

Aus dem Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Wirkungen von Levofloxacin und Prednisolon alleine und
in Kombination auf humane Tenozyten *in vitro***

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Anders Fagh

aus Partille/Schweden

Gutachter/in: 1. Prof. Dr. med. R. Stahlmann
 2. Prof. Dr. M. Shakibaei
 3. Priv-Doz. Dr. med. U. Steckelings

Datum der Promotion: 25.10.2013

Veröffentlichungen

Poster

Anders Fagh, Judith Sendzik, Jessie Webb, Irmela Baumann-Wilschke and Ralf Stahlmann.
Prednisolone enhances apoptotic effects of Levofloxacin in human-derived tenocytes in vitro. 48.
Frühjahrstagung der DGPT Mainz, 2007.

1 Einleitung	6
1.1 Tendopathien	6
1.2 Sehne	7
1.2.1 Sehnenzellen	7
1.3 Chinolon- und Glukokortikoid-induzierte Tendopathien	8
1.4 Chinolone	10
1.4.1 Allgemeines	10
1.4.2 Struktur und Wirkungsmechanismus	12
1.4.3 Interaktionen	13
1.4.4 Kontraindikationen und Nebenwirkunge	13
1.4.5 Levofloxacin	14
1.5 Glukokortikoide / Prednisolon	14
1.5.1 Struktur und Wirkungsmechanismus	15
1.5.2 Interaktionen	16
1.5.3 Kontraindikationen und Nebenwirkungen	16
1.6 Apoptose	17
1.6.1 Initiationsphase	17
1.6.2 Typ I: Der extrinsische Weg	17
1.6.3 Typ II: Der intrinsische Weg	18
1.7 Fragestellung und Zielsetzung	19

2 Material und Methoden	21
2.1 Material	21
2.1.1 Geräte	21
2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien	22
2.1.3 Antikörper	24
2.1.4 Kulturmedien und Lösungen	24
2.1.4.1 Medien	24
2.1.4.2 Lösungen	24
2.2 Methoden	25
2.2.1 Zellkulturen	25
2.2.1.1 Herstellung von Primärkulturen	25
2.2.1.2 Zellkultivierung	26
2.2.1.3 Einfrieren	26
2.2.1.4 Zellzählung	27
2.2.2 Testsubstanzen	27
2.2.3 Versuchsaufbau	28
2.2.4 Lichtmikroskopie	30
2.2.5 MTT-Zytotoxizitätstest	30
2.2.5.1 Versuchsdurchführung (MTT-Zytotoxizitätstest)	31
2.2.5.2 Prinzip der Datenauswertung	31
2.2.6 Durchflusszytometrie	32
2.2.6.1 Probenvorbereitung bei der Annexin V Färbung	32

2.2.6.2 Datenauswertung der Durchflußzytometrie	33
2.2.7 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tenozyten	33
2.2.7.1 Versuchsdurchführung Immunhistochemie	33
2.2.7.2 Fluoreszenzmikroskopie und -Fotografie	34
2.2.7.3 Prinzip der Auswertung der Immunhistochemie	34
2.2.8 Statistik	35
3 Ergebnisse	36
3.1 Lichtmikroskopie	36
3.2 MTT-Zytotoxizitätstest	39
3.2.1 MTT-Zytotoxizitätstest der 3T3 Fibroblasten	39
3.2.2 MTT-Zytotoxizitätstest der humanen Tenozyten	42
3.3 Durchflußzytometrie	45
3.3.1 Annexin V Färbung von humanen Tenozyten nach Inkubation mit Camptothecin	47
3.3.2 Annexin V Färbung nach Inkubation mit Levofloxacin und Prednisolon über 24 h	47
3.3.3 Annexin V Färbung nach Inkubation mit Prednisolon über 20 und 60 Tage	51
3.3.4 Annexin V Färbung an humanen Finger -Tenozyten	54
3.4 Immunhistochemie und Bildanalyse	56
3.4.1 Nachweis von Kollagen Typ I in Tenozyten inkubiert mit Levofloxacin über 24 h	56
3.4.2 Nachweis von Kollagen Typ I nach Inkubation mit Levofloxacin und Prednisolon	56
4. Diskussion	63
4.1 Fallberichte, epidemiologische- und -Kohortenstudien	63

4.2 Untersuchungen der Toxizität von Chinolonen und Glukokortikoiden	65
4.3 Ausblick	70
4.4 Zusammenfassung	70
5 Literaturverzeichnis	73
Selbständigkeitserklärung	81
Lebenslauf	82
Danksagung	83

1 Einleitung

1.1 Tendopathien

„Tendopathie“ ist eine Bezeichnung für eine abakterielle Entzündung der Sehne. Die Ursachen für eine Tendopathie können unterschiedlich sein, im Vordergrund stehen Überbelastung, Traumen, Mikrotraumen, Stoffwechselstörungen oder Durchblutungsstörungen, aber auch toxische Einflüsse kommen als Ursache in Betracht. Die Symptome einer Tendopathie äußern sich in bewegungs- sowie belastungsabhängigen Schmerzen. Falls diese Beschwerden ignoriert werden und die Sehne weiter belastet wird, kann es zu einer Sehnenruptur kommen. Als Therapie einer Tendopathie steht ein konservativer Ansatz mit Wärme- oder Kälteanwendungen, Ruhigstellung sowie Antiphlogistika im Vordergrund, im Falle einer Sehnenruptur kann ein chirurgischer Eingriff erforderlich werden. Tatsache ist aber, dass eine Tendopathie erhebliche Leiden und Einschränkungen der Mobilität des Patienten verursachen kann. Als potenziell tendotoxisch gelten Arzneimittel wie Glukokortikoide und Chinolone alleine oder in Kombination. Eine Arzneimittel-induzierte Tendopathie äußert sich im bildgebenden Verfahren wie z.B. MRT als deutliche Auftreibung der Sehne (**Abbildung 1**).



Abbildung 1: MRT. Tendopathie bei einem Patienten nach Behandlung mit Ciprofloxacin. Der Kreis markiert eine deutliche Auftreibung der Achillessehne. Die Aufnahme wurde freundlicherweise von Herrn Dr. Bernd Viehöfer, Herzogenrath, zur Verfügung gestellt

1.2 Sehne

Eine Sehne ist jener stützgewebige Teil des Muskels, der mit dem Knochen verbunden ist. Sie dient somit der Kraftübertragung der Muskeln auf die Knochen und ermöglicht damit die Beweglichkeit der Gelenke. Sie muss für diese Funktion eine hohe mechanische Stabilität und Zugfestigkeit aufweisen.

Eine Ausnahme bilden die Zwischensehnen, die zwei oder mehrere Muskelbäuche eines Muskels verbinden oder an einer Faszie ansetzen. Die Sehnen können relativ kurz, aber auch sehr lang sein. Sie bestehen wie alles Binde- und Stützgewebe aus Zellen (Tenozyten) und einer Extrazellulärmatrix, die sich hauptsächlich aus kollagenen Fasern von 60-80% Kollagen Typ I, III und IV und 1-2% Elastin zusammensetzt. Die kollagenen und elastischen Fasern werden von einer Grundsubstanz umgeben, die aus Wasser, Glykosaminoglykanen, Proteoglykanen und Glykoproteinen besteht. Sie sind von der Sehnenhaut (Peritendineum) umgeben. Die Sehnenzellen (Tenozyten), die sich zwischen den Kollagenfasern befinden, synthetisieren die Komponenten der extrazellulären Matrix. Damit haben sie eine zentrale Bedeutung bei der Erneuerung (remodelling) und somit der Funktionstüchtigkeit der gesamten Sehne (Jozsa et al., 1991; Benjamin und Ralphs, 2000; Kannus 2000).

Es sind nur wenige Nerven und Blutgefäße in den Sehnen vorhanden. Unter diesen physiologischen Bedingungen ist die Sehne nur schwach vaskularisiert (bradytrophes Gewebe) und besitzt somit eine schlechte Regenerationsfähigkeit. Veränderungen im Elektrolyt- oder Nährstoffgehalt können kaum oder nur sehr langsam ausgeglichen werden (Ahmed et al., 1998).

1.2.1 Sehnenzellen

Die Sehnenzellen (Tenozyten) sind flache fibroblastenartige Zellen. Morphologisch sind die Sehnenzellen lang und flach mit einem langgestrecktem Zellkern und langen Ausläufern, die dem interzellulären Kontakt dienen. Die Sehnenzellen (**Abbildung 2**) bilden und regulieren die extrazelluläre Matrix, dementsprechend sind die Golgi-Apparate groß und das raue endoplasmatische Retikulum sehr ausgeprägt.

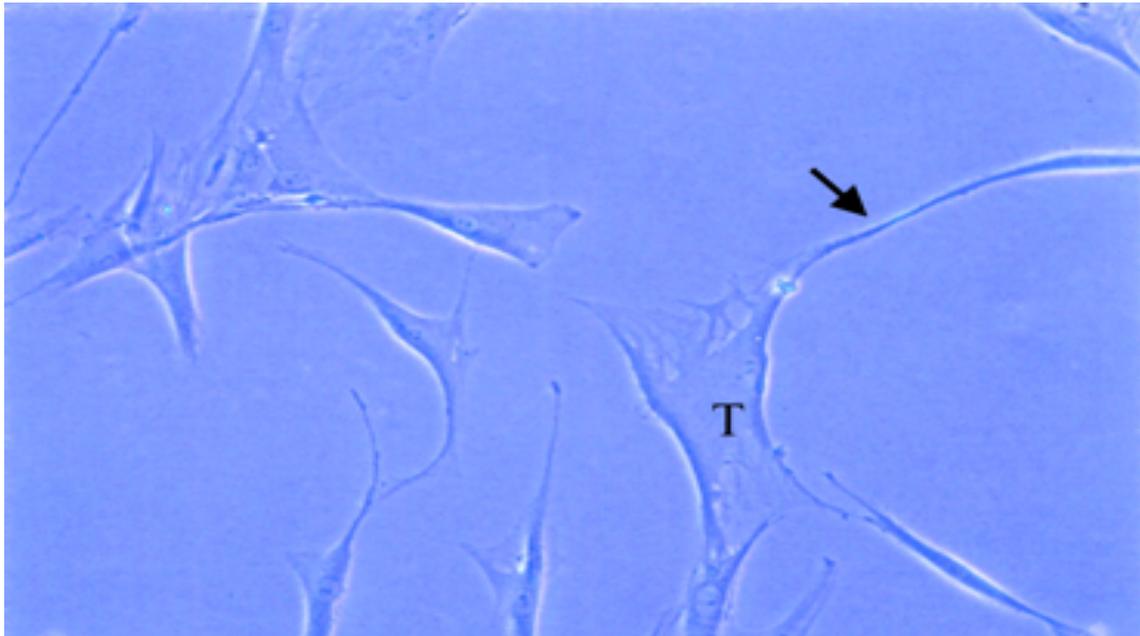


Abbildung 2: Lichtmikroskopische Nativaufnahme von humanen Hüft-Tenozysten in vitro (T). Deutlich zu sehen sind die langgezogenen Ausläufer (**Pfeil**) der Zellen.

1.3 Chinolon- und Glukokortikoid-induzierte Tendopathien

Es ist seit langem bekannt, dass Glukokortikoide ein tendotoxisches Potential besitzen. Die ersten Fallberichte können bis in die frühen 60er Jahre zurück verfolgt werden (Smaill 1961; Cowan und Alexander, 1960). Von mehreren Arbeitsgruppen wurde in den 90er Jahren beschrieben, dass eine systemische Glukokortikoid-Therapie mit einem erhöhten Risiko einer Tendopathie in Verbindung steht (z.B. Kao et al., 1991; Kotnis et al., 1999; Hayes et al., 2000). Glukokortikoide sind als Immunsuppressiva weit verbreitet und werden vor allem bei Autoimmunerkrankungen häufig eingesetzt. Die Therapie mit Glukokortikoiden wird häufig über lange Zeit durchgeführt, oft sogar lebenslang. Bekannt ist auch, dass Patienten, die unter einer immunsuppressiven Therapie stehen, häufiger an bakteriellen Infektionen erkranken. Diese wiederum können mit einem Antibiotikum behandelt werden, wobei häufig Chinolone zur Anwendung kommen.

Erst in den 80er Jahren wurde bekannt, dass die Chinolone ein tendotoxisches Potenzial besitzen. 1983 beschrieben Bailey und Mitarbeiter, dass die Einnahme eines Chinolons zu Sehnenschäden führen kann (Bailey et al., 1983). Die Gründe für diese Tendotoxizität waren aber weitgehend unbekannt. Weitere retrospektive Studien und Fallberichte bestätigten den Zusammenhang

zwischen einer Chinoloneinnahme und einem Tendopathierisiko (Pierfitte und Royer, 1996; Kahn und Hayem, 1997). Andere Studien untersuchten die möglichen Risikofaktoren. 1999 beschrieben van der Linden und Mitarbeiter das erhöhte Risiko, eine Achillessehnentendinitis zu erleiden, für Patienten, die mit einem Fluorchinolon behandelt worden waren im Vergleich zur Therapie mit anderen Antibiotika, wie z.B. Amoxicillin oder Cotrimoxazol. Weitere Studien zeigten, dass ein höheres Lebensalter (> 60 Jahre) einen Risikofaktor darstellt (van der Linden et al., 2001). Auch Patienten, die unter einer Therapie mit Glukokortikoiden stehen, haben ein höheres Risiko, an einer Tendopathie zu erkranken. Dies wurde 2003 in einer Fall-Kontroll-Studie aus Großbritannien dargestellt (Van der Linden et al., 2003).

Um den Pathomechanismus Chinolon-induzierter Tendopathien besser zu verstehen, wurden zahlreiche *in vitro* und *in vivo* Studien zu diesem Thema durchgeführt. Hier soll darauf hingewiesen werden, dass Chinolone auch einen chondrotoxischen Effekt aufweisen. Dies scheint darauf zu beruhen, dass Sehnenzellen und Chondrozyten (Knorpelzellen) große Ähnlichkeit besitzen. Studien an jungen Tieren haben gezeigt, dass eine Chinolonbehandlung zu Proteoglykanverlust sowie Matrixauflösung führt (von Keutz und Christ, 1998; Stahlmann et al., 2000). Die Integrin-Rezeptoren des $\beta 1$ -Subtyps sind essenziell für den Zell-Zell-Kontakt. Chondrozyten sowie Tenozyten sind von ihren Kontakten mit benachbarten Zellen abhängig, und so auch das Gewebe, das sie ausmachen (Shakibaei und Merker, 1999). Ein Verlust dieser Rezeptoren führt zu einem Gewebeuntergang (Stahlmann et al., 1993; Stahlmann et al., 1995; Stahlmann et al., 2000). Als eine Ursache für das Absterben der Zellen wird die Apoptose, der programmierte Zelltod, vermutet. Als Auslöser von Apoptose wird die Hemmung des MAP-Kinase-Signaltransduktionswegs diskutiert. Wird die MAP-Kinase gehemmt, führt dies z.B. zur Apoptose bei Chondrozyten (Shakibaei et al. 2001; Shakibaei et al; 1999).

Die Sehnenzellen und Chondrozyten besitzen große Ähnlichkeit im Bezug auf Signalproteine, die sich intrazellulär sowie transmembranär befinden. Biochemische Untersuchungen bei Hunden zeigten nach Chinolongabe eine signifikante Reduktion der transmembranären Signalproteine des MAP-Kinase-Signaltransduktionswegs sowie von Kollagen (Shakibaei et al., 2001). *In vitro* Studien zeigten, dass ein Fluorchinolon in Kombination mit einem Steroid zu einem höheren zytotoxischen Effekt führt als eine der beiden Substanzen alleine (Kempka et al., 1996). Andere Studien haben gezeigt, dass Tenozyten von Tieren, die mit einem Fluorchinolon inkubiert worden sind, einem erhöhten oxidativen Stress ausgesetzt waren, wodurch die zytotoxische Wirkung erklärt werden kann (Pouzaud et al., 2004). Torricelli und Mitarbeiter

haben zeigen können, dass es in den Tenozyten von Ratten nach einer längeren Gabe von Methylprednisolon (in vivo) zu einer verminderten Expression von Proteoglykanen, Fibronectin, Kollagen Typ I und sogar einer gestörten Zellproliferation kommt (Torricelli et al., 2006). Weitere in vitro Untersuchungen an humanen Sehnenzellen zeigten, dass Fluorchinolone (Ciprofloxacin und Levofloxacin) in Konzentrationen, die unter therapeutischen Bedingungen erreicht werden (3-10 mg/l), ebenfalls zu degenerativen Veränderungen führen (Sendzik et al., 2005). Hierbei konnten eine Reihe von tendotoxischen Effekten festgestellt werden, unter anderem ein Einfluss auf die Integrine und den MAP-Kinase Signalweg, die ebenfalls zu einer Verstärkung des programmierten Zelltods führen. Dazu konnte ein Nachweis von aktivierter Caspase 3 sowie verminderter Expression von Kollagen Typ I geführt werden.

1.4 Chinolone

1.4.1 Allgemeines

Die Entwicklung der Chinolone begann 1962 mit der Einführung von Nalidixinsäure als antibakterielles Therapeutikum bei Harnwegsinfektionen. Aufgrund ihrer ungünstigen Pharmakokinetik, geringer Aktivität und Tendenz zur schnellen Resistenzentwicklung, wird Nalidixinsäure heute nicht mehr eingesetzt (Leshner et al., 1962). Andere geringfügig verbesserte nicht-fluorierte Chinolone aus der Nalidixinsäure-Gruppe (Rosoxacin, Cinoxacin und Pipemidsäure) sind heute den fluorierten Chinolonen in ihrem Wirkspektrum und der antibakteriellen Aktivität deutlich unterlegen und haben wie Nalidixinsäure an Bedeutung verloren.

Die meisten fluorierten Chinolone haben eine Piperazinyl-Seitenkette. Bei Ofloxacin findet man einen N-Methylpiperazin-Ring. Das führt zu einer verlängerten Halbwertszeit. Ciprofloxacin und Moxifloxacin sind mit einem Cyclopropyl-Rest anstatt einer Äthylgruppe in Position eins ausgestattet. Dies ergibt eine erhöhte antibakterielle Aktivität. Neben diesen Strukturunterschieden können Fluorchinolone auch mehrfach fluoriert sein, wie z.B. Lomefloxacin und Sparfloxacin, die zweifach fluoriert sind. Fleroxacin, Trovafloxacin und Temafloxacin sind dreifach fluoriert. Das Grundprinzip ist eine Art von Baukastensystem, bei dem verschiedene Strukturbestandteile variiert werden können, während andere Positionen (C3 und C4) unverändert bleiben müssen, damit die antibakterielle Aktivität erhalten bleibt.

Um eine bessere Übersicht zu bekommen, hat 1998 die Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie eine Einteilung der in Deutschland verfügbaren Fluorchinolone in vier Gruppen vorgeschlagen (**Tabelle 1**).

Norfloxacin ist Vertreter der Gruppe I und wird hauptsächlich bei Harnwegsinfektionen eingesetzt. Es ist nur in oraler Form verfügbar. Zur Gruppe II gehören Ciprofloxacin und Ofloxacin. Ciprofloxacin wird heute nach wie vor häufig angewandt. Die häufige Verordnung von Ciprofloxacin erklärt sich durch den großen Indikationsbereich wie Harnwegs-, Weichteil-, Knochen-, und Hautinfektionen, oder auch systemischen Infektionen und Sepsis. Vertreter der Gruppe III ist Levofloxacin. Er handelt sich um den aktiven Teil des Racemates Ofloxacin. Levofloxacin entspricht in seinen pharmakokinetischen Eigenschaften dem Ofloxacin. Levofloxacin weist aber in vitro eine doppelt so hohe antibakterielle Aktivität auf. Dazu kann Levofloxacin auch in höheren Dosierungen zur Behandlung von Pneumokokken-Infektionen eingesetzt werden. Levofloxacin wurde der Gruppe III zugeordnet. Vertreter der Gruppe IV ist Moxifloxacin mit guter Pneumokokken-Wirksamkeit und erweitertem Spektrum. Im Gegensatz zur Ciprofloxacin und Levofloxacin hat Moxifloxacin eine gute Anaerobierwirksamkeit.

Gruppe	Definition	Beispiele
I	Orale Fluorchinolone mit eingeschränkter Indikation im wesentlichen bei Harnwegsinfekten.	Norfloxacin
II	Oral und systemisch anwendbare Fluorchinolone mit breitem Spektrum und großem Indikationsbereich.	Ciprofloxacin
III	Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und „atypische“ Erreger.	Levofloxacin
IV	Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und „atypische“ Erreger sowie gegen Anaerobier.	Moxifloxacin

Tabelle 1: Einteilung nach Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapie (modifiziert nach Naber und Adam 1998)

1.4.2 Struktur und Wirkungsmechanismus

Alle Chinolone besitzen eine gemeinsame Grundstruktur, das Chinolinringsystem. Die wichtigsten Substituenten und Strukturmerkmale in dem Ringsystem sind die Carboxygruppe in Position 3 mit einer daneben positionierten Oxofunktion in Position 4. Über diese Substituenten können die Chinolone an den Gyrase-Komplex binden und ihre bakterizide Wirkung entfalten. Diese beiden Gruppen sind auch für die chelatbindenden Eigenschaften mit zwei- und dreiwertigen Kationen zuständig, sowie für Wechselwirkungen (Stahlmann und Lode, 1999). Die neueren Chinolone sind mit einem Fluoratom in Position 6 ausgestattet, welches zu einem Anstieg der antibakteriellen Aktivität führt. Deshalb werden sie auch Fluorchinolone genannt. In vitro Studien zeigen aber auch, dass es hoch aktive Chinolone ohne Fluorsubstituenten in Position 6 gibt (Takahata et al., 1999). Ebenfalls können geeignete Substituenten in Position 1 (Ethyl- oder Cyclopropylreste) und 7 (5- oder 6-gliedrige Heterozyklen) zu einer erhöhten antibakteriellen Wirkung der Chinolone führen. Die Substituenten in Position 5 und 8 werden mit unerwünschten Nebenwirkungen in Verbindung gebracht.

Der Wirkungsmechanismus der Chinolone bezieht sich auf die Hemmung der DNA-Synthese der Bakterien. Ziel dieser Hemmung sind die Topoisomerasen II und IV. Die Topoisomerase II wird auch DNA-Gyrase genannt (Petersen, 2001). Topoisomerasen kommen in allen Organismen vor. Ihre Aufgabe ist es, Helix-Windungen von doppelsträngigen DNA-Strängen aufzulockern und zu lösen, so dass eine Transkription von DNA in RNA durchgeführt werden kann. Neben dieser Aufgabe ist die Topoisomerase II für die räumliche Anordnung und das Supercoiling der DNA-Stränge zuständig. Ohne diese Funktion könnte das bakterielle Chromosom nicht in die Bakterienzelle hineinpassen. Die Topoisomerase IV ist für die Trennung beider Tochterchromosomen nach der Replikation verantwortlich (Wigley, 1995; Heisig und Wiedemann, 2001).

Die Chinolone dringen durch Diffusion in die Bakterienzellen ein und können damit an den Gyrase-Komplex binden und somit ihre Wirkung entfalten. Die genaue Bindungsstelle, an der die Chinolone an den Gyrase-Komplex binden, ist noch nicht bekannt. Hier werden sowohl Wasserstoffbindungsbrücken (Shen et al., 1989) als auch Magnesiumbrücken diskutiert (Palu et al., 1992). Die bakterizide Wirkung der Chinolone führt dazu, dass die Bakterienzelle nicht mehr in der Lage ist, ihre DNA-Verdrillung sowie die essentiellen Vorgänge der Transkription und Replikation durchführen zu können (Heisig und Wiedemann, 2001)

1.4.3 Interaktionen

Die Bioverfügbarkeit der Chinolone wird durch Komedikation mit Präparaten die Magnesium, Kalzium oder Aluminium enthalten herabgesetzt (Höffken et al., 1985; Lode, 1988; Lomaestro und Bailie, 1991). Eisenpräparate, Sucralfat und zinkhaltige Multivitaminformulierungen zeigten eine signifikante Reduktion der Resorption der Chinolone. Wegen einer Hemmung von Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (Isoform CYP1A2) durch manche Chinolone kommt es zu einem verlangsamten Abbau von Substanzen wie Theophyllin und Koffein. Dies führt wiederum zu einer erhöhten Plasmakonzentration dieser Substanzen z.B. bei Gabe von Ciprofloxacin oder Enoxacin (Stahlmann et al., 1992).

1.4.4 Kontraindikationen und Nebenwirkungen

Die Chinolone sind antibakterielle Substanzen, die gut verträglich sind, doch wie bei anderen Chemotherapeutika gehören Übelkeit, Erbrechen und Diarrhoe zu den häufigsten unerwünschten Nebenwirkungen. Sie zeigen aber auch spezifische Nebenwirkungen, die beachtet werden müssen. Hierzu gehören z.B. ZNS-Beeinträchtigungen, phototoxische Reaktionen, Chondrotoxizität und Tendopathien. Die Nebenwirkungen des Gastrointestinaltraktes, der Haut und des ZNS der Chinolone sind reversibel, wenn das Medikament abgesetzt wird.

In 8-15 % der Fälle treten gastrointestinale Beschwerden auf. Einige Chinolone sind phototoxisch und bei intensiver UV-Exposition können Hautexantheme auftreten, die sich in sonnenbrandähnlichen Reaktionen äußern. Auf eine erhöhte UV-Lichtexposition sollte generell während einer Chinolon-Therapie verzichtet werden (Stahlmann und Lode, 2000). Kopfschmerzen, Schwindel, Müdigkeit, Schlaflosigkeit und Gelenk- und Muskelschmerzen treten selten auf. Kinder sollten mit Fluorchinolonen nicht behandelt werden, da im Tierexperiment Veränderungen am juvenilen Knorpel und Tendotoxizität beobachtet worden sind (Kashida und Kato, 1997; Kato und Onodera, 1988; Burkhardt et al., 1990; Stahlmann et al., 1990; Förster et al., 1996).

Bei einem Glucose-6-Phosphatdehydrogenasemangel kann es zu einer hämolytischen Anämie kommen. Nierenschäden durch Ausfällung von Chinolonen (Ciprofloxacin) im Tubulussystem mit Kristallurie (selten) wurden beschrieben, auch andere seltene Nebenwirkungen wie Hyperglykämie und Herzrhythmusstörungen sind möglich. Durch ihr tendotoxisches Potential kann es zu Entzündungen und Rupturen der Sehnen (insbesondere die Achillessehne) kommen

1.4.5 Levofloxacin

Levofloxacin wird von der Sanofi Aventis Pharma Deutschland GmbH (Berlin) unter dem Handelsnamen Tavanic[®] vertrieben. Es ist das wirksame L-Enantiomer des Racemates Ofloxacin und ist seit 1998 in Deutschland zugelassen (**Abbildung 3**).

Indikationen für Levofloxacin sind ambulant erworbene Pneumonie, akute Exacerbation einer chronischen Bronchitis, komplizierte Harnwegsinfektionen sowie Haut- oder Weichteilinfektionen. Spezielle Indikationen sind Chlamydien- und Mykoplasmeninfektionen sowie Salmonellose und Legionellose.

Nach einer Gabe von 500 mg Levofloxacin p.o. werden im Plasma C_{max} -Werte von 4,8 bis 5,7 mg/l erreicht. Die AUC liegt bei 45 bis 61 mg/l x h (Dudley, 2003). Es gibt bis jetzt keine Angaben über die Konzentration im Bindegewebe des Menschen nach Gabe von Levofloxacin.

Bei Studien an Ratten hat man nach einer wiederholten Gabe von 100 mg/kg KG Ofloxacin eine höhere Konzentration (2- bis 3fach) im Knorpel im Vergleich zum Plasma feststellen können (Lozo et al., 2002). Auch nach Gabe von höheren Dosen Levofloxacin (30 und 100 mg/l) konnte man nach 1 bzw. 2 Stunden an Ratten eine höhere Konzentration im Knorpel im Vergleich zum Plasma feststellen (Kato et al., 1995).

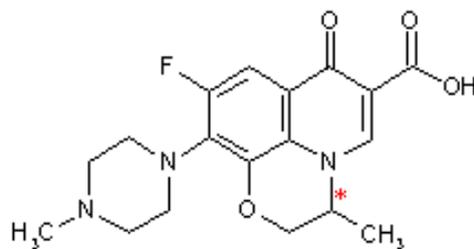


Abbildung 3: Strukturformel von Levofloxacin (* = Asymmetriezentrum)

1.5 Glukokortikoide / Prednisolon

Glukokortikoide sind eine Klasse von Steroidhormonen aus der Nebenniere. Sie sind alle Derivate des Progesterons. Durch ihre Wirkung wird eine Reihe von physiologischen Funktionen beeinflusst wie der Stoffwechsel sowie der Wasser- und Elektrolythaushalt. Neben diesen Wirkungen haben die Kortikoide auch einen wesentlichen Einfluss auf das Immunsystem durch ihre Immunsuppression und ihren entzündungshemmenden Effekt. Therapeutisch haben die Kortikoide eine hohe Bedeutung und werden in vielen Bereichen eingesetzt. Dazu gehören ein

Vielzahl von systemischen Erkrankungen wie zum Beispiel der systemische Lupus erythematoses, rheumatische Erkrankungen, allergische Reaktionen wie Urtikaria, anaphylaktischer Schock und Heuschnupfen oder auch chronische Atemwegserkrankungen. Durch ihre Immunsuppression besitzen sie eine wichtige Funktion in der Therapie gegen die Abstoßung von Transplantaten. In dieser Arbeit wurde Prednisolon als typischer Vertreter der Glukokortikoide eingesetzt (**Abbildung 4**), welches in der Medizin häufig angewendet wird.

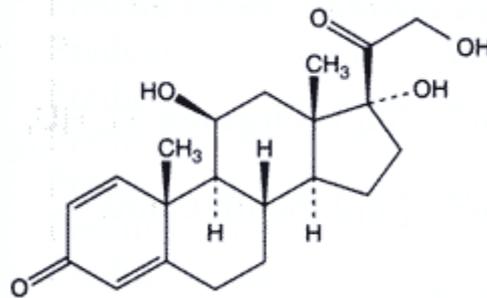


Abbildung 4: Strukturformel von Prednisolon

1.5.1 Struktur und Wirkungsmechanismus

Gemeinsam für alle Steroidhormone ist das Grundgerüst, das aus vier annelierten Ringen besteht. Ihre Wirkung ist abhängig von der Ketogruppe an C-3, der Doppelbindung zwischen C-4 und C-5, der Ketoalkoholgruppe an C-17, der α -OH-Gruppe an C-17 und der OH-Gruppe an C-11. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe sind die beiden natürlichen Glukokortikoide Kortison und Kortisol. Zur Ermittlung der Wirkungsstärke dient Kortisol mit der Wirkungsstärke 1. Die meisten synthetisch hergestellten Glukokortikoide haben keine mineralkortikoide Wirkung mehr mit Ausnahme von Prednison und Prednisolon. Die Wirkungsstärken der unterschiedlichen Derivate unterscheiden sich stark. Sie wird durch Einführung von Methylgruppen oder von Fluor ins Steroidgerüst beeinflusst. Dies beeinflusst nicht nur die Wirkungsstärke und Wirkungsdauer, sondern auch die Nebenwirkungen. Die Glukokortikoide vermitteln ihre Wirkung durch eine Bindung über einen Glukokortikoidrezeptor (α 1-Subtyp des humanen Glukokortikoidrezeptors). Dieser Subtyp befindet sich als Form eines Komplexes assoziiert mit anderen Proteinen im Zytoplasma der Zelle. Die anderen Proteine in diesem Komplex sind z.B. Hitzeschockproteine wie HSP90, die als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren wirken (Hollenberg et al., 1985). Durch die Gewährleistung der richtigen

Faltung des Proteins ermöglichen die Hitzeschockproteine eine Ligandenbindung. Ohne diese Faltung würden sich die Glukokortikoidrezeptoren in einem inaktiven Zustand befinden (Pratt et al., 1999). Die Ligandenbindung führt zu einer Dissoziation der Hitzeschockproteine, was dazu führt, dass der Glukokortikoidrezeptor in den Zellkern hineinwandert. Nach der Einwanderung des Rezeptors kommt es entweder zur Hemmung oder Aktivierung spezifischer Zielgene oder zur Interaktion mit Transkriptionsfaktoren (Schäfer-Korting et al., 2005).

Prednisolon ist ein Arzneimittel, das zur Gruppe der synthetischen Glukokortikoide gehört. Es ist ein aktiver Metabolit des Prednisons und hat im Körper dieselbe Wirkung wie das in der Nebennierenrinde hergestellte Kortisol, allerdings um das 5-fache verstärkt.

1.5.2 Interaktionen

Prednisolon zeigt zahlreiche Wechselwirkungen mit anderen Arzneimitteln, die entweder eine pharmakodynamische oder pharmakokinetische Ursache haben. Zu den wichtigsten gehören die ulzerogene Wirkung bei gleichzeitiger Anwendung von NSAR, verminderte Wirkung von oralen Antidiabetika, herabgesetzte Wirkung von Barbituraten, Phenytoin, Primidon (Antiepileptika). Rifampicin vermindert die Wirkung von Prednisolon. Antikoagulanzen werden in ihrer Wirkung abgeschwächt bei gleichzeitiger Einnahme mit Prednisolon. Aufgrund einer erhöhten Kaliumausscheidung während der Prednisolon-Einnahme kann eine gleichzeitige Einnahme von Abführmitteln die Entstehung von Herzrhythmusstörungen begünstigen.

1.5.3 Kontraindikationen und Nebenwirkungen

Während einer Prednisolontherapie kommen zahlreiche Nebenwirkungen in Betracht, besonders während einer Langzeittherapie. Häufige Nebenwirkungen bei Langzeittherapien sind das Cushing Syndrom und die diabetogene Stoffwechsellage aufgrund der glukoneogenetischen Wirkung der Glukokortikoide. Die katabole Wirkung der Glukokortikoide kann zu reversiblen Myopathien und Osteoporosen führen. Hier werden die Osteoblasten gehemmt, und es besteht eine Vitamin-D-antagonistische Wirkung. Psychische Veränderungen wie Euphorien, Schlaflosigkeit, Nervosität und Antriebsstörungen werden auch während der Therapie mit Glukokortikoiden beobachtet. Eine erhöhte Infektanfälligkeit durch ihre immunsuppressive Wirkung wird ebenso beobachtet, besonders die Anfälligkeit für Pilzinfektionen. Zu den

Kontraindikationen gehören Virus- oder Pilzinfektionen, Osteoporose und Ulkuserkrankungen sowie andere Infektionserkrankungen.

1.6 Apoptose

Die Apoptose (griechisch – der Niedergang) kann als eine Form des programmierten Zelltodes beschrieben werden. Es ist ein „Selbstmordprogramm“, bei dem einzelne Zellen absterben. Diese Reaktion kann entweder von außen oder aufgrund zellinterner Prozesse ausgelöst werden (z.B. bei starker Schädigung der Erbinformation). Im Gegensatz zu der Nekrose wird die Apoptose von der betreffenden Zelle selbst durchgeführt. Die Apoptose steht unter strenger Kontrolle, und es wird gewährleistet, dass die einzelne Zelle ohne weitere Schädigung des Nachbargewebes zugrunde geht. Die zentrale Rolle bei diesem Prozess wird von einer Gruppe von Enzymen mit proteolytischer Aktivität gewährleistet, den Caspasen (Hotchkiss et al., 2009). Die Apoptose wird in zwei Phasen unterteilt: Initiations- und Effektorphase.

1.6.1 Initiationsphase

Die Initiationsphase wird in zwei Vorgänge unterteilt: Den extrinsischen und den intrinsischen Weg. Danach unterscheidet man auch in Typ I und Typ II.

1.6.2 Typ I: Der extrinsische Weg

Bei dem extrinsischen Weg wird der Prozess eingeleitet durch eine Ligandenbindung an einen Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie wie z.B. CD95. Diese Rezeptoren nennt man Todesrezeptoren, die in ihrem zytoplasmatischen Teil eine Todesdomäne besitzen, eine sogenannte DD („death domain“). Die Liganden, die hier aktiv sind, sind z.B. der TNF (Tumor-Nekrose-Faktor) sowie andere Zytokine, die von T-Lymphozyten sezerniert werden können. Die Bindung an die Todesdomäne führt zu einer Trimerisierung dieser Rezeptoren. Das führt wiederum zu einer Struktur, an die nur Adaptormoleküle mit einer eigenen Todesdomäne durch homotypische Interaktion binden können. Als erster Schritt wird das TRADD (TNF-Rezeptor assoziiertes Protein) rekrutiert. An die Todesdomäne des TRADD bindet anschließend das FADD (Fas assoziiertes Protein mit Todesdomäne). Das nun gebundene FADD besitzt auch eine DED

(death effector domain), an die die pro-Caspase 8 mit ihrer DED bindet. Durch eine hohe lokale Konzentration kann sich die pro-Caspase 8 autokatalytisch aktivieren. Danach löst die aktivierte Caspase 8 die Caspase-Kaskade aus, dies führt wiederum zu einer Verstärkung durch Rückkopplung, durch die wiederum weitere Caspase 8-Moleküle aktiviert werden.

1.6.3 Typ II: Der intrinsische Weg

Beim intrinsischen Weg oder der Apoptose des Typs II kommt es zur Freisetzung von Cytochrom C und anderen pro-apoptotischen Faktoren wie Smac/DIABLO aus den Mitochondrien in das Zytoplasma. Dieser Weg kann ausgelöst werden durch Tumor-Suppressoren, wie z. B. p53, einem Transkriptionsfaktor, der durch Schädigung der DNA aktiviert wird. P53 stimuliert Expressions- und pro-apoptotisch wirkende Mitglieder der Bcl-2 Familie (z. B. Bax, Bad). Diese führen dann zur Freisetzung der pro-apoptotischen-Faktoren aus dem mitochondrialen Intermembranraum. Durch die Bindung von Cytochrom C und dATP an Apaf-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) wird eine Konformationsänderung des Proteins verursacht. Durch diese Konformationsänderung wird die Proteinbindedomäne CARD (Caspase-Rekrutierungs-Domäne) von Apaf-1 zugänglich, so dass sie an die CARD Domäne der Procaspase 9 binden kann. Die Bildung dieses Dimers, (Heterodimers) ist eine Voraussetzung für die autolytische Aktivierung der Caspase 9, der Caspase-Kaskade. Eine Signalverstärkung dieses Weges wird innerhalb der Caspase-Kaskade durch Caspase 7 vermittelt, welche nicht nur Substrate spaltet, die an der Ausführung der Apoptose beteiligt sind, sondern ihrerseits auch die Caspase 9 aktiviert (Lavrik et al., 2005).

1.6.4 Phosphatidylserin

Phosphatidylserin findet sich normalerweise auf der Innenseite der Zellmembran einer lebenden Zelle. Während der Anfangsphase der Apoptose wird Phosphatidylserin auf die Außenseite der Membran transloziert. Makrophagen können Phosphatidylserin erkennen. Das Erkennen und die Phagozytose von apoptotischen Zellen sowie sogenannte „apoptotic bodies“ schützen den Organismus vor der Exposition zellulärer Proteasen, die bei der Nekrose freigesetzt werden und zu Entzündungen führen. Damit führt die Apoptose im Gegensatz zur Nekrose nicht zu einer Entzündung!

1.7 Fragestellung und Zielsetzung

Sowohl Fluorchinolone als auch Glukokortikoide sind Arzneimittel, die in der heutigen Therapie zahlreicher Krankheiten zur Anwendung kommen. Die Fluorchinolone bieten eine effektive Therapie gegen mehrere Infektionserreger, und sie sind damit ein wichtiger Bestandteil der antibiotischen Therapie in der heutigen Medizin. Die Glukokortikoide und besonders Prednisolon sind heute Arzneimittel der 1. Wahl bei der Therapie zahlreicher Krankheiten unterschiedlicher Genese. Nicht nur bei Langzeittherapien kommt Prednisolon als Arzneimittel in Betracht, sondern auch bei Akutbehandlungen (z.B. Arteriitis temporalis und andere akute autoimmunologische Krankheitsbilder). Bei Langzeittherapien (z.B. des systemischen Lupus erythematodes) wird Prednisolon meist in einer niedrigen Dosis verabreicht. Diese Therapien laufen meist lebenslänglich.

Aufgrund zahlreicher Fallberichte und Studien sind Fluorchinolone und Glukokortikoide als potenzieller Auslöser von Tendopathien und Sehnenrupturen bekannt geworden. Fallberichte zeigen, dass diese Nebenwirkungen nicht nur auf einen Zusammenhang mit der Einnahme von Fluorchinolonen allein hinweisen, sondern ein noch höheres Risiko bei Patienten besteht, die unter Glukokortikoid Therapie stehen und bei Patienten, die über 60 Jahre alt sind. Eine Studie zeigte, dass bei diesen Patienten das Risiko für eine Tendinitis von 3,2 bis auf 6 pro 1000 Patienten-Jahre steigt (van der Linden et al., 2002). In vitro Versuche mit Tenozyten inkubiert mit Ciprofloxacin und Levofloxacin haben eine erhöhte Aktivität von aktivierter Caspase-3 gezeigt. Dieser Effekt wurde nach einer Kombination mit dem hochpotenten Glukokortikoid Dexamethason deutlich verstärkt (Sendzik et al., 2005). Wenn man diese ungewöhnlichen, aber für die Betroffenen schwerwiegenden Nebenwirkungen besser verstünde, könnte man das Risiko in der Zukunft deutlich reduzieren. Für dieses Promotionsvorhaben liegt ein etabliertes in vitro Modell vor, mit dem man die tendotoxischen Effekte der Fluorchinolone auf diese Zellen untersuchen kann. Die Eckpunkte dieser Arbeit beziehen sich auf den Effekt von Fluorchinolonen und Glukokortikoiden allein und in Kombination auf die apoptotische Wirkung an humanen Tenozyten. Zur Analyse sollten sowohl biochemische als auch morphologische Methoden angewendet werden (Durchflusszytometrie, Immunhistochemie, MTT-Zytotoxizitätstest und Lichtmikroskopie). Hier wurde Levofloxacin in verschiedenen Konzentrationen alleine und in Kombination mit Prednisolon in einer Konzentration von 100 µg/l Medium eingesetzt. Die angewendeten Konzentrationen wurden an den unter therapeutischen Bedingungen im menschlichen Organismus erzielten Spitzenkonzentrationen im Plasma

orientiert (500 mg Levofloxacin oral: C_{max} : 4,8 bis 5,7 mg/l (Dudley, 2003); 5mg Prednisolon oral C_{max} : 100 μ g/l (Czock et al. 2005).

Ein wichtiger Bestandteil der Arbeit lag in der Langzeit-Inkubation (20 bis 60 Tage) der Tenozyten mit einer Konzentration von 100 μ g Prednisolon/l Medium, bevor sie anschließend mit Levofloxacin für 24 Stunden inkubiert wurden.

Es ergeben sich für die Arbeit folgende Fragestellungen:

Führt eine Inkubation mit einem Fluorchinolon (Levofloxacin) alleine und in Kombination mit Prednisolon zu morphologischen Veränderungen an den humanen Tenozyten in vitro?

Ergibt sich bei in vitro Versuchen eine Zeit-, Konzentrations- und Kombinations- Abhängigkeit in Bezug auf den Nachweis von Apoptose-Markern wie Annexin V inkubiert mit Levofloxacin alleine und in Kombination mit Prednisolon?

Kommt es bei einem MTT-Test mit humanen Tenozyten, die mit Levofloxacin allein und in Kombination mit Prednisolon inkubiert wurden, zu einer erniedrigten Vitalität der Zellen?

Sind die humanen Tenozyten nach einer langen, mehr als 20 Tage dauernden Inkubation mit Prednisolon noch in der Lage, Kollagen zu produzieren?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Zentrifuge Multifuge 1 L-3	Heraeus Holding GmbH, Osterode Deutschland
Vortex Reax 2000	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Pipetboy acu	Integra Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
Referenzpipette (10-1000 µl)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Brutschrank B5060	Heraeus Holding GmbH, Osterode Deutschland
Wasserbad CS 20 D	Lauda. Dr. R. Wobser GmbH, & CO KG Königshofen, Deutschland
Laminar-AirFlow-Kabine ES/130/V/UV	Ehret GmbH, Emmendingen, Deutschland
Analysenwaage Sartorius Analytic A200S-*D1	Sartorius GmbH, Göttingen, Deutschland
FACScan-Durchflusszytometer	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Olympus SC 35 mm Spiegelreflexkamera	Olympus, Japan
Lichtmikroskop Olympus CK 2	Olympus, Japan
Lichtmikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop Axiophot	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Octapette 200µl	Corning, Corning, USA
Cryo Freezing Container (Einfrierbox)	Nalgene, Rochester, NY, USA
Cellspin I	Tharmac, Waldsolms, Deutschland
Hämozytometer (Neubauer-Zählkammer)	Zeiss, Göttingen, Deutschland

2.1.2 Verbrauchsmaterialien und Reagenzien

5 ml Polystyrene FACScan Tubes	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
12 ml PP-Tube	Greiner-Bio-One North America Inc, Monroe, NC, USA
Nunc-cryo-Tube™ vials	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Easy Flask 25 FLT 40 ml (Kulturflaschen)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Easy Flask 75 FLT 160 ml (Kulturflaschen)	Nunc, Wiesbaden, Deutschland
Falcon Serologische Pipetten 5 und 10 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Eppendorf epT.I.P.S., verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
DermaClean nicht sterile Einmal-Untersuchungshandschuhe	Ansell, München, Deutschland
Ham's F-12 Medium	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hank's Salt Solution	Biochrom, Berlin, Deutschland
Amphotericin B (250 µg/ml)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Prednisolon	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Ethanol (99,5%) zur Analyse	Merck, Darmstadt, Deutschland
Camptothecin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Foetales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Glukose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
PBS Dulbecco ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10000 U / 10000 µg/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tavanic® i.v. 500 mg/l	Aventis, Frankfurt am Main, Deutschland

Trypsin/EDTA Solution in PBS 0,05% / 0,02% (w/v) ohne Ca ²⁺ , Mg ²⁺	Biochrom, Berlin, Deutschland
Vitamin C	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Dimethylsulfoxid, getrocknet max. 0,05% H ₂ O	Merck, Darmstadt, Deutschland
MEM-Amino-Acids = Aminosäuren (50x) ohne L-Glutamin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Hepes	Sigma Chemicals, St. Louis, USA
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
CaCl ₂	Merck, Darmstadt, Deutschland
p-Phenylendiamin	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Glyzerin p.a	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kodachrome ASA 100 Diafilm	Kodak, Stuttgart, Deutschland

2.1.3 Antikörper

Primärer Antikörper gegen Kollagen I	ABD Serotec, Raleigh, USA
Sekundärer Antikörper AP 156 F (Goat anti Rabbit Ig G)	Chemicon, Temecula, USA
Annexin V (human) (recombinant) (FITC) (FACScan)	Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz

2.1.4 Kulturmedien und Lösungen

2.1.4.1 Medien

Die humanen Tenozyten wurden in einem Wachstumsmedium kultiviert. Es bestand aus Ham's F12 und DMEM in Verhältnis 1:1 und folgenden Zusätzen:

FKS	10%, 5%
Penicillin/Streptomycin 10000 U / 10000 µg/ml	1%
Amphotericin B (250 µg/ml)	1%
Aminosäuren (50x)	1%
Vitamin C (25 µg/ml)	1%
L-Glutamin (200 mM)	1%

2.1.4.2 Lösungen

Annexin Bindungspuffer

Der Annexin-Puffer wurde aus 10 mM HEPES-NaOH, 140 mM NaCl, 2,5 mM CaCl₂ und Aqua dest. hergestellt, steril filtriert und anschließend auf pH 7,4 eingestellt.

MTT [3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromid]

Bei dem Zytotoxizitätstest wurde MTT, auch Thiazolylblau genannt, als Vitalitäts-Marker für die humanen Tenozyten verwendet. MTT wird in den vitalen Zellen von verschiedenen Dehydrogenase-Enzymen umgewandelt. Es kommt zu einem Farbumschlag von gelb bis dunkelblau. Das Dunkelblau liegt in Form von Kristallen vor und wird mit einer Desorptionslösung, die Isopropanol enthält, aufgelöst und mittels Photometrie analysiert.

MTT-Stammlösung

MTT	5mg
PBS (mit Ca und Mg)	1ml

MTT Desorptionslösung

1 N HCl	20 ml
Isopropanol	480 ml

Bei dem MTT-Zytotoxizitätstest diente das Zytostatikum 5-Fluoruracil als Positivkontrolle. Zunächst wurde die Substanz in einer Konzentration von 2 mg/ml in destilliertem Wasser gelöst und anschließend eingefroren. Zu Beginn des Versuches wurde die Lösung wieder aufgetaut und mit 980 µl Kulturmedium auf eine Konzentration von 40 µg/ml verdünnt, dies entspricht einer Verdünnung von 1:50.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkulturen

2.2.1.1 Herstellung von Primärkulturen

Die Gewinnung von Primärkulturen humaner Sehnenzellen erfolgte durch Isolierung der Tenozyten aus Finger- und Hüftsehnen-Segmentstücken von 2 verschiedenen Patienten. Diese Sehnenstücke wurden in Form von überschüssigem OP-Material unfallbedingter Operationen von Patienten ohne relevante Grunderkrankungen oder Arzneimittelaufnahme anonymisiert zur Verfügung gestellt (Charité-Universitätsmedizin Berlin). Das Operationsmaterial wurde unter sterilen Bedingungen ins Kulturmedium gegeben, anschließend wurden die Tenozyten durch ein nicht-enzymatisches Verfahren isoliert: Um eine Kontamination zu vermeiden, wurde das Präparat zuerst dreimal mit Penicillin/Streptomycin- und Amphotericin B-haltigem Wachstumsmedium gespült. Durch aseptische Präparation wurde die Sehne freigelegt, so sollte eine Reinkultur aus Tenozyten gewährleistet werden. Durch eine geringe Menge an Wachstumsmedium wurde eine schnelle Adhäsion am Flaschenboden gesichert, so dass die Sehnenzellen aus dem Präparat emigrieren konnten. Die Kultivierung der Tenozyten erfolgte in

einem sterilen Inkubator bei 37° C unter Begasung mit 5% CO₂. Die Sehnenstücke waren nach 4-5 Tagen fest am Boden durch Adhäsion verankert und somit konnte ein vorsichtiger Mediumwechsel jeden 3. Tag durchgeführt werden. Nach 1-2 Wochen begannen die Tenozyten aus dem Gewebestück heraus zu emigrieren. Etwa 2-3 Wochen, nachdem die ersten Sehnenzellen aus den Sehnenstücken emigriert waren, wurden die Sehnenstücke aus dem Medium entfernt. Um eine zusätzliche Zellvermehrung zu gewährleisten, wurden die Zellen für eine Woche in den Kulturflaschen gelassen. Anschließend wurden die Zellen kultiviert und dann für eine weitere Verwendung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2.1.2 Zellkultivierung

Bei einem Konfluenzgrad von ca. 70-80% wurden die Tenozyten passagiert. Um das restliche Wachstumsmedium aus der Kulturflasche zu entfernen, wurde zuerst mit Hank's Salzlösung ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ gespült. Anschließend wurde jede Kulturflasche mit je 2 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) bis zum Ablösen der Zellen im Brutschrank inkubiert (ca. 3-4 min). Mit 4 ml Wachstumsmedium wurde die Enzymreaktion gestoppt und mittels einer 5 ml Pipette wurden die Zellen mechanisch abgelöst. Die Tenozyten-Suspension wurde auf neue Kulturflaschen mit Wachstumsmedium wieder ausgesät (Gesamtvolumen 10 ml) und als Zellen der nächsthöheren Passage bezeichnet. Die Verteilung der Zellen erfolgte jeweils im Verhältnis 1: 2. Für alle Versuche wurden Sehnenzellen bis maximal Passage 17 eingesetzt.

2.2.1.3 Einfrieren

Um eine Vorratshaltung von Zellen niedriger Passagen zu ermöglichen, wurden die Tenozyten wie unter 2.2.1.2 behandelt. Zunächst wurden die Monolayer mit Hank's Salzlösung gespült, dann enzymatisch mit Trypsin/EDTA im Brutschrank abgelöst und anschließend wurde eine homogene Zellsuspension mit Kulturmedium hergestellt. Um sämtliche Trypsinreste zu entfernen, wurde die Zellsuspension zentrifugiert und mit Kulturmedium gespült. Das entstandene Zellpellet wurde mit Gefriermedium versehen und resuspendiert und anschließend in Kryoröhrchen (je 1,5 ml) verteilt. Zunächst wurden die Röhrchen bei -80° C in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox für 12 h eingefroren. Die weitere Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff.

2.2.1.4 Zellzählung

Das Wachstum der Tenozyten ist von einem engen Zell-Zell-Kontakt abhängig und deshalb ist die Zellzahl bei der Einsaat von großer Bedeutung. Zu wenig Zell-Zell-Kontakte führen zu langsamem Wachstum. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde eine mittlere Zellzahl gewählt, die am letzten Versuchstag zu vollständiger Konfluenz führte. Die Zellzählung erfolgte mittels eines Hämozytometers (Neubauer Zählkammer). Hier wurde, nachdem ein Deckgläschen unter Ausbildung von Newtonringen auf die Zählkammer gedrückt worden war, ein Tropfen homogenisierter Zellsuspension in den Zwischenraum zwischen Deckglas und Zählkammer gegeben. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte durch eine Auszählung der vier großen Quadranten. Der errechnete Mittelwert wurde mit 10^4 multipliziert. Damit konnte während der Versuche eine durchgehend ähnliche Zelldichte gewährleistet werden.

2.2.2 Testsubstanzen

Bei der Herstellung von einer 1 mM Prednisolon-Stammlösung wurde in 100 ml Ethanol (reinst) 0,036 g Prednisolon (steriles Pulver) gelöst und anschließend steril filtriert. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank für maximal 6 Monate. Die für die Experimente benötigten Verdünnungen im Wachstumsmedium wurden als absteigende Verdünnungsreihe, ausgehend von der Stammlösung hergestellt.

Für die Langzeitinkubation mit Prednisolon (20 und 60 Tage) wurde unmittelbar vor jeder Passage ein neues Wachstumsmedium mit Prednisolon (100 µg/l Medium) hergestellt.

Für die Experimente mit Levofloxacin wurde die entsprechende handelsübliche Infusionslösung verwendet (Tavanic[®] i.v. 500 mg/l, Aventis, Frankfurt am Main).

Die Verdünnungen (0,3; 1; 3; 10; 30 mg/l) in Wachstumsmedium wurden erst kurz vor der Versuchsdurchführung als absteigende Verdünnungsreihe, ausgehend von der jeweiligen Infusionslösung als Stammlösung hergestellt. Bei den Experimenten mit Prednisolon und Levofloxacin wurde für die Verdünnungsreihe ein Prednisolon-haltiges Wachstumsmedium verwendet.

2.2.3 Versuchsaufbau

Mit den Versuchen wurde versucht, die in Fallberichten beschriebene Verstärkung der Fluorchinolon-induzierten Tendopathien durch Glukokortikoide in vitro zu simulieren. Im Mittelpunkt des Interesses stand die Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit. In vielen Fallberichten wurde eine Verstärkung der unerwünschten Wirkung nach einer vorangegangenen oder gleichzeitigen Glukokortikoidtherapie beobachtet. Daher sollte dieses in den Versuchsprotokollen berücksichtigt werden.

Die Inkubationen wurden über 24 Stunden bis 60 Tagen durchgeführt. Bei den Inkubationen, die sich über 24 Stunden erstreckt haben, wurde die unbehandelte Kontrolle mit einem reinen Wachstumsmedium (5% FKS) unbehandelt gelassen. Bei den Versuchen, bei denen das Medium eine Basis-Konzentration von 100 µg Prednisolon/l Medium beinhaltete, hatten auch die Kontroll-Proben eine entsprechende Konzentration von Prednisolon. Bei den Langzeit-Inkubationen wurden die Zellkulturen über 20 bis 60 Tage mit einem Medium kultiviert, das 100 µg Prednisolon/l Wachstumsmedium enthielt. Vier Tage vor der Inkubation mit Levofloxacin wurden die Zellkulturen kultiviert und gezählt, hierbei wurden alle Proben mit einer Zellkonzentration von 20.000 Zellen/ml Wachstumsmedium in 40 ml Kulturflaschen verteilt. Die einzelnen Konzentrationen sind in **Tabelle 2** dargestellt.

Inkubation über 24 Stunden mit Levofloxacin
Unbehandelte Kontroll-Probe
1 mg Levofloxacin/l Medium
3 mg Levofloxacin/l Medium
10 mg Levofloxacin/l Medium
10 mg Levofloxacin/l Medium
30 mg Levofloxacin/l Medium
Inkubation über 24 Stunden mit Levofloxacin und 100 µg Prednisolon/l Medium
Kontroll-Probe (100µg Prednisolon/l Medium)
0,3 mg Levofloxacin/l Medium + 100µg Prednisolon/l Medium
1 mg Levofloxacin/l Medium + 100µg Prednisolon/l Medium
3 mg Levofloxacin/l Medium + 100µg Prednisolon/l Medium
10 mg Levofloxacin/l Medium + 100µg Prednisolon/l Medium
30 mg Levofloxacin/l Medium + 100µg Prednisolon/l Medium
Inkubation über 20 und 60 Tage mit 100 µg Prednisolon/l Medium und anschließend 24 Stunden mit Levofloxacin
Kontroll-Probe (100µg Prednisolon/l Medium)
0,3 mg Levofloxacin/l Medium + 100µg Prednisolon/l Medium
3 mg Levofloxacin/l Medium + 100µg Prednisolon/l Medium
10 mg Levofloxacin/l Medium + 100µg Prednisolon/l Medium
30 mg Levofloxacin/l Medium + 100µg Prednisolon/l Medium

Tabelle 2: Experimentielle Bedingungen bei der Inkubation von humanen Tenozyten mit Levofloxacin und Prednisolon in vitro.

Bei den Kontrollversuchen mit Camptothecin wurden die Zellen mit 5, 15 und 20 mg Camptothecin/l Medium über 4 Stunden inkubiert, die unbehandelte Kontrolle wurde in 5% FKS unbehandelt gelassen, das Inkubationsprotokoll ist in **Tabelle 3** dargestellt.

Inkubation über 4 Stunden mit Camptothecin

Unbehandelte Kontroll-Probe
5 mg Camptothecin/l Medium
15 mg Camptothecin/l Medium
20 mg Camptothecin/l Medium

Tabelle 3: Experimentelle Bedingungen bei der Inkubation von humanen Tenozyten mit Camptothecin

2.2.4 Lichtmikroskopie

Bei der Lichtmikroskopie wurden die Zellen in 40 ml Kulturflaschen mit den oben angegebenen Konzentrationen (siehe 2.2.3) inkubiert und anschließend nativ in der Kulturflasche bei einer 20-fachen Vergrößerung mittels eines Minolta CK 2 Lichtmikroskops und einer Minolta SC 35 Spiegelreflexkamera fotografiert.

2.2.5 MTT-Zytotoxizitätstest

Der MTT-Zytotoxizitätstest wurde 1983 von Mosmann ursprünglich unter Verwendung von Lymphom-Zellen entwickelt. Der Test wurde seit dem weiter entwickelt und verbessert. Heute wird der MTT-Zytotoxizitätstest überwiegend mit anderen Zelllinien durchgeführt.

Die Zellen wurden nach dem modifizierten Invitox-Protokoll für zehn Tage der zu untersuchenden Substanz in verschiedenen Konzentrationen ausgesetzt. Im direkten Anschluss wird das Agens Thiazolylblau (MTT) (siehe 2.1.4.2) zu den Zellen gegeben. Hierbei werden die noch vitalen Zellen das MTT in einen blauen Farbstoff umwandeln. Mit einem Photometer wird dieser Farbumschlag durch ihre optische Dichte in den einzelnen Wells der 96-Well-Platte gemessen und bestimmt. Mit der Extinktion kann somit die Menge der noch vitalen Zellen in Vergleich zur unbehandelten Kontrolle bestimmt werden.

Für die Vorversuche wurden 3T3-Fibroblasten verwendet. Es handelt sich um eine Standardzelllinie und diente hier zur Evaluation der Zytotoxizität der Substanzen. Das gleiche Test-Protokoll wurde auch für die humanen Tenozyten verwendet.

2.2.5.1 Versuchsdurchführung (MTT-Zytotoxizitätstest)

Die Zytotoxizität von Levofloxacin und Prednisolon wurde nach dem 10-Tage-MTT-Protokoll bestimmt. Der Test wurde mit den 3T3-Fibroblasten und den humanen Tenozyten nach dem gleichen Ablauf durchgeführt.

Nach den Vorversuchen mit den 3T3-Fibroblasten waren zusätzliche Vorversuche mit humanen Tenozyten notwendig, um die Menge der einzusäenden Zellen zu bestimmen, damit eine Auswertung nach 10 Tagen gewährleistet war. Bei jedem Versuch wurden zwei Multiwell-Platten pro Substanz vorbereitet und alle Versuche wurden zu einem späteren Zeitpunkt wiederholt.

1. Tag Die Zellen wurden in einer Zellsuspension von 400×10^4 Zellen/ml eingestellt. Von dieser Suspension werden 50 μ l in jedes Well pipettiert. In die Blanks werden je 50 μ l Kulturmedium pipettiert. Nach 2h wurden zu den Zellen je 150 μ l Testmedium (1,33 fach konzentriert) gegeben.
2. Tag Das Kulturmedium wurde gewechselt. In alle Wells wurde je 200 μ l Testmedium (1 fach konzentriert) gegeben.
3. Tag Das Kulturmedium wurde erneut gewechselt. In alle Wells wurde je 200 μ l Testmedium (1 fach konzentriert) gegeben.
4. Tag MTT-Inkubation. In die Wells wurden je 100 μ l MTT gegeben und über Nacht inkubiert.
5. Tag Die Platten wurden „gestürzt“ und leicht ausgeklopft und die Reaktion wurde mit je 10 μ l „MTT Desorb“ gestoppt. Danach folgte eine Messung bei 570 nm.

2.2.5.2 Prinzip der Datenauswertung

Mit Hilfe eines Photometers wurden die einzelnen Proben bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen. Die Photometrie basiert auf der Grundlage der Absorptionsintensität von der sich im Strahlengang befindlichen Teilchenzahl. Somit kann man die Konzentration von fein verteilten und gelösten Farbstoffen durch die Intensität des einfallenden Lichtes bestimmen. Die Extinktionswerte des umgewandelten MTTs in den behandelten Proben wurden mit den unbehandelten Proben miteinander verglichen. Die optische Dichte der Probe erhält man nach der Messung. Um den Einfluss der Absorption des Kulturmediums und der MTT-

Desorptionslösung zu eliminieren, wurde zuerst aus allen „Blanks“ auf einer Multititerplatte ein Mittelwert gebildet und dieser wurde wiederum von den behandelten Proben subtrahiert. Die Mittelwerte und Standardabweichung jener Wells wurden anschließend berechnet. Ihre statistische Signifikanz wurde mittels des Post-Hoc-Tests nach Dunnet gegenüber der unbehandelten Kontrolle überprüft und graphisch in einem Diagramm aufgetragen.

2.2.6 Durchflusszytometrie

Das Durchflusszytometer dient der quantitativen, automatischen Analyse von fluoreszenzmarkierten Zellsuspensionen. Anwendungsgebiete sind die klinische Diagnostik und Forschung. Bei einer Durchflusszytometrie passieren einzelne Zellen in einem Flüssigkeitsstrom den Lichtstrahl eines Lasers. Das von den durch Fluoreszenz markierten monoklonalen Antikörpern oder Zellproteinen auf der Zelloberfläche oder intrazellulären Proteinen reflektierte bzw. emittierte Licht wird mit Hilfe von Filtern und Spiegeln so getrennt, dass nur bestimmte Emissionswellenlängen die entsprechenden Detektoren erreichen. In diesen Detektoren wird durch den Lichteinfall ein elektrischer Impuls (ein analoges Signal) erzeugt, dessen Intensität dem Lichteinfall proportional ist. Aus jeder Probe wurden 10.000 Zellen (events) gemessen. Jedes analoge Signal wird in ein digitales umgewandelt. Alle einzelnen Signale sind als Rohdaten gespeichert. Diese Rohdaten kann später graphisch oder numerisch dargestellt und weiterverarbeitet werden. Das FACScan Durchflusszytometer kann in drei zusammenhängende Systeme aufgegliedert werden: das Flüssigkeitssystem, das optische und das elektronische System.

2.2.6.1 Probenvorbereitung bei der Annexin V Färbung

Nach vorgegebenen Inkubationszeiten wurde das Wachstumsmedium abgegossen und der Monolayer mit 10 ml PBS abgespült. Anschließend wurde mit je 2 ml Trypsin/EDTA (0,05%/0,02%) Lösung pro Kulturflasche bis zum Ablösen der Zellen im Brutschrank inkubiert (ca. 3-4 min). Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt und anschließend wurden die Zellen mit Hilfe einer 5 ml Pipette mechanisch abgelöst, vereinzelt und resuspendiert und in 12 ml sterile Röhrchen überführt. Die Proben wurden danach 2x mit kaltem PBS gewaschen (1000 rpm/4°/4 min), anschließend wurde der Überstand abpipettiert. Die Zellen

wurden in 1 ml Annexin Puffer resuspendiert und in 5 ml FACScan Röhrchen überführt und für 5 min auf Eis gestellt und anschließend zentrifugiert (1000 rpm/4°/4 min). Der Überstand wurde abpipettiert, zu jeder Probe wurden 390 µl Annexin Puffer gegeben, zusätzlich 10 µl Annexin V und für 10 min im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels Durchflusszytometrie analysiert.

2.2.6.2 Datenauswertung der Durchflußzytometrie

Die Rohdaten aus der Durchflusszytometrie wurden mit der WinList[®] Version 2.0 ausgewertet. Zuerst wurde die Selbstfluoreszenz der Zellen mittels einer Blanko-Probe (Probe ohne Annexin V Färbung, sonst gleiche Behandlung) dargestellt. Danach wurden unbehandelte Kontrollzellen und anschließend Konzentrationen in aufsteigender Ordnung mit der Blanko-Probe verglichen. Die Daten wurden in einer Tabelle aufgeführt und aus jeder Konzentration wurde ein Mittelwert mit zugehöriger Standardabweichung berechnet.

2.2.7 Immunhistochemische Untersuchungen an humanen Tenozyten

Immunhistochemische Untersuchungen eignen sich zum semiquantitativen Nachweis mit Hilfe von mono- oder polyklonalen Antikörpern, gerichtet gegen verschiedene intra- und extrazelluläre Proteine. Es wurde eine indirekte Immunfluoreszenz-Technik angewendet. Die Zellen wurden zunächst mit einem antigenspezifischen Antikörper inkubiert, der in einem weiteren Inkubationsschritt mit einem sekundären fluoreszenzmarkierten Antikörper gekoppelt wurde (Visualisierung). Anschließend wurden die Proben mittels eines Fluoreszenzmikroskops analysiert und gleich fotografiert.

2.2.7.1 Versuchsdurchführung Immunhistochemie

- 1 Die Zellen wurden nach ihrer jeweiligen Inkubation von der Kulturflasche abgelöst und zweimal im PBS gewaschen (siehe 2.2.5.1). Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert und der Überstand bis auf 1 ml abpipettiert.

- 2 Aus den Proben wurden jeweils 175 µl Zellsuspension mit 325 µl Trägerflüssigkeit (PBS) in den Cellspin I gegeben und mit 10,000 rpm auf den Objektträger geschleudert.
- 3 Die Objektträger wurden in einer Färbekammer 2 x 10 min unter vorsichtigem Rühren (Magnetrührer) in PBS gewaschen.
- 4 Danach wurden die Objektträger luftgetrocknet.
- 5 10 µl eines antigenspezifischen Antikörpers wurden auf jede Probe gegeben (außer Blanko Probe/hier nur PBS) und anschließend über Nacht in einer feuchtern Kammer bei 4° C inkubiert.
- 6 Wieder 2 x 10 min in PBS gewaschen und anschließend getrocknet wie unter 3 und 4.
- 7 10 µl Suspension der sekundären Antikörper wurden auf die Proben geben, hier wurde auch die Blanko Probe mit Antikörper Suspension behandelt (es dient dem Nachweis der Selbstfluoreszenz). Danach folgte eine Inkubation für 60 min (lichtgeschützt) in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur.
- 8 Die Proben wurden wie unter 3 gespült (dürfen jedoch nicht austrocknen, da sonst der sekundäre Antikörper auskristallisiert).
- 9 Ein Tropfen einer Lösung von 0,1% p-Phenylendiamin in Glycerin/PBS (9+1) wurde auf die feuchten Proben gegeben und mit einem Deckglas bedeckt.
- 10 Anschließend wurden die Proben mit einem Immunfluoreszenz Mikroskop untersucht und fotografiert.

2.2.7.2 Fluoreszenzmikroskopie und -Fotografie

Zunächst wurden die Proben mittels Fluoreszenzmikroskop Axiophot (Carl Zeiss) fotografiert. Hier wurde eine 20fache Vergrößerung verwendet. Jedes Objekt wurde durchschnittlich 6 mal an repräsentativen Stellen fotografiert. Die Aufnahmen wurden als TIF Datei gespeichert.

2.2.7.3 Prinzip der Auswertung der Immunhistochemie

Die Proben wurden doppelblind fotografiert und ausgewertet. Die densitometrische Auswertung und semiquantitative Analyse der Bilder erfolgte mit Scion Image Version 4.0.3.2 (Scion

Corporation, Frederick, MD, USA). Zunächst wurde ein Schwarzabgleich einer Probe festgelegt und anschließend wurden die Aufnahmen in eine binäre Darstellung konvertiert. Eine repräsentative Fläche mit 2-6 Zellen wurde ausgewählt und gegen den Schwarzabgleich wurde die Fluoreszenz verglichen. Aus jeder Probe wurde ein Mittelwert und eine Standardabweichung berechnet und in eine Tabelle eingetragen.

2.2.8 Statistik

Die ermittelten Daten mittels Zytotoxizitäts-Test, Durchflusszytometrie und Immunhistochemie errechnen sich aus Mittelwert und Standardabweichung von Drei- und Sechsfachbestimmungen. Die statistische Signifikanz wurde mit einer einfaktoriellen ANOVA und dem Post hoc Dunnet-t-Test geprüft. Die statistisch signifikanten Unterschiede wurden durch explorative Datenanalyse ($P < 0,05$) ausgewertet.

3 Ergebnisse

3.1 Lichtmikroskopie

Bei der lichtmikroskopischen Analyse wurden die unbehandelten Kontrollzellen mit den Zellen, die mit Levofloxacin und Prednisolon alleine oder in Kombination inkubiert worden waren, verglichen. Zuerst wurden unbehandelte Zellen analysiert, gefolgt von Tenozyten, die über 24 Stunden mit 10 mg Levofloxacin/l Medium inkubiert worden waren. Zusätzlich wurden Zellen über 20 Tage mit einem Medium von Prednisolon kultiviert und zusätzlich über 24 Stunden mit einem Medium mit 10 mg Levofloxacin/l Medium inkubiert. Die mikroskopische Analyse wurde in einem Anfangsstadium der Versuchsreihen durchgeführt um eine grafische Darstellung des Effekts der unterschiedlichen Substanzen auf die humanen Tenozyten zu bekommen.

Die Aufnahmen wurden nativ gemacht, ohne Zufuhr jeglicher Farbstoffe. Bei den unbehandelten Zellen zeigte sich die typische Morphologie der Sehnenzellen (**Abbildung 5a**), spindelartig und langgestreckt mit einem langgezogenen Zellkern. Es zeigten sich langgestreckte zytoplasmatische Ausläufer, die eine Tendenz zu netzwerkähnlichen interzellulären Kontakten zeigten. Bei den Zellen, die über 24 Stunden mit Levofloxacin (10 mg/l Medium) inkubiert worden waren, zeigten sich keine nennenswerten Unterschiede zur unbehandelten Kontrolle (**Abbildung 5b**). Bei den Zellen, die mit Prednisolon (100 µg/l Medium) über 20 Tage inkubiert worden waren, zeigten sich eindeutige degenerative Veränderungen in der Morphologie (**Abbildung 5c**). Die Zellen, die zusätzlich zu einer Inkubation mit Prednisolon (100 µg/l Medium) über 20 Tage mit 10 mg Levofloxacin/l Medium inkubiert worden waren, zeigten so wie in **Abbildung 5d** deutliche morphologische und degenerative Veränderungen. Hier zeigten sich deutliche morphologische Veränderungen in Form von Aufweichungen mit fehlenden bzw. kaum erkennbaren Ausläufern.

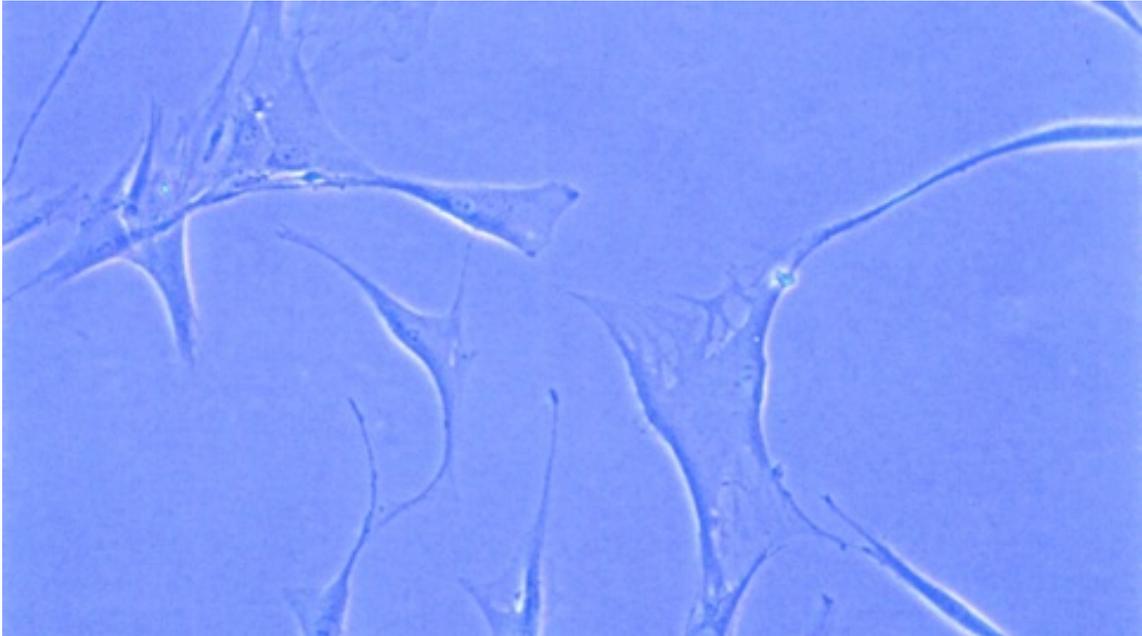


Abbildung 5a: Lichtmikroskopische Nativaufnahme von unbehandelten Kontrollzellen, die ohne Zusatz von Prednisolon oder Levofloxacin kultiviert worden waren.

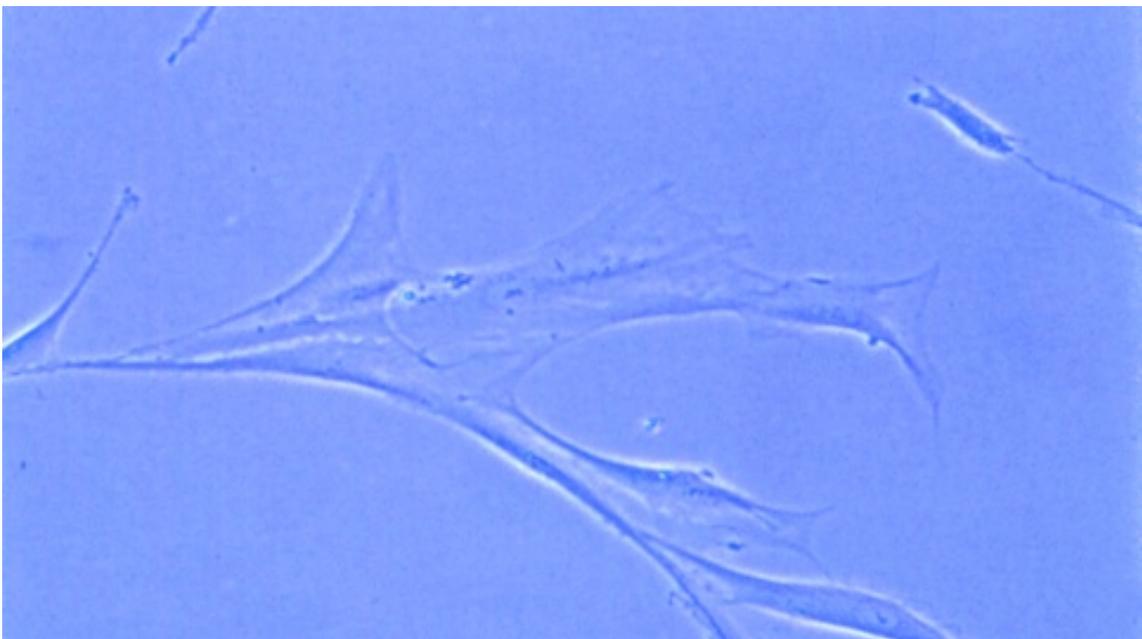


Abbildung 5b: Lichtmikroskopische Nativaufnahme von humanen Tenozyten nach einer Inkubation über 24 Stunden mit Levofloxacin in einer Konzentration von 10 mg/l Medium.

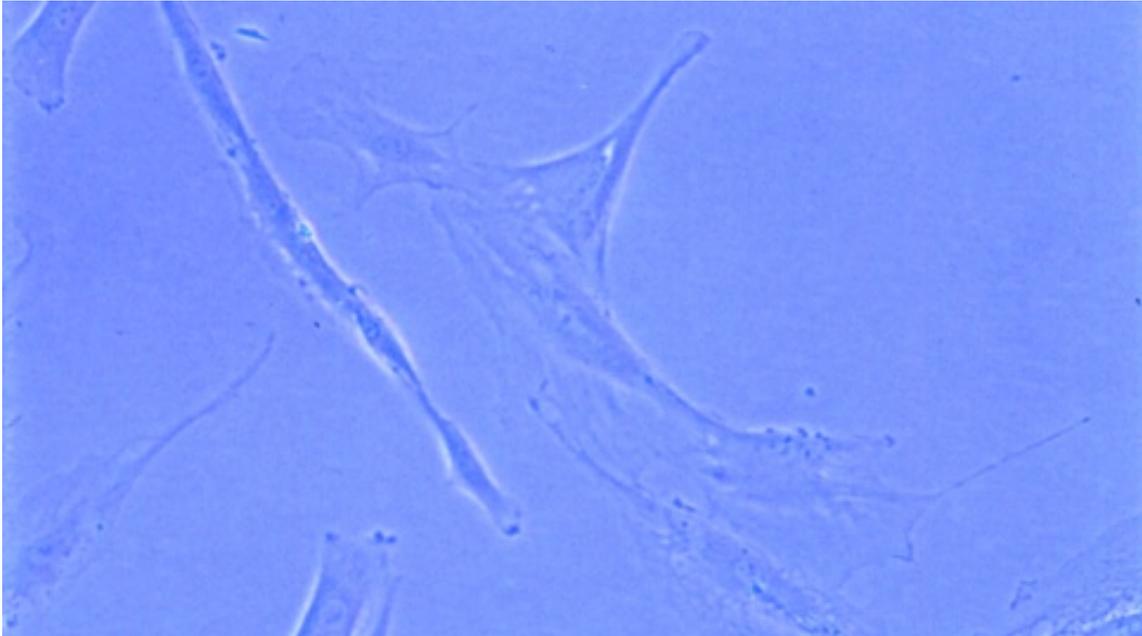


Abbildung 5c: Lichtmikroskopische Nativaufnahme von humanen Tenozyten die über einen Zeitraum von 20 Tagen mit einer Konzentration von 100 µg Prednisolon/l Medium inkubiert worden waren.

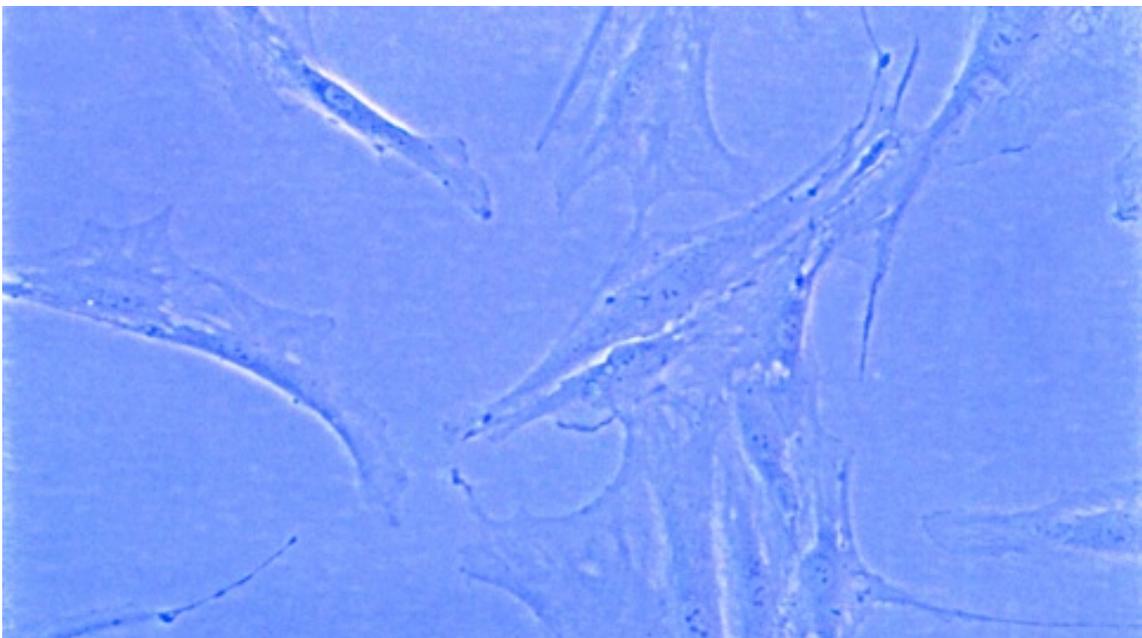


Abbildung 5d: Lichtmikroskopische Nativaufnahme von humanen Tenozyten die über 20 Tage inkubiert wurden mit einem Medium, das Prednisolon in einer Konzentration von 100 µg/l Medium beinhaltetete, anschließend wurden die Zellen über 24 Stunden mit Levofloxacin in einer Konzentration von 10 mg/l Medium inkubiert.

3.2 MTT-Zytotoxizitätstest

Aufgrund der Beobachtungen während der lichtmikroskopischen Analyse wurde ein MTT-Zytotoxizitätstest ausgeführt. Hierbei wurden die Zellen nach einem festgelegten Protokoll über 9 Tage mit einer der beiden Substanzen exponiert. Im direkten Anschluss (Tag 10) wurde das Agens Thiazolylblau (MTT) zu den Zellen gegeben, die noch vitalen Zellen werden hier das MTT in einen blauen Farbstoff umwandeln. Diese Farbumschläge wurden einzeln in ihrer optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen und somit wurde die Menge der noch vitalen Zellen pro Well bestimmt. Als Vorversuch diente ein festgelegtes und standardisiertes Protokoll mit 3T3 Fibroblasten. Die Fibroblasten wurden unter gleichen Bedingungen behandelt wie später auch die Tenozyten.

3.2.1 MTT-Zytotoxizitätstest der 3T3 Fibroblasten

Bei der Untersuchung der Zytotoxizität von Prednisolon und Levofloxacin auf 3T3 Fibroblasten wurden die Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von Levofloxacin (1,56; 3,125; 6,5; 12,5; 25; 50; 100 und 200 mg/l) (**Abbildung 6, Tabelle 4**) und Prednisolon (12,5; 25; 50; 100; 200; 400 und 800 µg/l) (**Abbildung 7, Tabelle 5**) alleine inkubiert.

Die 3T3 Fibroblasten, die mit Levofloxacin inkubiert worden waren, zeigten einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab einer Levofloxacin-Konzentration von 1,56 mg/l Medium. 3T3 Fibroblasten, die mit Prednisolon behandelt worden waren, zeigten einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab 12,5 µg Prednisolon/l Medium.

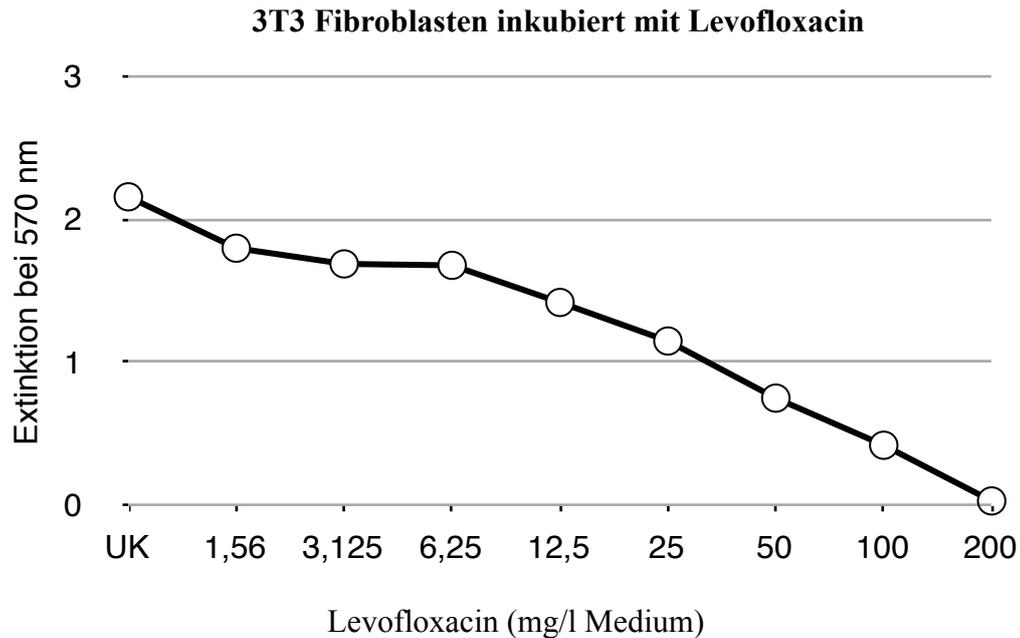


Abbildung 6: MTT-Test: 3T3 Fibroblasten inkubiert mit Levofloxacin in 8 verschiedenen Konzentrationen über 9 Tage, um die Zytotoxizität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**UK**) zu analysieren. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied in Vergleich zur unbehandelten Kontrolle schon ab einer Levofloxacin-Konzentration von **1,56 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten (Sechsfachbestimmung) (**siehe Tabelle 4**). $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-Test).

	Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)								
	UK	1,56	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200
Probe									
1	2,27	1,65	1,74	1,73	1,64	1,17	0,81	0,43	0,04
2	2,22	1,93	1,61	1,76	1,25	1,21	0,77	0,41	0,03
3	2,06	1,76	1,74	1,77	1,28	1,12	0,76	0,42	0,03
4	2,02	1,90	1,78	1,52	1,42	1,19	0,74	0,42	0,06
5	2,20	1,65	1,65	1,62	1,49	1,07	0,66	0,42	0,03
6	2,21	1,91	1,60	1,67	1,42	1,13	0,77	0,41	0,02
MW	2,16	1,80	1,69	1,68	1,42	1,15	0,75	0,42	0,03
Stabw	0,10	0,13	0,08	0,10	0,14	0,05	0,05	0,01	0,01
Median	2,20	1,83	1,70	1,70	1,42	1,15	0,77	0,42	0,03

Tabelle 4: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 6.

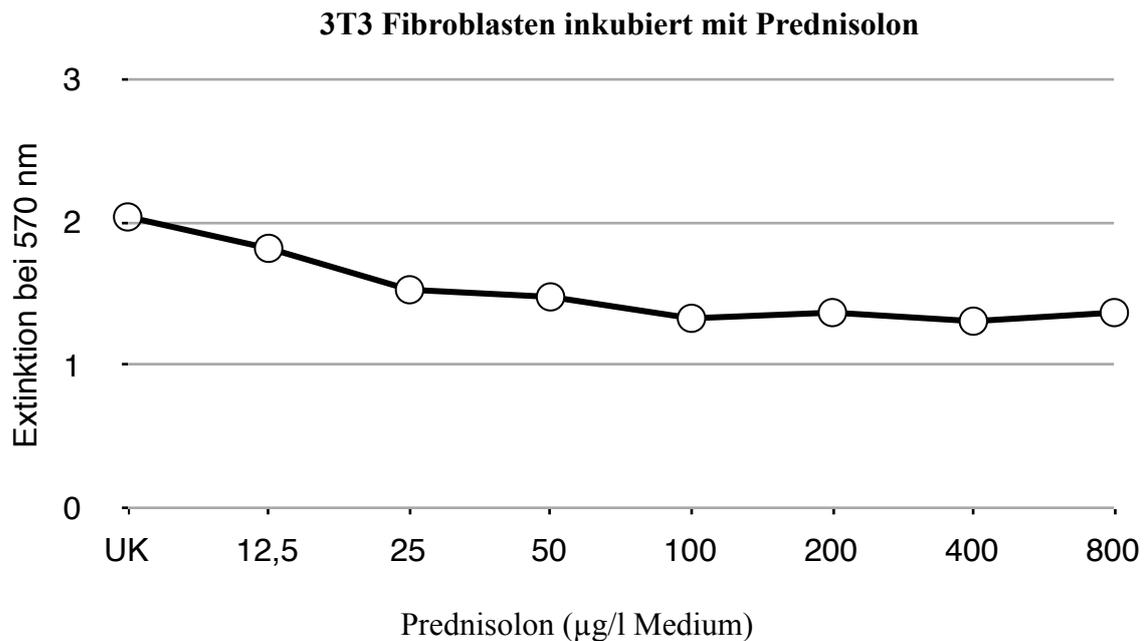


Abbildung 7: MTT-Test: 3T3 Fibroblasten inkubiert mit Prednisolon in 7 verschiedenen Konzentrationen über 9 Tage, um die Zytotoxizität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (UK) zu analysieren. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle schon ab einer Prednisolon-Konzentration von **12,5 µg** Prednisolon/l Medium. Darstellung von Mittelwerten (Sechsfachbestimmung) (siehe Tabelle 5). $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

	Prednisolon-Konzentration (µg/l Medium)							
	UK	12,5	25	50	100	200	400	800
Probe								
1	2,09	1,80	1,59	1,40	1,42	1,34	1,31	1,28
2	1,98	1,65	1,50	1,35	1,32	1,40	1,33	1,34
3	2,00	1,94	1,42	1,54	1,36	1,32	1,38	1,33
4	2,02	1,86	1,65	1,59	1,42	1,37	1,29	1,71
5	2,11	1,88	1,42	1,61	1,25	1,44	1,36	1,30
6	2,04	1,79	1,60	1,39	1,22	1,35	1,19	1,24
MW	2,04	1,82	1,53	1,48	1,33	1,37	1,31	1,37
Stabw	0,05	0,10	0,10	0,11	0,08	0,04	0,07	0,17
Median	2,03	1,83	1,54	1,47	1,34	1,36	1,32	1,32

Tabelle 5: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Median zu der grafischen Darstellung der Abbildung 7.

3.2.2 MTT-Zytotoxizitätstest der humanen Tenozyten

Bei der Untersuchung der Zytotoxizität von Levofloxacin alleine und in Kombination mit Prednisolon auf humane Tenozyten wurden die Zellen zuerst mit einer aufsteigenden Konzentration von 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50, 100 und 200 mg Levofloxacin/l Medium über 9 Tage inkubiert und anschließend analysiert. Dies ergab ab einer Konzentration von 12,5 mg Levofloxacin/l Medium einen signifikanten Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Abbildung 8, Tabelle 6**).

Um die Zytotoxizität von Levofloxacin und Prednisolon in Kombination zu untersuchen, wurden die Tenozyten in einem Basismedium mit einer Konzentration von 100 µg Prednisolon/l Medium und zusätzlich Levofloxacin in 8 verschiedenen Konzentrationen (1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50; 100 und 200 mg/l) über 9 Tage inkubiert. Im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle, ergab sich hier ein signifikanter Unterschied erst ab einer Konzentration von 100 mg Levofloxacin/l (**Abbildung 9, Tabelle 7**).

Diese Versuche zeigten, dass offenbar die 3T3-Fibroblasten empfindlicher auf Levofloxacin reagieren als die Sehnenzellen (**Abbildung 6 und 8**).

Die MTT-Experimente mit Sehnenzellen geben keinen Anhalt für eine erhöhte Zytotoxizität von Levofloxacin durch die Zugabe von Prednisolon (**Abbildung 8 und 9**).

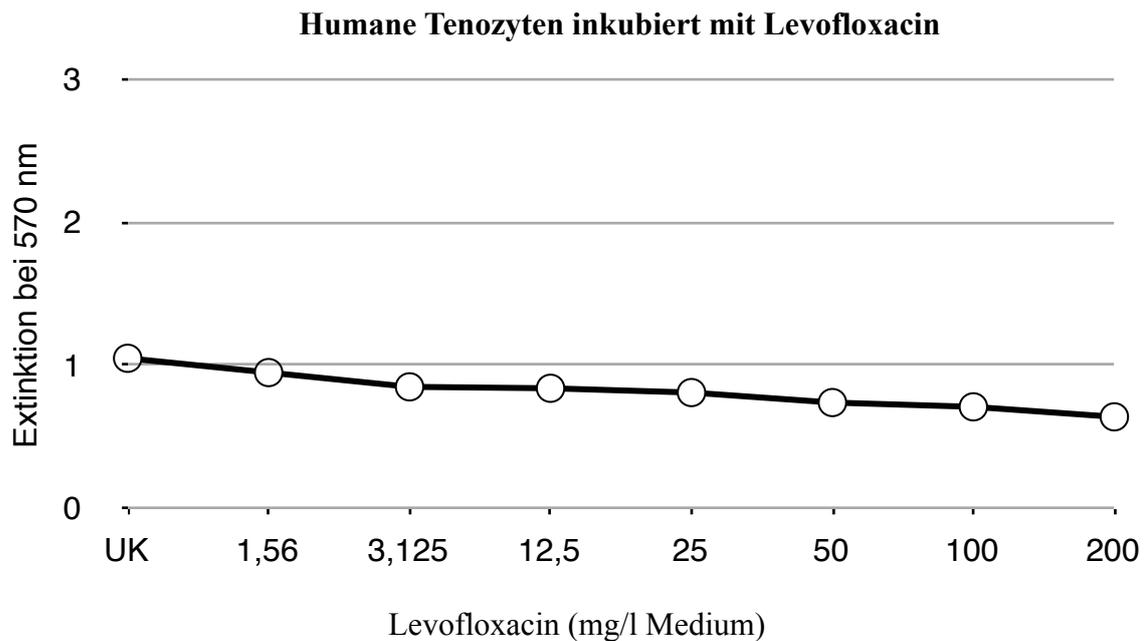


Abbildung 8: MTT-Test: Humane Tenozyten inkubiert mit Levofloxacin in 7 verschiedenen Konzentrationen (6,25 mg/l nicht auswertbar aufgrund von technischen Problemen) über 9 Tage, um die Zytotoxizität im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**UK**) zur analysieren. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab einer Konzentration von **12,5 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten (Sechsfachbestimmung) (**siehe Tabelle 6**). $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

	Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)							
	UK	1,56	3,125	12,5	25	50	100	200
Probe								
1	1,13	1,01	0,88	0,79	0,84	0,76	0,64	0,62
2	1,19	0,92	0,84	0,79	0,77	0,76	0,70	0,66
3	1,04	0,92	0,89	0,82	0,92	0,76	0,82	0,66
4	1,03	1,02	0,89	0,82	0,81	0,77	0,72	0,63
5	1,00	0,99	0,84	0,91	0,75	0,67	0,74	0,77
6	0,89	0,84	0,77	0,90	0,78	0,75	0,66	0,48
MW	1,05	0,95	0,85	0,84	0,81	0,74	0,71	0,64
Stabw	0,10	0,07	0,05	0,05	0,06	0,04	0,06	0,10
Median	1,04	0,96	0,86	0,82	0,79	0,76	0,71	0,64

Tabelle 6: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 8.

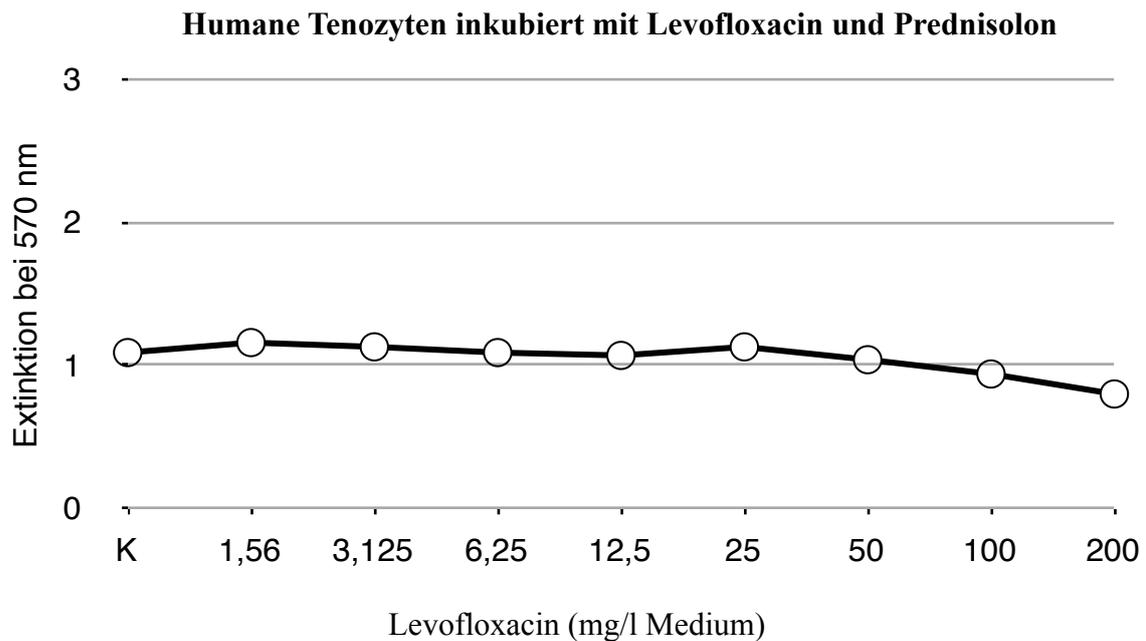


Abbildung 9: MTT-Test: Humane Tenozyten inkubiert mit Levofloxacin in 8 verschiedenen Konzentrationen über 9 Tage mit einem Basismedium mit einer Konzentration von 100 µg Prednisolon/l Medium. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (**K**) (enthält ebenso 100 µg Prednisolon/l Medium) ab einer Konzentration von **100 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten (Sechsfachbestimmung) (siehe **Tabelle 6**). $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

	Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)								
	K	1,56	3,125	6,25	12,5	25	50	100	200
Probe									
1	1,04	1,19	1,18	1,15	1,08	1,19	0,91	0,94	0,90
2	1,03	1,21	1,19	1,01	1,08	1,13	1,06	0,97	0,69
3	1,03	1,19	1,18	1,10	0,94	1,15	1,09	1,01	0,62
4	1,00	1,11	1,05	1,03	1,09	1,13	1,09	0,95	0,83
5	1,21	1,07	1,07	1,10	1,09	1,12	1,02	0,91	0,88
6	1,22	1,17	1,12	1,15	1,12	1,08	1,07	0,87	0,89
MW	1,09	1,16	1,13	1,09	1,07	1,13	1,04	0,94	0,80
Stabw	0,10	0,06	0,06	0,06	0,06	0,04	0,07	0,05	0,12
Median	1,03	1,18	1,15	1,10	1,09	1,13	1,06	0,94	0,85

Tabelle 7: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und Standardabweichungen sowie Median zu der grafischen Darstellung der Abbildung 9.

3.3 Durchflußzytometrie

Mittels Durchflußzytometrie sollte das apoptoseassoziierte Phosphatidylserin mittels Annexin V gefärbt und analysiert werden. Dabei wurden die Tenozyten mit Levofloxacin und Prednisolon einzeln und in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen über 24 Stunden inkubiert und anschließend analysiert. In den darauf folgenden Versuchen wurden die Tenozyten für längere Zeit (20 und 60 Tage) mit einem Medium das 100 µg Prednisolon/l Medium beinhaltete, inkubiert und analysiert. Dadurch sollte eine längere Behandlungsdauer mit Prednisolon *in vitro* simuliert werden. Die Versuchsreihe begann mit einem Kontrollversuch, bei dem die Tenozyten mit Camptothecin behandelt worden waren. Camptothecin diente hier als Positivkontrolle, denn diese Substanz ist als Verursacher von Apoptose bekannt. Die Ergebnisse (Histogramme) wurden anschließend mit WinList® analysiert (**Abbildung 10**).

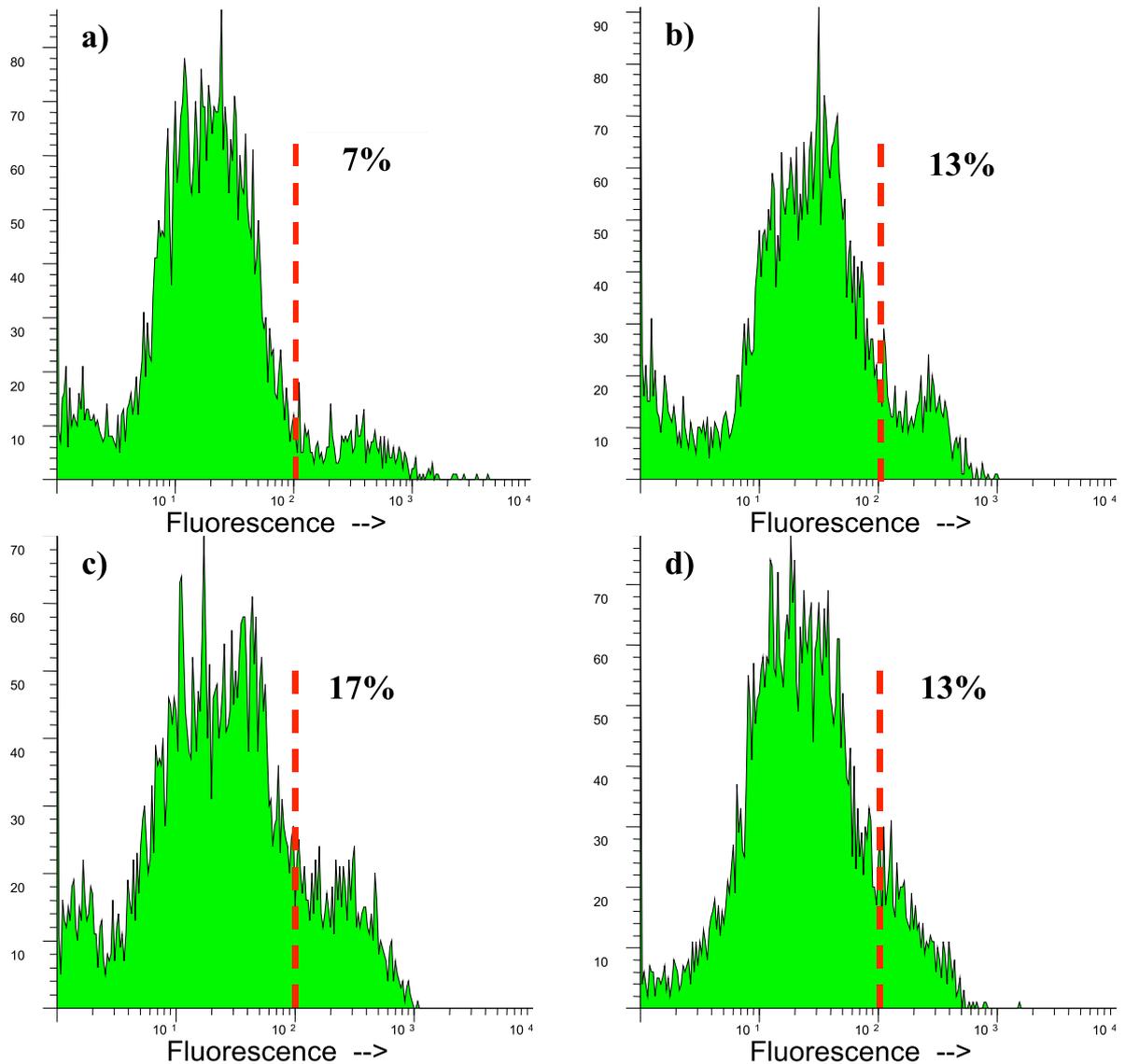


Abbildung 10: Histogramme nach Färbung von humanen Tenozyten mit Annexin V und anschließender Durchflusszytometrie. Die Zellen rechts der gestrichelten Linie (% der gesamten 10.000 gemessenen Zellen) sind Zellen, die eine erhöhte Fluoreszenz im Vergleich zur Blanko-Probe zeigen.

a) Unbehandelte Kontrolle.

b) Humane Tenozyten nach Inkubation mit 1,0 mg Levofloxacin/l Medium über 24 Stunden.

c) Humane Tenozyten nach Inkubation mit 0,3 mg Levofloxacin und 100 µg Prednisolon/l Medium über 24 Stunden.

d) Humane Tenozyten, die über 60 Tage mit 100 µg Prednisolon/l Medium und zusätzlich über 24 Stunden mit 0,3 mg Levofloxacin/l Medium inkubiert worden sind.

3.3.1 Annexin V Färbung von humanen Tenozyten nach Inkubation mit Camptothecin

Bei der Färbung mit Annexin V als Nachweis des Phosphatidylserin-Umbauprozesses wurden die Zellen mit Camptothecin in vier verschiedenen Konzentrationen (2, 5, 15 und 20 mg/l) für 4 Stunden inkubiert und anschließend mit Annexin V gefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert. Hier ergab sich ein signifikanter Unterschied ab einer Camptothecin-Konzentration von 15 mg/l, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Abbildung 11, Tabelle 8**).

3.3.2 Annexin V Färbung nach Inkubation mit Levofloxacin und Prednisolon über 24 h

Es wurde ein Versuchs-Modell etabliert, bei dem zuerst humane Tenozyten nur mit Levofloxacin alleine inkubiert worden waren und die nachfolgenden Versuche mit einer Kombination von Levofloxacin und Prednisolon über 24 Stunden untersucht wurden.

Bei der Inkubation mit Levofloxacin wurden fünf verschiedene Konzentrationen (0,3; 1; 3; 10 und 30 mg/L) analysiert. Hier wurde ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab einer Levofloxacin Konzentration von 1 mg/l Medium registriert (**Abbildung 12, Tabelle 9**).

Als nächstes wurde ein Versuch durchgeführt, bei dem die Zellen mit einer Konzentration von 100 µg/l Prednisolon (was einer Serumkonzentration nach einer täglichen Dosis von 5 mg Prednisolon entspricht) und zusätzlich mit Levofloxacin in fünf verschiedenen Konzentrationen (0,3; 1; 3; 10 und 30 mg/l) inkubiert wurden. Dieser Versuch ergab einen signifikanten Unterschied bereits bei einer Levofloxacin-Konzentration von 0,3 mg/l im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**Abbildung 13, Tabelle 10**). Die unbehandelte Kontrolle wurde mit einem Basismedium mit 100 µg Prednisolon/l Medium kultiviert.

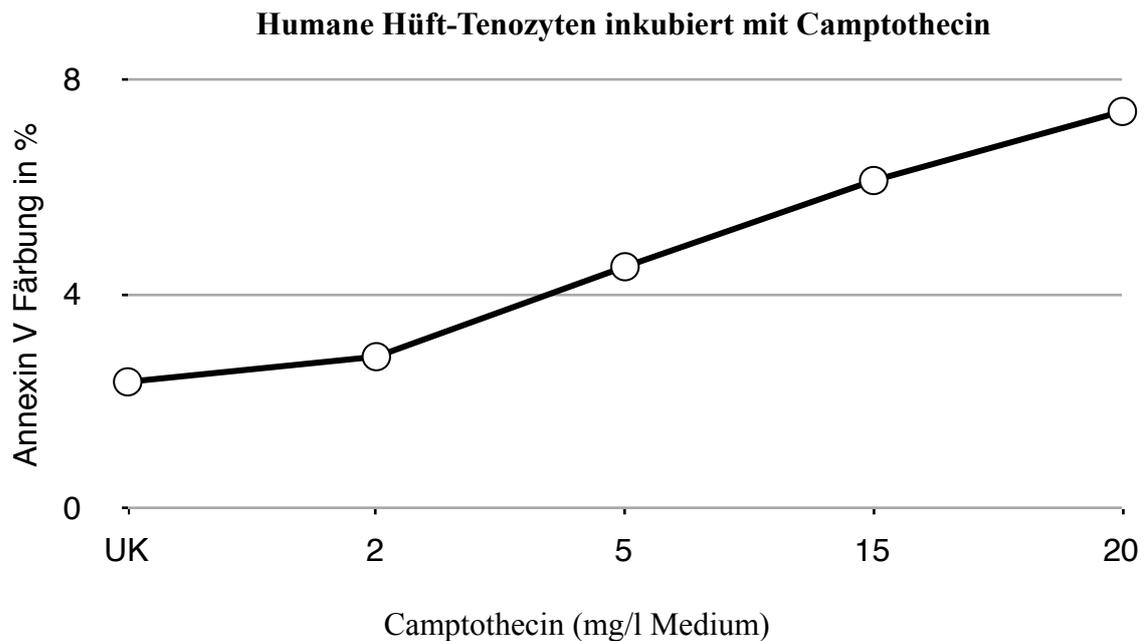


Abbildung 11: Durchflusszytometrie: Effekt einer 4-stündigen Inkubation von humanen Hüft-Tenozyten mit 2, 5, 15 und 20 mg Camptothecin l/Medium zur Analyse des Phosphatidylserin-Umbauprozesses im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (UK). Darstellung von Mittelwerten (Dreifachbestimmung) der Annexin V markierten Zellen. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied ab einer Camptothecin-Konzentration von **15 mg/l**, im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (**siehe Tabelle 8**). $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

	Camptothecin-Konzentration (mg/l Medium)				
	UK	2	5	15	20
Probe					
1	3,02	2,26	4,20	5,28	8,00
2	2,00	2,58	3,74	6,44	5,58
3	2,06	3,64	5,60	6,64	8,64
MW	2,36	2,83	4,51	6,12	7,41
Stabw	0,57	0,72	0,97	0,73	1,61
Median	2,06	2,58	4,20	6,44	8,00

Tabelle 8: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie der Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 11.

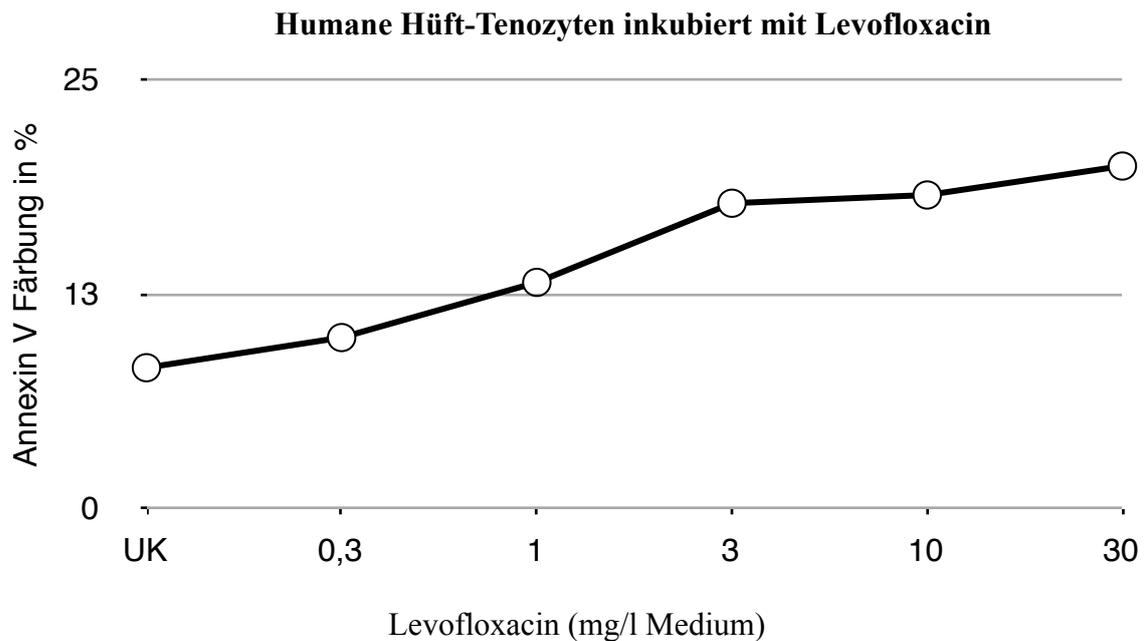


Abbildung 12: Analyse mit Durchflusszytometrie: Effekt einer 24-stündigen Inkubation von humanen Hüft-Tenozyten mit 0,3; 1; 3; 10 und 30 mg Levofloxacin/l im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (UK). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab einer Konzentration von **1 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten (Sechsfachbestimmung) der Annexin V markierten Zellen (**siehe Tabelle 9**). $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

	Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)					
	UK	0,3	1	3	10	30
Probe						
1	9,24	8,56	10,26	16,44	21,34	17,56
2	9,34	8,62	15,46	16,02	18,04	17,52
3	6,24	9,12	10,62	16,44	18,22	21,02
4	7,92	9,78	12,74	17,8	17,16	21,38
5	6,78	11,90	12,92	18,58	17,4	18,06
6	9,66	11,8	17,08	21,5	17,52	24,3
MW	8,20	9,96	13,18	17,80	18,28	19,97
Stabw	1,45	1,53	2,67	2,06	1,55	2,73
Median	8,58	9,45	12,83	17,12	17,78	19,54

Tabelle 9: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie der Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 12.

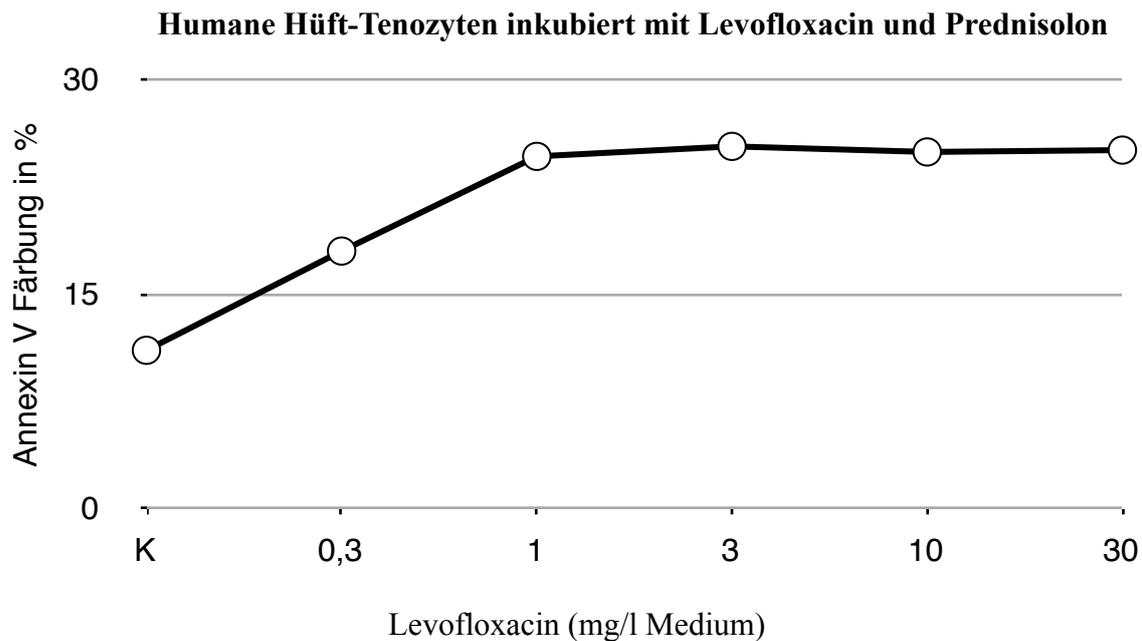


Abbildung 13: Durchflusszytometrie: Effekt einer 24-stündigen Inkubation von humanen Hüft-Tenozyten mit 100 µg Prednisolon/l plus 0,3; 1; 3; 10 oder 30 mg Levofloxacin/l im Vergleich zu einer Kontrolle (**K**), die nur mit Prednisolon in einer Konzentration von 100 µg/l inkubiert waren. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ab einer Konzentration von **0,3 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten (Sechsfachbestimmung) der Annexin V markierten Zellen. $p < 0,05$ vs. Kontrolle (**siehe Tabelle 10**) (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

	Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)					
	K	0,3	1	3	10	30
Probe						
1	9,98	15,62	21,92	22,64	25,48	26,24
2	10,68	17,06	26,3	23,42	26,52	26,48
3	10,52	18,88	21,34	26,98	25,52	25,04
4	10,34	17,48	26,72	25,54	25,02	24,18
5	12,32	20,38	26,2	24,46	24,24	24,52
6	12,54	19,18	25,38	29,00	22,92	24,00
MW	11,06	18,10	24,64	25,34	24,95	25,08
Stabw	1,09	1,71	2,38	2,36	1,24	1,06
Median	10,60	18,18	25,79	25,00	25,25	24,78

Tabelle 10: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie der Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 13.

3.3.3 Annexin V Färbung nach Inkubation mit Prednisolon über 20 und 60 Tage

Im Anschluss an die Versuche mit einer Inkubation über 24 Stunden wurden die humanen Tenozyten über einen längeren Zeitraum (20 und 60 Tage) mit einem Basismedium, das eine Prednisolon-Konzentration von 100µg/l beinhaltet, und einer anschließenden Inkubation von 24 Stunden mit Levofloxacin in fünf verschiedenen Konzentrationen (0,3; 1; 3; 10 oder 30 mg/l) durchgeführt. Die Prednisolon-Konzentration von 100 µg/l wurde von Tag 1 an beibehalten, der Mediumwechsel erfolgte jeden 3. Tag.

Bei dem Versuch über 20 Tage konnte ein signifikanter Unterschied im Vergleich zu den Kontrollzellen, die nur mit 100 µg Prednisolon/l Medium inkubiert worden waren, bereits bei einer Levofloxacin Konzentration von 0,3 mg/l festgestellt werden (**Abbildung 14, Tabelle 11**).

Bei dem Versuch über 60 Tage wurden die Zellen von Tag 1 an mit einer Prednisolon-Konzentration von 100 µg/l inkubiert und anschließend über 24 Stunden mit Levofloxacin in fünf verschiedenen Konzentrationen (0,3; 1; 3; 10 und 30 mg/l) inkubiert. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied bei den Konzentrationen von **1 und 3 mg** Levofloxacin/l Medium, im Vergleich zur Kontrolle, die nur mit Prednisolon in einer Konzentration von 100 µg/l Medium inkubiert wurden, festgestellt (**Abbildung 15, Tabelle 12**).

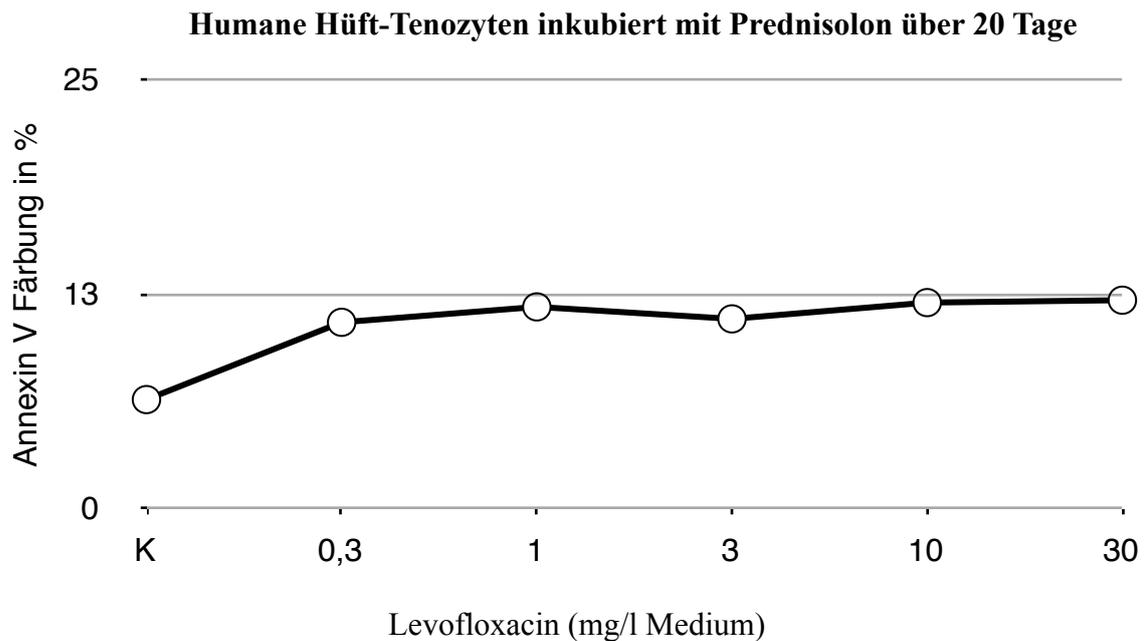


Abbildung 14: Durchflusszytometrie: Effekt einer Inkubation von humanen Hüft-Tenozyten mit 100 µg Prednisolon/l Medium über 20 Tage und anschließender 24-stündiger Inkubation mit 0,3; 1; 3; 10 oder 30 mg Levofloxacin/l im Vergleich zu einer Kontrolle (**K**), die nur mit Prednisolon in einer Konzentration von 100 µg/l inkubiert wurde. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ab einer Konzentration von **0,3 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten (Sechsfachbestimmung) der Annexin V markierten Zellen. $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

Probe	Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)					
	K	0,3	1	3	10	30
1	5,20	10,34	12,6	10,44	12,5	12,18
2	6,38	10,94	12,16	10,34	11,62	13,16
3	6,62	11,16	12,96	11,26	12,92	10,46
4	6,48	10,98	12,44	11,78	11,16	12,60
5	7,52	11,54	10,16	12,32	11,24	12,04
6	5,82	10,12	10,16	10,16	12,58	12,42
MW	6,34	10,85	11,75	11,05	12,00	12,14
Stabw	0,78	0,53	1,26	0,88	0,76	0,91
Median	6,43	10,96	12,30	10,85	12,06	12,30

Tabelle 11: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie der Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 14.

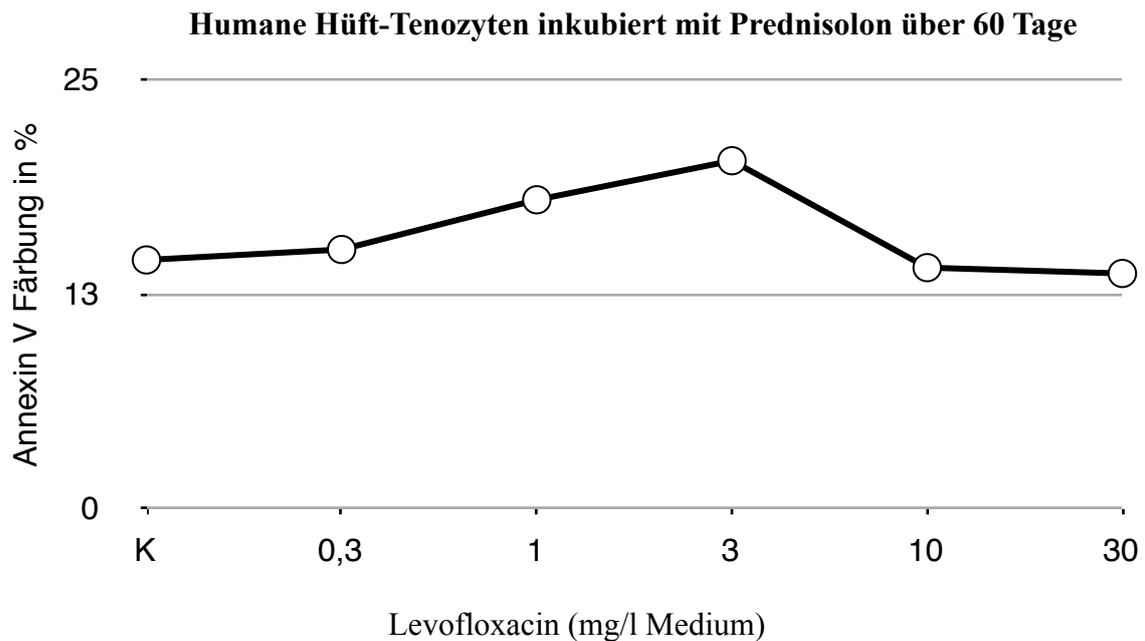


Abbildung 15: Durchflusszytometrie: Effekt einer Inkubation von humanen Tenozyten mit 100 µg Prednisolon/l über 60 Tage plus anschließender 24-stündiger Inkubation mit 0,3; 1; 3; 10 oder 30 mg Levofloxacin/l im Vergleich zu einer Kontrolle (**K**), die nur mit Prednisolon in einer Konzentration von 100 µg/l inkubiert wurde. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle bei den Konzentrationen von **1 und 3 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten (Sechsfachbestimmung) der Annexin V markierten Zellen. $p < 0.05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

	Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)					
	K	0,3	1	3	10	30
Probe						
1	13,14	14,86	19,28	21,84	13,54	15,5
2	14,46	15,28	18,26	20,26	14,12	13,66
3	15,16	16,30	16,68	18,58	13,82	13,44
4	13,14	15,46	18,70	20,66	14,38	13,08
5	15,46	13,46	17,08	20,24	13,64	13,26
6	15,56	15,26	18,02	20,08	14,76	13,28
MW	14,49	15,10	18,00	20,28	14,04	13,70
Stabw	1,11	0,94	0,98	1,05	0,47	0,90
Median	14,81	15,27	18,14	20,25	13,97	13,36

Tabelle 12: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie der Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 15.

3.3.4 Annexin V Färbung an humanen Finger -Tenozyten

In den bisher beschriebenen Versuchen wurden humane Hüft-Tenozyten von einem Spender verwendet. Als nächstes wurde ein Versuch mit humanen Finger-Tenozyten von einem anderen Spender durchgeführt, um zu analysieren, ob sich ein Unterschied zwischen den verschiedenen Sehnen, und Spendern nachweisen lässt. Die humanen Finger-Tenozyten wurden mit Levofloxacin in drei verschiedenen Konzentrationen von 3, 10 und 30 mg Levofloxacin/l Medium über 24 Stunden inkubiert und anschließend mit Annexin V gefärbt und mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Es ergab sich ein signifikanter Unterschied zur unbehandelten Kontrolle ab einer Levofloxacin Konzentration von 3 mg/l Medium (**Abbildung 16, Tabelle 13**).

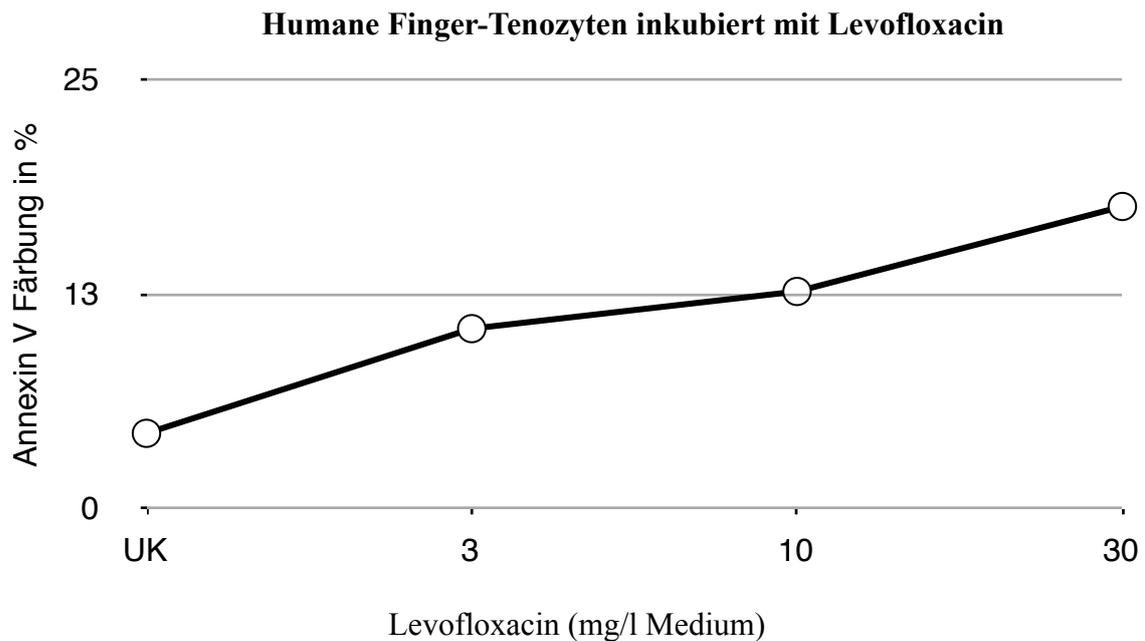


Abbildung 16: Analyse mit Durchflusszytometrie: Effekt einer 24-stündigen Inkubation von humanen Finger-Tenozyten mit 3, 10 und 30 mg Levofloxacin/l Medium im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle (UK). Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab einer Konzentration von **3 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten (Dreifachbestimmung) der Annexin V markierten Zellen. $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

	Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)			
	UK	3	10	30
Probe				
1	4,36	8,85	15,14	19,42
2	4,5	10,46	13,00	16,98
3	4,84	12,12	9,82	16,42
MW	4,37	10,48	12,65	17,61
Stabw	0,45	1,64	2,68	1,60
Median	4,5	10,46	13,00	16,98

Tabelle 13: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie der Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 16.

3.4 Immunhistochemie und Bildanalyse

Beim Nachweis von Kollagen Typ I in der Immunhistochemie wurden Tenozyten mit Levofloxacin und Prednisolon einzeln und in Kombination in unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert und analysiert. Ziel dieses Versuches war es, die Kollagen Typ I-Produktion mit Hilfe der Bildanalyse zu analysieren. Zuerst wurden Zellen über 24 Stunden mit Levofloxacin (3 und 30 mg/l Medium) alleine über 24 Stunden inkubiert. Eine zweite Versuchsreihe wurde mit einer Kombination von Levofloxacin (3 und 30 mg/l Medium) in einem Medium mit 100 µg Prednisolon/l Medium durchgeführt. Zusätzlich wurden Zellen über 20 Tage in einem Wachstumsmedium kultiviert, das eine Prednisolon-Konzentration von 100 µg/l Medium beinhaltet. Im Anschluss wurden die Zellen für 24 Stunden mit Levofloxacin inkubiert (**Abbildungen 17-20**).

3.4.1 Nachweis von Kollagen Typ I in Tenozyten inkubiert mit Levofloxacin über 24 h

Beim Nachweis von Kollagen Typ I zeigte sich ein signifikanter Unterschied schon bei 3 mg Levofloxacin/l Medium im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (UK) sowie in deutlicher Ausprägung bei der Konzentration von 30 mg Levofloxacin/l Medium (**Abbildung 21, Tabelle 14**).

3.4.2 Nachweis von Kollagen Typ I nach Inkubation mit Levofloxacin und Prednisolon

Nach einer kombinierten Inkubation von humanen Tenozyten mit Levofloxacin (3 und 30 mg/l Medium) und 100 µg Prednisolon/l Medium über 24 Stunden. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle ab einer Konzentration von 3 mg Levofloxacin/l Medium, aber kein signifikanter Unterschied zwischen den Konzentrationen. (**Abbildung 22, Tabelle 15**).

3.4.3 Nachweis von Kollagen Typ I nach Inkubation mit Prednisolon über 20 Tage

Nach einer Inkubation von humanen Tenozyten mit 100 µg Prednisolon/l Medium über 20 Tage und anschließender Inkubation mit 3 und 30 mg Levofloxacin/l Medium für 24 Stunden zeigte

sich ein verminderter Nachweis von Kollagen Typ I im Vergleich zur unbehandelten Kontrollproben. (**Abbildung 23, Tabelle 16**).

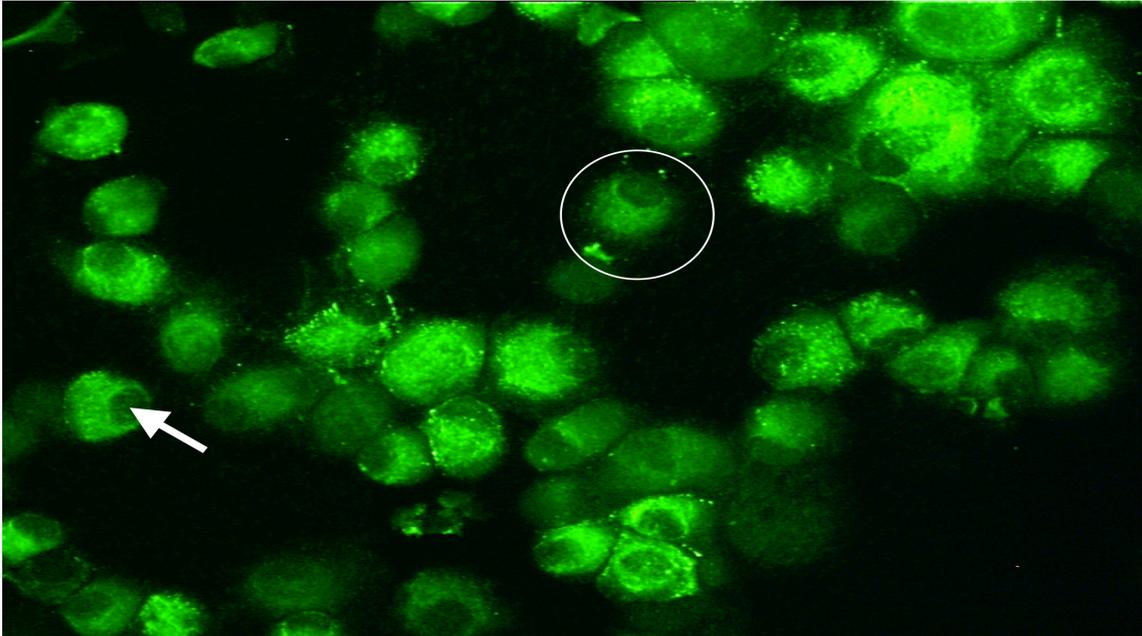


Abbildung 17: Unbehandelte Kontrollprobe nach immunohistochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ I auf humanen Hüft-Tenozysten (Kreis). Deutlich zu sehen sind die Zellkerne (Pfeil).

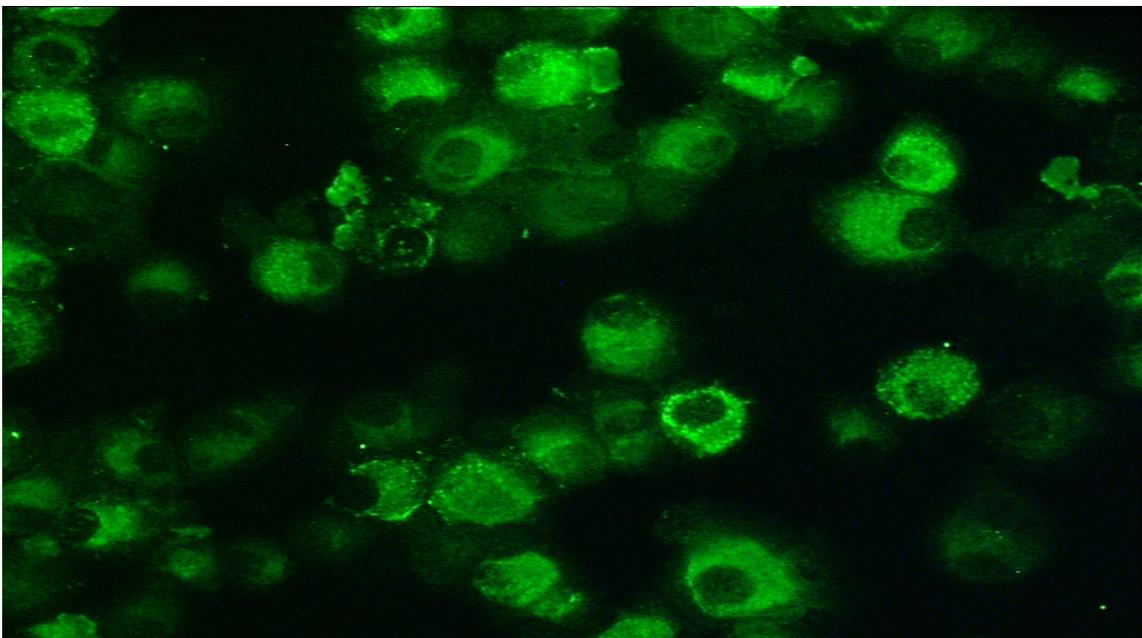


Abbildung 18: Humane Tenozyten nach Inkubation über 24 Stunden mit 30 mg Levofloxacin/l Medium und immunohistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ I.

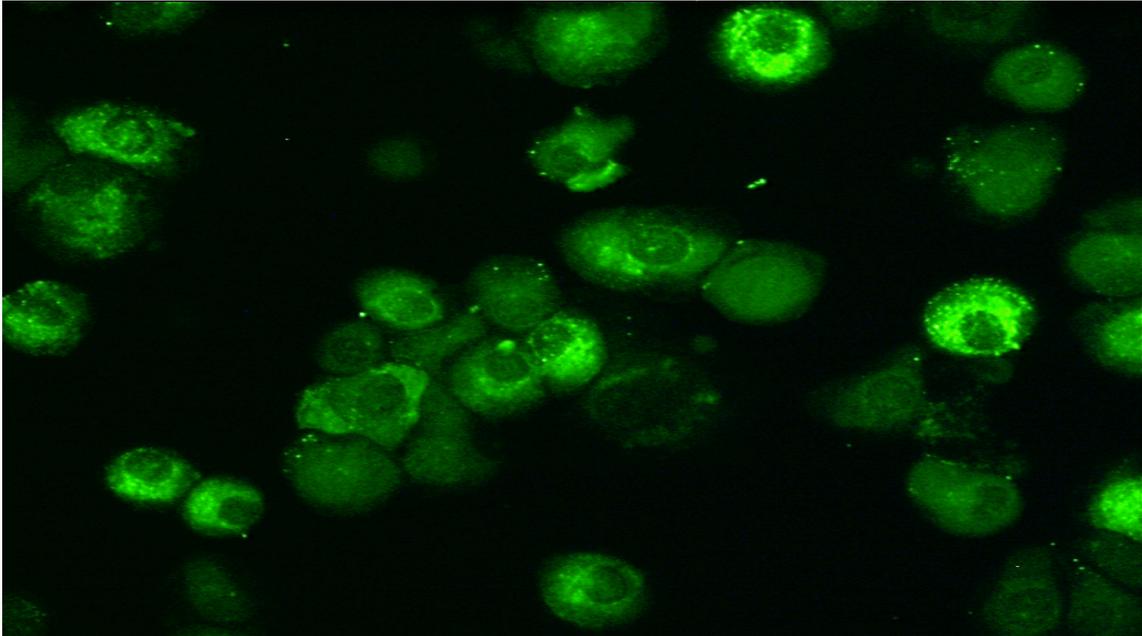


Abbildung 19: Humane Tenozyten nach Inkubation über 24 Stunden mit 30 mg Levofloxacin und 100 µg Prednisolon/l Medium über 24 Stunden und immunohistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ I.

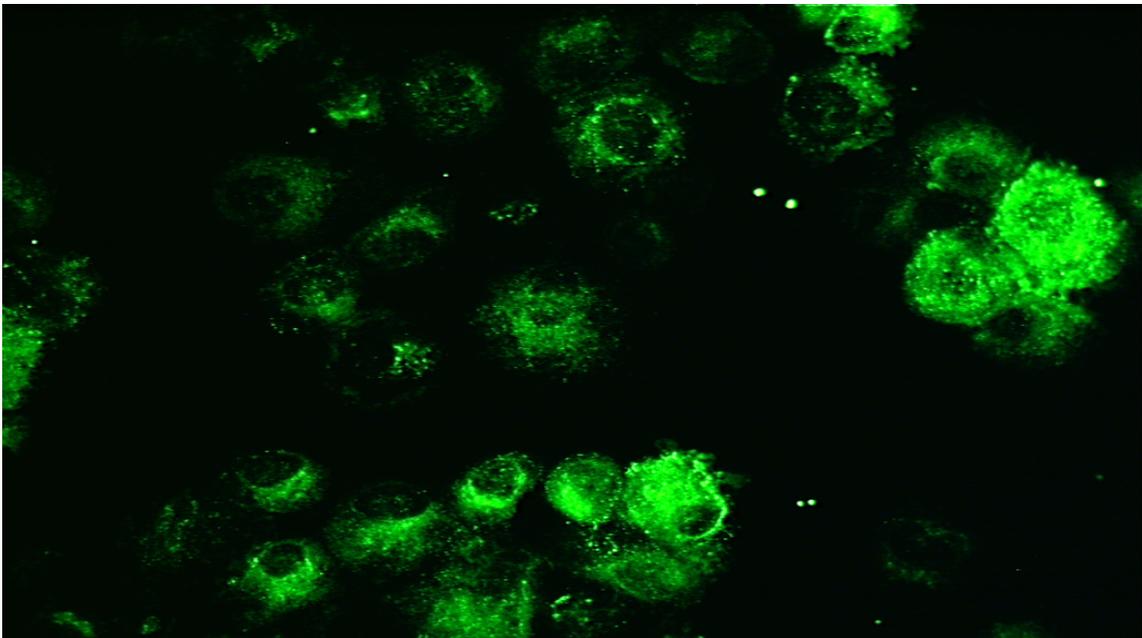


Abbildung 20: Humane Tenozyten nach Inkubation über 20 Tage mit 100 µg Prednisolon Stunden und über 24 Stunden mit 30 mg Levofloxacin/l Medium und immunohistochemische Färbung mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ I

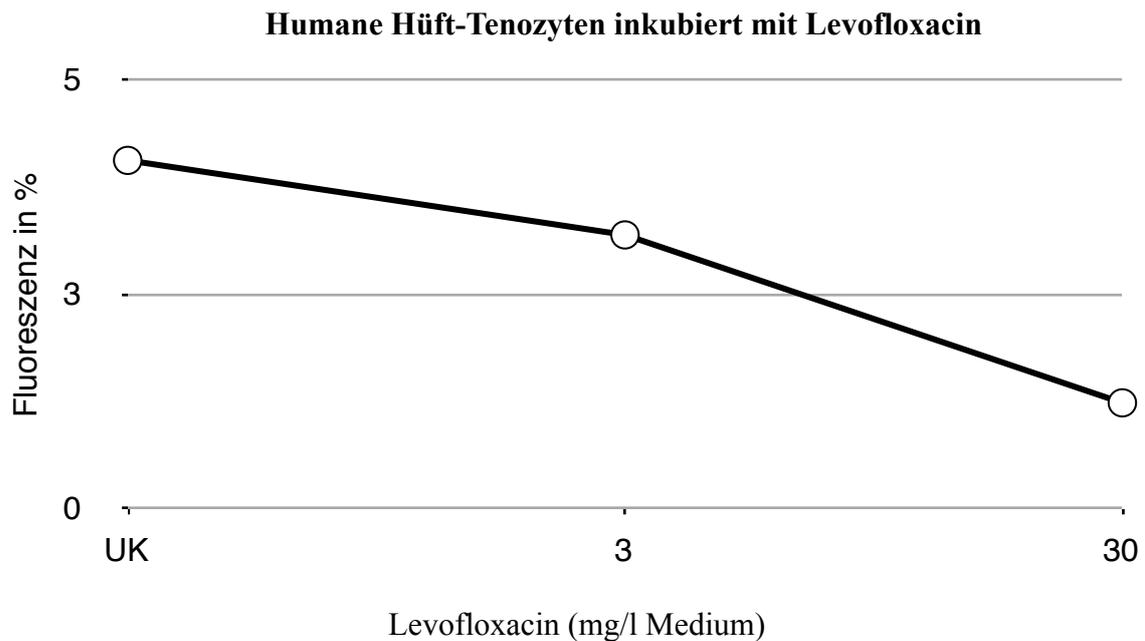


Abbildung 21: Humane Tenozyten nach Inkubation über 24 Stunden mit 3 und 30 mg Levofloxacin Medium nach immunohistochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ I. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (UK) ab einer Konzentration von **3 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen (Sechsfachbestimmung). $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)			
	UK	3	30
Probe			
1	3,44	3,30	0,96
2	4,59	2,90	1,41
3	4,60	2,96	1,55
4	3,78	3,00	1,00
5	4,10	4,09	1,00
6	3,85	2,87	1,48
MW	4,06	3,19	1,23
Stabw	0,46	0,47	0,27
Median	3,98	2,98	1,21

Tabelle 14: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie der Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 21.

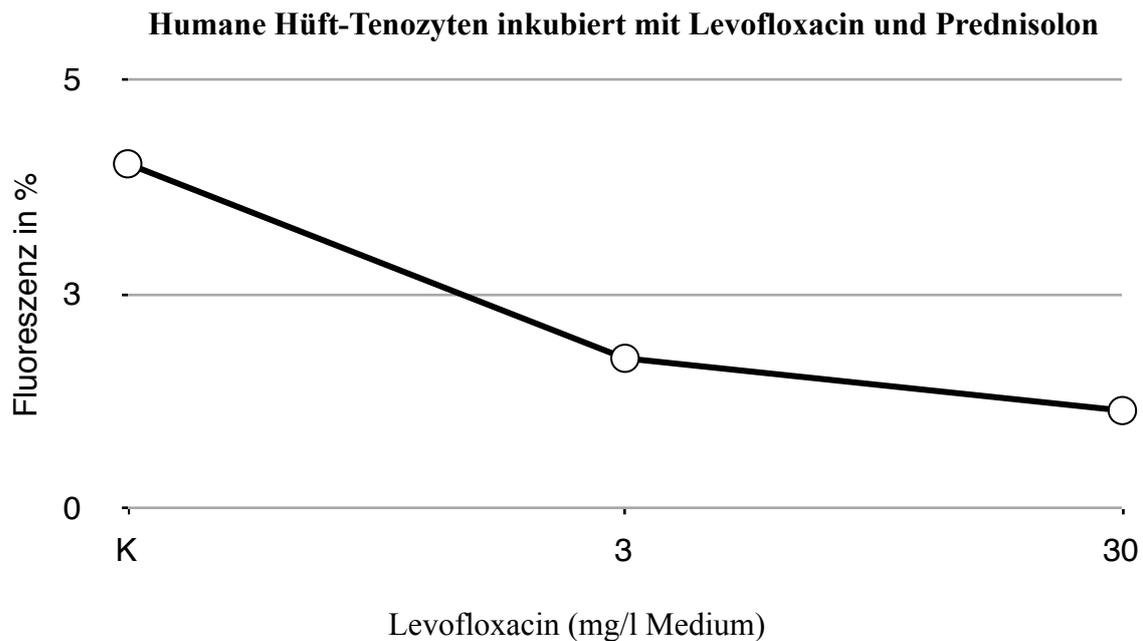


Abbildung 22: Humane Tenozyten nach Inkubation über 24 Stunden mit 3,0 und 30 mg Levofloxacin und 100 µg Prednisolon/l Medium über 24 Stunden nach immunohistochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ I. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (**K**) ab einer Konzentration von **3 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen (Sechsfachbestimmung). $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)			
	K	3	30
Probe			
1	4,73	1,67	1,12
2	3,72	1,88	1,13
3	4,01	1,33	0,98
4	3,87	1,86	1,19
5	3,63	2,05	1,29
6	4,13	1,68	1,11
MW	4,02	1,75	1,14
Stabw	0,40	0,25	0,10
Median	3,94	1,77	1,13

Tabelle 15: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie der Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 22.

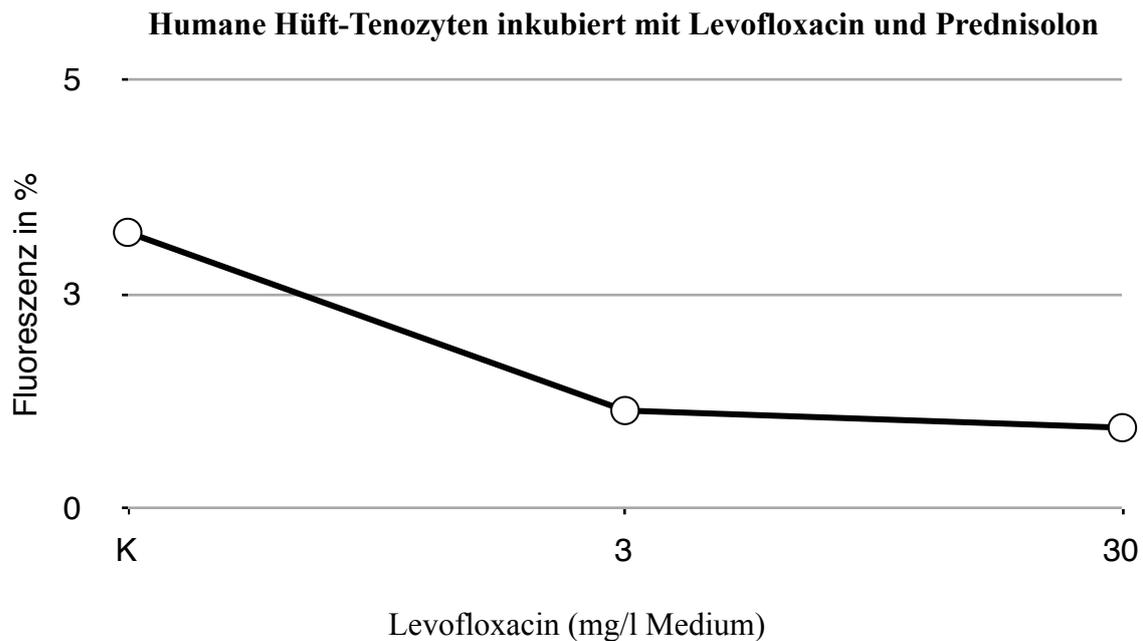


Diagramm 23: Humane Tenozyten nach Inkubation über 20 Tage mit 100 µg Prednisolon und über 24 Stunden mit 3,0 und 30 mg Levofloxacin/l Medium nach immunohistochemischer Färbung mit einem Antikörper gegen Kollagen Typ I. Es ergab sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur Kontrolle (**K**) ab einer Konzentration von **3 mg** Levofloxacin/l Medium. Darstellung von Mittelwerten und Standardabweichungen (Sechsfachbestimmung). $p < 0,05$ vs. Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

Levofloxacin-Konzentration (mg/l Medium)			
	K	3	30
Probe			
1	3,29	1,03	1,08
2	3,33	1,14	0,73
3	2,79	1,15	1,06
4	3,36	0,86	0,83
5	3,13	1,33	1,02
6	3,42	1,32	0,89
MW	3,22	1,14	0,94
Stabw	0,23	0,18	0,14
Median	3,31	1,15	0,96

Tabelle 16: Darstellung der Einzelwerte, Mittelwerte und der Standardabweichungen sowie der Medianwerte zu der grafischen Darstellung der Abbildung 23.

4. Diskussion

Die Fluorchinolone besitzen ein breites Wirkspektrum und eine gute Gewebepenetration. Durch die zur Zeit noch günstige Resistenzlage haben sie eine wichtige Rolle in der antibakteriellen Therapie eingenommen. Obwohl sie eine relativ gute Verträglichkeit aufweisen, zeigen die Chinolone auch Unverträglichkeiten und Nebenwirkungen. Eine dieser unerwünschten Wirkungen wurde in dieser Arbeit näher untersucht, die toxische Wirkung auf Sehnenzellen.

Glukokortikoide spielen eine wichtige Rolle bei der Therapie vieler Krankheiten in der Dermatologie sowie in der Therapie von systemischen Krankheiten wie Vaskulitiden, rheumatoider Arthritis und Lupus erythematodes. Die Glukokortikoide sind in diesen Einsatzgebieten essentiell, aber sie verursachen unerwünschte Wirkungen. Es ist schon lange bekannt, dass Glukokortikoide ein tendotoxisches Potenzial besitzen (Cowan und Alexander, 1961; Smaill, 1961). Es liegen Berichte seit den 70er Jahren vor, die Sehnenrupturen im Zusammenhang mit einer systemischen Glukokortikoidtherapie beschreiben (Morgan und McCarty, 1974; Kao et al., 1992; Kotnis et al., 1999; Hayes et al., 2000).

Die vorgelegte Arbeit konzentriert sich auf ein *in vitro* Modell, mit dessen Hilfe das tendotoxische Potential von Levofloxacin und Prednisolon alleine und in Kombination auf humane Tenozyten analysiert wurde. Mit diesem Modell ist es möglich, die direkte Wirkung einer Substanz (oder mehrerer) auf die Zellen zu untersuchen. Es wurden Primärkulturen aus humanen Tenozyten verwendet und die Effekte verschiedener Konzentrationen von Levofloxacin und Prednisolon allein oder in Kombination über unterschiedlich lange Zeiträume auf die Zellen wurden analysiert. Untersucht wurde die Morphologie, Vitalität, die Expression von Phosphatidylserin sowie die Kollagen Typ I Synthese der Zellen.

4.1 Fallberichte, epidemiologische- und -Kohortenstudien

In der 80er Jahren wurde erstmals über die Chinolon-induzierte Sehnenbeschädigung berichtet. Seitdem wird dieser Nebenwirkung mehr Aufmerksamkeit geschenkt. Vor allem zeigen retrospektive Studien und Kasuistiken einen deutlichen Zusammenhang zwischen Einnahme eines Chinolons und dem Auftreten einer Tendopathie (Bailey et al., 1983).

Die durch Fluorchinolone induzierte Tendopathie ist eine unerwünschte Wirkung mit einem relativ niedrigen Risiko von 3,2:1000 Patientenjahre (van der Linden et al., 2002). Es liegen Fallberichte und Kasuistiken vor, die einen eindeutigen Zusammenhang zwischen Einnahme eines Chinolons und dem Auftreten einer Tendopathie bis zur Sehnenruptur zeigen (van der Linden et al., 1999, 2001, 2002, 2003; Melhus et al., 2003; Gold und Igra, 2003). Zwischen der Einnahme eines Chinolons und dem Auftreten einer Tendopathie kann ein Zeitfenster von Tagen bis Monaten liegen. Aufgrund dieses verzögerten Effekts ist es manchmal schwer, einen Kausalzusammenhang zwischen einer Chinolontherapie und einer Tendopathie zu erkennen. Daher ist zu vermuten, dass es hier eine große Zahl von nicht erkannten Fällen gibt. Am häufigsten ist die Achillessehne betroffen, wobei auch andere Sehnen des menschlichen Bandapparates betroffen sein können (Braun et al., 2004). Im Falle einer Achillessehnenruptur wird der betroffene Patient immobil. Die Genesung kann Wochen bis Monate dauern, und damit ist der wirtschaftliche Faktor dieser Nebenwirkung nicht zu ignorieren. Insbesondere bei alten Patienten stellt die weitgehende Immobilisierung ein erhebliches Risiko für Folgeerkrankungen dar (Gottschalk et al., 2009).

Neben dem Risiko einer Chinolontherapie als solche gibt es auch andere Faktoren, die das Risiko dieser unerwünschten Wirkung erhöhen. Dazu gehören z.B. die Therapie mit Glukokortikoiden und ein höheres Alter (> 60 Jahre). Eine Therapie mit Glukokortikoiden zusätzlich zu einer Chinolontherapie erhöht das Risiko für eine Achillessehnenruptur erheblich (van der Linden et al., 2003).

Van der Linden und Mitarbeiter untersuchten in der ersten epidemiologischen Studie zu Tendopathien nach Einnahme von Chinolonen das relative Risiko, eine Tendopathie zur erleiden. Hier wurden 1841 Patienten, die mit Fluorchinolonen behandelt worden waren, und 9406, die mit anderen antibakteriellen Substanzen behandelt worden waren, analysiert. Bei 22 Patienten wurde eine Tendinitis diagnostiziert. Es ergab sich ein erhöhtes Tendinitisrisiko nach Einnahme eines Chinolons im Vergleich zu anderen Antibiotika. Das relative Risiko für eine Achillestendinitis (3,7) im Vergleich zu anderen Tendopathien (1,3) war deutlich erhöht. Diese Studie zeigte auch, dass Ofloxacin mit 15 Fällen bei 100 000 Expositionstagen eine höhere Rate an Tendinitiden aufwies als andere Chinolone (Ciprofloxacin, Norfloxacin) (Van der Linden et al., 1999).

2007 wurde eine populationsbasierte Kohortenstudie von Sode und Mitarbeitern aus Dänemark veröffentlicht. Hier wurde eine Population von 470 000 über den Zeitraum 1991-1999

untersucht. Aus dieser Population wurde 28 262 Patienten, die zum ersten Mal mit einem Chinolon behandelt worden waren identifiziert. Gleichzeitig wurden alle Fälle von Achillessehnenrupturen während derselben Zeit identifiziert. Man hatte ein Zeitfenster von 90 Tagen nach der Behandlung gewählt und es konnte festgestellt werden, dass eine Behandlung mit Fluorchinolonen das Risiko um das Dreifache steigerte. Die Inzidenz erwies sich als sehr niedrig bei 12:100 000 behandelten Patienten (Sode et al., 2007). Mehrere Fallberichte beschreiben über einen Zusammenhang zwischen einer Behandlung mit Levofloxacin und dem Auftreten einer Tendopathie bis zu Sehnenrupturen. In den meisten Fällen werden Achillessehnenrupturen beschrieben. In vielen Fallberichten wird eine Tendopathie schon nach wenigen Tagen nach Einnahme eines Chinolons wie Levofloxacin beschrieben (Gold und Igra, 2003; Kahn und Christensson, 2004; Lühje et al., 2005).

Das eine Glukokortikoidtherapie (oral oder lokal) zu einem erhöhten Risiko, an einer Tendopathie zu erkranken, führen kann, ist in mehreren Fallberichten beschrieben worden. Es wird häufig über spontane Sehnenrupturen nach Stoßtherapien berichtet, aber auch nach Einnahme von niedrigen Dosen über eine längere Zeit (Murakoshi et al., 2006).

4.2 Untersuchungen der Toxizität von Chinolonen und Glukokortikoiden

Bei den in dieser Arbeit beschriebenen Experimenten wurden die Sehnenzellen zunächst mikroskopisch untersucht.

Bei der Durchlichtmikroskopie zeigten sich an den humanen Tenozyten nach einer Inkubation mit 10 mg Levofloxacin/l Medium über 24 Stunden keine morphologischen Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Nach 20 Tagen Kultivierung bzw. Inkubation mit einem Wachstumsmedium, das 100 µg Prednisolon/l Medium enthielt, konnte man deutliche morphologische Veränderungen beobachten. Die charakteristischen langen Ausläufer der Tenozyten waren deutlich kürzer und aufgequollen. Die Zellkerne sowie das Zytoplasma zeigten auch Aufquellungen und Deformierungen. Eine zusätzliche Inkubation mit 10 mg Levofloxacin/l Medium über 24 Stunden führte aber nicht zu weiteren morphologischen Veränderungen, die im Durchlichtmikroskop analysierbar waren.

Bei dem MTT-Zytotoxizitätstest wurden die humanen Tenozyten über 9 Tage mit Levofloxacin behandelt, hier zeigte sich eine signifikante Veränderung zur unbehandelten Kontrolle ab einer

Konzentration von 12,5 mg Levofloxacin/l Medium. Das entspricht einer Konzentration, die oberhalb der Spitzenkonzentration im Plasma unter therapeutischen Bedingungen beim Menschen nach oraler Therapie mit Levofloxacin liegt [500 mg Levofloxacin oral: C_{max} : 4,8 bis 5,7 mg/l (Dudley, 2003)]. In den folgenden Versuchen enthielt das Medium 100 µg Prednisolon/l Medium und Levofloxacin in derselben Konzentration wie im vorherigen Versuch, hier ergab sich eine Signifikanz zur unbehandelten Kontrolle ab einer Levofloxacin-Konzentration von 100 mg/l Medium. Die Abnahme der Vitalität der Zellen verstärkte sich mit zunehmender Levofloxacin-Konzentration.

Ähnliche Versuche mit Ciprofloxacin an humanen Tenozyten haben signifikante Effekte ab einer Konzentration von 100 mg/l Medium gezeigt (Kempka et al., 1996). Kempka und Mitarbeiter inkubierten die Zellen für 72 Stunden, während in dieser Arbeit die Zellen über 9 Tage inkubiert wurden. Nicht zuletzt zeigte sich, dass die Tendotoxizität von Chinolonen zeit- und konzentrationsabhängig ist. Kempka und Mitarbeiter zeigten, dass Tenozyten, die mit einer Kombination von Chinolon und Triamcinolonacetonid inkubiert waren, zytotoxische Veränderungen aufweisen. Im Vergleich zu den Chinolonen zeigte Triamcinolonacetonid eine höhere Toxizität auf die Tenozyten (Kempka et al., 1996). Die Tenozyten wurden über 72 Stunden allein oder in Kombination inkubiert und anschließend mit der entsprechenden Methodik untersucht (Viabilitätsassay durch Neutral-Rot Färbung und Messung der mitochondrialen Dehydrogenaseaktivität mit Hilfe eines MTT Assays). Die hier vorgelegten Ergebnisse in dieser Arbeit korrelieren mit den Ergebnissen in der Arbeit von Kempka und Mitarbeitern. Letztendlich zeigen die Ergebnisse beider Arbeiten eine toxische Wirkung von Chinolonen und Glukokortikoiden alleine und in Kombination auf humane Tenozyten.

Pouzaud und Mitarbeiter haben 2003 mittels MTT-Zytotoxizitätstest nachgewiesen, dass Chinolone eine Tendotoxizität durch oxidativen Stress auslösen können. Hier wurde eine Tenozytenzelllinie mit verschiedenen Chinolonen (Ofloxacin, Pefloxacin, Ciprofloxacin und Levofloxacin) inkubiert und untersucht (Pouzaud et al., 2003).

Bei der Durchflußzytometrie nach Annexin V Färbung zeigte sich nach einer Inkubation über 24 Stunden mit Levofloxacin alleine ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab einer Konzentration von 1 mg Levofloxacin/l Medium. Eine kombinierte Inkubation mit Levofloxacin und Prednisolon (100 µg/l Medium) zeigte schon ab einer

Levofloxacin-Konzentration von 0,3 mg/l Medium eine signifikante Veränderung. Langzeitinkubationen über 20 und 60 Tage mit Prednisolon und anschließender 24-Stunden-Inkubation mit Levofloxacin zeigten im Vergleich zur Inkubation über 24 Stunden keine Intensivierung der Färbung mit Annexin V, aber auch einen signifikanten Unterschied zur unbehandelten Kontrolle ab einer Levofloxacin-Konzentration von 0,3 mg/l Medium.

Zusätzlich wurde ein Versuch mit Sehnenmaterial eines anderen Spenders durchgeführt. Hier wurden humane Fingersehnenzellen mit Levofloxacin in Konzentrationen von 3, 10 und 30 mg/l Medium über 24 Stunden inkubiert. Die anschließende Annexin V Färbung und Durchflusszytometrie zeigte eine ähnliche Expression von Annexin V wie bei den Hüftsehnenzellen mit einer signifikanten Veränderung im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle ab einer Levofloxacin-Konzentration von 3 mg/l Medium.

Es gibt bisher wenige Arbeiten, in denen Tenozyten mittels Annexin V Färbung untersucht wurden. Yuan und Mitarbeiter untersuchten den Effekt von oxidativem Stress mittels H₂O₂ auf humane Tenozyten. Nachgewiesen wurde eine Konzentrations- und Zeitabhängigkeit bei der Annexin V Färbung sowie Nachweis von aktivierter Caspase-3 (Yuan et al., 2003).

Von Sendzik und Mitarbeitern wurde beschrieben, dass eine kombinierte Inkubation mit Levofloxacin und Dexamethason zu einer erhöhten Expression von aktivierter Caspase-3 führt. Hier wurden humane Tenozyten mit einer Kombination von Levofloxacin oder Ciprofloxacin mit Dexamethason (10⁻¹⁰ M) in Konzentrationen, die innerhalb der therapeutisch relevanten Plasmakonzentration lagen, inkubiert. Es zeigte sich eine Zunahme von aktivierter Caspase-3 ab einer dreitägigen Inkubation mit Dexamethason und 3 mg Levofloxacin/l Medium. Ciprofloxacin in Kombination mit Dexamethason ergab ebenso eine Zunahme an aktivierter Caspase-3 nach einer dreitägigen Inkubation. In ihren Ergebnissen haben Sendzik und Mitarbeiter eine Konzentrationsabhängigkeit der Wirkungen gezeigt, indem es ab einer Chinolonkonzentration (Levofloxacin und Ciprofloxacin) von 10 mg/l Medium eine Verstärkung in der Expression von aktivierter Caspase-3 gab (Sendzik et al., 2005).

Die Ergebnisse entsprechen den Ergebnissen dieser Arbeit, in der gezeigt werden konnte, dass eine Kombination des Chinolons Levofloxacin und des Glukokortikoids Prednisolon eine erhöhte toxische Wirkung auf humane Tenozyten hat.

Es gibt mehrere Arbeiten über die Wirkung von Glukokortikoiden auf Tenozyten. Wong und Mitarbeiter haben eine verminderte Vitalität, Proliferation sowie verminderte Kollagensynthese nach Inkubation von humanen Tenozyten mit Triamcinolonacetonid feststellen können (Wong et

al., 2004). Dass die Zellproliferation und Kollagensynthese unter Exposition von Glukokortikoiden abnehmen, haben auch Scutt und Mitarbeiter in ihrer Arbeit feststellen können. Hier wurden die Sehnenzellen über 24 Tage mit einer Konzentration von 0,1 nM bis 10µM Dexamethason/l Medium kultiviert. Es wurde hier eine Abnahme der Kollagensynthese ab dem 14. Tag bei den Zellen, die mit einem Dexamethason-bereicherten Medium kultiviert waren, festgestellt. Die Kontrollproben haben erst in der vierten Woche eine Abnahme in der Kollagensynthese gezeigt. Die Ergebnisse zeigten, dass auch eine sehr niedrige Konzentration von Dexamethason (0,1 nM) einen signifikanten Effekt haben kann (Scutt et al., 2006).

Sendzik und Mitarbeiter untersuchten die Kollagen Typ I Synthese nach einer Inkubation von Tenozyten mit Dexamethason mit Hilfe von Immunoblotting. Hier zeigte sich im Vergleich zu den Inkubationen mit einem Chinolon allein eine signifikante Abnahme ab einer Konzentration von 10^{-5} M Dexamethason. Bei einer kombinierten Inkubation mit Chinolon und Dexamethason zeigte sich eine Verstärkung dieses Effekts (Sendzik et al., 2005).

Weitere Arbeitsgruppen haben den Effekt von Glukokortikoiden auf Tenozyten in Bezug auf die Kollagensynthese tierexperimentell untersucht, Torricelli und Mitarbeiter haben Ratten über 8 Wochen mit Methylprednisolon (4 mg/kg KG) behandelt. Anschließend wurden die Rattentenozyten aus den Sehnen gewonnen, für 3 bis 7 Tage kultiviert und anschließend untersucht mittels Immunoassay. Es ergab sich hier eine deutliche Verminderung von Kollagen Typ I in den behandelten Zellen im Vergleich zu den unbehandelten (Torricelli et al., 2006).

Bei der immunhistochemischen Auswertung wurde mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern gegen Kollagen Typ I die Expression dieses extrazellulären Matrixproteins untersucht. Eine Inkubation mit Levofloxacin alleine über 24 Stunden mit den Konzentrationen 3 und 30 mg/l Medium ergab bei 3 mg/l eine signifikante Verringerung der Kollagen Typ I Menge im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Eine kombinierte Inkubation über 24 Stunden mit Prednisolon (100 µg/l Medium) und zusätzlich 3 oder 30 mg Levofloxacin/l Medium ergab eine signifikante Reduktion der Kollagen Typ I Menge ab einer Levofloxacin-Konzentration von 3 mg/l Medium im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. Zusätzlich zeigte sich eine deutliche Abnahme der Kollagen Typ I Menge im Vergleich zu den Zellen, die mit Levofloxacin alleine inkubiert wurden. Die Langzeitinkubation über 20 Tage zeigte eine signifikant verminderte Expression von Kollagen Typ I bei den Zellen, die nur mit Prednisolon (100 µg/l Medium) inkubiert worden waren, im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben. Die Zellen, die zusätzlich mit Levofloxacin über 24 Stunden in Konzentrationen von 3 und 30 mg/l Medium

inkubiert wurden, zeigten eine signifikante Kollagenreduktion ab einer Levofloxacin-Konzentration von 3 mg/l Medium.

Simonin und Mitarbeiter haben gezeigt, dass Pefloxacin oxidativen Stress, Veränderung im Proteoglykanmetabolismus sowie eine Oxidation von Kollagen auf Achillessehnenzellen von Nagern auslösen kann (Simonin et al., 2000). Hier zeigten sich nach einmaliger Applikation von Pefloxacin deutliche Veränderungen in dem Proteoglykanmetabolismus. Nach längerer Applikation konnten oxidative Schädigungen des Kollagen Typ I beobachtet werden.

Williams und Kollegen konnten eine durch Ciprofloxacin verursachte Abnahme der Synthese von Proteoglykanen, Kollagen und der Zellproliferation bei Achillessehnenzellen von Kaninchen feststellen (Williams et al., 2000).

Sendzik und Mitarbeiter zeigten auch, dass Ciprofloxacin einen deutlich stärkeren und schnelleren Effekt auf die Kollagensynthese zu haben scheint als Levofloxacin (Sendzik et al., 2005). In dieser Arbeit wurde durch die semiquantitative Auswertung immunhistochemischer Färbungen eine signifikante Reduktion in der Kollagen Typ I Menge nach einer Inkubation mit 3 mg Levofloxacin/l Medium über 24 Stunden im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen festgestellt. 30 mg Levofloxacin/l Medium zeigten eine deutliche Verstärkung dieses Effektes.

2010 untersuchten Sendzik und Mitarbeiter die Wirkung von Ciprofloxacin und Dexamethason auf humane Tenozyten. Hier wurde (bei Konzentrationen, die während einer Therapie im Serum erreicht werden) eine signifikante Abnahme von Kollagen Typ I und beta (1)-Integrin Rezeptor beobachtet. In Korrelation mit den vorgelegten Ergebnissen zeigte sich in der Arbeit von Sendzik eine Aktivierung der Caspase 3 nach Inkubation mit Ciprofloxacin und Levofloxacin, zusätzlich wurden bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen apoptotische Veränderungen dargestellt (Sendzik et al., 2010).

Die Ergebnisse nach der semiquantitativen Bildanalyse der immunhistochemischen Färbungen bestätigen die Resultate der Annexin V Färbung. Nach einer Inkubation über 24 Stunden mit dem Fluorchinolon Levofloxacin in Kombination mit dem Glukokortikoid Prednisolon zeigte sich eine konzentrationsabhängige Abnahme der Kollagen Typ-I Produktion im Vergleich zu den Kontrollzellen ab einer Konzentration von 3 mg Levofloxacin/l Medium. Eine Kultivierung über 20 Tage mit einem Medium mit 100 µg Prednisolon/l Medium ergab eine zusätzliche Abnahme der Kollagen Typ I Synthese.

4.3 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen die toxischen Effekte des Chinolons Levofloxacin auf humane Tenozyten *in vitro* bereits in Konzentrationen, die während einer Therapie im Blut des Patienten erreicht werden. Diese Effekte wurden bei einer kombinierten Inkubation mit Prednisolon und Levofloxacin verstärkt. Die untersuchten apoptotischen Zeichen in Form von Expression des Phosphatidylserins mit Hilfe von Annexin V Färbung zeigen eine Frühphase der Apoptose, geben aber keine nähere Auskunft über den apoptotischen Signalweg. Um einen besseren Einblick in das Geschehen zu erhalten, müssen weitere Untersuchungen durchgeführt werden. Eventuell könnten hier diverse Caspasen im apoptotischen Signalweg untersucht werden. Um diesen Signalweg zu charakterisieren, könnten Apoptose-Inhibitoren eingesetzt werden. Mit einem tieferen Einblick und Verständnis in das Geschehen könnte man in der Zukunft Wege finden, solche unerwünschten Nebenwirkungen zu umgehen.

4.4 Zusammenfassung

Chinolone sind häufig eingesetzte Substanzen in der antibakteriellen Therapie. Sie werden oft zur Behandlung von Urogenital- und Atemwegsinfektionen angewandt.

Glukokortikoide spielen eine wichtige Rolle in der Therapie vieler Autoimmunerkrankungen wie z.B. des systemischen Lupus erythematodes, des Raynaud Syndroms, der rheumatoiden Arthritis aber auch in der Therapie von Krankheiten wie Asthma bronchiale. Wie jedes Arzneimittel können auch Chinolone und Glukokortikoide zu unerwünschten Wirkungen führen. Eine relativ seltene, dafür aber gemeinsame Nebenwirkung dieser beiden Substanzen ist die Tendopathie. Studien zeigen, dass einige Faktoren wie höheres Alter (>60 Jahre), Glukokortikoid-Therapie und chronische Nierenerkrankungen das Risiko, an einer Chinolon-induzierten Tendopathie zu erkranken, deutlich erhöhen. Diese Arbeit soll zur Aufklärung des Pathomechanismus dieser unerwünschten Wirkung beitragen.

Es wurden Primärkulturen mit humanen Tenozyten, die aus chirurgischen Eingriffen stammen, verwendet. Die Zellen wurden mit dem Chinolon Levofloxacin und dem Glukokortikoid Prednisolon allein und in Kombination behandelt. Im Mittelpunkt dieser Arbeit stand die Untersuchung der Toxizität dieser beiden Substanzen auf humane Tenozyten. Die Apoptose wurde mittels Annexin V Färbung des Phosphatidylserin und durchflusszytometrisch analysiert, als weitere Methode wurde der MTT-Zytotoxizitätstest eingesetzt. Die Zellen wurde außerdem

mittels Durchlichtmikroskopie untersucht. Zudem wurde mit Hilfe von immunhistochemischen Färbungen das Kollagen Typ I als Produkt dieser Zellen nachgewiesen. Die Menge des Kollagens wurde durch Bildanalysen semiquantitativ bestimmt.

Es konnte mit den angewendeten Methoden nachgewiesen werden, dass Levofloxacin alleine und in Kombination mit Prednisolon einen zytotoxischen Effekt auf humane Tenozyten *in vitro* hat. Dieser Effekt zeigt sich bereits in Konzentrationen im Bereich der Plasmakonzentrationen, die während einer Therapie mit den beiden Substanzen erreicht werden.

Die Annexin V Färbung von Phosphatidylserin zeigte eine deutliche Zunahme in der Färbung nach einer Inkubation mit Levofloxacin. Ab einer Konzentration von 1 mg/l Medium zeigte sich im Vergleich zu den unbehandelten Zellen über 24 Stunden eine Signifikanz. Mit aufsteigender Konzentration zeigte sich hier eine Zunahme der Annexin V positiven Zellen. Eine kombinierte Inkubation mit 100 µg Prednisolon/l Medium und Levofloxacin in fünf verschiedenen Konzentrationen (0,3; 1; 3; 10; 30 mg/l Medium) ergab einen signifikanten Unterschied zu den unbehandelten Kontrollzellen schon ab einer Levofloxacin-Konzentration von 0,3 mg/l Medium, eine Konzentration, die deutlich unterhalb der erreichten durchschnittlichen Serumkonzentration während einer Therapie mit Levofloxacin liegt. Obwohl die Annexin V Färbung ein Frühzeichen der Apoptose ist und wenig über den weiteren Verlauf dieses Vorgangs aussagt, korreliert dies mit Ergebnissen, die in anderen Arbeiten vorgelegt worden sind, in denen das aktivierte Caspase-3 mittels Immunoblotting analysiert wurde (Sendzik et al., 2005).

In den darauffolgenden Versuchen wurden die Zellen für 20 und 60 Tage mit einem Medium, welches 100 µg Prednisolon/l Medium beinhaltet, kultiviert und anschließend mit Hilfe von Annexin V Färbung und Durchflusszytometrie analysiert. Diese Versuche ergaben keine Zunahme der Annexin V Färbung, aber die Tendenz und eine Signifikanz in der Färbung ab einer Levofloxacin-Konzentration von 0,3 mg/l Medium im Vergleich zu den unbehandelten Zellen wurde auch hier nachgewiesen. Damit ist es gelungen, mittels Annexin V Färbung einen toxischen Effekt des Chinolons Levofloxacin auf humane Tenozyten nachzuweisen, der in Kombination mit Prednisolon verstärkt wurde.

Der MTT-Zytotoxizitätstest mit Levofloxacin alleine ergab einen signifikanten Effekt gegenüber den unbehandelten Zellen ab einer Konzentration von 3,125 mg Levofloxacin/l Medium mit einer nur gering ausgeprägten konzentrationsabhängigen Verstärkung des Effekts bei höheren

Konzentrationen. Eine kombinierte Inkubation mit Levofloxacin und Prednisolon (100 µg/l Medium) ergab eine Signifikanz im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen erst bei einer Konzentration von 100 mg Levofloxacin/l Medium, bis zu einer Konzentration von 50 mg/l zeigte sich kein Unterschied zur Kontrolle.

Weiter wurde die Kollagen Typ-I-Synthese der Tenozyten nach einer Inkubation mit Levofloxacin alleine und in Kombination mit Prednisolon mittels Immunhistochemie und anschließender Bildanalyse semiquantitativ untersucht. Eine alleinige Inkubation mit Levofloxacin über 24 Stunden zeigte eine deutliche Abnahme der Kollagen Typ I Produktion bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 3 mg Levofloxacin/l Medium im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollzellen. Dieser Effekt wurde nach einer kombinierten Inkubation mit Prednisolon (100 µg/l Medium) deutlich verstärkt. Diese Abnahme der Kollagen Typ I-Synthese wurde zusätzlich an Zellen, die mit einem Medium mit 100 µg Prednisolon/l Medium über 20 Tage kultiviert worden waren, nochmals deutlicher. Es zeigte sich auch, dass Prednisolon alleine über einen Zeitraum von 20 Tagen zu einer verminderten Kollagensynthese führte.

Zusätzliche Versuche wurden mittels Durchlichtmikroskopie durchgeführt. Die humanen Tenozyten wurden mit Levofloxacin alleine und in Kombination inkubiert. Es konnten bei den kurzen Inkubationen keine morphologischen Unterschiede festgestellt werden. Bei den Langzeitinkubationen über 20 Tage mit Prednisolon (100 µg/l Medium) konnten eindeutige morphologische Veränderungen wie Verkürzungen der Zellausläufer und Aufquellungen in den Zellstrukturen beobachtet werden.

Mit Hilfe der hier beschriebenen *in vitro* Untersuchungen an Tenozyten vom Menschen wurde gezeigt, dass ein synergistischer Effekt von Prednisolon und Levofloxacin auf diese Zellen besteht. Die Wirkungen treten bei therapeutisch relevanten Konzentrationen auf. Diese Beobachtungen unterstützen die klinischen Erfahrungen, dass Patienten mit chronischer Glukokortikoidtherapie ein erhöhtes Risiko für Chinolon-induzierte Tendopathien haben. Die *in vitro* Daten sind vor allem deshalb bedeutsam, weil die Kasuistiken in vielen Fällen hinsichtlich des Kausalzusammenhanges nicht eindeutig zu interpretieren sind. Darüber hinaus gestattet das hier weiterentwickelte *in vitro* Modell mit humanen Tenozyten die Untersuchung von anderen Chinolonen bzw. Kombinationen mit anderen Medikamentengruppen und eingehenden mechanistische Studien.

5 Literaturverzeichnis

- Ahmed IM, Lagopoulos M, McConnell P, Soames RW, Sefton GK. Blood supply of the Achilles tendon. *J Orthop Res.* 1998;16:591-6.
- Bailey RR, Kirk JA, Peddie BA. Norfloxacin-induced rheumatic disease. *N Z Med J.* 1983;96:590.
- Benjamin M, Ralphs JR. The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol.* 2000;196:85-130. *Biochim Biophys Acta.* 2003;1641:35-41.
- Braun D, Petitpain N, Cosserat F, Loeuille D, Bitar S, Gillet P, Trechot P. Rupture of multiple tendons after levofloxacin therapy. *Joint Bone Spine.* 2004;71:586-7.
- Budd RC. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *J Clin Invest.* 2002;109:437-41.
- Burkhardt JE, Hill MA, Carlton WW, Kesterson JW. Histologic and histochemical changes in articular cartilages of immature beagle dogs dosed with difloxacin, a fluoroquinolone. *Vet Pathol.* 1990;27:162-70.
- Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;15:1-16.
- Cowan MA, Alexander S. Simultaneous bilateral rupture of Achilles tendons due to triamcinolone. *Br Med J.* 1961;10:1658.
- Czock D, Keller F, Rasche FM, Häussler U. Pharmacokinetics and pharmacodynamics of systemically administered glucocorticoids. *Clin Pharmacokinet.* 2005;44:61-98.
- Dudley MN. Pharmacokinetics of fluoroquinolones. In: Hooper DE, Rubinstein E (eds.). *Quinolone Antimicrobial Agents.* 2003; 3rd Edition. Press Washington DC, p.115-132.

- Förster C, Kociok K, Shakibaei M, Merker HJ, Stahlmann R. Quinolone-induced cartilage lesions are not reversible in rats. *Arch Toxicol.* 1996 a;70:474-81.
- Förster C, Kociok K, Shakibaei M, Merker HJ, Vormann J, Günther T, Stahlmann R. Integrins on joint cartilage chondrocytes and alterations by ofloxacin or magnesium deficiency in immature rats. *Arch Toxicol.* 1996 b;70:261-70.
- Gold L, Igra H. Levofloxacin-induced tendon rupture: a case report and review of the literature. *J Am Board Fam Pract.* 2003;16:458-60.
- Gottschalk AW, Bachmann JW. Death following bilateral complete Achilles tendon rupture in a patient on fluoroquinolone therapy: a case report. *J Med Case Reports.* 2009;6;3:1
- Hayes DW Jr, Gilbertson EK, Mandracchia VJ, Dolphin TF. Tendon pathology in the foot. The use of corticosteroid injection therapy. *Clin Podiatr Med Surg.* 2000;17:723-35.
- Heisig P, Wiedemann B. Wirkung und Resistenzmechanismen der Chinolone: Actio und Reactio. *Pharm Unserer Zeit.* 2001;30:382-93.
- Höffken G, Borner K, Glatzel PD, Koeppe P, Lode H. Reduced enteral absorption of ciprofloxacin in the presence of antacids. *Eur J Clin Microbiol.* 1985;4:345.
- Hollenberg SM, Weinberger C, Ong ES, Cerelli G, Oro A, Lebo R, Thompson EB, Rosenfeld MG, Evans RM. Primary structure and expression of a functional human glucocorticoid receptor cDNA. *Nature.* 1985;318:635-41.
- Hotchkiss R, Strasse A, McDunn J.E, Swansson P.E. Mechanism of Disease, Cell Death. *N Engl J Med* 2009;361:1570-83.
- Jozsa L, Kannus P, Balint JB, Reffy A. Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel).* 1991;142:306-12.

- Kahn F, Christensson B. A rapid development of Achilles tendon rupture following quinolone treatment. *Läkartidningen*. 2004;15;101:190-1.7575
- Kahn MF, Hayem G. Tendons and fluoroquinolones. Unresolved issues. *Rev Rhum Engl Ed*. 1997;64:437-9.
- Kannus P. Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports*. 2000;10:312-20.
- Kao NL, Moy JN, Richmond GW. Achilles tendon rupture: an underrated complication of corticosteroid treatment. *Thorax*. 1991;46:853-4.
- Kashida Y, Kato M. Toxic effects of quinolone antibacterial agents on the musculoskeletal system in juvenile rats. *Toxicol Pathol*. 1997;25:635-43.
- Kato M, Onodera T. Effect of ofloxacin on the uptake of [3H]thymidine by articular cartilage cells in the rat. *Toxicol Lett*. 1988;44:131-42.
- Kato M, Takada S, Ogawara S, Takayama S. Effect of levofloxacin on glycosaminoglycan and DNA synthesis of cultured rabbit chondrocytes at concentrations inducing cartilage lesions in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995;39:1979-83.
- Kempka G, Ahr HJ, Ruther W, Schlüter G. Effects of fluoroquinolones and glucocorticoids on cultivated tendon cells in vitro. *Toxicol In Vitro*. 1996;10:743-754.
- Kotnis RA, Halstead JC, Hormbrey PJ. Atraumatic bilateral Achilles tendon rupture: an association of systemic steroid treatment. *J Accid Emerg Med*. 1999;16:378-9.
- Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest*. 2005;115:2665-72.

- Leshner, GY, Froehlich EJ, Gruett MD, Bailey JH, Brundage R. P. (1962) 1,8-Naphthyridine Derivatives. A New Class of Chemotherapeutic Agents. *J Med Pharm Chem.* 1962;91:1063-5.
- Lode H. Drug interactions with quinolones. *Rev Infect Dis.* 1988;10 (Suppl 1):S132-6
- Lomaestro BM, Bailie GR. Effect of staggered dose of calcium on the bioavailability of ciprofloxacin. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991;35:1004-7.
- Lozo E, Riecke K, Schwabe R, Vormann J, Stahlmann R. Synergistic effect of ofloxacin and magnesium deficiency on joint cartilage in immature rats. 2002;46:1755-9.
- Lüthje P, Nurmi I, Nyysönen T. Missed Achilles tendon rupture due to oral levofloxacin: surgical treatment and result. *Arch Orthop Trauma Surg.* 2005;125:124-6.
- Madsen BL, Noer HH. Simultaneous rupture of both peroneal tendons after corticosteroid injection: operative treatment. *Injury.* 1999;30:299-300.
- Melhus A, Apelqvist J, Larsson J, Eneroth M. Levofloxacin-associated Achilles tendon rupture and tendinopathy. *Scand J Infect Dis.* 2003;35:768-70.
- Morgan J, McCarty DJ. Tendon ruptures in patients with systemic lupus erythematosus treated with corticosteroids. *Arthritis Rheum.* 1974;17:1033-6.
- Murakoshi K, Momohara S, Ikari K, Iwamoto T, Kawamura K, Tomatsu T, Iikuni N, Okamoto H. Neglected spontaneous rupture of the Achilles tendon in patients with systemic lupus erythematosus. *Mod Rheumatol.* 2006;16:324-6.
- Palù G, Valisena S, Ciarrocchi G, Gatto B, Palumbo M. Quinolone binding to DNA is mediated by magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:9671-5.

- Petersen U. The evolution of quinolone: from nalidixic acid to the quinolones of the third generation. *Pharm Unserer Zeit*. 2001;30:376-81.
- Pierfitte C, Royer RJ. Tendon disorders with fluoroquinolones. *Therapie*. 1996;51:419-20
- Pouzaud F, Bernard-Beaubois K, Thevenin M, Warnet JM, Hayem G, Rat P. In vitro discrimination of fluoroquinolones toxicity on tendon cells: involvement of oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004;308:394-402.
- Pratt WB, Silverstein AM, Galigniana MD. A model for the cytoplasmic trafficking of signalling proteins involving the hsp90-binding immunophilins and p50cdc37. *Cell Signal*. 1999;11:839-51.
- Schäfer-Korting M, Kleuser B, Ahmed M, Holtje HD, Korting HC. Glucocorticoids for human skin: new aspects of the mechanism of action. *Skin Pharmacol Physiol*. 2005;18:103-14.
- Scutt N, Rolf CG, Scutt A. Glucocorticoids inhibit tenocyte proliferation and tendon progenitor cell recruitment. *J Orthop Res*. 2006;24:173-82.
- Sendzik J, Shakibaei M, Schäfer-Korting M, Stahlmann R. Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix, signalling proteins, metalloproteinases and caspase-3 in cultured human tendon cells. *Toxicology*. 2005;212:24-36.
- Sendzik J, Shakibaei M, Schäfer-Korting M, Stahlmann R. Synergistic effects of dexamethasone and quinolones on human derived tendon cells. *Int J Antimicrob Agents*. 2010;35:366-74
- Shakibaei M, John T, De Souza P, Rahmanzadeh R, Merker HJ. Signal transduction by beta1 integrin receptors in human chondrocytes in vitro: collaboration with the insulin-like growth factor-I receptor. *Biochem J*. 1999;15:615-23.
- Shakibaei M, Merker HJ. Beta1-integrins in the cartilage matrix. *Cell Tissue Res*. 1999;296:565-73.

- Shakibaei M, Schulze-Tanzil G, de Souza P, John T, Rahmanzadeh M, Rahmanzadeh R, Merker HJ. Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase induces apoptosis of human chondrocytes. *J Biol Chem.* 2001;276:13289-94.
- Shen LL, Baranowski J, Pernet AG. Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: specificity and cooperativity of drug binding to DNA. *Biochemistry.* 1989;28:3879-85.
- Simonin MA, Gegout-Pottie P, Minn A, Gillet P, Netter P, Terlain B. Pefloxacin-induced achilles tendon toxicity in rodents: biochemical changes in proteoglycan synthesis and oxidative damage to collagen. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000;44:867-72.
- Smaill GB. Bilateral rupture of Achilles tendons. *Brit Med J.* 1961;1:1958
- Sode J, Obel N, Hallas J, Lassen A. Use of fluroquinolone and risk of Achilles tendon rupture: a population-based cohort study. *Eur J Clin Pharmacol.* 2007;63:499-503.
- Stahlmann R, Deppermann K, Schulz-Schalge T, Lode H. Klinisch relevante Arzneimittel-Interaktionen während einer Behandlung mit Chinolonen. *Chemoth J.* 1992;1:7-10
- Stahlmann R, Förster C, Shakibaei M, Vormann J, Günther T, Merker HJ. Magnesium deficiency induces joint cartilage lesions in juvenile rats which are identical to quinolone-induced arthropathy. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995;39:2013-8.
- Stahlmann R, Förster C, Van Sickle D. Quinolones in children. Are concerns over arthropathy justified? *Drug Saf.* 1993;9:397-403.
- Stahlmann R, Kühner S, Shakibaei M, Schwabe R, Flores J, Evander SA, van Sickle DC. Chondrotoxicity of ciprofloxacin in immature beagle dogs: immunohistochemistry, electron microscopy and drug plasma concentrations. *Arch Toxicol.* 2000;73:564-72.

Stahlmann R, Lode H. Safety overview. Toxicity, adverse effect, and drug interactions. In: Andiole V (ed). The Quinolones. 2000; London GB Academic Press. Third Edition p. 397-453

Stahlmann R, Lode H. Toxicity of quinolones. *Drugs*. 1999;58 (Suppl 2):37-42.

Stahlmann R, Merker HJ, Hinz N, Chahoud I, Webb J, Heger W, Neubert D. Ofloxacin in juvenile non-human primates and rats. Arthropathia and drug plasma concentrations. *Arch Toxicol*. 1990;64:193-204.

Takahata M, Mitsuyama J, Yamashiro Y, Yonezawa M, Araki H, Todo Y, Minami S, Watanabe Y, Narita H. In vitro and in vivo antimicrobial activities of T-3811ME, a novel des-F(6)-quinolone. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999;43:1077-84.

Torricelli P, Fini M, Giavaresi G, Carpi A, Nicolini A, Giardino R. Effects of systemic glucocorticoid administration on tenocytes. *Biomed Pharmacother*. 2006;60:380-5.

van der Linden PD, Sturkenboom MC, Herings RM, Leufkens HM, Rowlands S, Stricker BH. Increased risk of achilles tendon rupture with quinolone antibacterial use, especially in elderly patients taking oral corticosteroids. *Arch Intern Med*. 2003;163:1801-7.

van der Linden PD, Sturkenboom MC, Herings RM, Leufkens HM, Rowlands S, Stricker BH. Increased risk of achilles tendon rupture with quinolone antibacterial use, especially in elderly patients taking oral corticosteroids. *BMJ*. 2002;324:1306-7.

van der Linden PD, van de Lei J, Nab HW, Knol A, Stricker BH. Achilles tendinitis associated with fluoroquinolones. *Br J Clin Pharmacol*. 1999;48:433-7.

van der Linden PD, van Puijenbroek EP, Feenstra J, Veld BA, Sturkenboom MC, Herings RM, Leufkens HG, Stricker BH. Tendon disorders attributed to fluoroquinolones: a study on 42 spontaneous reports in the period 1988 to 1998. *Arthritis Rheum*. 2001;45:235-9.

Von Keutz, Christ W. Toxicology and safety pharmacology of quinolones. 1998. In: Kuhlmann J, Dalhoff A, Zeiler H-J (eds.). Handbook of Experimental Pharmacology. Quinolone Antibacterials. 1998; Volume 127. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York, pp. 297-337.

Wigley DB. Structure and mechanism of DNA topoisomerases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct.* 1995;24:185-208.

Williams RJ 3rd, Attia E, Wickiewicz TL, Hannafin JA. The effect of ciprofloxacin on tendon, paratenon, and capsular fibroblast metabolism. *Am J Sports Med.* 2000;28:364-9.

Wong MW, Tang YN, Fu SC, Lee KM, Chan KM. Triamcinolone suppresses human tenocyte cellular activity and collagen synthesis. *Clin Orthop Relat Res.* 2004;277-81.

Yuan J, Murrell GA, Trickett A, Wang MX. Involvement of cytochrome c release and caspase-3 activation in the oxidative stress-induced apoptosis in human tendon fibroblasts.

Selbständigkeitserklärung

„Ich“, (Anders Fagh), erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema „**Wirkungen von Levofloxacin und Prednisolon alleine und in Kombination auf humane Tenoyzten *in vitro***“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeitendargetellt habe.“

Lebenslauf

"Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht."

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ralf Stahlmann danke ich für die Überlassung des Themas der vorliegenden Arbeit, insbesondere für die freundliche und hervorragende Zusammenarbeit und Betreuung sowie die finanzielle Unterstützung; Frau. Dr. rer. nat. Judith Sendzik für ihre Hilfsbereitschaft und wertvollen Tipps bei der Versuchsdurchführung; Frau Irmela Baumann-Wilschke für die tatkräftige Unterstützung und Beratung während der Durchführung des praktischen Arbeitsteils im Labor.

Frau Christine Gericke danke ich für die Erstellung der statistischen Analyse sowie für die stetige Bereitschaft zur Beantwortung von Fragen.

Herrn Jessie Webb möchte ich meinen Dank aussprechen für die hervorragende Unterstützung bei der Durchflusszytometrie, und allen nicht namentlich genannten Mitgliedern der Arbeitsgruppe Stahlmann für die freundliche Aufnahme in das Team und das gute Arbeitsklima.

Schließlich danke ich Meinen Eltern für die liebevolle Nachsicht und Geduld sowie für die großzügige Unterstützung meiner Ausbildung.