

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

Direktor: Prof. Dr. med Jürgen Strutz

# Humane Chondrozyten und Lymphozyten als Modell zur Untersuchung der Toxizität von Matrixmaterialien für die Gewebezüchtung

Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilian-Universität zu München

vorgelegt von

Joachim Bernhard Havla

aus Pegnitz/Oberfranken

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität München

1. Berichterstatter	Prof. Dr. med. vet. Elmar Richter
2. Berichterstatter	Prof. Dr. med. Ludwig von Meyer
Mitberichterstatter	Prof. Dr. med. Peter Müller Priv. Doz. Dr. Martin Albrecht
Mitbetreuung durch die 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	22.04.2010

# Humane Chondrozyten und Lymphozyten als Modell zur Untersuchung der Toxizität von Matrixmaterialien für die Gewebezüchtung

## **KAPITEL 1 EINLEITUNG**..... 7

---

1.1 Tissue Engineering und Rapid Prototyping.....	7
1.2 Materialien der Matrix.....	12
1.3 Arbeitshypothese und Aufgabenstellung.....	13

## **KAPITEL 2 MATERIAL UND METHODIK** ..... 15

---

2.1 Verwendete Gewebe und Zellen .....	15
2.2 Verwendete Labormaterialien und Geräte.....	15
2.3 Zusammensetzung der Lösungen .....	18
2.4 Herkunft und Charakterisierung der Testsubstanzen.....	20
2.5 Zellexposition.....	22
2.6 Methoden der Untersuchungen zur Zytotoxizität.....	24
2.6.1 Gewinnung von Chondrozyten .....	24
2.6.2 Passagieren der Chondrozyten .....	24
2.6.3 Vitalitätstest mit Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat .....	25
2.6.4 Proliferationstest mit Tetrazoliumsalzen.....	27
2.7 Methoden der Untersuchungen zur Genotoxizität.....	30
2.7.1 Gewinnung und Isolation humaner Lymphozyten .....	30
2.7.2 Genotoxizitäts- und Zytotoxizitätstest an humanen Lymphozyten.....	30
2.7.3 Digitale Analyse der DNA-Migration und Datenspeicherung.....	33
2.8 Statistische Analyse und grafische Ergebnisdarstellung .....	34
2.8.1 Boxplots .....	34
2.8.2 Statistische Testverfahren .....	34

## **KAPITEL 3 ERGEBNISSE**..... 36

---

3.1 Ergebnisdarstellung für 1,6-Hexandiol .....	36
3.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehung zur Zytotoxizität an humanen Chondrozyten .....	36
3.1.2 Proliferationstest mit der Schwellenkonzentration 5 mg/ml .....	38
3.1.3 Zytotoxizität an humanen Lymphozyten .....	39
3.1.4 Genotoxizität an humanen Lymphozyten .....	40

3.2 Ergebnisdarstellung für 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) .....	41
3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung zur Zytotoxizität an humanen Chondrozyten .....	41
3.2.2 Proliferationstest mit der Schwellenkonzentration 0,5 mg/ml .....	43
3.2.3 Zytotoxizität an humanen Lymphozyten .....	45
3.2.4 Dosis-Wirkungsbeziehung zur Genotoxizität an humanen Lymphozyten.....	46
3.3 Ergebnisdarstellung für 6-Hydroxyhexansäure (HHS) .....	46
3.3.1 Dosis-Wirkungsbeziehung zur Zytotoxizität an humanen Chondrozyten (0,9-7,4 mg/ml) .....	47
3.3.2 Dosis-Wirkungsbeziehung zur Zytotoxizität an humanen Chondrozyten (0,5--1,9 mg/ml)....	48
3.3.3 Proliferationstest mit der Schwellenkonzentration 0,9 mg/ml .....	48
3.3.4 Zytotoxizität an humanen Lymphozyten bei 0,9 mg/ml .....	51
3.3.5 Genotoxizität an humanen Lymphozyten bei 0,9 mg/ml .....	51
3.3.6 Zytotoxizität an humanen Lymphozyten (0,005–0,037 mg/ml) .....	52
3.3.8 Ergänzungsreihe zur Genotoxizität an humanen Lymphozyten (0,005–0,037 mg/ml) .....	53
<b>KAPITEL 4 DISKUSSION</b> .....	<b>54</b>
<hr/>	
4.1 Diskussion der Ätiologie und Therapie aurikulärer Rekonstruktion.....	54
4.2 Diskussion der Auswahl des Spenderkollektivs und der Zielzellen.....	55
4.2.1 Humane Chondrozyten .....	55
4.2.2 Humane Lymphozyten.....	58
4.3 Diskussion der Methodik.....	59
4.3.1 Der Comet Assay und die alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese (EMGB) .....	59
4.3.2 Zytotoxizitätstests .....	63
4.3.3 Diskussion der statistischen Auswertung.....	66
4.4 Diskussion der Testsubstanzen.....	67
4.5 Diskussion der Ergebnisse und deren Interpretation .....	68
4.5.1 1,6-Hexandiol.....	69
4.5.2 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU).....	70
4.5.3 6-Hydroxyhexansäure .....	70
4.5.4 Ergebnisse bezüglich der Biomaterialzusammensetzung .....	71
4.6 Zellspezifische Ergebnisse .....	71

4.6.1 Untersuchungsreihen an humanen Chondrozyten.....	71
4.6.2 Untersuchungsreihen an humanen Lymphozyten .....	72
4.7 Ausblick auf die Projektweiterführung .....	73
<b>KAPITEL 5 ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>74</b>
<hr/>	
5.1 Hintergrund und Fragestellung.....	74
5.2 Methoden, Stoffe und Patientengruppen .....	74
5.3 Ergebnisse .....	74
5.4 Schlussfolgerung .....	75
<b>KAPITEL 6 LITERATUR .....</b>	<b>76</b>
<b>KAPITEL 7 ANHANG .....</b>	<b>86</b>
<hr/>	
7.1 Abkürzungsverzeichnis .....	86
7.2 Abbildungsverzeichnis .....	87
7.3 Curriculum Vitae.....	89
7.4 Publikationen aus der Arbeit.....	90
7.4.1 Originalarbeit: .....	90
7.4.2 Kongressbeitrag: .....	90
7.5 Danksagungen .....	91
7.6 Versuchsdaten .....	92

## 1.1 Tissue Engineering und Rapid Prototyping

Die Ohrmuschel ist ein aus elastischem Knorpel und Haut bestehender, mit dem Schläfenbeinperiost verbundener Teil des äußeren Ohres. Durch die exponierte Lage als Teil des Gesichtes prägt sie das körperliche Selbstbild. Dabei unterscheidet man individuelle Formunterschiede des äußeren Ohres in



**Abb. 1-1** Menschliche Ohrmuschel



**Abb. 1-2** Mikrotie°III der Ohrmuschel

anliegende, abstehende, kleine und große Ohrmuscheln. Diese Individualität der Formgebung ist beinahe so ausgeprägt wie die Individualität des humanen Fingerabdruckes. Das Ohrläppchen (lat. *Lobulus*) ist fleischig weich und fungiert als Resonanzkörper. Die frei vom Kopf hängenden Ohrläppchen (Abb. 1-1) sind genetisch dominant determiniert und kommen im Gegensatz zu angewachsenen Ohrläppchen in der Bevölkerung doppelt so häufig vor. Die Vertiefungen und Erhebungen der Ohrmuschel (lat. *Auricula*) stellen insgesamt ein Filtersystem des Schalleindrucks dar und tragen zur Funktion des Richtungshörens bei. Formdefekte der Ohrmuschel treten sowohl hereditär isoliert, als auch in Folge verschiedener Missbildungen oder eines Unfalls auf. Ungefähr die Hälfte aller Fehlbildungen des Kopf-Hals-Bereiches sind einseitig rechtsbetont im Ohrbereich lokalisiert. In ungefähr 10% der Fälle kommt es jedoch auch zu einer beidseitigen Missbildung. Die Gesamtinzidenz der Ohrfehlbildungen beträgt etwa 1:3800 der Neugeborenen. Eine häufige isolierte Fehlbildung ist dabei die Mikrotie. Sie hat in der westlichen Bevölkerung eine Inzidenz von 0,76 bis 2,35 Fälle pro 10.000 Geburten [Staudenmaier, 2000, 2006]. In 20-30% der Betroffenen ist die Deformation Teil eines genetischen Fehlbildungssyndroms im Goldenhar/Franceschetti-Syndrom oder ein Kombinationsdefekt bei Gesichtshypoplasie oder Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Meistens treten diese Defekte sporadisch auf, jedoch werden auch hämorrhagische Ereignisse in der Frühschwangerschaft und Gestosen erwogen. Gerade junge Menschen leiden sehr stark unter einer fehlenden bzw. deformierten Ohrmuschel, auch wenn, solange kein Gehörgangverschluss vorliegt, diese funktionell weniger

bedeutsam sind. Auch für die Eltern der Betroffenen ist gerade eine angeborene Ohrmuscheldeformität eine große psychische Belastung, da dieses häufig Schuldgefühle über Fehlverhalten während der Schwangerschaft auslöst. Die Dysplasien des äußeren Ohres, werden in einer Klassifikation nach Weerda [1988] eingeteilt. Dabei wird die Weerda-Klassifikation der natürlichen Formenvielfalt gerecht und beschreibt deren Übergang zu einer Anomalie. Den Schweregraden der Ohrmuschelfehlbildungen sind drei Ausprägungsebenen zugeordnet (Mikrotie Grad I-III). Grad I umfasst kleinere Defekte unter Erhaltung der wesentlichen Bestandteile der Ohrmuschel. Für eine chirurgische Korrektur ist kein zusätzliches Gewebe notwendig. Im zweiten Grad sind nur noch einige Strukturen der

Ohrmuschel vorhanden. Es kommt zum Miniohr oder auch zu einem tassenförmigen Ohr. Grad III umfasst alle Defekte, bei denen keine wesentlichen Bestandteile der Ohrmuschel vorhanden sind und somit zu einer Anotie (Abb. 1-2). Zur Konstruktion einer Ohrmuschel bei Dysplasien Grad II und



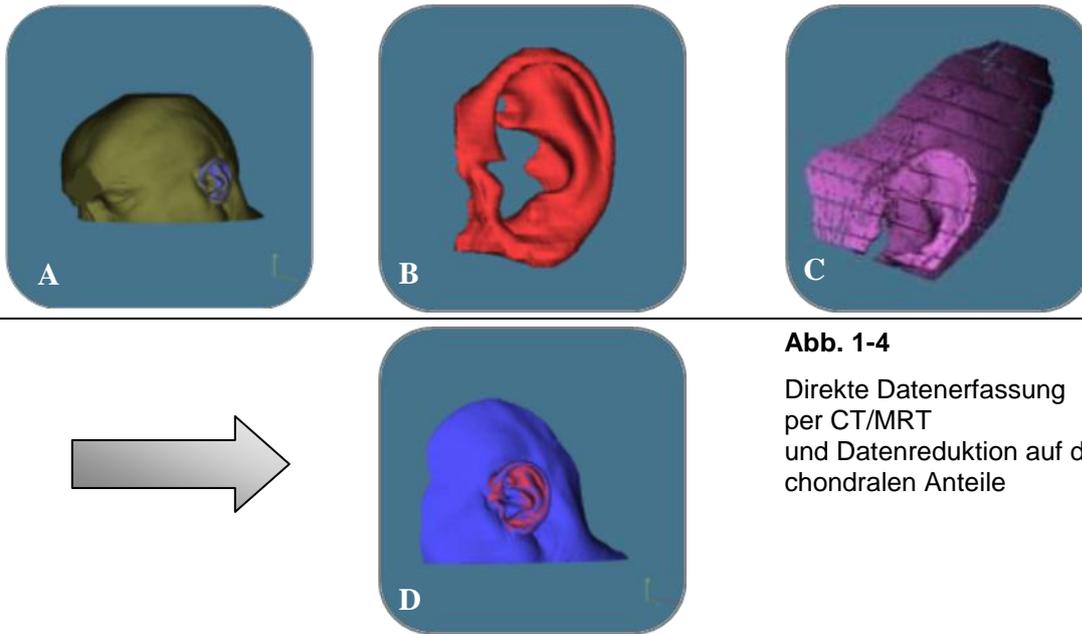
**Abb. 1-3**  
Herkömmliche Ohrrekonstruktionstechnik

Grad III ist zusätzlich Knorpel und Hautgewebe notwendig (Abb. 1-3).

Gehäuft kommt es zu einer Assoziation zwischen den schweren Ohrmuschelfehlbildungen mit Dysplasien des Mittelohres. Folge ist eine Schwerhörigkeit unterschiedlichen Grades, wie sie beispielsweise bei der Dysostosis mandibulofazialis auftritt. Bei Mittelohrfehlbildungen ist meist die Innenohrfunktion unbeeinträchtigt. Folge einer angeborenen Dysplasie mit oder ohne Innenohrbeteiligung können entwicklungspsychologische Defizite wie eine gestörte Lautsprachenentwicklung sein. Im Gegensatz zu einseitigen Dysplasien sollte nur bei beidseitigen Fehlbildungen rasch eine akustische Verstärkung angestrebt werden, um frühzeitig Entwicklungsdefizite zu verhindern. Neben den angeborenen Missbildungen spielen Verletzungen im Bereich des äußeren Ohres eine große Rolle für die Rekonstruktionschirurgie. Dabei ereignen sich zwei

Drittel der Unfallereignisse zwischen dem 11. und dem 40. Lebensjahr. Männer sind doppelt so häufig betroffen. Hauptsächlich sind Unfälle im Straßenverkehr (43%), häusliche Verletzungen (33%) und Verletzungen bei Tötlichkeiten (14%) [Steffen et al., 2007]. Auch die thermische Schädigung der Ohrmuschel muss abhängig vom Verbrennungs- bzw. Erfrierungsgrades chirurgisch versorgt werden [Bootz, 2001]. Eingeteilt werden die traumatischen Ohrdefekte in einer dreigliedrigen Klassifikation nach Haug et al. [2001] nämlich in primäre Wundversorgung, Replantation und Rekonstruktion. Diese kommt dem Ziel nach, den verschiedenen Belangen einfacher und komplexer Ohrverletzungen durch ein differenziertes Behandlungskonzept Rechnung zu tragen, da dies auf Grund der komplexen Ohrstruktur, der einzigartigen Form, des mehrschichtigen Aufbaus und der Besonderheit der Blutversorgung des äußeren Ohres notwendig scheint. Das therapeutische Ziel der Ohrmuschelkonstruktion und -rekonstruktion sollte eine funktionell und ästhetisch möglichst physiologische Lösung sein. Die neue Ohrmuschel soll dem Patienten sowohl einen formstabilen Ersatz liefern als ihn auch von der sichtbaren Fehlbildung befreien. Gleichzeitig kann ein adäquater Hörmuschelersatz eine Verbesserung der akustischen Qualität erlauben, da die Muschel als Schallfänger fungiert. Durch die Anwendung einer autologen aurikulären Rekonstruktion wird heute diesem Streben nach einer individuell geformten, kosmetisch ansprechenden Ohrmuschel nachgekommen [Staudenmaier, 2000, 2006, Staudenmaier et al., 2000, 2001, 2006], die auch ein normales Ohrempfinden ermöglicht. Dennoch gibt es im Bereich der chirurgischen Ohrknorpelrekonstruktion einen immer größer werdenden Bedarf an langlebigen, hoch belastbaren Ersatzstoffen. Die Implantation von Prothesen ist dabei eine etablierte Methode. Kunststoffimplantate können durch Infektionen, Unverträglichkeiten auf chemische Bestandteile und Abstoßungsreaktionen an die Grenzen ihrer Entwicklung stoßen. Darüber hinaus können künstliche Implantate Nachteile im Bereich der Funktionalität und Dauerbelastbarkeit haben [Staudenmaier, 2006]. Vorteile werden in der alterunabhängigen, leichten Verfügbarkeit und einzeitigen Operation gesehen. Eine weitere etablierte Form der Defektbehebung ist ein Ersatz durch körpereigene Knorpeltransplantate [Staudenmaier et al., 2006]. Dabei bildet man aus dem Rippenknorpel patientenindividuelle Ohrformen. Diese, einer autologen Implantation entsprechende Art der

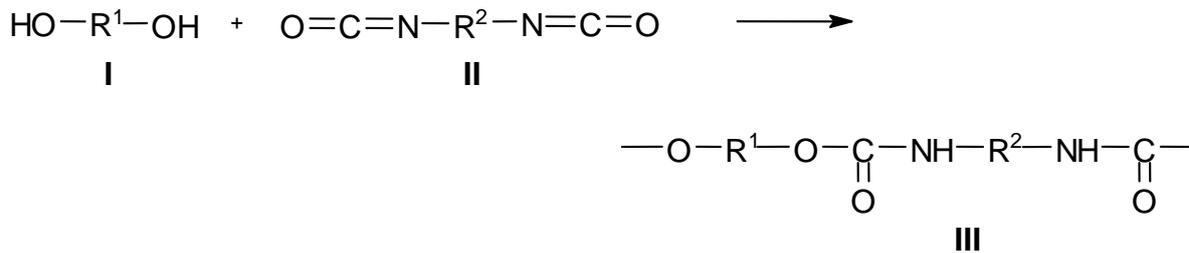
Defektbehebung kann auch Probleme mit sich bringen, denn das Transplantat ist häufig nur eine ungenaue Ersatzlösung [Staudenmaier und Rasp, 2003]. Obwohl damit kosmetisch gute Ergebnisse erzielt werden, steht das mit autologem Knorpel rekonstruierte neue Ohr mit einer möglichen gesunden alten Ohrmuschel in ästhetischer Konkurrenz. Auch sind die autologen chondralen Ressourcen des Körpers für das so verwendbare Ersatzmaterial limitiert. Für kleinere Deformitäten genügt zwar die Verwendung von Nasenseptumknorpel meistens aus, jedoch muss für Deformitäten der Grade II und III auf Rippenknorpel zurückgegriffen werden. So entstehen zusätzliche neue Defekte, die man als Hebedefekte subsumiert [Rasp et al., 2000]. Als Komplikationen sind Infektionen, Pneumothorax, überschießende Narbenbildung und Thoraxdeformitäten zu nennen.



**Abb. 1-4**

Direkte Datenerfassung per CT/MRT und Datenreduktion auf die chondralen Anteile

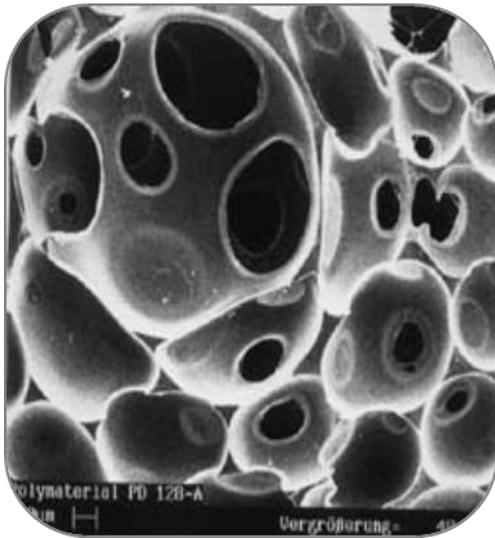
Eine dritte etablierte Möglichkeit der Ohrrekonstruktion ist die alloplastische Implantation. Dabei werden aus Polyethylen industriell verschiedene Ohrmuschelformen hergestellt, die den Patienten als Epithese angeboten werden. Durch die individuelle Modulation ist es möglich Fremdkörpermodelle zu schaffen, die speziell für den Patienten angefertigt werden können. Diese können damit beispielsweise einer kontralateral vorhandenen Ohrmuschel identisch sein und dadurch bessere kosmetische Resultate erzielen. Allerdings bleiben sie für den Betroffenen immer ein Fremdkörper. Patientenindividuelle Modelle nicht aus Kunststoff, sondern aus Polycaprolactonen zu konstruieren, die man mit *in vitro*-kultivierten Chondrozyten besiedelt ist das Ziel innovativer Gewebezüchtung, in der Literatur auch als Tissue Engineering bezeichnet. Die autologen Zellen müssen in der Lage sein, diesen Fremdkörper nach einer Weile mit eigener Stabilität und Funktion biologisch zu ersetzen. Dadurch könnte dem Wunsch einer echten autologen chondralen Ohrrekonstruktion entsprochen werden, ohne dass es zu Hebedefekten kommt. Auch befriedigt es das Bestreben, möglichst der Physiologie ähnliche Matrixverhältnisse in der Rekonstruktion zu schaffen. Die Matrix ist die Struktur, die den Zwischenraum zwischen Zellen ausfüllt. Sie ist gerade bei Knorpelgewebe besonders ausgeprägt. Hauptbestandteile der Knorpelmatrix sind Strukturproteine, vor allem Kollagen und Elastin, Adhäsionsproteine wie Fibronektine und Laminin und eine Grundsubstanz aus Proteoglycanen. Als Ziel der Entwicklung muss man also der physiologischen Matrix in der Rekonstruktion sehr nahe kommen mit der Formulierung eines biokompatiblen, möglichst bioabbaubaren, offenporigen Polymers, das ohne mechanische Nachbehandlung geöffnete Poren besitzt und damit von keiner Haut umgeben ist.



**Abb. 1-5**

Polyurethan (PUR): Zusammensetzung aus I (Polycaprolacton) + II = III (Polyurethanschaum)

Dieses Polymer besteht aus einer Zusammensetzung strukturell sich wiederholender Teilkomponenten oder Monomeren. Diese werden durch kovalente chemische Bindungen (altgriechisch *polysmeros*) mit einander verbunden [Keim, 2006]. Die Anzahl und Größe der Poren sollte über den gesamten Polyurethanschaum homogen verteilt oder zumindest in den oberflächennahen Bereichen des Schaums zunehmen. Dieser offenporige Polymerschaum in Form eines dreidimensionalen Trägergerüsts dient zur Herstellung eines Zellträgers, dem so genannten Scaffold, der schließlich für Zellkulturen, Gewebekulturen und für das Tissue Engineering besonders geeignet wäre. Das Rapid Prototyping (deutsch: *schneller Prototypenbau*) beschreibt die Möglichkeit der schnellen Herstellung von Musterbauteilen ausgehend von Konstruktionsdaten. Dabei handelt es sich um Urformverfahren, die das Werkstück schichtweise aus formlosen oder formneutralen Material aufbauen. Das Rapid Prototyping eröffnet durch die Erfassung von dreidimensionalen Datensätzen die Möglichkeit der Herstellung patientenindividueller Zellträger. Dabei kann beispielsweise das vorhandene defektfreie kontralaterale Ohr über ein entsprechendes mathematisches Simulationsverfahren und dessen Modulation als Modell dienen. Zur Datenerfassung finden innovative Scan-Technologien wie 3D-Ultraschall, Holographie und Computertomographie Verwendung [Naumann et al., 2003]. Sie ermöglichen die Digitalisierung der Daten [Sader und Zeilhofer, 2003] und bilden als CAD-Daten Grundlage für einen äußerst exakten Schichtaufbau des Modells durch die Laserstereolithographie. In Abb. 1-4 wird beispielhaft aufgezeigt, wie die dreidimensionalen Daten des kontralateralen externen Ohres auf die chondralen Anteile der Ohrmuschel reduziert werden, die als spiegelsymmetrisches Modell für die betroffene Seite dienen soll. Durch mathematische Verfahren der Modellierung und Simulation wird ein dreidimensionales alloplastisches Modell der fehlenden Ohrmuschel aus einem Spezialharz geschaffen und davon eine Negativform aus einem geeigneten Material wie Silicon hergestellt. Durch ein einfaches Gießverfahren kann in dieser Negativform der Zellträger als offenporiger Schaum ohne Haut aus physiologisch abbaubarem und biokompatiblen Polyurethan gebildet werden. Zur Formulierung dieses offenporigen Polyurethanschaums dienen sechs chemische Hauptbestandteile. Die Polyolkomponente (I) wird bevorzugt mit einem Polyester besetzt. Dazu eignen sich Polycaprolactondiole bis zu einem mittleren Molekulargewicht von 15000 g/mol. In Abb. 1-5 wird die chemische Wandlung des Polycaprolacton zu einem Polyurethan verdeutlicht. Das Caprolacton ist ein ringbildender, zyklischer Ester, der im Sprachgebrauch auch als  $\epsilon$ -Lacton der Capronsäure bezeichnet wird. Im Normalzustand ist das Caprolacton eine klare, farblose Flüssigkeit. Es ist in Wasser und in nahezu allen organischen Lösungsmitteln leicht löslich. Aus einer Kette der Caprolactone wird das Polycaprolacton (PCL) gebildet. Mit Wasser reagiert das Caprolacton langsam zur 6-Hydroxyhexansäure. Bei dem Polycaprolacton



**Abb. 1-6**  
Polycaprolacton in einer REM-Aufnahme



**Abb. 1-7**  
Ohrmodell aus PCL im Original. Man erkennt die schaumig weiche Ohrmuschelnachbildung

handelt es sich um ein regelmäßiges Polymer, welches durch die Polymerisation des ringförmigen Caprolactons in Anwesenheit von Hitze und einem Katalysator (Alkohole/Diole) gebildet wird. Industriell wird es durch die Baeyer-Villiger-Oxidation aus Cyclohexanon, einem Aktivator unterschiedlicher Oxidierungsreaktionen, produziert. Bei der Baeyer-Villiger-Oxidation kommt es zur Oxidation eines Ketons. Bei dieser organischen Reaktion entsteht ein Ester. Diese Entwicklung ist nach dem deutschen Chemiker Johann Friedrich Wilhelm Adolf von Baeyer (1835-1917) und seinem Schweizer Kollegen Victor Villiger (1868-1934) benannt [Smith und March, 2001]. Die Abb. 1-6 und 1-7 zeigen Aufnahmen des Polycaprolacton-Schwammes in einer rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme, die die Offenporigkeit des Stoffes darstellt, und beispielhaft eine Übersichtsaufnahme des Endmodells. Zur Bildung der Polyisocyanatkomponente (II) trägt die chemische Substanz 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) bei. Gleichzeitig wird DBU als basischer Katalysator (IV) eingesetzt, der die Reaktion zwischen Hydroxy- und Isocyanat-Gruppen katalysiert. Eine Saccharidkomponente (III), die entweder Mono-, Oligo- oder Polysaccharid-Gruppen enthält, führt bei Einsatz in kleinen Mengen zu einer deutlichen Verbesserung der Porosität und Offenporigkeit, d.h. die Zahl und Größe der Poren in den oberflächennahen Bereichen des Schaums nimmt zu. Dabei werden Monosaccharide wie Dextrose bevorzugt. Als weitere Komponente (V) werden Treibmittel zur Schaumbildung eingesetzt. Diese Stoffe müssen bei der Schäumtemperatur gasförmig vorliegen oder Gas bilden. Besonders geeignet sind dafür Wasser, organische Lösungsmittel oder Kombinationen daraus. Deswegen kann man als physikalisches Treibmittel Alkane, Acetale oder Ketone in Kombination mit dem

chemischen Treibmittel Wasser verwenden. Diese sechs Komponenten (siehe auch Tab. 1-2) werden in einem formulierten Polyurethanschaum (PUR) vereint und ermöglichen damit die Reimplantation kultivierter lebender Zellen. Grundvoraussetzung für einen zu konstruierenden Polyurethanschaum ist jedoch, dass er nicht toxisch wirkt, gut biokompatibel ist, mit gängigen Verfahren sterilisiert werden kann und eine gute Hydrophilie aufweist. Die Besiedelung dieses Zellträgers kann sowohl in vivo als auch in vitro stattfinden. Man spricht in diesen Fällen von in vivo- bzw. in vitro-Tissue Engineering. Durch seine Offenporigkeit soll ein ungehinderter Zugang von den äußeren zu den inneren, offenen, d.h. interkonnektierenden Poren ermöglicht werden. Die Chondrozyten haben so die Möglichkeit durch ein allmähliches Hineinwachsen in die Poren zeitgleich die Strukturen durch chondrales Stützmaterial zu ersetzen. Für Chondrozyten konnten geeignete Kultivierungsverfahren etabliert werden.

**Tab. 1-1** Chemisches Datenblatt des Caprolactons

<b>Caprolacton</b>	
<b>Chemischer Name</b>	2-Oxepanon
<b>Chem. Summenformel</b>	$C_6H_{10}O_2$
<b>Massengewicht (MG)</b>	114,14 g/mol
<b>Dichte <math>\rho</math></b>	1,030 g/cm <sup>3</sup>
<b>Schmelzpunkt</b>	-1 °C
<b>Siedepunkt</b>	253 °C
<b>SMILES</b>	O=C1OCCCCC1

Übertragen auf die vorliegende wissenschaftliche Zielsetzung genügt es deshalb Chondrozyten aus einer kleinen Gewebeprobe beispielsweise aus der Ohrmuschel des Patienten zu isolieren. Aus dieser Eigenspende kann man anschließend größere Mengen zur Generierung von Knorpelmasse züchten, die in Fibringel gelöst auf das patientenindividuelle Scaffold aus einem Polyurethanschaum (Zellträger) aufgebracht und in vitro kultiviert werden können (Abb. 1-8). So erhält man über einige Monate ein autologes Knorpel-Biomaterial-Konstrukt, welches dem Patienten implantiert werden kann um ursprüngliche Defekte zu rekonstruieren. Über weitere Monate sollte die Matrix dann biologisch unter Bildung unschädlicher Produkte ersetzt werden [Wiese und Maier, 2006]. Bis heute ist dieses Ziel noch nicht erreicht [Naumann et al., 2003]. Vor allem die Überlebenszeit der Zell/Matrix-Konstrukte ist momentan noch limitiert und Gegenstand intensiver Forschung [Izquierdo et al., 2007, Shieh und Vacanti, 2005]. Deswegen bleibt die Entwicklung einer solchen Matrix als eine interdisziplinäre Aufgabe für Mediziner, Materialwissenschaftler, Biologen, Mathematiker, Physiker und Ingenieure bestehen.

## 1.2 Materialien der Matrix

Polycaprolactone gehören in die Gruppe der Polyester. Dieses synthetische Material eignet sich besonders zur Herstellung eines Zellträgergerüsts [Angele et al., 2004, Izquierdo et al., 2007, Naumann et al., 2003]. Der vorliegenden Arbeit liegen drei Reinsubstanzen des Polyurethanschaums zu Grunde, die in vorher theoretisch formulierten Konzentrationen Verwendung finden. Im Folgenden werden die Einzelsubstanzen aufgelistet. Für die Substanzen 1,6-Hexandiol, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en und 1,6-Hydroxyhexansäure sind in 2.5.1 die Grundzüge ihrer chemischen Datenblätter erläutert. Die hier untersuchten Stoffe sind in der Tabelle 1-2 hervorgehoben. Diese Stoffe sind Bestandteil der Komponenten (I)-(VI), die man zur Bildung eines offenporigen Polyurethans benötigt, um den verschiedenen Ansprüchen an das Trägermaterial gerecht zu werden [Müller et al., 2006]. Dabei wurde die jeweilige Stoffmenge auf 0,2 g umgerechnet, denn das entspricht der Menge, die in einem Milliliter enthalten ist. Die verwendeten Substanzen der Saccharidkomponente Dextrose bzw. weiterer Diolkomponenten Triethanolamin und Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol ergänzen die Formulierung des Zellträgers.

Tab. 1-2 Auflistung der Reinsubstanzen/Komponenten des Polymers

Substanz	Bezeichnung	Angedachte Konzentration	Anmerkung
1	1,6-Hexandiol	19,24 mg/ml	gut lösliches Pulver
2	Dextrose	$4,22 \cdot 10^{-3}$ g/ml	gut lösliches Pulver
3	Polyethylenglycol-b-Polypropylenglycol-b-Polyethylenglycol	$4,7 \cdot 10^{-3}$ g/ml	schlecht lösliches, körniges Pulver
4	1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]-undec-7-en	0,47 mg/ml	zähflüssige Substanz
5	Triethanolamin	5,2 µl/ml	zähflüssige Substanz
6	6-Hydroxyhexansäure	98 mg/ml	schwer lösliche Substanz

### 1.3 Arbeitshypothese und Aufgabenstellung

Die Substanzen 1,6-Hexandiol, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und 6-Hydroxyhexansäure sollen als Bestandteil eines geplanten Polymers Verwendung finden, das mit Hilfe des Tissue Engineerings als Zellträger für Transplantate zur autogenen Rekonstruktion chondralen Gewebes dient.

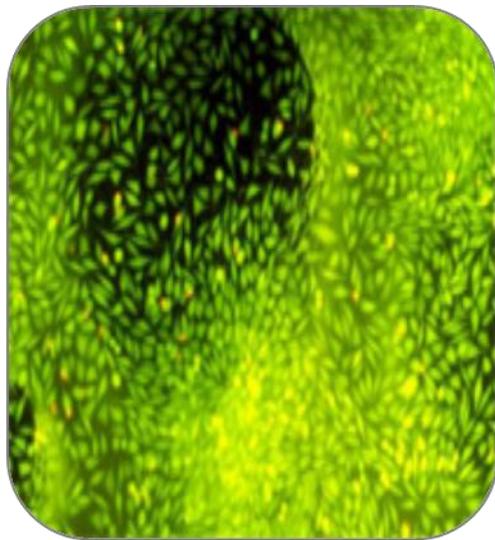


Abb. 1-8

Vitalfärbung (FDA + PI) einer angesiedelten Chondrozytenpopulation auf einem porösen Zellträgers mit L-929 (100fache Vergrößerung)

Weder das ursprüngliche Polymer, noch seine Abbauprodukte dürfen dabei mutagene oder zelltötende Auswirkungen haben. Die Untersuchung der Einzelsubstanzen *in vitro* auf Zytotoxizität und Genotoxizität an humanen Chondrozyten und Lymphozyten sollte die Definition von Schwellenkonzentrationen für die toxikologische Unbedenklichkeit im untersuchten Testsystem ermöglichen. Die Lymphozyten stehen als Zellen der Immunabwehr nach der Transplantation in direktem Kontakt mit dem Zellträger, die Chondrozyten dienen dem Aufbau des Transplantats sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Über Dosis-Wirkungsbeziehungen waren diejenigen Konzentrationen der Matrixbildner zu bestimmen, die keine Zellschäden provozieren und damit als Schwellenkonzentrationen zur Fabrikation in Frage kommen. In der folgenden Abb. 1-9 ist der Versuchsablauf zur Findung der entsprechenden Konzentrationen beschrieben.

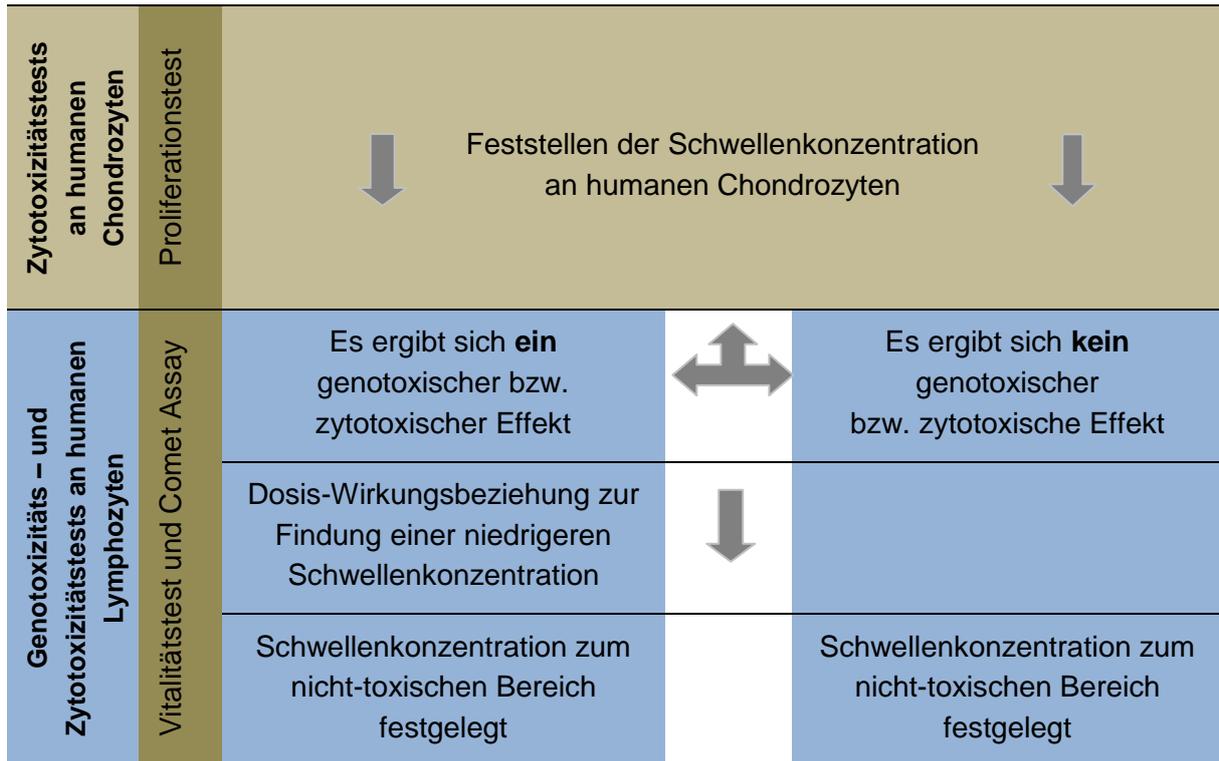


Abb. 1-9

Schematische Darstellung der Versuchsplanung zur Definition einer Schwellenkonzentration der Substanzen

## Kapitel 2 Material und Methodik

### 2.1 Verwendete Gewebe und Zellen

Alle verwendeten Proben wurden im Rahmen operativer Eingriffe im Bereich der Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde entnommen. Die Spender waren dabei keinem zusätzlichen Risiko ausgesetzt. Das Patientengut entstammte der HNO-Klinik und Poliklinik der Universität Regensburg. Es wurden ausschließlich Gewebe- und Blutproben von Patienten ab dem 18. Lebensjahr verwendet. Darüber hinaus wurden die Patienten über die wissenschaftliche Verwendung zur toxikologischen Untersuchung der Proben aufgeklärt und auf die Probenentnahme hingewiesen. Dieses wurde durch eine schriftliche Einverständniserklärung dokumentiert. Dafür wurde ein von der Ethikkommission der Medizinischen Fakultät empfohlener Aufklärungsbogen verwendet (Ethikkommission der Medizinischen Fakultät der Universität Regensburg, Projekt Nr. 03/100/2003). Die Knorpelproben wurden aus Knorpelresten gewonnen, die z.B. bei Operationen der Nase anfielen und durch die Methodik des Tissue Engineering isoliert und generiert wurden. Es wurde ausschließlich hyaliner Knorpel der Nase oder der Rippenbögen verwendet. Bei den Proben handelte es sich um aus medizinischer Sicht nicht mehr zu verwendenden Knorpelabfall und die Entnahme stellte für den Patient kein zusätzliches Trauma dar. Die Isolierung der Lymphozyten erfolgte aus heparinisiertem Vollblut. Dafür wurde den Spendern im Laufe der Operationen über einen schon vorhandenen Venenverweilkatheter 20 ml peripheres Blut abgenommen.

### 2.2 Verwendete Labormaterialien und Geräte

Chemikalien	Hersteller
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz, (NA <sub>2</sub> EDTA)	Serva Elektrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
EZ4U (Tetrazolium-Verbindung); ELISA-Proliferationskit	Biomedica Medizinprodukte GmbH & Co KG, Wien, Österreich
Fluoresceindiacetat (25 mg/ml in Aceton)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Low-Melting-Agarose (Sea-Plaque <sup>®</sup> GTG <sup>®</sup> Agarose)	Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, USA
MNNG (N-Methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin, C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O)	Fluka, St. Gallen, Schweiz
Natriumchlorid (NaCl)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH, wasserfrei)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Normal-Melting-Agarose, (Seakem <sup>®</sup> LE Agarose)	Cambrex Bio Science Rockland Inc., Rockland, USA
Propidiumiodid (1 mg /ml destilliertes Wasser)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trishydroxymethylaminomethan (Tris)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Triton - X 100 (t-Octylphenoxypolyethoxyethanol)	Sigma, Steinheim, Deutschland
Trypan Blue Stain	Gibco, Auckland, Neuseeland

Medien	Hersteller
Aqua bidest.	Eigenherstellung
Biocoll Separating Solution (Density 1.077)	Biochrom AG, Heidelberg, Deutschland
DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
DMEM HAM'S F12 (mit L-alanyl-l-glutamin)	Biochrom AG, Heidelberg, Deutschland
DMEM HAM'S F12, (mit Natriumbicarbonat, L-Glutamine)	PAA laboratories GmbH, Pasching, Österreich
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein, Deutschland
Gentamycin	Sigma, Steinheim, Deutschland
HEPES, N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure	Gibco Lifetechnologies, Eggenstein, Deutschland
Non-Essential-Amino-Acids	Biochrom AG, Heidelberg, Deutschland
Penicillin-Streptomycin (PS)	Biochrom AG, Heidelberg, Deutschland
Phosphate buffered saline, (PBS, ohne Kalzium, Magnesium und Natriumbikarbonat)	PAA laboratories GmbH, Pasching, Österreich
RPMI-Medium (Rosewell Park Memorial Institute)	Biochrom AG, Heidelberg, Deutschland

Enzyme	Hersteller
Collagenase II (Kollagenase P aus Clostridium histolyticum)	Gibco, Auckland, Neuseeland
Insulin, human, rekombinant	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
Trypsin in PBS (0,02%) w/o Ca <sup>2+</sup> + Mg <sup>2+</sup>	Biochrom AG, Heidelberg, Deutschland
Trypsin/EDTA Solution (0,05%)	Biochrom AG, Heidelberg, Deutschland

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Deckgläser zum Mikroskopieren, (76 x 26 mm, Glasdicke 0,08-0,12 mm)	Langenbrick, Emmendingen, Deutschland
Einmalspritzen (5 ml, 10 ml)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg, Deutschland
Einwegfiltereinheiten Millex-GV und Millex-GS (steril, Porenweite 0,22µm)	Millipore, Eschborn, Deutschland
Falcon-Röhrchen mit Schraubdeckel (13/15/50 ml)	Greiner BIO-ONE, Frickenhausen, Deutschland
Kryoröhrchen, Rundbodenröhrchen (2 ml)	Nalgene Company, Rochester, USA
Kulturplatten (24- u. 96-Wells)	BD Falcon, Heidelberg, Deutschland
Objektträger (70 x 24 mm, seitlich mattiert)	R. Langenbrick, Emmendingen, Deutschland
Objektträgerkasten für 50 OT's (76 x 26 cm)	GLW, Würzburg, Deutschland
Petrischale	Becton Dickinson, Heidelberg
Pinzette steril	Angiokard Medizintechnik GmbH & CO. KG, Friedenburg, Deutschland
Pipetten steril (2/5/10/25 ml)	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland

Pipettenspitzen (2,5/10/100µl/200/1000 µl)	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Reaktionsgefäß (Schottflaschen)	VVRbrand, Merck KG, Darmstadt, Deutschland
Röhrchen mit Schraubverschluss (15 ml, 50 ml)	Greiner BIO-ONE, Frickenhausen, Deutschland
Schreibdiamant	Carl Roth GmbH & CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Skalpell Nr. 10, steril	PfM (Produkte für Medizin AG) Köln, Deutschland
Stericup, steril	Millipore Cooperation, Bedford, Großbritannien
Zellkulturflaschen	Sarstedt, Newton, USA
Zellschaber, TPP Produktnr. 99002	TPP Produkt, Trasadingen, Schweiz
Zellsieb (Talcen 35)	Becton Dickinson Labware, Heidelberg, Deutschland
Technische Geräte	Hersteller
Analysenwaage (Explorer+Mettler PM 5417 R)	Ohaus, Gießen, Deutschland
Brutschrank, CO2 , Hera Cell Fabric Nr: 40184114	Heraeus, Hanau, Deutschland
Digitale Auswertesystem Komet 4.0	Kinetik Imagine, Liverpool, Großbritannien
Digitale Camera PowerShot G3	Canon Europa, Amsterdam, Holland
Durchlichtmikroskop	Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Eismaschine Ziegla	Ziegla, Isauhagen, Deutschland
Elektrophoresekammer, horizontal (23,7 cm x 18,0 cm)	Renner, Dannstadt, Deutschland
Elektrophoresengerät, Consort E 865/E 835	Renner, Dannstadt, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop DM LB Lichtquellen: Hg Gasentladungslampe 100W Halogenlampe 12V, 100W 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 Mikrosysteme, Bensheim, Deutschland
Gefrierschrank (-20 °C)	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Gefriertruhe (-80 °C)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Hochleistungs-Monochrom-CCD-Kamera Cohu 4912 (0,02 Lux ½ Sensor)	Cohu, San Diego, USA
Inverses Labormikroskop (Axioverte 25 CFI) Lichtquellen: Halogenlampe 6 V/25 W Quecksilberdampf Lampe HBO 50 W 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/0,5	Carl Zeiss Mikroskop, Jena, Deutschland

Kühlschrank (+5 °C)	Bosch, Stuttgart, Deutschland
Microsoft Office Professional 2003 und Home 2007	Microsoft, Unterschleißheim, Deutschland
Mikrowelle, R 210A	Sharp, Mahwah, USA
Neutralisationswanne	Assistano, Sondheim, Deutschland
pH-Meter 760, Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Photometer, EMax <sup>®</sup> Microplate Reader	Molecular Devices Corporation, Sunnyvale, USA
Pipetten (10 ml)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Pipetus <sup>®</sup> -akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Deutschland
Rührmagnettisch, RCTbasic, Combimag RCT	IKA Werke, Staufen, Deutschland
Schüttelplatte, Swip SM 25	Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland
Schüttelwasserbad, GFL-1083	GFL, Burgwedel, Deutschland
Schüttler Vortex Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
SPSS <sup>™</sup> 11.5	SPSS Software, München, Deutschland
Sterilbank, Herasafe (Lamina-Flow-Einheit)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Vorschaltgerät für Quecksilberdampf Lampe HBO 50W IAC, Kurzbogenlampe mbq 50 ac-Serie	Leistungselektronik Jena GmbH LEJ, Jena, Deutschland
Zählkammer Super Rior nach Neubauer (0,0025 mm <sup>2</sup> )	Paul Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zentrifuge Varifuge 3.0RS und R	Heraeus, Hanau, Deutschland

### 2.3 Zusammensetzung der Lösungen

#### 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.

#### 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

#### Elektrophoresepuffer

24 g NaOH (300 mM) und 0,744 g Na<sub>2</sub>EDTA (1 mM) kurz vor der Elektrophorese in 2 l Aqua bidest. lösen.

#### Lysestammlösung

146,4 g NaCl (25 mM)

1,2 g Tris (10 mM)

37,2 g Na<sub>2</sub>EDTA (100 mM)

10 g (1%) *N*-Lauroylsarcosin Natrium Salz

Bestandteile separat ansetzen und erst nach vollständiger Auflösung in 1 l Aqua bidest. mischen. pH-Wert mit NaOH-Tropfen auf 8,5 einstellen und danach mit (1 M) NaOH auf pH 10 justieren.

### Lysepuffer

1% Triton  
10% DMSO  
89% Lysestammlösung  
mischen und im Kühlschrank (4 °C) aufbewahren.

### Neutralisationspuffer (400mM)

48,5 g Tris 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

### Knorpelmedium

50 ml DMEM HAM'S F12  
50 ml Fetales Kälberserum (FCS)  
5 ml Penicillin Streptomycin (PS)  
3 ml Non-Essential-Amino-Acids (NAA)  
2,5 ml Insulin  
3 ml Gentamycin

### Trypanblau

0,5 g Trypanblau in  
100 ml Aqua bidest. lösen,  
zur Sterilisation aufkochen,  
erkalten lassen und filtrieren

### Kombinationsfärbung aus PI und FDA

PI und FDA eignen sich besonders für die Fluoreszenzfärbung zum Zytotoxizitätsnachweis. Dabei wird jeweils neu zur Färbung eine Mischung aus 1 ml PI und 1 ml FDA hergestellt, die in 60 ml Ringerlösung oder 0,9% NaCl gelöst wird.

---

## 2.4 Herkunft und Charakterisierung der Testsubstanzen

Herkunft der Testsubstanzen

Reinsubstanz	Hersteller
1,6-Hexandiol (Tab. 2-8)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (Tab. 2-9)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
6-Hydroxyhexansäure (Tab. 2-10)	Sigma, Taufkirchen, Deutschland

### 1,6-Hexandiol (HD)

Chemische  
Strukturformel

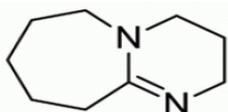


Dichte	0,96 kg/l
Massengewicht MG	118,17 g/mol
Schmelzpunkt	45 °C
Siedepunkt	250 °C
Summenformel	$C_6H_{14}O_2$ ; HO-(CH <sub>2</sub> ) <sub>6</sub> -OH
Synonyme	1,6-Dihydroxyhexane; HDO; Hexamethylenediol; alpha, omega-Hexanediol; Hexamethylene Glycol; omega-Hexanediol

Das 1,6-Hexandiol dient als ein Teil der Diolkomponente des Polyurethans. Damit ergänzt es sich mit der 6-Hydroxyhexansäure. Diol (Dialkohol) steht als Gruppenbezeichnung für aliphatische und alicyclische Verbindungen, die zwei Hydroxygruppen enthalten. Technisch sind die Dirole als Komponenten der Polyurethane, Polyester und als Zwischenprodukt für Pharmaka und Pestizide von erheblicher Bedeutung. 1,6-Hexandiol entspricht dem Hexamethylenglykol. Die Substanz zeigt sich als eine farblose kristalline Struktur. Sie ist löslich in Wasser und in Alkohol. Bei Kontakt mit dem Auge kann sie schleimhautreizend wirken. Zugänglich gemacht wird 1,6-Hexandiol technisch durch die Reduktion von Adipinsäure oder Caprolacton. Verwendet wird es zur Herstellung von 1,6-Hexandiamin, Polyestern und Polyurethanen wie der Matrix für Knorpelbesiedelung im Tissue Engineering. Weiter wird es eingesetzt als Weichmacher, für synthetische Schmiermittel und in der Benzinraffinerie. In der Weiterverarbeitung ist es Ausgangsprodukt für Hexandioldiacrylat, einem flüssigen, süßlich riechenden, hautreizenden Acrylsäureester (C<sub>12</sub>H<sub>18</sub>O<sub>4</sub>).

### 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU)

Chemische  
Strukturformel



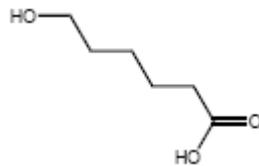
Dichte	1.018 kg/l
IUPAC International Chemical Identifier	InChI=1/C9H16N2/c1-2-5-9-10-6-4-8-11(9)7-3-1/h1-8H2
Massengewicht MG	152.24 g/mol
Siedepunkt	80-83 °C (0,6 mm Hg)
Summenformel	C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub>
Synonyme	DBU, Pyrimido[1,2-a]azepine, 2,3,4,6,7,8,9,10-octahydro-; 1,5-Diazabicyclo[5.4.0]undec-5-en; 1,5-Diaza(5,4,0)undec-5-en; 1,5-Diazabicyclo[5.4.0]-5-undecen; 2,3,4,6,7,8,9,10-Octahydropyrimido(1,2-α)azepine; 2,3,4,6,7,8,9,10-Octahydropyrimido[1,2-a]azepine; Diazabicycloundecen

DBU wird der Klasse der Amidine zugeordnet. Chemische Verwendung findet es als reaktiver Katalysator, als komplexer Ligand und als nicht-nukleophile Base. In dem zu entwickelnden Polyurethan wird es als organische Base verwendet. Durch eine alkalische Substanz werden dabei bestimmte Reaktionen in Bewegung gesetzt. Es gehört in die Gruppe der Isocyanate. Isocyanate sind Salze bzw. Ester der in freiem Zustand mit Cyansäure tautomeren Isocyansäure (HNCO). Obwohl die Schwermetallsalze der Cyansäure vorwiegend in der Isocyanat-Form vorliegen, werden sie trotzdem als Cyanate bezeichnet. Dabei kommt es entweder zu Verbindungen, bei denen die Isocyanat-Gruppe an einen organischen Rest gebunden ist oder es bilden sich polyfunktionale Isocyanate, die mit zwei oder mehr Isocyanat-Gruppen im Molekül verbunden sind. Dies sind wertvolle Bausteine in der Polymer-Synthese, sie besitzen eine große technische Bedeutung. Die große Reaktionsfähigkeit der Isocyanate ist verantwortlich für ihre Giftigkeit und die starke Reizwirkung auf Haut und die Schleimhäute, besonders der Atemwege. Für alle Arbeiten mit ihnen gelten deshalb strenge Sicherheitsbestimmungen. Dennoch ist gerade die Reaktionsfreude der Grund, der die Isocyanate in der organischen Chemie zu einem viel benutzten Zwischenprodukt macht. Sie reagieren leicht mit H<sup>+</sup>-aktiven Verbindungen wie z.B. Alkoholen oder Aminen, wobei Urethane bzw. Harnstoffe entstehen. Mit Wasser erfolgt heftige Reaktion zu Aminen unter CO<sub>2</sub>-Entwicklung. Die Entdeckung von O. Bayer, durch Polyaddition von Diisocyanaten an Diolen und/oder Polyolen Polyurethane (PUR) herstellen zu können, ist heute Grundlage einer bedeutenden Kunststoffindustrie geworden. 1,5-Diazabicyclo[4.3.0]non-5-en (DBN) ist ein Abkömmling des Diazabicycloundecens, welches nach IUPAC-Regeln die Bezeichnung 2,3,4,6,7,8-Hexahydropyrrolo[1,2-a]pyrimidin hat, eine stark basische farblose Flüssigkeit, die bei Dehydrohalogenierungen beispielsweise in der Vitamin-A-Synthese und bei Wittig-Reaktionen sowie bei Eliminierungen Verwendung findet. Das DBU wird in gleicher Weise eingesetzt.

Die 6-Hydroxyhexansäure bildet als Capronsäure den zweiten Teil der Diolkomponente des Polyurethans (siehe 1,6-Hexandiol). Es ist eine ölige, farblose oder schwach gelbliche Flüssigkeit, deren Geruch unangenehm nach Ziege bzw. schweißartig riecht. Die Flüssigkeit ist fast unlöslich in Wasser. Man kann sie in Alkohol und Ether auflösen. Die 6-Hydroxyhexansäure kommt als Glycerinester in geringen Mengen in Kuhbutter, Ziegenbutter und Kokosnussöl vor, entsteht aber auch neben der Buttersäure bei der Vergärung von Ethanol und Acetaten durch das *Clostridium kluyveri*. Bei Termiten spielt die 6-Hydroxyhexansäure die Rolle eines Spurfolge-Pheromons. Man kann sie aus Ölsäure oder aus ungesättigten Fettsäuren des Tallöls durch Ozonolyse bzw. durch Oxidation von Cyclohexanol oder

### 6-(Hydroxy)hexansäure (HA)

Chemische  
Strukturformel



Dichte $\rho$	0,93 kg/l
IUPAC International Chemical Identifier	InChI=1/C6H12O3/c7-5-3-1-2-4-6(8)9/h7H,1-5H2,(H,8,9)
Massengewicht MG	132,16 g/mol
Schmelzpunkt	-3,9°C
Siedepunkt	205°C
Summenformel	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>
Synonyme	6-hydroxyhexanoate, hexanoic acid, 6-hydroxyhexanoic acid

Hexanol herstellen. Verwendung findet sie als Säurekomponente in Fruchtestern (Capronate), als Bestandteil von Arzneimitteln und zur Synthese von Hexylphenolen.

## 2.5 Zellexposition

Die Exposition der Zellen erfolgte durch Zugabe verschiedener Konzentrationen der entsprechenden Testsubstanzen zum Kulturmedium. Dabei wurde die Substanzmenge per Milliliter berechnet. Die Substanzen 1,6-Hexandiol und DBU wurden auf der Analysenwaage abgewogen, während als Flüssigkeit vorliegende 6-Hydroxyhexansäure mit einer Pipette entnommen und dem Medium zugeführt wurde. Nach Exposition sollte sich der pH-Wert des Medium/Substanz-Gemisches zwischen 7.2 und 7.4 befinden. Die erforderliche Gesamtmenge ergab sich aus der Anzahl und dem Volumen der zu exponierenden Wells der Mikrotiterplatten. Die Exposition von Chondrozyten erfolgte protokollgemäß nach 24 h Vorinkubation im Brutschrank. In dieser Zeit sollte sich ein regelrechtes Chondrozytenwachstum in der mikroskopischen Kontrolle darstellen. Danach wurde das Kulturmedium aus den Well abgesaugt und durch das entsprechende Medium mit den Testsubstanzen ersetzt. Um eine spätere Abschätzung der Proliferationsleistung einer Zellkultur zu ermöglichen, wurde die Proliferation nach Exposition im Vergleich zu einer Negativkontrolle ausgewertet. Dafür waren pro 24er Zellkulturplatte 4 Wells nicht zu exponieren. Normalerweise wurden in den verbleibenden 20 Wells 5 Konzentrationen in jeweils 4 Wells getestet (siehe auch 2.6.3). Dabei war es entweder möglich die Dosis-Wirkungsbeziehungen einer Fremdschubstanz zu untersuchen oder eine bestimmte Konzentration als zytotoxisch

bzw. nicht-zytotoxisch zu verifizieren, indem man einerseits die Vitalität der Chondrozyten nach Inkubation beurteilen, andererseits aber auch eine eventuelle Proliferationshemmung quantifizieren konnte.

### 2.6 Methoden der Untersuchungen zur Zytotoxizität

Die wissenschaftlichen Untersuchungen zur Zytotoxizität wurden unter der Anleitung von Frau Dr. rer.nat. M.M. Wenzel (Arbeitsgruppe PD Dr. med. R. Staudenmaier) durchgeführt.

#### 2.6.1 Gewinnung von Chondrozyten

Zur Gewinnung einzelner Chondrozyten ist ein enzymatischer Verdauungsprozess von chondralen Gewebestücken nötig. Zunächst wurden die Knorpelbiopsien in ein mit Knorpelmedium gefüllt 50 ml Falconröhrchen zur Aufrechterhaltung der vitalen Knorpelstrukturen gegeben. Unter der Sterilbank wurde nach Abgießen des Mediums das Probenmaterial in einer Petrischale in chondrale, ossäre und bindegewebige Bestandteile getrennt. Dies erfolgte mit steriler Pinzette und Skalpell. Danach zerteilte man die Proben in 1 mm<sup>3</sup> große Stückchen. Die so präparierten Knorpelteile wurden gewogen und in Zellkulturflaschen gegeben. Aus dem Gewicht des Knorpels errechnete man die zum Knorpelverdau nötige Menge an Kollagenase II. Für ein Gramm Knorpelprobe wird 10 ml der Protease benötigt. Nach maximal 16 h bei 37 °C auf der Schüttelplatte löste die Kollagenase die extrazelluläre Matrix des Knorpels auf. Dieser Schritt wird als Knorpelverdau bezeichnet. Nach Ablauf der 16 Stunden wurde die Flüssigkeit mit einer sterilen Pipette aufgesaugt und durch ein Zellsieb filtriert. Dabei wurden die nun gelösten Chondrozyten von den noch unverdauten Knorpelstückchen getrennt. Es folgte eine Zentrifugation der Chondrozytensuspension für fünf Minuten bei 1500 rpm um die Chondrozyten zu pelletieren. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 20 ml Knorpelmedium aufgenommen. So erhielt man eine Zellsuspension, die auf Zellkulturflaschen verteilt bei 37 °C/5% CO<sub>2</sub> bebrütet werden konnte. Je nach Knorpelbeschaffenheit kolonisierten die Zellen den Boden der Zellkulturflaschen unterschiedlich schnell und bildeten einen adhärenenten Zellteppich.

#### 2.6.2 Passagieren der Chondrozyten

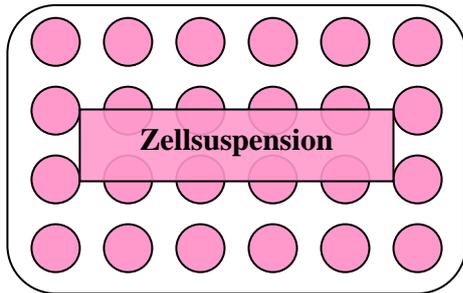
Passagieren von Chondrozyten beschreibt die Generation einer Zellkultur. Dabei bildete die nach dem Verdau der Knorpelstückchen neu in Zellkulturflaschen angesetzte Knorpelgeneration die Zellkolonie der erster Passage. Verteilte man nun nach einer Proliferationsperiode diese Zellen auf neue Flaschen, erhielt man nach einer weiteren Wachstumsphase die Zellen zweiter Passage. Theoretisch war dieser Vorgang beliebig fortsetzbar. Im folgenden Text werden die Möglichkeiten der Passagierung und die Versorgung der einzelnen Zelllinien beschrieben. Eine Voraussetzung für das Passagieren einer Zellgeneration ist die Proliferation der Zellen in dem Nährmedium. Durch die Proliferation ist es möglich, einerseits Zellen zur Verwendung zu entnehmen und gleichzeitig einen Anteil davon neu zu passagieren. Damit gelingt es aus einer kleinen Knorpelprobe viele Passagen zu generieren. Dieser Vorgang wurde auf Grund der experimentellen Vergleichbarkeit maximal 8-mal durchgeführt [Reichl, 2000]. Dadurch entsteht die Möglichkeit mehrmals mit der gleichen Zelllinie wissenschaftliche Untersuchungen durchzuführen. Als Maß für die Beurteilung des Vorganges der Proliferationsperiode galt die Semikonfluenz des Zellbodens. Dies wurde unter dem inversen Mikroskop überprüft. Die Zellen sollten ausbreitend proliferieren und morphologisch regelrecht erscheinen. Zusätzlich konnte durch die mikroskopische Begutachtung der Zellkulturflaschen eine pathogene mikrobielle Co-Kolonisation frühzeitig erkannt werden. Einen ersten Hinweis dafür gab die makroskopische Morphologie des Zellnährmediums, da bei optimalen Wachstumsbedingungen im Brutschrank eine exponentielle Vermehrung der Mikroben zu einem wesentlich schnelleren Verbrauch der angebotenen Nährstoffe führte. Dadurch kommt es innerhalb kürzester Zeit zu einer pH-Absenkung im Kulturmedium als Zeichen eines Nährstoffmangels, bzw. einer Übersäuerung durch überwiegend saure Stoffwechselendprodukte der Zellen und Mikroben. Neben dem pH-Umschlag ins Saure kam es darüber hinaus zu einem

Farbumschlag des Mediums in das Gelbliche. Standardisiert wurde das Medium alle drei Tage und bei Bedarf gewechselt. Dazu wurde das verbrauchte Medium mit der Pipette abgesaugt und durch frisches Medium ersetzt. Es wurde immer ein Nährmedium gleicher Konsistenz verwendet. Bei Bedarf konnte mit dosierter Zugabe von antimikrobiellen Substanzen (Gentamycin/Penicillin/Streptomycin) einer bakteriellen Infektion begegnet werden. Der Vorgang des Passagierens wurde nach der beschriebenen Beurteilung der Wachstumsperiode durchgeführt. Zur Lösung des Zellteppichs vom Kulturplattenboden unterscheidet man eine mechanische von einer enzymatischen Methode. Bei der mechanischen Ablösung wurde nach dem Abpipettieren des Nährmediums der Zellteppich abgeschabt und Kulturgefäße mit 60 ml Knorpelmedium durchgespült. Das Medium/Zell-Gemisch wurde anschließend mit der Pipette aufgenommen und zur Zellvereinzelung durch ein Zellsieb gefiltert. Die Vereinzelung der Zellen ist nötig, weil chondrale Zellen bevorzugt in Gruppierungen proliferieren (so genannte Zellcluster). Für den Zweck der wissenschaftlichen Untersuchung sind diese jedoch im Vergleich zu der vereinzelter Proliferation im Sinne eines gleichmäßigen Zellteppichs unerwünscht, da die mikroskopisch-morphologische Begutachtung der einzelnen Zelle erschwert wird. Die enzymatische Ablösung des Zellrasens ist in zweierlei Hinsicht limitiert. Einerseits sollte der Zellteppich nicht allzu dicht gewachsen sein, da anderenfalls die Enzymlösung, Trypsin/EDTA, die Zellen nicht gut umspülen und deswegen auch die Adhäsionen nicht zu lösen vermag. Andererseits ist auch die Konzentration und Einwirkungsdauer des Enzyms begrenzt, damit die Zellen nicht geschädigt werden. Nach Abpipettieren des Knorpelmediums wurden die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurde unter der Sterilbank die Trypsinlösung (37 °C) auf die Zellen gegeben, wobei auf die genaue Temperierung geachtet werden musste, da die Enzymaktivität temperaturabhängig ist. Pro Zellkulturflasche verwendete man 5 ml Trypsin/EDTA 0,05%. Je nach Zellwachstumstyp und Alter der Zellgeneration konnte man eine unterschiedliche Latenz der Enzymwirkung des Trypsins auf den Zellteppich beobachten. In der Regel handelte es sich jedoch nur um wenige Sekunden. Deswegen war es nötig das Resultat der Enzymaktivität unter dem Lichtmikroskop zu überwachen. Die Wirkung zeigte sich am langsamen Aufreißen kleiner Löcher im Zellteppich und damit der Vereinzelung der Chondrozyten. An diesem Punkt wurde die Trypsinlösung abgegossen, da nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein längeres Einwirken der Protease auch die Chondrozytenqualität und -vitalität beeinträchtigt. Weiter sollte verhindert werden, dass man die sich nun bald lose in Flüssigkeit befindenden Chondrozyten mit der Trypsinlösung abgießen würde. Durch die Zugabe von Knorpelmedium beendete man endgültig auch die Resttrypsinwirkung. Danach löste man die angelockerten Zellen mechanisch durch leichte Schläge der Flasche auf die Handinnenseite und führte eine erneute mikroskopische Kontrolle durch. Die Trypsinierung fand vor allem für den Proliferationstest Verwendung, da dadurch eine bessere Vereinzelung der Zellen im Vergleich zu der mechanischen Vereinzelung gewährleistet war. Unabhängig von der angewandten Methode wurde nach Lösung vom Kulturflaschenboden für das Passagieren der Chondrozyten die Menge zuzugebenden Kulturmediums so berechnet, dass man je 20 ml des neuen Medium/ Zell-Gemisches auf drei weitere Kulturflaschen verteilen konnte. Dazu wurden die nun freien Chondrozyten mit frischem Knorpelmedium durchgespült und das Medium/Zell-Gemisch anschließend mit der Pipette aufgenommen. Dies wurde unter der Sterilbank durchgeführt. Schließlich wurde die neu passagierte Generation in den Brutschrank (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>) gegeben.

### 2.6.3 Vitalitätstest mit Propidiumiodid und Fluoresceindiacetat

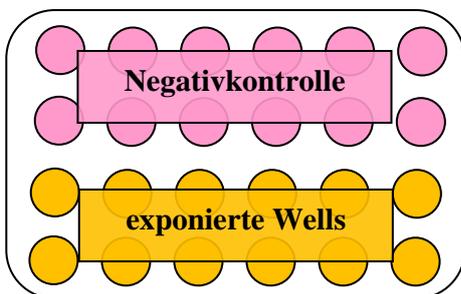
Anhand einer qualitativen, semi-quantitativen Vitalfärbung mit Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) wurde die Vitalität und Proliferationsdichte der Chondrozyten unter Einfluss eines Fremdstoffes untersucht. Dazu wurden die Chondrozyten aus den Kulturflaschen entsprechend der Knorpelpassagierung auf Zellkulturplatten mit 24 oder 96 Wells umgesetzt. Man unterscheidet wie

## 1. Versuchstag Ansatz



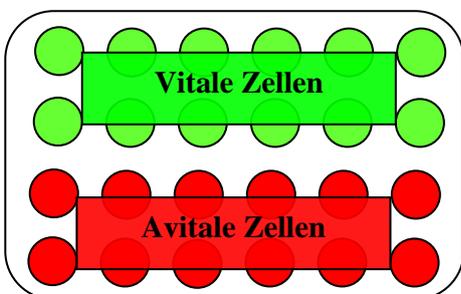
- I. Ansatz der mit Kulturmedium (DMEM HAM's F12) vermischten Zellsuspension auf einer 24-Well-Kulturplatte
- II. Kultivierung für 24 Stunden im Brutschrank (37 °C/5% CO<sub>2</sub>) zur Proliferation

## 2. Versuchstag Exposition



- I. Abpipettieren des Kulturmediums von Tag 1
- II. Erneuern der Wells zur Negativkontrolle mit unexponierten Kulturmedium
- III. Exposition der Wells der einen Hälfte mit einer entsprechenden Substanzkonzentration
- IV. Erneute Kultivierung im Brutschrank für 24h

## 3. Versuchstag Auswertung



- I. Färbung mit PI und FDA und Kontrolle unter dem Fluoreszenzmikroskop
- II. Negativkontrolle: dicht gewachsener vitaler (grüner) Zellteppich.
- III. Exponierte Wells: beispielhaft avitale (rotfluoreszierende) Zellreste
- IV. Fotografische Katalogisierung.

**Abb. 2-1** Darstellung des Ablaufes einer Vitalfärbung mittels PI und FDA

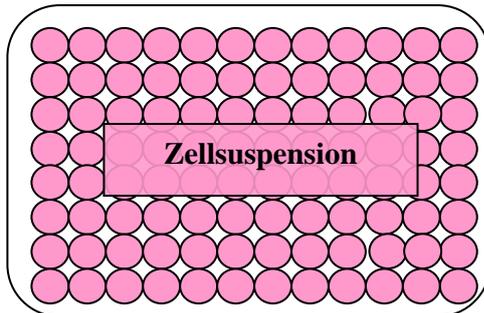
beschrieben den mechanischen und den enzymatischen Ansatz. Für die Vitalitätstests wurden die Zellen in erster Linie mechanisch aus den Kulturflaschen isoliert. Grundsätzlich wurden je Experiment nur Zellen einer Passage einer Zellkulturflasche verwendet. Damit ist zwar die Vergleichbarkeit der Ergebnisse innerhalb eines Versuchsansatzes gegeben, nicht aber die Möglichkeit unterschiedliche zellbezogene Ergebnisse gegeneinander zu interpretieren. Nach der Resuspension der abgelösten Chondrozyten in Kulturmedium wurde zur Bestimmung der Zellzahl ein Trypanblautest durchgeführt. Durch Ermittlung der Zellzahl konnte das notwendige Volumen zum Befüllen aller Wells einer 24er Kulturplatte mit je 1 ml Zellsuspension pro Well berechnet werden, das eine konstante Verteilung von 15.000 Zellen pro Well garantierte. Für den Trypanblautest wurden gleiche Volumina der Zellsuspension und der Trypanblaulösung, jeweils 40 µl, vermischt und anschließend in eine Zählkammer pipettiert. Unter dem Mikroskop (Axiovert 25) wurde das Verhältnis vitaler zu avitalen Chondrozyten erfasst. Avitale Zellen stellen sich blau, vitale Chondrozyten auf Grund ihrer intakten Permeabilitäts-

Barrierefunktion der Zellmembranen durchsichtig weißlich dar. Den prozentualen Anteil vitaler Zellen erhält man durch Division des Produkts aus der Zahl der ungefärbten Zellen (vitale Chondrozyten) und 100 durch die Gesamtzahl der Zellen. Durch den Trypanblautest konnten neben der Bestimmung der Quantität und Vitalität der Zellen auch Aussagen über die mikroskopische Qualität anhand der Morphologie getroffen werden. Das Medium wurde je nach vorhandener Zellzahl verdünnt und anschließend mit einer Multipipette auf die 24 Wells einer Kulturplatte verteilt. Durch dieses standardisierte Verfahren konnten vergleichbare Ergebnisse hinsichtlich der Proliferationsneigung erzielt werden. Die neu angesetzte Zellkulturplatte wurde für eine erneute Wachstumsphase in den Brutschrank (37 °C/5% CO<sub>2</sub>) gegeben. Nach 24 Stunden konnten die Chondrozyten für eine Versuchsreihe verwendet werden. Dafür mussten im Vorfeld für die zu untersuchenden Reinsubstanzen Konzentrationen zur Exposition der Zellpopulation berechnet werden. Die 4 Negativkontrollen pro Zellkulturplatte erhielten frisches Knorpelmedium ohne Zusatz. Die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgte für weitere 24 Stunden bei 37 °C/5% CO<sub>2</sub> im Brutschrank. Danach wurde die Inkubation durch Entnahme des Mediums mit der Pipette beendet und die frisch vorbereitete Färbelösung aus PI und FDA zugegeben. PI hat ein Anregungsmaximum  $\lambda = 536$  nm bei einem Emissionsmaximum  $\lambda = 650$  nm. FDA ein Anregungsmaximum  $\lambda = 488$  nm bei einem Emissionsmaximum  $\lambda = 518$  nm. Die mikroskopische Auswertung erfolgte mit einem inversen Mikroskop (Axioverte 25 CFI). Durch den Einsatz von Filtern zur Grünanregung (546/12 nm) und einem Ausgangssperrfilter bei 590 nm und zur Blauanregung (450-490 nm) und einem Ausgangssperrfilter bei 515 nm war es möglich bei einer 50- bis 200-fachen Vergrößerung vitale und avitale Zellen deutlicher hinsichtlich ihrer Morphologie und Konsistenz zu inspizieren und damit subjektive deskriptive Aussagen über die Zellmorphologie, die Dichte und die Vitalitätsrate zu treffen. Der Blaufilter filtert dabei die Rotanteile des Kunstlichtes heraus. Rote Fluoreszenz entsteht durch das Eindringen von PI in die DNA avitaler Zellen. Dagegen zeigt FDA nach Umsatz von Esterasen in der vitalen Membran grüne Fluoreszenz. Damit eignet sich der Blaufilter zur Begutachtung von vitalen Zellen. Der Grünfilter stärkt in erster Linie den Kontrast der Zellstrukturen. Dies dient der Ansicht der meist stark geschädigten avitalen (rot fluoreszierenden) Zellen. Darüber hinaus kann bei starker Vergrößerung die Neigung leicht geschädigter Zellen zur Ausbildung von Vakuolen im Zytoplasma dargestellt werden. Dies eröffnet eine dritte Dimension der Beurteilung zwischen vital und avital, nämlich der Gruppe der noch vitalen aber schon geschädigten Chondrozyten. Nach einer halben Minute Inkubation mit diesen Farbstoffen wurde die Färbelösung mit einer Ballonpipette entfernt. Anschließend konnten die Wells nach dem eben beschriebenen Muster inspiziert werden. Wenn also in der Beurteilung der einzelnen Wells neben einem Proliferationsunterschied, der anhand der Anzahl gewachsenen Zellen im Vergleich zur Negativkontrolle ersichtlich wurde, sich auch ein veränderter Vitalitätsstatus ergab, d.h. das Verhältnis roter/avitaler zu grünen/ vitalen Zellen unterschiedlich zur Negativkontrolle war, wurde von einer Hemmung des Zellwachstums durch die Substanz in der jeweiligen Konzentration und von einer zytotoxischen Wirkung auf die Zellen selbst ausgegangen. So war es möglich, optische Dichteunterschiede und zytotoxische Auswirkungen einer Medium/Substanz-Konzentration zuzuordnen. In der Abb. 2-2 soll das Vorgehen der Versuchsdurchführung nochmals in einer Übersicht dargestellt werden. Über eine mit dem Mikroskop verbundene Digitalkamera wurden repräsentative Ausschnitte aufgenommen und gespeichert.

### 2.6.4 Proliferationstest mit Tetrazoliumsalzen

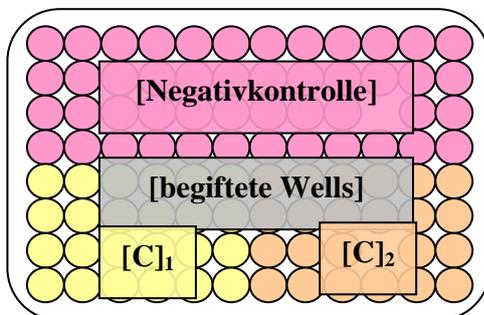
Um neben dem semiquantitativen und qualitativen Test mittels der Vitalfärbung auch einen objektivierbaren quantitativen Nachweis der Chondrozytenproliferation zu erhalten, wurde zusätzlich ein kommerzielles Testverfahren, Easy-For-You, verwendet, das die Proliferationsleistung einer vitalen Zellpopulation auf Grund ihrer metabolischen Umwandlung schwach gefärbter Tetrazoliumsalze in

## 1. Versuchstag Ansatz



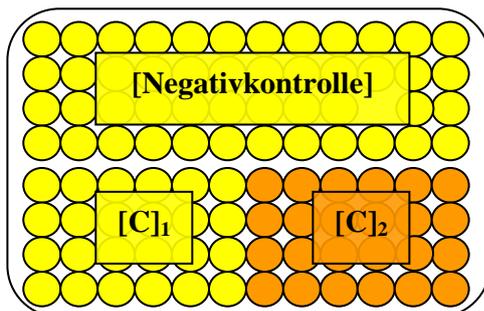
- I. Ansatz der mit Kulturmedium (DMEM HAM's F12) vermischten Zellsuspension auf einer 96-Well-Kulturplatte
- II. Kultivierung für 24 Stunden im Brutschrank (37°C/5%CO<sub>2</sub>) zur Proliferation

## 2. Versuchstag Exposition



- I. Abpipettieren des Kulturmediums von Tag 1
- II. Erneuern der Wells zur Negativkontrolle mit unexponiertem Kulturmedium
- III. Beispielhafte Exposition der Wells der einen Hälfte mit einer Substanzkonzentration [C]<sub>1</sub>, der anderen Hälfte mit einer Konzentration [C]<sub>2</sub>
- IV. Erneute Kultivierung im Brutschrank für 24h

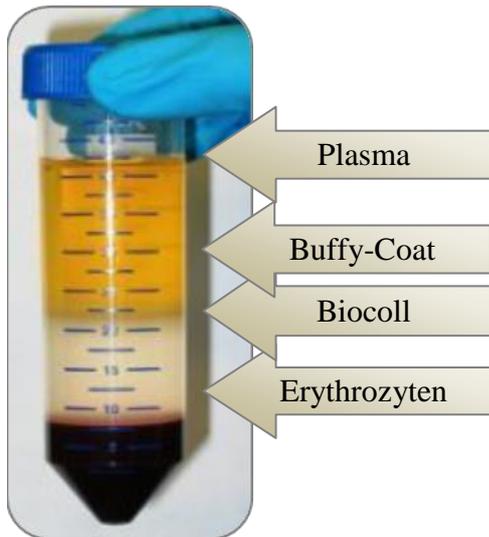
## 3. Versuchstag Auswertung



- I. Zugabe des EZ4U-Kits und erneute Kultivierung für 3 Stunden (37° C/5%CO<sub>2</sub>)
- II. Negativkontrolle: hohe Extinktionswerte durch den hohen Anteil an Formazanderivaten in den vitalen Zellen
- III. Exponierte Wells:  
[C]<sub>1</sub>: Extinktion entspricht Negativkontrolle  
[C]<sub>2</sub>: Verminderte Extinktionswerte sprechen für verminderte Zellproliferation nach Fremdsbstanzinkubation

**Abb. 2-2** Darstellung des Ablaufes des Proliferationstests

intensiv gefärbte Formazanderivate errechnet. Damit entspricht das Verfahren einem Viabilitätstest, da über die Beurteilung der Lebensfähigkeit eine Abstufung der Vitalitätsrate erzielt wird. Schon 1956 wurde über die Verwendung von Tetrazoliumsalzen als Indikator der Zellvitalität berichtet [Hansen et al., 1989, Mosmann, 1983] und dieser Test in der Folgezeit immer weiter entwickelt [Carmichael et al., 1987, Mosmann, 1983, Scholz et al., 1991]. Die Farbveränderungen werden durch ein Photometer erfasst. Wie schon für den Vitalitätstest beschrieben, basiert auch dieses Testverfahren auf der



**Abb. 2-3**  
Vollblut zur Gewinnung von humanen Lymphozyten nach Dichtegradientenzentrifugation.

Grundlage der Proliferation vereinzelter Chondrozyten. Um eine ausreichende Vereinzelung der Zellen zu erreichen, wurden hier jedoch die Zellen enzymatisch (Trypsin) von der Kulturflasche gelöst und in die Wells umgesetzt. Die Vereinzelung ist für diese Art der Proliferationstestung essentiell. Nach der Trypsinierung wurde ein Trypanblautest zur Zellzahlbestimmung durchgeführt. Für die Durchführung des Proliferationstests wurden die 96 Wells der Kulturplatten mit 100  $\mu$ l Zellsuspension mit jeweils 4000 Zellen gefüllt, und anschließend in einem Kulturschrank bei 37 °C/5% CO<sub>2</sub> für 24 Stunden kultiviert. Nach dieser ersten Wachstumsperiode wurde die Proliferation der Zellen unter dem Lichtmikroskop bei Phasenkontrast auf konfluentes Wachstum hin überprüft. Daraufhin wurde das Kulturmedium abpipettiert und durch ein Medium ersetzt, das entweder die Prüfsubstanzen in einer bestimmten zu untersuchenden Konzentration oder Medium ohne weitere Prüfsubstanzen als Negativkontrolle enthält. In der Regel wurde die Platte in 8 bis 16 Wells pro Konzentration

aufgeteilt. Nach Ablauf von 24 Stunden bei 37 °C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Kulturmedium entfernt, 20  $\mu$ l/Well des Easy-For-You-KITs zugesetzt und für weitere drei Stunden im Brutschrank (37 °C/5% CO<sub>2</sub>) inkubiert. Die enthaltenen Tetrazoliumsalze werden nur von Mitochondrien lebender Chondrozyten zu Formazanderivaten verarbeitet, da avitale Zellen schon früh ihre Mitochondrientätigkeit verlieren. Das spezifische Extinktionsmaximum der Formazanderivaten bei 450 nm ermöglicht den photometrischen Nachweis im Mikroplattenleser. Von dem Messwert wurde der Blindwert (Substrat ohne Zellen) subtrahiert. Ein zweiter Referenzwert wurde bei 620 nm bestimmt. Damit konnten Confounder wie Dichtestörungen der Zellkulturplatten ausgeschlossen werden. Aus diesen Daten errechnet der angeschlossene Computer die Proliferationsrate der Zellkultur. Dabei korreliert die Zelldichte als Maß des Wachstums und die Anzahl der vitalen Zellen mit der Extinktion. Gleichzeitig stehen verringerte Extinktionswerte für eine stärkere Schädigung der Chondrozyten durch die Testsubstanz.

### 2.7 Methoden der Untersuchungen zur Genotoxizität

Die wissenschaftlichen Untersuchungen zur Genotoxizität wurden unter der Anleitung von Frau Dr. Andrea Sassen (Arbeitsgruppe Prof. Dr. N. Kleinsasser) durchgeführt.

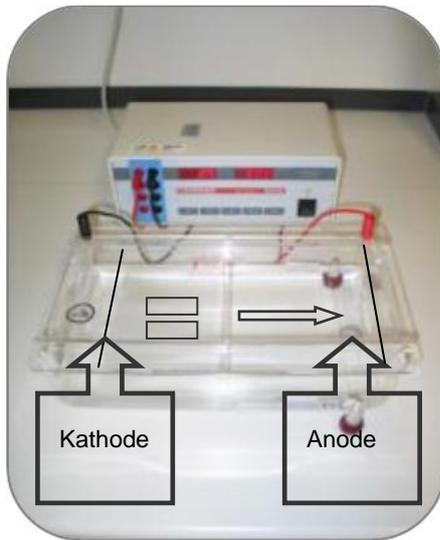
#### 2.7.1 Gewinnung und Isolation humaner Lymphozyten

Neben den unter Abschnitt 2.6 beschriebenen Zytotoxizitätsuntersuchungen an humanen Chondrozyten wurden in der vorliegenden Arbeit auch Untersuchungen zur Zytotoxizität und Genotoxizität von 1,6-Hexandiol, DBU und 6-Hydroxyhexansäure an humanen Lymphozyten durchgeführt. Das Vollblut (siehe Abschnitt 2.1) wurde im heparinisiertem Zustand weiter verarbeitet und unter Verwendung der Methodik des Comet Assays untersucht. Zur Gewinnung der Lymphozyten gab man 18 ml Vollblut zusammen mit 9 ml PBS in ein 45 ml Falcongefäß, das mit 15 ml Biocoll befüllt war. Das Vollblut/PBS-Gemisch vorsichtig zuzugeben, damit es keine Vermischung mit dem Biocoll gab. Nun folgte die Dichtezentrifugation ohne Bremseinstellung, bei 2000 rpm und 24 °C für 20 min. Das ungebremste Auszentrifugieren war die Voraussetzung für die Entstehung einer reinen Lymphozytenbande zwischen der Plasma- und der Biocollschicht, dem so genannten „Buffy Coat“. Dieser wurde nun mit einer sterilen Pasteurpipette abgesaugt und mit 15 ml PBS vermischt. Es folgte ein erneuter Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2000 U/min mit Bremse. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in 1 ml FCS resuspendiert. Mit Hilfe des Trypanblautests [Phillips, 1973] wurde jeweils ein Vitalitätstest und eine Zellzählung (siehe Abschnitt 2.6.3) durchgeführt.

Generell musste zur weiteren Verwendung eine Mindestvitalität von 85% erfüllt sein. Entsprechend der gesamten Zellzahl wurden die Lymphozyten zur Aufbewahrung auf Tieffriermedium aus 90% FCS und 10% DMSO verteilt. Dafür berechnete man ein Mischungsverhältnis, das ermöglichte pro 1 ml Tieffriermedium  $10^6$  Lymphozyten aufzunehmen und auf beschriftete 2 ml Kryoröhrchen aufzuteilen. Diese wurden danach unverzüglich in einen schon bei -80 °C gelagerten Einfrierbehälter (Kälteblock) überführt. Damit wirkte durch dieses Verfahren von Anfang an ein linearer Einfriervorgang bis zu einer Zieltemperatur von -80 °C. Damit ist eine Lagerung der Lymphozyten bis zu sechs Monaten möglich. Dieses Vorgehen war die Grundlage für eine angemessene Vitalität und Zellzahl nach dem Auftauen.

#### 2.7.2 Genotoxizitäts- und Zytotoxizitätstest an humanen Lymphozyten

Der Comet Assay eignet sich als Kurzzeittestverfahren nach in vitro-Inkubation um DNA-Schädigungen darzustellen. Er ist als alkalische Version (pH 13) der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese etabliert. Genotoxische Schäden wie Einzelstrangbrüche, alkalilabile Stellen und inkomplette DNA-Exzisionsreparaturen können damit sichtbar und quantitativ erfasst werden. Ursprünglich wollte man durch diese Technik das Migrationsverhalten einzelner Zellen nach Bestrahlung unter Elektrophoresebedingungen evaluieren [Ostling und Johanson, 1984], jedoch konnte gleichzeitig die DNA-Wanderung in Anodenrichtung proportional zu dem Ausmaß der induzierten Schädigung beobachtet werden. Dieses Prinzip wurde auf die Untersuchung an humanen Lymphozyten übertragen. Ein Testdurchgang setzte sich aus den zu überprüfenden Dosis-Wirkungsbeziehungen sowie Negativ- und Positivkontrollen zusammen. Lymphozyten eines Spenders wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen inkubiert. Als Negativkontrolle dienten Inkubationen ohne Zusatz von Substanzen, als methodische Positivkontrolle zur Überprüfung der Elektrophorese wurde mit der alkylierende Substanz MNNG inkubiert. Vom 17%igem MNNG wurden 10 µl auf 1 ml verdünnt. Diese Konzentration führt in Leberzellen reproduzierbar zu DNA-Strangbrüchen [Slamenova et al., 1997]. Falsch negative Ergebnisse aufgrund systematischer Fehler in der Durchführung der alkalischen Mikrogel-Elektrophorese wurden somit vermieden. Im Folgenden soll der Versuchsablauf systematisch beschrieben werden.

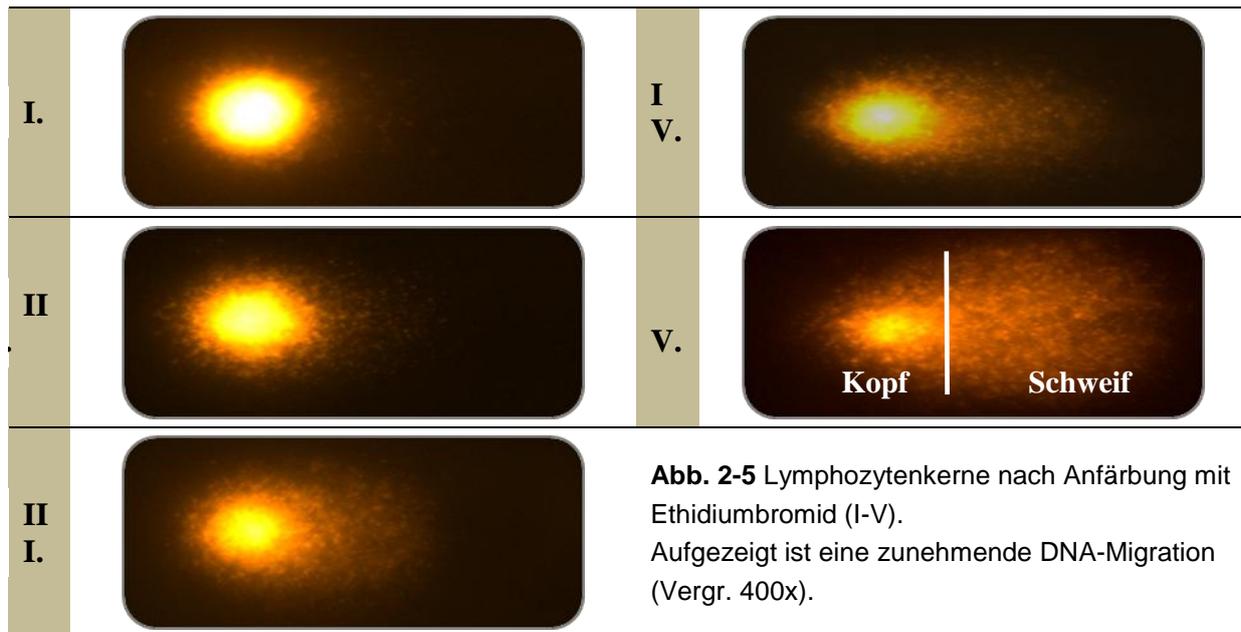


**Abb. 2-4**

Elektrophoresewanne und Netzgerät:  
die Kästchen entsprechen den aufgelegten Objektträgern, der Pfeil der Auflagerichtung (ohne Darstellung der Eiswanne)

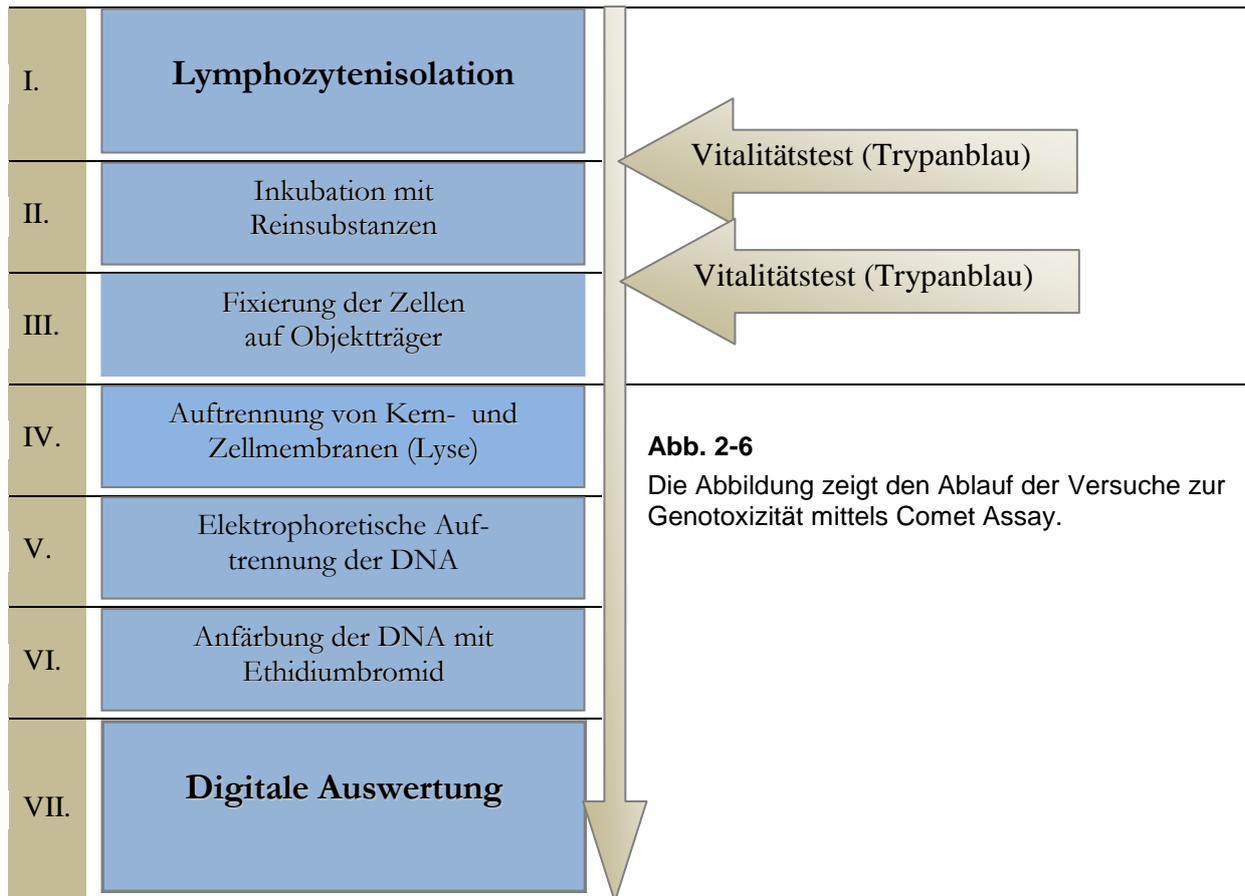
Vorbereitend wurden die für die Versuchsdurchführung benötigten Objektträger mit einem Schreibdiamant nummeriert und mit einer Grundschicht aus 85  $\mu\text{l}$  0,5% Normal-Melting-Agarose versehen. Diese dient zur späteren Fixierung der Deckschicht. Man verwendete seitlich mattierte Objektträger um eine Ablösung der Agarose während der Elektrophorese zu verhindern. Das Aufbringen der Agarose erfolgte nach Mischen mit PBS und Erhitzen in der Mikrowelle (180 W). Dabei lösen sich die festen Bestandteile der Agarose, die als lineares Polysaccharid aus Seetang extrahiert wird, und es bildet sich eine homogene, flüssige Gelmatrix. Vor der Verwendung wurden die mit Deckgläsern geschützten Objektträger zur Trocknung mindestens 3 Tage nach dem Auftragen der Agarose an Luft gelagert. Nach Entfernen der Deckgläser konnten dann die Lymphozyten auf den Objektträgern fixiert werden. Zu Beginn des Experiments wurden die Lymphozyten nach dem Auftauen mit 9 ml PBS versetzt und bei 2000 U/min und 4 °C für 10 min zentrifugiert. Dies diente dem Herauswaschen des Tiefriermediums. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 1 ml RPMI Medium aufgenommen. Nach diesen Schritten war eine Untersuchung des Vitalitätsstatus der aufgetauten Zellen mit dem Trypanblautest nötig (siehe

Abschnitte 2.6.3 und 2.7.1). Für die Durchführung der Versuchsreihen war nach dem Auftauen ein Vitalitätsminimum von 85% vorgeschrieben. Für die Untersuchungsreihen der Testsubstanzen wurde mit je drei Ansätzen gearbeitet. Davon waren 2 Röhrchen für den anschließenden Comet Assay und 1 Röhrchen für einen weiteren Trypanblautest vorgesehen. In jedem Ansatz befanden sich 750  $\mu\text{l}$  mit der Testsubstanz, 150  $\mu\text{l}$  FCS und 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension. Die Lösung der Testsubstanzen wurde so berechnet, dass genau die gewünschte Testkonzentration pro Milliliter Lösung erhalten wurde. Auf eine gute Verteilung der Substanzen im Medium wurde geachtet. Es folgte die Inkubation im Wasserbad (37 °C, 60 min, Schüttelfrequenz bei 60/min). Nach Ablauf der Stunde schloss sich ein Zentrifugationsschritt mit 2000 U/min und 4 °C für 5 min an, um die Fremdstoffinkubation zu beenden. Der Überstand wurde abgegossen. In einem der drei Ansätze wurde erneut ein Trypanblautests durchgeführt. Nur Vitalitäten über 75% erlaubten die Fortführung des Versuchablaufes, da bei stärker reduzierter Vitalität die Analyse der Ergebnisse des Comet Assays durch den Confounder Zytotoxizität zu stark verfälscht wäre. Um die Zellen der beiden anderen Röhrchen nach ihrer Inkubationszeit auf dem Objektträger zu fixieren, wurden sie in 75  $\mu\text{l}$  0,7% Low-melting-Agarose aufgenommen, durchgespült und auf Objektträger aufgetragen, die um die Erstarrung zu einer homogenen Gelmatrix zu beschleunigen auf einer von Kühlelementen unterlegten Metallplatte gelagert waren. Nach ungefähr 3 min konnte eine dritte Schicht von 85  $\mu\text{l}$  0,7% Agarose auf die Objektträger appliziert werden. Nach jedem Auftragen wurde mit einem Deckglas die optimale Verteilung auf der Glasfläche gewährleistet. Nach einer kurzen Aushärtung wurden die beschichteten Objektträger ohne Deckgläser Rücken an Rücken in Lysekammern gestellt. Dies dient zur Lyse der Zellmembranen und damit zur Freisetzung der DNA-Bestandteile. Dies ist die Voraussetzung der Zellkernfragmentwanderung im folgenden Elektrophoreseschritt. Die Objektträger werden in die entsprechenden Vorrichtungen der Lysekammern gesteckt und mit je 80 ml Lysepuffer aufgefüllt. Dafür musste der Lysepuffer frisch vorbereitet (pH 10) und auf 4 °C temperiert sein. Nach Verteilung



der Objektträger auf die Lysekammern wurden die Lysekammern für mindestens eineinhalb Stunden lichtgeschützt in den Kühlschrank gestellt. Elektrophorese beschreibt den Transport geladener Partikel durch elektrischen Strom (Gleichstrom) als Verfahren zur analytischen und präparativen Trennung verschiedener Substanzgemische im elektrischen Feld. Damit kann man sowohl Proteine analysieren, als auch Nukleinsäuren trennen. Durch die Anlage eines elektrischen Feldes werden also geladene Teilchen wie beispielsweise DNA-Fragmente, die bei Einzelstrangbrüchen, alkalilabilen Stellen sowie inkompletten DNA-Exzisionsreparaturen entstehen, in Richtung Anode abgelenkt. Vorbereitend wurde zunächst eine große Wanne mit Eis befüllt. Dies diente der Kühlung der in der großen Wanne stehenden 23,7 x 18,0 cm großen Elektrophoresewannen. Nun füllte man die Elektrophoresewannen mit frisch hergerichteter Elektrophoresepuffer, der später zur Entspiralisierung der DNA dienen sollte. In die Wanne mit dem Eiswasser gab man schließlich noch so lange kaltes Wasser hinzu, bis der Wasserstand der Wanne dem Wasserstand der Elektrophoresekammer entsprach. Für das Auftragen der Objektträger mussten die Rückseiten mit einem Tuch abgetrocknet werden, damit ein höherer Haftungseffekt über adhärente Saugkräfte auf der Elektrophoresewannenoberfläche entstand.

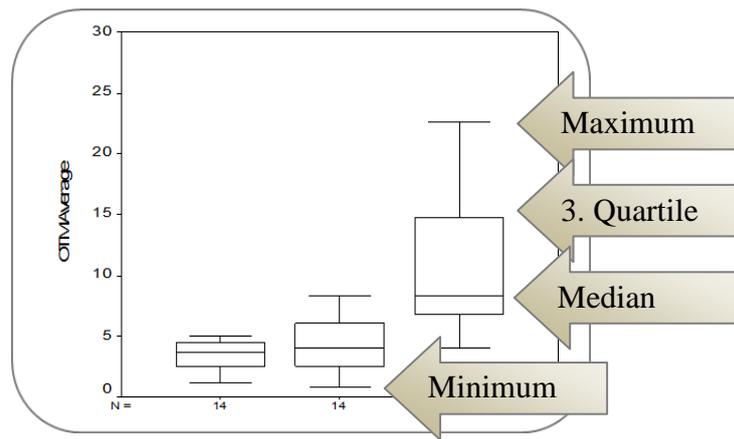
Das Auflegen erfolgte mit der unbeschichteten Seite des Objektträgers nach unten. Die beschichtete Objektträgerseite mit den aufgetragenen Zellen lag nach oben offen. Man startete mit dem Aufsortieren von der Kathode anodenwärts. Danach überprüfte man nochmals die Festigkeit der Fixierung und die Ausrichtung der Randflächen. Abschließend wurden die Objektträger mit alkalischem Elektrophoresepuffer (pH 13,2) bedeckt um eine Entspiralisierung der DNA zu starten. Dieser Vorgang war nach 20 Minuten abgeschlossen. Nach der Entwindung der DNA konnte man die alkalische Mikrogel-Elektrophorese starten. Durch eine dosierte Zugabe bzw. Wegnahme von Elektrophoresepuffer konnte man die optimale Laufbedingung bei 300 mA und 25 V feinjustieren, weil die Wanderungsgeschwindigkeit direkt proportional zu der angelegten Spannung und Ladung ist. Die Stromstärke steigt also mit der Erhöhung der Puffermenge. Damit ist neben der angelegten Spannung, der pH-Wert des Puffers, die Zusammensetzung des Agarosegels und die Länge und Konformation entscheidend für das Elektrophoreseverhalten von Kern-DNA bis 50 KB Basenlänge [Balling, 1998]. Es folgte ein 20 min. Elektrophorese-Schritt. Durch toxische Einflüsse entstandene Fragmente der Kern-DNA wurden währenddessen getrennt. Danach wurden die Objektträger auf Abtropfwannen gelegt und mit Neutralisationspuffer dreimal innerhalb von zehn Minuten beträufelt. Dies diente der Neutralisation des alkalischen Elektrophoresepuffers. Im Anschluss trockneten die Objektträger an



Luft. Die DNA wird dann mit dem verdünnten Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid angefärbt. Dieser Stoff lagert sich in die DNA ein, indem es zwischen Basenpaaren interkaliert [Balling, 1998]. Ethidiumbromid absorbiert direkt längerwelliges UV-Licht (302 nm und 360 nm). Kurzwelliges UV-Licht hingegen wird nur von den Nukleinsäuren absorbiert. Die Umwandlung des verschiedenwelligen UV-Lichts erfolgt jedoch in je dem Fall in orange-rotes sichtbares Licht (590 nm). Der Ethidiumbromid-Nukleinsäurenkomplex führt dabei zu einer besonders effizienten Emission, die auch kleinere Schäden auswertbar macht. Hierfür wurde auf jeden Objektträger 7,5 µl Ethidiumbromid aufgetragen. Durch das Auflegen eines Deckglases wurde die optimale Verteilung des Farbstoffes gewährleistet. Damit konnte nun die digitale Auswertung folgen. In speziellen lichtgeschützten feuchten Aufbewahrungsboxen wurden die fertigen Objektträger bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt.

### 2.7.3 Digitale Analyse der DNA-Migration und Datenspeicherung

Die digitale Auswertung der Objektträger wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop vorgenommen, das über eine Monochrom-CCD Kamera mit einem digitalen planimetrischen Auswertesystem Komet Data 4.0 verbunden war. Zur Vermessung kam ein Filtersystem mit Grünanregung (515-560 nm) und Ausgangssperfilter bei 590 nm zur Anwendung. Die Vergrößerung der Messung war 400fach. Zur Auswertung wurden 50 Zellen pro Objektträger, also 100 Zellen pro Doppelauswertung erfasst. Dafür wurde das System vom Benutzer auf die jeweiligen Zellkerne fokussiert um dann automatisiert die entsprechenden Kometendaten berechnet zu erhalten. Die Ergebnisse wurden katalogisiert und im Microsoft Excel-Format gespeichert. Dabei wird genutzt, dass DNA-Fragmente geschädigter Zellen in der Elektrophorese wandern. Daher entsteht in der Betrachtung das Bild eines Kometen, der im Zellkern noch unfragmentierte DNA-Reste beinhaltet. Die DNA-Fragmente bilden den Kometenschweif aus. Das Ausmaß des Kometen ist direkt abhängig vom Grad der DNA-Schädi-



**Abb. 2-7**

Erklärung der Darstellung in einem Boxplot

gung. Zur Bestimmung der DNA-Schädigung und zur Quantifizierung der genotoxischen Auswirkung wird der „Olive Tail Moment“ (OTM)<sup>1</sup> errechnet [Olive und Banath, 1993]. Dieser entspricht dem Produkt des Median der Wanderungstrecke und dem Quotienten aus DNA im Kometenschweif und Gesamt-DNA.

## 2.8 Statistische Analyse und grafische Ergebnisdarstellung

### 2.8.1 Boxplots

Eine grafische Darstellung der Ergebnisse in Form von Boxplots erfolgte mit dem statistischen Datenprogramm SPSS<sup>TM</sup> 11.5.

Die photometrisch gemessenen Daten zur Proliferationsleistung humaner Chondrozyten wurden in Boxplots übertragen. Die Daten der Genotoxizitätsuntersuchungen wurden als arithmetisches Mittel der OTM-Werte von je 100 gemessenen Lymphozyten auch in Boxplots dargestellt. Die Abb. 2-8 zeigt zur Illustrierung einen Boxplot. Dabei entspricht die T-Linie dem höchsten und eine umgekehrte T-Linie dem niedrigsten Wert. Innerhalb des Boxplot-Kastens gibt ein horizontaler Balken den Median an. Der Median ist der Wert, der von der Hälfte aller Werte unter- und von der anderen Hälfte überschritten wird. Bei der 1. Quartile (entspricht der 25. Perzentile) sind 25% der Werte kleiner und bei der 3. Quartile (entspricht der 75. Perzentile) 25% der Werte größer. Diese werden durch die untere bzw. obere Linie des Boxplots symbolisiert. Ein Stern (\*) in der Grafik steht für einen Extremwert, der über drei Kastenlängen außerhalb liegt. Ausreißer, die maximal 1,5 Kastenlängen außerhalb liegen, werden durch einen Kreis (°) kenntlich gemacht. Die Fallzahl (N) wird durch die Anzahl der einbezogenen Ergebnisse festgelegt. Das Maximum steht für den größten, das Minimum für den kleinsten Wert. Um eine Vergleichbarkeit zu den Negativkontrollen zu gewährleisten, wurden die OTM-Werte der nicht-exponierten Gruppe der Genotoxizitätsuntersuchung mit dem Wert 1 normiert. Alle Ergebnisse der exponierten Gruppen wurden deswegen im Folgenden auf den Wert eins bezogen.

### 2.8.2 Statistische Testverfahren

Mit Hilfe des Datenprogramms SPSS<sup>TM</sup> 11.5 erfolgte die statistische Analyse der Ergebnisse. Der Wilcoxon-Test wurde für die Gegenüberstellung von Daten an Zellen gleicher Spender verwendet. Der Wilcoxon-Test ist ein parameterfreier und verteilungsunabhängiger Test, der zwei verbundene Stichproben auf signifikante Unterschiede hin überprüft [Siegel, 1985] und wurde von dem Chemiker und

<sup>1</sup> *OTM = (flächiger Median der Fluoreszenzverteilung des Schweifes-flächiger Median der Fluoreszenzverteilung des Kopfes) x (mittl. Fluoreszenzintensität des Schweifes/mittl. Fluoreszenzintensität von Kopf und Schweif)*

Statistiker Frank Wilcoxon (1892-1965) etabliert [Wilcoxon, 1945]. Parameterfreie Modelle unterscheiden sich von parametrischen Modellen durch die Festlegung der Modellstruktur mittels der gewonnenen Daten. Dabei ist die Art und Anzahl der Parameter flexibel und nicht von vornherein festgelegt. Damit eignen sie sich besonders zum Testen statistischer Hypothesen. Die zu testenden Grundgesamtheiten sollen dabei eine stetige Verteilung von gleicher Form haben und mindestens intervallskaliert sein. Entscheidend für die Beurteilung war eine gegebene Signifikanz im Vergleich zu der Negativkontrolle. Dieser Unterschied wurde als p-Wert angegeben und mit dem allgemeinen Signifikanzniveau verglichen. Dabei sind Unterschiede der Daten dann als signifikant anzusehen, wenn die Wahrscheinlichkeit gering ist, dass sie durch Zufall zustande gekommen sind. Das Signifikanzniveau entspricht dem Quartil der maximal zulässigen geschätzten Irrtumswahrscheinlichkeit. Diese ist meistens auf maximal 5% ( $p=0,05$ ) festgelegt. Je niedriger man dieses Niveau wählt, umso höher ist die Informationsqualität [Bortz, 2005]. Durch die Anwendung der Bonferroni-Korrektur wurde versucht die Kumulierung des  $\alpha$ -Fehlers bei multiplen Paarvergleichen zu neutralisieren. Das Risiko des  $\alpha$ -Fehlers steigt mit dem mehrfachen Testen in derselben Grundgesamtheit. Dabei wird das Signifikanzniveau mathematisch für jeden Einzeltest angepasst, man erhält neben dem globalen  $\alpha$ -Niveau (für die gesamte Hypothesenfamilie) ein berechnetes lokales Signifikanzniveau. Wenn also der p-Wert zweier verbundener Stichproben unter dem globalen Signifikanzniveau von 0,05 oder dem dementsprechenden jeweiligen lokalen Signifikanzniveau lag, wurde ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Proben festgestellt. Zusätzlich wurde mit den gewonnenen Daten noch ein zweiter statistischer Test durchgeführt. Mit dem Friedman-Test, den der US-amerikanische Ökonom Milton Friedman (1912-2006) [Friedman, 1937] entwickelte, wurde ein Testverfahren gewählt, dass sich vor allem für den Vergleich mehrerer verbundener Stichproben in einer Grundgesamtheit eignet [Siegel, 1985]. Beide statistischen Testverfahren versuchen die Nullhypothese zu bestätigen oder zu verwerfen. Die Nullhypothese  $H_0$  ist eine Annahme über die Wahrscheinlichkeitsverteilung einer Zufallsvariablen. Damit wird die Gleichheit von Sachverhalten angenommen. Dem gegenüber steht die Alternativhypothese, die eine begründete empirische Annahme einer Erklärungsmöglichkeit von Phänomenen bietet und damit in Gegenposition zur Nullhypothese steht. Damit sind die beiden Hypothesen disjunkt zueinander.

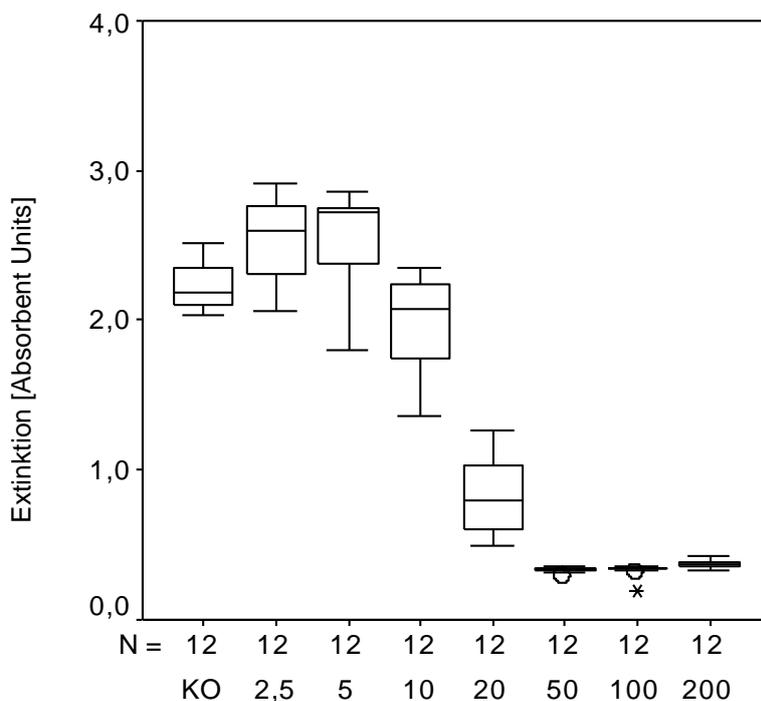
## Kapitel 3 Ergebnisse

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Versuchsreihen grafisch und tabellarisch dargestellt. Für jede Substanz wird zunächst ein Grenzwert der Zytotoxizität bestimmt, d.h. eine Konzentration, die im Testsystem gerade nicht mehr zytotoxisch auf humane Chondrozyten und/oder Lymphozyten wirkt. Dieser Wert wird im Folgenden als Ausgangswert für die Genotoxizitätsuntersuchung verwendet. Die statistische Auswertung befindet sich jeweils im Anschluss an die grafische Darstellung.

Im Endergebnis können für jede der drei Substanzen Schwellenkonzentrationen definiert werden, bei denen weder mit genotoxischen noch zytotoxischen Effekten auf humane Chondrozyten und Lymphozyten zu rechnen sind.

### 3.1 Ergebnisdarstellung für 1,6-Hexandiol

#### 3.1.1 Dosis-Wirkungsbeziehung zur Zytotoxizität an humanen Chondrozyten



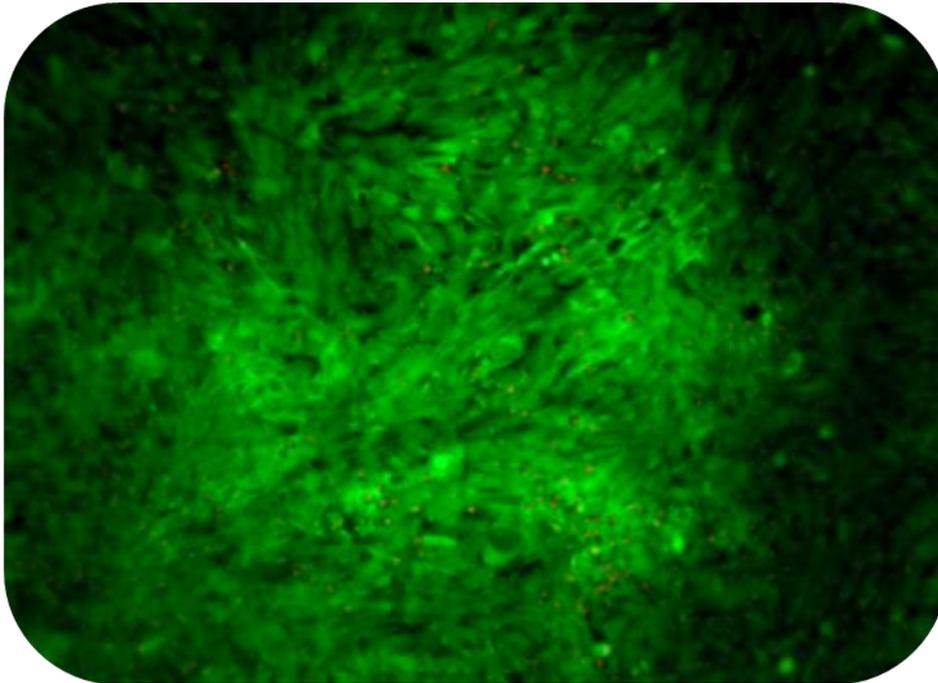
**Abb. 3-1**  
Chondrozytenproliferation im EZ4U-Test nach 24 h Inkubation in Abhängigkeit von der 1,6-Hexandiol-Konzentration im Bereich von 2,5 bis 200 mg/ml

\* - Extremwert  
° - Ausreißer

**x-Achse:**  
Kontrolle (KO) und Substanzkonzentrationen [mg/ml]  
**y-Achse:**  
Maß der Extinktion  
**N** - Anzahl der Versuche

**Tab. 3-1** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W) und Friedman-Test (F)

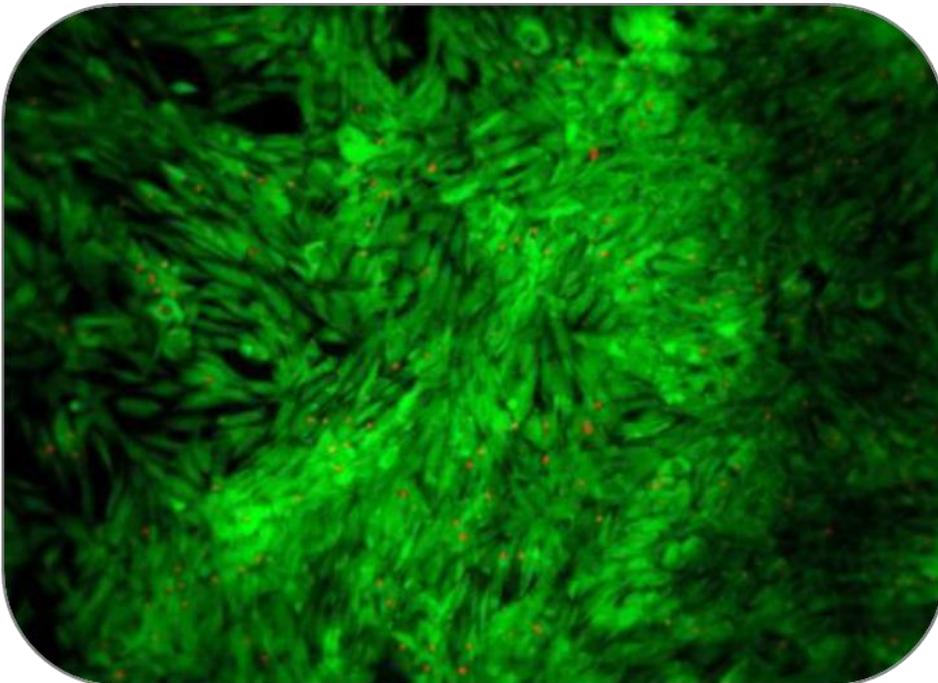
Signifikanzniveau								
p (F)	< 0,0001							
1,6-Hexandiol [mg/ml]	KO	2,5	5	10	20	50	100	200
Median [AU]	2,18	2,60	2,73	2,08	0,79	0,33	0,34	0,38
Mittelwert [AU] ± Stabw	2,23 ± 0,17	2,55 ± 0,28	2,58 ± 0,31	1,98 ± 0,33	0,83 ± 0,26	0,33 ± 0,02	0,32 ± 0,04	0,38 ± 0,03
p (W) vs. KO		< 0,01	< 0,05	< 0,05	< 0,01	< 0,01	< 0,01	< 0,01



**Abb. 3-2**

Mit PI und FDA gefärbte Chondrozyten im Kontrollansatz (50fache Vergrößerung). Der über 24 h gewachsene Zellteppich entspricht dem natürlichen Proliferationsverhalten der Chondrozyten. Dies zeigt sich in grünen Zellkörpern mit einer flächigen Vermehrung. Die Körper der Zellausläufer bilden weder Vakuolen noch andere morphologische Auffälligkeiten aus. Somit ist von einem regelhaften Wachstum auszugehen. Die roten Punkte entsprechen avitalen Zellen.

---



**Abb. 3-3**

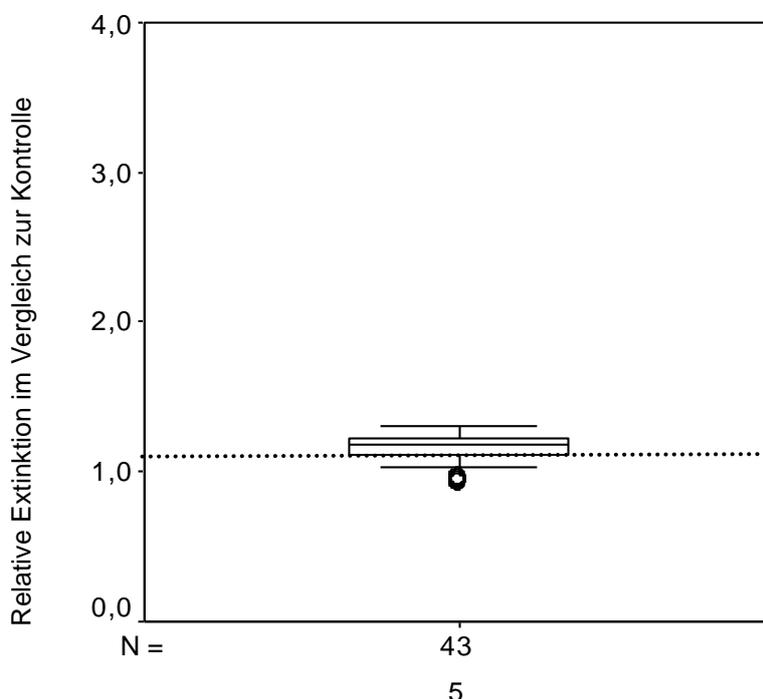
Mit PI und FDA gefärbte Chondrozyten nach 24 h Inkubation (100fache Vergrößerung) mit der Schwellenkonzentration von 1,6-Hexandiol, 5 mg/ml, bei der morphologisch kein toxischer Effekt mehr sichtbar ist. Man erkennt wie bei der Kontrolle die Ausbreitung eines gleichmäßigen Zellteppichs und die regelhafte Morphologie der Chondrozyten neben wenigen avitalen Zellen.

---

In der Abb. 3-1 zeigt sich eine Abhängigkeit der gemessenen Extinktion von der Konzentration des 1,6-Hexandiols. Während bei 2,5 und 5,0 mg/ml die Proliferation geringfügig gegenüber der Kontrolle (Kontrolle  $2,19 \pm 0,17$  [AU]) stimuliert wird, deutet sich bei 10 mg/ml ein leichte Hemmung an, die bereits bei 20 mg/ml auf über 50% der Kontrolle zunimmt. Obwohl bei 10 mg/ml die Extinktion noch ähnlich wie bei der Kontrollpopulation ist, zeigt die Begutachtung der Zellstruktur nach PI/FDA-Färbung unter dem Fluoreszenzmikroskop auffällige Veränderungen in Morphologie und Vitalität. Deshalb wurde eine Konzentration von 5 mg/ml als Schwellenwert festgelegt (Abb. 3-2 und 3-3). Der statistische Vergleich der Einzelergebnisse mit dem Kontrollwert (KO) mit dem Wilcoxon-Tests, ergibt für alle Konzentrationen signifikante Unterschiede in der Proliferation gegenüber der Kontrolle.

### 3.1.2 Proliferationstest mit der Schwellenkonzentration 5 mg/ml

Zur Überprüfung der möglichen Schwellenkonzentration wurde im Proliferationstest EZ4U die nach der Abb. 3-1 festgelegte Konzentration der Expositions- zur Kontrollgruppe verglichen. Dabei zeigten sich bei hoher Fallzahl ( $N=43$ ) Proliferationswerte humaner Chondrozyten, die bei der Konzentration 5 mg/ml 1,6-Hexandiol um 18% über der Kontrolle lagen. Relativ zur Kontrolle (= 1) betragen der Median 1,18 und der Mittelwert  $\pm$  Stabw  $1,15 \pm 0,09$  ( $p < 0,001$ ). Eine Hemmung des Wachstums lag demnach nicht vor. Das Ergebnis der Zytotoxizitätsuntersuchung diene als Grundlage für die anschließenden Genotoxizitätstests. In der folgenden Abb. 3-5 sollen die Ergebnisse der Zytotoxizitätsuntersuchung dieser Konzentration auf humane Lymphozyten aufgezeigt werden.



**Abb. 3-4**  
Chondrozytenproliferation  
im EZ4U-Test nach 24 h  
Inkubation mit 5 mg/ml  
1,6-Hexandiol

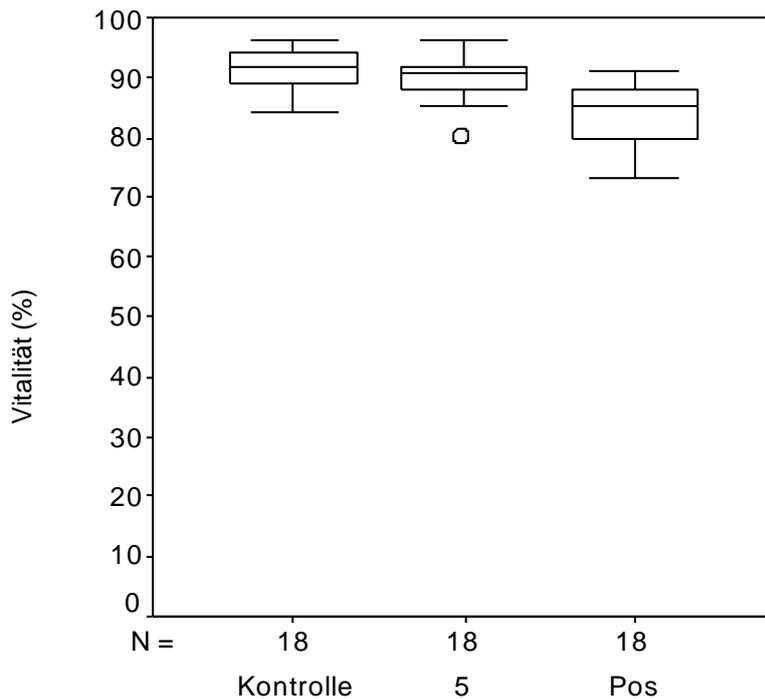
° - Ausreißer

**x-Achse:**  
Substanzkonzentration  
[mg/ml]

**y-Achse:**  
Extinktion relativ zur  
Kontrolle (= 1)  
**N** - Anzahl der Versuche

### 3.1.3 Zytotoxizität an humanen Lymphozyten

Die Zytotoxizität in humanen Lymphozyten wurde mit dem Trypanblautest nach einstündiger Inkubation mit der für Chondrozyten ermittelten Schwellenkonzentration von 5 mg/ml 1,6-Hexandiol, überprüft. Bei einer Fallzahl von  $N=18$  unterscheidet sich die mittlere Vitalitätsrate mit 89,5% nur unwesentlich von der Vitalität im Kontrollansatz, der im Mittel 91,7% beträgt. Der Unterschied ergibt im Wilcoxon-Tests keine Signifikanz ( $p = 0,064$ ). Damit ist auch in Humanlymphozyten bei einer Konzentration von 5 mg/ml keine Reduktion der Vitalität durch 1,6-Hexandiol nachweisbar.



**Abb. 3-5**  
Zytotoxizität im Trypanblautest nach 1 h Inkubation von humanen Lymphozyten mit 5 mg/ml 1,6-Hexandiol

**x-Achse:**

Kontrolle, Substanzkonzentration [mg/ml] und Positivkontrolle (MNNG)

**y-Achse:**

Vitalität der Lymphozyten in Prozent als quantitatives Maß der Zytotoxizität.

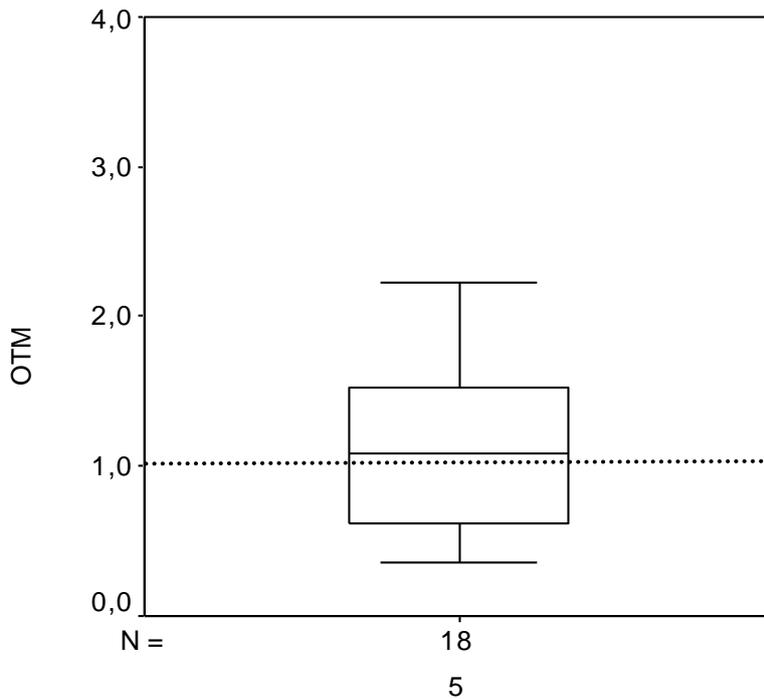
**N** - Anzahl der Versuche

**Tab. 3-2** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W)

1,6-Hexandiol [mg/ml]	Kontrolle	5	Pos
Median [Vitalität in %]	92,0	90,0	85,0
Mittelwert $\pm$ Stabw [Vitalität in %]	91,7 $\pm$ 3,2	89,5 $\pm$ 3,8	83,7 $\pm$ 5,7
p (W) vs. KO		n.s.	< 0,05

3.1.4 Genotoxizität an humanen Lymphozyten

Die Untersuchung der Genotoxizität wurde mit dem Comet Assay mit gleicher Fallzahl von  $N=18$  bei der durch die Zytotoxizitätsversuche bestimmten Schwellenkonzentration von 5 mg/ml 1,6-Hexandiol durchgeführt. Abbildung 3.6 und Tabelle 3.3 zeigen, dass sich auch die OTM-Werte der behandelten Lymphozyten nicht von denen der Negativkontrolle unterscheiden ( $p = 0,918$ ).



**Abb. 3-6**  
Genotoxizität im Comet Assay nach 1 h Inkubation von humanen Lymphozyten mit 5 mg/ml 1,6-Hexandiol

**x-Achse:**  
Substanzkonzentration [mg/ml]  
**y-Achse:**  
Olive Tail Moment (OTM, ohne Angabe von Einheiten) relativ zur Kontrolle (=1)  
**N** - Anzahl der Versuche

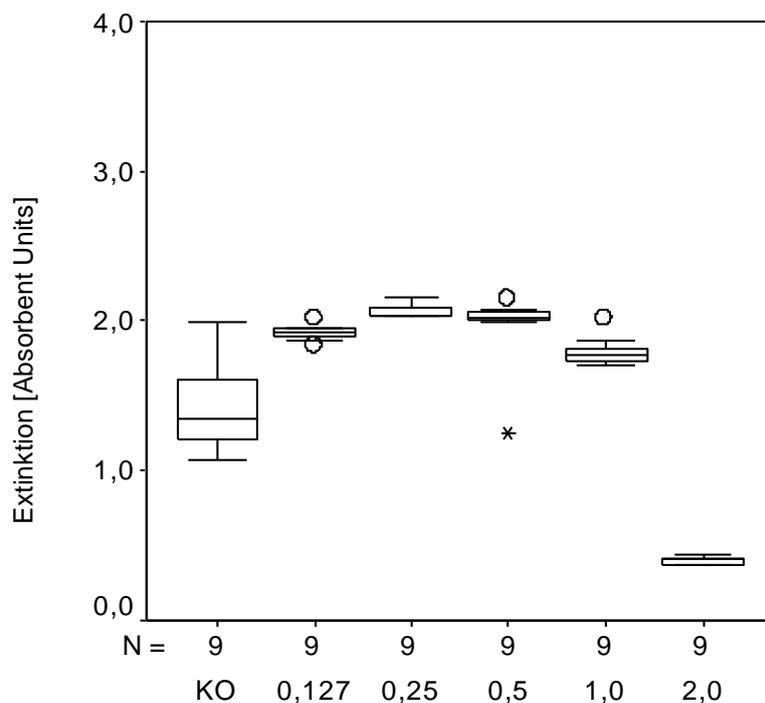
**Tab. 3-3** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W)

1,6-Hexandiol [mg/ml]	5
Median ± Stabw [OTM]	1,09 ± 0,88
Mittelwert [OTM]	1,27
p (W) vs. KO	n.s.

### 3.2 Ergebnisdarstellung für 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU)

#### 3.2.1 Dosis-Wirkungsbeziehung zur Zytotoxizität an humanen Chondrozyten

In der Abbildung 3-7 zeigt sich eine signifikante Abhängigkeit der gemessenen Extinktion von der DBU-Konzentration ( $p(F) < 0,001$ ). Während die Proliferationsraten bei 0,125 bis 1,0 mg/ml um das 1,2- bis 1,3-fache oberhalb der des Kontrollansatzes liegen, kommt es bei 2,0 mg/ml zu einer deutlichen Abnahme der Proliferation um mehr als das Dreifache. Im Gegensatz zu den Konzentrationen unter 1,0 mg/ml, bei denen keine morphologische Schädigung der Zellkörper festgestellt werden konnte, zeigten sich bei 1,0 mg/ml bereits erste Schäden bei der Betrachtung unter dem Fluoreszenzmikroskop nach PI/FDA-Färbung. Deswegen kann ein toxischer Einfluss von 1,0 mg/ml auf die Zellen nicht ausgeschlossen werden, obwohl die quantitative Proliferationsmessung im EZ4U-Test keine Hemmung im Vergleich zur Kontrolle zeigt. Als Schwellenkonzentration wurde daher 0,5 mg/ml festgelegt bei der noch keine morphologischen Veränderungen sichtbar waren (Abb. 3-8 und 3-9). Der Wilcoxon-Test zeigt eine Signifikanz aller Ergebnisse im Vergleich zur Kontrolle (Tab. 3-5).



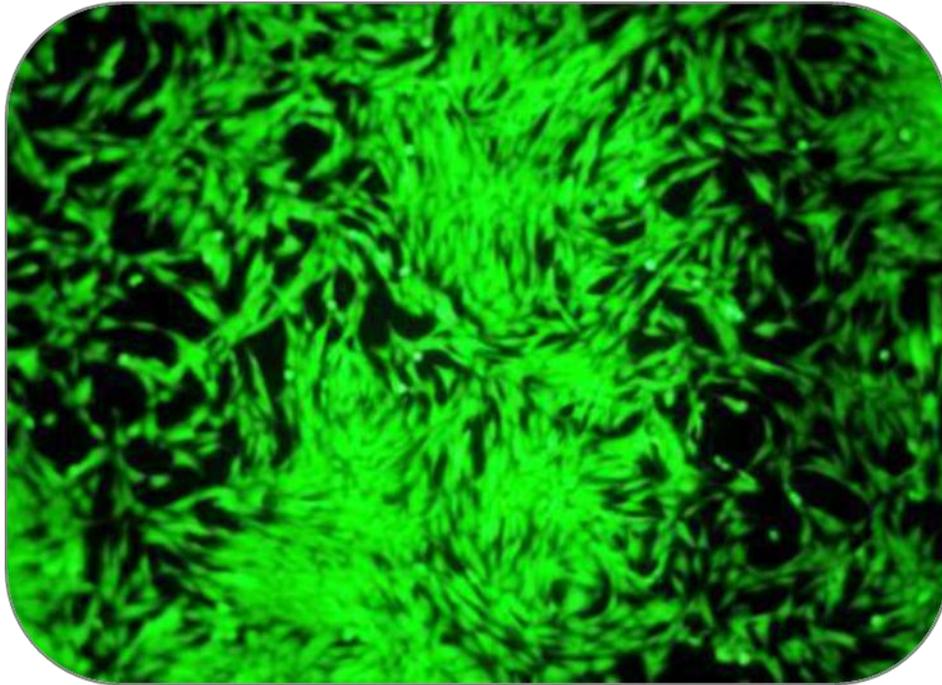
**Abb. 3-7**  
Chondrozytenproliferation im EZ4U-Test nach 24 h Inkubation in Abhängigkeit von der DBU-Konzentration im Bereich von 0,125 bis 2,0 mg/ml

\* - Extremwert  
○ - Ausreißer

**x-Achse:**  
Kontrolle (KO) und Substanzkonzentrationen [mg/ml]  
**y-Achse:**  
Maß der Extinktion  
**N** - Anzahl der Versuche

**Tab. 3-4** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W) und Friedman-Test (F)

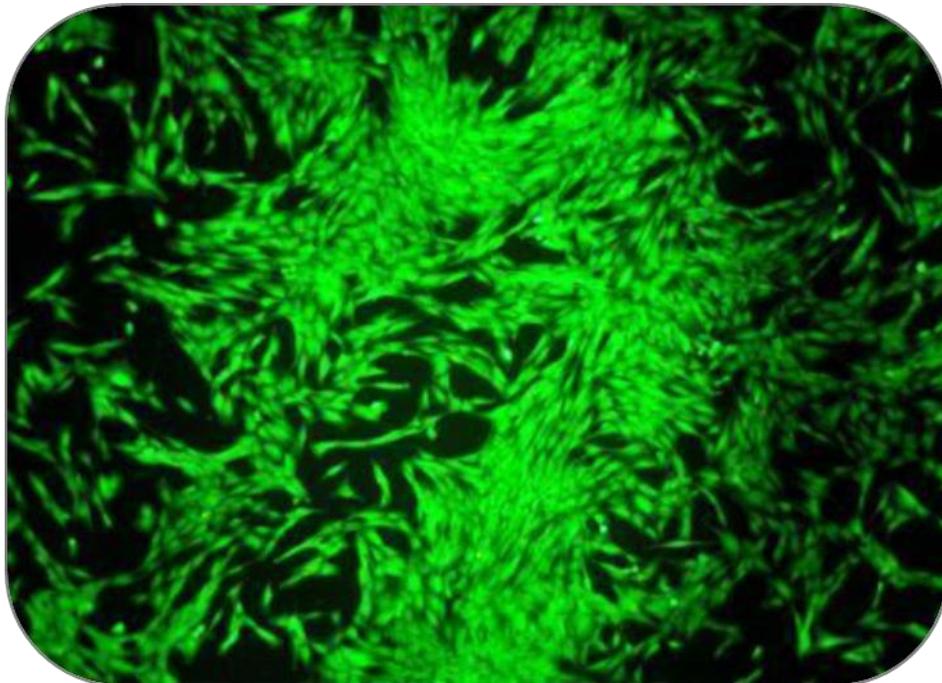
Signifikanzniveau						
p (F)	< 0,001					
DBU [mg/ml]	Kontrolle	0,125	0,25	0,5	1,0	2,0
Median [AU]	1,55	1,92	2,04	2,03	1,76	0,42
Mittelwert [AU]	1,48	1,93	1,99	1,90	1,73	0,41
± Stabw	± 0,29	± 0,46	± 0,25	± 0,31	± 0,21	± 0,02
p (W) vs. KO		< 0,05	< 0,01	< 0,05	< 0,05	< 0,01



**Abb. 3-8**

Proliferation von Chondrozyten nach 24 h Inkubation im Kontrollansatz (PI/FDA-Färbung, 50fache Vergrößerung). Die Kontrolle zeigt einen gut gewachsenen Zellteppich. Wiederum gilt es sowohl die Extinktion [Absorbent Units] im Ganzen, als auch die Morphologie im Detail zu kontrollieren. Die Zellen haben eine intakte Zellstruktur. Die Kontrolle zeigt regelhaftes Wachstum und keine roten abgestorbene Zellen.

---



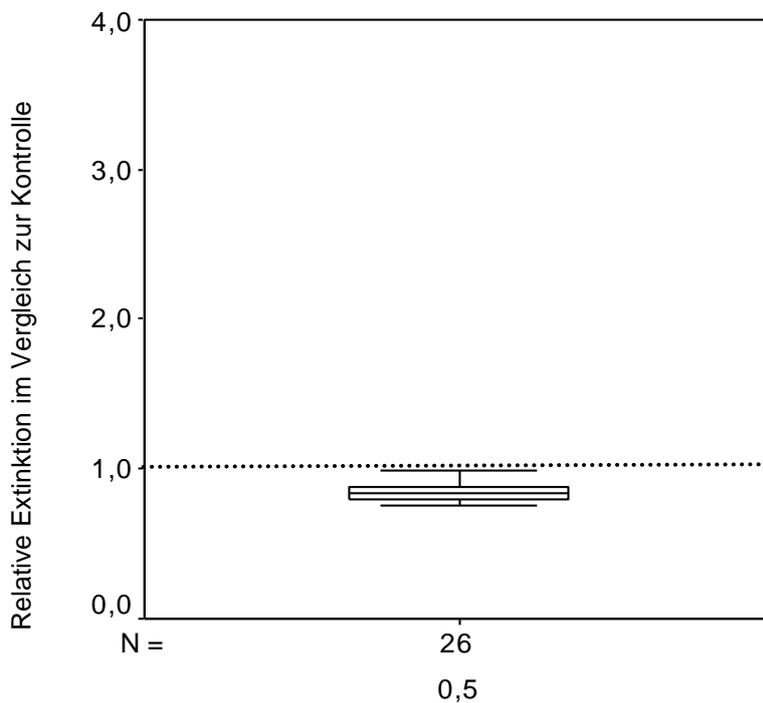
**Abb. 3-9**

Chondrozyten nach 24 h Inkubation (PI/FDA-Färbung, 50fache Vergrößerung) mit der Schwellenkonzentration von 0,5 mg/ml DBU: sowohl die Extinktion [Absorbent Units] als auch der morphologische Vitalitätstest stimmen mit der Kontrolle überein. Hier sieht man eine deutliche dichte Ausbreitung adhärenter Chondrozyten mit deren Ausläufern. In der vorliegenden Abbildung ist ein Bereich des Kulturwells getroffen, der besonders starkes Wachstum aufweist.

---

### 3.2.2 Proliferationstest mit der Schwellenkonzentration 0,5 mg/ml

Die für DBU ermittelte Schwellenkonzentration (0,5 mg/ml) wurde mit dem EZ4U-Proliferationstest mit höherer Anzahl überprüft ( $N=26$ ). Es ergab sich im Gegensatz zu dem kleineren Ansatz (Abb. 3.7) relativ zur Kontrolle (= 1) eine signifikante Abnahme der Proliferation mit einem Mittelwert von  $0,84 \pm 0,06$  ( $p < 0,001$ ). Trotz der um 16% verringerten Extinktion im Vergleich zum Kontrollwert kann die DBU-Konzentration von 0,5 mg/ml als Schwellenkonzentration bestätigt werden, da die bildmorphologischen Kriterien zur Proliferationsbeurteilung ohne Einschränkungen, d.h. ohne Hinweise auf toxischen Einfluss, erfüllt waren und in der Fluoreszenzmikroskopie auch bei höherer Auflösung kein Unterschied zwischen Kontrollansatz und exponierter Gruppe feststellbar war (Abb. 3.11 und 3.12).



**Abb. 3-10**

Chondrozytenproliferation im EZ4U-Test nach 24 h Inkubation mit 0,5 mg/ml DBU

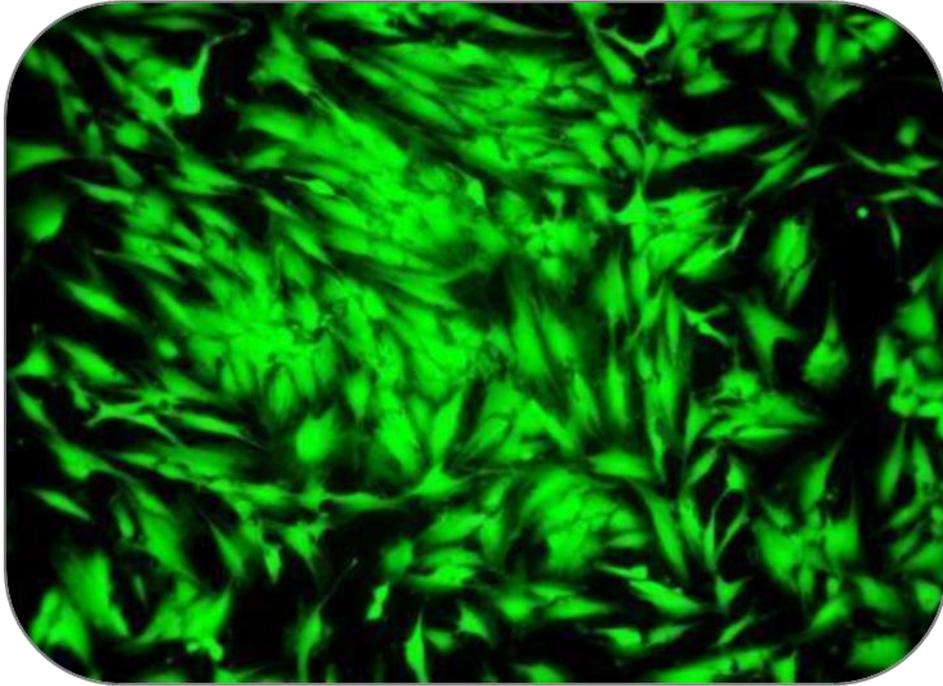
**x-Achse:**

Substanzkonzentration [mg/ml]

**y-Achse:**

Extinktion relativ zur Kontrolle (= 1)

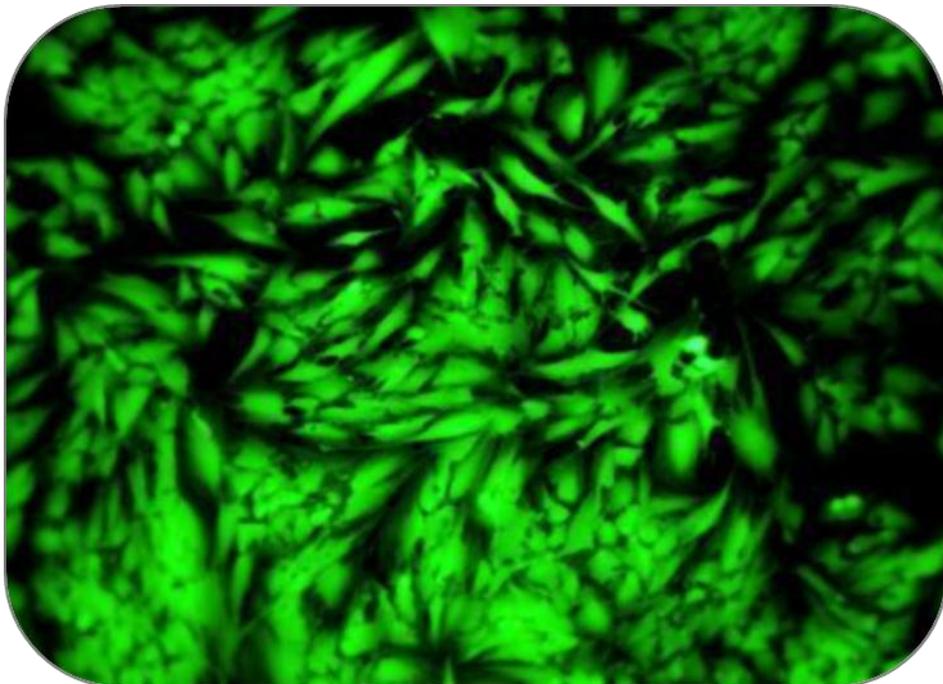
**N** - Anzahl der Versuche



**Abb. 3-11**

Chondrozyten im Kontrollansatz (PI/FDA-Färbung, 100fache Vergrößerung). Im Kontrollansatz sieht man einen normal sich ausbreitenden Zelleppich humaner Chondrozyten, die bevorzugt in kleinen Clustern wachsen. Die Proliferation und die Morphologie scheinen morphologisch regelhaft.

---



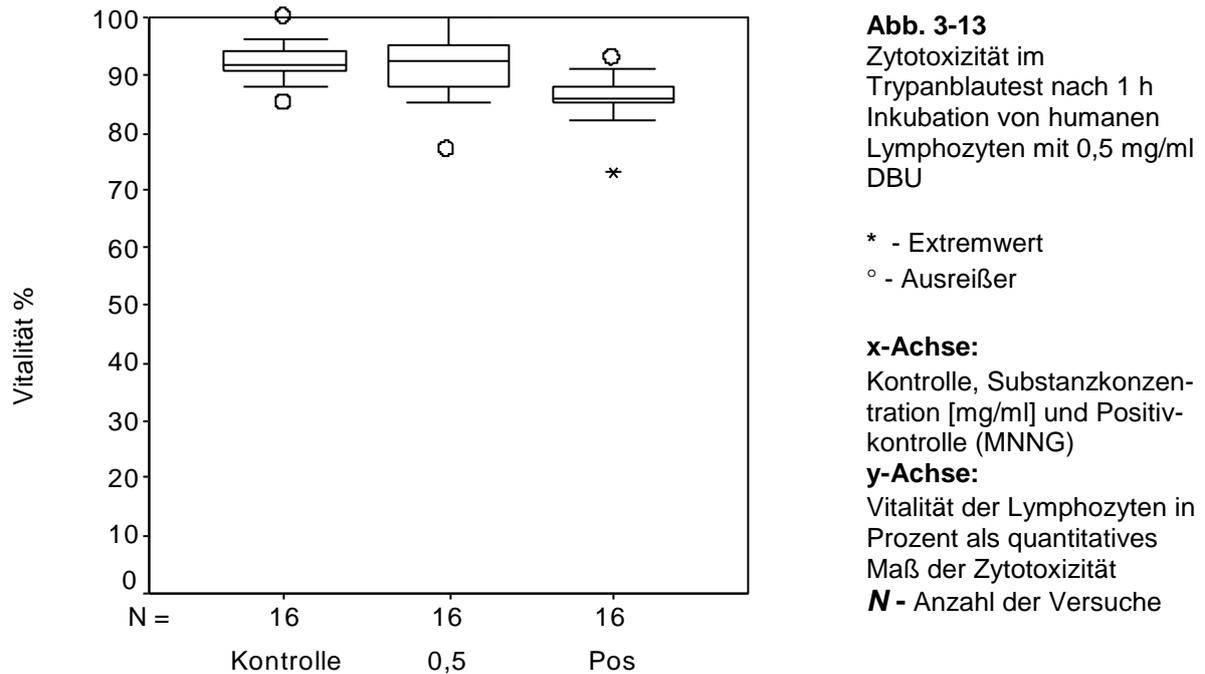
**Abb. 3-12**

Chondrozyten nach Substanzinkubation zur Verifizierung (PI/FDA-Färbung, 100fache Vergrößerung). Es ist eine Übersichtsdarstellung einer Chondrozytenpopulation nach 24 h Inkubation mit der Schwellenkonzentration von 0,5 mg/ml DBU dargestellt. Dabei ist kein Unterschied zur Kontrollaufnahme zu erkennen. Man sieht deutlich die von Chondrozyten bevorzugte Proliferationsart der Gruppenproliferation.

---

### 3.2.3 Zytotoxizität an humanen Lymphozyten

Die Zytotoxizität in humanen Lymphozyten wurde mit dem Trypanblautest nach einstündiger Inkubation mit der für Chondrozyten ermittelten Schwellenkonzentration von 0,5 mg/ml DBU überprüft. Im Vergleich zur Vitalität des Kontrollansatzes (Vitalitätsrate von 92,37%) reduziert die Substanz DBU in der Fallzahl  $N=26$  in der Schwellenkonzentration 0,5 mg/dl die mittlere Vitalitätsrate nicht signifikant auf 89,33% ( $p(W) > 0,067$ ). Damit ist in Humanlymphozyten bei einer DBU-Konzentration von 0,5 mg/ml keine Reduktion der Vitalität nachweisbar.

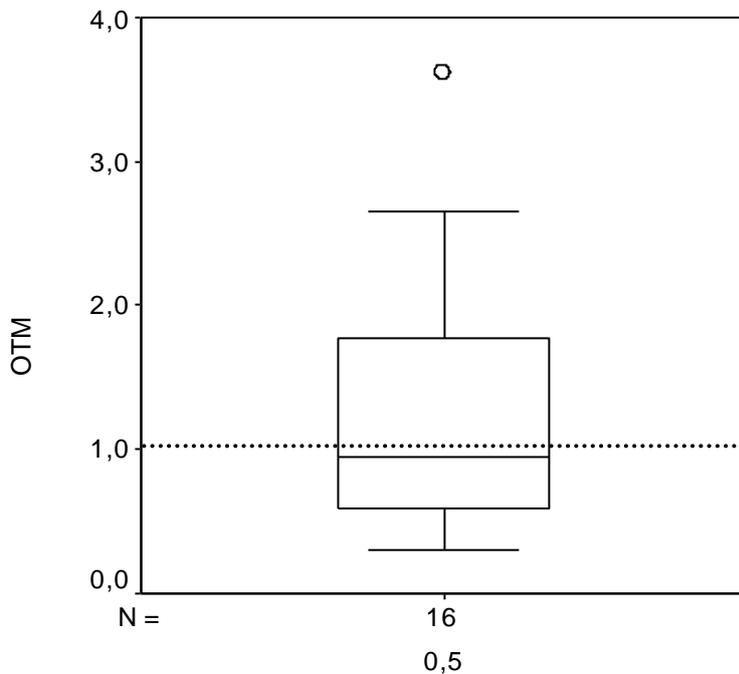


**Tab. 3-5** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W)

DBU [mg/ml]	Kontrolle	0,5	Pos
Median [Vitalität in %]	92,0	89,0	86,0
Mittelwert ± Stabw [Vitalität in %]	92,4 ± 3,3	89,3 ± 6,5	85,9 ± 4,4
p (W) vs. KO		n.s.	< 0,05

3.2.4 Dosis-Wirkungsbeziehung zur Genotoxizität an humanen Lymphozyten

Die Ergebnisse der Genotoxizitätsuntersuchungen sind in der Fallzahl  $N=16$  dargestellt. Bei der durch Zytotoxizitätsversuche bestimmten Schwellenkonzentration 0,5 mg/ml verändert DBU auch die OTM-Werte nicht im Vergleich zu der Negativkontrolle ( $p = 0,918$ ).



**Abb. 3-14**  
Genotoxizität im Comet Assay nach 1 h Inkubation von humanen Lymphozyten mit 0,5 mg/ml DBU  
° - Ausreißer

**x-Achse:**  
Substanzkonzentration [mg/ml]  
**y-Achse:**  
Olive Tail Moment (OTM, ohne Angabe von Einheiten) relativ zur Kontrolle (=1)  
**N** - Anzahl der Versuche

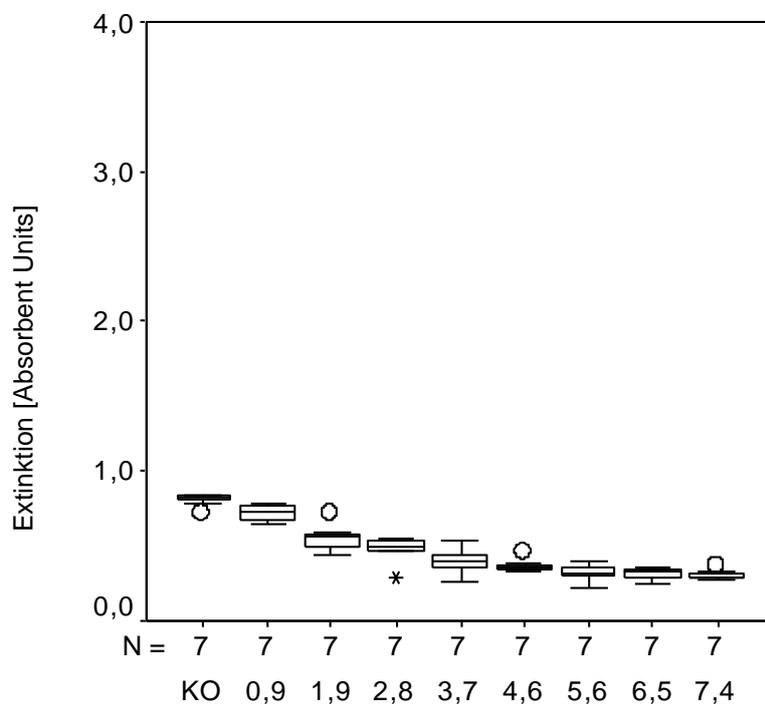
**Tab. 3-6** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W)

DBU [mg/ml]	0,5
Median [OTM]	0,95
Mittelwert ± Stabw [OTM]	1,26 ± 0,97
p (W) vs. KO	n.s.

### 3.3 Ergebnisdarstellung für 6-Hydroxyhexansäure (HHS)

#### 3.3.1 Dosis-Wirkungsbeziehung zur Zytotoxizität an humanen Chondrozyten (0,9-7,4 mg/ml)

Im zunächst untersuchten Konzentrationsbereich zwischen 0,9 bis 7,4 mg/ml zeigt sich für die 6-Hydroxyhexansäure eine klare, im Friedman-Test hochsignifikante Dosisabhängigkeit (p-Wert 0,001; Abb. 3-15 und Tab. 3-7). Schon bei der niedrigsten Konzentration von 0,9 mg/ml ist die Proliferation auf 89% der Kontrolle erniedrigt ( $p < 0,05$ ). Bei der höchsten Konzentration von 7,4 mg/ml erreicht die Proliferationsrate nur noch 37% des Kontrollwertes. Dieses Ergebnis war Anlass für eine detailliertere Untersuchung des Konzentrationsbereiches um 0,9 mg/ml



**Abb. 3-15**

Chondrozytenproliferation im EZ4U-Test nach 24 h Inkubation in Abhängigkeit von der HHS-Konzentration im Bereich von 0,9 bis 7,4 mg/ml

\* - Extremwert

o - Ausreißer

**x-Achse:**

Kontrolle (KO) und Substanzkonzentrationen [mg/ml]

**y-Achse:**

Maß der Extinktion

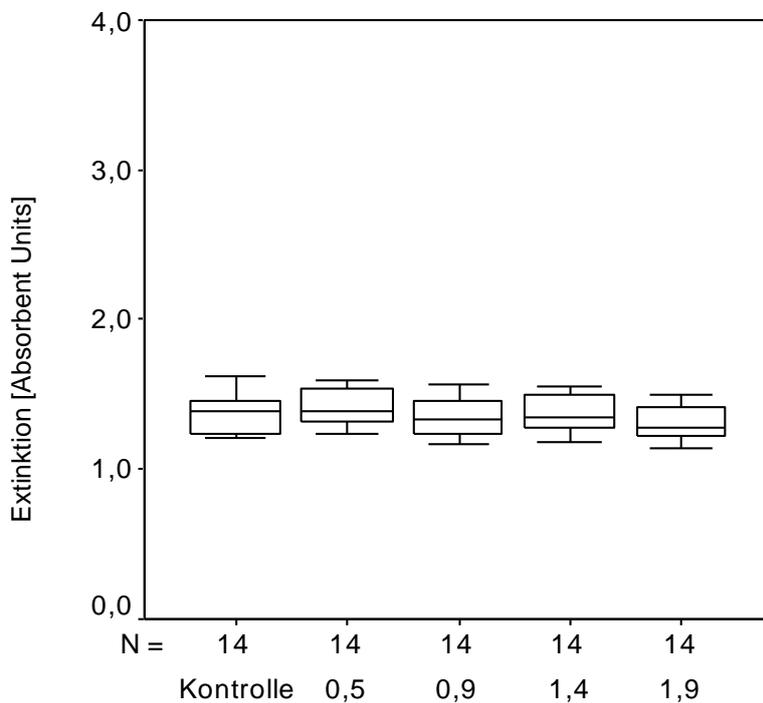
**N** - Anzahl der Versuche

**Tab. 3-7** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W) und Friedman-Test (F)

Signifikanzniveau									
p (F)		< 0,001							
HHS [mg/ml]	KO	0,9	1,9	2,8	3,7	4,6	5,6	6,5	7,4
Median [AU]	0,83	0,72	0,56	0,49	0,40	0,35	0,32	0,32	0,29
Mittelwert	0,81	0,72	0,55	0,47	0,40	0,37	0,32	0,31	0,30
± Stabw [AU]	± 0,05	± 0,05	± 0,09	± 0,09	± 0,09	± 0,04	± 0,06	± 0,04	± 0,03
p (W) vs. KO		< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05

3.3.2 Dosis-Wirkungsbeziehung zur Zytotoxizität an humanen Chondrozyten (0,5--1,9 mg/ml)

Die erneute Untersuchung mit der doppelten Anzahl von Zellpopulationen ergab im Bereich von 0,5-1,9 mg/ml zwar noch signifikante Unterschiede im Friedman-Test ( $p(F) 0,001$ ), jedoch unterscheidet sich im direkten Vergleich mit dem Wilcoxon-Test nur die höchste Konzentration signifikant von der Kontrolle (Abb. 3-16, Tab. 3-8). Die Hemmung der Chondrozytenproliferation durch 0,9 mg/ml 6-Hydroxyhexansäure im ersten Versuch konnte also nicht bestätigt werden. Auch zeigt die qualitative Begutachtung bei dieser Konzentration keine Beeinträchtigungen der Zellstrukturen (Abb. 3-17 und 3-18). Nach 24 h Inkubation mit 1,4 und 1,9 mg/ml 6-Hydroxyhexansäure sind dagegen Zeichen toxischer Schädigung bildmorphologisch nachweisbar. Deswegen wurde als vorläufiger Schwellenwert eine 6-Hydroxyhexansäure-Konzentration von 0,9 mg/ml festgelegt.

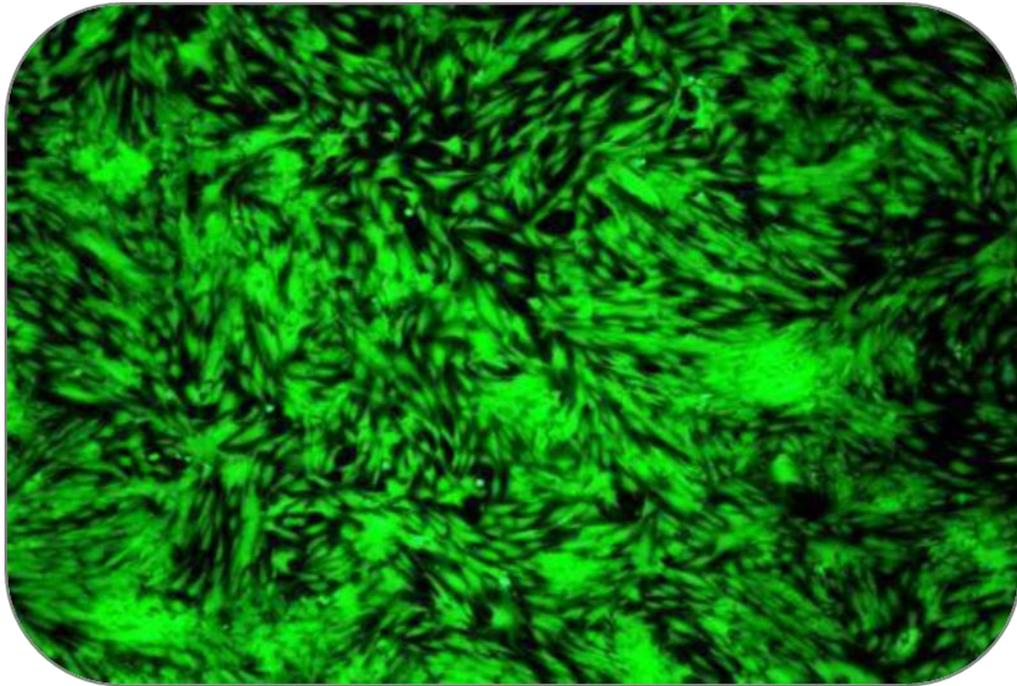


**Abb. 3-16**  
Chondrozytenproliferation im EZ4U-Test nach 24 h Inkubation in Abhängigkeit von der HHS-Konzentration im Bereich von 0,5 bis 1,9 mg/ml

**x-Achse:**  
Kontrolle (KO) und Substanzkonzentrationen [mg/ml]  
**y-Achse:**  
Maß der Extinktion  
**N** - Anzahl der Versuche

**Tab. 3-8** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W) und Friedman-Test (F)

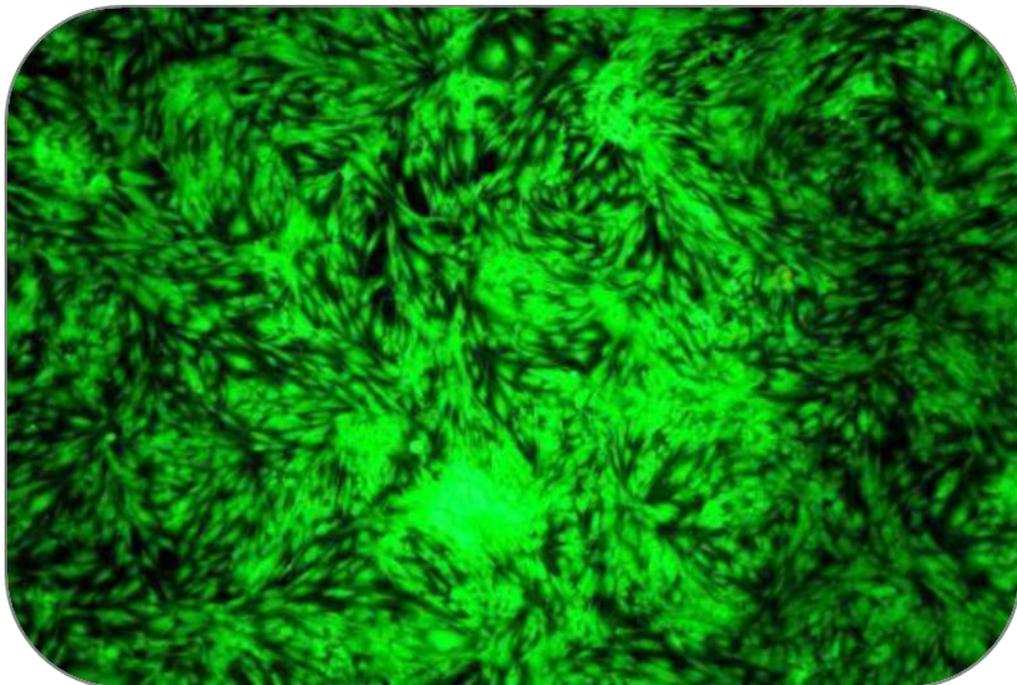
Signifikanzniveau					
p (F)	< 0,001				
HHS [mg/ml]	Kontrolle	0,5	0,9	1,4	1,9
Median [AU]	1,39	1,39	1,34	1,36	1,28
Mittelwert ± Stabw [AU]	1,37 ± 0,14	1,36 ± 0,12	1,35 ± 0,13	1,37 ± 0,12	1,35 ± 0,12
p (W) vs. KO		n.s.	n.s.	n.s.	< 0,05



**Abb. 3-17**

Chondrozytenwachstum des Kontrollansatzes (PI/FDA-Färbung, 50fache Vergrößerung). Da Chondrozyten bevorzugt gruppiert proliferieren sind kleine stark verdichtete Zellcluster zu erkennen. Diesen Effekt kann man auch in der Abb. 3-18 beobachten. Auch in der qualitativen Strukturkontrolle waren keine Vakuolisierungen und sonstige Zellstrukturen erkennbar.

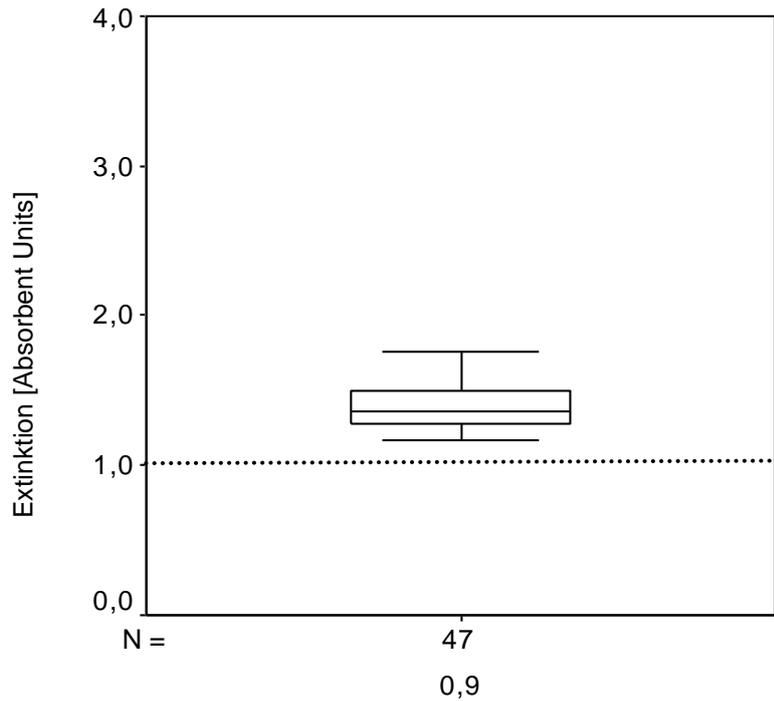
---



**Abb. 3-18**

Chondrozyten nach 24 h Inkubation (PI/FDA-Färbung, 50fache Vergrößerung). mit der Schwellenkonzentration von 6-Hydroxyhexansäure 0,9 mg/ml dargestellt. Die Morphologie und Vitalitätsrate zeigt keine Unterschiede zur Negativkontrolle auf. Somit liegen keine weiteren Hinweise möglicher negativen Einflüsse der Substanz 6-Hydroxyhexansäure in dieser Konzentration vor.

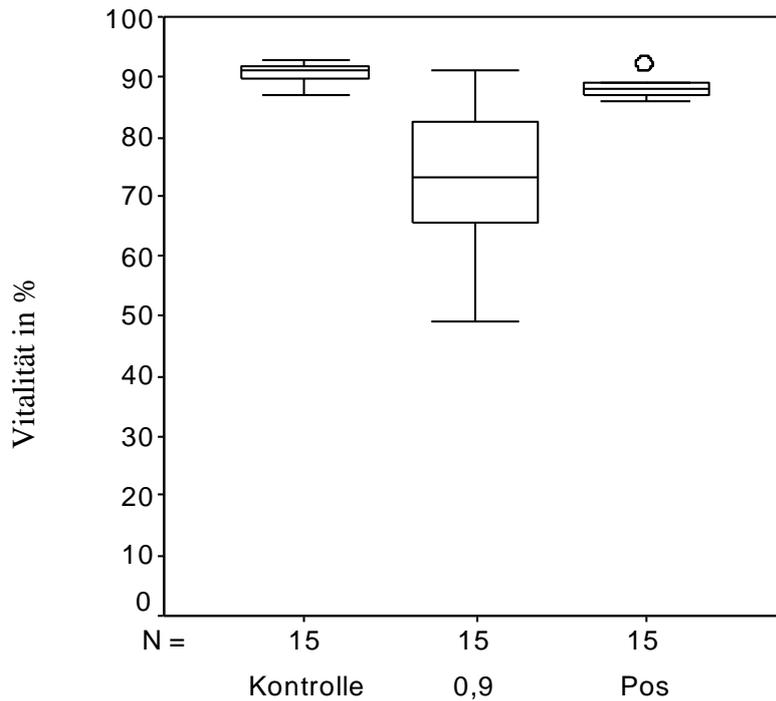
---



**Abb. 3-19**  
Chondrozytenproliferation im EZ4U-Test nach 24 h Inkubation mit 0,9 mg/ml 6-Hydroxyhexansäure

\* - Extremwert  
° - Ausreißer

**x-Achse:**  
Substanzkonzentration [mg/ml]  
**y-Achse:**  
Maß der Extinktion  
**N** - Anzahl der Versuche



**Abb. 3-20**  
Zytotoxizität im Trypanblautest nach 1 h Inkubation von humanen Lymphozyten mit 0,9 mg/ml 6-Hydroxyhexansäure

**x-Achse:**  
Kontrolle, Substanzkonzentration [mg/ml] und Positivkontrolle (MNNG)

**y-Achse:**  
Vitalität der Lymphozyten in Prozent als quantitatives Maß der Zytotoxizität  
**N** - Anzahl der Versuche

**Tab. 3-9** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W)

HHS [mg/ml]	Kontrolle	0,9	Pos
Median [Vitalität in %]	91,0	73,0	88,0
Mittelwert ± Stabw [Vitalität in %]	90,0 ± 2,5	76,7 ± 12,4	88,5 ± 2,1
p (W) vs. KO		< 0,001	n.s.

3.3.3 Proliferationstest mit der Schwellenkonzentration 0,9 mg/ml

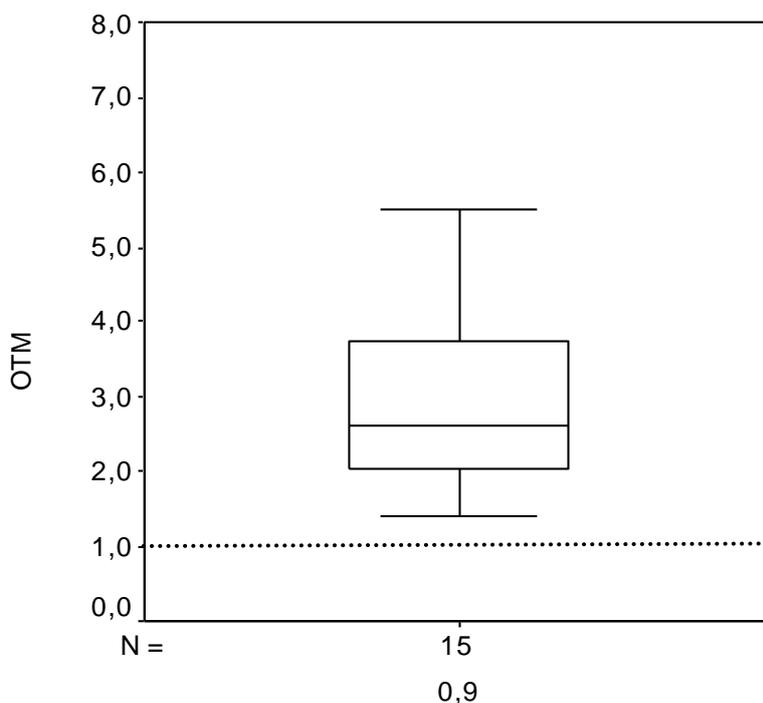
Bei dem Proliferationstest wird die Schwellenkonzentration von 0,9 mg/ml 6-Hydroxyhexansäure mit einem Kontrollansatz in hoher Fallzahl N=47 bezüglich der gemessenen Extinktion verglichen. Dabei zeigten die Substanz-belasteten humanen Chondrozyten eine signifikant erhöhte Proliferation mit einem mittleren Anstieg relativ zur Kontrolle von 39% (Median 1,36, Mittelwert  $\pm$  Stabw  $1,39 \pm 0,14$ ;  $p(W) < 0,05$ ) waren. Eine Hemmung des Wachstums lag demnach nicht vor. Auch in der erneuten mikroskopischen Beurteilung ergab sich kein Anhalt für eine mögliche toxische Einwirkung auf die Chondrozyten.

3.3.4 Zytotoxizität an humanen Lymphozyten bei 0,9 mg/ml

Bei der Schwellenkonzentration von 0,9 mg/ml für die Chondrozytenproliferation wird die Vitalität der Lymphozyten durch die 6-Hydroxyhexansäure bereits hochsignifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt ( $p < 0,001$ ; Abb. 3-20, Tab. 3-9). Die mittlere Vitalitätsrate liegt bei den Substanz-belasteten Lymphozyten nach einstündiger Inkubation mit 76,7% mehr als 13% unter jener der Kontrolle. Die 6-Hydroxyhexansäure ist demnach für Lymphozyten erheblich toxischer als für Chondrozyten. Dies war ein erster Hinweis, dass für diese Substanz eine niedrigere Schwellenkonzentration als 0,9 mg/ml anzunehmen ist.

3.3.5 Genotoxizität an humanen Lymphozyten bei 0,9 mg/ml

Die Genotoxizität von 0,9 mg/ml 6-Hydroxyhexansäure wurde mit einer Fallzahl von N=15 an humanen Lymphozyten untersucht (Abb. 3.-21, Tab. 3-10). Es ergab sich eine statistisch hochsignifikante Erhöhung der OTM Werte ( $p(W) 0,001$ ). Dieses Ergebnis bestätigte, dass für die 6-Hydroxyhexansäure von einer niedrigeren Schwellenkonzentration als 0,9 mg/ml ausgegangen werden musste. Dies hatte weitere Untersuchungen zur Dosisfindung zur Folge.



**Abb. 3-21**  
Genotoxizität im Comet Assay nach 1 h Inkubation von humanen Lymphozyten mit 0,9 mg/ml 6-Hydroxyhexansäure

**x-Achse:**  
Substanzkonzentration [mg/ml]  
**y-Achse:**  
Olive Tail Moment (OTM, ohne Angabe von Einheiten) relativ zur Kontrolle (=1)

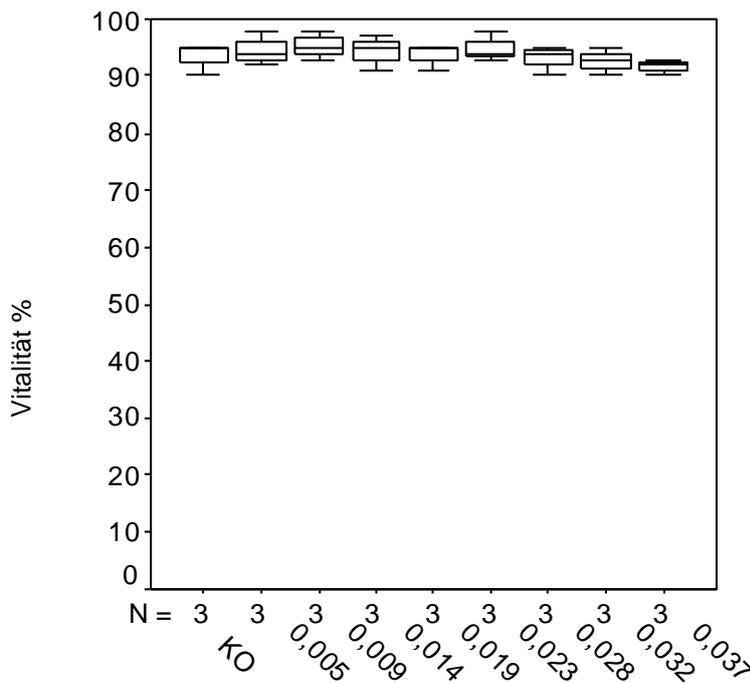
**N** - Anzahl der Versuche

**Tab. 3-10** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W)

HHS [mg/ml]	0,9
Median [OTM]	2,62
Mittelwert ± Stabw [OTM]	2,95 ± 1,28
p (W) vs. KO	< 0,001

3.3.6 Zytotoxizität an humanen Lymphozyten (0,005–0,037 mg/ml)

Bei deutlich niedrigen Konzentrationen zeigt die 6-Hydroxyhexansäure nur noch einen geringen Einfluss auf die Vitalität von humanen Lymphozyten im Trypanblautest, der sich im Friedman-Test nur in einer schwach signifikanten Dosiswirkungsbeziehung ( $p(F) < 0,05$ ) widerspiegelt (Abb. 3-22, Tab. 3-14). Erst bei den beiden höchsten Konzentrationen nimmt die Vitalität gegenüber der Kontrolle ab, im Mittel um als 2%. Auf eine statistische Bewertung mit dem Wilcoxon-Test wurde wegen der geringen Fallzahl von  $N=3$  verzichtet. Für die Genotoxizitätsprüfung im Comet-Assay sind diese geringfügigen Änderungen der Vitalität ohne Belang.



**Abb. 3-22**  
Zytotoxizität im Trypanblautest nach 1 h Inkubation von humanen Lymphozyten in Abhängigkeit von der 6-Hydroxyhexansäure-Konzentration im Bereich von 0,005 bis 0,037 mg/ml

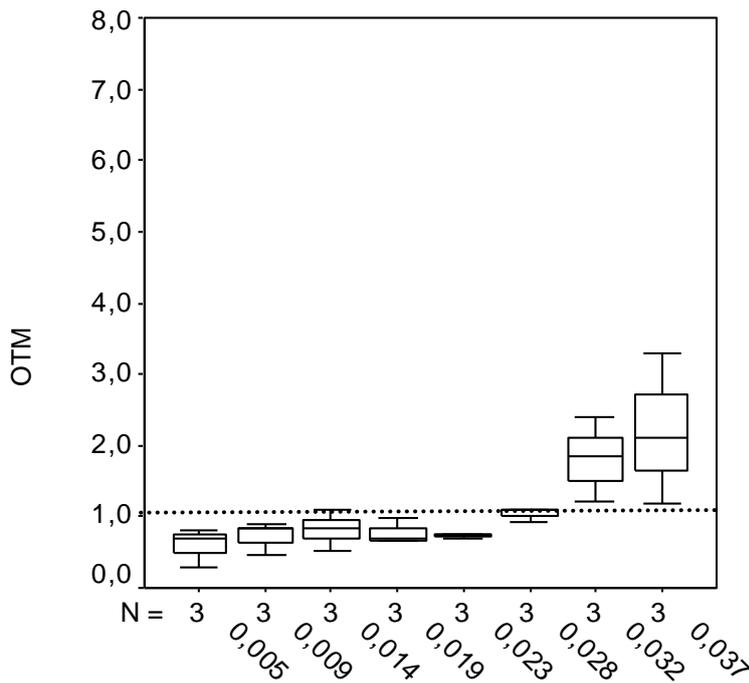
**x-Achse:**  
Kontrolle (KO) und Substanzkonzentrationen [mg/ml]  
**y-Achse:**  
Vitalität der Lymphozyten in Prozent als quantitatives Maß der Zytotoxizität  
**N** - Anzahl der Versuche

**Tab. 3-11** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W) und Friedman-Test (F)

Signifikanzniveau									
p (F)	< 0,05								
HHS [mg/ml]	KO	0,005	0,009	0,014	0,019	0,023	0,028	0,032	0,037
Median [V%]	95,0	94,0	95,0	95,0	95,0	94,0	94,0	93,0	92,0
Mittelwert ± Stabw [V%]	93,3 ± 2,9	94,7 ± 3,1	95,3 ± 2,5	94,33 ± 3,06	93,7 ± 2,3	95,0 ± 2,7	93,0 ± 2,7	92,7 ± 2,5	91,7 ± 1,5

3.3.8 Ergänzungsreihe zur Genotoxizität an humanen Lymphozyten (0,005–0,037 mg/ml)

Hinsichtlich der Genotoxizität in humanen Lymphozyten besteht im niedrigen Konzentrationsbereich für die 6-Hydroxyhexansäure eine deutlichere Dosisabhängigkeit ( $p(F) < 0,01$ ) als für die Vitalität (Abb. 3-23; Tab. 3-13). Auch wenn wegen der niedrigen Fallzahl von  $N=3$  keine statistische Auswertung nach Wilcoxon durchgeführt wurde, zeigt die Grafik doch eindeutig, dass die 6-Hydroxyhexansäure nur bei Konzentrationen  $> 0,032$  mg/ml zu erhöhten OTM Werten geführt hat. In Übereinstimmung mit dem Ergebnis für die Vitalität im Trypanblautest kann deshalb 0,028 mg/ml als neue Schwellenkonzentration für die 6-Hydroxyhexansäure festgelegt werden.



**Abb. 3-23**  
Genotoxizität im Comet Assay nach 1 h Inkubation von humanen Lymphozyten in Abhängigkeit von der 6-Hydroxyhexansäure-Konzentration im Bereich von 0,005 bis 0,037 mg/ml

**x-Achse:**  
Substanzkonzentrationen [mg/ml]  
**y-Achse:**  
Olive Tail Moment (OTM), ohne Angabe von Einheiten) relativ zur Kontrolle (=1)  
**N** - Anzahl der Versuche

**Tab. 3-12** Statistische Auswertung, Wilcoxon-Test (W) und Friedman-Test (F)

Signifikanzniveau								
p (F)	< 0,01							
HHS [mg/ml]	0,005	0,009	0,014	0,019	0,023	0,028	0,032	0,037
Median [OTM]	0,68	0,82	0,86	0,67	0,73	1,09	1,82	2,11
Mittelwert ± Stabw [OTM]	0,58 ± 0,27	0,72 ± 0,23	0,81 ± 0,29	0,77 ± 0,19	0,72 ± 0,03	1,04 ± 0,09	1,81 ± 0,60	2,18 ± 1,05

## Kapitel 4 Diskussion

---

Ziel der Untersuchung der Zytotoxizität und Genotoxizität von 1,6-Hexandiol, 1,8-Diazabicyclo-[5.4.0]undec-7-en (DBU) und 6-Hydroxyhexansäure an humanen Chondrozyten und Lymphozyten ist der Ausschluss möglicher genotoxischer oder zytotoxischer Effekte an humanen Chondrozyten und Lymphozyten. Diese Substanzen sollen Verwendung als Bestandteile eines Zellträgers finden, der im Rahmen des Tissue Engineering der Ohrmuschel als Transplantat zur autogenen Rekonstruktion chondralen Gewebes dient. Für die gefundenen Schwellenkonzentrationen konnte keine Gefahr einer Zellschädigung nachgewiesen werden und können damit im Biomaterialzellträger verwendet werden. Im Folgenden werden die verwendete Methodik und Ergebnisse Grundlage der Diskussion sein.

### 4.1 Diskussion der Ätiologie und Therapie aurikulärer Rekonstruktion

Die Generierung humaner Chondrozyten hat einen wichtigen Platz in der heutigen medizinischen Forschung. Die Notwendigkeit der Rekonstruktion chondraler Strukturen ist eine häufige Fragestellung in den verschiedenen chirurgischen Disziplinen. Allein im nichttraumatischen Bereich der aurikulären Rekonstruktion kann man in der Bundesrepublik Deutschland pro Jahr von 150 Betroffenen mit angeborenen Fehlbildungen ausgehen (Abb. 4-1 und 4-2) [Staudenmaier, 2000, 2006, Staudenmaier et al., 2006]. Daneben gibt es eine wachsende Anzahl so genannter Lifestyle-Betroffener auf Grund unhygienischer Piercings im Bereich der Ohrmuschel. Bei infausten Verläufen der Perichondritis bleibt dabei häufig nur noch die Indikation zur Ohrrekonstruktion. Mehrere Studien [Eckhardt et al., 2002, Janssen und Kon, 2004, Margulis et al., 2003] konnten die Gefahr der Entzündung bei transcartilagenen Ohrpiercings darstellen. Dabei kann ein unsteriles Vorgehen zu einer (Peri)chondritis führen, die im schlimmsten Fall eine chondrale Nekrose oder andere Deformitäten verursachen kann. Zur Rekonstruktion ist die autologe aurikuläre Wiederherstellung, insbesondere bei Kindern, immer noch die Therapie der Wahl. Neben dieser Behandlungsoption kommt auch der Einsatz von Epithesen in Frage. Nachteile dieser Form der Defektbehebung wie Instabilität, Unsensibilität und der eingeschränkten Dauerhaftigkeit sprechen jedoch häufig gegen eine Verwendung dieser Transplantate. Doch muss auch bei der autologen Wiederherstellungschirurgie trotz stetiger positiver Weiterentwicklung zur Optimierung der operativen Verfahren [Staudenmaier, 2006] das Operationsrisiko als Nachteil berücksichtigt werden, obwohl es nur selten zu intraoperativen Komplikationen wie Pleuraverletzungen kommt.



**Abb. 4-1**  
Bilder des prä- und postoperativen Status bei jungem Mädchen mit Mikrotie



**Abb. 4-2**  
Männlicher Patient mit chirurgisch rekonstruiertem Tassenohr





**Abb. 4-3**  
Verarbeitung humanen Knorpelmaterials

Häufiger sind postoperative Schmerzen, so genannte Hebedefekte an der Spenderstelle, die aber gut therapierbar sind [Staudenmaier et al., 2006]. Die Komplexizität der Rekonstruktion ist demnach groß. Durch die Etablierung eines neuen Operationsverfahrens, das in zwei chirurgischen Stufen die Rekonstruktion vorschlägt, wurde das Ergebnis durch den Einsatz von individualisierten Anpassungen dieser Operationstechnik ab dem Alter von 8 Jahren entscheidend verbessert [Staudenmaier, 2006, Staudenmaier et al., 2006]. Jedoch wird auch in naher Zukunft weiterhin die Entnahme von Rippenknorpel nötig sein (Abb. 4-3) [Staudenmaier, 2006]. Das äußere Ohr hat neben seinen funktionalen Aspekten im Bezug auf die Hörleistung auch

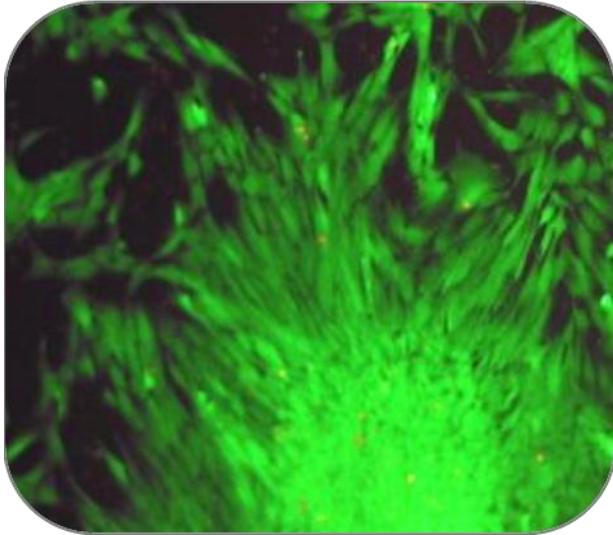
Einfluss auf das ästhetische Wohlbefinden. Funktionale Beeinträchtigungen sind beispielsweise für Brillenträger bedeutsame Probleme, die ein Ohrmuscheldefekt mit sich bringen kann. Oft kommt es zu einer Kombination dieser Aspekte. So gehen schwere kongenitale Malformationen des Ohres häufig neben der Missbildung der Ohrmuschel mit Atresien des äußeren Ohrkanals und Fehlbildung der Ohrknöchelchen einher. Wichtig ist deswegen die Anwendung eines gemeinsamen Therapieansatzes, der die unterschiedlichen Aspekte der Beeinträchtigung gleichermaßen erfasst. Es ist hier besonders nötig, neben der bestehenden gut etablierten operativen Rekonstruktionsmöglichkeit neue Verfahren der Ohrmuschelrekonstruktion zu entwickeln. Aufgrund der Aktualität des Themas beschäftigen sich viele wissenschaftliche Arbeitsgruppen mit den Möglichkeiten der Knorpelrekonstruktion. Die Komplexizität dieser Aufgabe erscheint aber auch vielerorts groß. Dabei muss versucht werden, den besonderen Eigenschaften des chondralen Gewebes gerecht zu werden indem die Versorgung des gezüchteten Knorpelgewebes durch das Blutssystem gewährleistet wird, obwohl humaner Knorpel als avaskuläres Gewebe auf die Diffusion durch das Perichondrium angewiesen ist. Ein Ansatz dazu ist die Integration des gezüchteten Knorpelgewebes in einen präfabrizierten Lappen [Staudenmaier et al., 2004, Staudenmaier et al., 2004]. Ziel dieser Forschungsrichtung, das auch das vorliegende Projekt verfolgt, ist die Bereitstellung einer Matrize für eine hyaline Chondrozytenbesiedelung und damit die Bereitstellung eines Zellträgers für ein cartilaginäres Tissue Engineering [Müller et al., 2006]. Die Anforderungen sind demnach eine hohe Porosität, eine adäquate Porengröße und eine Interkonnektion der Poren untereinander. Das Material darf nicht zytotoxisch sein und muss eine ausreichende Elastizität aufweisen. Gleichzeitig hängt der Erfolg des Tissue Engineerings schließlich noch von der Anwesenheit der Regulationssignale ab, die eine Neuentstehung von chondralen Gewebe erst ermöglichen [Müller et al., 2006]. Dabei ist der Einsatz von besonderem Fibrin-Gel als Zellträger von großer Bedeutung [Eyrich et al., 2007]. Schließlich muss die Übertragbarkeit der Ergebnisse von hyalinem Knorpel auf andere chondrale Gewebe wie dem Faserknorpel geprüft werden.

## 4.2 Diskussion der Auswahl des Spenderkollektivs und der Zielzellen

### 4.2.1 Humane Chondrozyten

In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden humane Chondrozyten verwendet, die zuvor nach

operationsbedingter Entnahme von Nasen- und/oder Rippenknorpel isoliert wurden. Es handelte sich dabei um chondrale Überreste, die bei Standardoperationen wie z.B. Nasenseptumkorrekturen im HNO-Operationssaal anfallen. Damit bestand die Selektion allein durch die unwillkürliche Auswahl einer repräsentativen Patientengruppe unterschiedlichen Alters und Geschlechts, deren Proben im Anschluss an den operativen Eingriff weiterverarbeitet wurden. Die Untersuchungen an humanen Chondrozyten wurden von der Ethikkommission der Universität Regensburg genehmigt. Es wurde nur hyaliner Knorpel verwendet, weil dieser bereits standardisiert zur chirurgischen Ohrrekonstruktion eingesetzt wird [Staudenmaier, 2006, Staudenmaier et al., 2006]. Ziel des Tissue Engineering der Ohrmuschel ist jedoch die physiologische Verwendung von elastischem Knorpel zur Ohrmuschelrekonstruktion. Dafür würde in Zukunft auch eine kleine Biopsieprobe zur späteren Generierung der Zellen genügen. In Abwägung von der Verfügbarkeit des hyalinen Knorpels und der nicht gewollten zusätzlichen traumatischen elastischen Knorpelbiopsie, wurden die Versuche jedoch stellvertretend an hyalinem Knorpel durchgeführt. Hyaliner Knorpel unterscheidet sich jedoch in der Zusammensetzung seiner Grundsubstanz von anderen Knorpelarten. Hauptbestandteil hyaliner Chondrozyten ist zu 60-70% Wasser. Die Trockensubstanz besteht zur Hälfte aus Kollagenen II und Glykanen. Dabei unterscheidet man Hyaluronsäure und Proteoglykosaminoglykane. Auch Mineralien gehören zu der Grundsubstanz. Der Namen hyalin entstammt dem Griechischen hyalos (Glas) aufgrund der fast durchsichtigen Grundsubstanz. Zu den speziellen Eigenschaften der Chondrozyten gehört die Fähigkeit, nach Isolierung der Zellen aus ihrem Gewebeverband zu dedifferenzieren, um nach einer kurzen Ruhezeit mit einer starken Proliferation zu beginnen [Holtzer et al., 1960]. Dabei zeigt sich nach fortlaufender Subkultivierung eine sukzessive Veränderung des morphologischen Erscheinungsbilds [Reichl, 2000]. So verändert sich die polygonale Gestalt immer mehr in eine fibroblastenähnliche Form und die Expression der hyalinen Matrixbestandteile wandelt sich hin zu einer dedifferenzierten fibroblastentypischen Matrixproteinexpression. Es kann gezeigt werden, dass mit zunehmender Passagezahl der kultivierten humanen Chondrozyten die Proliferationsrate sinkt. In der zweiten Passage werden zwar noch Raten bis zu 40% errechnet, wobei sich dieser Wert mit der Anzahl der Passagen bis auf Werte kleiner 5% in der achten Passage reduziert. Dieses Verhalten wurde bereits von Hayflick und Moorhead [1961] an normalen diploiden Fibroblasten geschildert und ist seitdem als Hayflick-Limit bekannt. Man kann vermuten, dass dieses Phänomen mit dem Alterungsvorgang humaner oder anderer Vertebraten-Zellen in Verbindung steht, auch wenn die genauen Vorgänge bis heute ungeklärt sind [Cristofalo und Pignolo, 1993]. Dabei geht man am ehesten von einem über p53 ausgelösten [Kulju und Lehman, 1995], oder anderweitig assoziierten Proliferationsstopp aus [Afshari et al., 1993, Atadja et al., 1995]. Da also nicht das Alter des chondralen Materials, sondern die Passage der Züchtung ausschlaggebend für ihre wissenschaftliche Verwertbarkeit ist [Reichl, 2000], werden Kulturansätze, die sich schon in der neunten Generation befanden, nicht mehr verwendet. Die mikroskopische Überprüfung der Zellmorphologie soll dabei ein weiterer Diskussionspunkt sein. Diese wird unter einem Lichtmikroskop durchgeführt. Dabei beobachtet man die Ausbreitung der Zellen auf dem Boden eines Kulturwells, betrachtet die schemenhafte Kontur der Zellkörper und beurteilt die Dichte der Population. Damit kann die Wachstumsgeschwindigkeit einer Zellgruppe gut verfolgt werden. Diese Methodik ermöglicht jedoch nicht zu überprüfen, ob die beobachteten Zellen vital oder bereits avital sind, da unter dem Lichtmikroskop keinerlei Unterschied im Anfärbeverhalten differenziert wird. Auch ist die Beurteilung der Zelladhäsion der Zellverbände oft schwierig. Gerade bei langsam wachsenden Populationen kann es nach einer 24-stündigen Wachstumsperiode zur Beob-



**Abb. 4-4**  
Proliferationsherd (Zellcluster), Vergr. 100fach

achtung von frei schwimmenden Zellen kommen, die sich noch nicht adhären auf dem Zellboden angesiedelt haben. Im Gegensatz dazu kann durch Manipulation an den Kulturflaschen eine zu lockere Adhäsion wieder gelöst werden. In der Abwägung der Vor- und Nachteile der Methodik wird jedoch das Ziel der Untersuchung, die Eignung der beobachteten Zellen zu bestätigen, nach einer Wachstumsperiode von 24 h erreicht. Das entscheidende Kriterium dafür ist die Zellanzahl und Dichte, nicht aber die Morphologie. Nach positivem Abschluss dieses Ausschlusskriteriums erfolgt die Passagierung der Zellen in einem Brutschrank. Dies ermöglicht optimale Wachstumsbedingungen bei 37,5 °C. Die Freisetzung der Zellen zur Passagierung aus

den Kulturflaschen erfolgt auf zweierlei Art. Entweder können die Zellen durch eine mechanische oder durch eine enzymatische Ablösung mittels Trypsin freigesetzt werden. Jede Methodik birgt dabei zu diskutierende Möglichkeiten der Zellschädigung. Bei der mechanischen Abschabung der Zellen vom Zellboden kann eine Schädigung der Zellstrukturen durch die schabende Ablösung des adhären Zellteppichs verursacht werden. Deswegen werden nur spezielle patentierte Zellschaber verwendet. Ein weiterer Unterschied der Methodik zeigt sich in der Möglichkeit der Zellvereinzelung. Eine Ansammlung der Zellen in Clustern ist in der mechanischen Ablösung wahrscheinlicher. Dies führt zu Clusterbildung, die auch bei Gabe durch ein Zellsieb nicht vollständig aufzulösen ist. Das Ergebnis wird im jeweiligen Proliferationsbild deutlich. Bei schlecht vereinzelt Zellen entstehen wie in der Abb. 4.4 gezeigt Proliferationsherde, die auf Grund der dichten Hyperproliferation eine einzelne Zellbegutachtung unmöglich machen. Im Gegensatz dazu ist die morphologische Auswertung bei der enzymatischen Ablösung mittels der Serinprotease Trypsin erleichtert, da hierbei die adhären Zelle nicht nur vom Boden der Kulturwells sondern auch interzellulär von den Nachbarzellen (regionale selektive Separation) gelöst werden. Dafür werden die adhären Zellen mit 5 ml Trypsin bedeckt und dieses unter leichtem Schwenken der Kulturflasche verteilt. Die Wirkung der Protease Trypsin ist temperaturabhängig (37 °C). Schon nach einer kurzen Inkubationszeit kann eine effektive Zellvereinzelung beobachtet werden. Dagegen zeigt sich auch bei dieser Methode ein Nachteil durch die Proteolyse bei zu langer Einwirkung auf die Zellen. Deswegen wird lichtmikroskopisch der Zeitpunkt der Zellauflockerung kontrolliert, um das Trypsin noch vor der Ablösung des Zellteppichs abzugeben. Dies verhindert einerseits eine verlängerte Enzymexposition der Zellen und andererseits dass sie mit der Trypsinlösung zusammen abgegossen werden. Durch diese Maßnahmen konnte in mehreren Probeversuchen gezeigt werden, dass sich erstens die Schädigungsgefahr bei der mechanischen Methode gravierender als bei der enzymatischen trypsinogenen Ablösung darstellt und zweitens auch die Vereinzelung der humanen Chondrozyten wesentlich schlechter gelingt. Deswegen wird die enzymatische Methode vor allem bei diesen Anforderungen eingesetzt. Die damit kultivierten oder vereinzelt humanen Chondrozyten fanden in der vorliegenden Arbeit nur im Rahmen Zytotoxizitätstests Verwendung. Eine Adaptation der Methode des Comet Assay in Verbindung mit der Mikrogelelektrophorese wäre jedoch generell wünschenswert, auch wenn dies zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung noch nicht standardisiert möglich war.

### 4.2.2 Humane Lymphozyten

Ein weiterer Gesichtspunkt der vorliegenden Arbeit ist die systemische Untersuchung der Zellen, die mit dem Transplantat oder seinen Abbauprodukten in Kontakt treten können. Als Vertreter des Immun- und damit des Blutsystems wurden humane Lymphozyten ausgewählt, um die systemische Wirkung der Reinsubstanzen 1,6-Hexandiol, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und 6-Hydroxyhexansäure zu simulieren. Dies hat mehrere Vorteile. Erstens sind Lymphozyten als Beispiel separierbaren Gewebes die standardisierten Zielzellen für die alkalische Mikrogelelektrophorese [Harréus et al., 2001, Kleinsasser et al., 2000, Kleinsasser et al., 2001]. Als etabliertes Verfahren konnte diese Methodik im Rahmen des Comet Assays für die hier geplanten Versuchsreihen leicht adaptiert werden. Ein zweiter wichtiger Grund für die Verwendung dieser Zellpopulation ergibt sich selbst durch die Funktion dieses korpuskulären Blutbestandteiles, da bei Zellen mit guter systemischer Verfügbarkeit ein Rückschluss der mutagenen Wirkung von in vitro auf in vivo zulässig ist. Damit ist es möglich die gewonnenen Daten als eine potentielle Wirkung stellvertretend für andere humane Körperzellen anzunehmen [Eisenbrand und Metzler, 2002]. Neben der Möglichkeit eines Rückschlusses von der Lokal- auf eine systemische Generalwirkung während des biologischen Abbaus des Zellträgers sind es auch die Lymphozyten, die durch Migration direkt aus dem Blutsystem austreten und in Kontakt zum Transplantat treten können. Dadurch gelangen die Lymphozyten über das Perichondrium an den eigentlich avaskulären Knorpel. Im Falle des Tissue Engineering der Ohrmuschel simuliert man das Perichondrium durch die Einbettung des gezüchteten Knorpels in einen präfabrizierten Lappen [Staudenmaier et al., 2004]. Drittens sind die Lymphozyten sehr leicht aus peripherem Gewebe wie venösem Vollblut zu gewinnen. Die Blutentnahmen (20 ml) über periphere venöse Zugänge wurden während chirurgisch operativer Eingriffe in der HNO-Abteilung der Universitätsklinik Regensburg durchgeführt. Die Patienten wurden gemäß dem Ethikantrag über die Verwendung aufgeklärt und ihr Einverständnis schriftlich dokumentiert. Bei jedweder Zellmanipulation wie Zentrifugation, Isolierung, Einfrieren und Auftauen kann es jedoch zu Zellschädigungen kommen. Deswegen wurde pauschal die Vitalität der Lymphozyten nach dem Auftauen als Maß einer möglichen Beeinträchtigung durch die Verfahrensweise bestimmt. Die Zellvitalität der verwendeten humanen Lymphozyten lag stets über 85%. Um gleiche Bedingungen für die Versuchsreihen zu gewähren, wurde nur mit Lymphozyten gearbeitet, die primär isoliert und gelagert waren. Die Aufbewahrung der Zellen im Gefrierschrank (-80 °C) wurde auf maximal 12 Monaten begrenzt, denn bei längerer Aufbewahrung können Einflüsse auf die Genotoxizitätsmessungen mit dem Comet Assay nicht ausgeschlossen werden [Rajae-Bebahani, 1999, Schmezer et al., 2001]. Diese negativen Effekte konnten bei kürzerer Lagerungsdauer nicht nachgewiesen werden. Die angewendete Methodik der Lymphozytenisolation erfasst alle im peripheren Blut befindlichen Lymphozytensubpopulationen anteilmäßig. Lymphozyten als Zellen der Immunabwehr befinden sich jedoch nur zu fünf Prozent im Blut, der Rest ist auf das interstitielle Bindegewebe und lymphatische Organe verteilt. Die systemische Bewegung erfolgt dabei amöboid. Lymphozyten als humane Körperzellen unterliegen den physiologischen Zellzyklen. Erwähnenswert ist hierbei eine beschriebene Abhängigkeit einer mit Comet Assay [Graubmann und Dikomey, 1983] gemessenen DNA-Schädigung vom Zellzyklus [Lett und Sun, 1970]. Da der Status des Zellzyklus jedoch nicht durch den Versuchsaufbau des Comet Assay berücksichtigt werden kann, ist eine abschließende Diskussion dieses Themas nicht möglich. Dennoch darf von einer statistischen Normalverteilung der Zellpopulation ausgegangen werden. Die Ergebnisse wurden deshalb in hoher Fallzahl bestätigt.

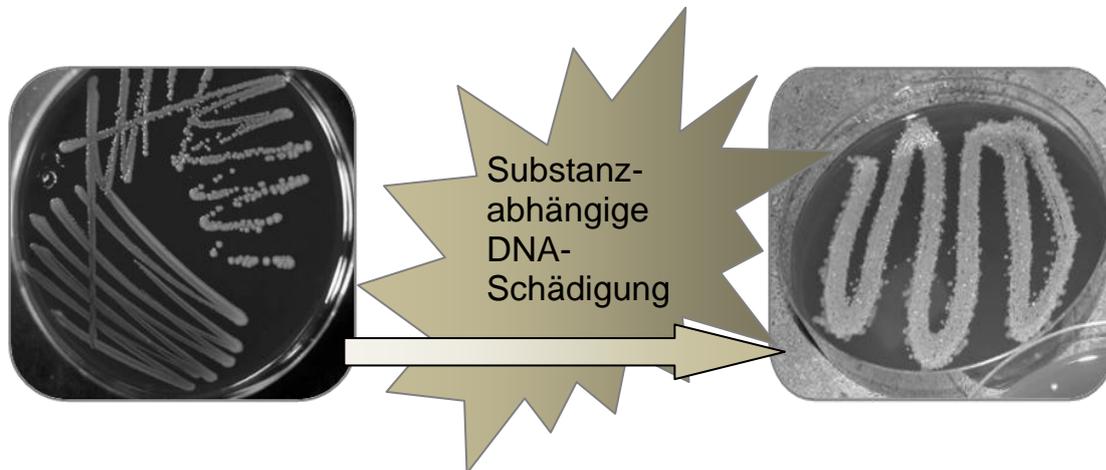
### 4.3 Diskussion der Methodik

#### 4.3.1 Der Comet Assay und die alkalische Einzelzellmikrogelelektrophorese (EMGB)

Die wissenschaftliche Prüfung von Fremdstoffen auf ihre Toxizität erfordert standardisierte Testverfahren. Diese sollen neben dem Ausschluss zytotoxischer Wirkungen, also der Einleitung von Apoptose und Nekrose einer Zelle, auch die genotoxische mutagene Wirkung eines Stoffes detektieren. Deswegen wurde mit dem Comet Assay für den Bereich der Genotoxizitätstests dieser Arbeit ein standardisiertes Verfahren der Mutagenitätsforschung ausgewählt. Zur Diskussion der Methodik zum Nachweis genotoxischer Auswirkungen von Xenobiotika auf eine Zielzelle müssen jedoch zunächst die Ebenen der Toxizität unterschieden werden. Es gilt dabei sowohl eine akute als auch eine chronische Toxizität auszuschließen. Spezifische Wirkungen wie die Genotoxizität werden durch *in vitro* Versuche beobachtet. In diese Untersuchungsgruppe fallen die Versuchsreihen mit dem Comet Assay. Pharmakokinetik, Wirkung auf das Reproduktionssystem, Verträglichkeit und Sensibilisierungspotenzial sind hingegen Ebenen der Kontrollmechanismen. Meistens wird dabei der *in vitro*-Test durch die nächst höhere Stufe der toxikologischen Prüfung von Fremdstoffen ergänzt, zu der beispielsweise die Tierversuche zu zählen sind. Der Bereich der Mutagenität stellt seit vielen Jahren einen wichtigen Teil der wissenschaftlichen Forschung dar. Dieser Zweig verwendet standardisierte Testverfahren zum Nachweis kanzerogener Wirkungen und deren Abhängigkeit von möglichen Polymorphismen in der Codierung der Reparaturkapazitäten [Abdel-Rahman und El-Zein, 2000]. Dabei waren die Grundlagen beobachtete Phänomene, die einen Zusammenhang zwischen einer Substanzexposition und einer mutagenen phänotypischen Wirkung vermuten ließen. Einen ersten Hinweis chemisch induzierter Erbgutveränderungen brachten Erkenntnisse während des ersten Weltkrieges mit dem Einsatz des Kampfstoffes Senfgas (2',2'-Dichlordiethylsulfid). Hierbei konnte eine Korrelation von Gaseinwirkung und Punktmutationen bzw. größeren chromosomalen Translokationen in dem Erbgut betroffener Soldaten nachgewiesen werden [Balling, 1998, Yamada, 1963]. Zu den chemischen Mutagenen gehören unter anderen Insektizide, Herbizide, Kosmetika und Nahrungsbeimischungen. In der Regel müssen jedoch alle neu synthetisierten Stoffe den Mutagenitätstests unterzogen werden. Die meisten Mutagene erweisen zusätzlich als kanzerogen. Zu beachten ist jedoch, dass abhängig von der Konzentration auch sonst unbedenkliche Substanzen mutagene Wirkung auf biologische Zellen entfalten können. Deswegen ist der generelle Umgang mit Chemikalien durch das deutsche Chemikaliengesetz geregelt, das fortlaufend aktualisiert und erweitert wird. Zusätzlich werden gültige Grenzkonzentrationen im Bereich der Arbeitsmedizin erstellt. In der Diskussion der Methodik ist jedoch zu beachten, dass die Verwendung des Comet Assays allein eine Aussage im Rahmen der *in vitro* Versuchsreihen zulässt. Mögliche *in vivo* Effekte, wie z.B. ein metabolischer First-Pass-Effekt (Pharmakokinetik), der zu einer entscheidenden mutagenen Veränderung der Substanz bei der ersten Passage führen könnte, war dabei nicht zu berücksichtigen. Damit konnte die Toxikokinetik, die ein Maß für die Empfindlichkeit eines Organismus darstellt, indem sie verantwortlich ist für die Konzentration am Wirkungsort, nicht dargestellt werden [Eisenbrand und Metzler, 2002]. Dennoch ist es durch die Verwendung des Comet Assay möglich, die Konzentration von mutagenen Stoffen in ungefährlichen Bereichen zu ermitteln, indem durch die Auswertung des Olive Tail Moments quantitative Aussagen über die Wirkung einer Substanz getroffen werden kann. Es gibt jedoch auch noch andere Möglichkeiten der Mutagenitätsforschung, deren Verwendung grundsätzlich auch für die vorliegende Fragestellung in Betracht kommen und deren Vor- und Nachteile im Folgenden kurz diskutiert werden sollen. Der Mikrokerntest hat durch seine einfachere Handhabung den zytogenetischen Test abgelöst. Dabei bilden Chromosomen bzw. Chromosomenbruchstücke so genannte Mikrokerne (Micronuclei). Diese sind in der Anaphase nicht regulär auf die Tochterkerne verteilte chromatinhaltige Partikel außerhalb der Zellkerne, die in

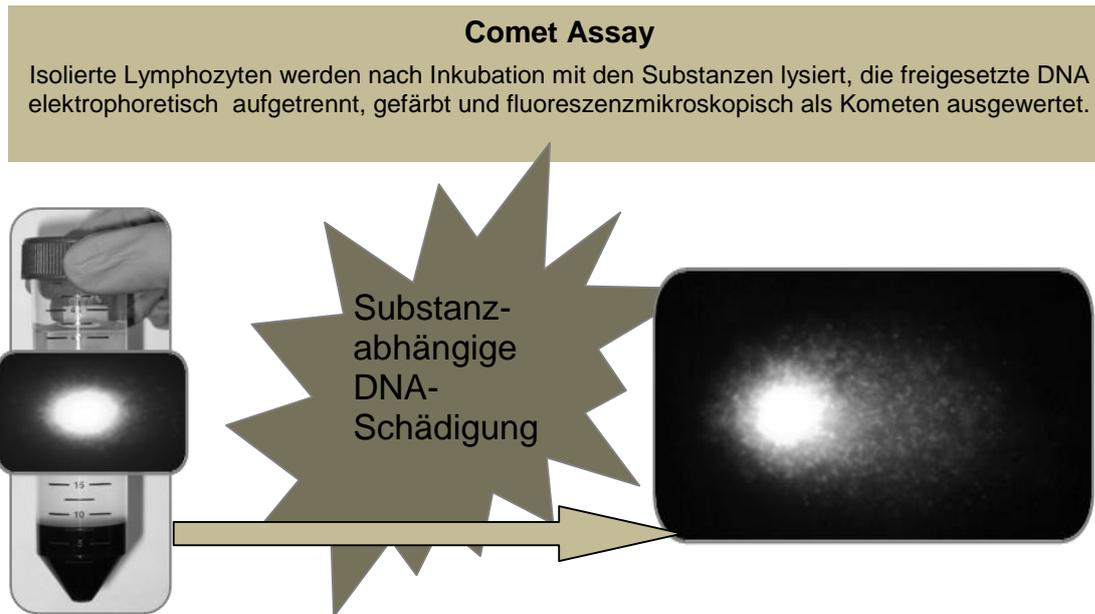
### Ames Test

Histidin-defiziente Bakterien vom Stamm *Salmonella typhimurium* werden nach Inkubation mit der Testsubstanz in Histidin-freiem Agar ausplattiert und die Mutagenität proportional zur Anzahl der gewachsenen Kolonien abgeschätzt



**Abb. 4-5** Grafische Darstellung der Grundlagen des Ames-Tests

der folgenden Interphase im Zytoplasma erscheinen. Der Mikrokerntest ist also ein *in vitro* Testverfahren, das Chromosomen- oder Spindelapparatschädigungen als Ausdruck genomischer Instabilität und eines fremdstoffinduzierten Defektes untersucht [Streffer, 1997]. Dadurch kann man sowohl Substanzen die Chromosomenbrüche verursachen (Klastogene) als auch Spindelgifte, die eine Störung der Chromosomenverteilung hervorrufen, nachweisen. Am häufigsten für den Mutagenitätsnachweis wird der Ames Test verwendet. Sein größter Vorteil besteht in seiner Einfachheit der Durchführung bei gleichzeitiger äußerst hoher Sensitivität auf Mutagenität. Weiter ist er billig anzuwenden, was zu einer schnellen Verbreitung des Verfahrens führte. Die Messung dieses Testverfahrens basiert auf rückwärtsgerichtete Mutationen in Salmonellen (Abb. 4-5) [Ames et al., 1973, Ames et al., 1975]. Dabei wird der Einfluss von Chemikalien auf die Rückmutationsrate eines histidinauxotrophen Revertanten getestet. Dieser kann im Vergleich zu anderen ohne den Zusatz von Histidin wachsen. Die grundlegende Idee der Methode ist also die Verwendung von Bakterienstämmen, die zur Bildung der Aminosäure Histidin nicht mehr in der Lage (*his*-) sind. Eine wesentliche Verbesserung bestand in der Veränderung der Zellwandstruktur der Salmonellen. Ziel war es die Zellwände der Bakterien durchlässiger zu machen. Damit wurde verhindert, dass eine unterschiedlich hohe Mutagenität auf Grund einer unterschiedlich hohen Penetrationsfähigkeit der Testsubstanzen zustande kam. Zusätzlich bekamen die verwendeten Bakterien plasmid-codierte Reparaturgene, deren Genprodukte effektiv DNA-Reparatur betreiben. So können keine letalen Mutationen mehr auftreten. Jedoch kommt es gleichzeitig durch die schnelle Reparatur häufig zum Einbau falscher Basen. Dies begünstigt die Entstehung von Punktmutationen, die das Ergebnis verfälschen können. Die Verwendung von Bakterien hat den Nachteil, dass die meisten Substanzen durch sie nicht metabolisch aktiviert werden können. Deswegen muss man *in vitro* durch Beimischung eines Leberextraktes die Metabolisierung der Testsubstanzen im Säugerorganismus simulieren. Dadurch ist es möglich auch die positive Reaktion von beispielsweise Aflatoxin B im Ames-Test nachzuahmen. Einer der größten Nachteile dieses Testverfahrens ist die Tatsache, dass mit dem Ames-Test keine Durchführung an humanen Zellen möglich und damit die Übertragung der Befunde auf den Menschen problematisch ist, da keine bzw. nur wenige Untersuchungen zur Pharmakokinetik und zum Metabolismus bekannt sind [Eisenbrand G. et al., 2005]. Jedoch konnte er sich für die Untersuchung verschiedenster chemischer Umwelttoxene etablieren. Weil er sich jedoch nicht mit



**Abb. 4-6** Grafische Darstellung der Grundlagen des Comet Assays

humanen Lymphozyten durchführen lässt, wurde auch dieser Test nicht zur Überprüfung der Genotoxizität in der vorliegenden Fragestellung ausgewählt. Eine weitere Möglichkeit des Mutagenitätsnachweises stellt der Schwesterchromatidaustausch-Test (SCE) dar. Damit werden reziproke Austausche der DNA zwischen zwei Chromatiden eines replizierten Chromosoms ermittelt. Die Grundlage ist also eine Schädigung der DNA auf Einzelstrangniveau, die wenn sie auf beiden Schwesterchromatiden gleichzeitig passiert zu einem aufbrechen des DNA-Stranges führt und damit in der Reparatur einen fälschlicherweise Austausch der Chromatidenstückchen zwischen den Schwesterchromatiden ermöglicht. Dies wird von den meisten Kanzerogenen verursacht. Deswegen ist der SCE ein sensibler Test zum Mutagenitätsnachweis. Nachteilig kann jedoch kein valider Rückschluss von der Stärke des induzierten SCE auf die Mutagenität einer Substanz gezogen werden, da es auch zu spontanen SCEs in der Replikation kommt [Eisenbrand G. et al., 2005]. Der Zusammenhang zwischen Mutation und SCE ist deswegen nicht eindeutig auszumachen [Speit, 1993]. Die alkalische Version der Einzelzellmikrogelelektrophorese (EMGB) und als Bestandteil des Comet Assays (Abb. 4-6) haben ein ähnliches Prinzip wie die Elutionstechniken. Der Comet Assay weist dabei hauptsächlich Einzelstrangbrüche nach. Dies ist sinnvoll, da Einzelstrangbrüche weitaus häufiger substanzinduziert sind als Doppelstrangbrüche. Gerade bei Fragestellung der Ökogenotoxikologie findet die alkalische Mikrogelelektrophorese Verwendung [Harreus et al., 2002, Harréus et al., 2001, Kassie et al., 2000, Kleinsasser et al., 2003, Kleinsasser et al., 2001, Tice et al., 2000]. Weitere mögliche Anwendungsgebiete sind unter anderen der Bestrahlungsnachweis von Lebensmitteln [Cerdea et al., 1997], die Messung der Genotoxizität von einzelnen Chemikalien [Belpaeme et al., 1996] sowie die Bestimmung spezieller Mutagenitätssensitivität [Kleinsasser et al., 1999, Kleinsasser et al., 2000, Kleinsasser et al., 2000]. Durch die vielfältigen Einsatzmöglichkeiten des Comet Assays hat sich dieses Testverfahren mittlerweile in mehreren Varianten zu einer etablierten Untersuchungsmethode entwickelt [Holz et al., 1995]. Dabei ermöglicht der Comet Assay als Kurzzeittestverfahren DNA-Schädigungen anhand quantitativer Auswertung darzustellen. Genotoxische Effekte von biologischen, physikalischen und chemischen Noxen oder Umweltstoffen werden durch dieses Testsystem genauso erfasst wie strahleninduzierte DNA-Schädigungen [Kleinsasser et al., 2000]. Ursprünglich wollte man durch diese Technik das Migrationsverhalten einzelner Zellen nach Bestrahlung unter Elektrophoresebedingungen evaluieren [Ostling und

Johanson, 1984], jedoch konnte gleichzeitig die DNA-Wanderung in Anodenrichtung proportional zu dem Ausmaß der induzierten Schädigung beobachtet werden. Voraussetzung für die Wanderung der DNA-Fragmente (Migration) im elektrischen Feld ist eine bestehende Schädigung des Kerninhaltes und das so genannte „unwinding“ der DNA, d.h. eine Auflösung der Verdrillung. Die entstandenen Bruchstücke der DNA haben eine elektrische Polarisation und wandern stets anodenwärts. Dabei sind die Wanderungsgeschwindigkeit und die Auftrennung der DNA-Fragmente Größen, die in erster Linie von der Konformation und der Länge der DNA, vom pH-Wert und der Zusammensetzung des Gelpuffers, von der elektrischen Spannung und von der Konzentration der Agarose im Gel abhängen. Diese Komponenten können einzeln oder als Gruppe die Ergebnisse des Comet Assays beeinflussen. Grundsätzlich ist der Logarithmus der elektrophoretischen Beweglichkeit der DNA-Moleküle bis zur Fragmentgröße 50 Kilobasen-Paare proportional zur Agarosekonzentration im Gel. Es kommt zum Bild eines Kometen als Ausdruck einer Kernschädigung. Dabei ist der Anteil der im Schweif des Kometen vorhandenen DNA in Relation zur ungeschädigten DNA im Kopf des Kometen umso größer, je höher die Fragmentierung des Erbgutes ist. Genauso wächst die Größe und Dichte des Schweifes mit dem Ausmaß der Genschädigung. Die Anteile der DNA im Schweif multipliziert mit der mittleren Wegstrecke gehen hierbei in den Olive Tail Moment ein [Olive et al., 1991, Singh et al., 1988, Tice et al., 2000], der somit ein Maß der DNA-Strangbrüche darstellt. Nicht abschließend ist zu klären, ob diese Form des Einzelstrangbruchnachweises durch die Fähigkeit einzelner Zellen beeinflusst ist, etwaige Schädigungen innerhalb von Stunden wieder reparieren zu können [Kammann, 1998]. Dieses wird auch als Kritikpunkt der Methodik des Comet Assay angefügt. Darüber hinaus kann ein geringer Teil der entstandenen DNA-Fragmente aus einer inkompletten Exzisions-Reparatur der DNA stammen [Speit und Hartmann, 1995]. Als Vorteil ist dem jedoch entgegen zu stellen, dass mögliche mutagene Läsionen der Zellen relativ früh nach der Exposition nachweisbar werden. Dies ist ein Grund der weiten Verbreitung dieses Testverfahrens [Singh et al., 1988] und dessen Etablierung in zahlreichen Forschungsgruppen. Die Voraussetzung für die Verwendung von Einzelzellen ist jedoch immer ein separierbares Gewebe. Dieses war durch die Verwendung von humanen Lymphozyten gegeben. Unter anderen Fragestellungen wäre sicherlich auch das jeweilige betroffene Gewebe zu berücksichtigen, solange es separierbar ist. Die Verwendung von humanen Chondrozyten ist aber nicht standardisiert möglich. Deswegen wurden die Genotoxizitätstest stellvertretend an humanen Lymphozyten durchgeführt. Jedoch ist beispielsweise gerade die humane Mukosa des oberen Aerodigestivtraktes ein häufig verwendeter Zelltyp [Harreus et al., 1999, Kleinsasser et al., 2001, Kleinsasser et al., 2000, Kleinsasser et al., 2001]. Die Ergebnisse dieser Versuchsdurchführung sind nur im Vergleich zu den Werten eines Positivansatzes valide. Dafür verwendet man als etablierte mutagene Substanz das MNNG (*N*-Methyl-*N'*-nitro-*N*-nitrosoguanidin). Im Vergleich zu einer Negativkontrolle kann man damit eine definierte Induktion von DNA-Strangbrüchen erzeugen. MNNG wird als eine beim Menschen wahrscheinlich kanzerogene Substanz eingestuft [Aoyagi et al., 2000, IARC, 1974]. Da MNNG jedoch hauptsächlich als experimentelles Mutagen und Karzinogen eingesetzt wird [Lewis, 2004], beschränkt sich eine mögliche Exposition vor allem auf Beschäftigte der wissenschaftlichen Forschungslabore [IARC, 1974]. Nitrosamine im Allgemeinen wurden jedoch in vielen Produkten des täglichen Lebens nachgewiesen. Vor allem befinden sie sich in Agrarchemikalien, Kosmetika, pharmazeutischen Produkten [Brown, 1999]. Die höchsten Mengen werden in Tabak und Tabakrauch gefunden [Abdel-Rahman und El-Zein, 2000, Hecht, 1999]. Als alkylierende Substanz trägt MNNG reaktionsfähige Gruppen, die unter spontaner Abspaltung eines  $N_2$  und eines  $OH^-$  elektrophile Alkylat-Ionen bilden, die mit DNA-Basen eine kovalente Bindung eingehen können. So kann MNNG nach Umwandlung zu einem Diazohydroxid DNA-Strangbrüche, chromosomale Aberrationen, Mikrokerne sowie Schwesterchromatidaustausch in Human- und Nagerzellen verursachen, [Aoyagi et al., 2000, Hsie et al., 1987, Slamenova et al., 1997]. Die kanzerogene und mutagene Wirkung wurde in zahlrei-

chen Studien nachgewiesen [Aoyagi et al., 2000, Harreus et al., 1999, Kleinsasser et al., 2000, Pool-Zobel et al., 1994, Slamenova et al., 1997]. Die unabhängig von einer metabolischen Aktivierung reproduzierbar auslösbaren DNA-Schäden machen MNNG zu einer geeigneten Positivkontrolle für genotoxische Wirkungen an humanen Lymphozyten, die bei der Auswertung von Versuchsserien mit dem Comet Assay dessen regelhafte Durchführung anzeigt. Die Fragmente der induzierten DNA-Kernschädigung werden durch die Anfärbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Dies ist ein in molekulargenetischen Labors gebräuchlicher Farbstoff, der eine fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Nukleinsäuren ermöglicht. Er ist den Acridinen strukturverwandt und wird wegen seiner hohen Affinität zur DNA zu deren Markierung eingesetzt. Ethidiumbromid interkaliert mit seinem Ringsystem zwischen die Basenpaare, wird dadurch fixiert und seine Fluoreszenz gegenüber freiem Ethidiumbromid in Lösung erhöht. Dies funktioniert sowohl in Einzelstrang- als auch in Doppelstrang-DNA. Kurzwelliges UV-Licht wird demnach von den Nukleinsäuren absorbiert und auf den Fluoreszenzfarbstoff übertragen. Längerwelliges UV-Licht wird hingegen von Ethidiumbromid direkt absorbiert und jeweils gleich als Energie im Bereich 590 nm, also sichtbares Licht orange-rot, emittiert. Da die Emission effizienter im Nukleinsäure-Ethidiumkomplex erfolgt, werden selbst kleine Nukleinsäuremengen im Hintergrund ungebundenen Ethidiumbromids sichtbar. Dadurch kann man das Erbgut einer Zelle fluoreszenzmikroskopisch darstellen. Die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) ermöglicht es mit Sonden spezifische Genloci anzufärben. Hierbei können entweder ganze Chromosomen markiert werden oder beispielsweise auch nur einzelne Regionen. Im Besonderen wurde hier eine Kombination von FISH und Comet Assay in humanen Schleimhautzellen etabliert [Harréus et al., 2004]. Diese Methodenerweiterung scheint in Zukunft eine genauere Lokalisation von Strangbrüchen zu ermöglichen und ist somit eine viel versprechende Erweiterung zur Beurteilung des genotoxischen Potenzials von Fremdstoffen in humanen Zielzellen wie Schleimhautzellen und Lymphozyten [Harreus et al., 2002].

### 4.3.2 Zytotoxizitätstests

Im zweiten Teil der Methodikdiskussion wird die Erfassung einer möglichen Zytotoxizität nach Substanzinkubation durch verschiedene Testverfahren beschrieben. Der zytotoxische Schaden durch eine Fremdschubstanz kann direkt oder indirekt zum Schaden der humanen Zielzellen *in vivo* führen. Die hier angewendeten Zytotoxizitätstests simulieren den direkten Kontakt *in vitro*. Dabei werden zwei unterschiedliche Ansätze der Toxizitätsforschung angewandt. Zum Einen die Toxizität im Sinne einer Induktion von Nekrose oder Apoptose der Zielzelle, zum Anderen im Sinne von morphologischer, zellstruktureller Schädigung. Für Ersteres wird als Nachweis angeführt, ob eine Substanz die Proliferation einer Zellpopulation einschränkt bzw. gar zum Absterben der Zellen führt. Für das Zweite gibt die Betrachtung der Morphologie einer Zelle Auskunft über mögliche zytotoxische Einflüsse. Ein Beispiel hierfür sind Fremdschubstanzen, die die Membranintegrität negativ beeinflussen. Dafür ist es wichtig sowohl quantitative als auch qualitative Beurteilungskriterien festzulegen. Die Ermittlung der Zellzahl wird durch das quantitative Maß der Zellproliferation ermittelt. Dafür werden automatische Teilchenzähler verwendet. Diese messen entweder den Widerstand oder die Leitfähigkeit der Zellen. Eine Weiterentwicklung der automatischen Zellzählung ist ein Ansatz der Kopplung des Verfahrens an eine Enzymreaktion. Damit kann eine wesentlich bessere Präzision im Vergleich zu einem individuellen Auszählen durch einen Beobachter in der Auswertung erreicht werden. Zusätzlich zu diesen direkten Zählmethoden haben sich auch indirekte Möglichkeiten der quantitativen Erfassung etabliert. Eine indirekte Form der Zellzahlbestimmung beruht auf der Verwendung radioaktiv markierter Moleküle. Durch Einsatz von radioaktiv markiertem Thymidin ( $^3\text{H}$ -Thymidin) kann z.B. die Proliferation der Population durch den Einbau der Radioaktivität in die DNA messbar gemacht werden, weil die DNA-Syntheserate ein entscheidender Faktor für die Zellproliferation ist. Weitere Möglichkeiten sind die

Messung des Gesamtproteingehaltes mittels chromogenen Farbstoffen oder der Umsatzrate zellulärer Enzyme als indirektes Maß der Zellproliferation. Für die quantitative Erfassung dieser Fragestellung wurde mit dem Proliferationstest mit Easy-For-You (EZ4U) gearbeitet, der auf der Umwandlung von Tetrazoliumsalzen in kräftig leuchtende Formazanderivate beruht. Auf dieser Grundlage basieren zwei unterschiedliche indirekt quantitative Testverfahren. Der MTT-Test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid-Test weist dabei genauso wie der Proliferationstest mit EZ4U die mitochondriale Stoffwechselaktivität vitaler Zellen nach. Diese Testverfahren ermitteln anhand der gemessenen Extinktionswerte einen quantitativen Wert für die Zellproliferation. Die Idee dieses Verfahrens wurde schon in dem Jahr 1956 etabliert. Sie beruht auf der Verwendung eines Tetrazoliumsalzes als Indikator für die Zellvitalität [Hansen et al., 1989, Mosmann, 1983, Wiedmann-Al-Ahmad et al., 2002]. Die Umwandlung des Salzes bewirkt eine starke Veränderung der Extinktion, die man photometrisch z.B. in einem Mikrotiterplattenleser messen kann. Um Confounder auszuschließen wurde zusätzlich mit einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen. Es besteht ein direkt proportionaler Zusammenhang zwischen der Extinktionsänderung und der Mitochondrienvitalität. Mitochondriale Stoffwechselleistungen sind dabei ein sehr zuverlässige Parameter, weil die Mitochondrien schon 15 Minuten nach dem Absterben einer Zelle inaktiv werden. Durch die Verwendung des EZ4U-Kits konnte der zeitliche Aufwand im Vergleich zu dem MTT- oder  $^3\text{H}$ -Thymidin-Test wesentlich reduziert werden [Carmichael et al., 1987]. Der Proliferationstest ist gut etabliert und wurde über die Jahre stetig weiterentwickelt. Als möglicher Nachteil des Verfahrens wird diskutiert, dass das verwendete Tetrazoliumsalz selbst oder der gebildete Chromophor toxischen Einfluss auf die Zellen nehmen könnte. Für diese Hypothese findet sich jedoch in der Literatur keinerlei Bestätigung. Auch ist zur Versuchsdurchführung eine Vereinzelnung der Zellen vorausgesetzt. Diese kann nur durch eine Trypsinierung der Zellen vor dem Ansatz eines EZ4U-Proliferationstests erfolgen. Trypsin vermag als proteolytisches Enzym extrazelluläre Proteine zu spalten. Damit werden interzelluläre und adhäsive Bindungen gelöst. Obwohl bei kurzer Einwirkungszeit auf die Zellen kein toxischer Einfluss auf die Zellstruktur bekannt ist, kann dieser bei längerer Exposition nicht ausgeschlossen werden. Neben dieser Art der indirekt quantitativen Proliferationserfassung wurden auch qualitative Verfahren zur Zytotoxizitätsuntersuchung verwendet. Ziel ist hierbei der Nachweis morphologischer Veränderungen bei Zytotoxizität. Dafür kommen lichtmikroskopische sowie fluoreszenzmikroskopische Vitalfärbungen in Betracht. Die lichtmikroskopische Auswertung des Vitalitätsstatus erfasst alle bekannten Methoden, die in umgekehrten Mikroskopen anwendbar sind. Am gebräuchlichsten ist dabei die Untersuchung mittels der Phasenkontrastmikroskopie. Sie kann mit den Färbelösungen von Trypanblau, Erythrosin B, Nigrosin, Eosin Y, Naphtholschwarz oder Fast Green durchgeführt werden, die sich in ihrer chemischen Zusammensetzung der Farbstoffmoleküle und damit in ihrer Art der Färbung unterscheiden. Diese Art der Vitalitätstestung wird auch Viabilitätstestung genannt. Die Färbung kann durch die Zellen für längere Zeit ohne eigene Schädigung ertragen werden. Dabei umfasst die Auswertung neben der Beurteilung der Proliferation vor allem die Beurteilung der vitalen Zellstrukturen als bestimmende Größe. Entscheidend ist, ob die Morphologie der Zelle der Norm entsprechend, anormal oder präformiert normal erscheint. Dabei können vielerlei Faktoren eine wichtige Rolle in der morphologischen Bewertung spielen. Zu diesen Faktoren zählen neben den chemischen Merkmalen des Farbstoffs auch die Konstitution der Zellstruktur. Durch ein standardisiertes Vorgehen der Auswertung ist eine Vergleichbarkeit der Zellen untereinander und im Vergleich zu einem Kontrollansatz möglich. Als Vorteil der subjektiven Betrachtung ist die individuelle Beurteilung der Zellstruktur anzusehen. Die Subjektivität kann jedoch auch als Nachteil angesehen werden. Für die Zytotoxizitätstests an humanen Lymphozyten wurde die qualitative und semiquantitative Methodik der Zellfärbung mit Try-

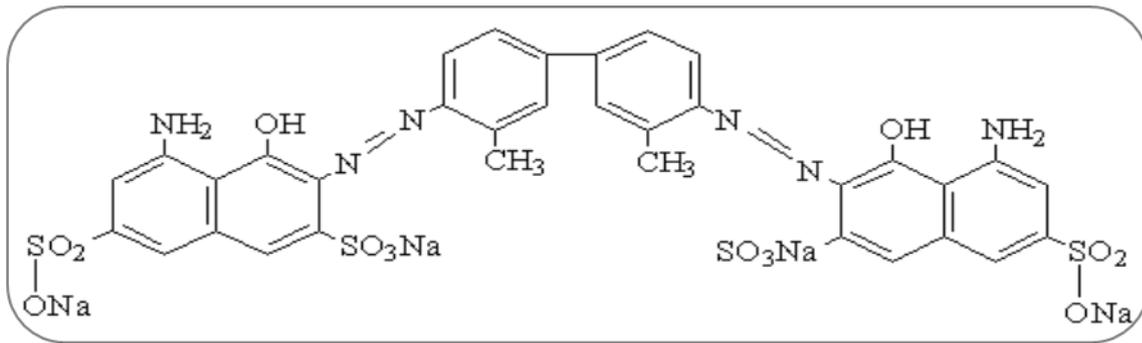
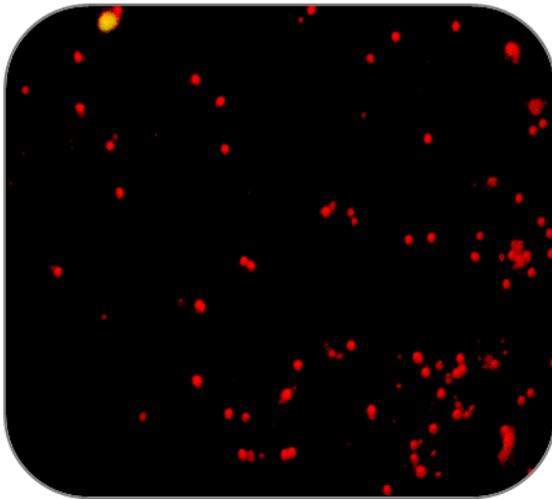


Abb. 4-7

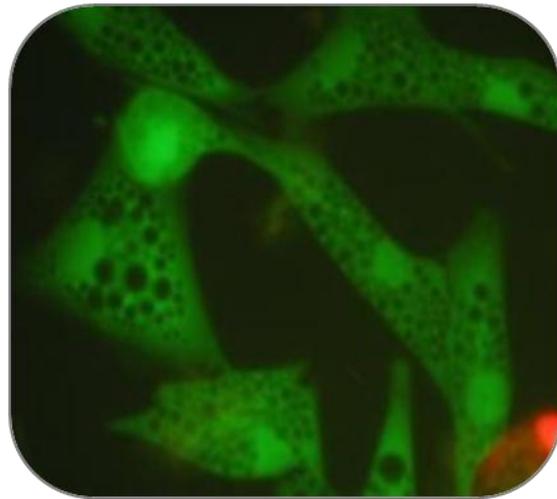
Zur Feststellung der Qualität eines Einfrierprozesses stellt sich als einfache Methode der Trypanblau-test dar. Abgebildet ist die Strukturformel des Trypanblau als schwach basischer Farbstoff mit der Summenformel  $C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$  und einer molaren Masse von 960,8 g/mol

panblau gewählt (Abb. 4-7). Schon 1909 wurde diese von Goldmann eingeführt, indem er den sauren Farbstoff Trypanblau zu vitalen und avitalen Zellen zugab [Goldmann, 1909]. Dabei stellte sich heraus, dass die Membran vitaler Zellen undurchlässig für diesen Farbstoff ist, aber nach Absterben der Zellen durchlässig wird. Die Folge ist eine Blaufärbung avitaler Zellen. Aus dieser Beobachtung wurde der Trypanblautest entwickelt. Dabei wird der prozentuale Anteil der vitalen im Vergleich zu den avitalen Zellen einer Population ermittelt. Entscheidend ist die standardisierte Durchführung hinsichtlich des zeitlichen Ablaufes, der Temperatur und der Farbstoffkonzentration, da diese Faktoren Einfluss auf die Auswertung haben. Hauptsächlich können die Ergebnisse durch einen zu hohen Anteil an Serum in der Testlösung verfälscht werden, da Serumproteine eine hohe Affinität zu dem Farbstoff hat. Zu beachten ist auch, dass dieser Test als qualitativer, semi-quantitativer Vitalitätstest nur die Vitalität einer Zelle erfasst, jedoch keine Aussage über die Proliferationsfähigkeit derselben geben kann [Sellner, 1988]. Um die Zytotoxizität der Substanzen an humanen Chondrozyten zu überprüfen, wurde eine Vitalfärbung basierend auf Fluoreszenzfarbstoffen verwendet. Die Färbung mit PI und FDA erlaubt es, relativ schnell neben einer semiquantitativen Beurteilung auch eine qualitative Aussage zur Zellproliferation zu erstellen. Dabei kann zusätzlich der Proliferationsgrad der Population anhand der Dichte des gewachsenen Zellteppichs festgestellt werden, wobei die Vitalfärbung nur bedingt zur Quantifizierung der Zellzahl einsetzbar ist. Durch die unterschiedliche mikrobiologische Wirkung des PI/FDA ist jedoch eine Aussage über die Vitalität der Population zu treffen. Propidiumiodid ist ein fluoreszierender Farbstoff, der nach der Interkalierung in die DNA rötlich darstellt. Mit zunehmender Membrandysfunktion, die bei Nekrose und Apoptose der Zellstruktur auftritt, wird PI vermehrt in die Zellen aufgenommen. Die Folge ist eine Rotfärbung unter der mikroskopischen Betrachtung. Vitale Zellen speichern das PI in Vakuolen, die DNA-Interkalierung wird damit verhindert. Dieser Mechanismus geht jedoch avitalen Zellen verloren. Im Gegensatz dazu wird FDA in den Zellmembranen intakter Zellen umgesetzt. Die Folge ist die Fluoreszenz aller vitalen Zellstrukturen. Durch die Verwendung unterschiedlicher Filtersysteme wird dieser Effekt noch verdeutlicht. Der Grünfilter stärkt den Kontrast der abgebildeten Strukturen. Damit werden hauptsächlich die avitalen Zellkörper besser dargestellt. Durch den Blaufilter, der die roten Lichtanteile herauszufiltern vermag, kann eine bessere Beurteilung der vitalen Zellstrukturen durchgeführt werden. Eine Vereinzelung der Zellen ist nicht nötig. Die Chondrozyten können also zur Versuchsdurchführung mechanisch mit einem Zellschaber vom Flaschenboden entfernt werden. Eine mechanische Schädigung der Zellen ist zwar möglich, wurde aber nicht beschrieben. Die Ergebnisse dieser Vitalfärbung wurden photodokumentiert und katalogisiert (Abb. 4-8 und 4-9). Zusätzlich zur Beurteilung der reinen Zellvitalität anhand der Unterscheidung des Anfärbeverhaltens wurde eine morphologische Beurteilung der Zellkörper durch-



**Abb. 4-8**

Betrachtung avitaler Chondrozyten unter Verwendung des Grünfilters nach Färbung mit PI/FDA (50fach)



**Abb. 4-9**

Beispiel einer substanzinduzierten Vakuolisierung der Zellausläufer (200fach)

geführt. Dabei wurde besonders auf substanzinduzierte Veränderungen geachtet. Zu diesen gehört beispielsweise als Zeichen einer beginnenden toxischen Schädigung die Vakuolisierung der Zellausläufer (Abb. 4-9). Durch Korrelation mit dem quantitativen Ergebnis des EZ4U-Tests wird die Spezifität und Sensitivität des Testverfahrens verbessert und die interindividuelle Variabilität der Beurteilung minimiert. Dem Risiko einer variablen Fehleinschätzung wird durch den Abgleich mit einer Negativkontrolle begegnet. Dennoch bleibt der subjektive Charakter der Auswertung einer der wichtigsten Nachteile dieses Testverfahrens. Deswegen ist es sinnvoll verschiedene Testverfahren in Kombination zu verwenden. Durch die Wahl multipler Testsysteme vermeidet man die Gefahr eines falsch negativen Ergebnisses. Dieses ist in der vorliegenden Arbeit durch die Kombination unterschiedlicher Zytotoxizitätstests erfolgt. Gleichzeitig war es für das Verfahren sinnvoll, vor den Untersuchungen zur Genotoxizität, Zytotoxizitätstests durchzuführen. Dabei können schon im Vorfeld die Konzentrationen, die zur Nekrose bzw. Apoptose der Zellen führen, ermittelt werden. Diese Konzentrationen wurden als zytotoxische Schwellenkonzentration bezeichnet. Um die Gefahr von Confoundern zu mindern, wurden alle Ansätze unabhängig von der Versuchsplanung gleich behandelt. Dies ermöglichte einen Vergleich zwischen einer Negativkontrolle und der dazugehörigen Versuchsprobe. Allerdings fand bei diesen *in vitro* Untersuchungen die Toxikokinetik keine Beachtung. So bleibt unbeantwortet, ob aktive Metabolit eventuell erst nach der Leberpassage (First-Pass-Effekt) oder nach Bildung in metabolisch kompetenten Zellen wirksam werden.

### 4.3.3 Diskussion der statistischen Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Datenprogramms SPSS<sup>TM</sup> 11.5 durchgeführt. Dabei kommen mit dem Wilcoxon- und dem Friedmann-Test zwei verschiedene Testverfahren zur Anwendung. Die gewonnenen Daten zur Zyto- und Genotoxizität werden auf eine vorhandene Dosis-Wirkungsbeziehung hin untersucht. Hierbei wird der Wilcoxon-Test für die Gegenüberstellung der Genotoxizität an Lymphozyten gleicher Spender im Vergleich zu OTM-Werten als quantitatives Maß für DNA-Migration verwendet. Der Wilcoxon-Test ist ein parameterfreier und verteilungsunabhängiger Test, der wie der Friedman-Test auf Rängen basierend zwei verbundene Stichproben auf signifikante Unterschiede hin überprüft. Die zu testenden Grundgesamtheiten sollen dabei eine stetige Verteilung von gleicher Form haben und mindestens intervallskaliert sein. Entscheidend

für die Beurteilung ist eine gegebene Signifikanz im Vergleich zu der Negativkontrolle. Dieser Unterschied wird als p-Wert angegeben und mit dem allgemeinen Signifikanzniveau verglichen. Das allgemeine Signifikanzniveau ist bei  $p = 0,05$  bzw. 5% festgelegt. Wenn also der p-Wert zweier verbundener Stichproben unter diesem Signifikanzniveau von 0,05 liegt, ist ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden verglichenen Proben feststellbar. Da aber auf Grund multipler Paarvergleiche in der gleichen Grundgesamtheit das Phänomen der Alphafehler-Kumulierung auftritt, kommt zusätzlich eine Bonferroni-Holm-Korrektur zur Anwendung. Dabei wird ausgehend von einem globalen Signifikanzniveau auf ein lokales Signifikanzniveau algorithmisch geschlossen. Dem hingegen eignet sich der Friedman-Test zum Vergleich mehrerer verbundener Stichproben in einer Grundgesamtheit. Damit ist eine statistische Einordnung einer generellen Dosis-Wirkungsbeziehung möglich. Grundsätzliches Ziel der statistischen Auswertung ist die Nullhypothese bzw. die Alternativhypothese zu stärken oder zu verwerfen. Dabei besagt die Nullhypothese, dass kein signifikanter Unterschied zwischen zwei Stichproben messbar ist. Die Alternativhypothese vertritt jedoch das Gegenteil. Durch die Anwendung zweier statistischer Testverfahren soll die Verfälschung der analytischen Aussagekraft minimiert werden. Dennoch ist immer zu beachten, dass diese Analyse abhängig von der Fallzahl fehleranfällig ist. Als Leitmethode wurde der Wilcoxon-Test festgelegt, der mit seinem Aufbau am besten mit der gestellten Fragestellung übereinstimmt. Als Nachteil der Berechnung des Signifikanzniveaus ist anzuführen, dass ein signifikanter Unterschied nie gleichzeitig eine Aussage über die Art des Unterschiedes machen kann. Um die Art des Unterschiedes zu benennen, sollen die Grafiken deswegen mit den statistischen Analysen im Zusammenhang betrachtet werden.

### 4.4 Diskussion der Testsubstanzen

Die Testsubstanzen dieser Arbeit sollen in einer Matrix Verwendung finden, die als Zellträger für das Tissue Engineering bzw. des Rapid Prototypings der Ohrmuschel geplant ist. Die Matrix soll eine adäquate Zellfunktion wie Zellmigration, Proliferation und Differenzierung erlauben [Müller et al., 2006]. Gleichzeitig muss sie die Gewebeentwicklung zur Regeneration des äußeren Ohres unterstützen. Dabei wird durch eine theoretisch formulierte Zusammensetzung die Anforderung an den Zellträger erfüllt. Bioabbaubarkeit, Formbarkeit und Offenporigkeit sind dabei die Säulen der Funktionsidee. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich jedoch nur mit der Biodegradation und dessen Folge. Weder der Zellträger selbst noch seine Abbauprodukte dürfen toxischen Einfluss auf den Körper nehmen. Die theoretische Zusammensetzung scheint dabei den Ansprüchen der biologischen Anforderungen an den Zellträger am besten zu genügen. Deswegen wird ausgehend von diesen Konzentrationen ein Schwellenwert bestimmt. Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte Überprüfung der Substanzen dient nicht einer Testung der Zusammensetzung des Polymers hinsichtlich der Substanzwahl. Vielmehr soll eine Kontrolle einer möglichen Substanzkonzentration in dem Polymer erfolgen, das schließlich einmal Grundgerüst (Matrize) zur Besiedelung mit humanen Chondrozyten Verwendung findet. Dafür erfüllen die Reinsubstanzen jeweils unterschiedliche Funktionen in dem Polymer. Das 1,6-Hexandiol dient als ein Teil der Diolkomponente des Polyurethans (Polycaprolacton). Dabei ergänzt es sich mit dem zweiten Teil, der 6-Hydroxyhexansäure. Die Diole spielen als Komponenten der Polyurethane, Polyester und als Zwischenprodukt für Pharmawirkstoffe eine erhebliche Rolle. 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en wird als organische Base in dem Polycaprolacton verwendet. Als alkalische Substanz gehört es in die Gruppe der Isocyanate. Diese besitzen eine große Reaktionsfähigkeit, die zwar verantwortlich ist für eine relativ große Giftigkeit, die aber auch den viel benutzten Einsatz als Katalysator in der organischen Chemie erklärt. Zusammen mit den anderen Bestandteilen soll es als festes Gerüst stabiler Adhäsionspartner für die Chondrozyten sein. Dieses Ziel kann nur durch einen biokompatiblen, resorbierbaren Werkstoff in Form eines dreidimensionalen Trägergerüsts

tes erreicht werden, das mit körpereigenen autogenen Zellen besiedelt ist. Es führt zu natürlichem Knochen- bzw. Knorpelwachstum, indem es ein allmähliches Hineinwachsen in die geformte Struktur ermöglicht. Dazu kann man das Stützmaterial exakt nach dem Defekt formen. Es löst sich dann mit dem Wachstum der körpereigenen Knorpelstruktur auf. Endpunkt des Heilungsprozesses ist also ein komplett geschlossener Defekt ohne das Vorhandensein von Fremdmaterial.

### 4.5 Diskussion der Ergebnisse und deren Interpretation

Als Risiko ist nach Definition der Weltgesundheitsorganisation die zu erwartende Häufigkeit unerwünschter Effekte, ausgelöst durch die Exposition gegenüber einem Fremdstoff, zu sehen. Dem hingegen gilt als Gesundheitsgefährdung die Wahrscheinlichkeit, mit der eine chemische Substanz eine unter den aktuellen Bedingungen von Produktion oder Anwendung eine unerwünschte Wirkung auf die Gesundheit hervorruft [Neubert, 1997]. Entscheidend für den Einsatz einer Substanz *in vitro*, *ex vivo* und *in vivo* ist das Ergebnis einer Risikoabschätzung. Dies gilt in besonderem Maße für die Exposition von kanzerogenen Stoffen auf menschliche Zellen. Dabei kann man nicht von einer immer gleichen Dosis-Wirkungsbeziehung ausgehen. Neben der Möglichkeit eines deterministischen Schadens, also eines Schadens, der jenseits eines Schwellenwert auftritt, muss man auch einen stochastischen Schaden in Betracht ziehen. Dieser kann also auch entstehen, ohne dass ein definierter Schwellenwert erreicht wird. Um das Risiko nun adäquat abschätzen zu können, muss man sowohl die Rate der unerwünschten Wirkungen als auch die Größe der exponierten Population kennen. Dadurch kann man das Risiko abwägen, ob durch eine Noxe eine Krebsentstehung verantwortet wird. Jedoch ist auch hier der interindividuelle Unterschied der exponierten Bevölkerung unbeachtet. So ist anzunehmen, dass ein großer Unterschied in der Konstitution, Geschlecht, Alter und Gesundheitszustand diese Risikoabschätzung verfälschen kann. Entscheidend für die Wirkung einer Substanz ist also neben der Dosis sowohl die Toxikokinetik als auch die Toxikodynamik. Toxikokinetische Daten beschreiben die Substanzwirkung am Wirkungsort. Die Toxikodynamik hingegen steht als Maß für die Empfindlichkeit des Organismus [Eisenbrand und Metzler, 2002]. Darin liegt auch die Problematik dieser Fragestellung, da viele dieser Faktoren im Vorfeld nur schwer abschätzbar sind. Auch ist davon auszugehen, dass die Expositionszeit eine bestimmende Komponente ist. Diese kann auch nur theoretisch simuliert werden. Deswegen muss man in Zukunft darüber hinaus versuchen, spezifische Mutagensensitivitäten und DNA-Reparaturkapazitäten zu untersuchen. Es ist weiter zu beachten, dass eine unterschiedliche Ausstattung und Aktivität von Enzymen die jeweiligen Untersuchungsergebnisse verändern können. Verschiedene Polymorphismen in Reparaturgenen können die Expression eines Reparaturproteins vermindern und damit die Reparaturkapazität einschränken [Abdel-Rahman und El-Zein, 2000, Hill et al., 2005]. Eine Risikoabschätzung sollte deswegen niemals nur monosystemisch sein, sondern interagierende Multisysteme beinhalten. So ist auch die vorliegende Arbeit bestrebt, unterschiedliche Datenbereiche zu berücksichtigen. Neben Zytotoxizitätsuntersuchungen an humanen Lymphozyten und Chondrozyten wurden auch Genotoxizitätsuntersuchungen an Lymphozyten durchgeführt. In der vorliegenden Arbeit wurde für jede der drei untersuchten Stoffe eine maximale Schwellenkonzentration bestimmt, die unter den in den Versuchen angelegten Maßstäben keine zytotoxischen und genotoxischen Schäden auf Zellen provoziert. Dies kann die Grundlage für die Komposition eines Polymers aus diesen Substanzen sein. Für das 1,6-Hexandiol ergibt sich so ein Maximalwert von 5 mg/ml, für DBU 0,5 mg/ml und für die 6-Hydroxyhexansäure 0,028 mg/ml. Die Schwellenwerte sind als Richtwerte für eine Prüfung der Substanzkonstellation in den jeweiligen weiterführenden Testsystemen zu verwenden, da die erwünschte Funktionalität der Polymatrize unter der Konzentrationsveränderung nicht erzeugt werden könnte. Eine Interaktionswirkung der Substanzen untereinander ist zusätzlich nicht ausgeschlossen. Auch bleiben Fragen wie zum Beispiel die genotoxische Wirkung der

Matrixreinsubstanzen auf humane Chondrozyten offen. Dazu müsste man die Methodik des Comet Assays auf die Verwendung an humanen Chondrozyten erweitern. Zum Zeitpunkt der wissenschaftlichen Untersuchung war diese aber nicht etabliert. Eine weitere Unwägbarkeit ist die Feststellung der realen Konzentrationen, denen die möglichen Zielzellen einer toxischen Wirkung im Körper ausgesetzt sind. Unter Annahme einer kontinuierlichen Verteilung der Abbauprodukte im Organismus würde es hypothetisch durch den langsamen Abbau der Matrix zu wesentlich geringeren Substanzkonzentrationen im Blut kommen. Schließlich ist auch die Verwendung von isolierten Zellen für die entsprechenden Toxizitätstests wesentlich abstrakter als die Untersuchung des gesamten Organismus und muss deshalb auch in Tierversuchen überprüft werden [Kammann, 1998]. Damit kann auch ein metabolischer First-Pass-Effekt der Abbauprodukte erfasst werden. Wichtig wie bei jeder Dateninterpretation ist es zudem die Möglichkeit des Vorhandenseins von Confoundern in Betracht zu ziehen, die in wissenschaftlichen Untersuchungen nur schwer auszuschließen sind. Dies sind Faktoren, die einen zusätzlichen Einfluss auf den Zusammenhang von Prüfsubstanz und untersuchtem Effekt haben können, ohne dass diese vom Untersucher als solche erkannt werden. Im Bereich der Genotoxizitätsuntersuchungen ist beispielsweise eine Erhöhung des genetischen Schadens durch Lichteinfluss zu erwarten. Um diesen Effekt zu begegnen, ist auf eine bestmögliche Standardisierung von Testverfahren unter Lichtabschluss zu achten. Die Versuche wurden deswegen nur in abgedunkelten Räumen durchgeführt. Den Ergebnissen zur Genotoxizität wurde immer eine Positivkontrolle gegenübergestellt, die statt mit der zu untersuchenden Reinsubstanz mit MNNG inkubiert war. Durch die Verwendung einer Positiv- und einer Negativkontrolle gelingt es im Bereich experimentell erfasster Daten die Vergleichbarkeit verschiedener Forschungsergebnisse zu gewährleisten. Die Daten müssen dennoch in Relation zu der eingesetzten Substanzdosis und der Fallzahl gesehen und kritisch hinsichtlich möglicher Interpretationsdifferenzen betrachtet werden. Beispielsweise kann bei geringer mutagener Wirkung auch nur ein geringer Effekt erzielt werden, der zu unterschiedlicher Bewertung führt. Diesem kann durch die statistische Analyse begegnet werden. Hier entscheidet schließlich das Signifikanzniveau über die Güte der Aussage. Auch kann über hohe Fallzahlen und Präzisionskontrollen der zufällige Fehler ausgeschlossen werden. Systematische Fehler werden mit Richtigkeitskontrollen überwacht. Die Möglichkeit eines groben Fehlers soll durch qualifiziertes und strukturiertes Arbeiten verhindert werden. Im Folgenden sollen die substanzspezifischen Ergebnisse nochmals in eigenen Unterkapiteln diskutiert werden. Dabei soll vor allem auf Besonderheiten und wichtige Details zur Ergebnisinterpretation kurz eingegangen werden.

### 4.5.1 1,6-Hexandiol

Zur Toxizität von 1,6-Hexandiol liegen kaum Daten vor. Die akute Toxizität ist äußerst gering. Die orale  $LD_{50}$  für Ratten beträgt 3730 mg/kg. Es gibt keine Hinweise auf ein krebserzeugendes Potential, die Substanz ist nach EG-Richtlinien nicht kennzeichnungspflichtig [Anon, 2009]. Das Ergebnis der hier vorgestellten *in vitro* Untersuchungen zeigt, dass für 1,6-Hexandiol bei der Schwellenkonzentration von 5 mg/ml kein zytotoxischer Einfluss auf humane Chondrozyten und kein zyto- und genotoxischer Einfluss auf humane Lymphozyten im Testsystem nachweisbar ist. Die unter 3.1.1 abgebildete Dosis-Wirkungsbeziehung zur Zytotoxizität an humanen Chondrozyten macht in der Fallzahl  $N=12$  eine signifikante Abhängigkeit von der exponierten Konzentration deutlich ( $p < 0,001$ ). Grafisch ist dabei ein Abbruch der Proliferationsrate bei  $\geq 10$  mg/ml aufgezeigt. Morphologisch kann jedoch diese Konzentrationsgrenze nicht bestätigt werden, da die Zellstruktur nach Begutachtung der Vitalfärbung mit PI und FDA unter dem Fluoreszenzmikroskop auffällig war. Die Werte der Extinktion in Absorbent Units sind dabei bei der Konzentration 5 mg/ml geringgradig höher als die des Kontrollansatzes (Fallzahl  $N=43$ ). Ein proliferationssteigernder Stimulus der Substanz konnte jedoch von den angewandten Testsystemen nicht erfasst werden. Die Ergebnisse der Untersuchung der substanzspezi-

fischen Zytotoxizität an humanen Lymphozyten ergeben keinen signifikanten Unterschied und können damit die Zytotoxizitätstests an humanen Chondrozyten im Wesentlichen bestätigen. In Abb. 3-6 sind die Ergebnisse der Genotoxizitätsuntersuchungen aufgezeigt. Die schon durch Zytotoxizitätsversuche vermutete Schwellenkonzentration von 5 mg/ml befindet sich im Bereich des OTM der Negativkontrolle. Damit kann davon ausgegangen werden, dass unterhalb dieser Schwellenkonzentration weder die Proliferation humaner Chondrozyten gehemmt noch eine vermehrte Migration von DNA-Fragmenten bewirkt wird. Für die Verwendung im Polymer wird also die Schwellenkonzentration 5 mg/ml aufgrund der *in vitro* Versuche unter Vorbehalt einer dennoch möglichen Proliferationssteigerung als toxikologisch unbedenklicher Grenzwert im angewandten Testsystem eingestuft.

### 4.5.2 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU)

Auch die Toxizität von DBU ist bisher unzureichend charakterisiert worden. Die orale LD<sub>50</sub> für Ratten beträgt 215 - 681 mg/kg. Es gibt keine Hinweise auf ein krebserzeugendes Potential. DBU wirkt aber extrem gewebeschädigend auf Haut und Schleimhäute und kann bei Hautkontakt, Inhalation und Ingestion wie auch in den Augen schwere Verätzungen auslösen. Wegen seiner Ökotoxizität darf DBU nur durch Verbrennen in geeigneten Lösemitteln entsorgt werden [Anon, 2009]. Die Abb. 3-7 zeigt die signifikante Dosis-Wirkungsbeziehung des DBU auf die Proliferationsrate einer Zellpopulation humaner Chondrozyten ( $p < 0,001$ ). Dabei korreliert das Wachstum, also die Proliferationsrate der Zellen, mit der gemessenen Extinktion. Grafisch darstellbar kann von einer Schwellenkonzentration in der Frage nach einem Schwellenwert zum zytotoxisch Unbedenklichen im angewandten Testsystem  $\leq 1,0$  mg/ml ausgegangen werden. Nach fluoreszenzmikroskopischer Kontrolle der Zellkörper nach Substanzinkubation wurde erst bei Konzentrationen  $< 1,0$  mg/ml keine vermehrte strukturelle Zellbeeinträchtigung wie Vakuolenbildung festgestellt. Daher wurde unabhängig vom Signifikanzniveau ( $p$ -Wert  $0,025/\alpha$ -Niveau  $0,05$ ) als zytotoxischer Schwellenwert  $0,5$  mg/ml bestimmt. Dieses Ergebnis wurde anschließend in der Fallzahl  $N=26$  bestätigt (siehe Abb. 3-10). Wiederum ist der Effekt aber als positiv, also im Sinne einer Proliferationssteigerung zu interpretieren. Mit dem Trypanblautest wurde die Vitalität der Lymphozyten nach einstündiger Inkubation mit der Testsubstanz bestimmt. Die Überprüfung der Genotoxizität bestätigt grafisch und nach der statistischen Datenanalyse, dass die Schwellenkonzentration zu keiner gesteigerten DNA-Fragmentierung führt. Als maximale Konzentration in einem Polymer wurde also  $0,5$  mg/ml festgelegt unter Vorbehalt einer möglichen Proliferationssteigerung Verwendung finden.

### 4.5.3 6-Hydroxyhexansäure

Die 6-Hydroxyhexansäure kann bei Temperaturen deutlich über  $37$  °C in erheblichem Maß aus Kunststoffen auf Polycaprolactam-Basis freigesetzt werden [Hakkarainen, 2003]. Trotzdem finden sich in der Literatur keine Angaben zur Toxizität. In der exemplarischen Ergebnisdarstellung zur Dosis-Wirkungsbeziehung der 6-Hydroxyhexansäure soll zunächst die Festlegung der Schwellenkonzentration im Bereich der Zytotoxizität für Chondrozyten erläutert werden. Die Abb. 3-15 zeigt eine Konzentrationsreihe der 6-Hydroxyhexansäure von  $0,9$  mg/ml bis  $7,4$  mg/ml. Man erkennt in der Übersichtsdarstellung eine klare dosisabhängige Abnahme der Absorption, die bereits bei der niedrigsten Konzentration Signifikanzniveau erreichte. Dies konnte in einer anschließenden Untersuchung mit Konzentrationen zwischen  $0,5$  und  $1,9$  mg/ml 6-Hydroxyhexansäure nicht reproduziert werden. Die Abb. 3-16 zeigt keine wesentliche Proliferationshemmung der humanen Chondrozyten im gesamten Konzentrationsbereich. In der qualitativen Begutachtung nach Färbung mit PI/FDA konnten allerdings bei den beiden höchsten Konzentrationen dieser Versuchsreihe, bei  $1,4$  und  $1,9$  mg/ml Beeinträchtigungen der Zellstrukturen wie Vakuolisierung oder Abrundung der

Zellausläufer festgestellt werden. Aufgrund der qualitativen Auswertung wurde deshalb trotz unbeeinträchtigter Proliferation für die 6-Hydroxyhexansäure eine vorläufige Schwellenkonzentration von 0,9 mg/ml festgelegt. Bei dem Proliferationstest mit hoher Fallzahl von  $N=47$  erweist sich diese Schwellenkonzentration als signifikant proliferationsfördernd (+39%, Abb. 3-19). Dieser Schwellenwert hatte jedoch nicht Bestand, weil humane Lymphozyten auf die 6-Hydroxyhexansäure deutlich empfindlicher reagierten als die Chondrozyten. Bei der Schwellenkonzentration von 0,9 mg/ml reduzierte sich Vitalitätsrate der Lymphozyten bereits nach 1 h Inkubation hochsignifikant ( $p < 0,001$ ; Abb. 3-20). Zusätzlich zeigte sich im Comet Assay bei dieser Konzentration eine deutliche Steigerung der OTM-Werte ( $p < 0,001$ ; Abb. 3-20). Die 6-Hydroxyhexansäure verhält sich in dieser Hinsicht also völlig verschieden von 1,6-Hexandiol und DBU. Diese Ergebnisse machten weitere Untersuchungen an humanen Lymphozyten bei geringeren Konzentrationen nötig. Im Konzentrationsbereich von 0,005 bis 0,037 mg/ml zeigt die 6-Hydroxyhexansäure keinen wesentlichen Einfluss mehr auf die Zytotoxizität (Abb. 3-22), jedoch steigt die Genotoxizität ab 0,032 mg/ml deutlich über den Kontrollwert an (Abb. 3-23). Auch wenn wegen der geringen Fallzahl von  $N=3$  keine aussagekräftige statistische Bewertung möglich war, wurde aufgrund der grafischen Auswertung eine Schwellenkonzentration von 0,028 mg/ml als Grenzwert für die Genotoxizität und damit generell für die 6-Hydroxyhexansäure festgelegt.

#### 4.5.4 Ergebnisse bezüglich der Biomaterialzusammensetzung

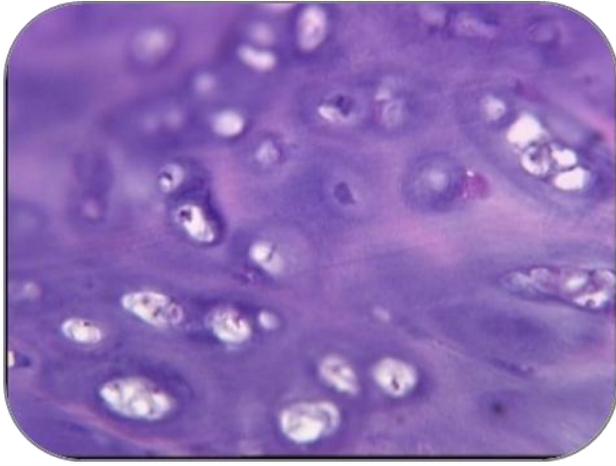
Das theoretisch formulierte Polycaprolacton soll unterschiedlichen Anforderungen der Matrizenbildung und damit der Verwendung als Zellträger genügen. Hierzu sind chemische Bauteile nötig, die in entsprechenden Konzentrationen wichtige Funktionen in der Polymerisation übernehmen. Die hier ermittelten Schwellenkonzentrationen sollte weder im fertigen Polymer noch bei dessen kontinuierlichen Abbau in biologischen Systemen überschritten werden. Dies muss durch entsprechende Analysen verifiziert werden. Auch soll nochmals darauf hingewiesen werden, dass die Festlegung dieser Grenzwerte allein auf Ergebnissen von *in vitro*-Testsystemen beruht. Dennoch ist ein Rückschluss wissenschaftlich legitim [Eisenbrand und Metzler, 2002; Eisenbrand G et al., 2005]. Niedrigere Expositionskonzentrationen wie sie höchstwahrscheinlich bei einem langsamen Abbau des Biomaterials zu verzeichnen sind, sollte in weiteren *in vitro* Langzeitversuchen, z.B. unter Benutzung von Miniorgankulturen simuliert werden [Kleinsasser et al., 2004].

## 4.6 Zellspezifische Ergebnisse

#### 4.6.1 Untersuchungsreihen an humanen Chondrozyten

Für die Untersuchungen der Zytotoxizität wurden in der vorliegenden Arbeit humane Chondrozyten verwendet. Da es sich um isolierte Chondrozyten aus Rippen- und Nasenknorpel der Spender handelte, ergab sich nur die Möglichkeit die Testverfahren an hyalinen Chondrozyten anzuwenden. Besser geeignet für die aurikuläre Rekonstruktion mittels Tissue Engineering und Rapid Prototyping erscheint jedoch die Verwendung elastischer Chondrozyten. Dennoch ist nicht davon auszugehen, dass der Austausch der Knorpelzellart zu anderen Toxizitätsergebnissen führen könnte. Wie schon unter Material und Methoden beschrieben wurden die Zellen aus Knorpelresten gewonnen, die routinemäßig bei HNO-Operationen anfielen. Dabei zeigte sich die spezielle Eigenschaft von Chondrozyten bezüglich ihrer Proliferationsfähigkeit. Diese ist nur isoliert gegeben, wenn sie sich dedifferenziert in Kulturmedium befindet. In dem natürlichen Zellverband mit Kollagen und Proteoglycanen verlieren sie diese Möglichkeit. Dieses erklärt die fehlende Regenerationsfähigkeit des Knorpelgewebes *in vivo* [Müller et al., 2006]. Im proliferationsfähigen Zustand gewinnen sie jedoch bald diese Fähigkeit wieder und

können somit sehr gut für wissenschaftliche Versuche Verwendung finden. Ein weiterer wichtiger Aspekt der Anwendung *in vitro* ist jedoch die Zellalterung bzw. die nachlassende Proliferationskapazität mit der Anzahl der Passagen. Dabei konnte gezeigt werden, dass sich die Proliferationsrate stark von der zunehmenden Passagenzahl abhängt. So kann man zu Beginn der Passagierung von Proliferationsraten um 40% ausgehen. Diese sinken kontinuierlich bis sie ab der achten Passage auf unter fünf Prozent abfallen [Reichl, 2000].



**Abb. 4-10** Chondrozyten nach HE-Färbung (200x)

Diese Untersuchung beruht auf einer Feststellung, die als Hayflick-Limit schon 1961 beschrieben wurde. Die Ursache dieses Phänomens ist bis dato unbekannt [Cristofalo und Pignolo, 1993]. Ein denkbarer Mechanismus ist, dass es sich um einen p53 initiierten Prozess handelt [Afshari et al., 1993, Kulju und Lehman, 1995, Vaziri und Benchimol, 1996]. Die Konsequenz dieser Proliferationsänderung war die Verwendung von kultivierten Chondrozyten bis zur maximal vierten

Generation, wobei die für einen Versuchsaufbau verwendeten Zellen immer einer Kolonie angehören mussten. Damit kann die Gefahr eines veränderten Proliferationsverhaltens auf Grund des Alters der Passage reduziert werden. Gleichzeitig ist dadurch die Vergleichbarkeit der Ergebnisse eines Versuchansatzes untereinander und mit dem Kontrollansatz gegeben. Die humanen Chondrozyten wurden aus Proben von Spendern isoliert die älter als 18 Jahre waren, da auch das Alter der Spender auf die Proliferationskapazität der Chondrozyten Auswirkungen hat. Nachdem die Verdopplungszeit der Chondrozyten im Alter von 15 bis 60 abnimmt, wurden auch für den jeweiligen Versuchsaufbau die Zellen nur eines Spenders verwendet [Rotter et al., 2001]. Als letzter Diskussionspunkt der Verwendung der Chondrozyten sei schließlich noch die Besonderheit des Wachstums *in vitro* angefügt. So verändern Chondrozyten im kultivierten Wachstum ihre chondrozytären Eigenschaften. Es findet dabei ein Wechsel zu einem fibroblastischen Typus statt [Benya et al., 1978]. Jedoch wird diese Veränderung durch die Rückbesiedelung auf dreidimensionale Trägerstoffe wieder nichtig. Damit kann sich eine *in vitro* Kultivierung nicht negativ auf die Besiedelung des Biomaterials auswirken. Dennoch ist zu beachten, dass diese Versuchsmodelle nur modellhaften Charakter haben. Die Übertragung der Ergebnisse auf *in vivo* Verhältnisse ist demnach obligat. Zusätzlich wäre es sicherlich sinnvoll, sobald die technischen Voraussetzungen es erlauben, auch die Genotoxizitätsversuche mittels Comet Assay nicht nur an humanen Lymphozyten sondern auch an Chondrozyten durchzuführen.

4.6.2 Untersuchungsreihen an humanen Lymphozyten

Für die Durchführung der Testreihen zur Genotoxizität wurden standardisiert Lymphozyten verwendet. Die Verwendung dieser Zellen ist für den Comet Assays etabliert. Die volljährigen Spender der Lymphozyten wurden zufällig ausgewählt. Damit kann von einer repräsentativen Kohorte an Alter und Geschlecht ausgegangen werden. Dabei wurde nicht weiter beachtet, welche Grunderkrankungen oder gesundheitliche Konstellation die Patienten aufwiesen. Die entnommenen Proben werden zeitnah am gleichen Tag weiterverarbeitet, eingefroren und innerhalb von drei Monaten zur Versuchsdurchführung herangezogen. Grundsätzlich ist eine Lagerung bis zu 12 Monaten möglich, da in dieser Zeitperiode noch kein Einfluss auf die Ergebnisse des Comet Assay nachweisbar ist [Rajae-

Behbahani, 1999, Schmezer et al., 2001]. Als Überprüfung möglicher Lagerungsschäden wurde die Vitalität nach dem Auftauen mit dem Trypanblautest bestimmt. Diese muss für die Durchführung des Versuchsaufbaues über 90% betragen. Andernfalls wurde die Zellpopulation verworfen. Mit dem Trypanblautest sind aber nur zytotoxische Effekte in Form von Membranstabilität nachweisbar. Auch sind im Comet Assay die Phasen des Zellzyklus der verwendeten Lymphozyten nicht steuerbar. Dabei ist nicht endgültig geklärt, ob die Inkubation in verschiedenen Zellphasen unterschiedliche genotoxische Schäden verursachen könnten, es wird aber davon ausgegangen, dass der Zellzyklus zum Zeitpunkt der Versuchsdurchführung einen Einfluss auf die Ergebnisse hat [Olive und Banath, 1993]. Dieser Effekt wird jedoch allein durch die Verwendung großer Lymphozytenmengen, die sich ungesteuert in unterschiedlichen Zellphasen befinden, unbedeutend. Daher ist trotzdem von repräsentativen Ergebnissen auszugehen.

### 4.7 Ausblick auf die Projektweiterführung

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit mit den drei Reinsubstanzen 1,6-Hexandiol, DBU und 6-Hydroxyhexansäure und weiterer Ergebnisse auch mit parallel untersuchten anderen Komponenten des Polycaprolactons wurde die Zusammensetzung der Matrix überprüft. Dabei geht es in erster Linie darum, die gewollte Funktionalität der zu erschaffenden Polymatrize auch bei veränderter Substanzkonzentration zu erhalten. Dies soll gewährleisten, dass von den Substanzen nur solche Konzentrationen Verwendung finden, die keine potenziell toxische Wirkung auf humane Zellen haben. Diese Neuzusammensetzung war auch nötig geworden, weil es in Langzeitversuchen zu einer unerwünschten Hautbildung des Polyurethans gekommen war. Parallel dazu wird an der optimierten Besiedelung des Polyurethans durch humane Chondrozyten gearbeitet [Balzer et al., 2004]. Untersuchungen an NMRI und immunschwachen nu/nu Mäusen wurden bereits durchgeführt, weitere sind in der Planung oder in Progress. Dabei geht es um Fragestellungen wie der Biokompatibilität der Polymatrize, der Biodegradation des Polymers im Körper und den Einfluss von Wachstumsfaktoren auf die Gewebebildung. Im Jahr 2006 konnte beim europäischen Patentamt ein neu formuliertes Polyurethan angemeldet werden, welches diese Nachteile nicht mehr aufbietet. Gleichzeitig wurde die neue Formulierung veröffentlicht [Wiese und Maier, 2006].

## Kapitel 5 Zusammenfassung

---

### 5.1 Hintergrund und Fragestellung

Formdefekte und Missbildungen der Ohrmuschel treten sowohl hereditär, traumatisch als auch entzündlich unterschiedlicher Genese auf. Die Betroffenen können unter den funktionellen oder ästhetischen Beeinträchtigungen leiden. Die Substanzen 1,6-Hexandiol, 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU) und 6-Hydroxyhexansäure sollen Verwendung als Bestandteil eines geplanten Polymers finden, welches im Rahmen des Tissue Engineerings als transplantierbarer Zellträger zur autogenen Rekonstruktion chondralen Gewebes dient. Weder das ursprüngliche Polymer, noch seine Abbauprodukte dürfen dabei mutagene oder zytotoxische Auswirkungen haben. Die *in vitro*-Untersuchungen von Einzelsubstanzen auf Zytotoxizität an humanen Chondrozyten und auf Zytotoxizität und Genotoxizität an humanen Lymphozyten diente der Definition von Schwellenkonzentrationen für die toxikologische Unbedenklichkeit der Testsubstanzen.

### 5.2 Methoden, Stoffe und Patientengruppen

Durch die kombinierte Verwendung von Comet Assay, Proliferationstest mit EZ4U und Vitalfärbung mit den Fluoreszenzfarbstoffen Propidiumiodid (PI) und Fluoresceindiacetat (FDA) wird sowohl eine qualitative als auch quantitative Erfassung genotoxischer und zytotoxischer Schäden ermöglicht. Der Comet Assay ist als alkalische Version der Einzelzell-Mikrogelelektrophorese nach *in vitro*-Inkubation für humane Zielzellen etabliert. Der Trypanblautest diente zur Zytotoxizitätsuntersuchung an humanen Lymphozyten, der Proliferationstest mit EZ4U und die Vitalfärbung mit PI FDA zur Evaluation des zytotoxischen Potenzials an humanen Chondrozyten. Die untersuchten Stoffe 1,6-Hexandiol, DBU und 6-Hydroxyhexansäure sind Bestandteile eines Polymers, das durch die Methode des Tissue Engineerings und des Rapid Prototypings als autogene Knorpelersatzstruktur dienen soll. Alle Untersuchungen werden an humanen Chondrozyten des Nasen- und Rippenknorpels sowie an humanen Lymphozyten durchgeführt.

### 5.3 Ergebnisse

Die durchgeführten Testsysteme sind grundsätzlich geeignet um Schwellenwerte für die toxikologische Unbedenklichkeit im angewandten System zu definieren. Dadurch ergibt sich, dass die im Folgenden für das Polymer vorgeschlagenen Schwellenkonzentrationen der Einzelsubstanzen als unbedenklich im Sinne der Verwendung als Komponente des Polymers einzustufen sind. Für die Substanz 1,6-Hexandiol ergab sich eine maximale Schwellenkonzentration 5 mg/ml, für das DBU 0,5 mg/ml und für die 6-Hydroxyhexansäure 0,028 mg/ml. Diese Werte sind nach der methodischen Durchführung von *in vitro*-Untersuchungen als vordefinierte Richtwerte in der weiteren Entwicklung der Polymatrise zu betrachten. Darüber hinaus muss beachtet werden, dass aufgrund der Toxizität vorgeschlagene Veränderungen der Substanzkonzentrationen Einfluss auf die erwünschte Funktionalität des Polymers nehmen können.

### 5.4 Schlussfolgerung

Da ein implantiertes Polymer und dessen Abbauprodukte weder zyto- noch genotoxisch auf humane Zellen wirken darf, müssen im Vorfeld zur Zulassung als Medizinprodukt durch die Durchführung entsprechender Toxizitätstestungen solche Effekte ausgeschlossen werden. Das Zulassungsverfahren schreibt sowohl *in vivo*- als auch *in vitro*-Versuche vor. Die *in vitro*-Toxizitätsuntersuchungen von 1,6-Hexandiol, DBU und 6-Hydroxyhexansäure ergeben Schwellenkonzentrationen für die toxikologische Unbedenklichkeit, die zur Verwendung im Zellträger geeignet sind. Dementsprechend muss die Zusammensetzung des Polyurethans überprüft und gegebenenfalls verändert werden, ohne dass die Anforderung an das Implantationsprodukt leidet. Als eine ergänzende toxikologische Überprüfung sollte die Simulation eines physiologischen Abbauvorgangs und dessen Auswertung bezüglich möglicher toxischer Schäden im Anschluss erfolgen. Damit kann durch die kontinuierliche Wirkung wesentlich kleinerer Dosen der Einzelsubstanzen ein physiologischerer Kontext geschaffen werden. Schließlich können die Ergebnisse auf *in vivo*-Testsysteme (NMRI- und nu/nu-Mäuse) übertragen werden.

## Kapitel 6 Literatur

---

- Abdel-Rahman SZ, El-Zein RA (2000). The 399Gln polymorphism in the DNA repair gene XRCC1 modulates the genotoxic response induced in human lymphocytes by the tobacco-specific nitrosamine NNK. *Cancer Lett.*, 159, 63-71
- 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
- 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. USA*, 70, 782-6
- Ames BN, McCann J, Yamasaki E (1975). Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 31, 347-64
- 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
- Anon (2009). Sicherheitsdatenblatt gemäß Verordnung (EG) Nr. 1907/2006. <http://www.sigma-aldrich.com>
- 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
- Atadja P, Wong H, Garkavtsev I, Veillette C, Riabowol K (1995). Increased activity of p53 in senescing fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 8348-52
- Balling R (1998). Chemisch Mutagene, Mutationen In: *Lehrbuch der Genetik*, 1, 30.3-30.4, Ed: Seyffert W, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/Jena
- Balling R (1998). Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren, Methoden der Molekulargenetik In: *Lehrbuch der Genetik*, 1, B2, Ed: Seyffert W, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/Jena
- Balling R (1998). Standardisierte Mutagenitätstests, Mutationen. In: *Lehrbuch der Genetik* Ed:

Seyffert W, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart/Jena

Balzer T, Witzenzellner R, Naumann A, Stoelzel K, Milz S, Ziegelaar B, Staudenmaier R, Berghaus A (2004). Vergleiche gezüchteter humaner Knorpeltransplantate mit kommerziellem (bovinem) und aus humanem Fibrin hergestelltem Fibrinkleber. *Laryngorhinootologie*, DOI: 10.1055/s-2004-823576

Belpaeme K, Delbeke K, Zhu L, Kirsch-Volders M (1996). Cytogenetic studies of PCB77 on brown trout (*Salmo trutta fario*) using the micronucleus test and the alkaline comet assay. *Mutagenesis*, 11, 485-92

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

Bootz F (2001). HNO-Heilkunde in Pädiatrie. In: *Pädiatrie*, 941-60, Ed: Speer C P, Gahr M, Springer Verlag, Berlin

Bortz J (2005). Elementarstatistik. In: *Statistik für Human- und Sozialwissenschaftler*, 6, I1-I6, Ed, Springer Verlag, Berlin

Brown JL (1999). N-Nitrosamines. *Occup. Med.*, 14, 839-48

Carmichael J, DeGraff WG, Gazdar AF, Minna JD, Mitchell JB (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing. *Cancer Res*, 47, 936-42

Cerda H, Delincee H, Haine H, Rupp H (1997). The DNA 'comet assay' as a rapid screening technique to control irradiated food. *Mutat. Res.*, 375, 167-81

Cristofalo VJ, Pignolo RJ (1993). Replicative senescence of human fibroblast-like cells in culture. *Physiol. Rev.*, 73, 617-38

Eckhardt LR, Haug S, Nielsen KO (2002). [Perichondritis caused by high ear piercing. Therapeutic and legal aspects]. *Ugeskr. Laeger*, 164, 5144-5

Eisenbrand G, Metzler M (2002). Prüfung auf Mutagenität und Kanzerogenität Toxikologie, WILEY-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2, 130-44

- Eisenbrand G, Metzler M (2002). Toxikokinetik. In: Toxikologie, 2, 8-50, Ed: Eisenbrand G, Metzler M, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Eisenbrand G, Metzler M (2002). Toxizitätsprüfung. In: Toxikologie, 2, 115-24, Ed: Eisenbrand G, Metzler M, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke F (2005). Toxikologie ausgewählter Substanzen. In: Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, 3, 233-34, Ed: Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke F, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke FJ (2005). *In vitro* Methoden (Ames-Test). In: Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, 3, 147-56, Ed: Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke F J, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke FJ (2005). *In vitro* Methoden (SCE). In: Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, 3, 153-56, 254, Ed: Eisenbrand G, Metzler M, Hennecke F J, Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim
- Eyrich D, Brandl F, Appel B, Wiese H, Maier G, Wenzel M, Staudenmaier R, Goepferich A, Blunk T (2007). Long-term stable fibrin gels for cartilage engineering. *Biomaterials*, 28, 55-65
- Friedman M (1937). The use of ranks to avoid the assumption of normality implicit in the analysis of variances. *J. Am. Statist. Assoc.*, 32, 675-701
- Goldmann E (1909). Die äußere und innere Sekretion des gesunden und kranken Organismus im Lichte der vitalen Färbungen. *Klein. Chir.*, 192-265
- 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
- Hakkarainen M (2003). Qualitative and quantitative solid-phase microextraction gas chromatographic–mass spectrometric determination of the lowmolecular-mass compounds released from poly(vinyl chloride) /polycaprolactone–polycarbonate during ageing. *J Chromatogr A*, 1010, 9-16
- Hansen MB, Nielsen SE, Berg K (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. *J Immunol Methods*, 119, 203-10

- Harreus UA, Kastenbauer ER, Wallner BC, Kleinsasser NH (2002). Stellenwert der Einzelzell Mikrogelelektrophorese in der Ökogenotoxikologie. *Laryngorhinootologie*, 81, 528-33
- 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
- Harréus UA, Schmezer P, Kuchenmeister F, Maier H (1999). Genotoxische Wirkung auf menschliche Schleimhautbiopsien des oberen Aerodigestivtraktes. *Laryngorhinootologie*, 78, 176-81
- Harréus UA, Wallner B, Kastenbauer E, Kleinsasser N (2001). Untersuchungen zur DNA-Reparatur von Schleimhautzellen und Lymphozyten mit dem Comet Assay. *Laryngorhinootologie*, 80, 23-26
- Haug M, Schoeller T, Wechselberger G, Otto A, Piza-Katzer H (2001). Ohrmuschelverletzungen: Klassifizierung und Therapiekonzept. *Unfallchirurg*, 104, 1068-75
- Hayflick L, Moorhead PS (1961). The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 585-621
- Hecht SS (1999). Tobacco smoke carcinogens and lung cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*, 91, 1194-210
- Hill CE, Wickliffe JK, Wolfe KJ, Kinslow CJ, Lopez MS, Abdel-Rahman SZ (2005). The L84F and the I143V polymorphisms in the O6-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT) gene increase human sensitivity to the genotoxic effects of the tobacco-specific nitrosamine carcinogen NNK. *Pharmacogenet Genomics*, 15, 571-8
- Holtzer H, Abbott J, Lash J, Holtzer S (1960). The Loss of Phenotypic Traits by Differentiated Cells in Vitro, I. Dedifferentiation of Cartilage Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 46, 1533-42
- Holz O, Jorres R, Kastner A, Krause T, Magnussen H (1995). Reproducibility of basal and induced DNA single-strand breaks detected by the single-cell gel electrophoresis assay in human peripheral mononuclear leukocytes. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.*, 67, 305-10
- Hsie AW, San Sebastian JR, Perdue SW, Schenley RL, Waters MD (1987). Multiple-endpoint mutagenesis with Chinese hamster ovary (CHO) cells: evaluation with eight carcinogenic and non-carcinogenic compounds. *Mol. Toxicol.*, 1, 217-34

- IARC (1974). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: Some aromatic amines, hydrazine and related substances, N-nitroso compounds and miscellaneous alkylating agents. IARC, Lyon 4, 183
- Izquierdo R, Garcia-Giralt N, Rodriguez MT, Caceres E, Garcia SJ, Gomez Ribelles JL, Monleon M, Monllau JC, Suay J (2007). Biodegradable PCL scaffolds with an interconnected spherical pore network for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. A*
- Janssen K, Kon M (2004). [Three patients with complications following piercing of the auricular cartilage]. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 148, 1351-4
- Kammann U (1998). Toxische Wirkung von Schadstoffen auf Fischzellen – Bestimmung von DNA-Strangbrüchen mit dem Comet Assay. *Inf.Fischwirtsch.*, 45 109-12
- Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S (2000). Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies. *Mutat. Res.*, 463, 13-31
- Keim W (2006). Polymer. In: *Kunststoffe: Synthese, Herstellungsverfahren, Apparaturen* 1, 44, Ed: Keim W, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- Kleinsasser NH, Harreus UA, Wallner BC, Kastenbauer ER (1999). Mutagensensitivität von Patienten mit Larynx- bzw. Oropharynxkarzinomen. *Laryngorhinootologie*, 78, 679-84
- Kleinsasser NH, Juchhoff J, Wallner BC, Bergner A, Harréus UA, Gamarra F, Bührlen MB, Huber RM, Rettenmeier AW (2004). The use of mini-organ cultures of human upper aerodigestive tract epithelia in ecogenotoxicology. *Mutat. Res.*, 561, 63-73
- Kleinsasser NH, Kastenbauer ER, Wallner BC, Weissacher H, Harreus UA (2001). Genotoxizität von Phthalaten. Zur Diskussion über Weichmacher in Kinderspielzeug. *HNO*, 49, 378-81
- Kleinsasser NH, Kastenbauer ER, Weissacher H, Muenzenrieder RK, Harreus UA (2000). Phthalates demonstrate genotoxicity on human mucosa of the upper aerodigestive tract. *Environ. Mol. Mutagen.*, 35, 9-12
- Kleinsasser NH, Kastenbauer ER, Zieger S, Baluschko T, Wallner BC, Harreus UA (2003). Lagerung humaner nasaler Mukosa für die Einzelzell-Mikrogelelektrophorese. *HNO*, 51, 134-9
- Kleinsasser NH, Wagner C, Wallner BC, Harréus UA, Kastenbauer ER (2001). Mutagen sensitivity of

nasopharyngeal cancer patients. *Mutat Res*, 491, 151-61

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

Kleinsasser NH, Weissacher H, Kastenbauer ER, Dirschedl P, Wallner BC, Harreus UA (2000). Altered genotoxicity in mucosal cells of head and neck cancer patients due to environmental pollutants. *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.*, 257, 337-42

Kleinsasser NH, Weissacher H, Wallner BC, Kastenbauer ER, Harreus UA (2001). Zytotoxizität und Genotoxizität von Fluoriden in humaner Mukosa und Lymphozyten. *Laryngorhinootologie*, 80, 187-90

Kulju KS, Lehman JM (1995). Increased p53 protein associated with aging in human diploid fibroblasts. *Exp. Cell Res.*, 217, 336-45

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

Lewis RJ (2004). Industrial Materials. In: Sax's Dangerous Properties of Industrial Materials, 5, Ed: Lewis R J, John Wiley Verlag, New York

Margulis A, Bauer BS, Alizadeh K (2003). Ear reconstruction after auricular chondritis secondary to ear piercing. *Plast. Reconstr. Surg.*, 111, 891-7; discussion 98

Mosmann T (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, 65, 55-63

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

Naumann A, Aigner J, Staudenmaier R, Seemann M, Bruening R, Englmeier KH, Kadedge 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

- Neubert D (1997). Möglichkeiten und Methoden der quantitativen Risikoabschätzung. In: Lehrbuch der Toxikologie 1, 848, Ed: Marquardt H, Schaefer S G, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart
- 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
- Olive PL, Wlodek D, Banath JP (1991). DNA double-strand breaks measured in individual cells subjected to gel electrophoresis. *Cancer Res.*, 51, 4671-6
- Ostling O, Johanson KJ (1984). Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 123, 291-8
- Phillips HJ (1973). Dye exclusion tests for cell viability. In: *Tissue Culture: Methods and Applications*, 406-08, Ed: Kruse PF P M, Academic Press, New York
- Pool-Zobel BL, Lotzmann N, Knoll M, Kuchenmeister F, Lambertz R, Leucht U, Schroder HG, Schmezer P (1994). Detection of genotoxic effects in human gastric and nasal mucosa cells isolated from biopsy samples. *Environ. Mol. Mutagen.*, 24, 23-45
- Rajae-Bebahani N (1999). Effect of long-term cryopreservation on mutagen sensitivity and DNA repair capacity of peripheral human lymphocytes. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 125, 125-32
- Rasp G, Staudenmaier R, Ledderose H, Kastenbauer E (2000). Autologous rib cartilage harvesting: operative procedure and postoperative pain reduction. *Laryngorhinootologie*, 79, 155-9
- 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
- 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
- Sader R, Zeilhofer HF (2003). Teilprojekt RP1: 3D Strukturingeering ForTePro. Bayerischer Forschungsverband für Tissue Engineering und Rapid Prototyping In: ForTePro,

- Schmezer P, Rajae-Bebahani 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
- Scholz D, Lubeck M, Loibner H, McDonald-Smith J, Kimoto Y, Koprowski H, Steplewski Z (1991). Biological activity in the human system of isotype variants of oligosaccharide-Y-specific murine monoclonal antibodies. *Cancer Immunol Immunother*, 33, 153-7
- Sellner W (1988). Gewebe und Zellkultur. In: Romeis Mikroskopische Technik 16. Auflage, 37-69, Ed: P B, Urban u. Schwarzenberg, München
- Shieh SJ, Vacanti JP (2005). State-of-the-art tissue engineering: from tissue engineering to organ building. *Surgery*, 137, 1-7
- Siegel S (1985). Der Wilcoxon-Vorzeichenrang-Test für abhängige Paare. In: Nichtparametrische statistische Methoden, 5, 72-80, Ed: Siegel S, Verlag Dietmar Klotz, Eschborn bei Frankfurt a.M.
- Siegel S (1985). Friedmans Zwei-Weg-Rangvarianzanalyse. In: Nichtparametrische statistische Methoden, Eschborn bei Frankfurt a.M.
- 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
- 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
- Smith MB, March J (2001). Baeyer-Villiger-Oxidation. In: March's advanced organic chemistry, 5, 1417 -18  
Ed: Smith M B, March J, Wiley-VCH, New York
- Speit G (1993). Zur Bedeutung induzierter Mutationen für das genetische Risiko des Menschen. In: Mutationsforschung und genetische Toxikologie, Wissenschaftliche Buchgesellschaft 12-17, Ed, Fahrig R, Darmstadt

- Speit G, Hartmann A (1995). The contribution of excision repair to the DNA effects seen in the alkaline single cell gel test (comet assay). *Mutagenesis*, 10, 555-9
- Staudenmaier R (2000). Ohrmuschelrekonstruktionen mit autologem Knorpel. *Monatsschr. Kinderheilkd.*, 148, 508-12
- Staudenmaier R (2006). Optimierung der Ohrmuschelrekonstruktion mit autologem Rippenknorpel. Erfahrung aus 120 Fällen. *HNO*, 54, 749-55
- Staudenmaier R, Aigner J, Holz J, Schilling V, Rotter N, Naumann A, Kastenbauer E (2000). Subkutane Konservierung einer abgetrennten Ohrmuschel. Morphologische Veränderungen. *Laryngorhinootologie*, 79, 233-8
- Staudenmaier R, Aigner J, Kastenbauer E (2001). Mikrotie: Technik zur Ohrmuschelrekonstruktion mit autologem Rippenknorpel. *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir.*, 33, 162-70
- Staudenmaier R, Hoang TN, Kleinsasser N, Schurr C, Frolich K, Wenzel MM, Aigner J (2004). Flap prefabrication and prelamination with tissue-engineered cartilage. *J. Reconstr. Microsurg.*, 20, 555-64
- Staudenmaier R, Miehle N, Kleinsasser N, Ziegelaar B, Wenzel MM, Aigner J (2004). Gezüchtetes Knorpelgewebe in einem präfabrizierten, mikrovaskulären Lappen. *HNO*, 52, 510-7
- Staudenmaier R, Rasp G (2003). Korrekturmöglichkeiten bei abstehenden Ohren, Tassenohr, Mikrotie. Verblüffend natürliche Ergebnisse. *MMW Fortschr. Med.*, 145, 26-7, 29
- Staudenmaier R, Steinbach S, Niedermeyer HP, Kiefer J, Müller D, Kleinsasser N, Reichert TE, Driemel O (2006). Versorgung von Ohrmuschelfehlbildungen mit autologem Rippenknorpel. *Mund Kiefer Gesichtschir.*, 10, 141-7
- Steffen A, Klaiber S, Katzbach R, Nitsch S, Frenzel H, Weerda H (2007). Zur Epidemiologie von Ohrmuschelverletzungen. *Handchir. Mikrochir. Plast. Chir.*, 39, 98-102
- Streffler C (1997). Genetische Prädisposition und Strahlenempfindlichkeit bei normalen Geweben. *Strahlenther. Onkol.*, 173, 462-8
- 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

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

Weerda H (1988). Classification of congenital deformities of the auricle. *Facial Plast. Surg.*, 5, 385-8

Wiedmann-Al-Ahmad M, Gutwald R, Lauer G, Hubner U, Schmelzeisen R (2002). How to optimize seeding and culturing of human osteoblast-like cells on various biomaterials. *Biomaterials*, 23, 3319-28

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, Deutsches Patent und Markenamt WO 2006/032501 A1

Wilcoxon F (1945). Individual comparison by ranking methods. *Biometrics*, 1, 80-83

Yamada A (1963). On the late injuries following occupational inhalation of mustard gas, with special references to carcinoma of the respiratory tract. *Acta Pathol. Jpn.*, 13, 131-55

## Kapitel 7 Anhang

---

### 7.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>Abk.</b>	<b>Abkürzung</b>
<b>Abb</b>	Abbildung
<b>DBU</b>	1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en
<b>DMEN</b>	Dulbecco's Modified eagle's medium
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>EMGE</b>	Einzelzellmikrogelelektrophorese
<b>ELISA</b>	Enzyme-linked-immuno-sorbent-assay
<b>FCS</b>	Fetales Kälberserum
<b>FDA</b>	Fluoresceindiacetat
<b>HHS</b>	6-Hydroxyhexansäure
<b>HNO</b>	Hals-Nasen-Ohren
<b>M</b>	Männlich
<b>MNNG</b>	<i>N</i> -Methyl- <i>N</i> '-nitro- <i>N</i> -nitrosoguanidin
<b>N</b>	Anzahl
<b>NAA</b>	Non-Essential-Amino-Acids
<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>OTM</b>	Olive Tail Moment
<b>p-Wert</b>	p-Werte als Maß für den Unterschied zweier verschiedener Stichproben
<b>PBS</b>	phosphate buffered saline
<b>PI</b>	Propidiumiodid
<b>PS</b>	Penicillin Streptomycin
<b>PUR</b>	Polyurethanschaum
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute
<b>SCE</b>	Schwesterchromatidaustausch
<b>Tab</b>	Tabelle
<b>W</b>	Weiblich

## 7.2 Abbildungsverzeichnis

Abbildung	Beschreibung
<b>Abb. 1-1</b>	Menschliche Ohrmuschel (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 1-2</b>	Mikrotomie der Ohrmuschel (Quelle: Prof. Kleinsasser, Würzburg)
<b>Abb. 1-3</b>	Herkömmliche Ohrrekonstruktionstechnik (Quelle: Prof. Kleinsasser, Würzburg)
<b>Abb. 1-4 A-D</b>	Direkte Datenerfassung per Computer/Magnetresonanztomographie und Datenreduktion auf die chondralen Anteile (Quelle: PD Staudenmaier, München)
<b>Abb. 1-5</b>	Polyurethan (PUR) (Quelle: PD Staudenmaier, München)
<b>Abb. 1-6</b>	Polycaprolacton in einer REM-Aufnahme (Quelle: PD Staudenmaier, München)
<b>Abb. 1-7</b>	Ohrmodell aus PCL im Original (Quelle: PD Staudenmaier, München)
<b>Abb. 1-8</b>	Vitalfärbung (FDA + PI) einer angesiedelten Chondrozytenpopulation auf einem porösen Zellträgers mit L-929 (100x) (Quelle: PD Staudenmaier, München)
<b>Abb. 1-9</b>	Schematische Darstellung der Versuchsplanung zur Definition einer Schwellenkonzentration der Substanzen (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 2.1</b>	Darstellung des Ablaufes einer Vitalfärbung mittels PI und FDA Beschrieben (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 2.2</b>	Darstellung des Ablaufes des Proliferationstests (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 2.3</b>	Vollblut zur Gewinnung von humanen Lymphozyten nach Dichtegradientenzentrifugation (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 2.4</b>	Elektrophoresewanne und Netzgerät (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 2-5</b>	Lymphozytenkerne nach Anfärbung mit Ethidiumbromid (I-V). Aufgezeigt ist eine stärker werdende DNA-Migration (400x) (Quelle: Prof. Kleinsasser, Würzburg)
<b>Abb. 2-6</b>	Die Abbildung zeigt den Ablauf der Versuche zur Genotoxizität mittels Comet Assay (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 2-7</b>	Erklärung der Darstellung in Boxplot (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 3-1 bis Abb. 3-23</b>	Darstellungen der Ergebnisse (Quelle: eigene Abbildung)

<b>Abb. 4-1</b>	Bilder des prä- und postoperativen Status bei jungem Mädchen mit Mikrotie (Quelle: Prof. Kleinsasser, Würzburg)
<b>Abb. 4-2</b>	Männlicher Patient mit chirurgisch rekonstruiertem Tassenohr (Quelle: Prof. Kleinsasser, Würzburg)
<b>Abb. 4-3</b>	Verarbeitung humanen Knorpelmaterials (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 4-4</b>	Proliferationsherd (Zellcluster), Vergr. 100x (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 4-5</b>	Grafische Darstellung der Grundlagen des Ames-Testverfahrens (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 4-6</b>	Grafische Darstellung der Grundlagen des Comet Assays (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 4-7</b>	Strukturformel des Trypanblau (Quelle: Leuthold, Jan, Berlin)
<b>Abb. 4-8</b>	Betrachtung avitaler Chondrozyten unter Verwendung des Grünfilters nach Färbung mit PI/FDA (50fach) (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 4-9</b>	Beispiel einer substanzinduzierten Vakuolisierung der Zellausläufer (200fach) (Quelle: eigene Abbildung)
<b>Abb. 4-10</b>	Chondrozyten nach HE-Färbung (200fach) (Quelle: Prof. Kleinsasser, Würzburg)

### 7.3 Curriculum Vitae

Persönliche Daten	
Name	Joachim Bernhard Havla
Geburtstag	26.08.1981
Geburtsort	Pegnitz/Oberfranken
Nationalität	Deutsch
Familienstand	Ledig
Eltern	Dr. med. Gerlinde Havla-Haberberger, Fachärztin für Allgemeinmedizin Dr. med. Dieter Havla, Facharzt für Allgemeinmedizin
Ausbildung	
seit 01/2009	Assistenzarzt der Neurologie am Institut für Klinische Neuroimmunologie der LMU München bei Prof. Dr. R. Hohlfeld, München, Deutschland
11/2008	2. Ärztliche Prüfung (1,5 sehr gut)
Seit 08/2007	Mentee des Mentoringprogramms "Career Service" der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland
04-08/2007	Research Fellowship an der University of Texas Medical Branch, Galveston, USA
09/2004	1. Ärztliche Prüfung (2,0 gut)
Seit 10/2002	Medizinstudium an der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Deutschland
07/2001-08/2002	Zivildienst im Operationstrakt der Klinik und Poliklinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde der Universität Regensburg, Deutschland
07/2001	Abitur (1,5 sehr gut)
1992-2001	Humanistisches Musikgymnasium und Internat der Regensburger Domspatzen, Regensburg, Deutschland
1988-1992	Grundschule, Pegnitz, Deutschland
Praktisches Jahr	
08-12/2007	Neurologie (PJ) in München, LMU Grosshadern
12/2007-04/2008	Chirurgie (PJ) in Zürich, USZ
04-05/2008	Innere Medizin (PJ) in New York, MSKCC
06-07/2008	Innere Medizin (PJ) in München, LMU Grosshadern

## 7.4 Publikationen aus der Arbeit

### 7.4.1 Originalarbeit:

Havla J.B., Lotz A.S., Richter E., Froelich K., Hagen R., Staudenmaier R., Kleinsasser N.H., Cartilage tissue engineering for auricular reconstruction: In vitro evaluation of potential genotoxic and cytotoxic effects of scaffold materials, *Toxicology in Vitro* (2009; Article in Press, Accepted Manuscript).

### 7.4.2 Kongressbeitrag:

Kleinsasser N, Lotz A, Havla J, Staudenmaier R. 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, Mai 2008, Bonn

### 7.5 Danksagungen

Das erfolgreiche Gelingen dieser Arbeit wurde durch die Hilfe und Unterstützung vieler Menschen ermöglicht, die mich während der Zeit begleitet haben. Besonders danken möchte ich...

...Herrn Prof. Dr. med. N. Kleinsasser, der mir ermöglichte, in dem klinisch-experimentellen, onkologischen Forschungsbereich zu promovieren. Ihm und seiner mir lieb gewordenen Familie, die mich seit meinem Zivildienst an der Universitätsklinik Regensburg durch mein Studium begleitet, möchte ich für alles von ganzen Herzen „Vergelts Gott“ sagen.

...Herrn PD Dr. med. R. Staudenmaier, der mich als zweiter Doktorvater mit fachlicher Kompetenz unterstützte. Durch ihn durfte ich über die Forschungsgruppe ForTePro Teil eines modernen Zukunftgebietes der medizinischen Forschung sein.

...Herrn Prof. Dr. med. vet. E. Richter für seinen Rat, seine enorme Unterstützung bei der Fertigstellung dieser Arbeit und der wissenschaftlichen Förderung während meines Studiums.

...Herrn Prof. Dr. med. J. Strutz als Leiter der Hals-, Nasen- und Ohrenklinik der Universität Regensburg für die Bereitstellung der Räumlichkeiten im Forschungstrakt.

...Frau dipl. biol. A. Sassen für die kompetente Betreuung im stürmischen Alltag der Doktoranten. Durch ihre geduldige Art wurde mir das Erlernen der unterschiedlichen Methodiken im Bereich der Genotoxikologie erleichtert.

...Frau Dr. hum. biol. M. Wenzel, die mir in allen Fragen der Zellbiologie und Zellkultivierung mit Rat und Tat zur Seite stand. Danken darf ich dabei besonders für die intensive Betreuung der Versuche im Bereich der Zytotoxikologie.

...den Operateuren und dem ganzen Team der HNO-Abteilung der Universitätsklinik Regensburg. Vor allem gilt auch den Spendern von Knorpelproben und Lymphozyten mein besonderer Dank. Ohne die Unterstützung aus dem Operationstrakt wäre meine Arbeit nicht ermöglicht worden.

...meinen Mitdoktoranden und meiner Mitdoktorandin. Ohne unsere gegenseitige Unterstützung, unseren freundschaftlichen Geist und die ermöglichte Rücksichtnahme aufeinander wäre diese Arbeit nicht entstanden.

...zuletzt darf ich meiner ganzen lieben Familie von Herzen danken. Diese hat mich während meines Studiums immer unterstützt.

## 7.6 Versuchsdaten

### 1,6-Hexandiol (HD)

Abb. 3-1

mg/ml	KO	2,5	5	10	20	50	100	200
MW	2,23	2,55	2,58	1,98	0,83	0,33	0,35	0,38
STAB	0,17	0,28	0,31	0,33	0,26	0,02	0,04	0,03
	2,29	2,58	1,81	1,80	0,64	0,31	0,19	0,36
	2,24	2,79	2,76	2,35	1,25	0,34	0,34	0,38
	2,50	2,44	2,75	2,34	0,96	0,35	0,33	0,44
	2,26	2,22	2,28	2,04	0,62	0,34	0,35	0,39
	2,52	2,91	2,86	2,29	0,62	0,34	0,31	0,35
	2,11	2,33	2,71	1,36	1,02	0,33	0,34	0,33
	2,12	2,30	2,75	2,12	0,59	0,33	0,34	0,39
	2,08	2,07	2,47	2,20	1,14	0,35	0,34	0,38
	2,11	2,89	2,68	2,20	0,94	0,34	0,35	0,41
	2,04	2,72	2,83	1,86	1,02	0,29	0,34	0,36
	2,41	2,75	2,27	1,53	0,50	0,32	0,34	0,35
	2,09	2,62	2,75	1,67	0,59	0,33	0,34	0,37

Abb. 3-5

mg/ml	KO	5	POS
MW	91,50	89,78	83,72
STAB	3,24	3,87	5,69
	94	89	90
	93	96	74
	93	80	80
	92	85	82
	91	86	85
	88	88	91
	96	91	89
	90	90	85
	92	85	84
	95	91	87

89	91	73
96	90	88
89	92	90
89	91	85
94	90	74
84	93	88
94	94	82
88	94	80

**Abb. 3-6**

mg/ml	KO	5	KO	5
MW	3,83	4,26	1,00	1,27
STAB	1,34	2,03		0,88
	1,71	1,98	1,00	1,16
	1,20	0,82	1,00	0,68
	4,52	2,55	1,00	0,57
	1,58	6,47	1,00	1,35
	5,02	2,91	1,00	0,58
	5,02	2,82	1,00	0,56
	3,26	5,24	1,00	1,61
	4,52	6,09	1,00	4,08
	3,52	7,39	1,00	2,10
	4,62	1,61	1,00	0,35
	5,99	3,71	1,00	0,62
	3,88	3,43	1,00	0,89
	3,74	8,29	1,00	2,21
	5,31	4,11	1,00	0,77
	4,26	5,50	1,00	1,29
	4,58	4,68	1,00	1,02
	3,75	5,33	1,00	1,42
	2,49	3,78	1,00	1,52

### 1,8-Diazabicyclo[5.4.0]undec-7-en (DBU)

Abb. 3-7

mg/ml	KO	0,127	0,25	0,5	1,0	2,0
MW	1,48	1,93	1,99	1,90	1,73	0,41
STAB	0,29	0,06	0,25	0,31	0,21	0,02
	1,21	1,87	2,16	2,08	1,78	0,44
	1,73	1,93	2,06	2,01	1,87	0,42
	1,07	2,02	2,10	2,02	1,71	0,42
	1,33	1,95	2,05	2,04	1,82	0,38
	1,99	1,90	2,04	1,99	1,70	0,38
	1,35	1,91	2,04	2,06	1,73	0,38
	1,21	1,92	2,04	2,14	1,74	0,42
	1,61	1,94	1,25	2,01	0,42	0,42
	1,49	1,83	2,03	1,78	0,38	0,38
	1,66	2,03	1,41	1,21		
	1,61					
	1,78					
	1,60					
	1,01					

Abb. 3-13

mg/ml	KO	0,5	POS
MW	92,31	91,19	85,88
STAB	3,52	5,49	4,35
	92	96	86
	93	100	93
	85	77	86
	100	93	86
	91	89	82
	96	92	85
	89	85	91
	95	96	89
	92	94	85

	90	87	84
	96	91	87
	88	96	73
	93	88	88
	92	94	88
	93	93	85
	92	88	86

Abb. 3-14

mg/ml	KO	0,5	KO	0,5
MW	3,17	3,53	1,00	1,26
STAB	0,98	2,01	-	0,97
	2,76	2,71	1,00	0,98
	1,84	1,18	1,00	0,64
	2,53	0,95	1,00	0,38
	3,26	2,54	1,00	0,78
	1,73	4,59	1,00	2,65
	3,88	3,55	1,00	0,91
	1,58	5,70	1,00	3,61
	3,52	7,43	1,00	2,11
	4,62	4,87	1,00	1,05
	3,74	1,12	1,00	0,30
	2,68	2,22	1,00	0,83
	4,58	1,91	1,00	0,42
	4,26	4,27	1,00	1,00
	3,75	1,97	1,00	0,53
	2,49	6,49	1,00	2,61
	3,54	5,00	1,00	1,41

**6-Hydroxyhexansäure (HA)**

Abb. 3-15

mg/ml	KO	0,9	1,9	2,8	3,7	4,6	5,6	6,5	7,4
MW	0,81	0,72	0,55	0,47	0,40	0,36	0,33	0,31	0,30
STAB	0,05	0,05	0,09	0,09	0,09	0,04	0,06	0,04	0,03
	0,72	0,77	0,44	0,55	0,46	0,33	0,40	0,30	0,29
	0,85	0,65	0,57	0,49	0,54	0,35	0,34	0,28	0,30
	0,83	0,72	0,58	0,53	0,33	0,34	0,37	0,33	0,37
	0,83	0,78	0,71	0,53	0,26	0,46	0,31	0,35	0,32
	0,78	0,70	0,49	0,28	0,40	0,33	0,29	0,24	0,28
	0,85	0,76	0,56	0,48	0,42	0,35	0,22	0,32	0,29
	0,84	0,65	0,50	0,46	0,39	0,39	0,32	0,33	0,29
				0,45		0,36	0,37	0,32	0,29

Abb. 3-16

mg/ml	KO	0,5	0,9	1,4	1,9
MW	1,37	1,42	1,37	1,35	1,31
STAB	0,14	0,12	0,12	0,13	0,12
	1,38	1,40	1,35	1,34	1,30
	1,24	1,24	1,35	1,25	1,22
	1,21	1,38	1,26	1,23	1,17
	1,23	1,33	1,22	1,24	1,25
	1,63	1,60	1,54	1,57	1,49
	1,47	1,50	1,56	1,55	1,42
	1,46	1,54	1,38	1,40	1,36
	1,41	1,35	1,36	1,36	1,35
	1,46	1,36	1,35	1,33	1,25
	1,28	1,30	1,27	1,30	1,26
	1,21	1,29	1,19	1,22	1,18
	1,23	1,59	1,50	1,17	1,15
	1,53	1,56	1,51	1,51	1,50
	1,42	1,44	1,40	1,45	1,42

**Abb. 3-20**

mg/ml	KO		0,9		POS	
MW	90,33		73,67		88,53	
STAB	1,88		12,1638		2,13	
	91	92	88	89	86	86
	92	87	67	61	89	89
	87	91	61	80	88	88
	93	88	72	82	92	92
	90	92	73	78	86	86
	91	90	83	67	89	89
	92	90	91	49	88	88
	89		64		92	

**Abb. 3-21**

mg/ml	KO		0,9		KO		0,9	
MW	3,38		9,01		1,00		2,95	
STAB	1,02		2,95				1,28	
	3,13	3,81	11,33	6,34	1,00	1,00	3,62	1,66
	2,96	5,06	7,73	10,59	1,00	1,00	2,62	2,09
	1,99	3,11	7,73	15,70	1,00	1,00	3,88	5,05
	3,90	2,04	5,42	11,24	1,00	1,00	1,39	5,51
	3,94	2,27	7,80	9,98	1,00	1,00	1,98	4,40
	3,26	4,80	10,01	7,84	1,00	1,00	3,07	1,63
	2,04	4,68	5,18	12,91	1,00	1,00	2,54	2,76
	3,07		6,41		1,00		2,09	

**Abb. 3-22**

mg/ml	KO	0,005	0,009	0,014	0,019	0,023	0,028	0,032	0,037
MW	1,0	0,58	0,72	0,81	0,77	0,72	1,04	1,81	2,18
STAB		0,27	0,23	0,29	0,19	0,03	0,09	0,61	1,05
	1,0	0,68	0,89	0,85	0,65	0,74	0,93	1,20	1,17
	1,0	0,80	0,82	1,08	0,98	0,69	1,09	1,82	3,27
	1,0	0,28	0,46	0,51	0,67	0,75	1,10	2,41	2,11

**Abb. 3-23**

mg/ml	KO	0,005	0,009	0,014	0,019	0,023	0,028	0,032	0,037
MW	93,33	91,67	92,67	93,00	95,00	93,67	94,33	95,33	94,67
STAB	2,89	1,53	2,52	2,65	2,65	2,31	3,06	2,52	3,06
	90	90	90	90	93	91	91	93	92
	95	93	95	95	98	95	97	98	98
	95	92	93	94	94	95	95	95	94