen sich auf die Sushruta Samhita zurückführen [Rana und Arora, 2002]. Sushruta, ein Mediziner im 6. Jh. v. Chr., beschrieb zahlreiche Operationen und bis zu 121 Operationsinstrumente, die in den 350 n. Chr. entstandenen Sammelwerken, den so genannten Samhita, dokumentiert wurden. Tagliacozzi [1597] beschrieb die Möglichkeit einer Ohrmuschelrekonstruktion mit einem retroaurikulären Hautlappen. Ähnliches versuchte Dieffenbach [1845] in Deutschland, indem er das mittlere Drittel des Ohres mit einem gewachsenen Hautlappen rekonstruierte. Die Methodik der Ohrmuschelrekonstruktion mit einem retroaurikulären Lappen wird sogar heute noch verwendet [Brent, 1999]. Hierbei dient der Ohrmuschelrekonstruktion ein temporoparietaler Fascienlappen. Um eine formgetreue und funktionale Ohrmuschel zu rekonstruieren, bedarf es aber neben eines Hauttransplantats auch eines Stützgerüsts. Eine Möglichkeit der Behandlung von Ohrmuschelfehlbildungen ist der Einsatz von alloplastischen Implantaten (Epithesen), sprich dem Ersatz fehlenden körpereigenen Gewebes durch Fremdmaterial. Diese alloplastischen Prothesen werden bisher in drei Formgrößen hergestellt. Basierend auf harten, nichtabbaubaren porösen Polymeren bergen sie ein erhöhtes Risiko einer Infektion und einer Materialeextrusion auch noch viele Jahre nach der Implantation [Berghaus et al., 1983, Breitbart, 1998]. Der Hals-Nasen-Ohren-Chirurgie ist es heute möglich, Epithesen zur Rekonstruktion einer neuen Ohrmuschel einzusetzen. Diese können mit der Haut verklebt oder mit dem Knochen, als osseointegrative Prothese, verankert werden. Die optischen Resultate bei der epithetischen Versorgung sind gut. Epithesen stellen aber, wie auch alloplastische Implantate, einen ewigen Fremd-

körper für den Organismus dar, wodurch es auch in seltenen Fällen zu Komplikationen, beispielsweise durch Infektionen, kommen kann. Die Gefahr einer Implantatlockerung sowie die Angst vor Verletzungen und Verlust der Epithese schränken die Lebensqualität der Patienten häufig ein. Ein weiteres Problem der Epithesen stellt eine gelbliche Veränderung dar, aufgrund derer es oft nach einigen Jahren einer erneuten Färbung bedarf [Renner und Lane, 2004].

Die Rekonstruktion einer patientenindividuellen Ohrmuschel aus autologem Rippenknorpel hatte ihre ersten Anfänge unter Gillies [1920]. Er rekonstruierte im Jahre 1937 mehr als 30 Ohrmuscheln unter der Verwendung von Rippenknorpel der Mütter der Patienten [Gillies, 1937]. Diese Form der Rekonstruktion wurde bereits von Pierce [1930] und in der Folge von zahlreichen Autoren [Cronin, 1966, Peer, 1948, Steffensen, 1952, Tanzer, 1959, Young, 1944] modifiziert. Die fortschrittlichsten Techniken hinsichtlich der autologen Ohrmuschelrekonstruktion kamen von Brent [1977, 1978] und Nagata [1994, 1995]. Die autologe Rekonstruktion ermöglicht die Herstellung einer individuell geformten, kosmetisch ansprechenden Ohrmuschel [Staudenmaier, 2000]. Sie kann auch zur Rekonstruktion nach Traumen eingesetzt werden. Die Patienten haben nach der Operation ein weitgehend normales Ohrempfinden. Die autologe Rekonstruktion ist außerdem gegenüber Traumen stabiler als Epithesen, sie ist warm und sensibel [Staudenmaier et al., 2006]. Die psychischen Begleiterscheinungen einer Dysplasie der Ohrmuschel wären somit behoben. Die Ohrmuschelrekonstruktion mit autologem Knorpel hat sich in den letzten zehn Jahren nachhaltig etabliert [Aguilar, 2001, Brent, 1999, Firmin, 1998, Siegert, 2003, Staudenmaier, 2006]. Dem Vorteil des minimierten Risikos der Transplantatabstoßung stehen aber gravierende Nachteile gegenüber: eine mögliche Resorption, Verbiegung oder Schrumpfung des körpereigenen Knorpelgewebes sowie überschießende Narbenbildung und Brustkorbdeformitäten an der Entnahmestelle des Rippenknorpels. Bei kleinen Defekten der Ohrmuschel reicht zwar oft Nasenseptum- oder Ohrmuschelknorpel der Gegenseite, größere Defektrekonstruktionen setzen aber die Entnahme von Rippenknorpel voraus [Rasp et al., 2000]. Intraoperative Komplikationen, beispielsweise Infektionen, sind dabei zwar selten, aber in etwa 10% der Fälle kann durch die Knorpelentnahme an der Rippe ein Pneumothorax entstehen [Laurie et al., 1984, Skouteris und Sotereanos, 1989]. Zudem sind bis zum endgültigen Resultat zwei bis drei Operationsschritte innerhalb von sechs bis neun Monaten notwendig, was gerade für die häufig operierten Kindern sehr belastend ist [Staudenmaier, 2006].

Die erwähnten Therapien stoßen aufgrund von Abstoßungs- und Infektionsrisiko, eingeschränkter Funktionsfähigkeit und Dauerbelastbarkeit der Prothesen sowie aufwändiger Operationsverfahren immer mehr an ihre Grenzen. Daher ist die moderne Medizin bestrebt, neue Möglichkeiten zur Ohrmuschelrekonstruktion zu erforschen. Ziel ist die Entwicklung einer individuell maßgeschneiderten, mechanisch stabilen Ohrmuschel, deren Verwendung mit möglichst geringem operativen Aufwand und wenig Komplikationen verbunden ist. Seit 2002 wurde in diesem Rahmen der Bayrische Forschungsverbund für Tissue Engineering und Rapid Prototyping (FORTEPRO) von der Bayrischen Forschungsförderung gefördert, um die Rekonstruktion einer Ohrmuschel aus einem dreidimensional strukturierten, resorbierbaren Polymergerüst in Form der knorpeligen Ohrmuschelanteile, welches mit patienteneigenen Chondrozyten besiedelt wird, zu entwickeln [Staudenmaier, 2006]. Dies erfordert eine Kombination von Rapid Prototyping und Tissue Engineering [Staudenmaier und Rasp, 2003]. Rapid Prototyping dient der Herstellung patientenindividueller, mechanisch stabiler, abbaubarer Zellträger, die in der Literatur Scaffold genannt werden [Heinzl, 2003]. Die Methode des Tissue

Engineering beruht auf der Kultivierung lebender Zellen eines Organismus außerhalb des Zielgewebes, um diese dann meist in den selben Organismus zu implantieren und so eine Gewebefunktion zu erhalten oder wiederherzustellen [Cronin und Ascough, 1978, Ohmori, 1978]. Es können aber auch allogene oder xenogene Gewebe verwendet werden [Shieh und Vacanti, 2005]. Allgemein ist die Verwendung sowohl gewebsspezifischer Zellen wie auch von Stammzellen zur Zellbesiedelung möglich, wobei der Vorteil gewebsspezifischer Zellen in der hohen Reproduzierbarkeit und der einfachen Verfügbarkeit liegt [Shieh et al., 2004]. Der Prozess des Tissue Engineerings ist an Abbildung 1-2 aufgeführt.

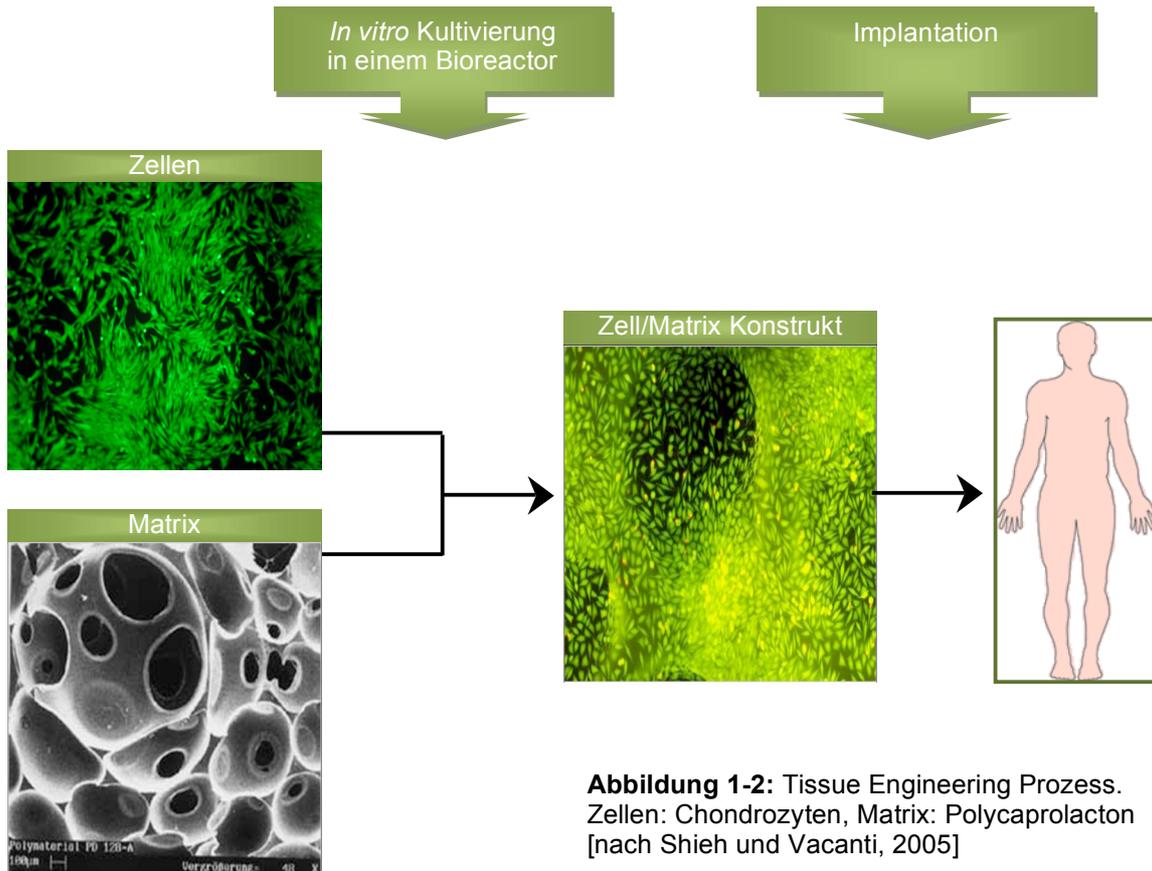


Abbildung 1-2: Tissue Engineering Prozess. Zellen: Chondrozyten, Matrix: Polycaprolacton [nach Shieh und Vacanti, 2005]

Zur Herstellung des Zellträgers wird die patientenindividuelle Formgebung durch Erfassung der genauen Form und Größe der anderen, nicht deformierten Ohrmuschel ermöglicht. Bei beidseitigen Defekten kann das Ohr eines Elternteils zur Datengewinnung für das Rapid Prototyping genannte Verfahren verwendet werden. Die Datengewinnung erfolgt in beiden Fällen durch Scan-Technologien wie der dreidimensionalen Sonographie, der Computertomographie, der Holographie und der Magnetresonanztomographie [Brix und Lambrecht, 1987, Marsh und Vannier, 1983]. Daten der funktionsfähigen Ohrmuschel können somit digital gespeichert und bearbeitet werden. Auf Basis dieser Bilddaten wird durch Laserstereolithographie ein Ohrmuschelmodell aus Epoxydharz erstellt, das dem vorhandenen Ohr optisch und spiegelsymmetrisch angepasst ist [Erickson et al., 1999, Mankovich et al., 1990]. Mit Hilfe dieses Modells wird eine Negativform aus Silikon gefertigt. In dieser Negativform kann durch ein Gießverfahren der Zellträger aus einem offenporigen Polymerschäum gebildet werden. In Abbildung 1-3 ist der Ablauf des Rapid Prototyping dargestellt.

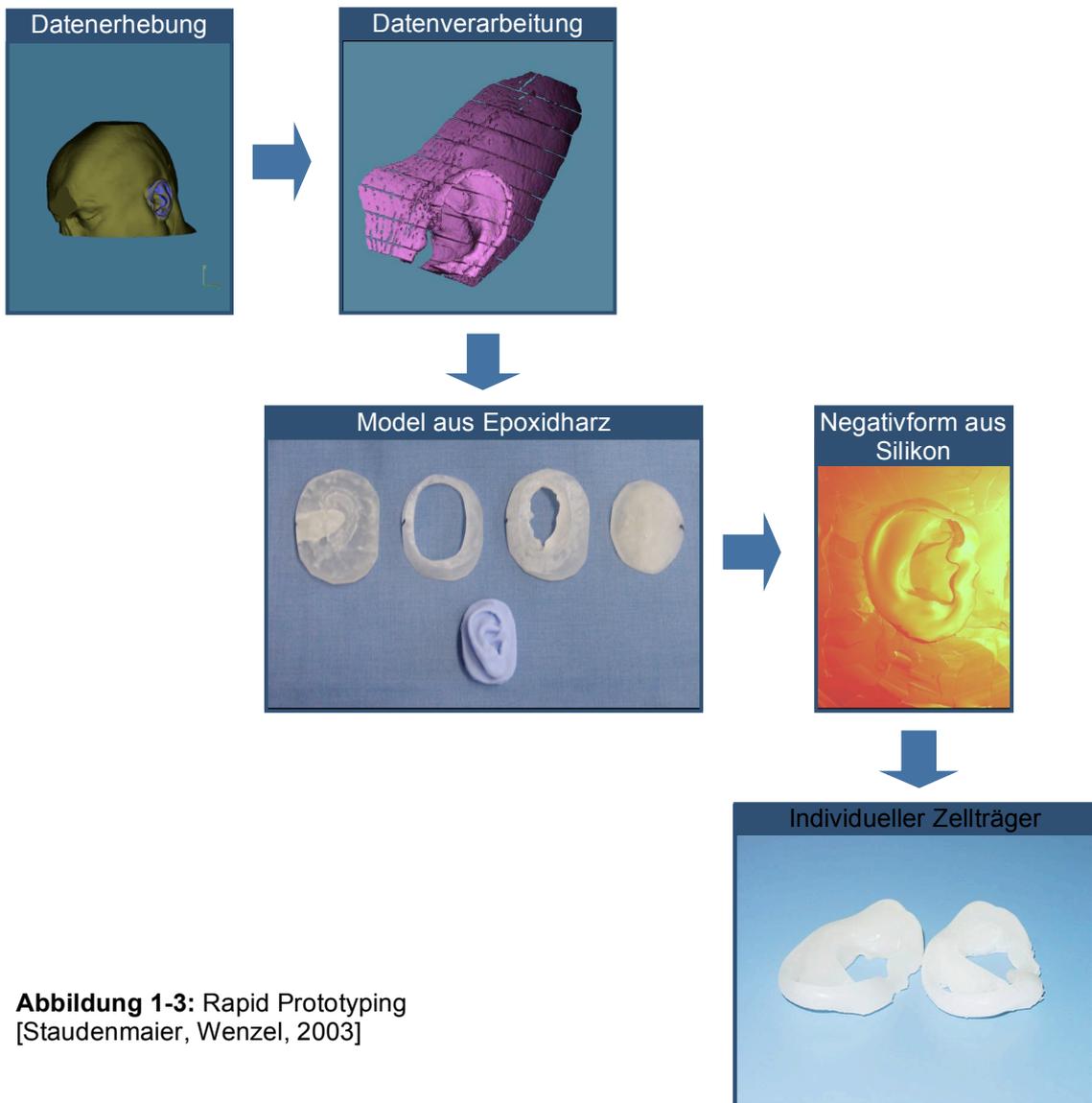


Abbildung 1-3: Rapid Prototyping
[Staudenmaier, Wenzel, 2003]

Zur Besiedelung des Zellträgers werden aus einer Knorpelbiopsie des Patienten Chondrozyten isoliert und in großen Mengen *in vitro* gezüchtet. Die Zellen werden nun in einem Fibringel gelöst und in den individuellen Zellträger injiziert. Dieses Stützgerüst wird dem Patienten implantiert. Ziel dieses neuartigen Verfahrens ist es, dass das Zellträgermaterial nach einigen Monaten vollständig resorbiert und abgebaut und durch neu generiertes Knorpelgewebe ersetzt wird. Diese Strategie zur Ohrmuschelrekonstruktion soll das Risiko einer Immunreaktion mit Entzündung des Organismus minimieren. Erwartet wird eine Reduktion der Gefahr der Resorption und Extrusion. Das hier beschriebene Vorgehen verspricht eine weitere Verbesserung der Operationsergebnisse, eine Verringerung des intraoperativen Aufwands, eine Vereinfachung der Operationstechnik und eine Reduktion der Hebedefektmorbidität. Entscheidend für die Qualität und Natürlichkeit einer rekonstruierten Ohrmuschel sind Form, Größe und Dreidimensionalität. Durch Kombination von Rapid Prototyping und Tissue Engineering ist es möglich, eine neue Ohrmuschel zu rekonstruieren, die in Stabilität, Aussehen und Verformbarkeit dem verbliebenen Ohr gleicht. Zum Zeitpunkt der vorliegenden Untersuchung gibt es allerdings noch kein biokompatibles und bioabbaubares Biomaterial ohne

Nebeneffekte wie beispielsweise einer inflammatorischen Reaktion auf dem Markt, das zur Ohrmuschelrekonstruktion im Rahmen des Tissue Engineerings geeignet erscheint [Arevalo-Silva et al., 2000, Renner und Lane, 2004]. Es wurden vielfältige Versuche unternommen, einen geeigneten Zellträger zu besiedeln und *in vivo* im Tierversuch zu implantieren [Britt und Park, 1998, Cao et al., 1997, Haisch et al., 2002, Naumann et al., 1998, Saim et al., 2000, Vacanti et al., 1992]. Eine lange Überlebenszeit der implantierten Zell/Matrix-Konstrukte konnte bei den Versuchen nicht erreicht werden. Die zuvor längste Überlebensdauer des Tissue Engineerings zur Ohrmuschelrekonstruktion im Tiermodell wurde von Shieh beschrieben [Shieh et al., 2004]. Eine auf Tissue Engineering basierende Rekonstruktion der Ohrmuschel am Menschen ist zur Zeit der vorliegenden Untersuchungen noch nicht bekannt [Naumann et al., 2003]. Die Herstellung eines neuen Biomaterials ist somit für die plastische und wiederherstellende Chirurgie der Ohrmuschel mit den Methoden des Tissue Engineering von essentieller Bedeutung.

Ein neues Biomaterial bestehend aus einem Polyurethanschaum Polycaprolacton, der sich aus sechs Reinsubstanzen zusammensetzt, wurde daher formuliert. Neben mechanischen Ansprüchen, muss aber auch eine Biokompatibilität gewährleistet sein, die eine Proliferation und Differenzierung der Zellen ermöglicht und keine toxischen Einflüsse auf humane Zielzellen ausweist. Von großer Bedeutung ist daher die toxikologische Untersuchung von Reinsubstanzen, als Komponenten eines Biomaterials für das Tissue Engineering. Um einem toxischen Einfluss der Reinsubstanzen auf die Proliferation und Vitalität auf die Zellen, sowie einem potentiellen genotoxischen Schaden vorzubeugen, wird das neu formulierte Biomaterial in vorliegender Arbeit in seinen Einzelkomponenten in Hinblick eines potentiellen toxischen Einflusses an primären humanen Zielzellen *in vitro* charakterisiert. Basierend auf den im Folgenden aufgeführten Untersuchungen und Erkenntnissen, kann das neue Biomaterial weiter modifiziert werden, so dass eine *in vivo* Applikation im Verlauf bereits im Tiermodell ermöglicht wird [Wiese und Maier, 2006].

1.2. Zusammensetzung des Polyurethanschaums

Das Biomaterial, das zur Herstellung eines dreidimensionalen Zellträgers verwendet werden soll, stellt eine wichtige Voraussetzung für das Gelingen des Tissue Engineerings dar. Neben einer guten Zyto- und Biokompatibilität soll es mechanisch belastbar sowie adäquat elastisch sein und innerhalb eines absehbaren Zeitraums resorbiert werden. Die Resorptions- und Abbauraten sollten hierbei der Bildungsrate des neuen Gewebes entsprechen [Müller et al., 2006]. Als zuverlässig haben sich in diesen Punkten Polyester wie z.B. Polylactid, Polyglycolid oder Polycaprolacton bewährt [Angele et al., 2004, Webb et al., 2004]. Diese synthetischen Materialien haben den Vorteil der guten Kontrollierbarkeit der Materialeigenschaften. Neben synthetischen Materialien können Zellträger auch aus natürlichen Substanzen bestehen. So werden modifizierte Zellträger basierend auf Zellulose für das Tissue Engineering eingesetzt [Müller et al., 2006]. Zellträger können zudem aus Kollagen, Alginat, Hyaluron oder Hydroxyapatit hergestellt werden [Naumann et al., 2003, Shieh und Vacanti, 2005].

Eine neue Überlegung für das Tissue Engineering von Knorpel ist die Kombination eines Hydrogels mit einem stabilen Polyurethan [Eyrich et al., 2007]. Das neu formulierte, in vorliegender Arbeit in seinen Einzelkomponente untersuchte Biomaterial entspricht einem Polyurethanschaum aus sechs Einzelsubstanzen. Polyurethane (PUR) stellen eine übergreifende

Bezeichnung für die Polyaddition aus Isocyanaten und Alkoholen dar. Polyurethanschäume entstehen bei der Polyaddition in Gegenwart von Wasser und Carbonsäuren. Geschäumte Polymere werden zum einen anhand der Materialbasis unterschieden, zum anderen danach, ob die Poren offen, sprich miteinander verbunden, oder geschlossen, sprich durch unterschiedlich kompakte Wände getrennt sind. Besitzt ein Polymerschaum auch an seiner Oberfläche geöffnete Poren, wird er als „Polymerschaum ohne Haut“ bezeichnet. Dies macht ihn zur Verwendung bei der Herstellung eines Zellträgers für Zell- und Gewebekulturen für das Tissue Engineering besonders geeignet [Wiese und Maier, 2006]. Offenporige Polyurethanschäume finden in verschiedensten Bereichen Anwendung. Ihr Einsatzgebiet reicht von Putzschwämmen über Filtermaterialien bis hin zu Zellträgern für das Tissue Engineering. In großen Mengen werden sie in der Medizintechnik und der Autoindustrie verwendet.

Das in vorliegender Arbeit in seinen Reinsubstanzen untersuchte Polycaprolacton soll zur Herstellung eines gegebenenfalls bioabbaubaren, offenporigen Polyurethanschaums ohne Hautbildung verwendet werden. Poly(ϵ -caprolacton)_n [R=(CH₂)₅] gehören zu den Typ I Polyestern der allgemeinen Formel [CO₂(CH₂)₅]_n. Sie werden durch Ringöffnungspolymerisation von ϵ -Caprolacton abgeleitet. Poly(ϵ -caprolacton)_n können als Polydiole mit endständigen Hydroxygruppen vermarktet und somit für die Herstellung von Polyesterpolyurethanen verwendet werden. Sie sind biologisch abbaubar. So dienen sie unter anderem als abbaubares chirurgisches Nahtmaterial oder als Träger für Polymer gebundene Arzneimittel. Das in seinen Reinsubstanzen hier untersuchte Polycaprolacton setzt sich aus einer Diol-, einer Isocyanat- und einer Saccharidkomponente zusammen. Während 1,6-Hexandiol, (Hydroxy)-hexansäure, Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol (PEG-PPG-PEG) und Triethanolamin Teile der Diolkomponente des Polyurethans sind, ist das Monosaccharid Dextrose Teil der Saccharidkomponente. Darüber hinaus enthält dieses Polycaprolacton eine Katalysator- und Treibmittelkomponente. Als Katalysator wird 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en, eine basische Verbindung und Teil der Isocyanatkomponente, eingesetzt.

Neben den Anforderungen der Porenverbindungen, einer geeigneten Porengröße und einer hohen Porosität, muss das Polycaprolacton aber als Grundvoraussetzung eine Adhäsion und Proliferation der Zellen ermöglichen. Ein toxischer Einfluss des neuen Biomaterials auf zellulärer Ebene muss folglich ausgeschlossen sein, um das Biomaterial für das Tissue Engineering erfolgsversprechend einsetzen und eine *in vivo* Applikation ohne Bedenken in weiteren Untersuchungen durchführen zu können. In der vorliegenden Arbeit werden daher die Reinsubstanzen des Polyurethanschaums Polycaprolacton, Dextrose, PEG-PPG-PEG und Triethanolamin in Hinblick auf ihre Geno- und Zytotoxizität an primären humanen Zielzellen getestet.

1.3. Aufgabenstellung und Ziel der Untersuchungen

Die Ohrmuschelrekonstruktion durch Rapid Prototyping und Tissue Engineering stellt eine vielversprechende Alternative zu herkömmlichen Therapieformen dar. Polycaprolacton ist ein der formulierter Polyurethanschaum, der als Biomaterial zur Besiedelung mit Chondrozyten für das Tissue Engineering der Ohrmuschel Verwendung finden soll. Um Polycaprolacton als Zellträger für das Tissue Engineering einsetzen zu können, dürfen seine Trägersubstanzen weder zu Schäden an humanen Zielzellen führen, noch DNA-Veränderungen hervorrufen.

Humane Zielzellen umfassen zum einen Chondrozyten, die in direkten Kontakt mit dem Trägermaterial kommen, zum anderen aber auch Zellen der Immunabwehr, stellvertretend Lymphozyten, die im Rahmen der Fremdkörperabwehr nach Implantation des mit Chondrozyten besiedelten Zellmaterials aktiviert werden.

Ziel dieser Arbeit ist die genaue Charakterisierung des zyto- und genotoxischen Potentials der Trägersubstanzen durch Definition von Schwellenkonzentrationen der Einzelsubstanzen *in vitro*. Als Schwellenkonzentrationen sollen die maximalen Substanzkonzentrationen bezeichnet werden, bei denen sich keine zyto- oder genotoxischen Effekte an primären humanen Zielzellen nachweisen lassen. Hierzu werden Dextrose, PEG-PPG-PEG und Triethanolamin auf Zytotoxizität an Chondrozyten sowie auf Zyto- und Genotoxizität an Lymphozyten untersucht. Eine Evaluation auf Genotoxizität ist ausschließlich durchzuführen, wenn eine Zytotoxizität ausgeschlossen werden kann. Daher wird in einem ersten Schritt die Dosis-Wirkungsbeziehung der Zytotoxizität der Substanzen an Chondrozyten in einem weiten Konzentrationsspektrum geprüft. Als zytotoxisch werden Substanzkonzentrationen eingestuft, die zu einem signifikanten Unterschied der Proliferation der Chondrozyten im Vergleich zu einer Negativ-Kontrolle führen und unter deren Einfluss vermehrt avitale oder morphologisch veränderte Zellen zu beobachten sind. Die aus den Untersuchungen zur Zytotoxizität definierten Schwellenkonzentrationen werden daraufhin an Lymphozyten auf Zyto- und Genotoxizität hin untersucht. Weisen diese Konzentrationen keine zyto- und genotoxische Wirkung an Lymphozyten auf, werden sie toxikologisch als potentiell zur Polymerherstellung einsetzbar eingestuft. Zeigt sich bei diesen Versuchen eine genotoxische Wirkung in einer erhöhten DNA-Fragmentierung oder einer Einschränkung der Vitalität der Lymphozyten im Vergleich zu einer Negativ-Kontrolle, werden die Substanzen in niedrigeren Konzentrationsbereichen auf ihre Geno- und Zytotoxizität an Lymphozyten hin untersucht. Im Rahmen der Charakterisierung des toxikologischen Potentials der Reinsubstanzen werden somit maximale Substanzkonzentrationen definiert, die aus zyto- und genotoxikologischen Erkenntnissen aus *in vitro* Untersuchungen zur weiteren Formulierung von Polycaprolacton eingesetzt werden können. In Abbildung 1-4 sind die Ziele und die Systematik des Versuchsaufbaus aufgeführt.

Ziel: Definition maximaler Substanzkonzentrationen, die *in vitro* zu keinem toxischen Effekt führen

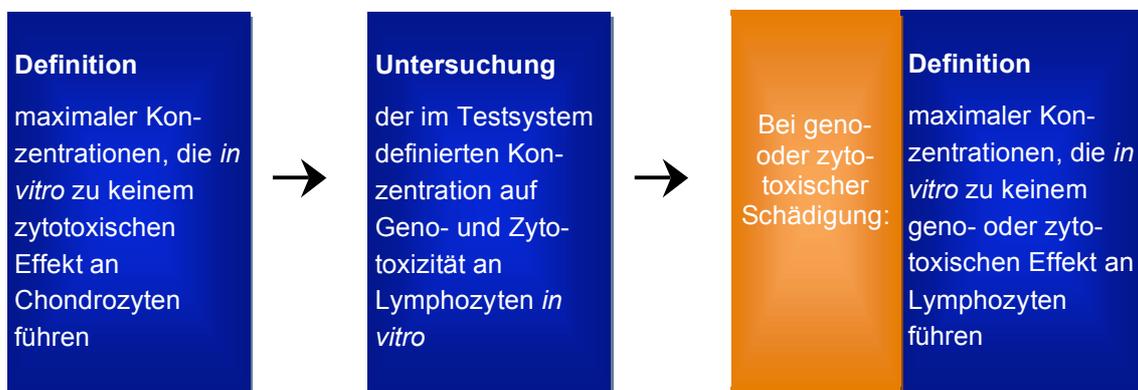


Abbildung 1-4: Versuchsplanung

1.4. Testverfahren

Potentielle zytotoxische Effekte der Reinsubstanzen des Polyurethanschaums Polycaprolacton, Dextrose, PEG-PPG-PEG und Triethanolamin werden an primären humanen Chondrozyten anhand von zwei Verfahren experimentell *in vitro* ermittelt. Die Fluoreszenzfärbung mit Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid liefert qualitative und semiquantitative Aussagen über den Einfluss der Substanzen auf die Zelldichte, Vitalität und Morphologie der Chondrozyten. Ein indirekter Proliferationstest, basierend auf der Umwandlung von Tetrazoliumsalzen zu Formazanderivaten in Mitochondrien lebender Zellen, wird zur quantitativen Bestimmung des Einflusses der Substanzen auf die Proliferation der Chondrozyten eingesetzt. Als Nachweismethode möglicher genotoxischer Wirkung der Substanzen an Lymphozyten dient der Comet Assay mit der alkalischen Version der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese. Mögliche zytotoxische Effekte an Lymphozyten werden mit Hilfe des Trypanblau-Ausschlusstests dargestellt. Zur Evaluation der Resultate erfolgte eine statistische Auswertung mit Hilfe der SPSS-Software.

Basierend auf der Kombination der genannten Einzelstudien und Screening-Verfahren zur toxikologischen Evaluation, können somit in vorliegender Arbeit die Einzelbestandteile von Polycaprolacton in Hinblick toxikologischer Effekte charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Gewebe und Zellen

Die vorliegenden toxikologischen *in vitro* Untersuchungen wurden an humanen Chondrozyten und Lymphozyten durchgeführt. Die Lymphozyten wurden aus heparinisiertem Vollblut gewonnen. Die Blutproben stammten von Patienten der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Regensburg. Den Patienten wurden 20 ml Blut während ihrer Operation über einen schon vorhandenen Venenkatheter entnommen. Es waren daher keine zusätzlichen Komplikationen zu erwarten. Zur Kultivierung der primären Chondrozyten wurden hyaline Gewebeproben des Rippen- und Nasenknorpels verwendet. Das entnommene Material stammte von Patienten, die sich einer plastischen Korrektur der Nasenscheidewand oder einer Rekonstruktion der Ohrmuschel durch Rippenknorpel unterzogen. Bei diesen Eingriffen fallen in der Regel zur plastischen Rekonstruktion nicht benötigte Knorpelstücke an. Die Operationen fanden alle an der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Regensburg statt. Es wurden ausschließlich Gewebe- und Blutproben von Patienten ab dem 18. Lebensjahr verwendet. Die Lymphozyten stammten von 34 verschiedenen weiblichen und männlichen Patienten, die Knorpelproben von 6 verschiedenen weiblichen und männlichen Patienten. Die Patienten wurden über die wissenschaftliche Verwendung der Blutproben aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis entsprechend einem von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät empfohlenen Aufklärungsbogen (Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg, Projekt Nr. 03/100 2003; Projekt Nr. 04/224 2004).

2.2. Methoden spezifische Labormaterialien

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien aufgeführt.

Tabelle 2-1: Reagenzien

Enzyme und Hormone	Hersteller
Collagenase II	Gibco, Eggenstein
Insulin, Rekombinante humane (27.5 U/mg)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypsin/EDTA (0,02%)	Biochrom, Heidelberg
Chemikalien	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (NA ₂ EDTA)	Serva Elektrophorese GmbH, Heidelberg
EZ4U (Tetrazolium-Verbindung)	Biomedica, Wien, A
Fluoresceindiacetat (25 mg/ml in Aceton)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Low-Melting-Agarose (Sea-Plaque [®] GTG [®] -Agarose)	Cambrex Bio Science, Rockland, MA, USA

Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt
Natriumhydroxid (NaOH, wasserfrei)	Merck, Darmstadt
N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG)	Fluka, Neu Ulm
Normal-Melting-Agarose (Seakem [®] LE agarose)	Cambrex Bio Science, Rockland, MA, USA
Propidiumiodid (1 mg/ml Aqua bidest.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trishydroxymethylaminomethan (Trisma-Base)	Merck, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Trypanblau-Lösung	Gibco, Eggenstein
Medien	
Hersteller	
Aqua bidest.	Eigenherstellung
Biocoll separating Solution (Density 1.077)	Biochrom AG, Heidelberg
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
DMEM HAM'S F12 (mit L-alanyl-1-glutamin)	Biochrom AG, Heidelberg
DMEM HAM'S F12 (mit Natrium Bicarbonat, L-Glutamine)	PAA laboratories GmbH, Pasching
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS) (ohne Calcium und Magnesium)	PAA laboratories GmbH, Pasching
Fetales Bovine Serum (FCS)	Gibco, Eggenstein
Gentamycin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Non-Essential-Amino-Acids (NAA)	Biochrom AG, Heidelberg
Penicillin-Streptomycin (PS)	Biochrom AG, Heidelberg
RPMI 1640	Biochrom AG, Heidelberg
Lösungen	
Anleitung der Herstellung	
Agarose	Normal-Melting-Agarose (0,5%ig) und Low-Melting-Agarose (0,7%ig) jeweils in PBS unter Erhitzung in einer Mikroelle lösen und danach im Wasserbad bei 37 °C aufbewahren.
Elektrophoresepuffer	24 g NaOH (300 mM) und 0,744 g Na ₂ EDTA (1 mM) kurz vor der Elektrophorese in 2 l Aqua bidest lösen
Ethidiumbromid Färbelösung	10 mg Ethidiumbromid 50 ml Aqua bidest Ethidiumbromid unter Lichtausschluss im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahren. Kurz vor Gebrauch eine 1:10 Verdünnung mit Aqua bidest herstellen und steril filtrieren.

Knorpelmedium	450 ml DMEM HAM'S F12 10 % Fetales Kälberserum (FCS) 100 U/ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin (PS) 1 mM Non-Essential-Amino-Acids (NAA) 2,5 mg (68.75 U) Insulin 30 mg Gentamycin
Lysepuffer	1% Triton 10% DMSO 89% Lysestammlösung mischen und bei 4 °C aufbewahren.
Lysestammlösung	146,4 g NaCl (25 mM) 1,2 g Trizma Base (10 mM) 37,2 g Na ₂ EDTA (100 mM) 10 g (1%) N-Lauroylsarcosin Natrium Salz Bestandteile separat ansetzen und nach vollständiger Auflösung in 1 l Aqua bidest mischen. pH-Wert mit NaOH auf 8,5 einstellen und mit 1 M NaOH auf pH 10 justieren.
Neutralisationspuffer (400 mM)	48,5 g Trizma-Base in 990 ml Aqua bidest lösen, mit konzentrierter Salzsäure (10 mM) einen pH-Wert von 7,5 einstellen und mit Aqua bidest auf 1 l auffüllen. Bei Raumtemperatur aufbewahren.
Gefriermedium	90% FCS 10% DMSO
Trypanblau	0,5 g Trypanblau in 100 ml Aqua bidest lösen, zur Sterilisation aufkochen, erkalten lassen und filtrieren

Tabelle 2-2: Technische Ausstattung und Arbeitsmittel

Technische Ausstattung	Hersteller
Analysenwaage PM 5417 R	Ohaus, Gießen
Brutschrank, CO ₂ , Hera Cell Fabrik	Heraeus, Hanau
Digitales Auswertesystem Komet 4.0	Kinetik Imagine, Liverpool, UK
Eismaschine, Ziegra Eis	Isauhagen, Ziegra
Elektrophoresekammer (23,7 x 1,0 cm)	Renner, Dannstadt
Elektrophoresenetzgerät, Consort E865/E835	Renner, Dannstadt
Emax microplate reader	Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA

Fluoreszenzmikroskop DM LB Lichtquellen: Hg Gasentladungslampe 100 W Halogenlampe 12 V, 100 W Filter- und Reflektordaten: Filtersystem N 2.1; Eingangs-Bandfilter: 510-560 nm Bandpass; dichroitischer Teilspiegel: 580 nm; Ausgangs-Sperrfilter: 590 nm Langpass Objektive: 40x / 0,5; 10x / 0,22; 4x / 0,1	Leica, Benzheim
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch, Stuttgart
Gefriertruhe (-80 °C)	Heraeus, Hanau
Hochleistungs-Monochrom-CCD-Kamera Cohu 4912 (0,02 Lux 1/2 Sensor)	Cohu, San Diego, CA, USA
Inverses Mikroskop Axioverte 25 CFI Lichtquellen: Halogenlampe 6 V / 25 W; Quecksilberdampfampe HBO 50 W	Carl Zeiss Mikroskop, Jena
Inverses Mikroskop Axioverte 25 CFI Filter- und Reflektordaten: Filtersatz 09: Eingangs-Bandfilter: 450-490 nm Bandpass; Strahlteiler: 510 nm; Ausgangs-Sperrfilter: 515 nm Langpass Filtersatz 15: Eingangs-Bandfilter: 546/12 nm Bandpass; Strahlteiler: 580 nm; Ausgangs-Sperrfilter: 590 nm Langpass Objektive: 5x / 0,12; 10x / 0,25; 20x / 0,30; 40x / 0,50	Carl Zeiss Mikroskop, Jena
Kühlschrank (+5 °C)	Bosch, Stuttgart
Microsoft Excel Version 7.0	Microsoft, Unterschleißheim
Mikrowelle R 210A	Sharp, Hamburg
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
PowerShot G3, Digitale Kamera	Canon, Amsterdam, NL
GraphPad Prism 4	GraphPad Software, La Jolla, USA
Rührmagnettisch, RCTbasic,	IKA Werke, Staufen
Schüttelplatte, Swip SM 25	Edmund Bühler GmbH, Tübingen
Schüttelwasserbad, GFL 1083	Steiner, Siegen Elsfeld
SPSS Version 11.5	SPSS Software, München
Sterilbank Herasafe	Heraeus, Hanau
Vorschaltgerät für Quecksilberlampe HBO 50W IAC, Kurzbogenlampe mbq 50 ac-Serie	Leistungselektronik Jena GmbH LEJ, Jena
Zentrifuge Varifuge 3.0 RS und 3.0. R	Heraeus, Hanau
Arbeitsmittel	Hersteller
Deckgläser	Langenbrinck, Emmendingen
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson, Heidelberg

Flaschen mit Schraubverschluss	Merck, Darmstadt
Kryoröhrchen (2 ml)	Nalgene Company, Rochester, NY, USA
Neutralisationswanne	Assistent, Sondheim
Objekttägerkästen für 50 Objekttäger (76 x 26 cm)	GLW, Würzburg
Objekttäger (70 x 24 mm, je 5 mm seitlich mattiert)	Langenbrinck, Emmendingen
Petrischale	Becton Dickinson, Heidelberg
Pinzetten	Angiokard Medizintechnik, Friedensburg
Pipetten steril (2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner bioone, Frickhausen
Pipettenspitzen (10, 100, 200 und 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetus®-akku	Hirschmann, Laborgeräte
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Röhrchen mit Schraubverschluss (13, 15 und 50 ml)	Greiner bioone, Frickhausen
Schreibdiamant	Renner, Dannstadt
Skalpell Nr. 10 steril	Pfm (Produkte für die Medizin) AG, Köln
Stericup, steril	Millipore Cooperation, Bedford
Zählkammer nach Neubauer	Super Rior, Marienfeld
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Nümbrecht
Zellkulturplatten (24 Wells, 96 Wells)	Becton-Dickinson, Heidelberg
Zellschaber	TPP, Trasadingen, CH
Zellsieb (Talcen 35)	Becton-Dickinson, Heidelberg

2.3. Testsubstanzen

Im Folgenden sind die in vorliegender Arbeit auf Zyto- und Genotoxizität untersuchten Reinstoffen aufgeführt. Dextrose, Triethanolamin und Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol (PEG-PPG-PEG), sind Reinstoffen des Zellträgerpolymers.

Tabelle 2-3: Testsubstanzen

Testsubstanz	Hersteller
Dextrose	Sigma-Aldrich-Aldrich, Taufkirchen
Triethanolamin	Sigma-Aldrich-Aldrich, Taufkirchen
PEG-PPG-PEG	Sigma-Aldrich-Aldrich, Taufkirchen

2.3.1. Dextrose

Dextrose ist eine Aldohexose mit der Summenformel $C_6H_{12}O_6$ und einer Molmasse von 180,16. Dextrose liegt meist in der Pyranoseform, als α -D(+)-Glukopyranose vor, selten auch als Glukofuranose. Sie ist optisch aktiv und durch Hefe gärbbar. Dextrose kommt frei und als Polysaccharid in Glykogen, Stärke, Zellulose und Dextran, Glykosiden, Nukleotiden und Glyko-

lipiden vor. Dextrose stellt eine Schlüsselsubstanz im Kohlenhydratstoffwechsel dar. Der Körper kann Dextrose als Glykogen in Leber- und Muskelgewebe speichern oder auch in Fett umwandeln. Stoffwechselaktive Formen sind Glukose-6-Phosphat und UDP-Glukose. Sie stehen der Energiegewinnung zur Verfügung und können im Körper durch anaerobe Glykolyse zu Lactat und durch aerobe Glykolyse oder Pentosephosphatweg, Citratzyklus und oxidative Phosphorylierung zu CO₂ und H₂O abgebaut werden. Dextrose ist als Bestandteil biokompatibler Polyurethane grundsätzlich bekannt.

2.3.2. Triethanolamin

Triethanolamin, 2,2',2'-Nitrilotriethanol, Tris(2-hydroxyethyl)amin, wird auch als Trolamin bezeichnet und hat die Summenformel C₆H₁₅NO₃ und eine Molmasse von 149,19. Hergestellt wird Triethanolamin durch Ammonolyse von Ethylenoxid. Als Nebenprodukt entsteht 2-Aminoethanol und Diethanolamin. Es ist eine farblose, visköse, sehr hygroskopische Flüssigkeit, die bei Kälte zu einer kristallinen Masse erstarrt. Mischbar ist es mit Wasser, Aceton, Ethanol, Glycerol 85% und Methanol. Mit einem pH von 10,5 ist Triethanolamin stark basisch. Aufgrund seiner basischen Eigenschaften wird Triethanolamin als basische Komponente in Seifen, Kosmetika, als Netzmittel in Textilien, als Weichmacher in Leder, als Korrosionsinhibitor, als Dispergiermittel und in wasserlöslichen Herbiziden verwendet. Triethanolamin findet außerdem Gebrauch als Erstarrungs- und Erhärtungsbeschleuniger zur Zementherstellung. Triethanolamin wird über die Haut und den Gastrointestinaltrakt absorbiert und nach oraler Belastung zu 95% unverändert über die Nieren ausgeschieden. Nur ein kleiner Teil wird über die Cytochrom P450 Monooxygenase zu Diethanolamin, Ethanolamin und Glyoxylat metabolisiert. Über das kanzerogene Potential von Triethanolamin an Menschen und im Tierversuch besteht bislang Unklarheit, so dass Triethanolamin in die Gruppe 3, der nicht klassifizierbaren humanen Kanzerogene eingestuft wird [IARC, 2000]. Das gehäufte Auftreten von malignen Lymphomen, bevorzugt des Thymus, in weiblichen Mäusen nach oraler Langzeitbelastung mit Triethanolamin wurde beobachtet [Snyder, 1999]. Es kam zudem zu einer Häufung von Neoplasien der Leber, Endometriumskarzinomen und Nierenadenomen. Andere Studien zeigten eine fehlende Abhängigkeit des Auftretens von Neoplasien von der Triethanolamindosis [Konishi et al., 1992]. *In vitro* Untersuchungen zeigten bislang keine mutagene Wirkung von Triethanolamin [Snyder, 1999]. In Konzentrationen über 5% führt Triethanolamin nach Hautkontakt zu Hautirritationen [Ellenhorn und Barcebus, 1988]. Es wirkt nach subchronischer und chronischer Exposition nephrotoxisch und kann eine Demyelinisierung hervorrufen. Auch das gehäufte Auftreten von Asthma ist beschrieben. Von Gosselin et al. [1984] wurde Triethanolamin als leicht toxisch eingestuft. Die angenommenen letale orale Dosis des Menschen liegt bei 5-15 g/kg. Es wird angenommen, dass der toxische Effekt von Triethanolamin zu großen Teilen auf seinen basischen Eigenschaften beruht.

2.3.3. PEG-PPG-PEG

Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol, im Folgenden mit PEG-PPG-PEG abgekürzt, umfasst eine Gruppe von circa 30 verschiedenen, nichtionischen Kopolymeren, mit einem molekularen Gewicht zwischen 1000 und 14000. Es handelt sich um schaumarme und schaumdämpfende Blockpolymere aus Ethylenoxid (PEG) und Propylenoxid (PPG). Je

nach Ethoxylierungsgrad sind sie flüssig, pastös, fest oder pulverförmig. PEG-PPG-PEGs dienen zur Herstellung einer Reihe von Oberflächensubstanzen, Pharmazeutika, Kosmetika und Polyurethanen [Zhang et al., 2004]. Unter anderem finden PEG-PPG-PEGs als Poloxamere zur Dispergierung und Emulgierung in der chemisch-technischen Industrie Anwendung. Cao et al. beschrieb 1999 PEG-PPG-PEG Kopolymeren als Formulierung für Zellträger von Chondrozyten [Cao et al., 1999]. *In vitro* werden PEGs und PPGs bis zu 90% biologisch abgebaut. Die Abbauwege von PEGs und PPGs unterscheiden sich allerdings. Der Abbau von PEG erfolgt durch eine Kürzung der Ketten bis zu Ethylenglycol und Diethylenglycol. Beim Abbau von PPGs konnten dagegen keine kurzkettigen Abbauprodukte gefunden werden [Zgola-Grzeškowiak et al., 2006]. PEGs mit niedrigem molekularem Gewicht unterscheiden sich hinsichtlich ihrer physikochemischen Eigenschaften, ihrer biologischen Effekte auf die Zellpermeabilität und ihrer Resorption und Ausscheidung signifikant von solchen mit größerem molekularem Gewicht. PEGs mit einem molekularen Durchschnittsgewicht von 4000 und 6000 zeigen in Kleintiersversuchen nach fünf Stunden keine intestinale Aufnahme, während PEGs mit einem molekularen Gewicht von 1000 und 1540 eine geringfügige intestinale Resorption von bis zu 2% zeigten. In gleichen Studien konnte eine renale Elimination der PEGs gezeigt werden. Die renale Clearance von PEG 400, 1000, 1540 und 4000 ist identisch mit der Kreatinin-Clearance in gesunden, narkotisierten Tieren. PEGs wirken *in vivo* leicht parasymphomimetisch. Nach intravenöser Applikation erhöhen sie zudem die Blutaggregation und erhöhen somit auch die Emboliegefahr. Die Genotoxizität von PEG wird kontrovers diskutiert. Negative Ergebnisse wurden für PEG 6000 in einem Mäuse-Lymphom-Test [Mitchell et al., 1997], für PEG 300 und 400 im Schwesterchromatidaustausch-Test an Ovarzellen des chinesischen Hamster und im DNA-Synthese-Test [Anonymous, 1993] beschrieben. Ein fehlender Hinweis für Genotoxizität konnte für Tetraethylenglycol (TEG) im Ames- und im Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase-Test gezeigt werden [Slesinski, 1989]. In osmotischen Konzentrationen führte TEG dagegen zu Chromosomenschäden [Galloway et al., 1987]. Biondi et al. [2002] zeigten in Leberepithelzellen des chinesischen Hamsters die Induktion von Chromosomenaberrationen durch TEG in Konzentrationen ab 2,5 mM und durch PEG 200 in Konzentrationen ab 3 mM. PEG 400 zeigte dagegen kein genotoxisches Potential. Dies unterstützt die Annahme, dass die Genotoxizität von PEG-Polymeren mit ansteigendem molekularem Gewicht abnimmt.

2.3.4. Getestete Substanzkonzentrationen

Im Folgenden werden die an Chondrozyten und Lymphozyten in vorliegenden Experimenten untersuchten Substanzkonzentrationen erläutert. Die zytotoxischen Untersuchungen wurden entsprechend den Empfehlungen des Europäischen Komitees für Normung durchgeführt [2002, CEN, 1993]. Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden für eine jeweilige Substanz mit Konzentrationen bis 0,2 g/ml ermittelt. Weitere Dosis-Wirkungsuntersuchungen dienten einer genaueren Eingrenzung der Konzentrationen, unter deren Einfluss in den verwendeten *in vitro*-Testsysteme an Chondrozyten keine toxischen Effekte zu erwarten sind. In Tabelle 2-4 zeigt die verwendete Konzentration für die Dosis-Wirkungsuntersuchungen. Diese wurden mit einer Anzahl von mindestens 8 Messungen bestätigt. Anhand dieser Dosis-Wirkungsuntersuchungen wurden maximale Substanzkonzentrationen definiert, nach deren Inkubation die Proliferation der Chondrozyten nicht eingeschränkt sowie die Anzahl avitaler Zellen nicht erhöht war und sich keine morphologischen Schäden zeigten. Die so bestimmten Schwellenkonzentrationen

wurden an Lymphozyten auf Zyto- und Genotoxizität mit einer Anzahl von mindestens 15 Messungen hin geprüft. Zeigte sich eine toxische Wirkung, dienten weitere Dosis-Wirkungsuntersuchungen an Lymphozyten der Definition der maximalen Substanzkonzentration, nach deren Inkubation keine erhöhte DNA-Fragmentierung resultierte und die Vitalität der Lymphozyten nicht eingeschränkt war. Die Untersuchungen wurden mit mindestens drei Messungen bestätigt.

Tabelle 2-4: Untersuchte Substanzkonzentrationen

Testsubstanz	Konzentrationen
Dextrose	12,5 mg/ml, 25 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml,
PEG-PPG-PEG	5 mg/ml, 10 mg/ml, 20 mg/ml, 50 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml; 0,018 mg/ml, 0,037 mg/ml, 0,075 mg/ml, 0,15 mg/ml, 0,3 mg/ml
Triethanolamin	0,45 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1,8 mg/ml, 2,5 mg/ml 0,56 mg/ml, 0,68 mg/ml, 0,79 mg/ml, 0,9 mg/ml, 1,01 mg/ml

2.3.5. Inkubationsschema

Die Toxizitätsprüfung wurde durch direkten Kontakt der Testsubstanzen mit den Chondrozyten, respektive Lymphozyten, durchgeführt. Chondrozyten wurden zur Zytotoxizitätstestung 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ im Brutschrank mit den Testsubstanzen inkubiert. Dies entspricht den Empfehlungen des Europäischen Komitees für Normung [CEN, 1993]. Die Inkubation von Lymphozyten zur Zyto- und Genotoxizitätsprüfung erfolgte über 60 min bei 37 °C im Wasserbad [Green et al., 1992].

2.4. Methodik zum Zytotoxizitätsnachweis

2.4.1. Kultivierung von Chondrozyten

Bei Nasen- und Ohrmuscheloperationen im Operationssaal der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Regensburg anfallende Knorpelproben wurden in Knorpelmedium (DMEM HAM'S F12 + Fetales Kälberserum + Penicillin Streptomycin + Non-Essential-Amino-Acids + Insulin + Gentamycin) bei 4 °C aufbewahrt.



Abbildung 2-1: Sterile Zerkleinerung von Knorpel

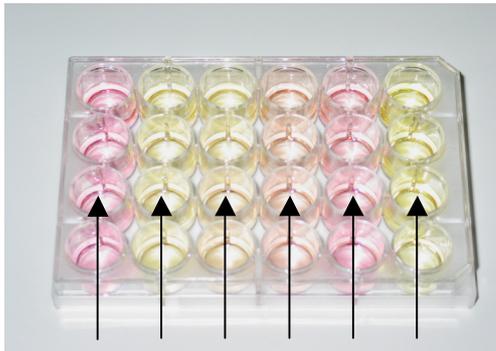
Unter sterilen Bedingungen wurde das Medium abgegossen. Der Knorpel wurde in einer Petrischale mit Hilfe eines Skalpells und einer Pinzette von Bindegewebe und Knochen befreit und in ca. 1 mm³ große Stückchen zerkleinert (Abb. 2-1). Um einzelne Chondrozyten zu gewinnen, wurde die extrazelluläre Knorpelmatrix enzymatisch durch Kollagenasen abgebaut. Für einen optimalen Verdau, wurde 1 g Knorpel mit 10 ml Kollagenase 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der 16 Stunden wurde die Kollagenase-Zell-Suspension

sion zum Stoppen des Knorpelverbaus bei 1500 Umdrehungen 5 Minuten lang zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Das Pellet wurde in 20 ml Knorpelmedium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche gegeben. Der Erhalt einer Reinkultur aus Chondrozyten wurde durch Lichtmikroskopie bei Phasenkontrast mit 50facher Vergrößerung bestätigt. Die Chondrozyten wurden bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Ein Mediumwechsel erfolgte dreimal wöchentlich. Die sich vermehrenden Chondrozyten wurden jeden Tag unter einem Lichtmikroskop bei Phasenkontrast betrachtet. Chondrozyten sind adhärent wachsende Zellen. War der Boden der Kulturflasche mit Zellen semikonfluent besiedelt, wurden sie auf weitere Kulturflaschen verteilt. Die Zellpassagierungen ermöglichte, sehr viele Chondrozyten aus einer kleinen Knorpelprobe zu züchten. Die maximale Passagezahl lag bei 8. Das Medium wurde steril entnommen und die Zellen mit einem Zellschaber von dem Boden der Kulturflasche abgelöst. Um alle Zellen zu erfassen wurde der Boden der Kulturflasche mit 60 ml DMEM HAM'S F12 Medium gespült, die Zellen in das Medium aufgenommen, durch ein Zellsieb vereinzelt und auf neue Kulturflaschen verteilt. Die Zellen wurden im bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert.

2.4.2. Vitalitätstest mit Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat

Die kultivierten Chondrozyten dienten nun einer Reihe von Untersuchungen, um die Zytotoxizität von Dextrose, PEG-PPG-PEG und Triethanolamin zu testen. Die Zytotoxizität wurde durch direkten Kontakt der Zellen mit den Testsubstanzen bestimmt. Als qualitatives, semiquantitatives Testverfahren ermöglichte eine Vitalitätsfärbung mit Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) die Beurteilung der Vitalität und der Proliferationsdichte der Chondrozyten. Zudem konnte die Morphologie, eine mögliche Vakuolisierung, eine Ablösung der Chondrozyten und eine Membran- bzw. Zellyse mit und ohne Zugabe der drei Reinsubstanzen beurteilt werden. Zur Inkubation mit den Substanzen und anschließender Färbung wurden Chondrozyten auf eine Kulturplatte mit 24 Vertiefungen, im Folgenden als Wells bezeichnet, passagiert. Für ein Experiment wurden Chondrozyten einer Zellkulturflasche mit gleicher Passagezahl verwendet. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber von dem Boden der Kulturflasche gelöst, und die genaue Zellzahl durch Zellzählung in Neubauer Zählkammern bestimmt. Die Zellzählung wurde kombiniert mit einer Trypanblau-Färbung, um die Vitalität der Zellen zu Beginn des Versuchs zu erfassen. Nur die Zellmembran avitaler Zellen ist für Trypanblau durchlässig, so dass eine deutliche Differenzierung von avitalen und vitalen Zellen möglich ist. 40 µl des Zellen enthaltenen Mediums wurden mit gleicher Menge an Trypanblau vermischt. 40 µl wurden in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert.

Unter dem Lichtmikroskop mit Phasenkontrast wurde bei 40facher Vergrößerung die Gesamtzellzahl und der prozentuale Anteil blauer und damit avitaler Zellen bestimmt. Es wurden vier Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro ml entspricht dem Produkt der gezählten Zellzahl mit 10⁴, dividiert durch vier. Pro Well wurden 15.000 Chondrozyten in 1 ml Knorpelmedium verteilt und über 24 h bei 37 °C und 5% CO₂ kultiviert. Das Medium aus den einzelnen Wells wurde abgesaugt und durch das die Testsubstanzen enthaltene Medium ersetzt. Jede Konzentration wurde in vier Wells pro Platte untersucht (Abb. 2-2). Als Negativ-Kontrolle wurde vier Wells 1 ml Knorpelmedium ohne weitere Zusätze hinzugefügt. Es folgte eine Inkubationszeit von 24 h bei 37 °C und 5% CO₂.



Kontrolle 5,0 2,5 1,8 0,9 5,9
24 h Inkubation mit Triethanolamin in
[mg/ml]

Abbildung 2-2: 24-Well Zellplatte mit Chondrozyten

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Chondrozyten mit einer Kombinationsfärbung aus FDA (25 mg/ml) und PI (1 mg/ml Aqua bidest) gefärbt. Ist die Membran der Zellen intakt, wird FDA von Esterasen in der Membran umgesetzt und fluoresziert grün. Ist die Zellmembran dagegen defekt, gelangt PI in die Zellen, interkaliert mit der DNA und fluoresziert orange-rot. So können vitale und avitale Zellen unterschieden werden. In Tabelle 2-5 sind die Anregungs- und Emissionsmaxima von PI und FDA aufgeführt.

Tabelle 2-5: Absorptions- und Emissionsmaxima von FDA und PI

	Anregungsmaximum λ	Emissionsmaximum λ
PI	536 nm	650 nm
FDA	488 nm	518 nm

Zur direkten Färbung der Zellen mit PI und FDA wurde den Zellen das Medium mitsamt den Testsubstanzen entzogen. Die Färbelösung wurde bei jedem Versuchsdurchgang aus 1 ml PI (1 mg/ml in Aqua bidest), 1 ml FDA (25 mg/ml in Aceton) und 60 ml NaCl frisch zubereitet und auf die Zellen gegeben. Nach einer Einwirkungsdauer von 30 Sekunden wurde mit dem Inversen Fluoreszenzmikroskop Axioverte 25 CFI, einem Filtersatz mit Grünanregung (546/12 nm) und Ausgangssperrfilter (590 nm), und einem weiteren Filtersatz mit Blauanregung (450-490 nm) und Ausgangssperrfilter (515), bei 50- und 200facher Vergrößerung die Vitalität der Chondrozyten, ihre Dichte und auch in gewissen Grenzen ihre Zellmorphologie erfasst. Die Auswertung erfolgte deskriptiv. Der Vergleich der mit PI und FDA gefärbten Chondrozyten nach Inkubation mit und ohne den Testsubstanzen wurde in Tabellen protokolliert. Berücksichtigt wurde die Dichte der Chondrozyten, der Anteil avitaler Zellen und morphologische Auffälligkeiten wie z.B. eine Veränderung der Adhärenz-Eigenschaften im Sinne abgerundeter Chondrozyten oder die Bildung von Vakuolen. Diese morphologischen Merkmale können Zeichen einer toxischen Schädigung der Zellen sein. Zeigte sich kein Unterschied der mit Testsubstanzen inkubierten Chondrozyten im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, wurde dies mit einem Gleichheitszeichen gekennzeichnet. Zeigte sich eine erhöhte/erniedrigte Dichte oder ein erhöhter/erniedrigter Anteil avitaler Zellen der Chondrozyten nach Inkubation mit Testsubstanzen so wurde dies durch einen nach oben/unten gerichteten Pfeil gekennzeichnet. Die Anzahl der angegebenen Pfeile beschreibt die Ausprägung des jeweils gekennzeichneten Merkmals. Ein zytotoxischer Schaden der Chondrozyten wurde angenommen, sofern ihre Dichte nach Inkubation mit einer Substanz im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle vermindert war, es zu Veränderungen auf morphologischer Ebene kam, oder aber eine hohe Anzahl avitaler, orange-rot fluoreszierender Zellen zu erkennen war. Mit einer über einen Tubus Adapter befestigten digitalen Kamera

wurde von jedem Versuchsansatz ein repräsentativer mikroskopischer Ausschnitt aufgenommen und gespeichert. In Abbildung 2-3 ist der Ablauf der Vitalfärbung dargestellt.

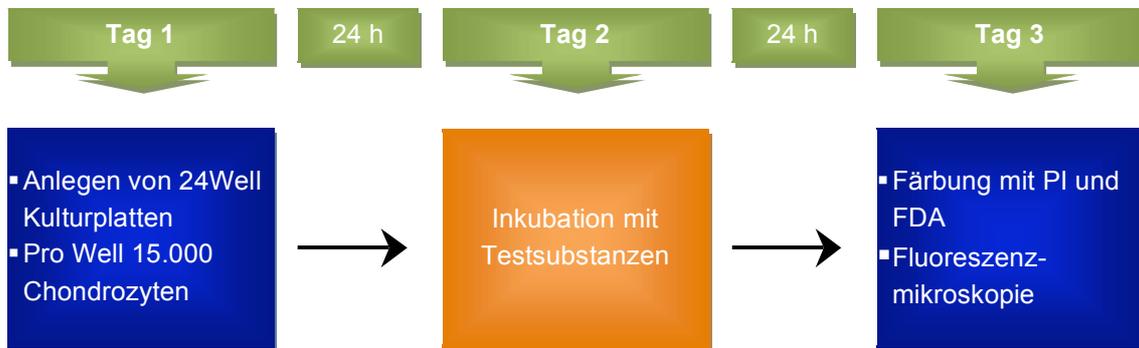


Abbildung 2-3: Versuchsaufbau Vitalfärbung

2.4.3. Proliferationstest mit Tetrazoliumsalzen

Für den quantitativen Nachweis der Proliferationsbeeinträchtigung der Chondrozyten durch die Testsubstanzen diente ein indirekter Proliferationstest, basierend auf der Umwandlung schwach gefärbter Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate in vitalen Zellen. Verwendet wurden Tetrazoliumsalze in Form eines Easy-For-You- (EZ4U) Kits. In den folgenden Ausführungen wird daher von einem EZ4U-Proliferationstest, bzw. dem EZ4U-Test gesprochen. Um den Proliferationstest durchführen zu können, wurden Chondrozyten auf 96Well Zellkulturplatten angesetzt. Für ein Experiment wurden Chondrozyten einer Zellkulturflasche mit gleicher Passagezahl verwendet. Um eine gleichmäßige photometrische Messung im weiteren Verlauf zu ermöglichen, ist eine gute Vereinzelung der Chondrozyten Voraussetzung. Die Chondrozyten wurden daher zur Passage enzymatisch durch Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche bei 37 °C gelöst. Das Knorpelmedium wurde entnommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Pro Zellkulturflasche wurden 5 ml Trypsin/EDTA (0,05%) auf die Zellen gegeben. Es folgte eine Einwirkdauer von wenigen Sekunden unter Beobachtung mit einem Lichtmikroskop bei Phasenkontrast. Bei ersten mikroskopisch sichtbaren Zeichen einer Lösung der Zellen aus ihrem Zellverband, wurde das Trypsin vorsichtig entnommen. Die folgende Zugabe von Knorpelmedium zu den Zellen beendete den Verdauungsprozess des Trypsins. Die Chondrozyten wurden in das Medium aufgenommen, durch ein Zellsieb vereinzelt und in einer Neubauer Kammer gezählt. Die festgelegte Zellzahl pro Well betrug 4000 Zellen in 100 µl Knorpelmedium. Nach Kultivierung der Chondrozyten über 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ folgte die Kontrolle nach einem regelrechten Wachstum unter einem Lichtmikroskop bei Phasenkontrast. Bei konfluentem Zellwachstum wurde das Medium allen Wells entnommen. Die Prüfsubstanzen wurden in den zu untersuchenden Konzentrationen in 100 µl frischem Knorpelmedium zu den Zellen in je 8-16 Wells pipettiert. Als Negativ-Kontrolle dienten 16 Wells mit Knorpelmedium ohne weitere Prüfsubstanzen. Es folgte eine Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C und 5% CO₂ von 24 Stunden. Grundlage des Proliferationstests mit EZ4U sind Tetrazoliumsalze, die von Mitochondrien lebender Zellen zu Formazanderivaten verarbeitet werden (Abb. 2-4).

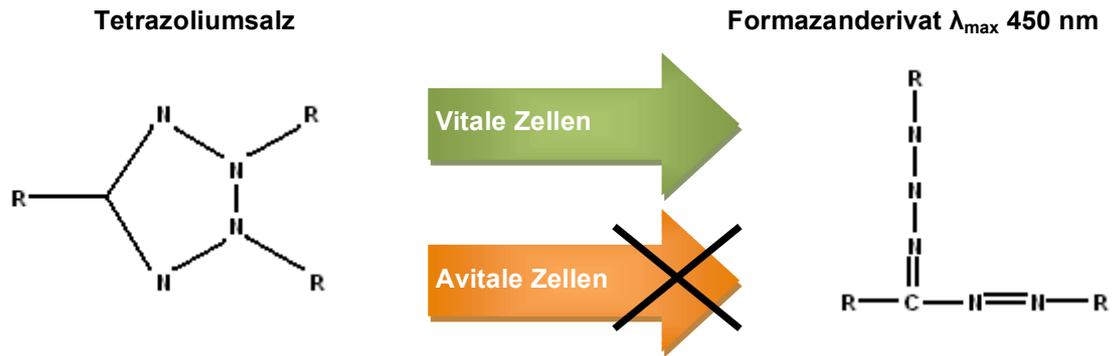


Abbildung 2-4: Umwandlung von Tetrazoliumsalz in Formazanderivate [nach Reichl, 2002]

Das spezifische Absorptionsmaximum der Formazanderivate bei einer Wellenlänge von λ_{\max} 450 ermöglicht eine photometrische Messung, aus der man auf das Vorhandensein vitaler Zellen schließen kann. Die Extinktion ist nach dem Lambert-Beerschen Gesetz proportional zur Konzentration des Formazanderivats. Der Wert der Extinktion ist somit ein Indikator für die Zellvitalität, und erlaubt indirekt quantitativ Rückschlüsse auf die Zellproliferation. Die Auflösung des lyophilisierte EZ4U Substrats erfolgte in 2 ml einer Aktivatorlösung. Pro Well wurden 20 μ l des Substrats zu der Zellkultur gegeben. Es folgte eine dreistündige Inkubation bei 37 °C und 5% CO₂ mit dem Substrat. Vor der Proliferationsmessung sollte die Zellkulturplatte leicht geschüttelt werden, um das EZ4U Substrat besser zu vermischen und somit eine erhöhte Streuung der Messwerte zu vermeiden. Ein Emax Mikroplattenlesegerät diente der photometrischen Messung der Extinktion bei 450 nm. Die Extinktion eines Blindwertes (Substrat ohne Zellen) wurde von dem Messwert abgezogen. Mit Hilfe eines zweiten Referenzwertes bei 620 nm sollten Dichtestörungen durch Fingerabdrücke vermieden werden. Die Werte der Extinktion wurden in "Absorbance Units" (AU) angegeben. Die gemessenen Daten wurden in Microsoft Excel Format gespeichert. In Abb. 2-5 ist der Ablauf des beschriebenen Proliferations-ELISA dargestellt.

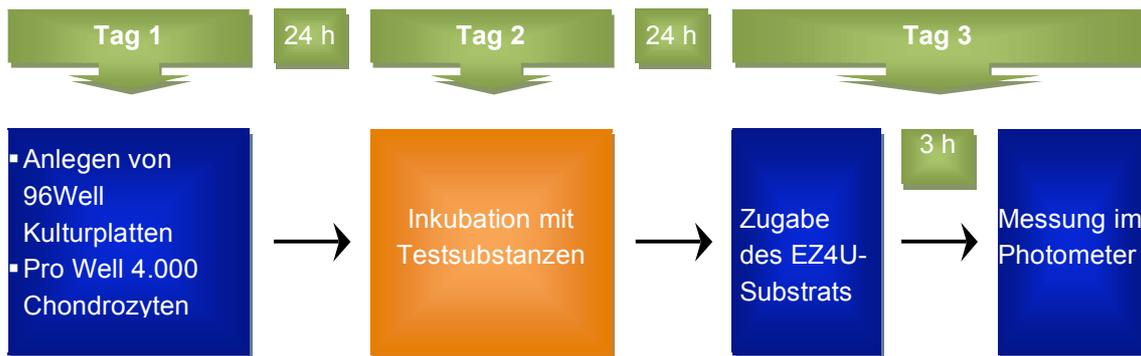


Abbildung 2-5: Versuchsaufbau EZ4U-Proliferationstest

2.5. Methodik zum Genotoxizitätsnachweis

2.5.1. Lymphozytenisolierung

Heparinisierte Blutproben wurden im Laufe von Operationen an der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Regensburg mit Einverständnis der Patienten entnommen. Die Lymphozyten wurden noch am gleichen Tag aus dem Vollblut isoliert. Zu 18 ml Vollblut wurden 9 ml PBS in ein 45 ml Falconröhrchen pipettiert. Vorsichtig wurde das mit PBS gemischte Blut auf 15 ml Biocoll in ein weiteres 45 ml Falconröhrchen geschichtet, ohne das sich die Flüssigkeiten vermischten. Durch 20 Minuten lange Zentrifugation bei 2000 U/min ohne Bremseneinstellung entstand zwischen der Plasma- und der Biocollschicht ein lymphozytenhaltiger Streifen, der Buffy Coat (siehe Abb. 2-6). Dieser wurde mit einer sterilen Pasteurpipette aufgenommen und zu 15 ml PBS gegeben. Es folgte eine 10 Minuten lange Zentrifugation bei 2000 U/min mit Bremse. Der Überstand wurde dekantiert, das Zellpellet vorsichtig resuspendiert und in 1 ml FCS aufgenommen. Zur Zellzählung in einer Neubauer Zellzählkammer wurden 40 µl der Suspension in einem 1:1 Verhältnis mit Trypanblau gemischt. Es wurden

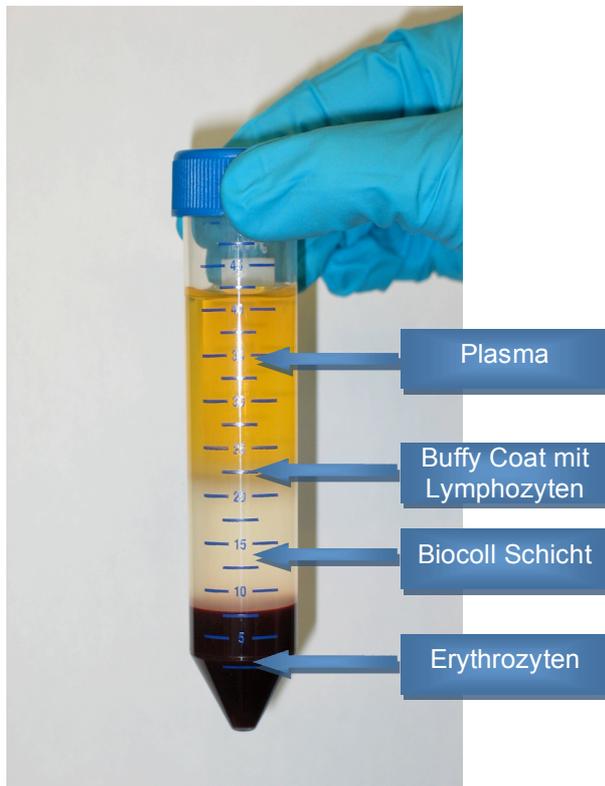


Abbildung 2-6: Mit Biocoll und PBS zentrifugiertes Vollblut zur Gewinnung von Lymphozyten. Der Buffy Coat, eine Schicht mit Lymphozyten, ist zwischen der Plasma- und der Biocollschicht zu erkennen

aufgenommen. Vitalitätsbestimmung und Zellzählung der Lymphozyten erfolgten, wie unter 2.3.1. beschrieben, mittels Trypanblau. Eine toxikologische Untersuchung erfolgte ausschließlich bei Vitalitäten über 85%.

vier Großquadrate ausgezählt. Die Zellzahl pro ml entspricht dem Produkt der gezählten Zellzahl mit 10^4 , dividiert durch vier. Zum Einfrieren der Lymphozyten sollten diese mit einer Anzahl von je 1×10^6 auf Kryoröhrchen verteilt werden. Den Lymphozyten wurde eine der Zellzahl entsprechende Menge FCS und 10% DMSO hinzu gegeben. Mit einem bei -80 °C aufbewahrten Kälteblock erreichte man ein langsames Einfrieren der Lymphozyten bis auf -80 °C . Die Lymphozyten können somit auch über einen längeren Zeitraum aufgehoben werden.

Die eingefrorenen Lymphozyten wurden jeweils direkt vor der Durchführung einer toxikologischen Untersuchung aufgetaut, in 9 ml PBS gewaschen und 10 min lang bei 2000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1 ml RPMI Medium

2.5.2. Genotoxizitätstest und Zytotoxizitätstest an humanen Lymphozyten

Zum Nachweis von Genotoxizität an Lymphozyten wurde die alkalische Version der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (MGE) bei einem pH von 13,0 im Rahmen des Comet Assays angewendet. Unter alkalischen Bedingungen dient die MGE dem Nachweis von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen und inkompletten DNA-Exzisionsreparaturen. Hierbei werden durch Zelllyse und Alkalisierung erhaltene DNA-Einzelstränge je nach Größe und Ladung der z.B. in Folge von Strangbrüchen entstandene DNA-Fragmente elektrophoretisch aufgetrennt.

Um eine elektrophoretische Auftrennung der DNA zu ermöglichen, müssen die Zellkerne auf Objektträgern von Agarose umschlossen sein. Agarose ist ein lineares, aus Seetang extrahiertes Polysaccharid. Durch Erstarren zuvor erhitzter Agarose bildet sich eine homogene Gelmatrix. Die Zellen kommen zwischen einer Grund- und einer Deckschicht aus Agarose zu liegen. Die verwendeten Agaroseprodukte wurden durch kurzes Erhitzen bei 180 W in der Mikrowelle in PBS gelöst und bis zur weiteren Verwendung im Wasserbad bei 37 °C aufbewahrt. Nach der Beschriftung mit einem Diamantstift erhielten die Objektträger die Grundbeschichtung aus 85 µl einer 0,5%igem Seakem Agarose. Um ein Ablösen der Agarose während der Elektrophorese zu vermeiden, wurden seitlich mattierte Objektträger verwendet. Die Agarose wurde mit Deckgläsern bedeckt, welche bei Verwendung der Objektträger mit einem Skalpell wieder entfernt wurden. Die beschichteten Objektträger trockneten 36 Stunden bei Zimmertemperatur.

Am Versuchstag wurde in beschriftete 15 ml-Röhrchen je 750 µl RPMI Medium sowie 150 µl FCS gegeben. Die Testsubstanzen wurden in der gewählten Konzentration pro ml hinzugefügt. Für jeden Ansatz wurden 3 Röhrchen vorbereitet. Drei Röhrchen dienten der Negativ-Kontrolle ohne weitere Zusätze, und drei weitere der Positiv-Kontrolle mittels 10 µl/ml 17%igem N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG). Die Durchführung aller weiteren Versuchsschritte erfolgte in abgedunkelten Räumen, um das Risiko von Strahlenschäden durch Tageslicht oder elektrischem Licht zu minimieren. Die zuvor eingefrorenen Lymphozyten wurden gemäß 2.5.1. aufgetaut und die Vitalität anhand der Trypanblaufärbung bestimmt. Lag die Vitalität über 85%, wurden je 100 µl der Zellsuspension in die vorbereiteten Röhrchen gegeben und eine Stunde lang im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Nach Ablauf der Stunde wurde erneut die Vitalität der Lymphozyten überprüft. Wie schon unter 2.2.2. erwähnt, ist nur die Zellmembran avitaler Zellen für Trypanblau durchlässig, so dass eine deutliche Differenzierung von avitalen und vitalen Zellen möglich ist. Die Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau stellte hiermit das Testverfahren zur Zytotoxizitätsbestimmung an Lymphozyten nach einstündiger Inkubation mit den Testsubstanzen dar. Um die Vitalität der Lymphozyten in Prozent zu berechnen, wurde die Zahl der ungefärbten, vitalen Lymphozyten durch die Gesamtzahl der Lymphozyten dividiert und mit 100 multipliziert. Die Zellzählung und Vitalitätsbestimmung erfolgte an den inkubierten Zellen aus einem der drei pro Substanz und Konzentration vorbereiteten Röhrchen. Der Versuchsvorgang nur bei Vitalitäten über 75% weiter geführt. Bei Vitalitäten unter 75% muss bei der Interpretation der im Folgenden beschriebenen Kometen von einer zytotoxischen Komponente ausgegangen werden, so dass Genotoxizitätstests mit der alkalischen Version der MGE nicht aussagekräftig erscheinen. Die Zellen aus den anderen zwei Röhrchen wurden nun in 75 µl 0,7%iger SeaPlaque Agarose aufgenommen, durchgespült, auf vorbereiteten Objektträgern aufgetragen und mit einem Deckglas geschützt. Um das Erstarren der Agarose zu beschleunigen, lagen die Objektträger auf einer gekühlten Metallplatte. Nach ca. 3 min Trockenzeit wurde, nach Entfernen der Deckgläser, eine Deckschicht von 85 µl 0,7%iger SeaPlaque Agarose auf

die Objektträger appliziert, und durch Deckgläser geschützt. Nachdem die Zellen nun mit Agarose auf die Objektträger geschichtet und gehärtet waren, konnten die Deckgläser mit Hilfe eines Skalpell entfernt werden. Zur Freilegung der DNA für die anschließende Elektrophorese wurden Zell- und Kernmembran der eingebetteten Zellen mindestens eine Stunde lang bei 4 °C unter alkalischen Bedingungen lysiert. Hierzu wurden die Objektträger Rücken an Rücken in Lysekammern zu je 80 ml Lysepuffer, pH von 10,0. Der Lysepuffer wurde im Kühlschrank bei 4 °C vorgekühlt. Eine 23,7 × 18,0 cm große Elektrophoresekammer wurde in ein mit Eis gefülltes Becken gestellt und an den Libellen ausgerichtet. Der Elektrophoresepuffer mit einem pH von 13,2, welcher der Entspiralisierung der DNA dient, wurde bei jedem Versuch neu hergestellt, kurze Zeit bei 4 °C gekühlt und in die Elektrophoresekammer bis zur Objektträgeroberfläche blasenfrei eingefüllt. Der Wasserstand des Eisbeckens sollte dem Pufferstand in der Elektrophoresekammer entsprechen. Die Objektträger wurden nach Ablauf der Lyse auf die mit Elektrophoresepuffer benetzte Tragfläche von der Anode ausgehend in die an ein Netzgerät angeschlossene Elektrophoresekammer gelegt und mit Elektrophoresepuffer bedeckt. Nach 20 min langer Entspiralisierung lief die Elektrophorese unter alkalischen Bedingungen bei 300 mA und 25 V. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist direkt proportional der angelegten Spannung und der Ladung. Sie hängt des Weiteren ab von der Länge und Konformation der DNA, vom pH-Wert, der Zusammensetzung des Gelpuffers und der Konzentration der Agarose im Gel bei DNA-Molekülen bis zu einer Länge von maximal 50 kb. Eine genaue Einstellung der Stromstärke war aufgrund des proportionalen Zusammenhangs mit erhöhter Pufferzugabe möglich. Nach abgelaufener Elektrophorese wurden die Objektträger in einer Abtropfwanne dreimal mit einem Neutralisationspuffer bei pH 7,5 gewaschen und dann luftgetrocknet. Die DNA wurde abschließend mit 7,5 µl 1:10 verdünntem Ethidiumbromid (Merck, Dannstadt) gefärbt. Ethidiumbromid ist ein extrinsischer Fluoreszenzfarbstoff. Es interkaliert mit seinem Ringsystem zwischen Basenpaare. Dadurch wird es fixiert und seine Fluoreszenz gegenüber freiem Ethidiumbromid in Lösung erhöht. Ethidiumbromid wird bei einer Wellenlänge von 510 nm (grüner Bereich) angeregt, und emittiert Energie mit einer Wellenlänge von 595 nm (oranger Bereich). Da die Emission effizienter im Nukleinsäure-Ethidiumbromidkomplex erfolgt, werden selbst kleine Nukleinsäuremengen im Hintergrund ungebundenen Ethidiumbromids sichtbar. Ethidiumbromid interkaliert in Einzelstrang- und Doppelstrangnukleinsäuren [Waring, 1965]. Es konnte sich nun eine digitale Auswertung der entspiralisierten, aufgespalteten DNA anschließen. Zum Aufbewahren wurden die Objektträger bei 4 °C in lichtgeschützten, feuchten Kästen gelagert. In Abbildung 2-7 ist der Versuchsablauf systematisch aufgeführt.

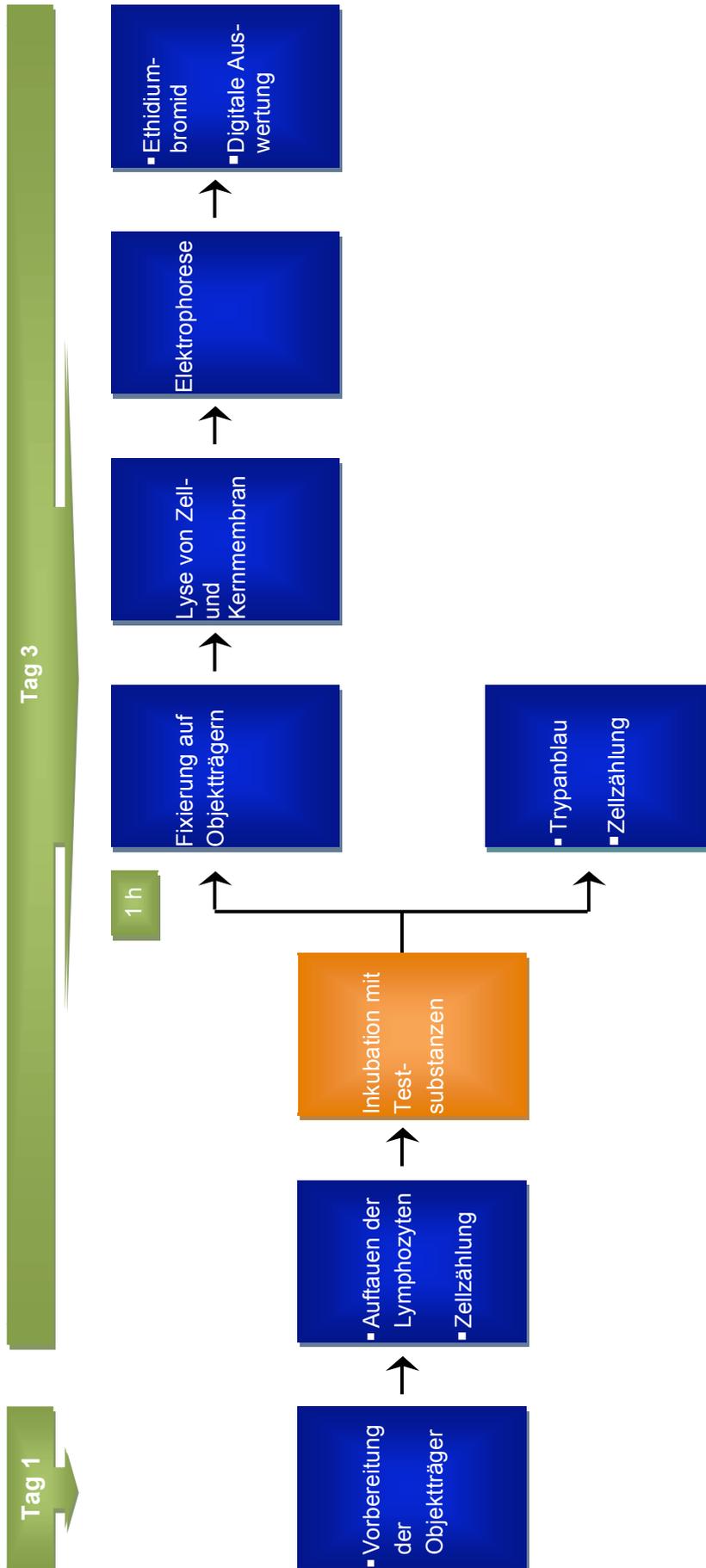


Abbildung 2-7: Versuchsaufbau des Comet Assays

2.5.3. Digitale Auswertung

Die computerassistierte Auswertung der Migration der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA erfolgte mit Hilfe eines DM LB Fluoreszenzmikroskops unter Verwendung eines Filtersystems mit Grünanregung (515 - 560 nm) und Ausgangssperrfilter (590 nm) bei 400facher Vergrößerung. Eine Monochrom-CCD Kamera digitalisierte das mikroskopische Bild. Das digitale Auswertesystem Komet Data 4.0 ermittelte automatisch an einem vom Auswerter gewählten Zellkern den OTM (Olive Tail Moment). Durch schädigende Substanzen entstandene DNA-Fragmente wandern in der Elektrophorese anodenwärts der ungeschädigten DNA im Kern voraus. Es ergibt sich das Bild eines Kometen, wobei der Kometenkopf den ungeschädigten, und der Kometenschweif den geschädigten Teil der DNA enthält.

Je stärker nun die durch die Noxe hervorgerufene Fragmentierung der DNA ist, um so länger, breiter und intensiver ist der Kometenschweif zu erkennen. Unter alkalischen Bedingungen hängt das Ausmaß der DNA-Migration von entstandenen Strangbrüchen und alkalilabilen Stellen ab [Kleinsasser et al., 2001]. Aus dem Produkt des Mittelwertes der Wanderungstrecke mit dem Prozentsatz der DNA im Schweif errechnet sich der Olive Tail Moment "OTM" (siehe Abb. 2-8). Der OTM diente zur Bestimmung der DNA-Schädigung als Maß für die Genotoxizität [Olive und Banath, 1993]. Der OTM bezieht sich auf die Wanderungstrecke in μm , wird üblicherweise aber ohne Einheit angegeben.

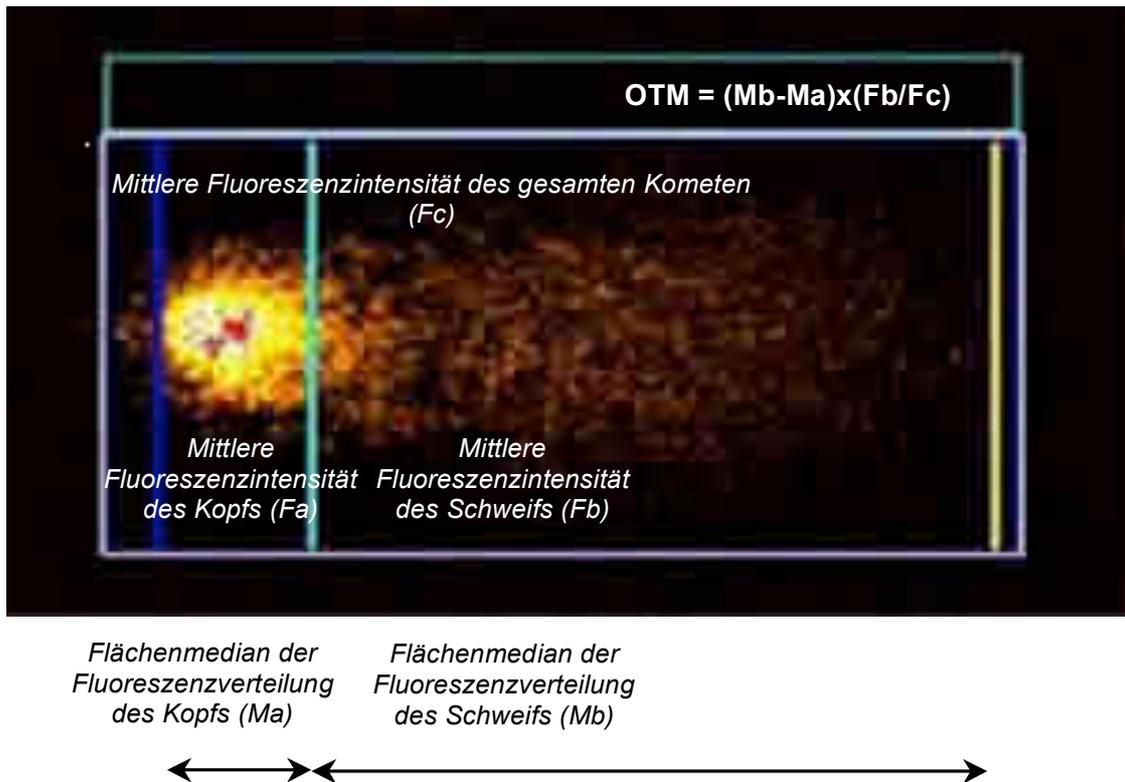


Abbildung 2-8: Mikroskopisches Bild eines Zellkerns nach der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese mit 400facher Vergrößerung und Formel zur Berechnung des OTM

Pro Substanz und Konzentration wurde das Fluoreszenzmuster von insgesamt 100 Zellen auf zwei identisch behandelten Objektträger bestimmt. Die Auswertung erfolgte weitgehend auto-

matisiert, wobei der Auswerter pro Objektträger 50 Zellen auswählen musste, die für das Schädigungsniveau des Versuchansatzes repräsentativ waren. Um eine subjektive Verfälschung der Auswahl auszuschließen und somit die Beobachtungsgleichheit bei der Versuchsauswertung zu gewährleisten, wurden die Objektträger der Versuchsansätze blind ausgewertet, sprich ohne das Wissen, um welchen Versuchsansatz es sich gerade handelt [Tice et al., 2000]. Zu diesem Zweck wurden die einzelnen Objektträger mehrerer Versuche, die durch eingravierte Nummern eindeutig kodiert waren, randomisiert und dann ausgewertet. Um korrekte Messergebnisse zu gewährleisten, wurde es vermieden, Zellen im Randbereich des Objektträgers auszuwerten. Die Messergebnisse wurden in einer Datei im Microsoft Excel-Format gespeichert. Pro Versuchsansatz ging der arithmetische Mittelwert der OTM-Werte der jeweils gemessenen 100 Zellen in die weiteren Berechnungen ein.

2.6. Grafische Darstellung der Ergebnisse und statistische Analyse

2.6.1. Boxplots

Die photometrisch gemessenen Werte der optischen Dichte als quantitatives Maß für die Proliferation der Chondrozyten wurden, ebenso wie die Vitalität der Lymphozyten, in Boxplots grafisch dargestellt. Dargestellt sind die im EZ4U-Proliferationstest und Trypanblau-Ausschlusstest erhaltenen Rohdaten. Beim Comet Assay ging für jeden Versuchsansatz der arithmetische Mittelwert der OTM-Werte der 100 gemessenen Lymphozyten in die weitere Berechnung ein. Die so errechneten Daten wurden auf die jeweilige Negativ-Kontrolle bezogen. Die Negativ-Kontrolle wurde gleich eins gesetzt. Die Daten wurden grafisch in Boxplots dargestellt. Das Datenprogramm SPSS™ 11.5 diente dem Erstellen der Boxplots (Abb. 2-9).

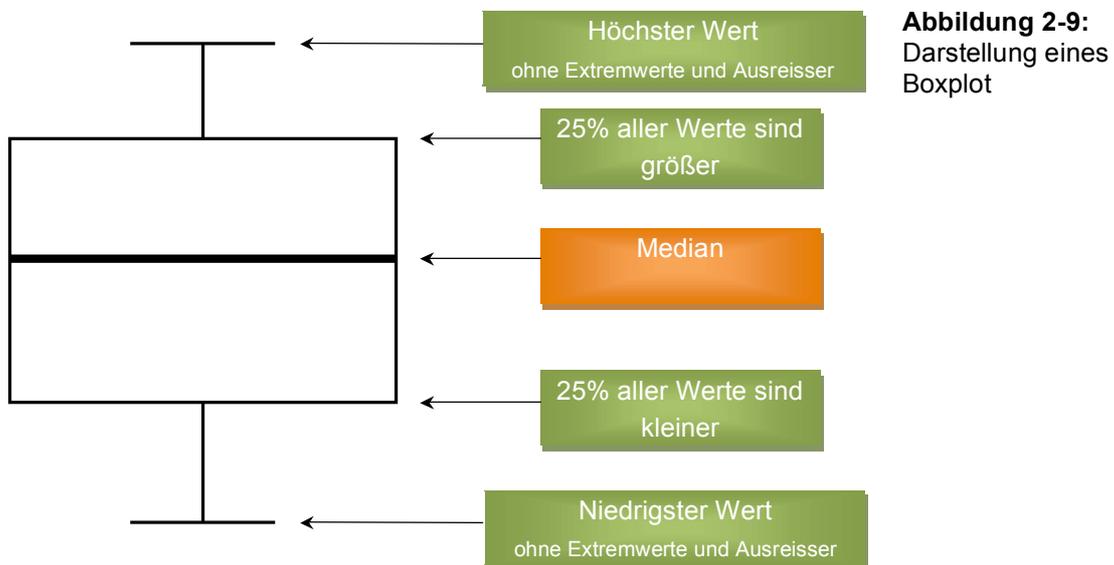


Abbildung 2-9:
Darstellung eines Boxplot

Der Boxplotkasten repräsentiert 50% der Messwerte. Die untere Linie des Boxplotkastens entspricht dem 1. Quartil, d.h. 25% aller Werte sind kleiner, die obere Linie entspricht dem 3. Quartil, d.h. 25% aller Werte sind größer. Die horizontale Linie in dem Kasten gibt den Median wieder. Der Median ist der Wert, der von höchstens der Hälfte aller Werte unterschritten und

von höchstens der Hälfte aller Werte überschritten wird. Die in den Boxplots dargestellte T-Linie gibt den höchsten Wert an, die umgekehrte T-Linie den niedrigsten, es sei denn es liegen Extremwerte, d.h. Werte, die mehr als drei Kastenlängen außerhalb liegen oder Ausreißer, d.h. Werte, die mehr als eineinhalb Kastenlängen außerhalb liegen, vor. Diese werden in der Boxplotdarstellung durch Sterne (Extremwerte) und Kreise (Ausreisser) gekennzeichnet.

2.6.2. Statistische Testverfahren

Die statistische Analyse der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Datenprogramms SPSS™ 11.5 durchgeführt. Die Abhängigkeit der Dosis-Wirkungsbeziehung der Zyto- und Genotoxizität der Testsubstanzen an Lymphozyten und Chondrozyten wurde mit dem Friedman-Test berechnet. Der Friedman-Test ist ein nicht parametrisches Verfahren, das verteilungsunabhängig ist und auf Rängen basiert [Friedman, 1937]. Er prüft die Nullhypothese, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen k verbundenen Stichproben gibt. Bei der hier benutzten Fragestellung besagt die Alternativhypothese, dass k Stichproben sich signifikant unterscheiden.

Der Unterschied wurde als p -Wert, als Wert der asymptotischen Signifikanz, angegeben und mit dem globalen Signifikanzniveau, als α_g -Niveau bezeichnet, verglichen. Das globale α_g -Niveau wurde mit $p = 0,05$ bzw. 5% definiert. Liegt der p -Wert k verbundener Stichproben unter diesem Signifikanzniveau von 0,05, so ist ein signifikanter Unterschied der k verglichenen Proben festzustellen, die Nullhypothese kann also verworfen werden. Liegt der p -Wert über dem Signifikanzniveau von 0,05, so ist kein Unterschied der Proben festzustellen, die Alternativhypothese kann also verworfen werden.

Zur Berechnung des Unterschiedes der einzelnen Ergebnisse zur Zyto- und Genotoxizität der Testsubstanzen an Lymphozyten und Chondrozyten und der entsprechenden Negativ-Kontrolle, wurde der Wilcoxon-Test für zwei verbundene Stichproben angewandt. Wie der Friedman-Test ist der Wilcoxon-Test ein nicht parametrisches Verfahren, das verteilungsunabhängig ist und auf Rängen basiert [Wilcoxon, 1945]. Er prüft die Nullhypothese, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen zwei verbundenen Stichproben gibt. Bei der hier benutzten Fragestellung besagt die Alternativhypothese, dass zwei verbundene Stichproben sich signifikant unterscheiden.

Der Unterschied wurde als p -Wert, als Wert der asymptotischen Signifikanz, angegeben. Das globale α_g -Niveau wurde mit $p = 0,05$ bzw. 5% definiert. Um die Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Paarvergleichen zu neutralisieren, wurde die Bonferroni-Holm-Korrektur angewandt. Durch den Algorithmus der Bonferroni-Holm-Korrektur werden lokale Signifikanzniveaus, als lokale α -Niveaus bezeichnet, berechnet, mit denen die p -Werte verglichen werden. Alle Null-Hypothesen, deren p -Werte kleiner als das lokale α -Niveau waren, werden zurückgewiesen. Mit der Null-Hypothese, deren p -Wert größer als das lokale α -Niveau wurde, werden alle folgenden Null-Hypothesen beibehalten und zwar unter dem globalen Signifikanzniveau.

Zur Evaluation des allgemeinen zytotoxischen Potentials der Reinsubstanzen *in vitro* wurde die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) in mg/ml nach nicht linearer Regression der Dosis-Wirkungsbeziehung der Reinsubstanzen auf die Proliferation von Chondrozyten mit GraphPad Prism 4 berechnet. Die EC_{50} mm spiegelt die mittlere Konzentration einer jeweiligen Substanz wieder, bei der die Dichte der Zellen, gemessen in der Absorption von Formazan, um die Hälfte eingeschränkt ist.

3. Ergebnisse

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchungen aufgeführt. Die Testsubstanzen, Dextrose, Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol (PEG-PPG-PEG) und Triethanolamin, wurden unabhängig voneinander untersucht. Zunächst ist jeweils die Dosis-Wirkungsbeziehung der Zytotoxizität der Reinsubstanzen an Chondrozyten dargestellt. Aufgeführt sind mit dem EZ4U-Proliferationstest untersuchte Dosis-Wirkungskurven zur indirekt quantitativen Beurteilung der Zellproliferation. Im Anschluss abgebildete Aufnahmen der mit Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiaceat (FDA) gefärbten Chondrozyten ermöglichen eine Beurteilung der Morphologie, der Vitalität und des Wachstums der Chondrozyten. Weiter sind Untersuchungen der maximalen Substanzkonzentrationen, die *in vitro* zu keinem zytotoxischen Effekt an Chondrozyten führte, an Lymphozyten dargestellt. Abgebildet sind die Ergebnisse zur Zytotoxizität, ermittelt durch den Trypanblau-Ausschlusstest, und zur Genotoxizität, ermittelt durch den Comet Assay. Zeigt sich im Rahmen der Untersuchungen eine zyto- oder genotoxische Wirkung dieser Schwellenkonzentrationen an Lymphozyten, ist die jeweilige Dosis-Wirkungsbeziehung der Testsubstanzen an Lymphozyten aufgeführt.

3.1. Zytotoxizität und Genotoxizität von Dextrose

3.1.1. Zytotoxizität an humanen Chondrozyten

Als indirekt quantitatives Maß für die Wirkung von Dextrose auf die Proliferation der Chondrozyten wurde der EZ4U-Proliferationstest durchgeführt. Abbildung 3-1 zeigt die Werte der Extinktion in Abhängigkeit zur Dextrosekonzentration.

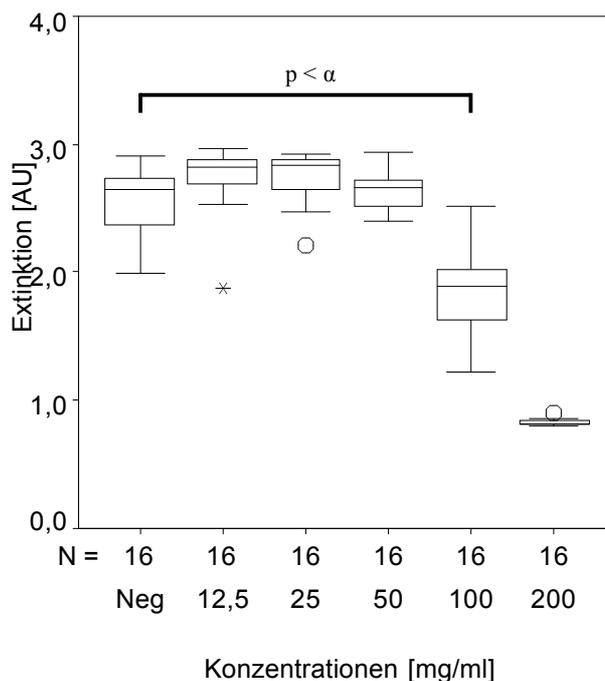


Abbildung 3-1:

Chondrozytenproliferation nach Inkubation mit Dextrose in Konzentrationen von 12,5 mg/ml bis 200 mg/ml.

x-Achse:

Dextrosekonzentrationen. Der Kontrollansatz (Neg) wurde ohne Zugabe zusätzlicher Substanzen durchgeführt. N: Anzahl der Versuche. \circ : Ausreißer. *: Extremwerte.

y-Achse: Extinktion von Formazan bei 450 nm als indirekt quantitatives Maß für die Proliferation

Eine signifikant unterschiedliche Proliferation der Chondrozyten in Abhängigkeit zur untersuchten Dextrosekonzentration ist zu erkennen (Tab. 3-1).

Tabelle 3-1: p-Werte der Unterschiede der optischen Dichte, ermittelt durch den Friedman-Test. Das Signifikanzniveau wurde als 0,05 definiert

EZ4U-Proliferationstest: Dextrose	
p-Werte	p = 0,001

Es besteht kein signifikanter Unterschied der Extinktion nach Inkubation der Chondrozyten mit 12,5, 25 und 50 mg/ml Dextrose gegenüber der Negativ-Kontrolle. Chondrozyten nach Inkubation mit 100 und 200 mg/ml zeigen eine signifikant eingeschränkte Proliferation (Tab. 3-2). Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) von Dextrose nach nicht linearer Regression der Dosis-Wirkungsbeziehung auf die Proliferation der Chondrozyten liegt bei 108,6 mg/ml.

Tabelle 3-2: p-Werte der Unterschiede der Extinktion gegenüber der Negativ-Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das globale Signifikanzniveau wurde als 0,05 definiert. p-Werte unterhalb des lokalen α -Niveaus sind grau hinterlegt

	Neg	12,5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml
Mittelwert	2,575	2,737	2,751	2,633	1,849	0,827
Stabw	0,263	0,261	0,195	0,150	0,335	0,027
p-Werte		p = 0,063	p = 0,023	p = 0,438	p = 0,001	p = 0,001
α -Niveau		$\alpha_4 = 0,025$	$\alpha_3 = 0,016$	$\alpha_5 = 0,05$	$\alpha_2 = 0,0125$	$\alpha_1 = 0,01$

Zur qualitativen, semiquantitativen Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Dextrose wurden Chondrozyten nach Inkubation mit Dextrosekonzentrationen von 12,5 mg/ml bis 200 mg/ml mit Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) gefärbt (Abb. 3-2). Die mit PI und FDA gefärbten Chondrozyten wurden unter dem Inversen Fluoreszenzmikroskop gemäß der unter 2.4.2. Tabelle 2-5 aufgeführten Absorptions- und Emissionsmaxima in Hinblick ihrer Vitalität, ihres Proliferationsverhaltens und ihrer Morphologie deskriptiv beurteilt.

Die Chondrozyten der Negativ-Kontrolle zeigen eine regelrechte Dichte vitaler Zellen mit einer geschätzten Bedeckungsfläche von circa 30%. Chondrozyten nach Inkubation mit 12,5 und 25 mg/ml Dextrose sind in ihrem Zellwachstum gegenüber der Negativ-Kontrolle nicht eingeschränkt. Auch zeigt sich nach Inkubation dieser Dextrosekonzentrationen keine verminderte Vitalität (Abbildung nicht aufgeführt). Inkubation mit 50, 100 und 200 mg/ml Dextrose führt zunehmend zu verminderter Zelldichte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Die Anzahl avitaler Chondrozyten ist nach Inkubation mit 200 mg/ml Dextrose im Vergleich zur Negativ-Kontrolle erhöht (siehe Tab. 3-3).

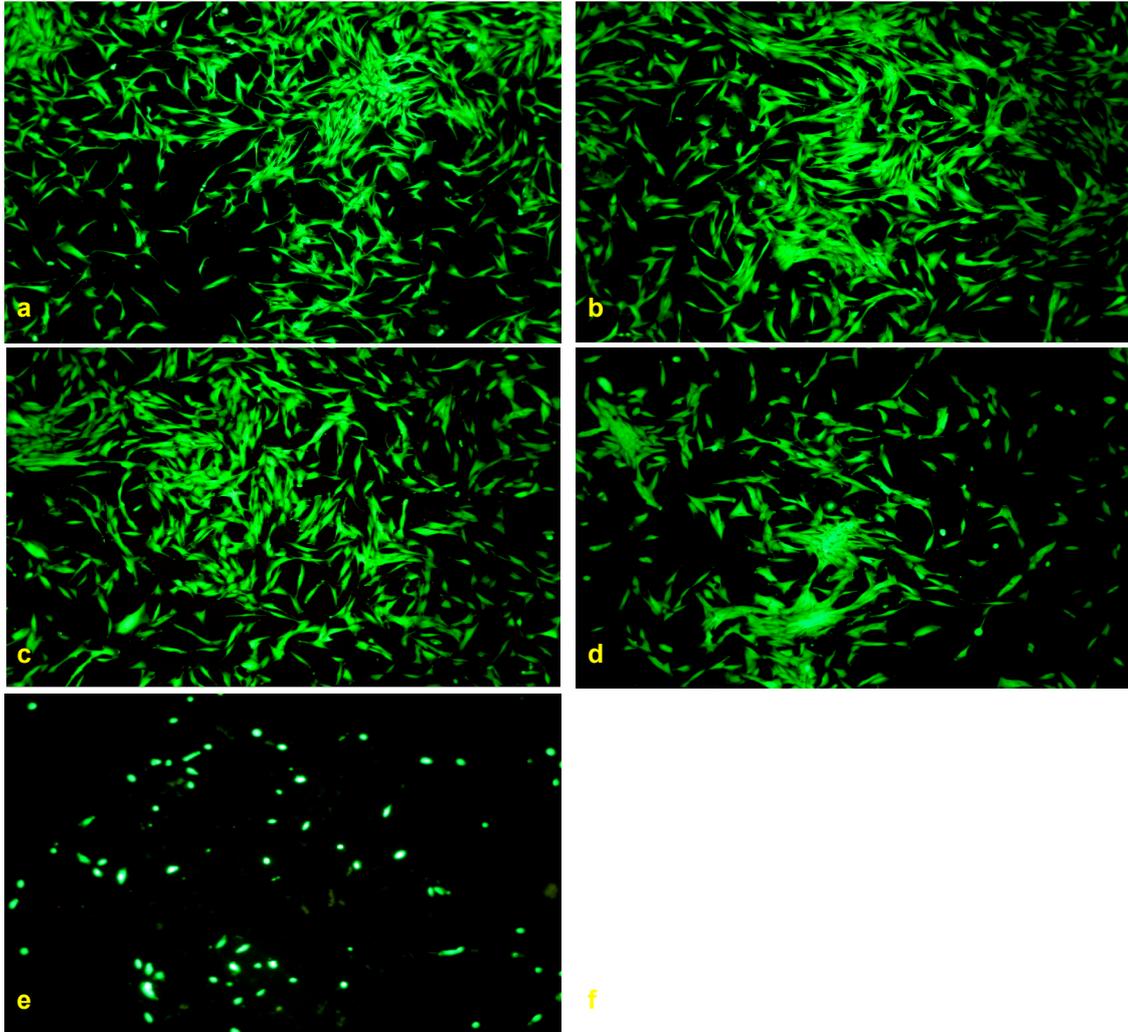


Abbildung 3-2: Mit PI und FDA gefärbte Chondrozyten nach Inkubation mit Dextrose (50x). Grün fluoreszierende Chondrozyten = vital. Rot fluoreszierende Chondrozyten = avital.
 a Negativ-Kontrolle. b 12,5 mg/ml. c 25 mg/ml. d 50 mg/ml. e 100 mg/ml. f 200 mg/ml.

Tabelle 3-3: Mit PI und FDA gefärbte Chondrozyten nach Inkubation mit Dextrose im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle. =: vergleichbar. ↑: einfach erhöht. ↑↑: zweifach erhöht. ↓: einfach erniedrigt. ↓↓: zweifach erniedrigt. ↓↓↓: dreifach erniedrigt gegenüber der Negativ-Kontrolle

	12,5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml
Zelldichte	=	=	↓	↓↓	↓↓↓
Anteil avitalen Zellen	=	=	=	↑	↑↑
Morphologie	=	=	=	abgerundet	abgerundet

3.1.2. Zytotoxizität an humanen Lymphozyten

Die Vitalität humaner Lymphozyten nach Inkubation mit 25 mg/ml Dextrose wurde mit dem Trypanblau-Ausschlusstest ermittelt und mit der Negativ-Kontrolle verglichen (Abb. 3-3). Bei dieser Konzentration hatte Dextran keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation in Chondrozyten gezeigt. Dagegen war die Vitalität der Lymphozyten nach Inkubation mit 25 mg/ml Dextrose signifikant gegenüber der Kontrolle vermindert (Tab. 3-4).

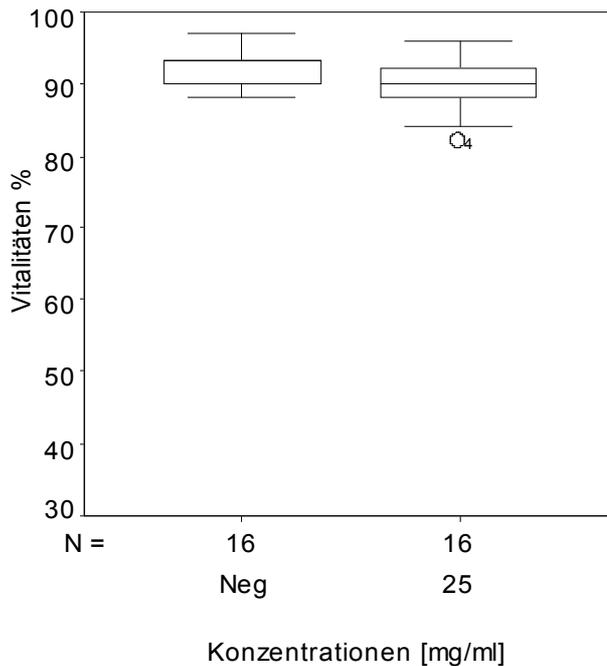


Abbildung 3-3: Vitalitäten der Lymphozyten nach Inkubation mit 25 mg/ml Dextrose.

x-Achse: Kontroll- und Versuchsansatz mit Dextrose. Der Negativ-Kontrolle wurden keine weiteren Substanzen zugeführt. N: Anzahl der Versuche. °: Ausreißer.

y-Achse: Vitalität der Lymphozyten in % als quantitatives Maß der Zytotoxizität

Tabelle 3-4: p-Werte der Unterschiede der Vitalitäten gegenüber der Negativ-Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das Signifikanzniveau wurde als 0,05 definiert

	Neg	25 mg/ml
Mittelwert	92	90
Stabw	2,553	3,775
p-Werte	p = 0,014	

Aufgrund des signifikanten Unterschiedes der Vitalität der Lymphozyten nach Inkubation mit 25 mg/ml Dextrose und der Negativ-Kontrolle, wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung von Dextrose im Konzentrationsbereich von 4 bis 30 mg/ml mit dem Trypanblau-Ausschlusstest ermittelt (Abb. 3-4). Es besteht ein signifikanter Unterschied der Vitalität der Lymphozyten in Abhängigkeit von der Dextrosekonzentration (Tab. 3-5).

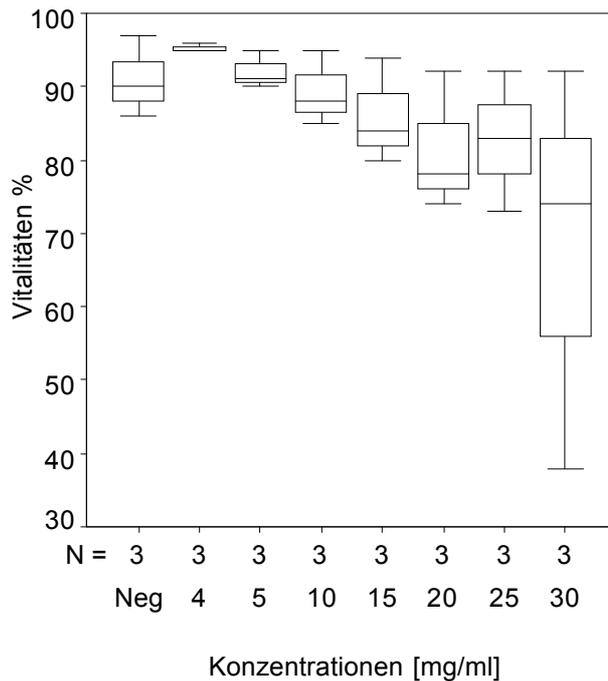


Abbildung 3-4: Vitalität der Lymphozyten nach Inkubation mit Dextrose in Konzentrationen von 4 bis 30 mg/ml.

x-Achse: Dextrosekonzentrationen. Der Negativ-Kontrolle wurden keine weiteren Substanzen zugeführt. N: Anzahl der Versuche.

y-Achse: Vitalität der Lymphozyten in % als quantitatives Maß der Zytotoxizität

Tabelle 3-5: p-Werte der Unterschiede der Vitalitäten, ermittelt durch den Friedman-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

Trypanblau-Ausschlusstest: Dextrose	
p-Werte	p = 0,007

Aufgrund der geringen Stichprobenzahl von N = 3 wurde Wilcoxon-Test nicht durchgeführt. Der Abbildung ist aber zu entnehmen, dass die Vitalität der Lymphozyten nach Inkubation mit der geringsten Dextrosekonzentration (4 mg/ml) gegenüber der Negativ-Kontrolle leicht erhöht und ab 15 bis 30 mg/ml zunehmend erniedrigt ist. Bei der höchsten Konzentration ist in mehr als der Hälfte der Zellen die für den Comet Assay kritische Grenze von 75% vitaler Zellen unterschritten.

In einer zweiten Versuchsserie mit Dextrosekonzentrationen von 3,5 bis 25 mg/ml war die Vitalität der humanen Lymphozyten im Trypanblau-Ausschlusstest nicht eingeschränkt, es besteht kein erkennbarer Unterschied der Vitalität der Lymphozyten in Abhängigkeit von der Dextrosekonzentration (Abb. 3-5, Tab. 3-6). Der Wilcoxon-Test wurde bei einer Stichprobenzahl von N = 3 nicht durchgeführt.

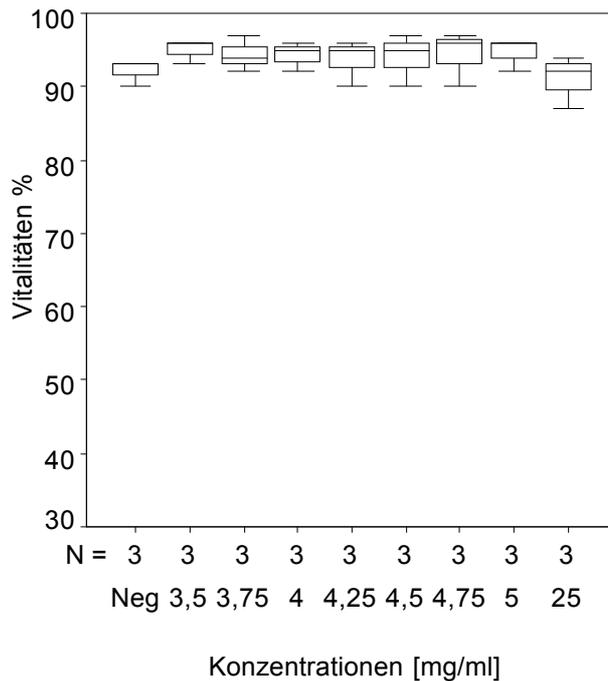


Abbildung 3-5: Vitalität der Lymphozyten nach Inkubation mit Dextrose in Konzentrationen von 3,5 bis 25 mg/ml.

x-Achse: Dextrosekonzentrationen. Der Negativ-Kontrolle wurden keine weiteren Substanzen zugeführt. N: Anzahl der Versuche.
y-Achse: Vitalität der Lymphozyten in % als quantitatives Maß der Zytotoxizität

Tabelle 3-6: p-Werte der Unterschiede der Vitalitäten, ermittelt durch den Friedman-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

Trypanblau-Ausschlusstest: Dextrose	
p-Werte	p = 0,182

3.1.3. Genotoxizität an humanen Lymphozyten

Die DNA-Fragmentierung humaner Lymphozyten nach Inkubation mit Dextrose wurde mit dem Comet Assay ermittelt. Abbildung 3-6 zeigt die DNA-Fragmentierung nach Inkubation mit 25 mg/ml Dextrose. An Chondrozyten hatte Dextrose dieser Konzentration die Proliferation im Vergleich mit der Negativ-Kontrolle nicht signifikant beeinträchtigt.

Es besteht ein signifikanter Unterschied der OTM-Werte der Negativ-Kontrolle und der OTM-Werten der mit 25 mg/ml Dextrose inkubierten Lymphozyten (Tab. 3-7). Der Abbildung ist eine erhöhte DNA-Migration der mit Dextrose inkubierten Lymphozyten, gegenüber der auf eins normierten Negativ-Kontrolle zu entnehmen.

Aufgrund der signifikant erhöhten DNA-Fragmentierung nach Inkubation mit 25 mg/ml Dextrose im Vergleich zur Negativ-Kontrolle, wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung von Dextrose an Lymphozyten mit dem Comet Assay ermittelt. Abbildung 3-7 zeigt, dass die DNA-Fragmentierung bei Inkubation mit Dextrosekonzentrationen von 4 bis 30 mg/ml dosisabhängig zunimmt. Der Unterschied der OTM-Werte in Abhängigkeit zur Konzentration dosisabhängig signifikant (Tab. 3-8). Der Wilcoxon-Test wurde bei einer Stichprobenzahl von N = 4 nicht durchgeführt. Die Abbildung zeigt aber erhöhte OTM-Werte bereits ab 5 mg/ml Dextrose gegenüber der auf eins normierten Negativ-Kontrolle.

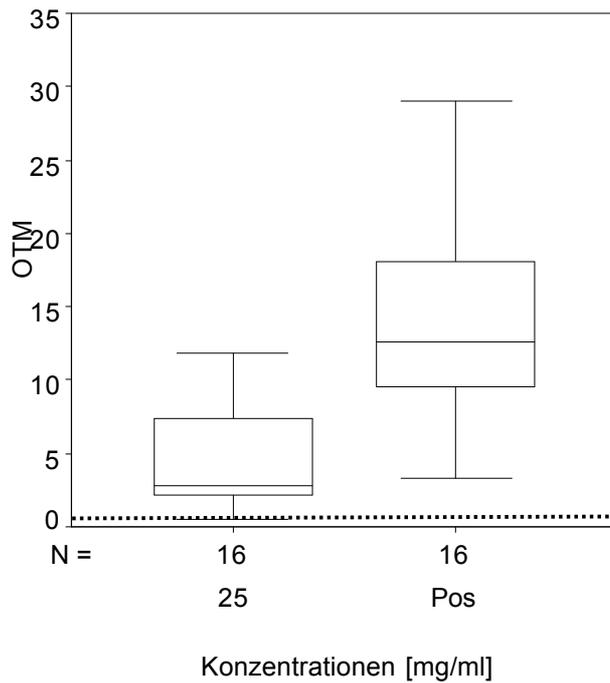


Abbildung 3-6: DNA-Fragmentierung humaner Lymphozyten nach Inkubation mit 25 mg/ml Dextrose.

x-Achse: Versuchsansatz mit Dextrose und der Positiv-Kontrolle (10 µl/ml 17%iges MNNG). N: Anzahl der Versuche.

y-Achse: OTM = Olive Tail Moment relativ zur Negativ-Kontrolle (= 1, angegeben als gestrichelte Linie) als quantitatives Maß der DNA-Fragmentierung.

Tabelle 3-7: p-Werte der Unterschiede der OTM-Werte gegenüber der Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

25 mg/ml	
Mittelwert	4,567
Stabw	3,434
p-Werte	p = 0,001

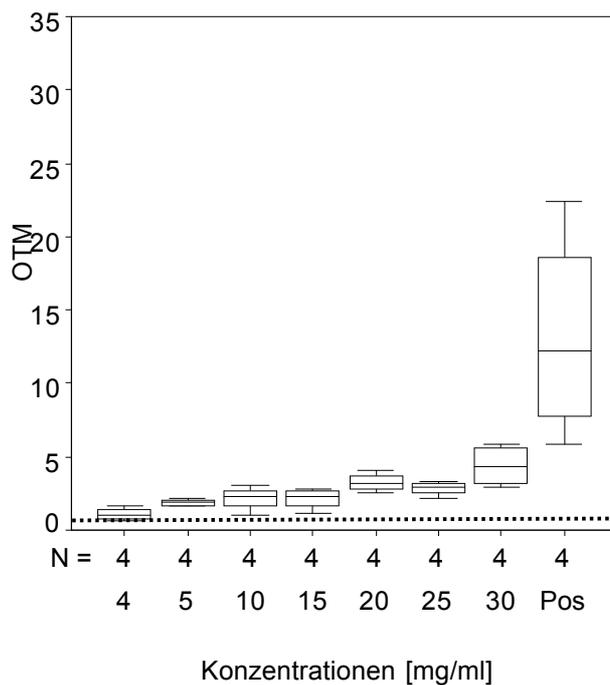


Abbildung 3-7: DNA-Fragmentierung humaner Lymphozyten nach Inkubation mit Dextrosekonzentrationen von 4 bis 30 mg/ml.

x-Achse: Versuchsansätze mit Dextrose und der Positiv-Kontrolle (10 µl/ml 17%iges MNNG). N: Anzahl der Versuche.

y-Achse: OTM = Olive Tail Moment relativ zur Negativ-Kontrolle (= 1) als quantitatives Maß der DNA-Fragmentierung.

Tabelle 3-8: p-Werte der Unterschiede der OTM-Werte, ermittelt durch den Friedman-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

Comet Assay: Dextrose	
p-Werte	p = 0,011

In einer zweiten Versuchsserie mit Dextrankonzentrationen von 3,5 bis 25 mg/ml konnten der signifikanter Anstieg der OTM-Werte in Abhängigkeit von der Konzentration bestätigt werden (Abb. 3-8, Tab. 3-9). Der Wilcoxon-Test wurde aufgrund einer Stichprobenzahl von N = 3 nicht durchgeführt. Lymphozyten nach Inkubation mit 3,5, 3,75, 4 und 4,25 mg/ml Dextrose zeigen gegenüber der auf eins normierten Negativ-Kontrolle keine erhöhten OTM-Werte. Erhöhte OTM-Werte der mit 4,5 mg/ml, 4,75 mg/ml, 5 mg/ml und 25 mg/ml Dextrose inkubierten Lymphozyten sind der Abbildung zu entnehmen.

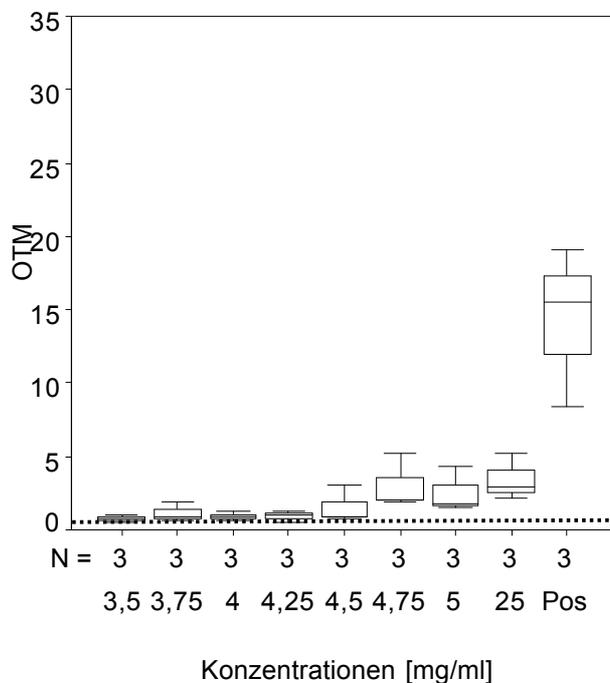


Abbildung 3-8: DNA-Fragmentierung humaner Lymphozyten nach Inkubation mit Dextrosekonzentrationen von 3,5 bis 25 mg/ml.

x-Achse: Versuchsansätze mit Dextrose und der Positiv-Kontrolle (10 µl/ml 17%iges MNNG).
N: Anzahl der Versuche.

y-Achse: OTM = Olive Tail Moment relativ zur Negativ-Kontrolle (= 1) als quantitatives Maß der DNA-Fragmentierung

Tabelle 3-9: p-Werte der Unterschiede der OTM-Werte, ermittelt durch den Friedman-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

Come Assay: Dextrose	
p-Werte	p = 0,019

3.2. Zytotoxizität und Genotoxizität von PEG-PPG-PEG

3.2.1. Zytotoxizität an humanen Chondrozyten

Der EZ4U-Test wurde zum indirekt quantitativen Nachweis der Wirkung von PEG-PPG-PEG auf die Proliferation der Chondrozyten durchgeführt. Abbildung 3-9 zeigt die Werte der Extinktion in Abhängigkeit von der PEG-PPG-PEG-Konzentration. Es ist eine signifikant verminderte Proliferation der Chondrozyten im Konzentrationsbereich von 5 bis 200 mg/ml zu erkennen (Tab. 3-10). Die Proliferation ist bereits ab der niedrigsten Konzentration, 5 mg/ml, signifikant verschieden gegenüber der Negativ-Kontrolle (Tab. 3-11).

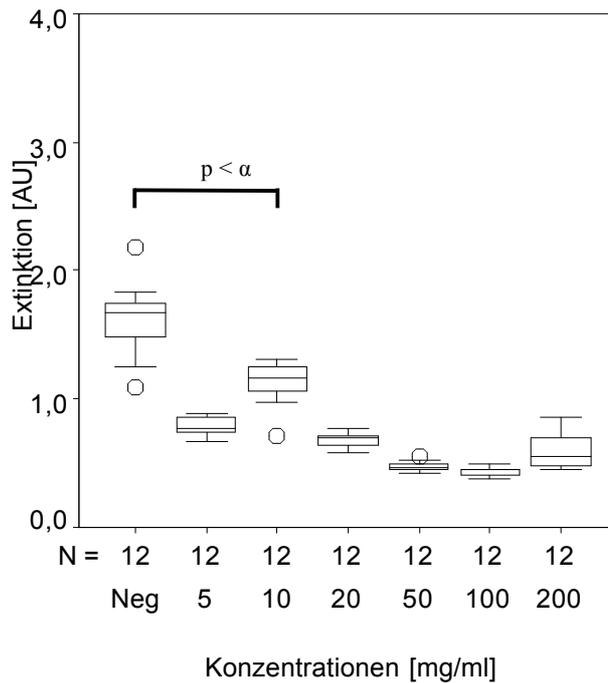


Abbildung 3-9: Chondrozytenproliferation nach Inkubation mit PEG-PPG-PEG in Konzentrationen von 5 bis 200 mg/ml.

x-Achse: PEG-PPG-PEG-Konzentrationen. Der Kontrollansatz wurde ohne Zugabe zusätzlicher Substanzen durchgeführt. N: Anzahl der Versuche. ○: Ausreißer.

y-Achse: Extinktion von Formazan bei 450 nm als indirekt quantitatives Maß für die Proliferation

Tabelle 3-10: p-Werte der Unterschiede der Extinktion, ermittelt durch den Friedman-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

EZ4U-Proliferationstest: PEG-PPG-PEG	
p-Werte	p = 0,001

Tabelle 3-11: p-Werte der Unterschiede der Extinktion gegenüber der Negativ-Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das globale Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert. p-Werte unterhalb des lokalen Signifikanzniveaus sind grau hinterlegt

	Neg	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml
Mittelwert	1,613	0,760	1,077	0,687	0,472	0,438	0,592
Stabw	0,281	0,070	0,169	0,060	0,038	0,037	0,129
p-Werte		p = 0,002	p = 0,002	p = 0,002	p = 0,002	p = 0,002	p = 0,002
α -Niveau		$\alpha_1 = 0,0083$	$\alpha_2 = 0,01$	$\alpha_3 = 0,0125$	$\alpha_4 = 0,016$	$\alpha_5 = 0,025$	$\alpha_6 = 0,05$

Um die Konzentration zu definieren, bei der PEG-PPG-PEG keine proliferationshemmende Wirkung auf humane Chondrozyten zeigt, wurde eine weitere Dosis-Wirkungsuntersuchung im Konzentrationsbereich von 0,018 bis 0,3 mg/ml mit dem EZ4U-Test durchgeführt. Auch hier ergab sich eine signifikante konzentrationsabhängige Veränderung der Extinktion (Abb. 3-10, Tab- 3-12). Allerdings gab es bei den beiden niedrigsten Konzentrationen, 0,018 und 0,037 mg/ml PEG-PPG-PEG, eine signifikant gesteigerte Proliferation der Chondrozyten und erst bei der höchsten Konzentration, 0,3 mg/ml, eine signifikante Einschränkung (Tab- 3-13).

Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) von PEG-PPG-PEG nach nicht linearer Regression der Dosis-Wirkungsbeziehung auf die Proliferation der Chondrozyten liegt bei 0,5 mg/ml.

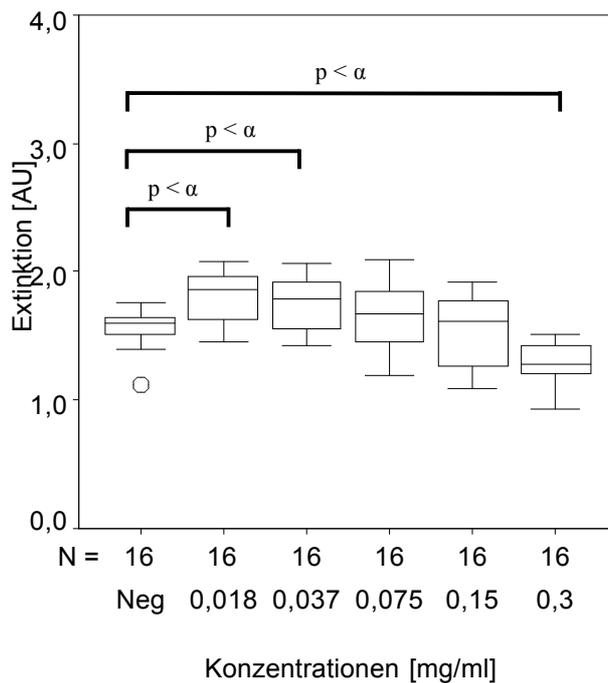


Abbildung 3-10: Chondrozytenproliferation nach Inkubation mit PEG-PPG-PEG in Konzentrationen von 0,018 bis 0,3 mg/ml.

x-Achse: PEG-PPG-PEG-Konzentrationen. Der Kontrollansatz wurde ohne Zugabe zusätzlicher Substanzen durchgeführt. N: Anzahl der Versuche. \circ : Ausreißer.

y-Achse: Extinktion als indirekt quantitatives Maß für die Proliferation

α

Tabelle 3-12: p-Werte der Unterschiede der Extinktion, ermittelt durch den Friedman-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

EZ4U-Proliferationstest: PEG-PPG-PEG	
p-Werte	p = 0,001

Tabelle 3-13: p-Werte der Unterschiede der Extinktion gegenüber der Negativ-Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das globale Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert. p-Werte unterhalb des lokalen Niveaus sind grau hinterlegt

	Neg	0,018 mg/ml	0,037 mg/ml	0,075 mg/ml	0,15 mg/ml	0,3 mg/ml
Mittelwert	1,561	1,810	1,749	1,681	1,523	1,289
Stabw	0,148	0,207	0,211	0,246	0,278	0,158
p-Werte		p = 0,005	p = 0,015	p = 0,196	p = 0,836	p = 0,001
α -Niveau		$\alpha_2 = 0,0125$	$\alpha_3 = 0,016$	$\alpha_4 = 0,025$	$\alpha_5 = 0,05$	$\alpha_1 = 0,01$

Die qualitative, semiquantitative Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von PEG-PPG-PEG an Chondrozyten erfolgte mit einer Kombinationsfärbung aus PI und FDA im Konzentrationsbereich von 20 bis 200 mg/ml (Abb. 3-11 und 3-12).

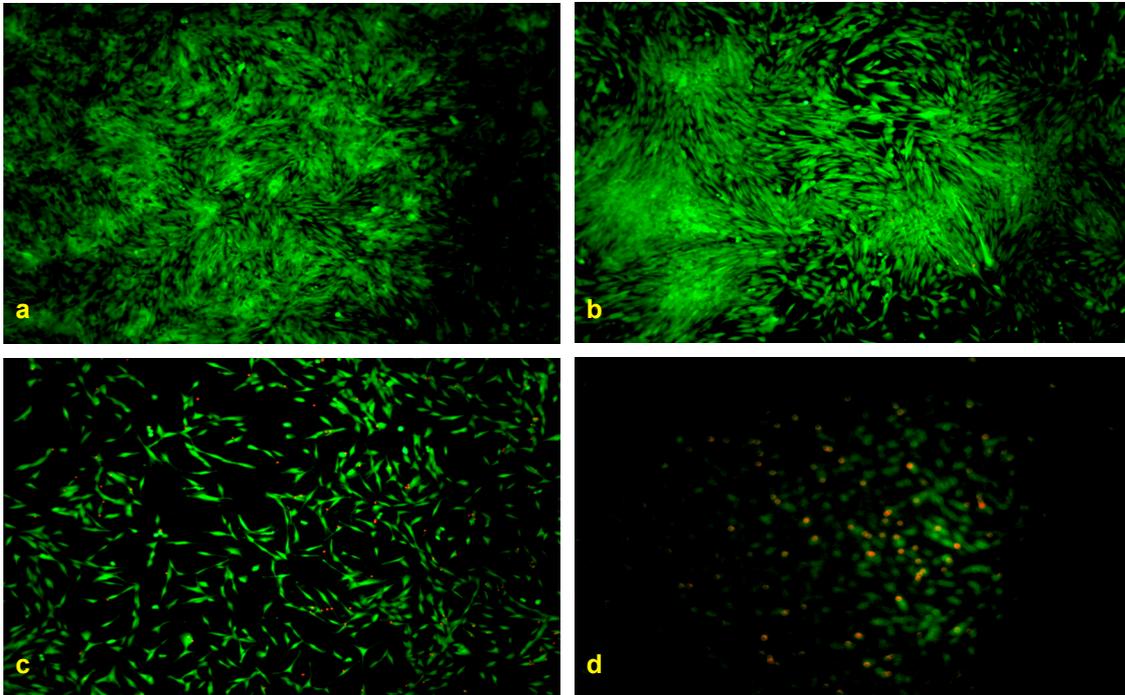


Abbildung 3-11: Mit PI und FDA gefärbte Chondrozyten nach Inkubation mit PEG-PPG-PEG (50x). Grün fluoreszierende Chondrozyten = vital. Rot fluoreszierende Chondrozyten = avital.

a Negativ-Kontrolle. **b** 20 mg/ml. **c** 50 mg/ml. **d** 100 mg/ml. **e** 200 mg/ml.

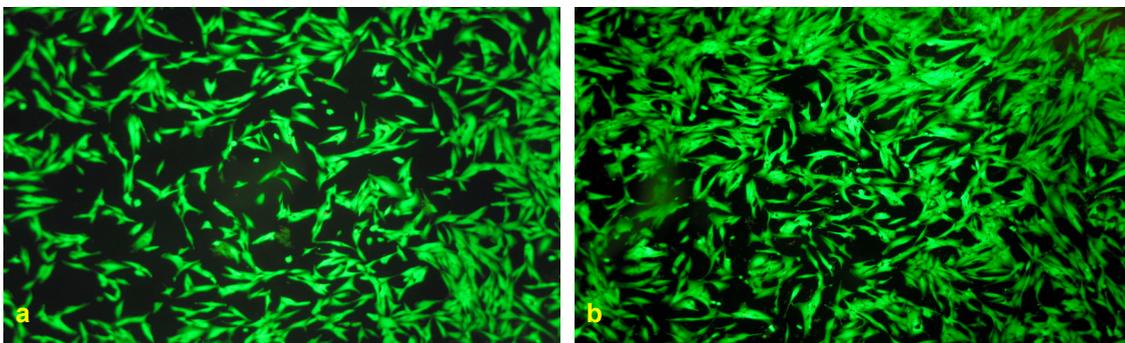


Abbildung 3-12: Mit PI und FDA gefärbte Chondrozyten nach Inkubation mit PEG-PPG-PEG (50x). Grün fluoreszierende Chondrozyten = vital. **a** Negativ-Kontrolle. **b** 0,15 mg/ml.

Die mit Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) gefärbten Chondrozyten wurden unter dem Inversen Fluoreszenzmikroskop gemäß der unter 2.4.2. Tabelle 2-5 aufgeführten Absorptions- und Emissionsmaxima in Hinblick ihrer Vitalität, ihres Proliferationsverhaltens und ihrer Morphologie deskriptiv beurteilt. In der ersten Versuchsserie zeigen die Chondrozyten der Negativ-Kontrolle eine hohe Dichte vitaler Zellen mit einer geschätzten Bedeckungsfläche von circa 70% (Abb. 3-11). Nach Inkubation mit 20 mg/ml PEG-PPG-PEG sind die Chondrozyten in ihrem Zellwachstum gegenüber der Negativ-Kontrolle nicht eingeschränkt. Auch zeigt sich nach Inkubation mit diesen Konzentrationen keine verminderte Vitalität (Abbildung nicht aufgeführt). Inkubation mit 50, 100 und 200 mg/ml PEG-PPG-PEG führt zunehmend zu verminderter Zelldichte im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Die Anzahl avitaler Chondrozyten ist im Vergleich zur Negativ-Kontrolle erhöht. Nach Inkubation mit 200 mg/ml PEG-PPG-PEG sind keine Chondrozyten zu erkennen. Auch in der zweiten Versuchsserie (Abb. 3-12) ist die Dichte der vitalen Chondrozyten in der Negativ-Kontrolle mit einer geschätzten Bedeckungsfläche von circa 50% regelrecht. Nach Inkubation mit 0,15 mg/ml PEG-PPG-PEG weisen die Chondrozyten eine vergleichbare bis leicht höhere Dichte gegenüber der Negativ-Kontrolle auf.

Tabelle 3-14: Mit PI und FDA gefärbte Chondrozyten nach Inkubation mit PEG-PPG-PEG im Vergleich zu der jeweiligen Negativ-Kontrolle. =: vergleichbar. ↑: einfach erhöht. ↓: einfach erniedrigt. ↓↓: zweifach erniedrigt gegenüber der Negativ-Kontrolle

	0,15 mg/ml	20 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml
Zelldichte	= bis ↑	=	↓	↓↓	keine Zellen
Anteil avitaler Zellen	=	=	=	↑	keine Zellen
Morphologie	=	=	=	abgerundet	abgerundet

3.2.2. Zytotoxizität an humanen Lymphozyten

Die Vitalität humaner Lymphozyten wurde mit dem Trypanblau-Ausschlusstest nach Inkubation mit PEG-PPG-PEG in einer Konzentration von 0,15 mg/ml, die Chondrozyten keine signifikante Veränderung der Proliferation im Vergleich mit einer Negativ-Kontrolle zeigte, ermittelt. Die Vitalität der Lymphozyten unterscheidet sich nicht signifikant von der Vitalität der Kontrolllymphozyten (Abb. 3-13, Tab. 3-15).

Tabelle 3-15: p-Werte der Unterschiede der Vitalitäten gegenüber der Negativ-Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

	Neg	0,15 mg/ml
Mittelwert	92	92
Stabw	2,422	1,886
p-Werte	p = 0,905	

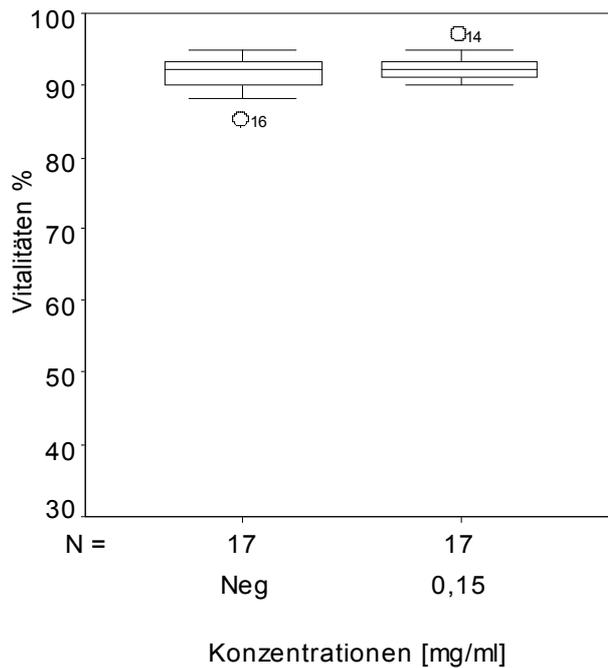


Abbildung 3-13: Vitalität der Lymphozyten nach Inkubation mit 0,15 mg/ml PEG-PPG-PEG.

x-Achse: Kontroll- und Versuchsansatz mit PEG-PPG-PEG. Der Negativ-Kontrolle wurden keine weiteren Substanzen zugeführt. N: Anzahl der Versuche. ○: Ausreißer.

y-Achse: Vitalität der Lymphozyten in % als quantitatives Maß der Zytotoxizität

3.2.3. Genotoxizität an humanen Lymphozyten

Die DNA-Fragmentierung humaner Lymphozyten wurde mit dem Comet Assay ebenfalls nach Inkubation mit 0,15 mg/ml PEG-PPG-PEG ermittelt. Die hinsichtlich der Chondrozytenproliferation unwirksame Konzentration bewirkt auch keinen signifikanten Anstieg der OTM-Werte gegenüber der Negativ-Kontrolle (Abb. 3.14, Tab. 3-16).

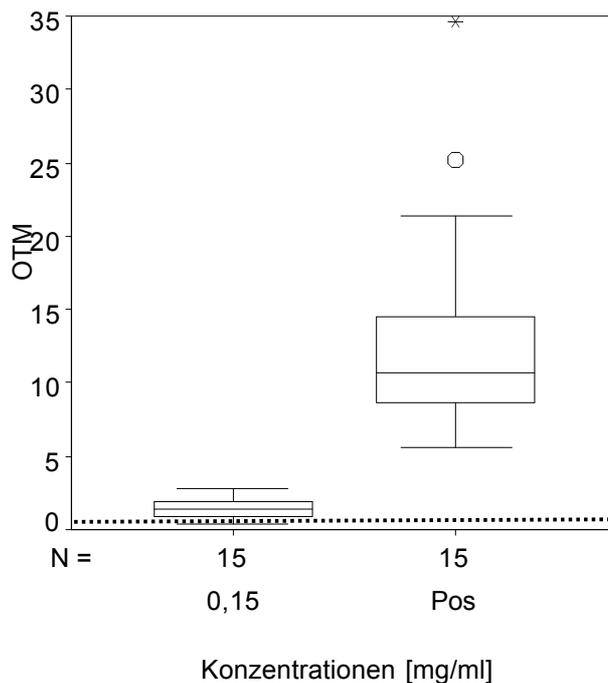


Abbildung 3-14: DNA-Fragmentierung humaner Lymphozyten nach Inkubation mit 0,15 mg/ml PEG-PPG-PEG.

x-Achse: Versuchsansatz mit PEG-PPG-PEG und der Positiv-Kontrolle (10 µl/ml 17%iges MNNG). N: Anzahl der Versuche. ○: Ausreißer. *: Extremwerte.

y-Achse: OTM = Olive Tail Moment als quantitatives Maß der DNA-Fragmentierung.

Tabelle 3-16: p-Werte der Unterschiede der OTM-Werte gegenüber der Negativ-Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

0,15 mg/ml	
Mittelwert	1,415
Stabw	0,667
p-Werte	p = 0,055

3.3. Zytotoxizität und Genotoxizität von Triethanolamin

3.3.1. Zytotoxizität an humanen Chondrozyten

Der EZ4U-Test diente als indirekt quantitativer Nachweis für die Wirkung von Triethanolamin auf die Proliferation der Chondrozyten. Im Konzentrationsbereich zwischen 0,45 und 2,5 mg/ml ist eine signifikant unterschiedliche Proliferation der Chondrozyten in Vergleich zur Negativ-Kontrolle zu erkennen (Abb. 3-15, Tab. 3-17). Während nach Inkubation mit 0,9 mg/ml noch eine signifikante Steigerung der Proliferation zu sehen ist, wird die Proliferation nach Inkubation mit 2,5 mg/ml signifikant gegenüber der Negativ-Kontrolle reduziert (Tab. 3-18).

Die mittlere effektive Konzentration (EC_{50}) von Triethanolamin nach nicht linearer Regression der Dosis-Wirkungsbeziehung auf die Proliferation der Chondrozyten liegt bei 2,7 mg/ml

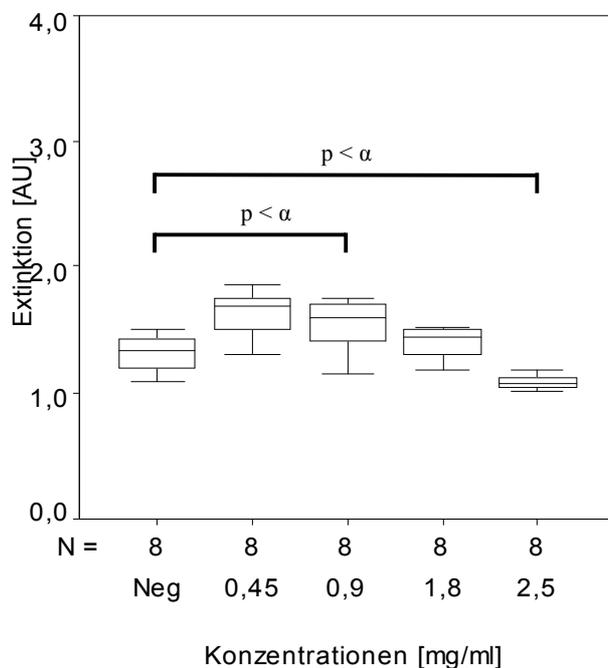


Abbildung 3-15:

Chondrozytenproliferation nach Inkubation mit Triethanolamin in Konzentrationen von 0,45 bis 2,5 mg/ml.

x-Achse:

Triethanolaminkonzentrationen. Der Kontrollansatz wurde ohne Zugabe zusätzlicher Substanzen durchgeführt. N: Anzahl der Versuche.

y-Achse: Extinktion von

Formazan bei 450 nm als indirekt quantitatives Maß für die Proliferation

Tabelle 3-17: p-Werte der Unterschiede der Extinktion, ermittelt durch den Friedman-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

EZ4U-Proliferationstest: Triethanolamin	
p-Werte	p = 0,001

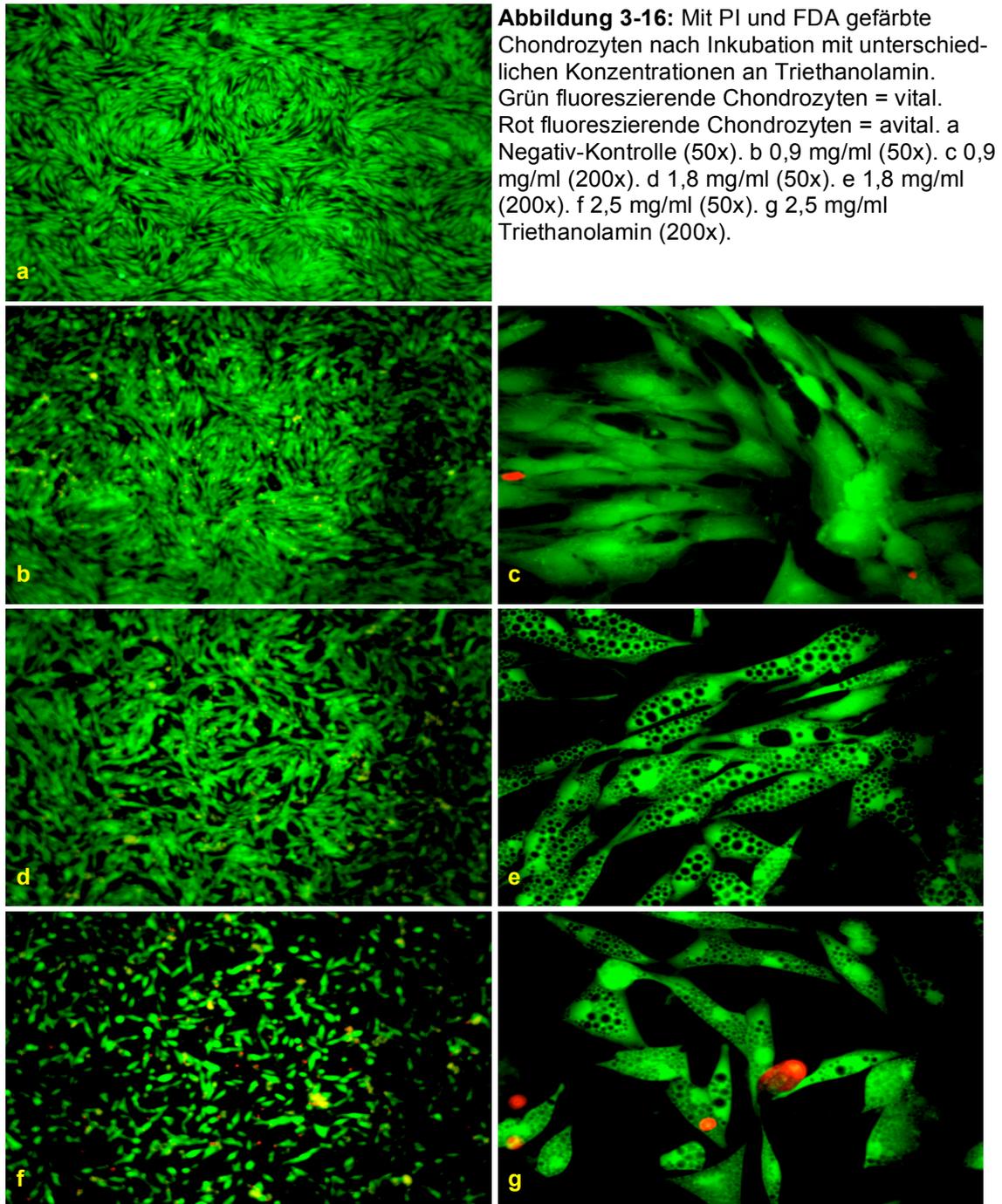
Tabelle 3-18: p-Werte der Unterschiede der Extinktion gegenüber der Negativ-Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das globale Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert. p-Werte unterhalb des lokalen α -Niveaus sind grau hinterlegt

	Neg	0,45 mg/ml	0,9 mg/ml	1,8 mg/ml	2,5 mg/ml
Mittelwert	1,314	1,627	1,540	1,402	1,085
Stabw	0,146	0,189	0,216	0,131	0,055
p-Werte		p = 0,019	p = 0,023	p = 0,79	p = 0,012
α -Niveau		$\alpha_2 = 0,016$	$\alpha_3 = 0,025$	$\alpha_4 = 0,05$	$\alpha_1 = 0,0125$

Zur qualitativen, semiquantitativen Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Triethanolamin erfolgte eine Kombinationsfärbung der Chondrozyten mit Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) nach Inkubation mit Konzentrationen von 0,9 bis 2,5 mg/ml (Abb. 3-16). Die mit PI und FDA gefärbten Chondrozyten wurden unter dem Inversen Fluoreszenzmikroskop gemäß der unter 2.4.2. Tabelle 2-5 aufgeführten Absorptions- und Emissionsmaxima in Hinblick ihrer Vitalität, ihres Proliferationsverhaltens und ihrer Morphologie deskriptiv beurteilt. Die Chondrozyten der Negativ-Kontrolle zeigen eine hohe Dichte vitaler Zellen mit einer geschätzten Bedeckungsfläche von circa 90%. Chondrozyten nach Inkubation mit 0,9 mg/ml Triethanolamin sind in ihrem Zellwachstum gegenüber der Negativ-Kontrolle nicht eingeschränkt. Bei 200x Vergrößerung sind keine morphologischen Veränderungen zu erkennen. Inkubation mit 1,8 mg/ml Triethanolamin resultiert in einer verminderten Dichte der Chondrozyten im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Auf morphologischer Ebene kommt es zu einer grobscholligen Vakuolisierung der Chondrozyten. Eine Bildung von Vakuolen in den Chondrozyten lässt sich auch nach Inkubation mit 2,5 mg/ml Triethanolamin erkennen. Die Dichte der Chondrozyten ist gegenüber der Negativ-Kontrolle vermindert. Die Anzahl avitaler Chondrozyten nach Inkubation mit 2,5 mg/ml ist erhöht (siehe auch Tab. 19). Zu einer Bildung von Vakuolen in Chondrozyten kam es nach Inkubation mit Triethanolamin in Konzentrationen von minimal 1,01 mg/ml (Daten nicht aufgeführt).

Tabelle 3-19: Mit PI und FDA gefärbte Chondrozyten nach Inkubation mit Triethanolamin im Vergleich zu der jeweiligen Negativ-Kontrolle. =: vergleichbar. ↑: einfach erhöht. ↑↑: zweifach erhöht. ↓: einfach erniedrigt gegenüber der Negativ-Kontrolle

	0,9 mg/ml	1,8 mg/ml	2,5 mg/ml
Zelldichte	=	↓	↓↓
Anteil avitaler Zellen	=	=	↑↑
Morphologie	=	Vakuolen	Vakuolen



Um die Diskrepanz der quantitativ und qualitativ erhobenen Daten zu verfolgen, wurde eine weitere Untersuchung der Dosis-Wirkungsbeziehung von Triethanolamin an humanen Chondrozyten mit dem EZ4U-Proliferationstest durchgeführt, diesmal im Konzentrationsbereich von 0,68 bis 1,01 mg/ml (Abb. 3-17). Der Friedman-Test ergibt eine statistisch signifikante Zunahme der Proliferation der Chondrozyten durch die niedrigen Triethanolaminkonzentrationen (Tab. 3-20). Im Einzelvergleich mit der Negativ-Kontrolle besteht kein signifikanter Unterschied der Extinktion nach Inkubation mit 0,56 oder 0,68 mg/ml. Nach Inkubation mit 0,79 bis 1,01 mg/ml Triethanolamin ist eine signifikant gesteigerte Proliferation der Chondrozyten abzulesen (Tab. 3-21)

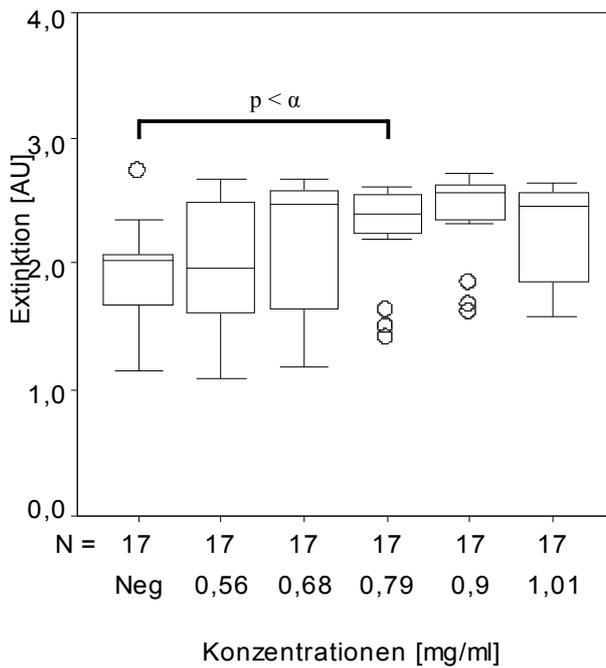


Abbildung 3-17: Chondrozytenproliferation nach Inkubation mit Triethanolamin in Konzentrationen von 0,56 bis 1,01 mg/ml.

x-Achse: Triethanolaminkonzentrationen. Der Kontrollansatz wurde ohne Zugabe zusätzlicher Substanzen durchgeführt. N: Anzahl der Versuche. \circ : Ausreißer.
y-Achse: Extinktion von Formazan bei 450 nm als indirekt quantitatives Maß für die Proliferation

Tabelle 3-20: p-Werte der Unterschiede der Extinktion, ermittelt durch den Friedman-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

EZ4U-Proliferationstest: Triethanolamin	
p-Werte	p = 0,001

Tabelle 3-21: p-Werte der Unterschiede der Extinktion gegenüber der Negativ-Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das globale Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert. p-Werte unterhalb des lokalen α -Niveaus sind grau hinterlegt

	Neg	0,56 mg/ml	0,68 mg/ml	0,79 mg/ml	0,9 mg/ml	1,01 mg/ml
Mittelwert	1,963	2,111	2,418	2,445	2,508	2,312
Stabw	0,386	0,538	0,336	0,332	0,279	0,369
p-Werte		p = 0,687	p = 0,062	p = 0,006	p = 0,001	p = 0,004
α -Niveau		$\alpha_5 = 0,05$	$\alpha_4 = 0,025$	$\alpha_3 = 0,016$	$\alpha_1 = 0,01$	$\alpha_2 = 0,0125$

3.3.2. Zytotoxizität an humanen Lymphozyten

Die Vitalität humaner Lymphozyten nach Inkubation mit Triethanolamin wurde mit dem Trypanblau-Ausschlusstest ermittelt. Abbildung 3-18 zeigt die Vitalität der Lymphozyten nach Inkubation mit 0,9 mg/ml Triethanolamin. An Chondrozyten bewirkt Triethanolamin in einer Konzentration von 0,9 mg/ml keine signifikant unterschiedliche Proliferation im Vergleich mit einer Negativ-Kontrolle und keine morphologischen Veränderungen.

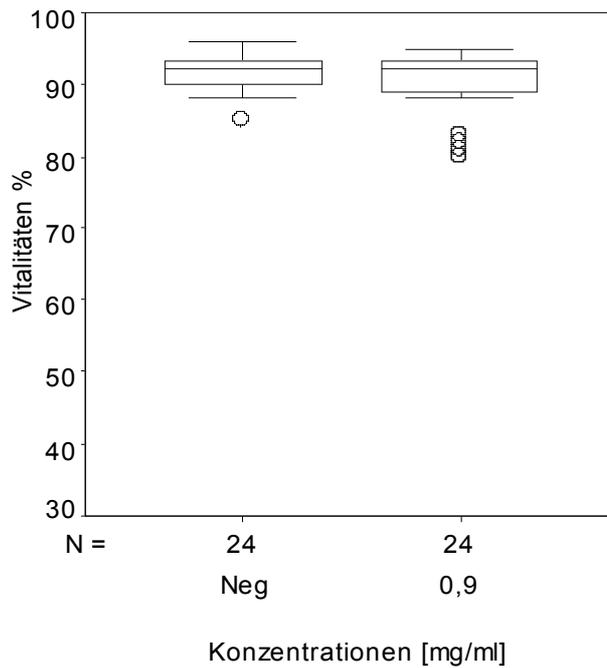


Abbildung 3-18: Vitalität der Lymphozyten nach Inkubation mit 0,9 mg/ml Triethanolamin.

x-Achse: Kontroll- und Versuchsansatz mit Triethanolamin. Der Negativ-Kontrolle wurden keine weiteren Substanzen zugeführt. N: Anzahl der Versuche. °: Ausreißer.

y-Achse: Vitalität der Lymphozyten in % als quantitatives Maß der Zytotoxizität

Die Vitalität der Lymphozyten nach Inkubation mit 0,9 mg/ml Triethanolamin unterscheidet sich nicht signifikant von der Vitalität der Kontrolllymphozyten (siehe Tab. 3-22).

Tabelle 3-22: p-Werte der Unterschiede der Vitalitäten gegenüber der Negativ-Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

	Neg	0,9 mg/ml
Mittelwert	91	91
Stabw	2,752	4,363
p-Werte	p = 0,755	

3.3.3. Genotoxizität an humanen Lymphozyten

Die DNA-Fragmentierung humaner Lymphozyten nach Inkubation mit Triethanolamin wurde mit dem Comet Assay ermittelt. Abbildung 3-19 zeigt die DNA-Fragmentierung nach Inkubation mit 0,9 mg/ml Triethanolamin. An Chondrozyten bewirkt Triethanolamin in dieser Konzentration keine signifikant unterschiedliche Proliferation im Vergleich mit einer Negativ-Kontrolle und keine morphologischen Veränderungen.

Es besteht kein signifikanter Unterschied zwischen den OTM-Werten der auf eins normierten Negativ-Kontrolle und den OTM-Werten der mit 0,9 mg/ml Triethanolamin inkubierten Lymphozyten (Tab. 23).

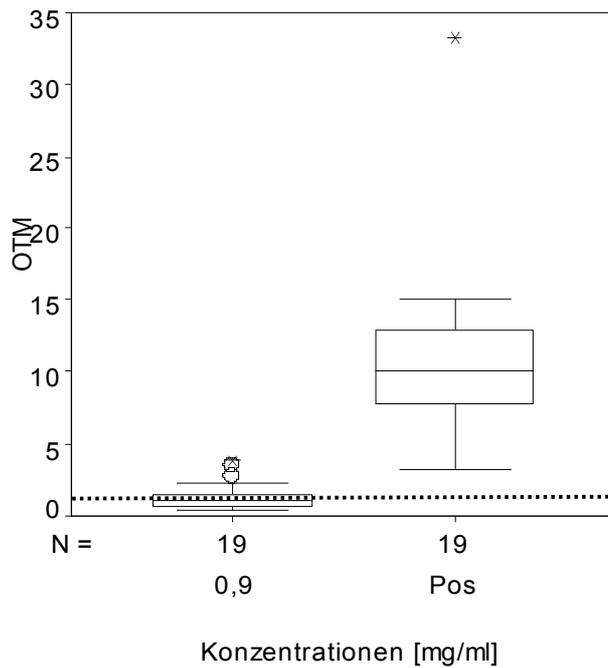


Abbildung 3-19: DNA-Fragmentierung humaner Lymphozyten nach Inkubation mit 0,9 mg/ml Triethanolamin.

x-Achse: Versuchsansatz mit Triethanolamin und der Positiv-Kontrolle (10 µl/ml 17%iges MNNG). N: Anzahl der Versuche. °: Ausreißer. *: Extremwerte.

y-Achse: OTM = Olive Tail Moment als quantitatives Maß der DNA-Fragmentierung.

Tabelle 3-23: p-Werte der Unterschiede der OTM-Werte gegenüber der Negativ-Kontrolle, ermittelt durch den Wilcoxon-Test. Das Signifikanzniveau wird als 0,05 definiert

	0,9 mg/ml
Mittelwert	1,324
Stabw	1,013
p-Werte	p = 0,872

4. Diskussion

Herkömmliche Therapieformen zur Ohrmuschelrekonstruktion stoßen trotz stetiger Weiterentwicklungen und Modifikationen weiterhin an ihre Grenzen. Neue Strategien in der Therapie von Ohrmuscheldefekten sind daher unabdingbar. Die Kombination aus Rapid Prototyping und Tissue Engineering stellt eine vielversprechende Alternative in der Rekonstruktion einer optisch ansprechenden, neuen Ohrmuschel dar. Nach vielfältigen gescheiterten Versuchen einen Zellträger mit Chondrozyten zu besiedeln, um ihn dann *in vivo* im Tiermodell zu implantieren, wurde nun ein neues Biomaterial, Polycaprolacton, als Zellträger für das Tissue Engineering von Ohrmuschelknorpel formuliert und vorgeschlagen. Ein bedeutender Schritt, um das Gelingen des Tissue Engineering zu gewährleisten, ist der Ausschluss jeglichen Einflusses der Einzelkomponenten des Biomaterials auf die Zellproliferation und Zelldifferenzierung humaner Zielzellen. Zelluläre Schäden an humanen Zielzellen sowie DNA-Veränderungen, die auf die Trägersubstanzen von Polycaprolacton zurückzuführen sind, müssen daher unbedingt ausgeschlossen sein. Humane Zielzellen umfassen zum einen Chondrozyten, die in direkten Kontakt mit dem Trägermaterial kommen, zum anderen aber auch Zellen der Immunabwehr, stellvertretend Lymphozyten, die im Rahmen der Fremdkörperabwehr nach Implantation des mit Chondrozyten besiedelten Zellmaterials aktiviert werden. Um einen toxischen Einfluss der Trägersubstanzen von Polycaprolacton an genannten humanen Zielzellen auszuschließen, wurde die Substanzen somit in Hinblick ihres zyto- und genotoxischen Potentials an primären humanen Chondrozyten und Lymphozyten *in vitro* charakterisiert.

4.1. Verwendete Gewebe und Zellen

4.1.1. Humane Chondrozyten

Der neue Ohrmuschelknorpel, der an dem Biomaterialgerüst wachsen soll, entspricht elastischem Knorpelgewebe, das durch eine Ohrmuschelbiopsie entnommen wird. Daher kommen auch elastische Chondrozyten in direkten Kontakt mit den Reinsubstanzen des Biomaterials. Die Nachweisverfahren auf Toxizität der getesteten Reinsubstanzen wurden aus materiallimitierten Gründen an hyalinem Knorpel durchgeführt.

Knorpel besteht aus Chondrozyten und einer extrazellulären Matrix aus Kollagen, Proteoglycanen und Glycoproteinen. Knorpel verschiedener adulter und embryonaler Gewebe, wie hyaliner-, elastischer- und Faserknorpel, unterscheiden sich in der Struktur und Zusammensetzung der extrazellulären Matrix. Sowohl bei hyalinem wie auch elastischem Knorpel liegen die Chondrozyten in Chondronen angeordnet (Abb. 4-1). Sie unterscheiden sich nur in ihrer Synthesefähigkeit. Während hyaline Chondrozyten ausschließlich Kollagen II, IV, VI und Aggrecan bilden, können elastische Chondrozyten auch Elastin und Fibrillin synthetisieren. Hyalinen Knorpel findet man vorwiegend an den ventralen Rippenenden, dem Kehlkopf, der Luftröhre, den Bronchien, dem Nasenskelett und den Gelenkflächen. Elastischer Knorpel befindet sich dagegen am äußeren Gehörgang, der Ohrmuschel, der Tuba auditiva und der Epiglottis. In diesen Untersuchungen wurde davon ausgegangen, dass sich die Toxizität an

Chondrozyten hyalinen und elastischen Knorpels nicht maßgebend unterscheidet. Die Toxizität der Reinsubstanzen wurde stellvertretend an Chondrozyten des hyalinen Knorpels geprüft.

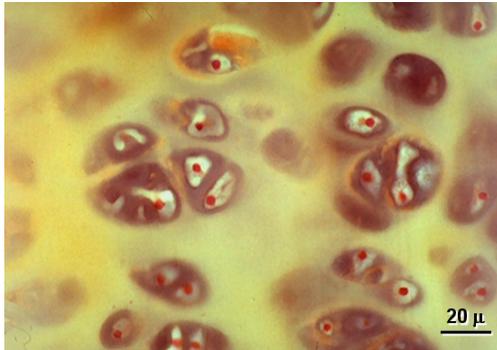


Abbildung 4-1: Hyaliner Knorpel der Trachea. Zu sehen sind einzelne Chondrone mit Chondrozyten. Färbung: Kernechtrot, Pinkroindigo [Goscurth P, 2005]

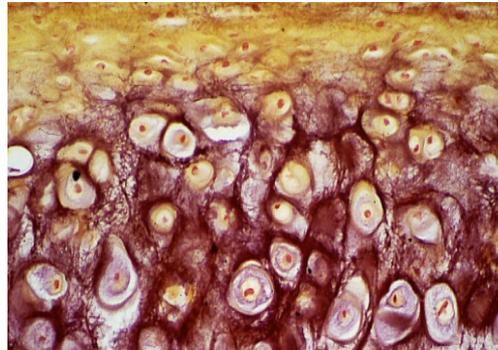


Abbildung 4-2: Elastischer Knorpel der Epiglottis. Zu sehen sind Chondrone mit Chondrozyten sowie elastische Fasern. Färbung: Elastin, Kernechtrot, Pinkroindigo [Goscurth P, 2005]

Das entnommene Material stammt von Patienten, die sich einer plastischen Korrektur der Nasenscheidewand oder einer Rekonstruktion der Ohrmuschel durch Rippenknorpel unterzogen. Septumdeviationen können eine behinderte Nasenatmung hervorrufen. Sie werden durch plastische Septumkorrektur beseitigt. Hierzu wird über einen Schnitt im Naseneingang die Nasenschleimhaut von den knorpelig-knöchernen Strukturen abgelöst, durch Knorpel- und Knocheneinschnitte unterteilt und mobilisiert. Überschüssige Knorpel- und Knochenanteile werden entfernt und nach Begradigung teilweise erneut zwischen die Schleimhautblätter der Nase reimplantiert. Zur operativen Korrektur von Formstörungen der Nase wird in einigen Fällen, wie z.B. der Sattelnase, zusätzlich autologer Knorpel benötigt, um die Nasenscheidewand und die Stützstruktur der Nase zu rekonstruieren. Hauptsächlich wird hier Knorpel der Ohrmuschel oder der knorpeligen Rippe des Patienten verwendet. Letzterer dient ebenso zur Korrektur von Ohrmuscheldeformitäten. Bei diesen Eingriffen fallen in der Regel zur plastischen Rekonstruktion nicht benötigte Knorpelstücke an. Die Operationen fanden alle an der Universitätsklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde in Regensburg statt. Aufgrund der dort häufig durchgeführten Nasenseptumkorrekturen und plastischen Rekonstruktionen von Nase und Ohr mit Rippenknorpel wurde es möglich, ohne einen zusätzlichen Eingriff ausreichende Mengen an Knorpel zu gewinnen. Dies wäre bei der Verwendung ausschließlich elastischer Knorpelgewebe nicht möglich gewesen.

4.1.2. Humane Lymphozyten

Der neue Knorpel, der auf der Grundlage des Biomaterials wachsen soll, bedarf wie jedes Gewebe einer guten Blutversorgung. Knorpelgewebe enthält selbst keine Gefäße, sondern wird vom Perichondrium aus genährt. Um dies zu erreichen, wird das gezüchtete Knorpelgewebe in einen präfabrizierten Lappen integriert [Staudenmaier et al., 2004], damit das Gewebe eine feste Vaskularisation bekommt. Über den somit gebildeten Blutweg gelangen auch Lymphozyten sowie andere Immunzellen in Kontakt mit dem Zellträger. Diese Zellen sind befähigt zu migrieren, das heißt die Blutbahn zu verlassen und das umliegende Gewebe zu erreichen. Neben

den Untersuchungen der Reinsubstanzen an Chondrozyten ist es somit ebenfalls wichtig, eine Schädigung von Immunzellen, wie hier stellvertretend den Lymphozyten, auszuschließen. Zudem werden die Reinsubstanzen durch Abbauprozesse des Polycaprolactons über den Blutweg transportiert. Sie könnten somit in diverse Gewebe des Körpers gelangen und dort in Zellen eine DNA-Schädigung oder einen zytotoxischen Effekt hervorrufen. Die Genotoxizitätstests an humanen Lymphozyten werden hier stellvertretend für alle humanen Zellen durchgeführt. Lymphozyten sind durch eine einfache Blutentnahme zu gewinnen. Im Gegensatz dazu ist zur Gewinnung anderer humaner Zellen oftmals eine Gewebeentnahme nötig. Des Weiteren sind fast alle humanen Zellen, trotz ihrer unterschiedlichen Differenzierung, nach dem gleichen Grundschema aufgebaut. Lymphozyten (Abb. 4-3) sind mit einem Anteil von 25-40% Vertreter der Leukozyten. Nur ein geringer Anteil von 5% der Lymphozyten zirkuliert im peripheren Blut, der restliche Teil befindet sich im interstitiellen Bindegewebe und den lymphatischen Organen. Aufgrund ihrer Oberflächenantigene und ihrer Funktion werden sie in B-, T- und Null-

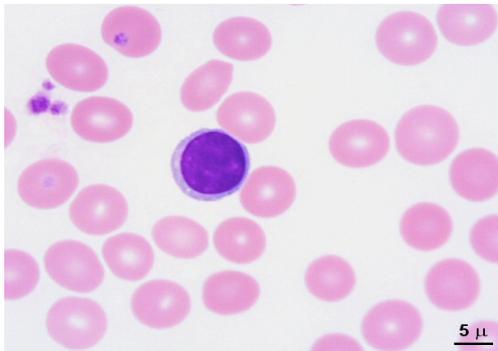


Abbildung 4-3: In der Mitte der Abbildung ist ein kleiner Lymphozyt zu erkennen. Färbung: Pappenheim [Goscurth, 2005]

zellen unterteilt. B-Lymphozyten gehören der spezifischen humoralen Immunantwort an. Sie können zu Plasmazellen aktiviert werden und dienen dann der Antikörperbildung. T-Lymphozyten dagegen gehören zur spezifischen zellulären Immunantwort. Ein Teil von ihnen ist zur Phagozytose befähigt, ein anderer ist maßgeblich an der B-Zellaktivierung beteiligt. In der Analyse vorliegender Untersuchungen wird kein Unterschied zwischen den verschiedenen Lymphozytenarten gemacht.

4.2. Testsubstanzen

Das in vorliegender Arbeit in seinen Reinsubstanzen untersuchte Polycaprolacton soll mit Hilfe des Tissue Engineerings als Zellträger zur Ohrmuschelrekonstruktion verwendet werden. Bei der Zusammensetzung des Biomaterials spielen, wie unter 1.2. erwähnt, verschiedene Faktoren eine wichtige Rolle. Zum einen muss es stabil sein, um als festes Gerüst für die Chondrozyten zu dienen. Eine feine Bearbeitung des Materials ist unabdingbar, um eine optisch schöne, der zweiten Ohrmuschel exakt nachgeformte, dreidimensionale Schablone zu erhalten. Zusätzlich ist eine vollständige Bioabbaubarkeit erwünscht, deren Rate in etwa der Formation des neuen Knorpelgewebes entspricht. Außerdem bedarf es einer Zusammensetzung des Polymers durch Reinsubstanzen, welche vom Organismus, ohne diesen zu schädigen, vollständig umgesetzt bzw. eliminiert werden. Eine weitere große Anforderung an das Biomaterial stellen die Chondrozyten selbst dar. Die Formulierung des Polyurethans muss ein Zellwachstum überhaupt ermöglichen, so dass das Ziel einer neuen, komplett aus Knorpel bestehenden Ohrmuschel erreicht werden kann.

Das in seinen Reinsubstanzen untersuchte Polycaprolacton besteht aus einer Diol-, einer Iso-cyanat-, einer Saccharid-, einer Katalysator- und einer Treibmittelkomponente. 1,6-Hexandiol, Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol (PEG-PPG-PEG), und (Hydro-

xy)hexansäure sind genauso wie auch Triethanolamin, einem Verzweiger, Teile seiner Diolkomponente. PEG-PPG-PEG ist eine oberflächenaktive Substanz, die in Polycaprolacton zum Erreichen einer erhöhten Schaumstabilität gebraucht wird. Triethanolamin dient der Vernetzung des Polyurethans. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en ist eine organische Base, welche benötigt wird um Reaktionen in Gang zu bringen. Es ist Teil der Isocyanatkomponente des Polyurethans. Das Monosaccharid Dextrose dient unter anderem der Energieversorgung der Chondrozyten.

Neben den genannten Eigenschaften darf das Polymer keine zytotoxischen oder genotoxischen Effekte auf körpereigene Zellen aufweisen. Eine durch die Reinsubstanzen hervorgerufene DNA-Schädigung, sowie Auswirkungen auf das Zellwachstum und die Vitalität der Zellen, müssen vor Verwendung der Substanzen als Zellträger ausgeschlossen werden. Hierfür muss für jede Substanz die maximale, an humanen Zellen nicht zyto- und nicht genotoxische Substanzkonzentration definiert werden. Dies ist nur durch eine umfassende Untersuchung der Reinsubstanzen zu erreichen, die von *in vitro* Kurzzeitversuchen über *in vitro* Langzeitversuche, bis hin zu Tierversuchen führen. In Hinblick auf Zyto- und Genotoxizität wurden in vorliegender Arbeit Dextrose, PEG-PPG-PEG und Triethanolamin *in vitro* untersucht.

4.3. Methodik

4.3.1. Zytotoxizitätstests

Bei der Zytotoxizitätsbestimmung unterscheidet man zwischen Tests durch direkten Kontakt, indirekten Kontakt oder anhand von Extrakten. Da Chondrozyten und Lymphozyten auch nach Implantation des Polymers in direkten Kontakt mit den Reinsubstanzen kommen, wurden zur Evaluation eines zytotoxischen Potentials der Reinsubstanzen Testverfahren durch direkten Kontakt gewählt. Bei den ausgewählten Testverfahren zur Zytotoxizitätsprüfung handelt es sich ausschließlich um *in vitro* Testverfahren zur Evaluation des zytotoxischen Potentials der Reinsubstanzen.

Zytotoxisch wirkende Substanzen können sich auf das Wachstum der Zellen auswirken, zu morphologischen Veränderungen und/oder Zellschaden führen, oder den Metabolismus der Zellen beeinflussen. Zytotoxizitätstest werden in vier Kategorien eingeteilt. Jede dieser Kategorien deckt einen der genannten Aspekte ab [CEN, 1993]. Um ein breites Spektrum an potentiell zytotoxischen Einflüssen einer Substanz zu erfassen, wurde in vorliegenden Untersuchungen mit Testverfahren aus zwei Kategorien gearbeitet. Zum einen wurde ein besonderes Augenmerk auf die Beeinflussung des Zellwachstums gelegt. Ein weiterer Fokus fiel auf die Evaluation eines entstandenen Zellschadens sowie die Analyse morphologischer Veränderungen.

Auswirkungen auf das Zellwachstum können an einer Abnahme der Proliferation und damit an einer verringerten Zellzahl gegenüber einer Negativ-Kontrolle erkannt werden. Durch die Bestimmung der Zellzahl, lassen sich somit Rückschlüsse auf das Zellwachstum ziehen. Die Zellen werden hierzu direkt unter dem Mikroskop ausgezählt, oder mit elektronischen Teilchenzählern ermittelt. Elektronische Teilchenzähler ermöglichen die automatische Messung des Widerstands oder der elektrischen Leitfähigkeit der Zellen. Ebenso können Streulichteigenschaften erfasst werden. Um die Zellzahl simultan zu messen, kann die Bestimmung der Zellzahl/Zellgröße auch mit einer Enzymreaktion gekoppelt werden, z.B. einer zytochemischen Peroxidasereaktion. Die automatische Zellzählung ermöglicht, eine große Zellzahl objektiv zu

bestimmen. Die Präzision ist bei elektronischen Teilchenzählern wesentlich höher als bei der direkten Auszählung durch einen Beobachter.

Neben dieser direkten Bestimmung der Zellzahl ist auch die indirekte Messung von großer Bedeutung. Zu den indirekten Testverfahren werden eine Reihe von indirekten und direkten Proliferationstests gezählt. Weit verbreitet ist der ^3H -Thymidin-Test. Er bedient sich des Einbaus radioaktiv markierten ^3H -Thymidins in die DNA-Neusynthese. Das radioaktiv markierte Thymidin wird in gleichem Maße eingebaut, wie das physiologische unmarkierte Thymidin. Der Einbau ist dabei abhängig von der DNA-Syntheserate und dient damit als Marker für die Zellproliferation. Für den ^3H -Thymidin-Test ist jedoch ein erheblicher Arbeitsaufwand erforderlich, da die Abtrennung des überschüssigen, nicht eingebauten ^3H -Thymidins vor der Messung erforderlich ist. Hinzu kommen Nachteile, die das Arbeiten mit radioaktiven Stoffen mit sich bringt. Weit verbreitet ist der Bromodeoxyuridin-(BrdU)-Assay. Wie ^3H -Thymidin bauen die Zellen auch BrdU in der Synthesephase des Zellzyklus in die genomische DNA ein. Weder fluoresziert BrdU, noch ist es radioaktiv. Die Zellen werden mit einem fluoreszierenden anti-BrdU-Antikörper versetzt und die markierten Zellen in einem Durchflusszytometer getrennt. Weitere indirekte Testverfahren bestimmen den Gesamtproteingehalt mit chromogenen Farbstoffen oder messen die Umsatzrate zellulärer Enzyme. Der 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test, bekannt als MTT-Test, weist die mitochondriale Stoffwechselaktivität lebender Zellen nach. Der MTT-Test ist ein indirekter Proliferationstest durch Ermittlung der Zellvitalität. Das den Zellen angebotene MTT, ein Tetrazoliumsalz, wird von Mitochondrien vitaler Zellen zu Formazan umgebaut [Slater et al., 1963]. Die Reduktion farbloser Tetrazoliumsalze in rote Formazanverbindungen wurde erstmals von Pechmann und Runge 1894 beschrieben [Pechmann und Runge, 1894]. Kuhn und Jerchel zeigten 1941 die Verwendbarkeit als Reduktionsindikatoren für biologische und biochemische Prozesse [Kuhn und Jerchel, 1941]. Der Easy-For-You- (EZ4U) Test beruht ebenfalls auf der Entdeckung, dass in Mitochondrien lebender Zellen farblose oder schwach gefärbte Tetrazoliumsalze in intensiv gefärbte Formazanderivate umgewandelt werden können. Mosman [1983] hat als Erster das Prinzip des EZ4U-Tests beschrieben, um die Zellproliferation und Zytotoxizität an Säugetierzellen zu untersuchen. Der genaue Prozess der Umwandlung ist allerdings noch nicht verstanden. Da die umgesetzten Derivate ein spezifisches Absorptionsvermögen von λ_{max} 450 nm haben, ist es möglich mit Hilfe eines Photometers auf das Vorhandensein von Zellen mit aktiven Mitochondrien zu schließen. Bei akuter Zellschädigung kommt es innerhalb von 15 Minuten über den Vorgang der Autophagie (=Selbstverdauung) oder Autolyse (=Selbstauflösung) zu einem gesteigerten Mitochondrienabbau, einer so genannten Mitochondrienverarmung der Zelle [Marzella et al., 1981]. Das in den Mitochondrien lokalisierte intrazelluläre Reduktionssystem mit der Succinatdehydrogenase wird inaktiv und die metabolische Vitalität der Zellen sinkt. Die Folge ist eine verringerte Reduktionsrate des Testsubstrates und damit eine Abnahme der Extinktion. Es ergibt sich eine gute Vergleichsmöglichkeit zwischen vitalen und avitalen Zellen [Mosmann, 1983]. Die Filterung muss bei der photometrischen Proliferationsmessung den verschiedenen Zellen angepasst werden, da unterschiedliche Zelltypen die Tetrazoliumsalze unterschiedlich umsetzen. Es sollten zudem Referenzwellenlängen gemessen (620 nm) oder Filter verwendet werden um Hintergrundstörungen durch Fingerabdrücke zu vermeiden.

Der MTT-Test hat einige Nachteile, wie zum Beispiel die Unlöslichkeit der gebildeten Formazanderivate. Es sind zeit- und arbeitsaufwändige Schritte und die Anwendung von Lösungs-

mitteln notwendig, um diese Verbindungen wieder in Lösung zu bringen. Diese Behandlung beendet irreversibel die Zellproliferation und macht eine Verlängerung der Inkubation zur Erhöhung der Empfindlichkeit oder ein Fortsetzen der Zellkultivierung unmöglich. Der EZ4U-Test ist dagegen wesentlich einfacher durchzuführen. Er arbeitet mit standardisierten Materialien, ist kostengünstig, und schneller im Ablauf. Der EZ4U-Test ist zuverlässig und weist eine hohe Sensitivität auf. Das hierbei verwendete Tetrazoliumsalz ist nicht radioaktiv und der Chromophor, soweit bekannt, nicht toxisch. Einzig stellt sich die Frage, ob es aufgrund der intensiven Rotfärbung des Formazanderivats zu Interferenzen mit dem Phenolrot des DMEM HAM'S F12 Mediums bei der photometrische Messung kommt. Bei Betrachtung der Absorptionsspektren von DMEM und EZ4U zeigen sich aber nur äußerst geringe Interferenzen mit dem Phenolrot.

Wie schon erwähnt, stellt die Untersuchung eines Zellschadens und morphologischer Veränderungen der Zellen einen weiteren Aspekt der *in vitro* Zytotoxizitätsprüfung dar. Ein Zellschaden lässt sich unter anderem durch eine Vitalitätsprüfung nachweisen. In erster Linie eignen sich hierfür Vitalfärbungen. Als Vitalfärbung bezeichnet man Färbemethoden, die am lebenden Tier oder an der lebenden Zelle vorgenommen und von diesen ohne Schaden längere Zeit ertragen werden. Jede Vitalfärbung stellt das Resultat zahlreicher Faktoren dar. Zu berücksichtigen sind chemische Merkmale des Farbstoffmoleküls, seine Löslichkeit, Ladungssinn, Ladungsgröße, Konzentration, Dispersität bzw. Teilchengröße, Temperatur, Viskosität, osmotische Parameter, Dielektrizitätskonstante, Oxidations- und Reduktionsfähigkeit, Elektrolytempfindlichkeit sowie der aktuelle pH-Wert. Die Schädigung und das Absterben der Zelle hat eine Veränderung der Färbung zur Folge, die sich unter einem Mikroskop erkennen lässt. Vitalfarbstoffe werden in saure und basische Vitalfarbstoffe, Fluorochrome und indifferente fettlösliche Farbstoffe unterteilt.

Die von Goldmann [1909] eingeführte Zellfärbung mit Trypanblau ist eine weit verbreitete Methodik. Der Vitalitätstest mit Trypanblau, einem sauren Farbstoff, beruht auf der Tatsache, dass die Zellmembran toter und absterbender Zellen für Trypanblau durchlässig ist, die Membran lebensfähiger Zellen hingegen nicht. Es sind also nur avitale Zellen mit Trypanblau färbbar sind. Eine hohe Vitalität ist durch eine hohe Anzahl ungefärbter und eine kleine Anzahl gefärbter Zellen charakterisiert. Daher kommt auch die Bezeichnung Trypanblau-Ausschlusstest. Dieser Test sollte immer unter den gleichen Bedingungen in Hinblick auf Farbstoffkonzentration, Temperatur und Zeit ablaufen. Die Zeit bis zur Auszählung sowie die Dauer der Auszählung, die Temperatur und die Bewertungskriterien des Untersuchenden haben großen Einfluss auf das Ergebnis. Die Frage, wann eine Zelle nicht, nur leicht oder stark angefärbt ist, liegt im subjektiven Ermessen des Untersuchenden. Zu beachten ist, dass Serum wegen seiner hohen Affinität für Farbstoffe die Ergebnisse verfälschen kann. Das Ergebnis der Zählung gibt nur einen Aspekt der Lebensfähigkeit der Zelle wieder, die nicht mit ihrer Proliferations- und Koloniebildungsfähigkeit gleichgesetzt werden kann. Als qualitativer, semiquantitativer Test eignet sich die Trypanblaufärbung, um einen weiteren Aspekt der Zytotoxizitätsprüfung, die Vitalität der Zellen, zu untersuchen.

Als schnelles Verfahren zur Bestimmung eines Zellschadens ist die Färbung mit Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) anzusehen. FDA wird von Esterasen in der intakten Zellmembran umgesetzt und fluoresziert daraufhin grün [Rotman und Papermaster, 1966]. PI kann die Membran vitaler Zellen nur erschwert passieren. Es wird bei zunehmender Membrandys-

funktion in geschädigte Zellen aufgenommen. Außerdem kann PI in avitalen Zellen vermindert vakuolär gespeichert werden. Es kann somit auf andere Zellorganelle wie z.B. auch den Zellkern übergreifen und interkaliert in die DNA. PI ist ein rot fluoreszierender Farbstoff. Interkaliert fluoresziert es stärker als in löslicher Form. Anhand der unterschiedlichen Fluoreszenz der Farbstoffe lassen sich somit avitale und vitale Zellen unterscheiden. Die Vitalfärbung mit PI und FDA eignet sich besonders zur Vitalitätstestung adhärent wachsender Zellen in Zellkultur. Eine Quantifizierung der Zellvitalität ist dabei aber nur bedingt möglich. Vielmehr lassen sich neben der Beurteilung der Vitalität noch weitere Aspekte eines zytotoxischen Schadens erkennen. So können durch die Beurteilung der Zelldichte Rückschlüsse auf die Proliferation der Zellen gezogen werden. Zudem ermöglicht die Vitalfärbung das Erkennen morphologischer Veränderungen. Veränderungen auf morphologischer Ebene können die Zellorganelle bzw. die Membranintegrität betreffen. Ein Beispiel wäre hier die Bildung von Zellvakuolen. Der natürliche oder programmierte Zelltod ist im Normalfall ungeachtet der biochemischen Abläufe durch eine definierte Abfolge eindeutiger Veränderungen wie Zellschrumpfung, Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung, Blasenbildung sowie einer Bildung apoptotischer Körperchen charakterisiert. Je nach dem Ausmaß der durch eine Substanz hervorgerufenen Schädigung können somit verschiedene morphologische Veränderungen beobachtet werden.

Nachteil der Vitalfärbung mit PI und FDA stellt die Subjektivität der Methode dar. Die Beurteilung der Zellen und ihrer Dichte kann von Beobachter zu Beobachter stark variieren. Die Vitalfärbung mit PI und FDA sollte daher nicht als alleiniger Nachweis für Zytotoxizität verwendet werden. Sie stellt aber eine wichtige Ergänzung zu quantitativen Verfahren wie z.B. einem EZ4U-Test dar, der das Wachstum der Zellen zwar objektiv betrachtet, zytotoxische Einflüsse, die sich nicht auf das Zellwachstum auswirken, aber nicht erfasst.

Um Chondrozyten für diese beiden Testverfahren (EZ4U-Test und Vitalfärbung mit PI und FDA) vorzubereiten, mussten sie zunächst auf Zellkulturplatten subkultiviert werden. Das Lösen der Chondrozyten vom Boden einer Zellkulturflasche kann mechanisch oder chemisch erfolgen. Zum einen lassen sich die Zellen vom Kulturflaschenboden abschaben. Dies kann allerdings zu physikalischen Schäden der Zellen führen. Außerdem werden die Zellen nicht sehr gut vereinzelt bzw. voneinander getrennt, so dass es bei dieser Methode der Zellpassagierung zu einer Clusterbildung von Chondrozyten kommen kann. Die Vitalfärbung mit PI und FDA wird hierdurch in den Ergebnissen nicht wesentlich beeinflusst, da eine Clusterbildung von dem Beobachter als solche erkannt wird und somit nicht mit einer erhöhten Zelldichte verwechselt wird. Der EZ4U-Test dagegen setzt eine Vereinzlung der Zellen voraus um die photometrischen Ergebnisse nicht zu verfälschen. Das proteolytische Enzym Trypsin trennt die Zellen auch interzellulär voneinander. Trypsin ist eine Serinprotease, die Peptidbindungen regioselektiv nach den Aminosäuren Lysin, Arginin und auch nach modifiziertem Cystein spaltet. Behandelt man die Zellen nicht zu lange mit Trypsin, werden sie nicht geschädigt und nur die extrazellulären Proteine werden gespalten. Man erhält somit vereinzelt Zellen. Eine gleichmäßigere Verteilung der Zellen auf die einzelnen Vertiefungen der Platte ist somit gewährleistet. Es kann allerdings zu einer enzymatischen Zerstörung der Zellen durch das Trypsin kommen. Demnach ist es wichtig eine zu lange Einwirkzeit des Trypsins zu vermeiden. Für einen Versuchsansatz wurden jeweils Zellen einer Kulturflasche verwendet. So konnte vermieden werden, dass durch das Trypsin entstandene enzymatische Schäden im Vergleich die Ergebnisse verfälschten.

Um einen Einfluss von Medienzusätzen und weiteren Faktoren auf die Zytotoxizitätsbestimmung zu vermeiden, wurden die Zellen einer Negativ-Kontrolle auf gleiche Weise behandelt, wie die Zellen eines Versuchsansatzes. Die Testergebnisse wurden immer im Unterschied zu der zugehörigen Negativ-Kontrolle gesehen. Potentiell schädigende Einflüsse verschiedener Faktoren auf die Zellen beeinflussten somit nicht die Messung und Beurteilung der Ergebnisse.

4.3.2. Alkalische Mikrogel-Elektrophorese und Comet Assay

Genotoxizitätstests dienen unter anderem der Untersuchung einer potentiell mutagenen Wirkung von chemischen Substanzen. Die Genotoxizität einer chemischen Substanz, die Änderungen im genetischen Material von Zellen auslöst, entspricht einer rein experimentellen Betrachtungsweise, wie sich die Substanzen in Experimenten *in vivo* oder *in vitro* verhalten. Substanzen, die dabei als genotoxisch positiv getestet werden, müssen jedoch nicht zwingend mutagen bzw. kanzerogen sein.

Genotoxische Chemikalien können unter anderem zu strukturellen Chromosomenaberrationen mit Gen- oder Chromosomenmutationen führen. Es können Einzel- und Doppelstrangbrüche, Lücken und Basenaustausche der DNA, sowie Ring- und azentrischer Fragmentbildung resultieren. Diese Veränderungen des genetischen Materials können negative, positive, aber auch keinerlei Konsequenzen nach sich ziehen. Die DNA-Integrität kann nach einer genotoxischen Schädigung entweder repariert werden, eine Veränderung der weitergegebenen Information bewirken oder zum Zelltod führen. Wird der Schaden des genetischen Materials nicht oder nur unzureichend repariert, kann eine Persistenz der Veränderung mit Mutationen und nachfolgenden Transformationen resultieren. Nicht reparierte Basenveränderungen können beispielsweise durch die damit verminderte Fähigkeit Wasserstoffbrücken auszubilden zu Replikationsfehlern führen. Des Weiteren beeinflussen Basenveränderungen die Häufigkeit mit der Keto-Enol-Tautomerien auftreten, einer häufigen Ursache für spontane Mutationen. Es gibt auch Noxen, welche sich in die DNA-Doppelhelix schieben und hierdurch den Replikationsprozess stören, was zu Rastermutationen führt.

Die meisten Mutagene, also Substanzen, die zu einem Anstieg der normalen Mutationsrate führen, sind bereits seit vielen Jahren auch als Kanzerogene bekannt. Einer einfachen Kopplung von Mutagenität und Kanzerogenität stand jedoch lange entgegen, dass potente Kanzerogene wie z.B. polyzyklische Kohlenwasserstoffe in Mutagenitätstests negative Ergebnisse ergaben. Erst als gezeigt werden konnte, dass diese Stoffe im Säugerorganismus, vor allem der Leber, zu aktiven Substanzen umgebaut werden müssen, bevor sie sowohl kanzerogen als auch mutagen wirken, konnte ein enger Zusammenhang zwischen somatischen Mutationen und der Krebsentstehung belegt werden [Balling, 1998]. Die Rückführung der kanzerogenen Wirkung einer Substanz auf ihre mutagenen Eigenschaften stellt einen wichtigen Grund dar, die genotoxische Wirkung von Chemikalien, mit denen der Mensch in Kontakt kommt, zu untersuchen.

Mutagenitätsprüfungen können anhand von Zellkulturen, mikrobiologischen Systemen, Tierversuchen, Genmutations- und Chromosomenanalysen vorgenommen werden. Die Entwicklung von Laborverfahren zu Darstellung toxikologischer Risiken *in vitro* ersetzt immer mehr Testsysteme, für die bislang Versuchstiere unerlässlich waren [Kleinsasser, 2004]. Die im Folgenden diskutierten Testsysteme zur Genotoxizitätsprüfung werden für *in-vitro*-, *in vivo*- und *ex vivo*-Untersuchungen eingesetzt.

Der Ames-Test ist ein anerkanntes Testverfahren, um chemische Mutagene zu identifizieren. Das von Ames entwickelte Verfahren ist sehr sensitiv, einfach durchzuführen und kostengünstig [Ames et al., 1973]. Der Ames-Test analysiert Genmutationen. Hierbei wird der Einfluss von Chemikalien auf die Rückmutationsrate eines histidinauxotrophen Salmonellen-Stamms gemessen. Da allerdings für die meisten Substanzen keine Untersuchungen zur Pharmakokinetik und zum Metabolismus bekannt sind, ist die Übertragung der Befunde auf den Menschen sehr problematisch. Es lag nahe Tests zu entwickeln, mit denen die mutagene Wirkung von Noxen an Säugerzellen untersucht werden kann. Während sich der Ames-Test vor allem für Genmutationen eignet, werden Genom- oder Chromosomenmutationen an Säugerzellen in Kulturen oder an Zellen des Knochenmarks frisch getöteter Mäuse oder Hamster getestet. Der Zellzyklus wird in der Metaphase blockiert, die Zellen mit einer Giemsa-Färbung gefärbt und unter dem Mikroskop inspiziert. Nachteil dieser Methode ist, dass die Untersuchung vieler Metaphasen einen großen Arbeitsaufwand erfordert. Der Schwesterchromatidaustausch- (SCE = Sister Chromatid Exchange) Test beschreibt vor allem DNA-Schäden auf DNA-Einzelstrang-Niveau. Er dient zur Ermittlung reziproker Austausche der DNA zwischen zwei Chromatiden eines replizierten Chromosoms. Der SCE ist eine spezielle Variante einer Chromosomenmutation, zum Teil als Folge einer DNA-Reparatur [Tucker et al., 1993]. Der Austausch kommt zustande, wenn die beiden Hälften eines Chromosoms (Schwesterchromatide) so geschädigt werden, dass die DNA-Stränge aufbrechen und auf dem jeweils falschen Arm des Chromosoms wieder in den Strang gefügt werden. Ein Chromosom besteht aus einem Desoxyribonucleinsäuredoppelstrang. Entlang der beiden komplementären Stränge wird bei der Zellteilung jeweils ein neuer synthetisiert, so dass zwei identische Schwesterchromatide aus Doppelsträngen entstehen. Zur Erkennung der Schwesterchromatide muss jeweils eines markiert werden. Da die meisten genotoxischen- und kanzerogenen Substanzen einen Schwesterchromatidaustausch verursachen, ist diese Chromosomenanalyse ein sensitiver Indikator für deren Genotoxizität. Zu beachten ist, dass nur Substanzen detektiert werden können, die Chromosomenbrüche hervorrufen können. SCE können allerdings auch bei der Replikation spontan auftreten. Der genaue Zusammenhang von SCEs und Mutationen ist daher noch weitgehend unklar. Eine direkte Korrelation der Häufigkeit von SCEs zur Mutagenität ist aber beschrieben [Carrano et al., 1978].

Als Alternative wird zunehmend die Induktion von Mikrokernen ausgewertet. Mikrokern bilden sich aus Chromosomenbruchstücken oder ganzen Chromosomen, die in der Anaphase auf keinen der Tochterkerne verteilt worden sind. Die Häufigkeit einer spontanen Bildung von Mikrokernen ist bei allen Spezies vergleichbar gering. Der Mikrokernetest dient somit dem Nachweis von Chromosomenschädigungen oder von Schädigungen des Spindelapparates durch Chemikalien *in vivo*. Hierbei ist der mutagene Phänotyp schnell und leicht erkennbar. Von Vorteil ist außerdem, dass Mikrokern während des gesamten Zellzyklus beobachtbar sind und sich deshalb viele Zellen pro Präparat auswerten lassen. Am gebräuchlichsten ist hier der Knochenmarkstest, bei dem die vermehrte Entstehung von Mikrokernen während der Erythropoese von Hamstern und Mäusen unter dem Einfluss von Chemikalien gemessen wird. Zu beachten ist bei diesem speziellen Testsystem, dass es gehäuft falsch negative Ergebnisse liefert. *In vivo* Keimzelltests, wie z.B. der "Säuger *in vivo* Dominant Letal Test", werden nicht als Routine-Mutagenitätsuntersuchungen durchgeführt, da für die entsprechenden Tests mit Mäusen viele tausend Tiere pro Testsubstanz nötig wären. Weitere bedeutende Methoden zum Mutationsnachweis sind Untersuchungen der DNA-Reparatursysteme (UDS = unscheduled DNA synthesis test). Die Reparatur von DNA-Schäden ist mit der DNA-Synthese verknüpft, deren Ausmaß als pro-

proportionales Maß für den Grad der Schädigung durch ein Mutagen dienen kann. Gemessen wird die DNA-Synthese unter Einbau radioaktiv markierten ^3H -Thymidins. Die replikative DNA-Synthese wird dabei blockiert, so dass nur die Reparatursynthese erfasst wird. Die Sensitivität dieser Methode ist aber limitiert. Außerdem wird kein Unterschied in der Art der DNA-Schädigung gemacht. Man braucht eine große Anzahl von Zellen.

Mutationen können in der Zielzelle auch zu einer vermehrten oder verminderten Aufnahme einer Noxe bzw. zu einem veränderten Resistenzpotential der Zelle führen. Dies kann mit einer Änderung der Toxizität der Substanz einhergehen. Nachweisverfahren stellen hier der Guanin-Analog-Resistenztest, der Thymidin-Kinase-Test, der Oubain-Resistenztest und der Hypoxanthin-Phospho-Ribosyl-Transferase-Test (HPRT) dar.

In dieser Arbeit wurde zum Nachweis einer mutmaßlichen Genveränderung der Lymphozyten der Comet Assay mit der alkalischen Version der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese (MGE,) verwendet. Unter Gelelektrophorese versteht man im Allgemeinen alle elektrophoretischen Verfahren, bei denen geladene Moleküle in porösen Gelen getrennt werden. Das in vorliegender Arbeit verwendete Agarosegel wird für die Trennung von Nukleinsäuren und DNA-Restriktionsfragmenten (bis zu 30 kb) erfolgreich verwendet. Ostling und Johanson [1984] benutzen als Erste die MGE zum Nachweis von DNA-Schäden an einzelnen Zellen. Sie diente damals einer Untersuchung des Migrationsverhalten der DNA von Einzelzellen nach Bestrahlung. Zu einer DNA-Migration in der Elektrophorese führt eine vorhergegangene Schädigung des Kerninhalts z.B. durch Acetylierung und anschließender Entspiralisierung der DNA. Die DNA-Fragmente haben eine elektrische Polarisation und wandern im elektrischen Feld in Richtung Anode. Je höher die Fragmentierung, desto höher ist der Anteil der am Schluss der Elektrophorese im Schweif des Kometen befindlichen DNA in Relation zur nicht fragmentierten DNA im Kopf. Empfindlich ist diese unter neutralen pH-Werten durchgeführte Version der MGE besonders für Doppelstrangbrüche. Die MGE wurde von Singh et al. [1988] zum ersten Mal unter alkalischen Bedingungen ($\text{pH} > 13$) durchgeführt. Hierbei können neben Doppelstrangbrüchen auch alkalilabile Stellen und Einzelstrangbrüche erkannt werden. DNA denaturiert ab pH-Werten von 12,0. Ab $\text{pH} > 12,6$ kommt es bei alkalilabilen Stellen zu Strangbrüchen [Kohn, 1991]. Ab einem $\text{pH} > 13$ kann mit einem maximalen Maß an alkalilabilen Stellen und Einzelstrangbrüchen gerechnet werden. Da die meisten Noxen eher Einzelstrangbrüche als Doppelstrangbrüche hervorrufen, stellt die unter alkalischen Bedingungen durchgeführte MGE aufgrund der DNA-Denaturierung während der Membranlyse und der Elektrophorese ein besonders sensibles Verfahren zum Genotoxizitätsnachweis dar [Wojewodzka et al., 2002]. Über die Bedeutung von Einzelstrangbrüchen besteht Unklarheit. Einzelstrangbrüche sind generell sehr häufig in Zellen und können von zelleigenen Reparaturmechanismen zum Teil innerhalb von Stunden wieder repariert werden [Olive et al., 1991]. Hierbei wird der Bereich mit dem Einzelstrangbruch herausgeschnitten und die Lücke mit Information aus dem zweiten nicht beschädigten Strang aufgefüllt. Jüngere Untersuchungen ergeben jedoch Anlass zur Vermutung dass bestimmte Einzelstrangbrüche erschwert repariert werden können, so dass biologische Effekte möglich sind. Des Weiteren kann eine zu hohe Anzahl dieser Schäden zu Überlastung der Reparatursysteme führen und somit möglicherweise zu Mutationen. Eine direkte pathogenetische Verbindung zwischen DNA-Strangbrüchen und einem kanzerogenen Effekt ist bisher allerdings nicht bekannt [Glück und Gebbers, 2000]. 1990 verwendeten Olive *et al.* eine weitere Version der MGE, die bei einem pH-Wert von 12,3 durchgeführt wurde [Olive et al., 1990]. Modifizierte

Versionen der Mikrogel-Elektrophorese unter neutralen Bedingungen haben nach neuen Erkenntnissen eine ebenfalls hohe Sensitivität [Chandna, 2004, Wojewodzka et al., 2002]. Als Standard wird heute allerdings meistens die alkalische Version der Mikrogel-Elektrophorese angewandt. Der Comet Assay ermöglicht durch eine Kombination der alkalische MGE mit dem computerbasierten Programm Komet Data 4.0 eine Quantifizierung [Kim et al., 2002] und Visualisierung [Kleinsasser et al., 2001] des DNA-Schadens. Anhand des Comet Assays können DNA Schädigungen physikalischen, biologischen oder chemischen Ursprungs untersucht werden. Er kann zur Untersuchung von Zellen nach *in vivo* oder *in vitro* Exposition eingesetzt werden. Der Comet Assay weist, im Gegensatz zu anderen Genotoxizitätstests, deren Nachweis auf unreparierten Schäden und/oder strukturellen Aberration als Folge von Reparaturmechanismen beruht, primäre DNA-Schäden nach [Garaj-Vrhovac, 2004]. Neben den Untersuchungen zu substanzinduzierten Strangbrüchen ist auch die zelleigene Reparaturfähigkeit mit dem Comet Assay in einer quantitativen und zeitlichen Dimension zu beurteilen [Bauch et al., 1999, Plappert et al., 1995]. Somit ist gewährleistet, dass induzierte Einzelstrangbrüche auch als solche erkannt werden und nicht schon wieder repariert sind. Der Comet Assay dient als ein Test der Genotoxizität, da er mutagene und kanzerogene Substanzen erfassen kann [Anderson et al., 1998]. Er stellt einen Weg dar sowohl proliferierende als auch nicht proliferierende Zellen zu erfassen. Er ist bei praktisch jedem eukaryontischen Zelltyp schon bei geringer Zellzahl anwendbar [Glück und Gebbers, 2000]. Die Anwendbarkeit an Lymphozyten wurde schon in früheren Studien beschrieben [Kleinsasser et al., 2001, Kleinsasser et al., 2000]. Im Gegensatz zum Mikrokerntest zeigt der Comet Assay schon bei geringen Dosen toxischer Substanzen eindeutige Veränderungen [He et al., 2000]. Der Comet Assay stellt somit ein besonders sensitives Verfahren zum Nachweis eines DNA-Schadens dar. Diese Sensitivität des Comet Assays wurde auch schon von Tice und Strauss [1995] bestätigt: Schon bei einer Strahlendosis von fünf cGy wiesen die menschlichen Lymphozyten unter Anwendung der MGE erhöhte OTM-Werte gegenüber der Kontrollgruppe auf. Der Comet Assay eignet sich besonders zum Screening potenzieller Noxen. Chemikalien können Strangbrüche auf direktem Weg oder über Radikale erzeugen. Sie können DNA-Addukte bilden oder Basen bzw. Zucker alkylieren und somit ebenfalls genotoxisch wirken. All dies führt zu einer stärker fragmentierten DNA und kann mit Hilfe des Comet Assays erkannt werden. Zudem setzt der Comet Assay keine Zellkulturen voraus, so dass falsch positive Ergebnisse durch mutagene Wirkung von Zellchemikalien wie Colchicin oder Cytochalasin B vermieden werden [Garaj-Vrhovac, 2004]. Wie schon erwähnt, wird die alkalische Einzelzell-Mikrogelelektrophorese heute zum Nachweis von Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen sowie inkompletten DNA-Exzisionsreparaturen verwendet [Tice et al., 2000]. Andere Aspekte der Genotoxizität, wie z.B. Quervernetzungen, führen eventuell nicht zu einer verringerten Stabilität der DNA und können demnach nicht anhand von DNA-Migration erkannt werden. Die MGE erhält zunehmend Bedeutung in der Beurteilung der Wirkung von Chemotherapeutika sowie in der Ökotoxikologie. Auch eine Abschätzung der Prädisposition von Individuen, welche mit Noxen in Kontakt kamen, wird möglich. Man kann das mit einem Schadstoff in Kontakt gekommene Gewebe oder Lymphozyten direkt untersuchen. Eine Identifikation spezifischer Chromosomen und Genorte eines DNA-Schadens ermöglicht die Kombination der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit dem Comet Assay [Harréus et al., 2004]. Der Comet Assay stellt zudem ein Kurzzeitverfahren dar, das einfach und schnell durchgeführt werden kann. Zum Beispiel können an einer Zellprobe gleich mehrere Substanzen bzw. mehrere Konzentrationen untersucht werden. Man kann ihn daher auch als sehr flexibel bezeichnen. Ein weiterer Vorteil

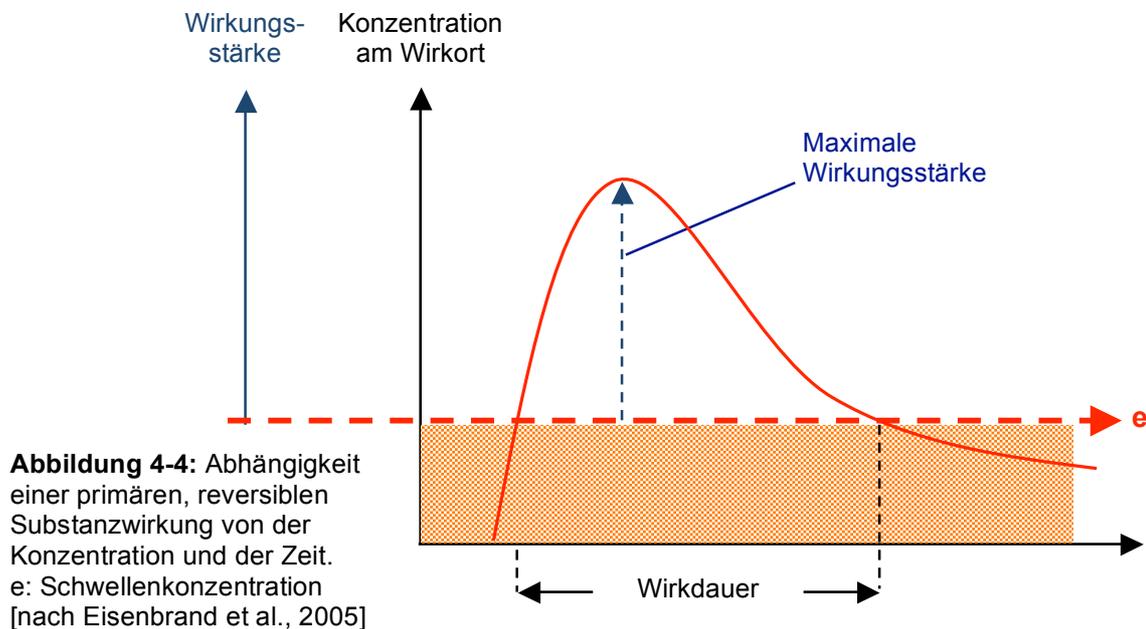
ist, dass pro Versuch nur eine sehr geringe Menge der Testsubstanz benötigt wird. Die Materialkosten halten sich vergleichsmäßig gering. Deshalb erschien der Comet Assay mit der alkalische Version der MGE gerade auch für das Screening auf eine potentielle Genotoxizität der in dem Polyurethan enthaltenen Reinsubstanzen als geeignet. Allerdings liefert der Comet Assay nur valide Ergebnisse, wenn eine zytotoxischen Schädigung der Zellen weitgehend ausgeschlossen werden kann. Die Vitalität der Zellen wurde mittels des Trypanblau-Ausschlusstests bestimmt (siehe 4.4.1.). Auch wenn der Trypanblau-Ausschlusstests, außer zur Membranstabilität, keine zusätzlichen detaillierten Aussagen zu funktionellen Aspekten der Zelle erlaubt, ist er als standardisierter Test zum Monitoring möglicher Einflussfaktoren auf die DNA-Fragmentierung im Comet Assay akzeptiert [Tice et al., 2000]. Sinkt die Vitalität der Lymphozyten unter 75%, kann die Migration der DNA zu einem erheblichen Anteil auch aufgrund einer Apoptose oder Nekrose zustande gekommen sein, da diese letzten Endes alle zu einer DNA-Fragmentierung führen [Henderson et al., 1998]. Basierend auf dieser Überlegung wurde die alkalische Version der MGE nur bei einer Vitalität über 75% durchgeführt. Dennoch erschienen ab und zu Proteinbestandteile in allen Proben. Diese Konglomerate wurden aber nicht ausgewertet. Vorliegende Untersuchungen dienen der Evaluation eines genotoxischen Potentials von Reinsubstanzen, die für das Tissue Engineering in Betracht gezogen werden. Eine genaue Lokalisation des DNA-Schadens wurde im Rahmen dieses genotoxischen Screenings daher nicht ermittelt.

4.4. Substanzspezifische Ergebnisse

Die Risikoabschätzung der Toxizität einer chemischen Noxe ist kein einstufiges Modell, sondern setzt sich aus vielen Einzelschritten und Informationen zusammen. Hierzu gehören Informationen zu den chemischen Eigenschaften der Substanz, *in vitro*- und tierexperimentelle Versuchsergebnisse, toxikodynamische und -kinetische Daten sowie Modelluntersuchungen zur biologischen und toxischen Wirkung im Menschen. Letzten Endes bestimmen Toxikodynamik und Toxikokinetik zusammen das Ausmaß der toxischen Wirkung einer Substanz. Die Toxikokinetik ist ausschlaggebend für die Konzentration am Wirkungsort, die Toxikodynamik beschreibt die Empfindlichkeit des Organismus. Prinzipiell hat jede Giftwirkung ihre Ursache auf zellulärer Ebene. Toxikologische Untersuchungen an Zellen liefern demnach wichtige Hinweise über das toxische Potential einer Substanz. Bereits Paracelsus erkannte die Abhängigkeit der Wirkung einer Substanz von der Dosis. Eine Substanz ist daher nicht per se toxisch, es gibt aber beinahe für jede Substanz eine toxische Konzentration [Hohenheim, 1538]. Für die quantitative Erfassung der Wirkung eines Stoffes auf einen Organismus dient die Dosis-Wirkungskurve. So zeigt sich bei entsprechend niedrigen Substanzmengen ein wirkungsfreier Bereich, bei Erhöhung der Dosis steigt die Wirkung zunächst steil an, bis sie asymptotisch der maximalen Wirkung zustrebt. Hierbei ist zu beachten, dass die Wirkung von Kanzerogenen im Vergleich zu anderen toxischen Effekten eine Sonderstellung aufweist. Bei genotoxischen Kanzerogenen gibt es keinen Anhaltspunkt für eine wissenschaftlich belegbare Schwellendosis, unterhalb derer keine Schädigung des genetischen Materials mehr stattfindet. Es konnte allerdings vielfach eine Korrelation einer Tumorzinzidenz mit der Kanzerogen-Dosis gezeigt werden. So wurde auf experimenteller Basis eine allgemeine Dosis-Wirkungs-Beziehung für chemische Kanzerogene mit Einbeziehung eines Zeitfaktors formuliert [Druckrey et al., 1963]. Während an Tierversuchen eine Nichtlinearität der kanzerogenen Effekte zu beobachten ist, kann aus epidemiologischen Studien am Menschen bis auf wenige Ausnahmen eine lineare Dosis-Wirkungsbeziehung

abgeleitet werden [Lutz, 1990]. Um Dextrose, PEG-PPG-PEG und Triethanolamin als Träger-substanzen für Zellträger einsetzen zu können, bedarf es Dosis-Wirkungsuntersuchungen *in vitro*, zur Definition der maximalen Substanzkonzentrationen, die das Risiko eines toxischen Effektes der Reinsubstanzen minimieren. Das Risiko steht hierbei für die Wahrscheinlichkeit, mit der ein toxischer Effekt eintritt. Es wurden Dosis-Wirkungsuntersuchungen zur Zytotoxizität an Chondrozyten durchgeführt. Die so ermittelten maximalen Substanzkonzentrationen, die *in vitro* keinen zytotoxischen Effekt an Chondrozyten zeigten, wurden in weiteren Experimenten auf eine zyto- und genotoxische Wirkung an Lymphozyten hin untersucht. Zeigten sich in diesen Untersuchungen toxische Einflüsse der Substanzen, dienten Dosis-Wirkungsuntersuchungen an Lymphozyten der Definition der Substanzkonzentrationen, die auch an Lymphozyten *in vitro* keinen zyto- oder genotoxischen Effekt zeigten.

Neben der Abhängigkeit der toxischen Wirkung von der Konzentration der Fremdschubstanz, spielt auch die Dauer der Einwirkung eine entscheidende Rolle (Abb. 4-4). Zytotoxizitätsuntersuchungen an Chondrozyten erfolgten nach 24 Stunden langer Inkubation gemäß den Empfehlungen des Europäischen Komitees für Normung [CEN, 1993]. Zyto- und Genotoxizitätsuntersuchungen an Lymphozyten wurden nach 60 Minuten langer Inkubation mit den Testsubstanzen durchgeführt. Dies basiert auf Untersuchungen von DNA-Strangbrüchen in Lymphozyten nach Behandlung mit UV-Strahlung, bei denen das Maximum an Strangbrüchen nach 1 h Bestrahlung vermerkt wurde [Green et al., 1992].



Als Folgen eines zytotoxischen Einflusses wurden sowohl die verminderte Proliferation der Zellen gegenüber einer Negativ-Kontrolle und das Auftreten avitaler Zellen, als auch die Bildung von Zellvakuolen angesehen. Als genotoxisch wurden solche Substanzen bezeichnet, die zu einer Fragmentierung der DNA, respektive zu einer Kometenbildung im Comet Assay führten. Jeder Versuch wurde in Kombination mit einem Negativ-Kontrollansatz durchgeführt.

Hierbei wurden Zellen auf gleiche Weise behandelt wie Zellen des Versuchsansatzes, ohne die Addition von Testsubstanzen. Falsch positive Ergebnisse bei schon vor der Inkubation mit den Reinsubstanzen bestehenden zelluläre Schäden konnten somit identifiziert werden. Um das Risiko von Strahlenschäden durch Tageslicht oder elektrisches Licht zu minimieren, wurden die Versuche an Lymphozyten in abgedunkelten Räumen durchgeführt. Als Positiv-Kontrolle bei der alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese dienten mit N-Methyl-N'-Nitro-N-Nitrosoguanidin (MNNG) inkubierte Lymphozyten. MNNG ist ein Nitrosamid und wird als alkylierende Substanz eingesetzt. Alkylierende Substanzen tragen reaktionsfähige Gruppen, die mit DNA-Basen eine kovalente Bindung eingehen können. Sie können somit, ohne metabolisiert zu werden, fehlerhafte DNA-Strukturen hervorrufen. Eine kanzerogene Wirkung von MNNG wurde in tierexperimentellen Studien an Nagern nachgewiesen [Aoyagi et al., 2000]. An Leberzellen konnten DNA-Strangbrüche nach Inkubation mit MNNG festgestellt werden [Slamenova et al., 1997]. Diese DNA-Strangbrüche lassen sich anhand der alkalischen Version der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese nachweisen. Falsch negative Ergebnisse aufgrund eines systematischen Fehlers in der Durchführung der alkalischen Einzelzell-Mikrogelelektrophorese wurden somit vermieden.

4.4.1. Dextrose

Vorliegende Untersuchungen zeigen, dass Dextrose in einer Konzentration von 4,25 mg/ml *in vitro* keine zytotoxische Wirkung an Chondrozyten und keine zyto- und genotoxische Wirkung an Lymphozyten hervorruft. Eine Abhängigkeit der zytotoxischen Wirkung von Dextrose an Chondrozyten im Sinne einer signifikant unterschiedlichen Proliferation der Chondrozyten nach Inkubation mit unterschiedlichen Dextrosekonzentrationen bei einer mittleren effektiven Dosis (EC_{50}) von 108,6 mg/ml unterstreicht die Notwendigkeit einer differenzierten Dosis-Wirkungsuntersuchung.

In vorliegenden Untersuchungen wurden keine glucosefreie Zellkulturmedium verwendet wurden. RPMI als Zellmedium für Lymphozyten enthält circa 2 mg/ml D-Glucose, DMEM HAM's F12 als Zellkulturmedium für Chondrozyten 1,801 mg/ml D-Glucose. Dies entspricht in etwa der zur Sicherstellung des physiologischen Wachstums und Metabolismus der Zellen benötigten Menge an D-Glucose und somit auch den physiologischen erforderlichen Bedingungen und den D-Glucose-Konzentrationen *in vivo*. Die in diesen Untersuchungen angegebenen Dextrosekonzentrationen beziehen sich auf die zusätzlich zur Testung von den Lymphozyten oder Chondrozyten dem Medium zugefügten Dextrosemengen, welche die physiologisch essentiellen Dextrosemengen überschreiten. Damit wurden dem Organismus möglichst entsprechende Bedingungen dargestellt, um potentielle zyto- oder genotoxische dosisabhängige Effekte von Dextrose bewerten zu können.

Die Proliferation der Chondrozyten nach Inkubation mit bis zu 50 mg/ml Dextrose unterscheidet sich nach quantitativer Messung mit dem EZ4U-Proliferationstest nicht signifikant von der Negativ-Kontrolle. Eine Inkubation der Chondrozyten mit 100 mg/ml führt zu einer signifikant eingeschränkten Proliferation. Deskriptive Betrachtungen der mit PI und FDA gefärbten Chondrozyten zeigen eine eingeschränkte Dichte der Chondrozyten nach Inkubation mit 50 mg/ml. Diese in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Pal et al., die eine Glucose induzierte Toxizität in Gonadotropin-Releasing-Hormon sezernierenden Neuronen *in vitro* gezeigt haben [Pal et al., 2007].

Dextrosekonzentrationen von 45 mg/ml führten in der Arbeit von Pal et al. im Vergleich zu 10 mg/ml zu einer deutlichen Reduktion der Zellvitalität und einem höheren Prozentsatz apoptotischer Zellen. In vorliegender Arbeit entspricht die Dichte der Chondrozyten nach Inkubation mit 25 mg/ml Dextrose der Dichte der Negativ-Kontrolle. Die maximale, nicht zytotoxische Konzentration an Chondrozyten beträgt somit 25 mg/ml.

Um DNA-Schädigungen basierend auf einem genotoxischen Einfluss von Dextrose auszuschließen, wurde der Comet Assay stellvertretend an Lymphozyten durchgeführt. In der vorliegenden Untersuchung zeigt eine Dextrosekonzentration von 25 mg/ml an Lymphozyten *in vitro* einen zyto- und genotoxischen Effekt im Sinne einer verminderten Vitalität und einer erhöhten DNA-Fragmentierung gegenüber einer Negativ-Kontrolle. Die Untersuchung zur Konzentrationsabhängigkeit der zyto- und genotoxischen Schädigung der Lymphozyten durch Dextrose ergab nach Analyse mit dem Friedman-Test eine signifikante Abhängigkeit. Aufgrund der niedrigen Stichprobenzahl in diesen Dosis-Wirkungsuntersuchungen wurde auf die Auswertung mit dem Wilcoxon-Test verzichtet. Während sich für die Vitalität der Lymphozyten nach Inkubation mit 5 mg/ml Dextrose noch kein Effekt gegenüber der Negativ-Kontrolle abzeichnet, lässt sich bei dieser Konzentration eine erhöhte DNA-Schädigung der Lymphozyten feststellen. In einer weiteren Versuchsserie führte eine Dextrose-Konzentration von 4,25 mg/ml an Lymphozyten zu keiner erhöhten DNA-Fragmentierung. Lorenzi et al. zeigte in Untersuchungen an humanen Endothelzellen, nicht aber an Fibroblasten, einen signifikanten Anstieg der DNA-Fragmentation nach Inkubation mit 5.4 mg/ml Dextrose [Lorenzi et al., 1986]. An retinalen mikrovaskulären Endothelzellen und Perizyten konnte auch nach 5-tägiger Exposition mit 2,7 mg/ml oder 0,9 mg/ml (Euglycämie) im Comet Assay kein induzierter DNA-Schaden detektiert werden [Patton et al., 2002]. Eine Konzentration von 4,25 mg/ml kommt somit nach *in vitro* Untersuchungen für eine Verwendung als Zellträger potentiell in Frage. Die Verwendung höherer Dextrosekonzentration ist nicht empfehlenswert, da eine genotoxische Wirkung nicht auszuschließen ist.

4.4.2. PEG-PPG-PEG

In einer Konzentration von 0,15 mg/ml wurden *in vitro* durch PEG-PPG-PEG keine zytotoxischen Wirkungen an Chondrozyten und keine zyto- und genotoxischen Wirkungen an Lymphozyten hervorgerufen. Eine Abhängigkeit der zytotoxischen Wirkung an Chondrozyten im Sinne einer signifikant unterschiedlichen Proliferation nach Inkubation mit unterschiedlichen PEG-PPG-PEG-Konzentrationen bei einer mittleren effektiven Dosis (EC_{50}) von 0,5 mg/ml unterstreicht jedoch die Notwendigkeit einer differenzierten Dosis-Wirkungsuntersuchung, zumal bislang keine Daten zu der Zyto- oder Genotoxizität von PEG-PPG-PEG *in vitro* in der Literatur beschrieben wurden. Eine signifikant eingeschränkte Proliferation der Chondrozyten kann nach Inkubation mit PEG-PPG-PEG erst ab einem Konzentrationsbereich von 0,3 mg/ml bis 200 mg/ml festgestellt werden. Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den deskriptiven Beobachtungen der mit PI und FDA gefärbten Chondrozyten, denn hier führt auch eine PEG-PPG-PEG-Konzentration von 20 mg/ml noch zu keinen negativen Auswirkungen auf die Zelldichte und Zellvitalität im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Es besteht somit eine Diskrepanz der Ergebnisse aus quantitativer Proliferationsmessung und der Vitalfärbung. Um einen zufälligen Fehler in einem der beiden Testverfahren auszuschließen, wurden die Versuche mehrmals wiederholt. Eine Änderung der Resultate ergab sich hierbei nicht. Da die mikros-

kopische Begutachtung der gefärbten Zellen stark vom Beobachter variieren kann, und der EZ4U-Test ein etabliertes Verfahren zur Proliferationsmessung darstellt, ist eine zytotoxische Wirkung vom PEG-PPG-PEG bei Konzentrationen von $>0,15$ mg/ml nicht auszuschließen. Untersuchungen der Zytotoxizität von PEG-PPG-PEG dieser Konzentration an Lymphozyten zeigen keine signifikant unterschiedliche Vitalität zur Negativ-Kontrolle.

PEG-PPG-PEG-Konzentrationen von 0,018 mg/ml und 0,037 mg/ml zeigen in Proliferationsmessungen mit dem EZ4U-Test einen signifikant proliferationsfördernden Effekt auf Chondrozyten im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle. Die gesteigerte Proliferation der Chondrozyten kann auf verschiedenen Ursachen basieren. Zum einen können kanzerogene Stoffe wachstumsfördernd auf die Zellen wirken. Aber auch die Optimierung der Zellkulturbedingungen durch Einzelsubstanzen kann die Proliferation der Chondrozyten fördern. Um eine gesteigerte Proliferation der Chondrozyten basierend auf einem genotoxischen Einfluss von PEG-PPG-PEG auszuschließen, wurden Genotoxizitätsuntersuchungen mit dem Comet Assay stellvertretend an Lymphozyten durchgeführt. Nach Inkubation mit 0,15 mg/ml, der an Chondrozyten und Lymphozyten definierten maximalen Konzentration ohne zytotoxische Folgeschäden, zeigte der Comet Assay keine signifikant unterschiedliche DNA-Fragmentierung der Lymphozyten im Vergleich mit der Negativ-Kontrolle. PEG-PPG-PEG in einer Konzentration von 0,15 mg/ml wird somit als die maximale Substanzkonzentration definiert, die *in vitro* keinen toxischen Effekt an humanen Zielzellen zeigt.

4.4.3. Triethanolamin

Die vorliegenden Untersuchungen haben ergeben, dass Triethanolamin in einer Konzentration von 0,9 mg/ml *in vitro* weder zytotoxische Wirkungen an Chondrozyten noch zyto- und genotoxische Wirkungen an Lymphozyten hervorruft.

Während sich mit dem EZ4U-Proliferationstest auch bei einer Triethanolaminkonzentration von 1,8 mg/ml bei einer mittleren effektiven Dosis (EC_{50}) von 2,7 mg/ml keine Zytotoxizität an Chondrozyten nachweisen lässt, zeigt sich bei der morphologischen Betrachtung nach PI- und FDA-Färbung bei dieser Konzentration bereits eine Vakuolenbildung in den Chondrozyten

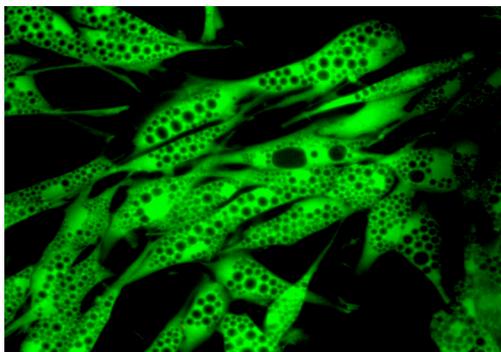


Abbildung 4-5: Chondrozyten mit Vakuolen mit PI und FDA gefärbt (200fache Vergrößerung)

(Abb. 4-5) und zudem eine gegenüber der Negativ-Kontrolle leicht reduzierte Zelldichte. Eine der Negativ-Kontrolle entsprechende Zelldichte zeigt sich mikroskopisch nach Inkubation der Chondrozyten mit 1,13 μ l/ml. Die Bildung von Vakuolen konnte in Chondrozyten nach Inkubation mit 1 μ l/ml erkannt werden (Daten nicht abgebildet). Als Ausdruck einer unspezifischen Schädigung der Zelle bricht das Membransystem des rauen Endoplasmatischen Retikulums (rER) in kleine Einheiten auf. Diese wandeln sich später in Bläschen um. Bei schweren Zellschädigungen, die zu einem Zusammenbruch der oxidativen Phosphorylierung führen, versagt folgend die Natriumpumpe. Dadurch strömt Wasser in die Zelle und die rER-Vesikel ein, so dass sie zu wasser-gefüllten Vakuolen werden. Diese als vakuolige

Degeneration des rER bezeichnete Zellveränderung wird meist auch von einer Schwellung des glatten Endoplasmatischen Retikulums und der Mitochondrien begleitet. Die vakuolige Degeneration einer Zelle ist zunächst noch reversibel und findet z.B. bei Ischämie in allen Körperzellen statt. Bei völligem Zusammenbruch des zellulären Stoffwechsels, bei osmotischen Störungen oder Membranschäden, nehmen die Vakuolen gigantische Formen an. Es kann zu einer irreversiblen Ballonisierung des Zytoplasmas kommen. Die Bildung von Vakuolen deutet somit auf eine erste Schädigung der Zellen hin, obwohl deren Dichte und somit das Wachstum nicht direkt beeinflusst zu sein scheint. Auch wenn die Vakuolisierung anfangs noch reversibel ist, sollte sie nicht außer Acht gelassen werden, zeigt sie doch die Schwierigkeit der Zelle mit der Testsubstanz zu leben. Die Inkubation der Chondrozyten mit 0,9 mg/ml Triethanolamin führt zu keiner vermehrten Vakuolenbildung bei entsprechender Zelldichte im Vergleich zu einer Negativ-Kontrolle.

Quantitative Proliferationsmessungen mit dem EZ4U-Proliferationstest zeigen nach Inkubation der Chondrozyten mit 0,45 bis 0,9 mg/ml Triethanolamin allerdings eine signifikant gesteigerte Proliferation. Wie bereits unter 4.5.2. diskutiert, sollte bei einer gesteigerten Proliferation eine mögliche genotoxische Wirkung der Prüfsubstanz in Betracht gezogen werden. Bei Triethanolamin ist zudem bekannt, dass es unter Nitrosierungsbedingungen zu *N*-Nitrosodiethanolamin, einem bekannten Leber-, Nieren- und Nasenkarzinogen umgewandelt werden kann [Hoffmann et al., 1982]. *In vitro* konnte aber bis zum heutigen Zeitpunkt kein mutagener Effekt von Triethanolamin gezeigt werden [Snyder, 1999]. Eine Induktion von Mutationen in *S. typhimurium* konnte nach Exposition mit Triethanolamin von 0,033 bis 3.333 µg/Platte nicht detektiert werden [Mortelmans et al., 1986]. Auch zytogenetische Untersuchungen an CHO Zellen zeigten bis zu Konzentrationen von 1,01 mg/ml keine Entstehung von SCE [Galloway et al., 1987]. Dagegen konnten in einer weiteren Untersuchung SCE nach Inkubation mit 2,52 mg/ml Triethanolamin in CHO Zellen beobachtet werden. Diese Studie wurde aber im Nachhinein aufgrund eines negativen Trend Testes als fragwürdig geachtet. Genotoxizitätsuntersuchungen an Lymphozyten mit dem Comet Assay zeigen in vorliegenden Untersuchungen nach Inkubation mit 0,9 mg/ml Triethanolamin keine signifikant erhöhte DNA-Fragmentierung im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle. Eine eingeschränkte Vitalität der Lymphozyten bei dieser Substanzkonzentration konnte als Ursache einer fehlenden Genotoxizität ausgeschlossen werden. Anhand dieser Resultate wird 0,9 mg/ml Triethanolamin als die maximale Substanzkonzentration definiert, die *in vitro* keinen toxischen Effekt an humanen Zielzellen zeigt.

4.4.4. Biomaterialzusammensetzung

Anhand der vorliegenden, toxikologischen *in vitro* Einzelsubstanzenanalysen konnten maximale Konzentrationen definiert werden, die das Wachstum und die Vitalität der Zellen nicht signifikant einschränken, und zu keiner signifikant erhöhten DNA-Fragmentierung im Vergleich zu einer Negativ-Kontrolle führen. Es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Dextrose in einer Konzentration von 4,25 mg/ml, PEG-PPG-PEG in einer Konzentration von 0,15 mg/ml und Triethanolamin in einer Konzentration von 0,9 mg/ml keine zytotoxischen Einflüsse auf Chondrozyten und keine zyto- und genotoxischen Einflüsse auf Lymphozyten aufweisen. Diese Substanzkonzentrationen spiegeln die Konzentrationen der Einzelsubstanzen wieder, die als Bestandteil von Polycaprolacton im Rahmen der Verwendung als Zellträger, maximal in einer

Zeiteinheit von 24 Stunden auf Chondrozyten und Lymphozyten einwirken sollten. Es muss somit sichergestellt sein, dass sowohl die in Polycaprolacton enthaltenen, wie auch die in einer Zeiteinheit von 24 Stunden degradierenden Substanzkonzentrationen, diese hier definierten Konzentrationen nicht überschreiten.

Zu erwähnen sei hier, dass bei Verwendung der Trägersubstanzen als Zellträger, basierend auf Polycaprolacton, eine Interaktionen der einzelnen Substanzen möglich ist. Der Einfluss möglicher Wechselwirkungen der Einzelsubstanzen auf die toxikologischen Eigenschaften sind vor der Verwendung der Substanzen in Polycaprolacton als Zellträger zu evaluieren.

Der menschliche Körper entspricht keinem geschlossenen System. Die Bedingungen im Reagenzglas können nur annähernd mit den Verhältnissen des Implantats im Körper verglichen werden. Wie schon unter 4.5. erwähnt, ist die Toxikokinetik und -dynamik zur toxikologischen Untersuchung von großer Bedeutung. Hierbei sollte die Clearance, das Verteilungsvolumen, die Bioverfügbarkeit und die Halbwertszeit der Substanz beachtet werden. Bei guter systemischer Verfügbarkeit muss für Substanzen, die mutagene Veränderungen von Zellen *in vitro* zeigen, erfahrungsgemäß auch mit einer mutagenen Wirkung *in vivo* gerechnet werden [Eisenbrand et al., 2005]. Die nach teilweise nur einstündiger *in vitro* Inkubation ermittelten Grenzkonzentrationen für Einzelstoffe im Biomaterial entsprechen somit nicht zwingend der effektiven Dosis, die *in vivo* auf die Zellen wirken. Dies beruht unter anderem auch auf der Tatsache, dass die in einer bestimmten Zeiteinheit freigesetzte Reinsubstanzmenge vermutlich länger auf die Zellen der Umgebung einwirkt. Um dieser Vermutung genauer nachzugehen, sind, wie schon unter 4.3. erwähnt, als Ausblick *in vitro* Langzeitversuche unabdingbar, bei denen die Veränderung der Zytotoxizität und Genotoxizität unter Akkumulation der Polymer-Abbauprodukte untersucht wird. Eine weitere Versuchsreihe soll, anschließen an die vorliegende Untersuchungen, den kompletten Abtransport der Abbauprodukte simulieren. Unabdingbar sind auch *in vivo* Versuche, die sowohl an NMRI-Mäusen als auch an immungeschwächten *nu/nu* Mäusen im Anschluß geplant sind. *Nu/nu* Mäuse tragen reinerbig eine Mutation, die nicht nur zu einer nackten Haut ohne Fell führt, sondern auch zu einer rudimentären Thymusbildung. Durch das Fehlen der Oberflächenantigenerkennung wird ein Abstoßen körperfremder Gewebe verhindert. Dies ermöglicht die Transplantation körperfremden Materials ohne Abstoßungsreaktion. Es soll somit untersucht werden, welche Polymermatrize die beste Biokompatibilität aufweist, wie die Biomaterialien vom Körper abgebaut werden und welchen Einfluss die Wachstumsfaktoren, die dem Polymer zugesetzt werden um die Knorpelbildung zu fördern, auf die Gewebebildung haben. *In vitro* Ansätze sind zur toxikologischen Untersuchung eine wertvolle Ergänzung, können den Tierversuch aber nicht komplett ersetzen, sind aber wohl Voraussetzung für etisch korrekte und erfolgsversprechende Untersuchungen *in vivo*.

Individuelle Risikofaktoren hinsichtlich einer genetischen Disposition, der Ernährung sowie des Lebensstils wurden nicht als Variablen berücksichtigt. Diese Risikofaktoren können unter Umständen das Ausmaß des mutagenen Schadens durch Substanzen beeinflussen [Glück und Gebbers, 2000]. Um die Beeinflussung der Ergebnisse durch individuelle Risikofaktoren einer speziellen Patientengruppe möglichst zu vermeiden, wurde jede Substanzkonzentration an mindestens 15 zufällig ausgewählten Lymphozytenproben unterschiedlicher Patientenzugehörigkeit im Comet Assay experimentell untersucht.

4.5. Zellspezifische Ergebnisse

4.5.1. Ergebnisse an Chondrozyten

In den vorliegenden Untersuchungen wurde von der Annahme ausgegangen, dass sich die Toxizität der Reinsubstanzen an hyalinen und elastischen Chondrozyten nicht wesentlich unterscheidet (siehe auch 4.1.1). Mit Hilfe einer Vitalfärbung aus PI und FDA konnte vor allem die Vitalität, das Zellwachstum und die Morphologie beurteilt werden. Die Zytotoxizität einer Substanz korrelierte mit der Dichte und der Vitalität der kultivierten Chondrozyten. Auf morphologischer Ebene resultierten unter dem Einfluss von Triethanolamin Vakuolen. Vakuolen spiegeln eine beeinträchtigte Lebensfähigkeit der Zellen wieder (siehe 4.5.3.). Auch konnte unter Einfluss toxischer Konzentrationen eine Veränderung der Adhärenz-Eigenschaften der Chondrozyten beobachtet werden. Es kam dosisabhängig zu einer Abnahme der Adhärenz zum Kulturboden, einhergehend mit morphologischen Veränderungen im Sinne abgerundeter Zellen. Eine quantitative Maß der Proliferation der Chondrozyten lieferte der EZ4U-Proliferationstest.

Zytotoxizitätsuntersuchungen an Chondrozyten erfolgten nach einer Inkubationsdauer mit den Testsubstanzen von 24 h bei 37 °C und 5% CO₂. Dies entspricht den Empfehlungen des Europäischen Komitees für Normung [CEN, 1993]. Diese Inkubationsbedingungen simulieren am weitgehend die Bedingungen unter denen die Testsubstanzen Verwendungen finden werden.

Eine spezielle Eigenschaft der Chondrozyten zeigte sich nach Isolierung der Zellen aus ihrem Gewebeverband. Im Gewebeverband mit Kollagen und Proteoglycanen sind Chondrozyten unter anderem aufgrund ihrer hohen Differenzierung nicht zur Proliferation und somit nicht zur Regeneration fähig [Müller et al., 2006]. Im Gegensatz zu vielen anderen menschlichen Zellen ist es den Chondrozyten aber möglich, nachdem sie in Kultur genommen wurden, wieder zu

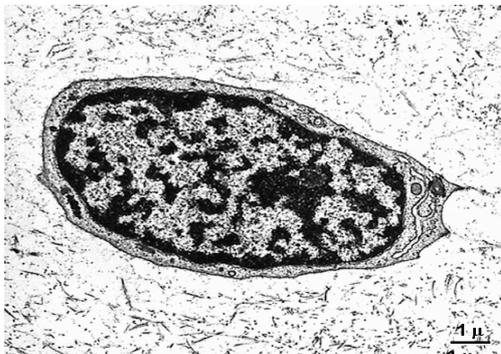


Abbildung 4-6: Elektronenmikroskopische Darstellung eines Chondrozyten [Goscurth P, 2005]

dedifferenzieren und nach kurzer Zeit mit der Proliferation zu beginnen. Dies konnte durch Vitalfärbung mit PI und FDA bestätigt und mit dem EZ4U-Proliferationstest quantifiziert werden. Dabei zeigt sich bei Subkultivierung der humanen Chondrozyten eine sukzessive Veränderung des morphologischen Habitus. Die anfangs polygonal geformten Zellen (Abb. 4-6) nehmen mit zunehmender Passagezahl ein immer mehr fibroblastenartiges Aussehen an. Hierbei kommt es zu einer Veränderung der Expression knorpelspezifischer Matrixproteine, wie z.B. Kollagen II und Knorpelproteoglycan, zugunsten des eher fibroblastenspezifischen Kollagen I [Benya et al., 1978, Mayne et al., 1976].

Eine Studie zum Verhalten von Chondrozyten bei Passagierung zeigte mit zunehmender Passagezahl der kultivierten Chondrozyten einen Abfall der anfänglichen Proliferationsrate von über 40% in Passage 2 auf einen Wert unter 5% ab Passage 8 [Reichl, 2000]. Dieses Verhalten wurde bereits von Hayflick und Moorhead [1965] an normalen diploiden Fibroblasten geschildert und ist seitdem als das Hayflick-Limit bekannt [Hayflick, 1965]. Es handelt sich dabei um einen in vielen Zelltypen oder Zellen verschiedener Spezies im Zusammenhang mit der Alterung beschriebenen Prozess, dessen Ursachen bis heute nicht genau geklärt sind [Cristofalo und

Pignolo, 1993]. Man vermutet einen p53 gekoppelten Prozess [Afshari et al., 1993, Kulju und Lehman, 1995, Vaziri und Benchimol, 1996] oder einen davon abhängigen durch die Expression von p21^(CIP1/WAF1) ausgelösten Proliferationsstopp [Afshari et al., 1993]. Die Diskussionen gehen weiter über die Annahme einer Rolle von p16^{INK4a} [Alcorta et al., 1996, Stein et al., 1999, Stein und Dulic, 1998], bis hin zur Theorie des Abbaus von Telomeren [Campisi, 1997, Chiu und Harley, 1997, Greider und Blackburn, 1985]. Differenzierungsabhängige Unterschiede in der Expression der zyklinabhängigen Kinaseinhibitoren der INK-4 Familie (p15^{INK4b}, p16^{INK4a}) und der CIP/KIP-Familie (p57^{KIP2}) konnten gezeigt werden, die sich in einer Zunahme der Expression dieser Inhibitorproteine von frühen (Passage 2) zu späten (Passage 8) Kulturpassagen sowie beim Entzug von Serummitogen manifestierten. Die Zunahme der Kulturpassagenzahl geht mit einer Abnahme der Proliferationsfähigkeit humaner Chondrozyten einher [Reichl, 2000]. *In vitro* lässt sich somit durch unterschiedliche Dauer der Subkultivierung (Passagenzahl) und unterschiedliche Kulturbedingungen der Differenzierungsgrad und das Proliferationsverhalten von humanen Chondrozyten beeinflussen. Aus diesem Grund wurden für Zytotoxizitätsuntersuchungen Chondrozyten verwendet, die maximal acht Kulturpassagen unterlagen. So sollte ein Einfluss der Ergebnisse zur Zytotoxizität durch eine verminderte Proliferationsfähigkeit von Chondrozyten hoher Passagezahl vermieden werden. Zudem wurden für ein Experiment jeweils Chondrozyten einer Kulturflasche verwendet, die einer gleichen Anzahl an Passagierungen unterlagen. Dies ermöglichte einen Vergleich der Proliferationsergebnisse der Versuchsansätze mit der Negativ-Kontrolle. Anhand einer Studie zur Abhängigkeit des Alters der Knorpelspender und der zellulären Proliferationsfähigkeit konnte eine Abnahme der Verdopplungszeit der Chondrozyten im Alter von 15 bis 60 Jahren und eine Zunahme des Ertrags an Chondrozyten gezeigt werden [Rotter et al., 2001] In vorliegender Arbeit wurden Knorpelproben von Spendern ab dem 18. Lebensjahr aufwärts verwendet. Da die für ein Experiment verwendeten Chondrozyten jeweils von dem gleichen Spender stammten, sollte eine ausreichende Vergleichsmöglichkeit der unterschiedlich beimpften Zellen gegeben sein. Eine Beeinflussung der Versuchsergebnisse durch das Alter der Spender konnte somit vermieden werden. Die unterschiedlichen Passagezahlen der Chondrozyten und das unterschiedliche Alter der Chondrozytenspender erklären auch die unterschiedliche Proliferationsfähigkeit der Negativ-Kontrollen der verschiedenen Experimente. Die Verwendung von Chondrozyten einer Kultur für ein jeweiliges Experiment erlaubt aber eine Vergleichbarkeit der toxischen Beeinflussung der Chondrozyten verschiedener Versuchsansätze mit der jeweiligen Negativ-Kontrolle. Chondrozyten verlieren zwar in der zweidimensionalen Kulturschale ihre chondrozytären Eigenschaften und werden fibroblastisch, durch Kultivierung auf einer dreidimensionalen Matrix werden ihre alten Eigenschaften aber reaktiviert und eine Synthese knorpelspezifischer Moleküle ermöglicht. So ist gewährleistet, dass die *in vitro* Kultivierung sich nicht negativ auf die Besiedelung des Biomaterials auswirkt.

Zusammenfassend kann somit davon ausgegangen werden, dass die toxikologische Charakterisierung der Trägersubstanzen von Polycaprolacton an humanen Chondrozyten der maximal achten Knorpelpassage von Spendern ab dem 18. Lebensjahr mit den verwendeten Methoden im Vergleich zu einer Negativ-Kontrolle, das toxikologische Potential der jeweiligen Substanz wahrheitsgetreu widerspiegelt.

4.5.2. Ergebnisse an Lymphozyten

Die Testsubstanzen wurde auf Zyto- und Genotoxizität an Lymphozyten verschiedener Patienten getestet, die sich in Alter und Geschlecht unterschieden. So sollten repräsentative Ergebnisse für die Gesamtbevölkerung erstellt werden. Wie schon unter 4.4.2. erwähnt, wurden weitere individuelle Risikofaktoren eines mutagenen Einflusses nicht beachtet. Die Inkubation von Lymphozyten zur Zyto- und Genotoxizitätsprüfung erfolgte über 60 min bei 37 °C. Schon nach 15 Minuten langer Inkubation von Lymphozyten mit genotoxischen Substanzen kann sich eine erhöhte DNA-Fragmentierung abbilden. In den darauf folgenden 15 Minuten schalten sich zell-eigene Reparaturmechanismen ein, die den DNA-Schaden wieder beheben. Eine erhöhte DNA-Fragmentierung der Lymphozyten nach Inkubation mit Testsubstanzen über 60 Minuten, weist somit auf einen irreparablen DNA-Schaden hin [Kleinsasser, 2004, Kleinsasser und Sassen, 2004]. Untersuchungen von Green et al. [1992] zeigen eine maximale DNA-Schädigung in Lymphozyten unter UV-Bestrahlung nach 60 min.

Es gibt unterschiedliche Studien zur Beurteilung der Abhängigkeit einer im Comet Assay gemessenen DNA-Schädigung vom Zellzyklus. Olive *et al.* [1991] konnten eine dreifach geringere Schädigung bei bestrahlten Ovarialzellen des Hamsters während der S-Phase zeigen. Graubmann und Dikomey [1983] fanden eine höhere Rate von DNA-Brüchen in der G1-Phase, begründeten dies jedoch mit einem experimentellen Fehler. Es wurden weitere Ergebnisse mit den unterschiedlichsten Resultaten publiziert [Humphrey et al., 1968, Lett und Sun, 1970, Lohman, 1968]. Allgemein kann von einer Abhängigkeit des Olive Tail Moments vom Zellzyklus ausgegangen werden [Olive und Banath, 1993]. Da jedoch die verwendeten Lymphozyten in den vorliegenden Untersuchungen in einem breiten Spektrum der unterschiedlichen Zellphasen, entsprechend der *in vivo* Situation, vorlagen, konnten repräsentative Bedingungen geschaffen werden.

Die Lymphozyten wurden am Tag der Blutentnahme isoliert und bei –80 °C gelagert. Die Lagerung der Lymphozyten betrug maximal drei Monate. Bis zu einer Dauer von 12 Monaten nimmt die Lagerung keinen Einfluss auf Genotoxizitätsuntersuchungen mit dem Comet Assay [Schmezer et al., 2001]. Die in diesen Untersuchungen gemessenen Zellvitalitäten nach dem Auftauen lagen über 85% und zeigten damit keine durch den Einfrierungsprozess hervorgerufenen zytotoxischen Effekte in Form von Membranstabilität. Falsch positive Ergebnisse auf Grund einer Schädigung der Lymphozyten bedingt durch die Lagerung sind daher nicht zu erwarten. Die Versuche zur Genotoxizität und Zytotoxizität wurden in einem Experiment jeweils an Lymphozyten gleicher Spender durchgeführt. Eine Vergleichsmöglichkeit eines Versuchsansatzes mit der Negativ- und Positiv-Kontrolle wurde somit gewährleistet.

Die toxikologische Charakterisierung der Trägersubstanzen von Polycaprolacton nach einstündiger Inkubation von humanen Lymphozyten verschiedener Zellzyklusphasen nach einer Lagerungsdauer von Maximal 3 Monaten bei –80 °C erlaubt zusammenfassend eine Evaluation und Schlussfolgerung des toxikologischen Potentials der Substanzen.

4.6. Fazit und Ausblick

In vorliegender Arbeit wurden Trägersubstanzen, des für die Ohmuschelrekonstruktion mittels Tissue Engineering formulierten Polycaprolactons, in Hinblick ihres zyto- und genotoxischen Potentials charakterisiert. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die verwendeten

Methoden zur Detektion zyto - und genotoxischer Schäden an humanen Chondrozyten und Lymphozyten als primäre Zielzellen zum Screening und zur Evaluation eines potentiell toxischen Einflusses der einzelnen Trägersubstanzen und zur Definition von Schwellenkonzentrationen *in vitro* geeignet sind. Diese Untersuchungen verschiedener Substanzkonzentrationen zur Evaluation des toxischen Potentials an humanen Zielzellen zeigten eindeutig, dass Dextrose, PEG-PPG-PEG und Triethanolamin dosisabhängig mit humanen Zellen und Geweben interferieren, so dass hohe Konzentrationen dieser Substanzen vermieden werden sollten. Die vorliegenden Daten zeigen, dass Dextrose in einer Konzentration von 4,25 mg/ml, Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol in einer Konzentration von 0,15 mg/ml und Triethanolamin in einer Konzentration von 0,9 mg/ml keine zytotoxischen Einflüsse auf Chondrozyten und keine zyto- und genotoxischen Einflüsse auf Lymphozyten ausweisen und somit als Scaffold für das Tissue Engineering sicher verwendet werden können.

Diese Daten unterstreichen aber auch die Notwendigkeit, negative Einflüsse von Träger-substanzen an humanen Geweben weiter zu charakterisieren. Der kontinuierliche Abtransport, der Abbau und die Ausscheidung der Testsubstanzen müssen deshalb in weiter führende Toxizitätsprüfungen einbezogen werden. An dieser Stelle schließen sich daher fortgeschrittene Testmodelle und *in vivo* Untersuchungen an.

Aufbauend auf die in dieser Arbeit erhobenen Daten, wurde die Formulierung von Polycaprolacton weiter optimiert. Bis 2006 wurde eine Auswahl neuer auf Polycaprolacton basierender Polyurethan-Zellträger mit unterschiedlichen Eigenschaften hinsichtlich der Vernetzung und Dichte, Kristallinitäten und Hydrophilie entwickelt und patentiert [Wiese und Maier, 2006]. Die potentielle Kombination eines soliden Zellträgers aus dem neu entwickelten Polycaprolacton mit einem hydrogelen Zellträger aus einem langzeitstabilen Fibringel konnte *in vitro* und im Tierversuch zur Verwendung im Tissue Engineering von Knorpel bereits demonstriert werden [Eyrich et al., 2007]. Hinsichtlich einer klinischen Anwendung, stehen noch weitere Untersuchungen mit empfindlicheren Chondrozyten aus. Überdies muss die Ausführung des zusammengesetzten Konstruktes an einer klinisch relevanten Implantationsstelle mit spezifischen Nährstoffbedingungen und entsprechender mechanischer Situation beurteilt werden. Dessen ungeachtet scheint die Kombination eines Hydrogels mit dem neu entwickelten Scaffold eine viel versprechende Alternative in der Regeneration von Knorpel in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie [Eyrich et al., 2007].

5. Zusammenfassung

Ein neuer, vielversprechender Ansatz zur plastischen und wiederherstellenden Chirurgie der Ohrmuschel ist die Neubildung von Knorpel mit den Methoden des Tissue Engineerings.

Dextrose, Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol und Triethanolamin sind Trägersubstanzen des neu formulierten Polymers Polycaprolacton, das als Zellträger für das Tissue Engineering fungieren soll. Um das bedeutende Risiko einer Interaktion dieser bioabbaubaren Materialien mit dem humanen Organismus zu evaluieren, wurden in der vorliegenden Arbeit zyto- und genotoxische Effekte der Trägersubstanzen *in vitro* untersucht. Ziel ist die Definition maximaler Substanzkonzentrationen, die zu keinem toxischen Effekt in Testsystemen führen.

In diesem Zusammenhang wurden Dextrose, Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol und Triethanolamin an humanen Chondrozyten des Nasen- und Rippenknorpels sowie an humanen Lymphozyten untersucht. Die Zytotoxizität der Reinsubstanzen wurde an Chondrozyten *in vitro* mit einer Kombinationsfärbung aus Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat bestimmt und durch den EZ4U-Proliferationstest quantifiziert. Zur Detektion eines zytotoxischen Schadens humaner Lymphozyten diente der Trypanblau-Ausschlusstest. Der Comet Assay mit der alkalischen Version der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese wurde nach *in vitro* Inkubation zur Quantifizierung genotoxischer Schäden an Lymphozyten eingesetzt.

Die vorliegenden Untersuchungen zeigen eindeutig eine dosisabhängige Toxizität von Dextrose, PEG-PPG-PEG und Triethanolamin an humanen Chondrozyten und Lymphozyten als primäre Zielzellen und unterstreichen die Notwendigkeit der Definition von maximalen Substanzkonzentrationen, die mit humanen Zielzellen nicht interferieren. Die vorliegenden Daten schlagen vor, dass die Trägersubstanzen in einer maximale Konzentration von 4,25 mg/ml Dextrose, 0,15 mg/ml Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol und 0,9 mg/ml Triethanolamin als Scaffold für das Tissue Engineering sicher verwendet werden können.

Schlussfolgernd konnten in vorliegender Arbeit maximale Konzentrationen der Reinsubstanzen definiert werden, die in Einzelsubstanzenanalysen keine zytotoxische Wirkung an Chondrozyten und keine zyto- und genotoxische Wirkung an Lymphozyten aufweisen und somit zur Verwendung als Scaffold empfohlen werden können. Die Daten dieser Arbeit unterstreichen zudem die Notwendigkeit, negative Einflüsse von Trägersubstanzen an humanen Geweben weiter zu charakterisieren, um die Toxizität von Abbauprodukten, deren Abbauwege und die Interaktion einzelner Reinsubstanzen im Rahmen von *in vivo* Untersuchungen zu berücksichtigen. Basierend auf den bedeutenden vorliegenden Daten konnte das Polymer Polycaprolacton weiter optimiert und formuliert werden, so dass erste *in vivo* Untersuchungen als weiterer Schritt in Richtung einer vielversprechenden klinischen Applikation ermöglicht wurden.

6. Literatur

- [1] Afshari CA, Vojta PJ, Annab LA, Futreal PA, Willard TB, Barrett JC (1993). Investigation of the role of G1/S cell cycle mediators in cellular senescence. *Exp Cell Res*, 209, 231-7
- [2] Aguilar EF (2001). Auricular reconstruction in congenital anomalies of the ear. *Facial Plast Surg Clin North Am*, 9, 159-69
- [3] Alcorta DA, Xiong Y, Phelps D, Hannon G, Beach D, Barrett JC (1996). Involvement of the cyclin-dependent kinase inhibitor p16 (INK4a) in replicative senescence of normal human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13742-7
- [4] Ames BN, Lee FD, Durston WE (1973). An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 70, 782-6
- [5] Anderson D, Yu TW, McGregor DB (1998). Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. *Mutagenesis*, 13, 539-55
- [6] Angele P, Abke J, Kujat R, Faltermeier H, Schumann D, Nerlich M, Kinner B, Englert C, Ruszczak Z, Mehrl R, Mueller R (2004). Influence of different collagen species on physico-chemical properties of crosslinked collagen matrices. *Biomaterials*, 25, 2831-41
- [7] Anonymous (1993). Final report of the safety assessment of polyethylen glycol (PEGs)-6,-8,-32,-75,-150,-14 m,-20 m. *J Am Coll Toxicol*, 12, 429-57
- [8] Aoyagi K, Kohfuji K, Yano S, Murakami N, Hori H, Terasaki Y, Takeda J, Tanaka M, Shirouzu K (2000). Morphological change in the MNNG-treated rat gastric mucosa. *Kurume Med J*, 47, 31-6
- [9] Arevalo-Silva CA, Eavey RD, Cao Y, Vacanti M, Weng Y, Vacanti CA (2000). Internal support of tissue-engineered cartilage. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 126, 1448-52
- [10] Balling R (1998). Chemisch Mutagene, Mutationen. *Lehrbuch der Genetik* (Hrsg. Seyffert, W.), Gustav Fischer Verlag
- [11] Bauch T, Böcker W, Mallek U, Müller WU, Streffer C (1999). Optimization and standardization of the "comet assay" for analyzing the repair of DNA damage in cells. *Strahlenther Onkol*, 175, 333-40
- [12] Benya PD, Padilla SR, Nimni ME (1978). Independent regulation of collagen types by chondrocytes during the loss of differentiated function in culture. *Cell*, 15, 1313-21

- [13] Berghaus A, Axhausen M, Handrock M (1983). Porous synthetic materials in external ear reconstruction. *Laryngol Rhinol Otol (Stuttg)*, 62, 320-7
- [14] Berghaus A, Rettinger G, Böhme G (1996). Erkrankungen des äußeren Ohres. In: Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Hippokrates Verlag, , Stuttgart
- [15] Biondi O, Motta S, Mosesso P (2002). Low molecular weight polyethylen glycol induces chromosome aberrations in chinese hamster cells cultured *in vitro*. *Mutagenesis*, 17, 261-64
- [16] Breitbart A (1998). Tissue engineering and gene therapie in facial plastic surgery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 6, 226-31
- [17] Brent B (1977). The acquired auricular deformity. A systematic approach to its analysis and reconstruction. *Plast reconstr surg*, 59, 475-85
- [18] Brent B (1978). Reconstruction of traumatic ear deformities. *Clin Plast Surg*, 5, 437-45
- [19] Brent B (1992). Auricular repair with autogenous rib cartilage grafts: two decades of experience with 600 cases. *Plast reconstr surg*, 90, 355-74
- [20] Brent B (1999). Technical advances in ear reconstruction with autogenous rib cartilage grafts: personal experience with 1200 cases. *Plast reconstr surg*, 104, 319-38
- [21] Britt JC, Park SS (1998). Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 124, 671-7
- [22] Brix F, Lambrecht JT (1987). Preparation of individual skull models based on computed tomographic information. *Fortschr Kiefer Gesichtschir*, 32, 74-7
- [23] Campisi J (1997). The biology of replicative senescence. *Eur J Cancer*, 33, 703-9
- [24] Cao Y, Ibarra C, Vacanti C (1999). Preparation and use of thermosensitive polymers. Tissue engineering: methods and protocols. In: *Methods in Molcular Medicine*, Morgan J, Yarmush M, Humana Press, Totowa, NJ, 18, 75-83
- [25] Cao Y, Vacanti JP, Paige KT, Upton J, Vacanti CA (1997). Transplantation of chondrocytes utilizing a polymer-cell construct to produce tissue-engineered cartilage in the shape of a human ear. *Plast reconstr surg*, 100, 297-302
- [26] Carrano AV, Thompson LH, Lindl PA, Minkler JL (1978). Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature*, 271, 551-3
- [27] CEN ECfS (1993). Part 5 - tests for cytotoxicity - *in vitro* methods. ISO 10993-5:1992. C 181 of 1999-06-26

- [28] Chandna S (2004). Single-cell gel electrophoresis assay monitors precise kinetics of DNA fragmentation induced during programmed cell death. *Cytometry A*, 61, 127-33
- [29] Chiu CP, Harley CB (1997). Replicative senescence and cell immortality: the role of telomeres and telomerase. *Proc Soc Exp Biol Med*, 214, 99-106
- [30] Cristofalo VJ, Pignolo RJ (1993). Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol Rev*, 73, 617-38
- [31] Cronin TD (1966). Use of a silastic frame for total and subtotal reconstruction of the external ear: preliminary report. *Plast Reconstr Surg*, 37, 399-405
- [32] Cronin TD, Ascough BM (1978). Silastic ear construction. *Clin Plast Surg*, 5, 367-78
- [33] Dieffenbach J (1845). *Die operative Chirurgie*. In: Brockhaus, Leipzig
- [34] Druckrey H, Schildbach A, Schmähl D, Preussmann R, Ivankovic S (1963). Quantitative Analyse der carcinogenen Wirkung von Diäthylnitrosamin. *Arzneimittelforsch*, 13, 841-51
- [35] Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke FJ (2005). Prüfung auf Mutagenität und Kanzerogenität In: *Toxikologie*, WILEY-VCH Verlag, Weinheim, 3, 130-44
- [36] Ellenhorn M, Barceloux D (1988). *Diagnosis and treatment of human Poisoning*. In: *Medical Toxicology* Elsevier, New York, 907
- [37] Erickson DM, Chance D, Schmitt S, Mathis J (1999). An opinion survey of reported benefits from the use of stereolithographic models. *J Oral Maxillofac Surg*, 57, 1040-3
- [38] Eyrich D, Wiese H, Maier G, Skodacek D, Appel B, Sarhan H, Tessmar J, Staudenmaier R, Wenzel MM, Goepferich A, Blunk T (2007). *In vitro* and *in vivo* cartilage engineering using a combination of chondrocyte-seeded long-term stable fibrin gels and polycaprolactone-based polyurethane scaffolds. *Tissue Eng*, 13, 2207-18
- [39] Firmin F (1998). Ear reconstruction in cases of typical microtia. Personal experience based on 352 microtic ear corrections. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, 32, 35-47
- [40] Friedman M (1937). The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variances. *J Amer Statist Assoc*, 32, 675-701
- [41] Galloway S, Armstrong M, Reuben C, Colman S, Brown B, Cannon C, Bloom A, Nakamura F, Ahmed M, Duk S (1987). Chromosome aberrations and sister chromatid exchanges in Chinese hamster ovary cells: evaluations of 108 chemicals. *Environ Mol Mutagen*, 10, 1-175

- [42] Galloway S, Deasy D, Bean C, Kraynak A, Armstrong M, Bradley M (1987). Effects of high osmotic strength on chromosome aberrations, sister chromatid exchanges and DNA strand breaks and the relationship to toxicity. *Mutat Res*, 189, 15-25
- [43] Ganzer U (1999). Konsensusbericht: Plastische rekonstruktive und ästhetische Operationen in der Hals-Nasen-Ohrenheilkunde, Kopf-Hals-Chirurgie, 1. Ohrmuschelplastik. *HNO*, 1, 45-50
- [44] Garaj-Vrhovac VZ, D (2004). Comet assay in the assessment of the human genome damage induced by gamma-radiation *in vitro*. *Radiol Oncol*, 38, 43-7
- [45] Gillies H (1920). Plastic surgery of the face. In: Hodder and Stroughton, London
- [46] Gillies H (1937). Reconstruction of the external ear with special reference to the use of maternal ear cartilage as the supporting structure. *Revue Chirurg Struct*, 7, 169
- [47] Glück U, Gebbers JO (2000). The comet assay of nasal epithelia: measurement of DNA damage for the assessment of genotoxic air pollution. *Laryngoscope*, 110, 123-5
- [48] Goldmann E (1909). Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichter der vitalen Färbungen. *Klein Chir*, 192-265
- [49] Gosselin R, Smith R, Hodge H (1984). Clinical toxicology of commercial products. In: Williams and Wilkins, London, 2, 106
- [50] Graubmann S, Dikomey E (1983). Induction and repair of DNA strand breaks in CHO-cells irradiated in various phases of the cycle. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*, 43, 475-83
- [51] Green MH, Lowe JE, Harcourt SA, Akinluyi P, Rowe T, Cole J, Anstey AV, Arlett CF (1992). UV-C sensitivity of unstimulated and stimulated human lymphocytes from normal and xeroderma pigmentosum donors in the comet assay: a potential diagnostic technique. *Mutat Res*, 273, 137-44
- [52] Greider CW, Blackburn EH (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*, 43, 405-13
- [53] Haisch A, Kläring S, Gröger A, Gebert C, Sittinger M (2002). A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 259, 316-21
- [54] Harréus UA, Kleinsasser NH, Zieger S, Wallner B, Reiter M, Schuller P, Berghaus A (2004). Sensitivity to DNA-damage induction and chromosomal alterations in mucosa cells from patients with and without cancer of the oropharynx detected by a combination of comet assay and fluorescence *in situ* hybridization. *Mutat Res*, 563, 131-8

- [55] Hayflick L (1965). The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res*, 37, 614-36
- [56] He JL, Chen WL, Jin LF, Jin HY (2000). Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the comet assay for the detection of genotoxic effects of X-ray radiation. *Mutat Res*, 469, 223-31
- [57] Heinzl J (2003). Teilprojekt RP 3: Custom-Implantate und Medical Products durch Rapid Prototyping Manufacturing (indirektes Verfahren). ForTePro Bayerischer Forschungsverband für Tissue Engineering und Rapid Prototyping. Im Internet verfügbar: <http://www.fortepro.de/rp3.html> (Stand: 2003 letzter Zugriff: 10/10/2004)
- [58] Henderson L, Wolfreys A, Fedyk J, Bourner C, Windebank S (1998). The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, 13, 89-94
- [59] Hoffmann D, Brunneemann K, Rivenson A, Hecht S (1982). N-Nitrosodiethanolamine: Analysis, formation in tobacco products and carcinogenicity in syrian golden hamsters. *IARC Sci Publ*, 41, 299-308
- [60] Hohenheim T (1538). *Defensiones*. In: *Septem Defensiones*, Villach
- [61] Humphrey RM, Steward DL, Sedita BA (1968). DNA-strand breaks and rejoining following exposure of synchronized Chinese hamster cells to ionizing radiations. *Mutat Res*, 6, 459-65
- [62] IARC IAfRoC (2000). Some Industrial Chemicals. Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. In: *IARC*, Lyon, 77, 381-401
- [63] Kaur S, Singh G, Stock JL, Schreiner CM, Kier AB, Yager KL, Mucenski ML, Scott WJ, Jr., Potter SS (1992). Dominant mutation of the murine Hox-2.2 gene results in developmental abnormalities. *J Exp Zool*, 264, 323-36
- [64] Kiefer J, Arnold W, Staudenmaier R (2006). Round window stimulation with an implantable hearing aid (Soundbridge) combined with autogenous reconstruction of the auricle - a new approach. *Otorhinolaryngol Relat Spec*, 68, 378-85
- [65] Kim BS, Park JJ, Edler L, Von Fournier D, Haase W, Sautter-Bihl ML, Gotzes F, Thielmann HW (2002). New measure of DNA repair in the single-cell gel electrophoresis (comet) assay. *Environ Mol Mutagen*, 40, 50-6
- [66] Kleinsasser N (2004). Toxicological evaluation of inhalation noxae: test methods, assessment of toxic action and hazard potential, threshold limit values. *Laryngorhinootologie*, 83 Suppl 1, 36-53
- [67] Kleinsasser N, Sassen A (2004). Testverfahren zur Evaluation von Inhalationsnoxen. *HNO aktuell*, 5, 175-79

- [68] Kleinsasser NH, Kastenbauer ER, Wallner BC, Weissacher H, Harréus UA (2001). Genotoxicity of phthalates. On the discussion of plasticizers in children's toys. *HNO*, 49, 378-81
- [69] Kleinsasser NH, Wagner C, Wallner BC, Harréus UA, Kastenbauer ER (2001). Mutagen sensitivity of nasopharyngeal cancer patients. *Mutat Res*, 491, 151-61
- [70] Kleinsasser NH, Wallner BC, Kastenbauer ER, Muenzenrieder RK, Harréus UA (2000). Comparing the genotoxic sensitivities of human peripheral blood lymphocytes and mucosa cells of the upper aerodigestive tract using the comet assay. *Mutat Res*, 467, 21-30
- [71] Kohn KW (1991). Principles and practice of DNA filter elution. *Pharmacol Ther*, 49, 55-77
- [72] Konishi Y, Denda A, Uchida K, Emi Y, Ura H, Yokose Y, Shiraiwa K, Tsutsumi M (1992). Chronic toxicity carcinogenicity studies of triethanolamine in B6C3F1 mice. *Fundam Appl Toxicol*, 18, 25-9
- [73] Kuhn R, Jerchel D (1941). Über Invertseifen, VII. Mitteil.: Tetrazoliumsalze. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft (A and B Series)*, 74, 941-52
- [74] Kulju KS, Lehman JM (1995). Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts. *Exp Cell Res*, 217, 336-45
- [75] Laurie SW, Kaban LB, Mulliken JB, Murray JE (1984). Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone. *Plast reconstr surg*, 73, 933-8
- [76] Lett JT, Sun C (1970). The production of strand breaks in mammalian DNA by X-rays: at different stages in the cell cycle. *Radiat Res*, 44, 771-87
- [77] Lohman PH (1968). Induction and rejoining of breaks in the deoxyribonucleic acid of human cells irradiated at various phases of the cell cycle. *Mutat Res*, 6, 449-58
- [78] Lorenzi M, Montisano DF, Toledo S, Barrieux A (1986). High glucose induces DNA damage in cultured human endothelial cells. *J Clin Invest*, 77, 322-5
- [79] Lutz W (1990). Dose-response relationship and low dose extrapolation in chemical carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 11, 1243-47
- [80] Mankovich NJ, Cheeseman AM, Stoker NG (1990). The display of three-dimensional anatomy with stereolithographic models. *J Digit Imaging*, 3, 200-3
- [81] Marsh JL, Vannier MW (1983). Surface imaging from computerized tomographic scans. *Surgery*, 94, 159-65

- [82] Marzella L, Ahlberg J, Glaumann H (1981). Autophagy, heterophagy, microautophagy and crinophagy as the means for intracellular degradation. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol*, 36, 219-34
- [83] Mayne R, Vail MS, Mayne PM, Miller EJ (1976). Changes in type of collagen synthesized as clones of chick chondrocytes grow and eventually lose division capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 1674-8
- [84] Mitchell A, Auletta A, Clive D, Kirby P, Moore M, Myh B (1997). The L5178/tk+/- mouse lymphoma specific gene and chromosomal mutation assay, a phase III report of the US environmental protection agency gen-tox program. *Mutat Res*, 394, 177-303
- [85] Mortelmans K, Haworth S, Lawlor T, Speck W, Tainer B, Zeiger E (1986). Salmonella mutagenicity tests: II. Results from the testing of 270 chemicals. *Environ Mutagen*, 8 1-119
- [86] Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65, 55-63
- [87] Müller FA, Müller L, Hofmann I, Greil P, Wenzel MM, Staudenmaier R (2006). Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 27, 3955-63
- [88] Nagata S (1994). Modification of the stages in total reconstruction of the auricle: Part II. Grafting the three-dimensional costal cartilage framework for concha-type microtia. *Plast reconstr surg*, 93, 231-42
- [89] Nagata S (1995). Total auricular reconstruction with a three-dimensional costal cartilage framework. *Ann Chir Plast Esthet*, 40, 371-99
- [90] Naora H, Kimura M, Otani H, Yokoyama M, Koizumi T, Katsuki M, Tanaka O (1994). Transgenic mouse model of hemifacial microsomia: cloning and characterization of insertional mutation region on chromosome 10. *Genomics*, 23, 515-9
- [91] Naumann A, Aigner J, Staudenmaier R, Seemann M, Bruening R, Englmeier KH, Kadege G, Pavesio A, Kastenbauer E, Berghaus A (2003). Clinical aspects and strategy for biomaterial engineering of an auricle based on three-dimensional stereolithography. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 260, 568-75
- [92] Naumann A, Rotter N, Bujia J, Aigner J (1998). Tissue engineering of autologous cartilage transplants for rhinology. *Am J Rhinol*, 12, 59-63
- [93] Ohmori S (1978). Reconstruction of microtia using the Silastic frame. *Clin Plast Surg*, 5, 379-87
- [94] Olive PL, Banath JP (1993). Induction and rejoining of radiation-induced DNA single-strand breaks: "tail moment" as a function of position in the cell cycle. *Mutat Res*, 294, 275-83

- [95] Olive PL, Banath JP, Durand RE (1990). Detection of etoposide resistance by measuring DNA damage in individual Chinese hamster cells. *J Natl Cancer Inst*, 82, 779-83
- [96] Olive PL, Wlodek D, Banath JP (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res*, 51, 4671-6
- [97] Ostling O, Johanson KJ (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 123, 291-8
- [98] Pal L, Chu HP, Shu J, Topalli I, Santoro N, Karkanas G (2007). In vitro evidence of glucose-induced toxicity in GnRH secreting neurons: high glucose concentrations influence GnRH secretion, impair cell viability, and induce apoptosis in the GT1-1 neuronal cell line. *Fertil Steril*, 88, 1143-9
- [99] Patton W, Gillespie H, Frew L, Burns M, Lewis S, Chakravarthy U (2002). The effects of high ambient glucose on the radiosensitivity of retinal microvascular endothelial cells and pericytes. *Curr Eye Res*, 24, 51–57
- [100] Pechmann H, Runge P (1894). Oxydation der Formazylverbindungen. *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft*, 27, 2920–30
- [101] Peer L (1948). Reconstruction of the auricle with decid cartilage grafts in a vitallium ear mold. *Plast reconstr surg*, 3, 653
- [102] Pierce C (1930). Reconstruction of the external ear. *Surgery, Gynokology and Obstetrics*, 50, 601
- [103] Plappert U, Raddatz K, Roth S, Fliedner TM (1995). DNA-damage detection in man after radiation exposure--the comet assay--its possible application for human biomonitoring. *Stem Cells*, 13 Suppl 1, 215-22
- [104] Rana RE, Arora BS (2002). History of plastic surgery in India. *Journal of postgraduate medicine*, 48, 76-8
- [105] Rasp G, Staudenmaier R, Ledderose H, Kastenbauer E (2000). Autologous rib cartilage harvesting: operative procedure and postoperative pain reduction. *Laryngorhinootologie*, 79, 155-9
- [106] Reichl J (2000). Expressionsanalyse der Zellzyklusregulatorproteine der Zyklin-, CDK-, CDKI- und Rb-Familie in humanen Chondrozyten *in vitro* in Abhängigkeit von Proliferation und Differenzierung. Dissertation an der Fakultät für Biologie, Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
- [107] Renner G, Lane RV (2004). Auricular reconstruction: an update. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*, 12, 277-80

- [108] Rotman B, Papermaster BW (1966). Membrane properties of living mammalian cells as studied by enzymatic hydrolysis of fluorogenic esters. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 55, 134-41
- [109] Rotter N, Bonassar LJ, Tobias G, Lebl M, Roy AK, Vacanti CA (2001). Age dependence of cellular properties of human septal cartilage: implications for tissue engineering. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, 127, 1248-52
- [110] Saim AB, Cao Y, Weng Y, Chang CN, Vacanti MA, Vacanti CA, Eavey RD (2000). Engineering autogenous cartilage in the shape of a helix using an injectable hydrogel scaffold. *Laryngoscope*, 110, 1694-7
- [111] Schmezer P, Rajaei-Behbahani N, Risch A, Thiel S, Rittgen W, Drings P, Dienemann H, Kayser KW, Schulz V, Bartsch H (2001). Rapid screening assay for mutagen sensitivity and DNA repair capacity in human peripheral blood lymphocytes. *Mutagenesis*, 16, 25-30
- [112] Shieh SJ, Terada S, Vacanti JP (2004). Tissue engineering auricular reconstruction: *in vitro* and *in vivo* studies. *Biomaterials*, 25, 1545-57
- [113] Shieh SJ, Vacanti JP (2005). State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery*, 137, 1-7
- [114] Siegert R (2003). Combined reconstruction of congenital auricular atresia and severe microtia. *Laryngoscope*, 113, 2021-7
- [115] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL (1988). A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, 175, 184-91
- [116] Skouteris CA, Sotereanos GC (1989). Donor site morbidity following harvesting of autogenous rib grafts. *J Oral Maxillofac Surg*, 47, 808-12
- [117] Slamenova D, Gabelova A, Ruzekova L, Chalupa I, Horvathova E, Farkasova T, Bozsakyova E, Stetina R (1997). Detection of MNNG-induced DNA lesions in mammalian cells; validation of comet assay against DNA unwinding technique, alkaline elution of DNA and chromosomal aberrations. *Mutat Res*, 383, 243-52
- [118] Slater TF, Sawyer B, Strauli U (1963). Studies on Succinate-Tetrazolium Reductase Systems. Iii. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim Biophys Acta*, 77, 383-93
- [119] Slesinski R (1989). Genotoxicity of tetraethylen glycol (TEG) evaluated with multiple *in vitro* and *in vivo* assays. *Toxicologist*, 9, 232
- [120] Snyder R (1999). Nitrogen and Phosphorus Solvents. In: *Ethyl Browning's Toxicity and Metabolism of Industrial Solvents*, Snyder R, Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 2, 447

- [121] Staudenmaier R (2000). Ohrmuschelrekonstruktionen mit autologem Knorpel. Monatsschrift Kinderheilkunde, 148, 508-12
- [122] Staudenmaier R (2006). Optimized auricular reconstruction with autologous cartilage. Experience from 120 cases. HNO, 54, 749-55
- [123] Staudenmaier R, Hoang TN, Kleinsasser N, Schurr C, Frölich K, Wenzel MM, Aigner J (2004). Flap prefabrication and prelamination with tissue-engineered cartilage. J Reconstr Microsurg, 20, 555-64
- [124] Staudenmaier R, Rasp G (2003). Malformations of the auricle and their correction. MMW Fortschr Med, 145, 26-7, 29
- [125] Staudenmaier R, Steinbach S, Niedermeyer HP, Kiefer J, Müller D, Kleinsasser N, Reichert TE, Driemel O (2006). Correction of ear malformations with autologous rib cartilage. Mund Kiefer Gesichtschir, 10, 141-7
- [126] Steffensen WH (1952). Comments on total reconstruction of the ear. Plast reconstr surg, 10, 186-90
- [127] Stein GH, Drullinger LF, Soulard A, Dulic V (1999). Differential roles for cyclin-dependent kinase inhibitors p21 and p16 in the mechanisms of senescence and differentiation in human fibroblasts. Mol Cell Biol, 19, 2109-17
- [128] Stein GH, Dulic V (1998). Molecular mechanisms for the senescent cell cycle arrest. J Investig Dermatol Symp Proc, 3, 14-8
- [129] Tagliacozzi G (1597). De curtorum chirurgia per institionent. In: Gaspare Bindonus, Venice
- [130] Tanzer RC (1959). Total reconstruction of the external ear. Plast Reconstr Surg Transplant Bull, 23, 1-15
- [131] Thorn L (1994). Entwicklung des Ohres (einschließlich Entstehung von Mißbildungen, experimentelle Embryologie und In-vitro-Studien). In: Otorhinolaryngology in Klinik und Praxis, Naumann H, Helms J, Herberhold C, Kastenbauer E, Thieme, Stuttgart, 1-31
- [132] Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. Environ Mol Mutagen, 35, 206-21
- [133] Tice RR, Strauss GH (1995). The single cell gel electrophoresis/comet assay: a potential tool for detecting radiation-induced DNA damage in humans. Stem Cells, 13 Suppl 1, 207-14

- [134] Tucker JD, Auletta A, Cimino MC, Dearfield KL, Jacobson-Kram D, Tice RR, Carrano AV (1993). Sister-chromatid exchange: second report of the Gene-Tox Program. *Mutat Res*, 297, 101-80
- [135] Vacanti C, Cima L, Ratkowski D, Upton J, Vacanti J (1992). Tissue engineered growth of new cartilage in the shape of a human ear using synthetic polymers seeded with chondrocytes. *Mat Res Soc Symp Proc*, 252, 367-74
- [136] Vaziri H, Benchimol S (1996). From telomere loss to p53 induction and activation of a DNA-damage pathway at senescence: the telomere loss/DNA damage model of cell aging. *Exp Gerontol*, 31, 295-301
- [137] Waring MJ (1965). Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol*, 13, 269-82
- [138] Webb AR, Yang J, Ameer GA (2004). Biodegradable polyester elastomers in tissue engineering. *Expert Opin Biol Ther*, 4, 801-12
- [139] Weerda H (1988). Classification of congenital deformities of the auricle. *Facial Plast Surg*, 5, 385-8
- [140] Wiese H, Maier G (2006). Offenporiger Polyurethanschaum ohne Hautbildung, Formulierung zu seiner Herstellung und Verwendung Desselben als Trägermaterial für Zell- und Gewebekulturen oder Arzneimittel. Offenlegungsschrift, im Internet verfügbare: <http://www.v3espacenet.com> (letzter Zugriff: 19/4/2006), WO 2006/032501 A1
- [141] Wilcoxon F (1945). Individual comparison by ranking methods. *Biometrics*, 1, 80-83
- [142] Wojewodzka M, Grądka I, Buraczewska I (2002). Modified neutral comet assay for human lymphocytes. *Nukleonika*, 47, 1-5
- [143] Young F (1944). Cast and precast cartilage grafts: their use in the restoration of facial contour. *Surgery*, 15, 735
- [144] Zgoła-Grześkowiak A, Grześkowiak T, Zembrzuska J, Łukaszewski Z (2006). Comparison of biodegradation of poly(ethylene glycol)s and poly(propylene glycol)s. *Chemosphere*, 64 803-09
- [145] Zhang Z, Xu G, Wang F, Dong S, Li Y (2004). Characterization and demulsification of poly(ethylene oxide)-block-poly(propylene oxide)-block-poly(ethylene oxide) copolymers. *J Colloid Interf Sci*, 277, 464-70

7. Anhang

7.1. Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1-1: Fröhlich K (2008). Klinik und Poliklinik für Hals-, Nasen- und Ohrenkrankheiten, plastische und ästhetische Operationen
- Abbildung 1-2: Abbildung verändert nach Shieh SJ, Vacanti JP (2005). State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. Surgery, 137, 1-7
- Abbildung 1-3: Abbildung nach Staudenmaier R, Wenzel M (2003). Forschungsprojekt ForTePro, TE Symposium
- Abbildung 2-4: Abbildung verändert nach Reichl FX (2002). Allgemeine Umweltmedizin, Testmethoden. In: Taschenatlas der Umweltmedizin, Thieme Verlag, 2. Auflage, 3-13-108972-5
- Abbildung 4-1 bis 4-3, 4-6: Abbildung nach Groscurth P (2005). In: Histologie Atlas auf CD-Rom, Urban & Fischer Verlag, 2 Auflage, 3-437-41378-3
- Abbildung 4-4: Abbildung verändert nach Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke FJ (2002). Dosis-Wirkungskurven. In: Toxikologie, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 3. Auflage, 130-44
- Abbildungen 1-4, 2-1 bis 2-3, 2-5 bis 2-9, 3-1 bis 3-19, 4-5: Eigene Abbildungen

7.2. Abkürzungsverzeichnis

Abb:	Abbildung
C:	Celsius
DMEM:	Dulbecco's Modified eagle's medium
DMSO:	Dimethylsulfoxid
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
EC ₅₀	Mittlere effektive Konzentration
EZ4U:	Easy for you
FCS:	Fetales Kälberserum
FDA:	Fluoresceindiacetat
h:	Stunden
HNO:	Hals-Nasen-Ohren
m:	männlich
MGE:	Mikrogel-Elektrophorese
min:	Minuten
MNNG:	<i>N</i> -Methyl- <i>N'</i> -Nitro- <i>N</i> -Nitrosoguanidin
N:	Anzahl
NAA:	Non-Essential-Amino-Acids
NaCl:	Natriumchlorid
Neg:	Negativ-Kontrolle
OTM:	Olive Tail Moment
p:	p-Werte als Maß für den Unterschied zweier verschiedener Stichproben
PBS:	Phosphate buffered Saline
PEG-PPG-PEG:	Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol
PEG	Polyethylenglycol
PPG	Polypropylenglycol
TEG	Tetraethylenglycol
PI:	Propidiumiodid
Pos:	Positiv-Kontrolle
PS:	Penicillin Streptomycin
RPMI:	Roswell Park Memorial Institute
SCE:	Schwesterchromatidaustausch
Stabw:	Standartabweichung
Tab:	Tabelle
w:	weiblich

7.3. Daten zu den Ergebnissen

Tabelle 7-1: Daten zu Abbildung 3-1

	Neg	12,5 mg/ml	25 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml
Extinktion in [AU]	2,873	2,711	2,789	2,399	1,393	0,843
	2,626	2,947	2,877	2,934	1,698	0,811
	2,710	2,881	2,751	2,459	2,009	0,811
	2,343	2,530	2,587	2,663	1,854	0,819
	2,176	2,828	2,693	2,753	1,566	0,810
	2,305	2,893	2,853	2,591	2,250	0,837
	2,661	2,906	2,918	2,651	1,978	0,856
	2,409	2,822	2,849	2,585	1,443	0,898
	2,646	1,870	2,602	2,673	2,113	0,827
	2,916	2,672	2,909	2,564	2,517	0,801
	2,730	2,972	2,891	2,798	1,932	0,816
	1,994	2,721	2,213	2,456	2,026	0,797
	2,700	2,841	2,477	2,431	2,021	0,806
	2,734	2,753	2,927	2,675	1,831	0,816
	2,856	2,828	2,843	2,676	1,730	0,817
2,517	2,621	2,831	2,818	1,215	0,863	
Stabw	0,263	0,261	0,195	0,150	0,335	0,027
Mittelwert	2,575	2,737	2,751	2,633	1,849	0,827

Tabelle 7-2: Daten zu Abbildung 3-8

	Neg	25 mg/ml
Vitalitäten in %	97	84
	96	89
	93	90
	89	82
	93	91
	92	84
	93	92
	90	90
	96	92
	88	89
	92	90
	93	92
	90	96
	90	87
	93	92
93	94	
Stabw	2,553	3,775
Mittelwert	92	90

Tabelle 7-3: Daten zu Abbildung 3-9

	Neg	4 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml	25 mg/ml	30 mg/ml
Vitalitäten in %	86	95	90	85	80	78	83	74
	97	96	95	95	94	92	92	92
	90	95	91	88	84	74	73	38
Stabw	5,57	0,58	2,65	5,13	7,21	9,45	9,50	27,50
Mittelwert	91	95	92	89	86	81	83	68

Tabelle 7-4: Daten zu Abbildung 3-10

	Neg	3,5 mg/ml	3,75 mg/ml	4 mg/ml	4,25 mg/ml	4,5 mg/ml	4,75 mg/ml	5 mg/ml	25 mg/ml
Vitalitäten in %	90	93	94	92	90	90	90	92	87
	93	96	97	96	96	97	96	96	92
	93	96	92	95	95	95	97	96	94
Stabw	1,73	1,73	2,52	2,08	3,21	3,61	3,79	2,31	3,61
Mittelwert	92	95	94	94	94	94	94	95	91

Tabelle 7-5: Daten zu Abbildung 3-11

	25 mg/ml	Pos
OTM	2,926	9,046
	1,279	5,696
	2,464	22,302
	2,091	17,478
	0,540	3,325
	2,686	11,016
	2,014	10,968
	3,659	17,890
	2,313	9,162
	8,722	18,318
	2,774	10,192
	9,730	62,958
	5,940	15,971
	8,834	14,089
5,260	9,923	
11,843	29,039	
Stabw	3,434	13,915
Mittelwert	4,567	16,711

Tabelle 7-6: Daten zu Abbildung 3-12

	4 mg/ml	5 mg/ml	10 mg/ml	15 mg/ml	20 mg/ml	25 mg/ml	30 mg/ml	Pos
OTM	1,108	2,225	2,283	2,094	3,341	2,928	2,949	22,355
	0,679	1,619	2,202	2,603	2,520	2,123	5,306	5,806
	1,703	1,749	3,027	2,783	4,052	3,342	3,337	9,781
	0,861	1,957	1,003	1,128	3,090	2,872	5,826	14,722
Stabw	0,446	0,264	0,837	0,743	0,635	0,508	1,424	7,130
Mittelwert	1,088	1,887	2,129	2,152	3,251	2,816	4,355	13,166

Tabelle 7-7: Daten zu Abbildung 3-13

	3,5 mg/ml	3,75 mg/ml	4 mg/ml	4,25 mg/ml	4,5 mg/ml	4,75 mg/ml	5 mg/ml	25 mg/ml	Pos
OTM	0,569	0,910	0,873	1,022	0,899	1,961	1,469	2,921	8,347
	0,756	0,630	0,677	0,567	0,770	1,996	1,796	2,217	15,585
	1,020	1,953	1,252	1,316	3,043	5,203	4,310	5,168	19,142
Stabw	0,227	0,697	0,292	0,378	1,277	1,862	1,555	1,541	5,501
Mittelwert	0,782	1,165	0,934	0,968	1,571	3,053	2,525	3,435	14,358

Tabelle 7-8: Daten zu Abbildung 3-14

	Neg	5 mg/ml	10 mg/ml	20 mg/ml	50 mg/ml	100 mg/ml	200 mg/ml
Extinktion in [AU]	1,256	0,783	1,182	0,778	0,548	0,452	0,474
	1,690	0,764	1,269	0,582	0,471	0,488	0,524
	1,694	0,884	1,046	0,615	0,415	0,450	0,476
	1,712	0,789	1,302	0,776	0,529	0,430	0,720
	1,656	0,864	1,078	0,686	0,466	0,453	0,488
	1,509	0,880	1,221	0,706	0,455	0,440	0,617
	1,485	0,737	1,138	0,610	0,468	0,394	0,446
	1,089	0,703	1,078	0,704	0,497	0,374	0,545
	2,185	0,667	1,232	0,709	0,450	0,451	0,679
	1,826	0,743	1,304	0,681	0,478	0,440	0,722
	1,770	0,838	0,971	0,701	0,470	0,382	0,865
1,483	0,751	0,710	0,676	0,429	0,487	0,549	
Stabw	0,281	0,070	0,169	0,060	0,038	0,037	0,129
Mittelwert	1,613	0,760	1,077	0,687	0,472	0,438	0,592

Tabelle 7-9: Daten zu Abbildung 3-15

	Neg	0,018 mg/ml	0,037 mg/ml	0,075 mg/ml	0,15 mg/ml	0,3 mg/ml
Extinktion in [AU]	1,615	2,051	2,002	1,819	1,786	1,460
	1,602	1,892	1,960	1,449	1,815	1,500
	1,646	1,981	1,894	2,091	1,783	1,460
	1,441	2,078	1,961	1,901	1,917	1,373
	1,544	2,072	1,818	1,652	1,635	1,226
	1,127	1,892	1,710	1,886	1,090	1,268
	1,398	1,484	1,757	1,789	1,422	1,201
	1,591	1,779	1,516	1,703	1,754	1,272
	1,514	1,842	1,587	1,683	1,116	1,288
	1,686	1,610	1,495	1,468	1,584	1,390
	1,631	1,786	1,424	1,649	1,248	1,093
	1,762	1,544	1,614	1,443	1,313	0,932
	1,682	1,657	1,449	1,448	1,287	1,147
	1,569	1,451	2,071	1,186	1,204	1,215
	1,650	1,944	1,874	1,652	1,713	1,515
	1,521	1,904	1,846	2,081	1,708	1,285
Stabw	0,148	0,207	0,211	0,246	0,278	0,158
Mittelwert	1,561	1,810	1,749	1,681	1,523	1,289

Tabelle 7-10: Daten zu Abbildung 2-23

	Neg	0,15 mg/ml
Vitalitäten in %	92	90
	95	90
	93	92
	93	90
	93	92
	93	92
	94	95
	92	93
	92	93
	92	91
	93	91
	93	90
	90	91
	88	97
	90	93
	85	91
90	92	
Stabw	2,422	1,886
Mittelwert	92	92

Tabelle 7-11: Daten zu Abbildung 3-24

	0,15 mg/ml	Pos
OTM	1,721	25,210
	1,927	21,393
	0,954	5,880
	0,938	8,299
	1,295	10,676
	0,909	9,234
	0,370	16,163
	0,500	9,030
	2,323	12,711
	2,742	34,600
	0,990	6,011
	1,874	5,571
	1,361	8,918
	1,401	11,391
	1,922	12,728
	Stabw	0,667
Mittelwert	1,415	13,188

Tabelle 7-12: Daten zu Abbildung 3-25

	Neg	0,45 mg/ml	0,9 mg/ml	1,8 mg/ml	2,5 mg/ml
Extinktion in [AU]	1,123	1,312	1,695	1,405	1,047
	1,494	1,628	1,308	1,503	1,181
	1,295	1,372	1,747	1,501	1,078
	1,452	1,743	1,723	1,225	1,079
	1,381	1,688	1,144	1,182	1,149
	1,274	1,858	1,514	1,463	1,084
	1,394	1,675	1,665	1,403	1,034
	1,096	1,743	1,524	1,530	1,025
Stabw	0,146	0,189	0,216	0,131	0,055
Mittelwert	1,314	1,627	1,540	1,402	1,085

Tabelle 7-13: Daten zu Abbildung 3-33

	Neg	0,56 mg/ml	0,68 mg/ml	0,79 mg/ml	0,9 mg/ml	1,01 mg/ml
Extinktion in [AU]	1,688	2,515	2,272	2,613	1,672	1,863
	2,020	2,629	2,547	2,196	2,568	2,651
	1,965	2,458	2,579	2,551	2,630	2,567
	2,123	2,683	2,593	2,449	2,598	2,621
	2,028	1,098	1,987	2,398	2,482	2,563
	1,178	2,485	2,681	2,617	2,548	2,458
	2,730	1,969	1,540	2,470	2,320	2,351
	2,189	2,595	2,603	2,296	2,662	2,597
	2,064	1,394	2,589	1,405	2,686	2,103
	2,035	2,134	2,589	2,531	2,638	1,834
	2,086	1,617	2,575	2,565	2,575	2,551
	1,468	1,759	2,466	2,245	2,637	1,587
	Stabw	0,386	0,538	0,336	0,332	0,279
Mittelwert	1,963	2,111	2,418	2,445	2,508	2,312

Tabelle 7-14: Daten zu Abbildung 3-34

	Neg	0,9 mg/ml
Vitalitäten in %	92	82
	93	95
	93	95
	91	93
	96	81
	89	92
	90	83
	96	88
	88	92
	91	94
	92	94
	93	93
	94	91
	92	88
	93	95
	90	90
88	93	
85	92	
90	90	
Stabw	2,752	4,363
Mittelwert	91	91

Tabelle 7-15: Daten zu Abbildung 3-35

	0,9 mg/ml	Pos
OTM	0,495	11,293
	1,268	14,399
	3,827	9,695
	0,340	11,016
	0,330	7,733
	1,049	7,306
	0,602	11,649
	1,655	33,191
	1,097	10,029
	0,794	7,309
	0,827	7,724
	0,946	8,455
	1,056	13,035
	0,875	14,984
	2,701	9,030
	2,334	12,711
	1,035	6,011
0,538	3,149	
3,382	13,396	
Stabw	1,013	6,150
Mittelwert	1,324	11,164

7.4. Publikationen aus der Arbeit

1. Originalarbeit

Lotz AS, Havla JB, Richter E, Frölich K, Staudenmaier R, Hagen R, Kleinasser NH (2009). Cytotoxic and genotoxic effects of matrices for cartilage tissue engineering. Toxicol Lett;190(2):128-33

2. Kongressbeitrag

Kleinasser NH, **Lotz AS**, Havla JB, Staudenmaier R (2008). Humane Chondrozyten und Lymphozyten als Modell zur Evaluation potentiell toxischer Effekte von Trägersubstanzen für das Tissue Engineering. Abstract Nr 533,79. Jahresversammlung der Deutschen Gesellschaft für Hals-Nasen-Ohren-Heilkunde, Kopf- und Hals-Chirurgie e. V, Bonn.

7.5. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben. Im Besonderen gilt dieser Dank...

...Herrn Prof. Dr. med. N. Kleinsasser für die Möglichkeit, im Labor für klinisch-experimentelle Onkologie zu promovieren und für das Vertrauen, das er mir entgegen brachte. Seine fachliche Kompetenz, sein großes Engagement und sein freundschaftlicher Beistand waren für das Gelingen dieser Arbeit unentbehrlich.

...Herrn Prof. Dr. med. vet. E. Richter für die zuvorkommende Mitbetreuung und die vertrauensvolle Unterstützung meiner Doktorarbeit. Seine wertvollen Erfahrungen und wissenschaftlichen Fachkenntnisse habe ich sehr zu schätzen gelernt.

...Herrn PD Dr. med. R. Staudenmaier, durch den ich die Möglichkeit hatte, am ForTePro-Projekt für Tissue Engineering zur autologen Ohrmuschelrekonstruktion beteiligt zu sein.

...Herrn Prof. Dr. med. J. Strutz für die Unterstützung der Laborarbeit durch Bereitstellung der Räumlichkeiten.

...Frau Dipl. biol. A. Sassen für die Einführung in die Methodik der Lymphozytenisolierung, des Comet Assays und des Programms SPSS. Sie hatte jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Anliegen des alltäglichen Labortages.

...Frau Dr. hum. biol. M. Wenzel für die Einführung in die Zellkultur, Vitalfärbung und den EZ4U-Proliferationstest.

...den Operateuren der HNO Abteilung und ihrem Team an der Universitätsklinik Regensburg für die Gewinnung und Aufbewahrung von Gewebeproben. Ohne ihre Kooperation hätte kein Versuch stattgefunden.

...meinen Mitdoktoranden für ihre Freundschaft und ihre große Kooperation hinsichtlich der Tagesplanung im Labor.

...meinen Eltern und Geschwistern, deren Interesse und Liebe mich in meiner Arbeit die ganze Zeit unterstützt haben.

7.6. Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Amelie Sophia Lotz
 Geburtsdatum: 14. Mai 1984
 Geburtsort: Heidelberg, Deutschland
 Nationalität: deutsch/schweizerisch
 Familienstand: ledig

Ausbildung

11/2008 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Note 1,5 (sehr gut)
 9/2004 Physikum, Note 2 (gut)
 10/2002-11/2008 Studium der Humanmedizin an der LMU München, Deutschland
 9/1999-6/2002 Gymnasium am Institut Montana in Zug, Schweiz
 Abschluss: Schweizer Abitur, Note 5,5 (von 6)
 9/1994-7/1999 Bunsen-Gymnasium in Heidelberg, Deutschland
 9/1990-7/1994 Grundschule in Heidelberg, Deutschland

Praktisches Jahr

3/2008-7/2008 Innere Medizin im Rahmen des PJ-Stipendienprogramms der LMU-HMI-Allianz an der Harvard Medical School, Boston, USA
 12/2007-3/2008 Chirurgie am Universitätsspital Zürich, Schweiz
 8/2007-12/2007 Pädiatrie am Dr. von Haunerschen Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland

Förderungsprogramme

3/2008-8/2008 PJ-Stipendienprogramm der LMU-HMI-Allianz
 Seit 10/2008 Mentee des LMUexcellent Mentoring-Programm

Wissenschaftlicher Werdegang

Seit 1/2008 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen der LMUexcellent Initiative in der Molekularen Pädiatrie, Dr. von Haunersches Kinderspital der Ludwig-Maximilians-Universität München, Deutschland
 3/1007-8/1007 Projekt in der Molekulare Pädiatrie „Entwicklung neuer Methoden zur Untersuchung von Protein-Protein-Interaktionen in vitro und in vivo“

