

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

DISSERTATION

**Einfluss von Ciprofloxacin und verschiedenen Hämofiltrat-  
Fraktionen vom Patienten mit chronischer Nierenerkrankung  
auf Tenozyten des Menschen *in vitro***

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

**Mona Askar (geb. Poorbiazar)**

aus Berlin

Gutachter: 1. : Prof. Dr. med. R. Stahlmann  
2. : Prof. Dr. med. A. Jörres  
3. : Prof. Dr. med. H. Lode

Datum der Promotion: 19.11.2010

<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Chinolone</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Überblick und Systematisierung .....	1
1.1.2 Wirkmechanismus und pharmakokinetische Aspekte.....	2
1.1.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen .....	3
1.1.4 Wechselwirkungen.....	4
1.1.5 Unerwünschte Wirkungen und Kontraindikationen.....	5
1.1.6 Ciprofloxacin.....	6
<b>1.2 Sehne</b> .....	<b>8</b>
1.2.2 Sehnenzelle .....	8
1.2.3 Extrazelluläre Matrix .....	9
1.2.4 Tendopathien.....	11
1.2.5 Chinolon-induzierte Tendopathien.....	12
<b>1.3 Niere</b> .....	<b>19</b>
1.3.1 Aufgaben der Niere .....	19
1.3.2 Chronische Nierenerkrankung, Niereninsuffizienz und Einschränkung der Nierenfunktion	21
1.3.3 Ursachen der chronischen Nierenerkrankung .....	23
1.3.4 Nierenersatzverfahren .....	24
1.3.5 Prinzip der Hämofiltration .....	25
1.3.5 Hämofiltrat und die Verwendung als Blutplasmaäquivalent .....	26
<b>2 Fragestellung und Zielsetzung</b> .....	<b>28</b>
<b>3 Material und Methoden</b> .....	<b>30</b>
<b>3.1 Material</b> .....	<b>30</b>
3.1.1 Geräte .....	30
3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien.....	31
3.1.3 Antikörper .....	33
3.1.4 Kulturmedien und Lösungen.....	33
3.1.4.1 Medien .....	33
3.1.4.2 Lösungen.....	34
<b>3.2 Methoden</b> .....	<b>38</b>
3.2.1 Tenozyten Zellkultur .....	38
3.2.1.1 Gewinnung und Kultivierung von menschlichen Sehnenzellen.....	38
3.2.1.2 Zellpassagierung .....	38

3.2.1.3 Einfrieren von Sehnenzellen .....	39
3.2.1.4 Auftauen von Sehnenzellen.....	39
3.2.1.5 Zellzahlbestimmung.....	40
3.2.2 Hämofiltrat (HF) .....	40
3.2.2.1 Gewinnung des Hämofiltrats (HF).....	40
3.2.2.2 Biochemische Aufbereitung des Ultrafiltrats (UF) .....	40
3.2.3 Versuchsaufbau für die Inkubation mit Testsubstanzen.....	42
3.2.4 Lichtmikroskopie .....	44
<b>3.3 Immunhistochemische und biochemische Untersuchungen .....</b>	<b>44</b>
3.3.1 Immunhistochemie .....	44
3.3.1.1 Cytospin .....	44
3.3.1.2 Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung .....	45
3.3.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting.....	46
3.3.2.1 Probenvorbereitung.....	47
3.3.2.2 SDS-Gelelektrophorese.....	48
3.3.2.3 Western Blot .....	48
3.3.2.4 Densitometrische und statistische Auswertung.....	49
<b>4 Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1 Lichtmikroskopie .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2 Immunhistochemie.....</b>	<b>52</b>
4.2.1 Einfluss von Ultrafiltrat auf humane Tenozyten <i>in vitro</i> .....	52
4.2.2 Einfluss von Ciprofloxacin auf humane Tenozyten <i>in vitro</i> .....	59
4.2.3 Einfluss von Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40 auf humane Tenozyten <i>in vitro</i> .....	65
<b>4.3 Western Blot.....</b>	<b>71</b>
<b>5 Diskussion.....</b>	<b>73</b>
5.1 Chinolon-induzierte Effekte auf Tenozyten <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	77
5.2 Effekte von Ultrafiltrat auf Tenozyten <i>in vitro</i> .....	80
5.3 Effekte einer kombinierten Exposition mit Ciprofloxacin und Ultrafiltrat auf Tenozyten <i>in vitro</i> .....	82
5.4 Ausblick .....	83
<b>6 Zusammenfassung.....</b>	<b>84</b>
<b>7 Literaturverzeichnis.....</b>	<b>86</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Chinolone.....	3
Abbildung 2: Strukturformel von Ciprofloxacin.....	6
Abbildung 3: Sehnenzellen vom Menschen <i>in vitro</i> .....	9
Abbildung 4: MRT-Aufnahme des linken Fußknöchels einer 81 jährigen Patientin.....	13
Abbildung 5: Prinzip der Hämofiltration .....	25
Abbildung 6: Aufbereitung des Hämofiltrats in verschiedenen Ultrafiltrat-Fractionen .....	41
Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahme humaner Tenozyten .....	51
Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Tenozyten: Immunhistochemisch mit Collagen Typ I-Antikörpern behandelt. Effekt einer 24 h und 72 h Inkubation mit Ultrafiltrat .....	54
Abbildung 9: Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Collagen Typ I in humanen Tenozyten: Effekt einer 24 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ultrafiltrat.....	58
Abbildung 10: Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Collagen Typ I in humanen Tenozyten: Effekt einer 72 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ultrafiltrat.....	58
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch mit Collagen-Typ-I-Antikörpern behandelte humaner Tenozyten. Effekt einer 24 h und 72 h Inkubation mit Ciprofloxacin .....	60
Abbildung 12: Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Collagen Typ I in humanen Tenozyten: Effekt einer 24 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ciprofloxacin.....	64
Abbildung 13: Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Collagen Typ I in humanen Tenozyten: Effekt einer 72 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ciprofloxacin.....	64
Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch mit Collagen-Typ-I-Antikörpern behandelte humaner Tenozyten. Effekt einer 72 h Inkubation mit Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40.....	66
Abbildung 15: Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Collagen Typ I in humanen Tenozyten: Effekt einer 72 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40 .....	68
Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch mit Fibronectin-Antikörpern behandelte humaner Tenozyten. Effekt einer 72 h Inkubation mit Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40.....	69

Abbildung 17: Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Fibronectin in humanen Tenozyten: Effekt einer 72 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40 ..... 71

Abbildung 18: Western Blot: Effekt einer 24 h und 72 h Inkubation von humanen Sehnenzellen mit Ultrafiltrat ..... 72

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Einteilung der Fluorchinolone nach der Paul-Ehrlich-Gesellschaft.....	2
Tabelle 2: Tagesdosierungen Ciprofloxacin .....	7
Tabelle 3: Klassifikation der Tendopathie .....	12
Tabelle 4: Mögliche prädisponierende Risikofaktoren für die Entstehung von Tendopathien	17
Tabelle 5: Definition der chronischen Nierenerkrankung.....	22
Tabelle 6: Einteilung der chronischen Nierenerkrankungen.....	23

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ANOVA	Analysis of variance = Varianzanalyse
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Aqua destillata = destilliertes Wasser
BSA	bovines Serumalbumin
C	Celsius
Ca	Calcium
Cl	Chlorid
Cu	Kupfer
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EZM	extrazelluläre Sehnenmatrix
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GAR	goat anti rabbit
GAM	goat anti mouse
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
$\mu\text{g}$	Mikrogramm
h	Stunde(n)
HF	Hämofiltrat
KI	Konfidenzintervall
$\mu\text{l}$	Mikroliter
l	Liter
$\mu\text{m}$	Mikrometer
$\text{m}^2$	Quadratmeter
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase = Mitogen aktivierte Proteinkinase
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
M	Mol
mg	Milligramm
Mg	Magnesium

min	Minute(n)
mm	Millimeter
MRT	Magnetresonanztomographie
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
NO	Stickstoffmonoxid
OR	Odds-Ratio
PBS	Phosphate Buffered Saline
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
rER	raues endoplasmatisches Retikulum
TEMED	Tetramethyldiamin
UF	Ultrafiltrat
ZNS	zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Chinolone

### 1.1.1 Überblick und Systematisierung

Chinolone stellen eine synthetisch hergestellte Wirkstoffklasse antibakteriell wirksamer Chemotherapeutika dar, deren Ausgangssubstanz die 1962 entdeckte Nalidixinsäure ist (Leshner et al., 1962). Aufgrund ihres hemmenden Effektes auf die bakterielle Topoisomerase II (DNA-Gyrase) wurden Chinolone früher auch als Gyrasehemmer bezeichnet. Da aber insbesondere neuere Derivate auch auf andere bakterielle Enzyme (Topoisomerase IV) wirken, wird diese Nomenklatur heute nicht mehr empfohlen (Stahlmann and Lode, 2008).

Gegenüber gramnegativen Bakterien hatte die Nalidixinsäure nur eine relativ schwache Wirkung, was die Indikation bei der Therapie der Harnwegsinfektion nur auf unkomplizierte Infektionen einschränkte (Leshner et al., 1962). Außerdem war dieser erste Substanzklassenvertreter nur eingeschränkt bioverfügbar. Heute ist Nalidixinsäure obsolet.

Erst verschiedene Substituierungen, insbesondere das Einbringen eines Fluoratoms in Position 6 sowie eines Piperazinrings in Position 7 brachten eine deutliche Verbesserung der Wirksamkeit auf ein breites Bakterienspektrum, welches auch grampositive Erreger sowie *Pseudomonas aeruginosa* umfasst. Auch die Pharmakokinetik konnte günstig beeinflusst werden, sie zeichnet sich vor allem durch eine schnelle Resorption und gute Gewebegängigkeit aus.

Chinolone, die einen 6-Fluorsubstituenten aufweisen, werden auch als Fluorchinolone bezeichnet. Hierzu gehören beispielsweise Ciprofloxacin und Levofloxacin.

Weitere Veränderungen des zyklischenamins in Position 7 führten zu einem weiteren Vertreter der Fluorchinolone: Moxifloxacin weist eine verbesserte antibakterielle Wirksamkeit gegen grampositive und atypische Erreger sowie Anaerobier auf. Aufgrund des breiten Wirkungsspektrums umfasst das Indikationsgebiet neben der Therapie der Harnwegsinfektionen auch den Einsatz bei Atemwegs- (vor allem Levofloxacin und Moxifloxacin), Weichteil- und Knocheninfektionen, Infektionen der Haut, der Augen und der Geschlechtsorgane sowie die Behandlung der Sepsis. Anhand ihres antibakteriellen Spektrums werden die Chinolone von der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapeutika in vier Gruppen eingeteilt (Tabelle 1).

**Tabelle 1: Einteilung der Fluorchinolone nach der Paul-Ehrlich-Gesellschaft für Chemotherapeutika, modifiziert nach (Naber and Adam, 1998)**

Gruppe	Spektrum	Vertreter
I	Orale Fluorchinolone mit eingeschränkter Indikation, vor allem bei Harnwegsinfektionen	<b>Norfloxacin</b>
II	Oral und systemisch anwendbare Fluorchinolone mit breitem Spektrum und großem Indikationsgebiet	<b>Ciprofloxacin Ofloxacin Enoxacin</b>
III	Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und atypische Erreger	<b>Levofloxacin</b>
IV	Fluorchinolone mit verbesserter Aktivität gegen grampositive und atypische Erreger sowie gegen Anaerobier	<b>Moxifloxacin</b>

### 1.1.2 Wirkmechanismus und pharmakokinetische Aspekte

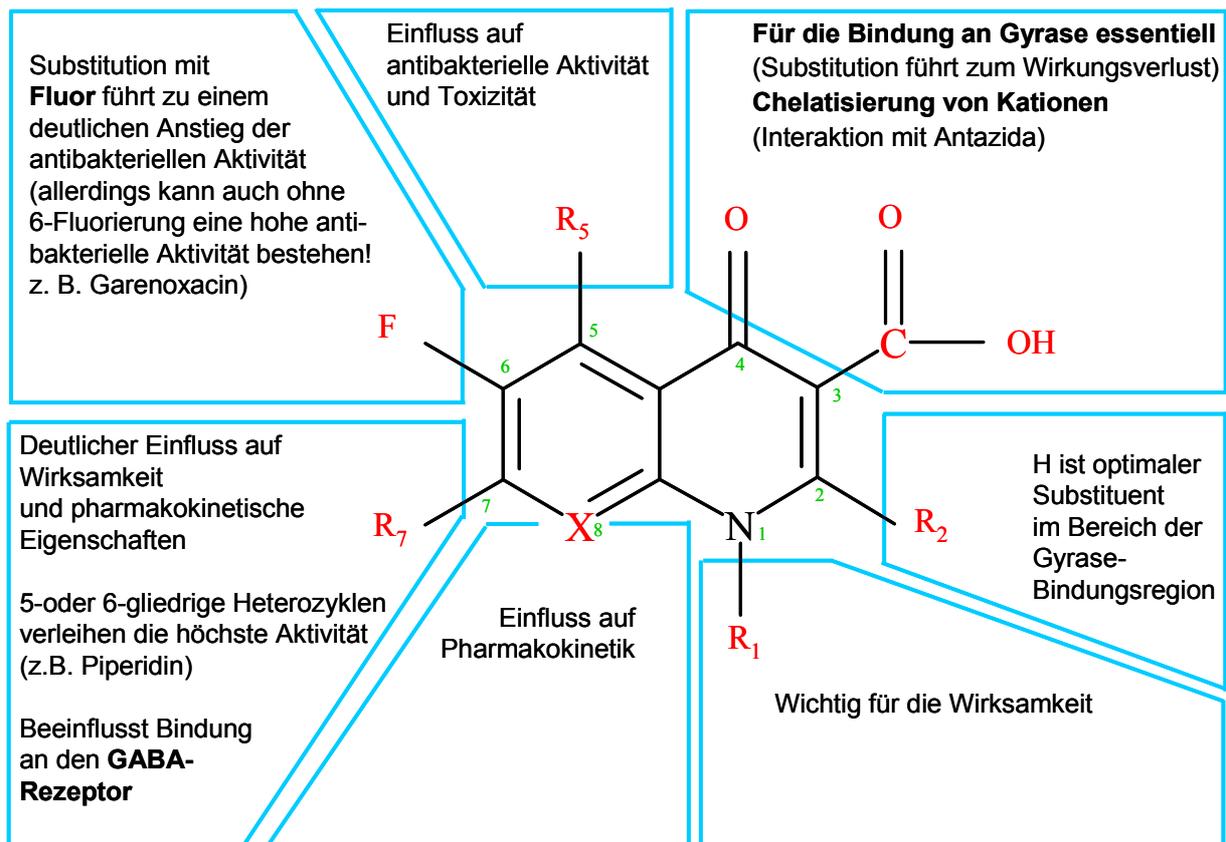
Chinolone erreichen ihre bakterizide Wirkung durch Angriff auf die bakteriellen Topoisomerasen. Substanzabhängig liegt der Hauptangriffsort primär auf der Topoisomerase II (DNA-Gyrase) oder der Topoisomerase IV. Diese beiden Enzyme sind essentiell für die Struktur und Funktion der bakteriellen DNA. Das bakterielle Chromosom besteht aus einer zirkulären doppelsträngigen DNA-Helix, die mit ca. 1300  $\mu\text{m}$  etwa 1000fach länger ist als das Bakterium. Um dieses Platzproblem zu lösen, muss die DNA-Helix sehr eng und funktionell günstig gefaltet werden. Diese Aufgabe übernimmt die Topoisomerase II, indem die DNA zu Schleifen gefaltet und gleichzeitig spiralig verdrillt (supercoils) wird. Aber auch die Entspiralisierung von DNA-Abschnitten, die die Voraussetzung für die Replikations-, Transkriptionsvorgänge und DNA-Synthese ist, erfolgt durch dieses bakterielle Enzym (Heisig and Wiedemann, 2001). Zusammen mit anderen Topoisomerasen liegt die Funktion der Topoisomerase IV in der bakteriellen DNA-Synthese, bei der sie für die Trennung zweier verbundener DNA-Moleküle nach der Replikation (Decatenierung) notwendig ist. Fluorchinolonen werden darüber hinaus noch weitere, bisher nicht im Detail geklärte Wirkmechanismen zugeschrieben.

Chinolone gelangen mittels Diffusion in die Bakterienzelle, dort erfolgt die Bindung an den Gyrase Komplex. Voraussetzung für diese Komplexbildung scheint die Beteiligung von Magnesiumionen zu sein (Palu et al., 1992). Der Bindungsmechanismus könnte über Wasser-

stoffbrückenbindungen (Shen et al., 1989) oder auch Magnesiumbrücken (Palu et al., 1992) zustande kommen. Der Einfluss auf die bakteriellen Topoisomerasen, der Polymerisationsreaktionen (Replikation, Transkription) sowie die erforderliche räumliche Anordnung des DNA-Doppelstranges verhindert, erklärt die rasch einsetzende konzentrationsabhängige bakterizide Wirkung der Chinolone.

Die verfügbaren Chinolone werden nach oraler Einnahme rasch resorbiert und über die Niere (z.B. Levofloxacin) oder über die Leber (z.B. Moxifloxacin) eliminiert. Eine charakteristische pharmakokinetische Eigenschaft der Chinolone ist das hohe Verteilungsvolumen, welches auf eine hohe Gewebegängigkeit und intrazelluläre Anreicherung hindeutet. Dies erklärt auch den Einsatz bei Infektionen von schwer erreichbaren Kompartimenten sowie intrazellulären Erregern (z.B. Chlamydien).

### 1.1.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen



**Abbildung 1: Struktur-Wirkungs-Beziehungen der Chinolone (modifiziert nach Domagala, 1994)**

Chinolone sind Substanzen, die als gemeinsame Grundstruktur ein Chinolinringsystem aufweisen. Substituierungen und Derivate dieses Grundgerüsts führten zu Substanzen, die sich

hinsichtlich ihrer gewünschten antibakteriellen Wirkung, Pharmakokinetik sowie unerwünschter Arzneimittelwirkungen unterscheiden.

Besondere Bedeutung kommt der Carboxygruppe in Position 3 und der benachbarten Oxygruppe in Position 4 zu. Diese Strukturmerkmale sind essentiell für die Bindung an den DNA-Gyrase Komplex und somit für die bakterizide Wirksamkeit verantwortlich. Außerdem kommt es über diese funktionellen Gruppen auch zu den chelatbildenden Eigenschaften von zwei- und dreiwertigen Kationen. Sie sind daher auch von großer Bedeutung für Wechselwirkungen dieser Substanzklasse (Stahlmann and Lode, 1999).

Das Einfügen eines Fluoratoms in 6-Stellung führte zu einer deutlichen Aktivitätssteigerung der antibakteriellen Wirkung (10-100fach). Vertreter dieser Gruppe werden als Fluorchinolone bezeichnet. Eine hohe antibakterielle Aktivität kann jedoch auch ohne diese Substitution bestehen (Barry et al., 2001, Takahata et al., 1999).

Eine Substitution in Position 8 kann zwar die Bioverfügbarkeit sowie die Aktivität gegenüber Anaerobiern verbessern, sie erhöht aber auch das phototoxische Potential der Substanz, was zum Ausschluss entsprechender Chinolone (z.B. Sparfloxacin, Fleroxacin) aus dem Handel geführt hat.

### **1.1.4 Wechselwirkungen**

Die Affinität der Chinolone, mit Kationen Komplexbindungen einzugehen, erklärt auch die Wechselwirkung bei gleichzeitiger Einnahme mit magnesium-, aluminium-, eisen-, calcium- oder zinkhaltigen Medikamenten (z.B. ionische Antacida), die zu einer deutlichen Resorptionsminderung und damit auch zum Verlust der antibakteriellen Wirksamkeit der Chinolone führen (Stahlmann and Lode, 2000, Stahlmann and Lode, 2008).

Eine weitere wichtige Interaktion einiger Chinolone, wie z.B. Enoxacin, Pefloxacin oder im geringen Maße Ciprofloxacin, ist der hemmende Einfluss auf den Metabolismus einiger Arzneimittel, die über Cytochrom P450 1A2 verstoffwechselt werden. Eine therapeutische Relevanz hat diese Wechselwirkung insbesondere bei Medikamenten, die nur eine geringe therapeutische Breite aufweisen. Ein Beispiel hierfür ist Theophyllin, es kann bei gleichzeitiger Chinolon-Therapie vermehrt zu unerwünschten Wirkungen kommen, da der Wirkstoffspiegel des Theophyllins ansteigt (Kinzig-Schippers et al., 1999, Stahlmann et al., 1992). Bei Kombination mit steroidal und nicht-steroidal Antiphlogistika wurden häufiger Übererregbarkeitsreaktionen bis hin zu Krämpfen beobachtet (Stahlmann and Lode, 2008).

### 1.1.5 Unerwünschte Wirkungen und Kontraindikationen

Mit Symptomen wie Übelkeit, Appetitlosigkeit und Erbrechen stellen gastrointestinale Störungen die häufigsten unerwünschten Wirkungen der Chinolone dar. Diarrhöen sind hingegen im Vergleich zu anderen antibakteriellen Substanzen relativ selten (Stahlmann and Lode, 2008). Die Einnahme von Chinolonen kann des Weiteren zu Störungen des Nervensystems führen, die sich in Form von erhöhter Erregbarkeit, Schwindel, Benommenheit und Schlafstörungen äußern. Aber auch schwere neurotoxische Symptome wie Verwirrtheit, Halluzinationen, Krampfanfälle bis hin zu psychotischen Zuständen wurden in seltenen Fällen beobachtet (Stahlmann and Lode, 2000, Stahlmann and Lode, 2008). Bisher konnte man den Wirkungen auf das zentrale Nervensystem (ZNS) zwar eine Dosisabhängigkeit nachweisen (Bowie et al., 1989), der ursächlich zugrunde liegende Mechanismus für dieses neurotoxische Potential konnte bisher jedoch noch nicht geklärt werden. Diskutiert werden Rezeptorinteraktionen an den GABA- oder NMDA-Rezeptoren im ZNS. Das neurotoxische Potential bedingt die Kontraindikation von Chinolonen für Patienten mit zentralnervöser Vorschädigung oder bekannter Krampfbereitschaft (Stahlmann and Lode, 2008).

In seltenen Fällen kann es zu einer allergischen Reaktion mit vaskulitisch-allergischen Erscheinungen und Ödembildung kommen. Aufgrund der Labilität einiger Fluorchinolone (v.a. Fleroxacin) im UV-Licht mit daraus folgender Radikalbildung kann es dosisabhängig zu phototoxischen Reaktionen kommen. Eine direkte Exposition mit UV-Licht (Solarium, Höhensonne) sollte daher vermieden werden (Stahlmann and Lode, 2000). In sehr seltenen Fällen kann es zu Störungen der Hämatopoese bis zur Agranulozytose kommen (Stahlmann and Lode, 2008).

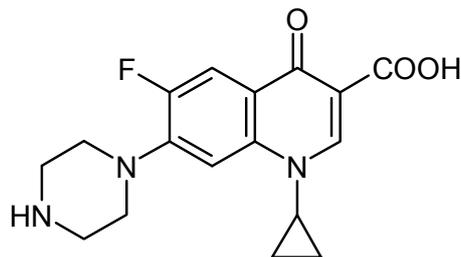
Des Weiteren konnte ein gewisses cardiotoxisches Potential in Form von unterschiedlich stark ausgeprägten QT-Verlängerungen beobachtet werden. Dieser Effekt auf das Reizleitungssystem ist dosisabhängig und nur für einige Chinolone (z.B. Sparfloxacin, nicht mehr im Handel) von direkter therapeutischer Relevanz. Vor allem bei gleichzeitiger Einnahme von Substanzen mit ähnlicher Wirkung, ausgeprägten Elektrolytstörungen oder angeborenen Störungen des Reizleitungssystems (z.B. Kaliummangel, Long-QT-Syndrome) kann es zu potentiell tödlichen Arrhythmien kommen (Torsades de pointes). Bei Vorliegen entsprechender Risikofaktoren sind Chinolone daher kontraindiziert (Rubinstein and Camm, 2002).

Von besonderem Interesse sind die unerwünschten Wirkungen der Chinolone auf das Bindegewebe in Form von Gelenkschädigungen (Arthropathien), irreversiblen Veränderungen der Epiphysenfuge bei juvenilen Tieren sowie Chinolon-induzierten Tendopathien. Das gelenkschädigende Potential der Chinolone wurde bereits 1977 beschrieben (Ingham and Brentnall,

1977). Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen folgten und konnten die chondrotoxische Wirkung von Chinolonen insbesondere auf unreifen juvenilen Gelenkknorpel nachweisen (Kato and Onodera, 1988a, Kato and Onodera, 1988c, Kato and Onodera, 1988b, Kato et al., 1995b, Burkhardt et al., 1990, Stahlmann et al., 1990, Förster et al., 1996). Zudem konnten im Tierexperiment für die Substanzen Ofloxacin und Trovafloxacin Veränderungen an der Epiphysenfuge von juvenilen Ratten mit daraus resultierenden irreversiblen Wachstumsstörungen festgestellt werden (Stahlmann and Lode, 2000).

Da diese gravierenden Nebenwirkungen insbesondere bei juvenilen Tieren beobachtet wurden, besteht für alle Chinolone eine Kontraindikation bei Kindern, Jugendlichen, Schwangeren und stillenden Patientinnen. Nur in ausgewählten Einzelfällen, wie z.B. der Behandlung von Kindern mit Mukoviszidose (cystischer Fibrose) im Alter von 5 bis 18 Jahren, kann nach sorgfältiger Abwägung eine antibakterielle Therapie mit Chinolonen indiziert sein.

### 1.1.6 Ciprofloxacin



**Abbildung 2: Strukturformel von Ciprofloxacin**

Ciprofloxacin ist ein 4-Chinolon, das zur Gruppe der Fluorchinolone gehört. Es wurde von der Bayer AG entwickelt und 1986 in den Markt eingeführt. Ciprofloxacin zeichnet sich durch ein breites Wirkspektrum mit Aktivität gegen Keime wie *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* und Enterobakterien aus, die infolge von Resistenzentwicklung meist nicht mehr mit Standardantibiotika behandelbar sind. Desweiteren wirkt es auch gegen intrazelluläre Erreger wie Legionellen und kann oral sowie parenteral eingesetzt werden. Aufgrund dieser Eigenschaften ist Ciprofloxacin der wichtigste Vertreter der Gruppe-II-Chinolone (Stahlmann and Lode, 2008).

Aufgrund der guten Aktivität gegen gramnegative Erreger insbesondere aber gegen Pseudomonaden und Enterobacter sowie der etwas geringeren Wirkung gegen grampositive Erreger erklärt sich das breite Indikationsgebiet von Ciprofloxacin. Dieses umfasst neben komplizier-

ten Harnwegs- und Atemwegsinfektionen (nicht Pneumokokken) auch gastrointestinale, genitale, Haut- und Weichteilinfektionen sowie Sepsis (nach Bakterienresistogramm). Gerade aufgrund der guten Wirksamkeit gegen Keime, welche infolge von Resistenzentwicklungen nicht mehr mit Standardantibiotika therapierbar sind und den Einsatz von Reserveantibiotika erfordern, sollte im Hinblick auf eine weitere Resistenzentwicklung jeder Einsatz kritisch erfolgen.

Eine übliche Dosierung abhängig vom Krankheitsbild ist die orale Einnahme von 2 x 250 mg oder 2 x 500 mg/Tag (Tabelle 2). Nach oraler Gabe einer Einzeldosis von 250 mg kann man mit einer Spitzenkonzentration von 1,7 mg/l im Plasma rechnen. Bei höheren Dosierungen und Patienten mit Grunderkrankungen können die maximalen Plasmakonzentrationen jedoch auch viel höher liegen. Nach intravenöser Gabe von 2 x 400 mg Ciprofloxacin wurden Spitzenkonzentrationen zwischen 2,2 und 18 mg/l gemessen (van Zanten et al., 2008).

Die Substanz weist eine günstige Pharmakokinetik mit rascher Resorption und einer Bioverfügbarkeit von 70% auf (Stahlmann and Lode, 2008). Die Ausscheidung erfolgt zu 40-60% renal, zu einem geringen Teil biliär (1-5%) sowie transintestinal (15%).

Von großem Vorteil ist, dass Ciprofloxacin zur oralen sowie zur parenteralen Verabreichung zur Verfügung steht und somit bei einer schweren Infektion von einer initial parenteralen zu einer oralen Therapie übergegangen werden kann. Aufgrund des häufigen Einsatzes in Klinik und Praxis wurde für die Untersuchungen in dieser Arbeit Ciprofloxacin als Modellsubstanz verwendet.

**Tabelle 2: Tagesdosierungen Ciprofloxacin (Werte entnommen aus der Fachinformation Ciprobay® Bayer AG, Leverkusen)**

<b>Tagesdosierung für Ciprofloxacin</b>	
<b>Verabreichungsform: oral</b>	
- bei normaler Nierenfunktion:	2 x 250-500 mg/Tag
- bei eingeschränkter Nierenfunktion: (Kreatinin-Clearance: $\leq 30$ mL/min)	max. 500 mg/Tag
<b>Verabreichungsform: parenteral</b>	
- bei normaler Nierenfunktion:	2-3 x 400 mg/Tag
- bei eingeschränkter Nierenfunktion: (Kreatinin-Clearance: $\leq 30$ mL/min)	max. 400 mg/Tag

## 1.2 Sehne

Neben Knorpeln und Knochen gehören auch Sehnen zu den Binde- und Stützgeweben des Körpers. Als verbindendes Element zwischen Muskeln und Knochen (sowie bei mehrbäuchigen Muskeln auch untereinander) spielen Sehnen eine entscheidende Rolle in der Bewegungsbildung durch Übertragung der Muskelkraft auf die Knochen. Entsprechend ihrer Funktion weisen Sehnen als charakteristische Merkmale eine hohe Zugfestigkeit, elastische Eigenschaften sowie eine hohe mechanische Stabilität auf. Histologisch lässt sich das straffe parallelfaserige Bindegewebe in eine ausgedehnte extrazelluläre Sehnenmatrix und einen zellulären Anteil unterteilen.

Die extrazelluläre Sehnenmatrix (EZM) ist hierbei für die bereits erwähnten charakteristischen Eigenschaften der Sehne verantwortlich und ermöglicht die optimale Funktionsausübung auch bei wechselnder Krafteinwirkung sowie ungleichmäßiger Beanspruchung.

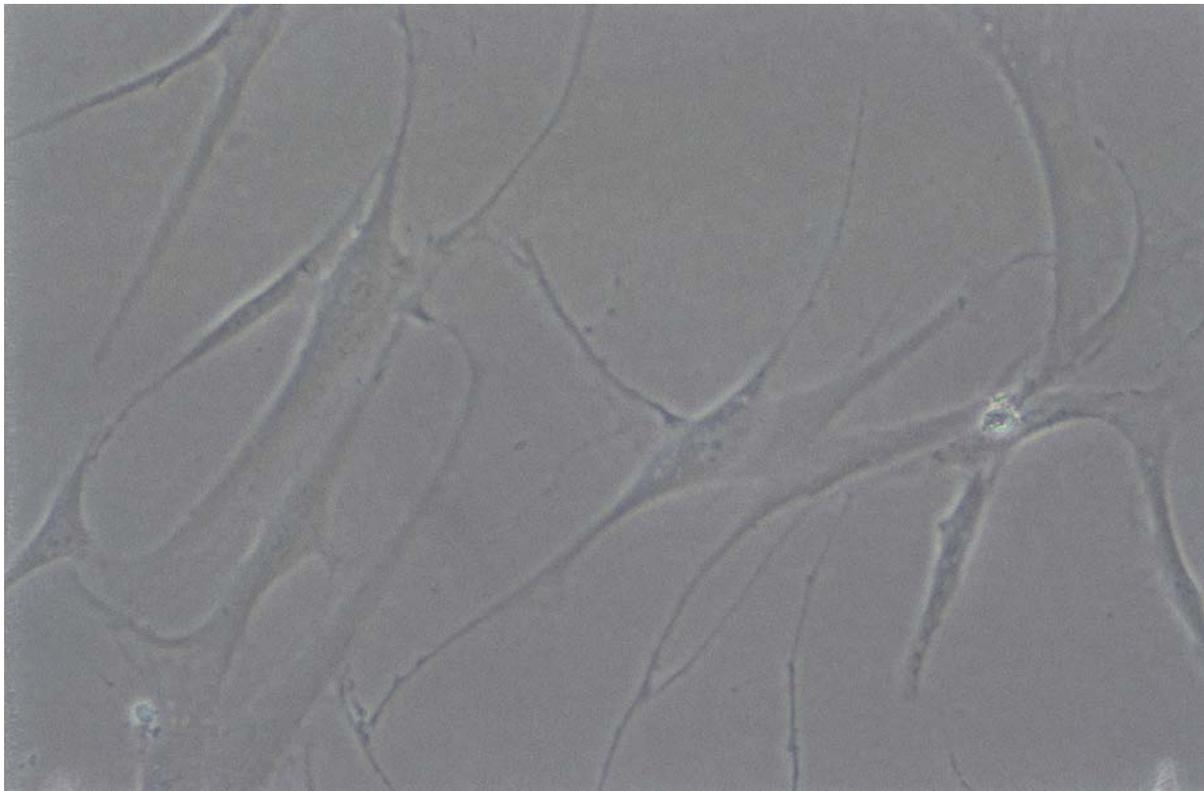
Tenoblasten und Tenozyten bilden den zellulären Anteil der Sehne. Sie liegen zwischen den Collagenfasern verteilt und sind für die Synthese der einzelnen Bestandteile der extrazellulären Matrix verantwortlich. Sie besitzen daher einen essentiellen Stellenwert beim so genannten Remodelling, welches Auf-, Umbau- und Regulationsprozesse umfasst und sind somit von zentraler Bedeutung für die Funktionstüchtigkeit der gesamten Sehne (Benjamin and Ralphs, 2000, Kannus, 2000, Jozsa et al., 1991).

Sehnen gehören zu den bradytrophen Geweben und sind kaum vaskularisiert. Dies hat zur Folge, dass Konzentrationsveränderungen von funktionell bedeutsamen Matrixbestandteilen kaum oder nur sehr langsam kompensiert werden können (Shakeri-Nejad et al., 2005). Die geringe Anzahl von Nerven und Blutgefäßen in den Sehnen trägt zusätzlich zur schlechten Regenerationsfähigkeit der Sehnen nach Trauma oder Entzündung bei.

### 1.2.2 Sehnenzelle

Zwischen den Collagenfasern angeordnet liegen die Sehnenzellen (Teno- oder Tendozyten sowie Teno- bzw. Tendoblasten). Wie bereits erwähnt, liegt ihre zentrale Funktion in der Synthese aller Komponenten der EZM. Außerdem sind sie für die Anordnung der Collagenfaserbündel verantwortlich. Infolgedessen haben sie einen essentiellen Stellenwert für die Funktionstüchtigkeit der Sehne (Benjamin and Ralphs, 2000, Kannus, 2000, Jozsa et al., 1991). Histologisch weisen Tenozyten einen lang gestreckten, spindelförmigen Zellkörper mit langen Ausläufern auf, welche an Flügel erinnern. Aufgrund dieser besonderen Form werden Sehnenzellen mitunter auch als Flügelzellen oder Pterygozyten bezeichnet (Abbildung 3). Die

charakteristische Form der Tenozyten mit ihren langen Zellausläufern ist von zentraler Bedeutung für die Bildung eines „kommunizierenden Netzwerkes“ in der Sehne. Die langen Fortsätze gewährleisten, trotz der unter physiologischen Bedingungen vorliegenden geringen Sehnenzellichte die essentiellen Zell-Zell- und Zell-Matrixkontakte. Der interzelluläre Informationsaustausch erfolgt hierbei über „gap junctions“. Dies sind kanalbildende Proteinkomplexe, welche die zytoplasmatischen Kompartimente benachbarter Zellen direkt miteinander verbinden. Im ultrastrukturellen Aufbau der Sehnenzellen spiegeln sich die große metabolische Aktivität und die hohe Synthesekapazität wider. Neben einem deutlich ausgebildeten rauen endoplasmatischen Retikulum (rER) finden sich zahlreiche Golgi-Apparate und wenige Mitochondrien mit charakteristischer Cristae-Struktur (Benjamin and Ralphs, 2000, Kannus, 2000).



**Abbildung 3: Sehnenzellen vom Menschen *in vitro* (Durchlichtmikroskopie Vergrößerung x 400)**

### **1.2.3 Extrazelluläre Matrix**

Die Sehne ermöglicht durch Übertragung von Muskelkraft auf Knochen Gelenkbewegungen. Während dieser Bewegungsphasen sind Sehnen einer Reihe von longitudinal, transversal und auch rotationsförmig verlaufenden Kräften ausgesetzt. Darüber hinaus müssen Sehnen auch

plötzlich von außen direkt einwirkendem Druck oder Prellkräften standhalten können (Kannus, 2000).

Diese vielfältigen Anforderungen werden durch den komplexen dreidimensionalen makro- und mikrostrukturellen Aufbau der Sehnen und Sehnenfasern erfüllt. Der komplexe Aufbau mit Anordnung der einzelnen Sehnenfibrillen und Sehnenfasern nicht nur in paralleler, sondern auch in longitudinaler, transversaler, horizontaler und spiraler Form, gewährleistet das Abpuffern von einwirkenden Kräften sowie die Integrität der Sehne, indem er die Zerstörung und Trennung der Fasern verhindert (Jozsa et al., 1991, Kannus, 2000).

Die extrazelluläre Matrix (EZM) setzt sich zu 65-80% aus kollagenen Fasern (hauptsächlich Collagen Typ I, wenig Collagen Typ III und V), außerdem Elastin (1-2%), anorganischen Komponenten sowie der so genannten Grundsubstanz zusammen.

Die kleinste Einheit des komplexen Collagenfasernetzwerkes bilden die löslichen Tropocollagenmoleküle, die von den Sehnenzellen synthetisiert und in den Extrazellularraum sezerniert werden. Durch Quervernetzungen bilden sich aus diesen Vorstufen des Collagens zunächst unlösliche Collagenmoleküle, die wiederum zu Mikro- und anschließend zu Collagenfibrillen aggregieren. Mehrere Collagenfibrillen lagern sich zunächst zu Fasern und schließlich zu primären Faserbündeln, den so genannten Subfaszikeln, zusammen. Der Verbund mehrerer primärer Faserbündel bildet ein sekundäres Faserbündel (Faszikel). Mehrere Faszikel bilden wiederum ein tertiäres Faserbündel. Durch Zusammenschluss vieler tertiärer Faserbündel in spiralförmiger Anordnung ergibt sich die Sehnengrundstruktur (Shakeri-Nejad et al., 2005).

Sowohl einzelne Collagenfasern, als auch die primären und sekundären Faserbündel werden von einer dünnen Schicht lockerem Bindegewebe umhüllt. Dieses so genannte „Endotenon bzw. Peritenon“ sorgt für eine Anbindung an weitere Fasern. Das Epitenon ist ein dichtes Netzwerk von Collagenfibrillen, welches die Sehne selbst umgibt. Als elastische Hülle ermöglicht es die Beweglichkeit der Sehne gegenüber dem umliegenden Gewebe. Einige Sehnen sind zusätzlich von einer weiteren Schicht aus lockerem Bindegewebe umgeben, dem so genannten „Paratenon“ (Kannus, 2000).

Neben den kollagenen Fasern sind in der EZM zu einem geringen Anteil von 1-2% auch elastische Fasern zu finden. Die Bedeutung dieser elastischen Fasern ist noch nicht vollständig geklärt. Wahrscheinlich tragen sie zur Wiederherstellung der wellenförmigen Struktur der Collagenfasern nach erfolgter Sehnendehnung/Sehnenstreckung bei (Kannus, 2000).

Die Grundsubstanz umgibt die kollagenen und elastischen Fasern und besteht aus Wasser, Proteoglykanen, Glykosaminoglykanen (wie z.B. Hyaluronsäure, Dermatansulfat, Chondroitinsulfat) und Glykoproteinen (z.B. Fibronectin). Proteoglykane und Glykosaminoglykane

sind hydrophile Makromoleküle mit einer großen Wasserbindungskapazität. Sie bilden ein hydrophiles Gel, welches die biomechanischen Eigenschaften der Sehne gegenüber auftretenden Scher-, Rotations- und Kompressionskräften unterstützt (Kannus, 2000). Glykoproteine befinden sich größtenteils auf den Sehnenzelloberflächen und haben adhäsive Eigenschaften. Sie tragen zur Stabilisierung des Collagenetzwerkes bei, indem sie an Makromoleküle oder Zelloberflächenproteine binden und somit zur Erhaltung von Zell-Matrix-Verbindungen beitragen (Potts and Campbell, 1996). Darüber hinaus ist die Grundsubstanz an der Aufrechterhaltung des Ionengleichgewichts (Homöostase) und der Fibrillogenese beteiligt (Kannus, 2000).

Die anorganischen Komponenten machen nur ca. 0,2% der Sehnentrockenmasse aus. Hierzu zählen unter anderem Calcium, Magnesium, Mangan, Kupfer, Cadmium, Zink, Nickel, Lithium, Fluor, Phosphor und Silizium. Ihnen wird eine Beteiligung an Wachstums-, Entwicklungs- und Stoffwechselprozessen der Sehne zugesprochen. So hat z.B. Kupfer eine wichtige Rolle bei der Ausbildung von Collagen-Quervernetzungen (Kannus, 2000).

Der für Wachstum und Erneuerungsprozesse (Remodelling) essentielle Informationsaustausch zwischen Sehnenzellen und extrazellulärer Matrix erfolgt über membranständige Rezeptorproteine, den Integrinen (Hayes et al., 2000, Hynes, 1992, Ivaska and Heino, 2000, van der Flier and Sonnenberg, 2001).

### **1.2.4 Tendopathien**

Unter dem Begriff Tendopathie wird eine Vielzahl von krankhaften Veränderungen des Bindegewebes im Sehnenbereich zusammengefasst. Im engeren Sinn versteht man unter einer Tendopathie jedoch eine primär nicht-entzündliche, degenerative, krankhafte Veränderung der Sehne. Hiervon abzugrenzen ist die Tendinitis, die überwiegend im Rahmen von entzündlichen Erkrankungen des rheumatischen Formenkreises auftritt. Die speziell im Zusammenhang mit der Einnahme von Chinolonen beobachteten krankhaften Veränderungen der Sehne reichen von der einfachen schmerzhaften Sehnenreizung, Sehnenentzündung (Tendinitis) mit begleitender Schwellung und Einlagerung von entzündlichen Infiltraten bis zur Totalruptur der Sehne. In der Literatur werden die Veränderungen meist als Chinolon-induzierte Tendopathie zusammengefasst. Typische Leitsymptome der Tendopathie sind bewegungs- und belastungsabhängige ausstrahlende Schmerzen.

Primäre Ursache der degenerativen Tendopathie ist meist eine chronische Überbelastung der Sehne. Darüber hinaus können aber auch Durchblutungsstörungen, ein Impingement (häufig im Bereich der Rotatorenmanschette) als auch die Einnahme von Medikamenten ursächlich

sein/auslösende Faktoren darstellen. Beispielhaft für Arzneimittel mit tendotoxischem Potential sind sowohl Glukokortikoide als auch Chinolone. Hinweise auf ein sehenschädigendes Potential/Wirkung des Kortisons liegen schon lange vor (Cowan and Alexander, 1961, Smaill, 1961, Csizy and Hintermann, 2001). Aktuellere Untersuchungen ergaben dabei, dass insbesondere die systemische Glukokortikoidtherapie ein erhöhtes tendotoxisches Risiko darstellt (Kao et al., 1992, Kotnis et al., 1999, Hayes et al., 2000, Sendzik et al., 2009b).

Darüber hinaus scheinen einige Risikofaktoren die Inzidenz degenerativer Tendopathien erhöhen zu können. Hierzu zählen ein erhöhtes Lebensalter, Begleiterkrankungen wie lokale Infektionen, renale Osteodystrophie, Diabetes mellitus, Adipositas, arterielle Hypertonie und entzündlich rheumatische Erkrankungen (Wirth and Carls, 2000).

Kernspintomographisch ist eine Klassifikation der Tendopathie in verschiedene Stadien möglich. Bereits Veränderungen der Klasse II beinhalten ohne geeignete therapeutische Maßnahmen wie lokale nichtsteroidale Antiphlogistika sowie eine Ruhigstellung der betroffenen Sehne, ein erhöhtes Risiko einer Sehnenruptur (Tabelle 3).

**Tabelle 3: Klassifikation der Tendopathie, modifiziert nach Weinstabl et al., 1991**

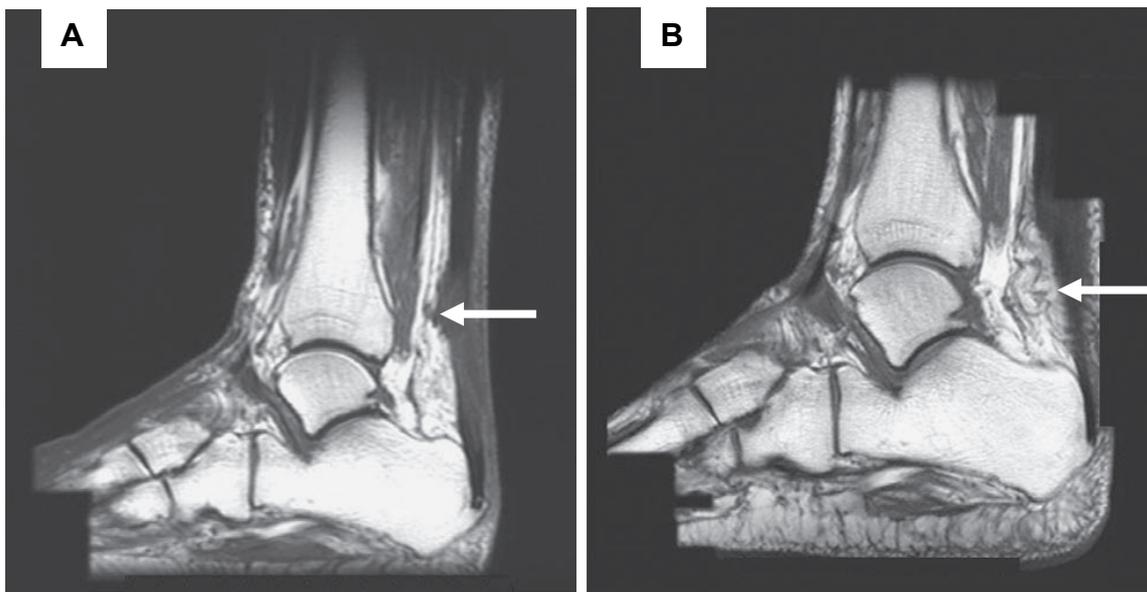
<b>Klasse</b>	<b>Befunde in der Magnetresonanztomographie (MRT)</b>
Klasse 0	Normale Sehnendarstellung, normale charakteristische fibröse Sehnenstruktur, klare Abgrenzbarkeit vom umliegenden Gewebe
Klasse I	Verdickung der Sehne
Klasse II	Verdickung der Sehne, strukturelle Signalveränderung, erhöhtes Rupturrisiko, insbesondere bei horizontalen Signalveränderungen, die die Oberfläche erreichen
Klasse III	Ödem im Peritendineum
Klasse IV	Partielle oder komplette Ruptur

### 1.2.5 Chinolon-induzierte Tendopathien

Chinolone können zu Schäden am juvenilen Bindegewebe, insbesondere am Knorpel (Chinolon-induzierte Arthropathie) führen (Stahlmann et al., 2000b, Stahlmann et al., 1990). Seit Mitte der 80er Jahre liegen zudem Hinweise auf eine sehenschädigende Wirkung von Chinolonen, den sogenannten Chinolon-induzierten Tendopathien vor (Abbildung 4).

Die Chinolon-induzierte Tendopathie umfasst die Krankheitsbilder Tendinitis und Sehnenruptur (Maurin, 2008). Meist ist hierbei die Achillessehne betroffen. Weshalb speziell diese Sehne in bis zu 90% der Fälle (van der Linden et al., 2001) betroffen ist, konnte bisher nicht geklärt werden. Eine eventuelle Erklärung für diese bevorzugte Lokalisation könnte die im Vergleich zu anderen Körpersehnen frühzeitige Degeneration der Achillessehne (Thermann et al., 2000) oder eine größere mechanische Belastung sein. Aber auch andere Sehnen des Körpers, wie z.B. die Bizepssehne können betroffen sein (Braun et al., 2004). Bei der Chinolon-induzierten Tendinitis treten entzündlichen Ödeme, Schwellungen und Schmerzhaftigkeit auf, die die Symptome einer Venenthrombose imitieren können und in etwa 50% der Fälle beidseits auftreten (Shakeri-Nejad and Stahlmann, 2006).

Im weiteren Verlauf kann es, vor allem bei Ausbleiben einer geeigneten Therapie, meist ohne besondere und plötzliche Belastung oder erinnerliches Trauma zur spontanen Sehnenruptur kommen. Einige Fallberichte weisen darauf hin, dass es auch ohne vorherige Symptome einer Tendinitis zu einer spontanen Sehnenruptur kommen kann (Saint et al., 2000, Casparian et al., 2000).



**Abbildung 4: MRT-Aufnahme des linken Fußknöchels einer 81 jährigen Patientin. Aufnahme A stellt eine fast komplette Chinolon-induzierte Ruptur der Achillessehne nach Einnahme von Levofloxacin dar (Pfeil). Aufnahme B wurde 2 Monate nach dem Rupturereignis angefertigt. Die Aufnahme B zeigt eine fast vollständige Heilung der Sehne (Vyas and Krishnaswamy, 2007) [Copyright © 2007 Massachusetts Medical Society. All rights reserved]**

Die klinischen Symptome können über einen Zeitraum von Wochen bis Monaten persistieren und zu erheblichen funktionellen Einschränkungen der betroffenen Patienten führen. Die Di-

agnose der Tendinitis bzw. Sehnenruptur kann mittels Ultraschall oder Kernspintomographie gestellt werden. Es lässt sich jedoch aus der klinischen Symptomatik allein nicht ableiten, ob eine Chinolon-Therapie als auslösender Faktor in Frage kommt (Shakeri-Nejad and Stahlmann, 2006).

Bei Verdacht auf eine Chinolon-induzierte Tendopathie sollte die Chinolon-Gabe gestoppt und die betroffene Extremität geschont werden. Des Weiteren können lokale nichtsteroidale Antiphlogistika sowie Physiotherapie zum Einsatz kommen. Es gibt Hinweise, dass die Gabe von N-Acetylcystein die oxidative Schädigung, die in Tierexperimenten eine wesentliche Rolle im tendotoxischen Mechanismus spielt, reduzieren kann (Simonin et al., 2000). Bisher liegen hierzu jedoch noch keine klinischen Studien vor.

Die Zeitspanne vom Beginn einer Chinolon-Therapie bis zum Auftreten erster Symptome der Tendopathie ist äußerst variabel und kann mitunter sehr lang sein. In einer niederländischen Studie, in der 42 Fälle Chinolon-assoziiierter Tendopathien untersucht wurden, konnte ein Zeitraum von 1-150 Tagen zwischen Chinolon-Therapie und Auftreten erster Symptome ermittelt werden. Am häufigsten war der Symptombeginn in der ersten bis zweiten Woche nach Therapiebeginn zu beobachten (van der Linden et al., 2001). In einer weiteren groß angelegten retrospektiven Fall-Kontroll-Studie zu Chinolon-induzierten Achillessehnenrupturen über einen Zeitraum von 10 Jahren ermittelten van der Linden und Mitarbeiter ein Risiko, angegeben als Odds-Ratio (OR), für Achillessehnenrupturen bei 6-18 Monate zurückliegender Therapie mit Fluorchinolonen von 1,4 (95%-KI: 0,9-2,1) (van der Linden et al., 2003). Für kürzlich erfolgte Chinolon-Therapien (30-180 Tage nach Abschluss der Therapie) lag die OR bei 2,4 (95%-KI: 1,5-3,7) und für laufende Therapien mit Chinolonen (bis 30 Tage nach Abschluß der Therapie) errechnete sich eine angepasste OR von 4,3 (95%-KI: 2,4-7,8) (van der Linden et al., 2003).

Ein kausaler Zusammenhang zwischen Tendopathie und Chinolon-Therapie, ist bei unmittelbarem Auftreten innerhalb weniger Stunden oder Tage nach einer Chinolon-Behandlung leicht zu erkennen. Dagegen wird bei einem Zeitraum von mehreren Monaten nach Beendigung einer Chinolon-Behandlung der Zusammenhang einer Tendinitis oder Sehnenruptur mit dieser zurückliegenden Behandlung wahrscheinlich in den meisten Fällen nicht erkannt.

Da bisher nur wenige retrospektive Studien vorliegen, sind es vor allem Fallberichte, die als Hauptbezugsquelle für Informationen und zur Identifikation sowie Einschätzungen von Inzidenz und begleitenden Risikofaktoren herangezogen werden. Dabei sollten Fallberichte beispielsweise als Quelle zur Angabe von Inzidenzen und Risikofaktoren durchaus auch kritisch betrachtet werden.

Neben dem bereits erwähnten Problem in der Erstellung eines Kausalitätszusammenhanges bei zum Teil beträchtlicher Latenzzeit liegt ein weiteres Problem darin, dass vor allem von Patienten mit erfolgter Sehnenruptur berichtet wird. Die Sehnenruptur stellt jedoch nur den schwerwiegendsten Fall der Chinolon-induzierten Tendopathie dar und ist daher zur Abschätzung eines allgemeinen Risikos nur bedingt geeignet. Daten zur Inzidenz Chinolon-induzierter Effekte am Bindegewebe und speziell am Sehngewebe variieren daher, je nach Studie, mitunter deutlich.

Laut einer Studie von 2003 lassen sich 2-6% aller Achillessehnenrupturen bei Patienten über 60 Jahren auf Chinolone zurückführen (van der Linden et al., 2003).

In dieser retrospektiven Studie aus dem Jahr 2003 haben van der Linden et al. in dem Zeitraum von 1988 bis 1998 auf Basis von Informationen der „General Research Database“ Chinolon-induzierte Achillessehnenrupturen untersucht. Diese Datenbank enthält medizinische Informationen von etwa 8 Millionen Einwohnern des Vereinigten Königreichs. Insgesamt 1367 Fälle erfüllten die Einschlusskriterien (erstmaliges Achillessehnenrupturereignis).

Bei Betrachtung des Risikos, angegeben als Odds-Ratio, für eine Achillessehnenruptur nach Altersstufen ergab sich für Patienten zwischen 60-79 Jahren eine OR von 6,4 (95%-KI: 3,0-13,7). Für Patienten älter als 80 Jahre lag die OR im Vergleich bei 20,4 (95%-KI: 4,6-90,1) (van der Linden et al., 2003).

Diese Zahlen machen deutlich, wie wichtig die Identifikation und Einschätzung von Risikofaktoren der Tendopathie sind. Aus den bisher vorliegenden Fallberichten und Studien wurden folgende Risikofaktoren abgeleitet: Alter über 60 Jahren, Glukokortikoidtherapie (van der Linden et al., 2003, Shakeri-Nejad and Stahlmann, 2006, Sendzik et al., 2009b), Hyperparathyroidismus sowie chronische Nierenerkrankung (Zabraniecki et al., 1996, Jones and Kjellstrand, 1996, Muzi et al., 2007).

So ergab eine Untersuchung zur Achillessehenschädigung bei oraler Glukokortikoidtherapie mit und ohne Chinolon-Gabe in Abhängigkeit vom Expositionszeitraum bei alleiniger Chinolon-Therapie die OR 5,3 (95%-KI: 1,8-15,2), in Kombination mit einer Glukokortikoidtherapie betrug sie jedoch 17,5 (95%-KI: 5,0-60,9) (van der Linden et al., 2003).

Des Weiteren scheint es wirkstoffspezifisch unterschiedliche Risiken zu geben. So scheinen Chinolone, welche die pharmakokinetischen Eigenschaften einer hohen Bioverfügbarkeit, einer langen Halbwertszeit und einer hohen renalen Eliminationsrate aufweisen, häufiger zu Sehnenrupturen zu führen. So war die OR in der Studie von van der Linden et al. bei laufender Chinolon-Therapie für Patienten älter als 60 Jahren von Ofloxacin mit 28,4 (95%-KI: 7,0-

115,3) deutlich höher als die von Norfloxacin (OR 14,2 (95%-KI: 1,6-128,6)) oder Ciprofloxacin (OR 3,6 (95%-KI: 1,4-9,1)) (van der Linden et al., 2003).

Eine Reihe weiterer potentieller Risikofaktoren ist in Tabelle 4 dargestellt. Insbesondere bei gleichzeitigem Vorliegen mehrerer dieser Risikofaktoren scheinen die Patienten einem höheren Risiko ausgesetzt, bei Chinolon-Gabe eine Tendopathie zu entwickeln.

Die tatsächliche Rolle und Relevanz der einzelnen Risikofaktoren wird dabei durchaus kritisch diskutiert. Es bestehen vor allem noch viele Unklarheiten darüber, ob die einzelnen Faktoren direkt oder indirekt sowie über welche Angriffspunkte sie Einfluss auf den Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tendopathie nehmen. So ist zum Beispiel die Rolle der chronischen Nierenerkrankung als Risikofaktor bisher nicht geklärt. Einige Autoren machen den bei chronischer Nierenerkrankung, insbesondere im dialysepflichtigen Endstadium häufig vorliegenden sekundären Hyperparathyroidismus verantwortlich, welcher selbst zu spontanen Sehnenruptur führen kann (Jones and Kjellstrand, 1996, Palmer et al., 2004). Vermutlich ist dieser tenotoxische Effekt darauf zurückzuführen, dass ein erhöhter Parathormonspiegel im Serum sekundär zu einem Magnesiummangel führen kann. Der Reduktion von frei im Gewebe verfügbarem Magnesium unter einen kritischen Schwellenwert, wie er auch durch Chinolon hervorgerufen werden kann, wird eine wichtige Rolle im Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tendopathie zugesprochen. Es wird vermutet, dass die Reduktion frei verfügbarer Magnesiumionen zu einer vermehrten Bildung von freien Radikalen führt, welche wichtige Proteinstrukturen der Matrix oxidativ schädigen können (Rock et al., 1995, Simonin et al., 1999, Shakibaei et al., 2000).

Es liegen jedoch auch Fallberichte vor, bei denen es bei chronisch nierenerkrankten Patienten mit physiologischem Parathormonspiegel im Serum zur Tendopathie gekommen ist (Maurin, 2008). Andere Autoren sehen den Grund nur in einer verminderten renalen Elimination des Chinolons, mit daraus folgendem erhöhtem Plasmaspiegel. Interessanterweise scheinen Patienten mit anamnestisch bekannter Chinolon-induzierter Tendopathie ein erhöhtes Risiko aufzuweisen, bei erneuter Chinolon-Gabe wiederholt eine Tendopathie zu entwickeln (Maurin, 2008). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine genetische Prädisposition ebenfalls eine Rolle spielen könnte.

**Tabelle 4: Mögliche prädisponierende Risikofaktoren für die Entstehung von Tendopathien, modifiziert nach (Lauzon et al., 1987, Cronin, 1988, Jozsa et al., 1989, Donck et al., 1994, Leppilähti et al., 1996, Jones and Kjellstrand, 1996, Grant et al., 1997, Leppilähti and Orava, 1998, van der Linden et al., 2002, van der Linden et al., 2003, Shakeri-Nejad et al., 2005)**

<b>Pharmakokinetische Faktoren des Chinolons</b>	<b>Individuelle Faktoren</b>	<b>Nierenerkrankungen</b>	<b>Begleiterkrankungen/-Faktoren</b>
Hohe Bioverfügbarkeit	<b>Alter &gt; 60 Jahre</b>	<b>Chronische Nierenerkrankung/ Hämodialyse</b>	Rheumatoide Erkrankungen/ Autoimmunerkrankungen
Lange Halbwertszeit	Männliches Geschlecht	Zustand nach Nierentransplantation	Diabetes mellitus
Verminderte renale Elimination	Sportliche Betätigung	<b>Sekundärer Hyperparathyroidismus</b>	<b>Glucocortikoid-Therapie</b>
	Erhöhter Parathormonspiegel im Serum		Adipositas
	Zurückliegende Tendopathie nach Chinolon-Therapie		

Obwohl in den letzten Jahren zunehmend neue Erkenntnisse gewonnen wurden, ist der genaue Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tendopathie bisher noch nicht eindeutig geklärt. Knorpel- und Sehngewebe sind in Bezug auf ihren entwicklungsgeschichtlichen Ursprung, der bradytrophen Stoffwechsellage, dem hohen Anteil an extrazellulärer Matrix, der Fähigkeit, hohe mechanische Belastungen zu tolerieren sowie dem Vorkommen transmembranärer und intrazellulärer Signalproteine ähnlich. Daher sind Parallelen im Pathomechanismus der Knorpel- und Sehntoxizität wahrscheinlich und bisherige Erkenntnisse vermutlich übertragbar. Gestützt wird diese Annahme zum Beispiel durch Untersuchungen von Kato und Mitarbeitern (Kato et al., 1995a).

Ein initialer Faktor bei der Entstehung toxischer Effekte am Bindegewebe könnte die für Chinolone charakteristische Bildung von Chelatkomplexen mit Magnesium und anderen zweiwertigen Kationen sein (Stahlmann et al., 1995, Stahlmann et al., 2000a, Sendzik et al., 2009a). Durch die Verminderung des funktionell frei verfügbaren Magnesiums im Sehngewebe unter einen kritischen Wert kommt es vermutlich zu einer vermehrten Bildung von freien Radikalen. Diese können wichtige Proteinstrukturen der extrazellulären Matrix oxidativ schädigen (Rock et al., 1995). Diese Annahme wird auch durch eine Untersuchung von Simo-

nin et al. gestützt, bei der es unter Einsatz von N-Acetylcystein als Antioxidans zu einer Inhibition der durch Pefloxacin verursachten Schäden kam (Simonin et al., 2000).

Die Bindung von Magnesium in Chelatkomplexen hat zudem auch Einfluss auf Chondrozyten-Matrix-Interaktionen, die über kationenabhängige  $\beta$ 1-Integrin-Rezeptoren vermittelt werden. Die chelatbildenden Eigenschaften der Chinolone könnten somit ein initialer Faktor für eine Störung der Wechselwirkung zwischen EZM und Sehnenzelle sein und konsekutiv zu Schädigung von Matrix und Zellfunktion führen.

Der Einfluss eines durch Chinolone bewirkten Magnesiummangels wurde in unterschiedlichen Tierexperimenten simuliert und untersucht. Stahlmann et al. stellten 1995 in einer Untersuchung an juvenilen Ratten fest, dass die durch eine Magnesiummangeldiät hervorgerufenen Schäden am juvenilen Knorpel dem Bild der Chinolon-induzierten Arthropathie gleichen (Stahlmann et al., 1995). Shakibaei et al. untersuchten 2000 elektronenmikroskopisch ultrastrukturelle Veränderungen an Achillessehnen von Ratten, die mit Ofloxacin behandelt wurden (Shakibaei et al., 2000). Ein Teil der Versuchstiere erhielt zudem nur magnesiumarmes Futter. Hierbei zeigten sich konzentrations- und zeitabhängige Veränderungen an den Sehnenzellen in Form einer auffälligen Vakuolenbildung im Zytoplasma und einer Schwellung der Zellorganellen, insbesondere des rauen endoplasmatischen Retikulums. Auffällig war, dass die magnesiumarme Diät die Effekte an den Tenozyten noch verstärkte. In diesem Zusammenhang gewinnen die schlechte Vaskularisation und die bradytrophe Stoffwechsellage der Sehnen noch an Bedeutung. Die Unfähigkeit des Sehnengewebes, Elektrolytschwankungen schnell wieder ausgleichen zu können, begünstigt die tendotoxischen Effekte.

In einer weiteren Untersuchung wurden juvenile Hunde mit Ciprofloxacin in unterschiedlichen Dosierungen über 5 Tage behandelt. Eine zweite Versuchsgruppe erhielt zum Vergleich nur eine magnesiumarme Diät. Auch in dieser Untersuchung ähnelten sich die Effekte nach Chinolon-Gabe und nach magnesiumarmer Diät. Chinolone und Magnesiumreduktion scheinen demnach eine ähnliche Wirkung auf Sehnen zu haben (Stahlmann et al., 2000a, Shakibaei et al., 2001a).

Die biochemische Untersuchung ergab bei den Chinolon-behandelten Hunden zum einen eine konzentrationsabhängige Reduktion des Hauptmatrixproteins Collagen Typ I. Diese kann als Ausdruck einer reduzierten Zellsyntheseleistung verstanden werden.

Zum anderen konnte auch eine Reduktion von Fibronectin und  $\beta$ 1-Integrin festgestellt werden. Fibronectin besitzt als extrazellulär eingelagertes Glykoprotein eine entscheidende Funktion in der Gewährleistung der Zell-Matrix-Integrität, indem es an zellmembranständige Integrine

und Bestandteile der extrazellulären Matrix bindet. Zudem spielt es auch eine Brückenfunktion in der Verbindung von Collagenfibrillen untereinander.

Das transmembranäre Rezeptorprotein  $\beta$ 1-Integrin induziert u.a. Signalübertragungswege, wie den MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg. Eine Beeinflussung dieser Signalübertragung führt an Chondrozyten und Sehnenzellen zur Apoptose (programmierter Zelltod). Der resultierende Gewebeuntergang geht mit dem klinischen Bild einer Tendopathie einher. Er ist somit als Teil des Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tendotoxizität zu sehen (Shakibaei et al., 2001a, Shakibaei and Stahlmann, 2001, Sendzik et al., 2005, Sendzik et al., 2009a). Welches Gewicht eine Störung des MAP-Kinase-Signaltransduktionswegs in der Pathogenese der Chinolon-induzierten Tendopathie tatsächlich hat, ist bisher noch unklar.

Sendzik et al. untersuchten 2005 den Einfluss der Matrixmetalloproteinasen (MMPs). Als System sich gegenseitig aktivierender und inhibierender Enzyme sorgen die MMPs durch gezielten Abbau von EZM u.a. dafür, die Funktion der Sehne optimal an ihre Funktion der Kraftübertragung zwischen Muskel und Knochen anzupassen. Sendzik und Mitarbeiter behandelten *in vitro* humane Tenozyten mit Ciprofloxacin. Dabei konnte biochemisch bereits bei einer Konzentration von 10 mg Ciprofloxacin pro Liter Medium nach 48 Stunden ein Anstieg von MMP-1 und MMP-13 festgestellt werden (Sendzik et al., 2005). Eine Aktivitätszunahme der Collagenasen MMP-1 und MMP-13 führt zur Destruktion der extrazellulären Matrix und daraus folgend zur Gewebeschädigung. Ein weiterer Ansatz in der Untersuchung des Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Sehnenschädigung scheint demzufolge in einer Induktion von Matrixmetalloproteinasen durch Chinolone zu liegen.

### **1.3 Niere**

Bisherige Studien und Fallberichte deuten darauf hin, dass die chronische Nierenerkrankung einen wichtigen Risikofaktor für die chinolon-induzierte Tendopathie darstellt. Insbesondere für Patienten, die eine fortgeschrittene chronische Niereninsuffizienz im dialysepflichtigen Stadium aufweisen, besteht ein erhöhtes Risiko (Zabraniecki et al., 1996, Jones and Kjellstrand, 1996, van der Linden et al., 2003, Shakeri-Nejad et al., 2005, Muzi et al., 2007).

#### **1.3.1 Aufgaben der Niere**

Die Nieren sind das wichtigste Organ zur Gewährleistung einer konstanten Zusammensetzung extrazellulärer Flüssigkeiten (Franz and Hörl, 1997). Zu den Hauptaufgaben der Nieren zählen neben der Elimination anfallender Stoffwechselendprodukte wie z.B. Harnsäure und

Harnstoff, die Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes, die Osmoregulation sowie die Regulation des Säure-Basen-Haushaltes. Außerdem sind die Nieren neben der endokrinen Sekretion von Gewebehormonen (Erythropoetin) auch am Intermediärstoffwechsel (Vitamin-D-Stoffwechsel) beteiligt. Unmittelbar mit der Harnbildung verknüpft sind die Funktionen von der Elimination bis zur Regulation des Säure-Basen-Haushaltes. Drei Prozesse sind dabei an der Harnbildung beteiligt: die glomeruläre Filtration, die tubuläre Sekretion und die Rückresorption (Franz and Hörl, 1997).

Um die Eliminationsleistung der Nieren und somit die Nierenfunktion zu beschreiben, wurde der Begriff der Clearance eingeführt. Mit Hilfe der Clearance lässt sich die glomeruläre Filtrationsrate (GFR) und die Menge Blut bestimmen, die pro Zeiteinheit von einer bestimmten Substanz wie z.B. Harnstoff oder Kreatinin vollständig befreit wird.

Zur Bestimmung der Clearance werden Substanzen benötigt, die folgende Merkmale aufweisen: Sie müssen frei filtrierbar, nicht tubulär resorbiert oder sezerniert, nicht in der Niere synthetisiert oder metabolisiert werden und nicht toxisch sein. Diese Kriterien treffen zum Beispiel auf die Substanzen Inulin oder das körpereigene Kreatinin zu. Für diese Substanzen ist die pro Zeiteinheit filtrierte Menge im Primärharn gleich der im Endharn pro Zeit ausgeschiedene Menge, d.h. die Clearance solcher Substanzen ist gleich der GFR (Franz and Hörl, 1997).

**Clearance-Formel:** 
$$C_x = \frac{U \cdot V}{P}$$

C = Clearance des Stoffes X (ml/min)

U = Konzentration des Stoffes X im Urin (mg/l)

P = Konzentration des Stoffes X im Plasma (mg/l)

V = Harnvolumen pro Minute (ml/min)

Zur Abschätzung der Kreatinin-Clearance wird im klinischen Alltag häufig die Cockcroft-Gault-Formel angewendet. Hierfür wird die Kreatininkonzentration im Serum bestimmt, ein Sammeln des Patientenurins über 24 h ist hierbei nicht erforderlich. Aufgrund der meist unterschiedlichen Muskelmasse bei Frauen und Männern wird der errechnete Wert bei weiblichen Personen mit dem Wert 0,85 multipliziert. Jedoch sollte diese Formel bei Patienten mit akutem Nierenversagen und/oder einer instabilen Nierenfunktion, sehr adipösen Patienten oder bei Vorliegen von starken Ödemen nicht angewendet werden (Hasslacher, 2003).

**Cockcroft-Gault-Formel:** 
$$C_{Cr} = \frac{(140 - \text{Alter}) \cdot \text{Körpergewicht}}{72 \cdot S_{Cr}} \quad (\cdot 0,85 \text{ falls weiblich})$$

$C_{Cr}$  = Kreatinin-Clearance (ml/min)

$S_{Cr}$  = Serum-Kreatinin (mg/dl)

Alter = Alter (Jahre)

Körpergewicht = Körpergewicht in kg

Die MDRD-Formel (Modifikation of Diet in Renal Disease) wurde im Jahre 1999 anhand von Daten chronisch nierenerkrankter Patienten entwickelt. Die Einbeziehung der Hautfarbe berücksichtigt die erhöhte Muskelmasse von Amerikanern schwarzafrikanischer Herkunft. Die MDRD-Formel berücksichtigt die tubuläre Sekretion von Kreatinin und ist bei Menschen mit moderater bis schwerer Nierenfunktionseinschränkung genauer als die Cockcroft-Gault-Formel und die Kreatinin-Clearance.

### **1.3.2 Chronische Nierenerkrankung, Niereninsuffizienz und Einschränkung der Nierenfunktion**

Kommt es zu einer qualitativen Beeinflussung oder sogar zum Verlust der Nierenfunktion, so liegt eine Niereninsuffizienz vor. Hierbei unterscheidet man nach der zeitlichen Verlaufsform eine akute und eine chronische Niereninsuffizienz (Herold, 2005).

Ein akutes Nierenversagen kann prärenal durch große Flüssigkeitsverluste (Verbrennungen, Blutungen), Flüssigkeitsverschiebungen (Peritonitis, Aszites, Ileus), fehlende Volumenzufuhr (Herzinsuffizienz, hepato-renales-Syndrom), akute Nierenerkrankungen (akute Glomerulonephritiden) sowie durch endogene (z.B. Organversagen/Insuffizienz eines Organs) als auch exogene Intoxikationen (z.B. Arzneimittelvergiftungen, andere Intoxikationen) hervorgerufen werden.

Von einer chronischen Nierenerkrankung spricht man bei einem über einen längeren Zeitraum, meist über mehrere Jahre bestehenden irreversibel und langsam voranschreitenden Verlust der Nierenfunktion (NKF, 2002). Die National Kidney Foundation (NKF) definierte 2002 die chronische Nierenerkrankung in der Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI) wie folgt:

**Tabelle 5: Definition der chronischen Nierenerkrankung, modifiziert nach Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI,(NKF, 2002)**

---

**Definition der chronischen Nierenerkrankung**

---

**1. Nierenschädigung  $\geq$  3 Monate**, definiert durch strukturelle oder funktionelle Anomalien, mit oder ohne Einschränkung der glomerulären Filtrationsrate (GFR), die sich manifestiert in:

- pathologischen Anomalien oder
- Marker einer Nierenschädigung, inklusive Anomalien in der Zusammensetzung des Blutes oder Urins oder Anomalien in bildgebenden Verfahren

**2. GFR  $<$  60 ml/min/1,73m<sup>2</sup> für  $\geq$  3 Monate**, mit oder ohne Nierenschädigung

---

Eine chronische Nierenerkrankung liegt demzufolge vor, wenn im Urin Eiweiß (Proteinurie) oder Albumin (Mikroalbuminurie) nachweisbar ist und/oder wenn die Nierenfunktion (glomeruläre Filtrationsrate) unter 60% der Norm abgefallen ist, oder wenn bei bildgebenden Verfahren (Sonographie, Computertomographie) krankhafte Veränderungen an den Nieren festgestellt werden und wenn dieser Zustand länger als 3 Monate anhält (NKF, 2002).

Hiervon abzugrenzen ist der Begriff „chronische Niereninsuffizienz“ (chronisches Nierenversagen), der nach den Richtlinien der National Kidney Foundation das Terminal- oder Endstadium einer chronischen Nierenkrankheit bezeichnet, welches durch eine Nierenleistung von 15% der Norm oder darunter (entsprechend einer glomerulären Filtrationsrate von unter 15 ml/min/1,73m<sup>2</sup>) gekennzeichnet ist. In diesem Stadium der Nierenfunktioneinschränkung besteht eine Indikation für die Nierenersatztherapie in Form von Dialysebehandlung oder Nierentransplantation.

**Tabelle 6: Einteilung der chronischen Nierenerkrankungen, modifiziert nach Kidney Disease Outcomes Quality Initiative (KDOQI, (NKF, 2002)**

Stadium	GFR	Proteinurie nachweisbar	Keine Proteinurie nachweisbar
1*	> 89	Nierenerkrankung mit normaler Nierenfunktion*	Normalbefund
2*	60-89	Nierenerkrankung mit milder Nierenfunktionseinschränkung*	milde Nierenfunktions-einschränkung, aber keine Nierenerkrankung**
3	30-59	Nierenerkrankung mit moderater Nierenfunktionseinschränkung***	
4	15-29	Nierenerkrankung mit schwerer Nierenfunktionseinschränkung***	
5	< 15	Chronisches Nierenversagen/Niereninsuffizienz***	

\*) Im Stadium 1 und 2 ist zur Diagnose einer Nierenerkrankung immer der Nachweis von Eiweiß im Urin oder ein krankhafter Befund in einem bildgebenden Verfahren erforderlich.

\*\*\*) Menschen mit einer leichten Nierenfunktionseinschränkung (GFR 60-89 ml/min/1,73m<sup>2</sup>), bei denen keine Proteinurie oder andere krankhafte Veränderungen an den Nieren festgestellt werden, sind nicht nierenkrank.

\*\*\*) In den Stadien 3 bis 5 gründet sich die Diagnose ausschließlich auf eine glomeruläre Filtrationsrate unter 60 ml/min/1,73m<sup>2</sup>.

### 1.3.3 Ursachen der chronischen Nierenerkrankung

Es sind heterogene Ursachen bekannt, die zu chronischer Nierenerkrankung und chronischer Niereninsuffizienz führen können. Weltweit gehören Entzündungen, Infektionen der Nieren, Anomalien der ableitenden Harnwege sowie angeborene Nierenerkrankungen zu den häufigsten Ursachen für eine chronische Nierenerkrankung und Niereninsuffizienz. In den Industrienationen sind aufgrund von Bewegungsmangel und Fehlernährung der Diabetes mellitus Typ II (diabetische Nephropathie), die arterielle Hypertonie (vaskuläre Nephropathie) und die Glomerulonephritis als häufigste Ursachen bei Erwachsenen zu nennen. Einer Untersuchung zufolge nahmen chronische Nierenerkrankungen aufgrund von Diabetes mellitus und arteriellem Bluthochdruck im Beobachtungszeitraum von 1997 bis 2005 in Deutschland stetig zu, während Erkrankungen wie Glomerulonephritis, interstitielle Nephritis, angeborene Nierenerkrankungen und Systemerkrankungen als Ursache aufgrund besserer Behandlungsmöglichkeiten abnahmen (Frei and Schober-Halstenberg, 2006).

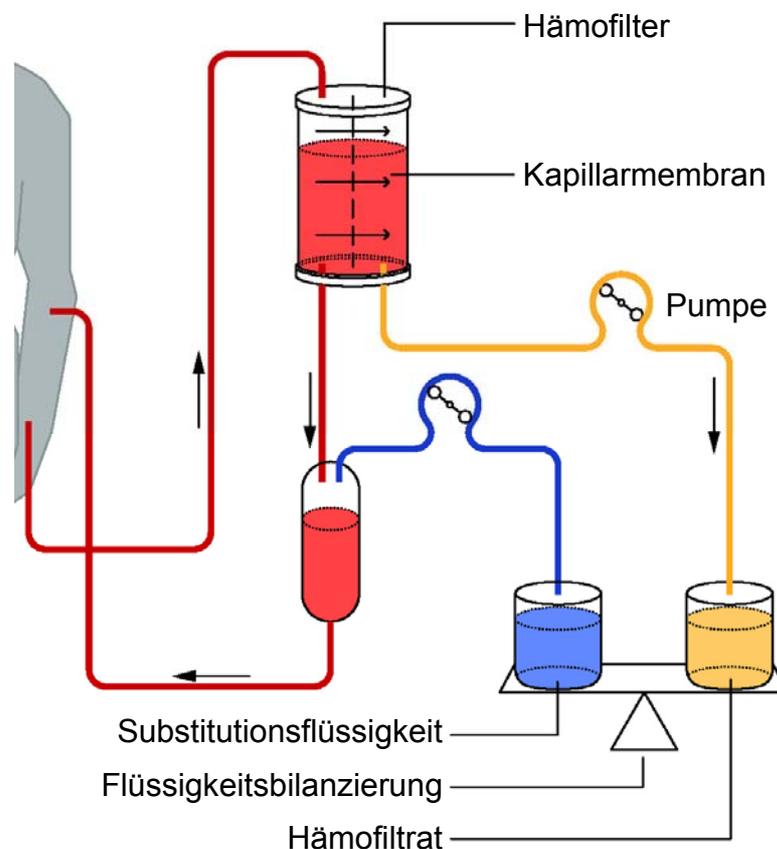
Insbesondere bei Patienten mit metabolischem Syndrom ist das Risiko, eine chronische Nierenerkrankung zu entwickeln, deutlich erhöht (Wahba and Mak, 2007). Die steigende Zahl älterer und am metabolischen Syndrom leidender Menschen wird die Zahl der chronischen Nierenerkrankungen in Zukunft weiter steigen lassen.

### **1.3.4 Nierenersatzverfahren**

Bei einer schweren Einschränkung der Nierenfunktion muss, um eine Urämie zu verhindern, ein Nierenersatzverfahren zur Anwendung kommen. Hierzu gehören die Blutreinigungsverfahren mittels Dialyse (Blutwäsche) oder die Nierentransplantation bei geeignetem Spender. Unter Dialyse (aus dem Griechischen: Dialysis = Auflösung; künstliche Blutwäsche) versteht man Blutreinigungsverfahren, welche bei chronischer Nierenerkrankung im Stadium 5 ( $\text{GFR} < 15 \text{ ml/min/1,73m}^2$ ), bei akutem Nierenversagen, exogenen Intoxikationen sowie Leberversagen zum Einsatz kommen. Die heute in Deutschland angewendeten Dialyseverfahren unterscheiden sich grob in extrakorporale Dialyseverfahren wie der Hämodialyse (HD), der Hämofiltration (HF), der Hämodiafiltration (HDF) sowie der intrakorporalen Peritonealdialyse (PD). Mit ca. 88% ist die Hämodialyse das mit Abstand am häufigsten eingesetzte Dialyseverfahren in Deutschland. Die Hämodiafiltration hat einen Anteil von bis zu ca. 8%, die Hämofiltration nur etwa 0,5%. Etwa 5% der Patienten werden mit dem Peritonealdialyseverfahren behandelt (Frei and Schober-Halstenberg, 2006).

In der vorliegenden Arbeit werden Dialyseextrakte von einem Patienten mit Hämofiltration verwendet, daher wird im Folgenden nur das Prinzip dieses Verfahrens näher erläutert.

### 1.3.5 Prinzip der Hämofiltration



**Abbildung 5: Prinzip der Hämofiltration**

Das Verfahren der Hämofiltration ahmt die glomeruläre Filtration der Niere nach, bei der kleinmolekulare und eiweißfreie Plasmabestandteile durch die Basalmembran und das innere Blatt der Bowmann'schen Membran filtriert werden.

Bei der Hämofiltration wird in den extrakorporalen Blutkreislauf ein Hämofilter zwischengeschaltet, über dessen Filterkapillaren entlang eines transmembranösen Druckgefälles Flüssigkeit durch eine Kapillarmembran gepresst wird. Das Molekulargewicht der im Flüssigkeitsstrom gelösten Stoffe wird hierbei von den Membraneigenschaften definiert. Der Stofftransport erfolgt dabei nach dem Prinzip der Konvektion, im Gegensatz zu anderen Dialyseverfahren, bei denen der Stofftransport über Diffusion und Osmose erfolgt.

Das so gewonnene Ultrafiltrat entspricht dem Primärharn der Niere. Während in der Niere ein Großteil des Primärharns im Bereich der Henle'schen Schleife rückresorbiert und ein großer Flüssigkeitsverlust so vermieden wird, muss bei der Hämofiltration das entzogene Ultrafiltrat durch eine der Extrazellulärflüssigkeit entsprechende Lösung (Substitutionslösung) ersetzt werden. Die Substitutionslösung kann prinzipiell vor (Prädilution) oder hinter (Postdilution)

dem Hämofilter infundiert werden. Für die Prädilution (häufig in den USA angewendet) werden 70-100 l Substitutionslösung pro Behandlung verwendet. In Europa wird vor allem die Postdilution eingesetzt, bei der nur 30-40 l Substitutionslösung benötigt werden. Im Allgemeinen erfolgt die Behandlung etwa 3-mal pro Woche. Im Vergleich zur Hämodialyse ist die Effektivität der Elimination kleinmolekularer Substanzen, wie Kreatinin oder Harnstoff, zwar geringer (dies gilt vor allem bei der Postdilution), dafür werden Substanzen mit einem mittleren Molekulargewicht zwischen 1000-1500 kDa mit Hilfe der Hämofiltration weitaus besser eliminiert (Franz and Hörl, 1997).

Zur Thromboseprophylaxe des Patienten und zur Vermeidung von Koagulationen im Filtersystem sollte eine Hämofiltration, je nach Gerinnungsstatus des Patienten unter Antikoagulation, z.B. unter Heparintherapie erfolgen.

### **1.3.5 Hämofiltrat und die Verwendung als Blutplasmaäquivalent**

Das bei der Hämofiltration niereninsuffizienter Patienten anfallende Ultrafiltrat wird bereits seit einigen Jahren in der Forschung als geeignetes Blutplasmaäquivalent eingesetzt (Schulz-Knappe et al., 1996, Schulz-Knappe et al., 1997, Raida et al., 1999). Im Gegensatz zu direkten Versuchen mit Blutplasma bietet das Ultrafiltrat dabei einige entscheidende Vorteile. Zum einen wird das Filtrat im Gegensatz zum Blutplasma nicht für die medizinische Akutversorgung von Patienten benötigt, zum anderen fallen die für eine biochemische Aufbereitung notwendigen großen Mengen an Ausgangssubstrat bei der Hämofiltration als Abfallprodukt an. Schließlich können mit der Verwendung von Ultrafiltrat z.B. Erkenntnisse über das Risikopatientenkollektiv der chronisch Niereninsuffizienten gewonnen werden, ohne diese schwer erkrankten Patienten durch weitere invasive Maßnahmen oder Blutentnahmen zusätzlich zu belasten.

In der Literatur wird Hämofiltrat bereits seit einigen Jahren als geeignete Quelle zur genaueren Analyse und Identifikation von im Blutplasma enthaltenen zirkulierenden biologisch aktiven Peptiden beschrieben (Schulz-Knappe et al., 1997, Raida et al., 1999). Hierfür werden in einem standardisierten Verfahren zur Aufbereitung die im Hämofiltrat enthaltenen Peptide zunächst mittels Kationenaustauschchromatographie extrahiert und anschließend eine Auftrennung der Peptide entsprechend ihrer Hydrophobizität durch „Reversed Phase“ Chromatographie in verschiedene Fraktionen erreicht. Hierbei kommt es zu einer Anreicherung der Peptide in den einzelnen Subfraktionen. Die nach diesem Verfahren reproduzierbar zu erstellende Peptidbank stellt die Grundlage des sogenannten „Peptide Trappings“ dar (Schulz-Knappe et al., 1996). Unter „Peptide Trapping“ versteht man die Kartierung der zirkulieren-

den humanen Peptide anhand ihres charakteristischen Masse- und Elutionsverhaltens. Hierfür werden mit Hilfe von Massenspektrometrie die Fraktionen der Peptidbank analysiert und Peptide bis in den femtomolaren Teil erfasst.

Einzelne Peptide können danach chromatographisch aufgereinigt und sequenziert werden. Zu diesem Zweck werden die Fraktionen der Peptidbank mit den modernen Methoden der Massenspektrometrie analysiert. Zeigt der Abgleich der erhaltenen Aminosäuresequenz mit den zur Verfügung stehenden Datenbanken, dass es sich um ein neues Peptid handelt, wird die vollständige Primärstruktur aufgeklärt. Bisher wurden mit diesem Verfahren mehr als 300 Peptide des menschlichen Blutes isoliert und identifiziert (Schulz-Knappe et al., 1996). Darunter befinden sich erwartungsgemäß sehr viele bekannte Peptide oder Fragmente von Plasmaproteinen. Es wurden aber auch einige neue Peptide entdeckt, deren Sequenz in keiner Datenbank vorhanden war. Es handelt sich also beim „Peptide Trapping“ um eine sehr effiziente Strategie zur Identifizierung unbekannter humaner Peptide.

Aber nicht nur zur Identifizierung von Peptiden und Proteinen wird Hämofiltrat verwendet, auch zur Untersuchung des Risikofaktors „*chronische Niereninsuffizienz*“ wurde aufbereitetes Hämofiltrat bereits erfolgreich eingesetzt. So untersuchten Jankowski und Mitarbeiter den Einfluss von aufbereitetem Hämofiltrat chronisch niereninsuffizienter Patienten im Vergleich zu Plasma gesunder Kontrollpatienten auf die NO-Expression mononuklearen Leukozyten (Jankowski et al., 2003). Während es bei den Kontrollgruppen zu keinem Effekt kam, inhibierte das Hämofiltrat die NO-Expression. Analog zum Verfahren des „Peptide Trappings“ konnte schließlich Phenylacetat als ursächlicher Faktor für die NO-Hemmung identifiziert werden. Im Gegensatz zu den gesunden Probanden lag Phenylacetat bei den Probanden mit eingeschränkter Nierenfunktion in erhöhter Konzentration vor (Jankowski et al., 2003). Diese Untersuchung veranschaulicht, wie Hämofiltrat als Blutplasmaäquivalent eingesetzt und zur Identifizierung von urämischen Toxinen sowie zur Untersuchung der terminalen Niereninsuffizienz als Risikofaktor eingesetzt werden kann.

## 2 Fragestellung und Zielsetzung

Obwohl in den letzten Jahren zunehmend Erkenntnisse über den Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tendopathie gewonnen werden konnten, ist die Pathogenese noch nicht eindeutig geklärt. Von besonderer Relevanz scheint die Identifikation und Einschätzung von begleitenden Risikofaktoren für diese seltene unerwünschte Arzneimittelwirkung.

Im Fokus dieser Arbeit steht der Risikofaktor chronische Niereninsuffizienz. Insbesondere Patienten im fortgeschrittenen Krankheitsstadium (Stadium 5), bei denen eine Nierenersatztherapie in Form der Dialyse durchgeführt werden muss, haben ein erhöhtes Risikoprofil. Ziel dieser Arbeit ist es daher, ein *in vitro* Sehnenzellkulturmodell zur Simulation des Risikofaktors chronische Nierenerkrankung zu etablieren. Mit Hilfe dieses Modells sollen in Versuchen neue Erkenntnisse zum Mechanismus der Tendotoxizität von Chinolonen und den Einfluss des Risikofaktors „chronische Nierenerkrankung“ gewonnen werden.

Zur Simulation der chronischen Niereninsuffizienz bietet sich die Verwendung von Ultrafiltrat an, welches bei der Hämofiltration chronisch niereninsuffizienter Patienten anfällt. Dieses Ultrafiltrat stellt ein Blutplasmaäquivalent dar, welches zunehmend auch als geeignetes Ausgangssubstrat zur Isolierung und Identifizierung von biologisch aktiven Stoffen verwendet wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde Ultrafiltrat eines chronisch niereninsuffizienten Patienten verwendet. Die Patientendaten wurden anonymisiert. Bekannt war, das Parathormon und Calcium des Dialyse Patienten im Normbereich lagen. So konnte der Einfluss eines Hyperparathyroidismus als Risikofaktor für die Cinolon-induzierte Tendopathie reduziert werden. Das Filtrat wurde biochemisch in unterschiedliche Filtratfraktionen aufbereitet.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen *in vitro* Versuche mit humanen Tenozyten (Primärkulturen) neue Erkenntnisse zum Mechanismus der Tendotoxizität von Chinolonen und Ultrafiltrat allein und in Kombination hervorbringen. Das Arbeiten mit humanen primären Sehnenzellkulturen hat sich als geeignetes Versuchsmodell am Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Charité Universitätsmedizin Berlin bereits bewährt. Zur Analyse sollten morphologische (Lichtmikroskop) sowie immunhistochemische und biochemische (Western Blot) Methoden angewendet werden.

Als Modellsubstanz wurde das im medizinischen Alltag häufig verwendete Fluorchinolon Ciprofloxacin in verschiedenen Konzentrationen einzeln und in Kombination mit Ultrafiltrat

untersucht. Die verwendeten Konzentrationen orientierten sich an den unter therapeutischen Bedingungen im menschlichen Organismus erzielten Spitzenkonzentrationen im Blutplasma. Nachdem in Vorversuchen unter lichtmikroskopischer Untersuchung eine primäre Unverträglichkeit des Ultrafiltrats auf die Zellen ausgeschlossen wurde, konnte die Konzentration des Ultrafiltrats auf 10% des Gesamtvolumens an Zellkulturmedium festgelegt werden.

Zusammenfassend ergaben sich für diese Arbeit folgende Fragestellungen und Zielsetzungen:

- Lässt sich Hämofiltrat als biochemisch aufbereitetes Ultrafiltrat für Versuche mit humanen Tenozyten *in vitro* verwenden?
- Kommt es unter Ultrafiltratexposition bei humanen Tenozyten zu einem Effekt auf Marker der Syntheseleistung von Tenozyten (Collagen Typ I, Fibronectin)?
- Liegt ein synergistischer oder additiver Effekt von Ultrafiltrat und Ciprofloxacin bei kombinierter Exposition auf humane Tenozyten *in vitro* vor?
- Kann der Risikofaktor chronische Nierenerkrankung durch die Verwendung von Ultrafiltrat und humanen Tenozyten in einem Zellkulturmodell simuliert werden?

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Material

#### 3.1.1 Geräte

Geräte	Hersteller
Analysenwaage Navigator <sup>TM</sup>	Sartorius, Göttingen
Autoklav, Tuttnauer 3870 ELV PV	Biomedis, Gießen
Axiophot Lichtmikroskop	Zeiss, Jena
Bidestanlage	Millipore, Billerica, USA
Blotting-Einheiten	Bio-Rad, München
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Calibrated Densitometer GS-800	Bio-Rad, München
Cellspin I (1205-14)	Thermac, Waldsolms
Cryo Freezing Container (Einfrierbox)	Nalgene, Rochester, NY, USA
Dewargefäß	KGW Isotherm, Karlsruhe
Elektrophorese-Einheiten	Bio-Rad, München
Flow bench NU 425-400	NuAire, Plymouth, MN, USA
Heizschrank/Wärmeschrank	Heraeus, Hanau
LiChroprep <sup>®</sup> Lobar <sup>®</sup> Größe A (40-63 µm)	Merck, Darmstadt
Magnetrührer mit Heizplatte	Janke und Kunkel, Staufen
Magnetrührer MR 2002	Brand, Wertheim
Neubauer-Zählkammer	Schott, Jena
pH-Meter Lab 850	Schott, Jena
Photometer, Ultrospec III	Pharmacia, Wien, Österreich
Pipetboy	IBS Integra, Schweiz
Power PAC 200 (Stromgeber)	Bio-Rad, München
Präzisionswaage 2001 MP2	Sartorius, Göttingen
Research Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Schüttelwasserbad	MGW Lauda CS20, Königshofen, Österreich
Schüttler 3005	Heidolph, Th. Karow, Berlin
Schüttler IKA-VIBRAX-VXR	Janke und Kunkel, Staufen
Thermostat 3401	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge (Laborfuge A)	Heraeus, Hanau
Tischzentrifuge Eppendorf centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Memmert, Schwabach
Vortex (Genie 2)	Scientific Industries, Darmstadt

### 3.1.2 Reagenzien und Verbrauchsmaterialien

Reagenzien/ Verbrauchsmaterialien	Hersteller
ACN (Acetonitril)	Merck, Darmstadt
30% Acrylamid / Bis Solution 37,5 :1 (2,6% C)	Bio-Rad, München
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad, München
Amphotericin B (250 µg/ml)	Biochrom, Berlin
BC Assay Kit	Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich
BCIP / NBT Solution	Uptima Interchim, Montlucon, Frankreich
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, München
BSA	Sigma-Aldrich, München
Cellclip	Thermac, Waldsolms
Cellfunnel	Thermac, Waldsolms
Cellspin Filtercards	Thermac, Waldsolms
Ciprobay® 400 Infusionslösung	Bayer AG, Leverkusen
Cryoröhrchen	Nunc, Wiesbaden
DermaClean, Einmal-Untersuchungshandschuhe	Ansell, Bangkok, Thailand
Dimethylsulfoxid, getrocknet max. 0,05% H <sub>2</sub> O	Merck, Darmstadt
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Biochrom, Berlin
Eppendorf epT.I.P.S., verschiedene Grössen	Eppendorf, Hamburg
Ethanol (96%) reinst	Merck, Darmstadt
Falcon Serologische Pipetten 5 und 10 ml	Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA
Fötales Kälberserum (FKS)	Biochrom, Berlin
Gel-Blotting-Papier	Schleicher und Schuell, Dassel
Glukose	Merck, Darmstadt
L-Glutamin (200 mM)	Biochrom, Berlin
Glycin	Merck, Darmstadt
Ham's F-12 Medium (Ham's F-12)	Biochrom, Berlin
Hank's Salt Solution	Biochrom, Berlin
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaleidoskope prestained standards (= Kaleidoskopstandard)	Bio-Rad, München
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Roth, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> ) min 99,0%	Merck, Darmstadt

---

MEM-Amino Acids (= Aminosäuren (50x) ohne L-Glutamin)	Biochrom, Berlin
Methanol	Merck, Darmstadt
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ )	Roth, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl) min 99,5%	Sigma-Aldrich, München
Natronlauge (NaOH)	Merck, Darmstadt
Nunc EasyFlask™, 25 und 75 cm <sup>3</sup> (= Kulturflaschen)	Nunc, Wiesbaden
Nunclon™ Zellkulturschalen 8,8 cm <sup>2</sup>	Nunc, Wiesbaden
Parafilm	American National Can, Neenah, WI, USA
Pasteur Pipetten	Brand GmbH & Co, Wertheim
PBS Dulbecco (1x) mit $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	Biochrom, Berlin
Penicillin/Streptomycin 10000 U / 10000 µg/ml	Biochrom, Berlin
Pepstatin	Roche Diagnostics, Mannheim
Phenylmethylsulfonylfluorid	Sigma-Aldrich, München
Reagenzgläser	Hecht-Assistent, Sondheim
Reaktionsgefäße	Brand GmbH + Co, Wertheim
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Skim Milk Powder (= Magermilchpulver)	Fluka, Buchs, Schweiz
Sodium dodecyl sulfate (= Natriumdodecylsulfat)	Bio-Rad, München
Softa-Man®	Braun, Melsungen
sterile Röhrchen	Nunc, Wiesbaden
Styrol	Merck, Darmstadt
TEAA (Triethylammonium Acetat)	Sigma-Aldrich, München
TEMED	Bio-Rad, München
Trispuffer Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma-Aldrich, München
Triton X 100	Sigma-Aldrich, München
Trizma® Base	Sigma-Aldrich, München
Trypsin / EDTA Solution in PBS 0,05% / 0,02% (w/v) ohne $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	Biochrom, Berlin
Tween® 20	Bio-Rad, München
Vitamin C	Merck, Darmstadt

---

### 3.1.3 Antikörper

In der folgenden Tabelle sind die Antikörper aufgeführt, die für die biochemischen Nachweisverfahren Western Blot und Immunhistochemie verwendet wurden.

Antikörper		Katalognummer	Hersteller
<b>Primär-Antikörper</b>			
Anti-Collagen I	Polyklonal	2150-0020	AbD Serotec, Raleigh, USA
Anti- Fibronectin	Monoklonal	AB1926	Chemicon, Temecula, USA
<b>Sekundär-Antikörper für Western Blot</b>			
Sheep anti-rabbit IgG	Gegen polyklonale Primärantikörper	AP304A	Chemicon, Temecula, USA
Sheep anti-mouse IgG	Gegen monoklonale Primärantikörper	AP326A	Chemicon, Temecula, USA
<b>Sekundär-Antikörper für Immunhistochemie</b>			
GAR-FITC	Gegen polyklonale Primärantikörper	AP156F	Chemicon, Temecula, USA
GAM-FITC	Gegen monoklonale Primärantikörper	AP 160F	Chemicon, Temecula, USA

### 3.1.4 Kulturmedien und Lösungen

#### 3.1.4.1 Medien

##### Kulturmedium

Das für die Kultivierung der humanen Tenozyten verwendete Wachstumsmedium bestand zu gleichen Anteilen aus Ham's F-12 Medium (Ham's F-12) und Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) sowie folgenden weiteren Zusätzen:

Reagenzien Kulturmedium	Prozentualer Anteil am Gesamtvolumen
FKS	5% oder 10% (nach Verwendungszweck)
Penicillin/Streptomycin (10.000 U / 10.000 µg/ml)	1%
Amphotericin B (250 µg/ml)	1%
Aminosäuren (50x)	1%
Vitamin C (25 µg/ml)	1%
Glutamin (200 mM)	1%

Für die Zellkultivierung und Zellpassagierung betrug der prozentuale Gehalt an fötalem Kälberserum (FKS) im Kulturmedium 10% des Gesamtvolumens.

Bei Versuchsdurchführung wurde für die ersten 24 h nach Umsetzung der Zellen auf Petrischalen oder kleine Zellkulturflaschen ebenfalls Kulturmedium mit einem FKS-Gehalt von 10% verwendet, um eine ausreichende Adhäsion durch Anwachsen der Zellen auf Petrischale und Kulturflaschenboden zu gewährleisten. Anschließend wurde für die verbleibende Versuchsdauer nur Kulturmedium mit reduziertem FKS-Gehalt (5%) verwendet.

Aus Vorversuchen ergab sich die Notwendigkeit, dem Kulturmedium antibiotische (Penicillin/Streptomycin) und antimykotische (Amphotericin B) Zusätze zuzufügen, um eine Besiedlung durch Bakterien und Pilze zu vermeiden.

### **Einfriermedium**

Um die humanen Tenozyten langfristig in flüssigem Stickstoff zu lagern, wurden die Zellen in einem Medium aus DMEM mit folgenden Zusätzen eingefroren:

<b>Reagenzien Einfriermedium</b>	<b>Prozentualer Anteil am Gesamtvolumen</b>
FKS	10%
DMSO	10%
Penicillin/Streptomycin (10000 U / 10000 µg/ml)	1,1%
Glukose (20%)	0,5%

### **3.1.4.2 Lösungen**

#### **Lösungen für Western Blot**

##### **Zellysepuffer**

Der für das Western Blot Verfahren notwendige Abbau der Sehnenzellen wurde mittels Lysepuffer erzielt. Hierfür wurde zunächst eine Stammlösung aus Aqua bidest. mit folgenden Komponenten erstellt:

Reagenzien Zelllysepuffer	Prozentualer Anteil/Konzentration
Triton X 100	1%
SDS (20%)	0,1%
NaCl	150 mM
Tris-HCl (1 M, pH 7,2)	50 mM
PMSF	1 mM
Pepstatin	5 µg/ml

Die Proteinaseinhibitoren PMSF und Pepstatin wurden erst kurz vor Gebrauch hinzugefügt, um eine mögliche Denaturierung zu verhindern.

### Polyacrylamidgele

Für die Proteinanalyse mittels Western Blot Verfahren wurden unterschiedliche Polyacrylamidgele (Trenngele) gegossen. Der prozentuale Anteil von Acrylamid und der weiteren verwendeten Komponenten richtete sich dabei nach dem Molekulargewicht des nachzuweisenden Proteins.

Über das Trenngel wurde ein Sammelgel geschichtet, welches zu einer Aufkonzentrierung der Proben und für eine verbesserte Auflösung der Banden sorgt. Um eine zu frühe Polymerisation und Aushärtung des Gels zu verhindern, wurden die Polymerisationsbeschleuniger APS und TEMED erst unmittelbar vor dem Einfüllen des Gelkomponenten-Gemisches hinzugegeben.

Reagenzien Trenngele:	Trenngel 5%	Trenngel 7,5%
Acrylamid (30%)	1,65 ml	2,5 ml
Tris Puffer pH 8,8 (1M)	2,25 ml	2,5 ml
SDS (20%)	50 µl	50 µl
Aqua dest.	5,7 ml	4,85 ml
APS (5%)	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl

<b>Reagenzien Sammelgel :</b>	<b>Sammelgel 4%</b>
Acrylamid (30%)	0,67 ml
Tris Puffer pH 8,8 (1M)	1,25 ml
SDS (20%)	25 µl
Aqua dest.	3 ml
APS (5%)	50 µl
TEMED	10 µl

<b>Tris Puffer</b>	<b>Reagenzien</b>	<b>pH</b>
<b>Tris Puffer für Trenngel</b>	Trizma <sup>®</sup> Base 1 M in Aqua dest.	pH 8,8
<b>Tris Puffer für Sammelgel</b>	Trizma <sup>®</sup> Base 1 M in Aqua dest.	pH 6,8
<b>Tris Puffer für Western Blot</b>	Trizma <sup>®</sup> Base 0,1 M MgCl <sub>2</sub> 0,05 M NaCl 0,1 M in Aqua dest.	pH 9,5

<b>Weitere Pufferlösungen für Western Blot</b>	<b>Reagenzien</b>	<b>Prozentualer Anteil am Gesamtvolumen</b>
<b>Laufpuffer 10-fache Konzentration (Elektrophorese)</b>	in Aqua dest.	
	Trizma <sup>®</sup> Base	3%
	Glycin	14,42%
	SDS	1%
<b>Transferpuffer 2-fache Konzentration (Western Blot)</b>	in Aqua dest.	
	Trizma <sup>®</sup> Base	0,25%
	Glycin	1,13%
	Methanol	5%
<b>Blockpuffer (Western Blot)</b>	in PBS	
	Magermilchpulver	5%
	Tween 20	0,1%

### Probenpuffer pH 6,8 (5x)

Der verwendete Probenpuffer sorgte zum einen für eine Beschwerung der in der Probe enthaltenen Proteine, zum anderen dient er durch eine farbliche Markierung als Hilfsmittel zur Orientierung bei der SDS-Gelelektrophorese und dem Transfer. Für die Herstellung des Probenpuffers wurde zunächst SDS in EtOH und Aqua dest. bei Raumtemperatur gelöst und anschließend mit Trispuffer Hydrochlorid versetzt und auf einer Heizplatte in Lösung gebracht. Nach Zugabe von Glycerol und Bromphenolblau kam es zu einem Farbumschlag nach grünrot. Durch die pH-Einstellung mit NaOH auf pH 6,8 wurde die Lösung dunkelblau.

Reagenzien Probenpuffer	Prozentualer Anteil am Gesamtvolumen
SDS	10%
Glycerol (87%)	35%
Ethanol (96%)	25%
Bromphenolblau	0,025%
Trispuffer HCl	1,5 M

### Lösungen für Reversed-Phase-Chromatographie

Puffer A	Konzentration
TEAA	40 mM
in Aqua bidest.	

Puffer B	Konzentration
Acetonitril (ACN)	20%
Acetonitril (ACN)	40%
Acetonitril (ACN)	60%
Acetonitril (ACN)	80%
Acetonitril (ACN)	100%
in Aqua bidest.	

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Tenozyten Zellkultur

#### 3.2.1.1 Gewinnung und Kultivierung von menschlichen Sehnenzellen

Die für das Zellkulturmodell verwendeten Primärkulturen wurden aus humanem Sehnenmaterial generiert, das als überschüssiges Operationsmaterial unfallchirurgischer Eingriffe angefallen ist. Aufgrund einer nur begrenzten Verwendbarkeit der eingefrorenen Zellen wurde im Rahmen dieser Arbeit Sehnenmaterial verschiedener anonymisierter Spender verwendet. Das Material entstammte aus der Patella und einer Fingersehne.

Die Gewinnung der Sehnenzellen erfolgte durch ein nicht-enzymatisches Verfahren, bei dem das Sehnenstück zunächst, um das Risiko einer Kontamination mit Mikroorganismen zu verringern, dreimalig mit einer Penicillin-, Streptomycin- sowie Amphotericin-B-Lösung gespült wurde. Anschließend erfolgte, um eine Mischkultur insbesondere mit Fibroblasten zu vermeiden, die sorgfältige präparative Entfernung des Peritendineums. Die so präparierte/vorbereitete Sehne wurde in kleine Stücke (2-4 mm) zerteilt und bedeckt mit Kulturmedium in einem sterilen Inkubator bei 37° C und unter Begasung mit 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Nach Adhäsion der Sehnenstücke erfolgte alle 3 Tage ein Mediumwechsel. Nach etwa 10 Tagen konnte unter dem Lichtmikroskop eine erste Migration von Sehnenzellen aus den Sehnenstücken beobachtet werden. Diese Zellen entsprachen einer Passage 0. Nach weiteren 1-2 Wochen wurden die Sehnenstücke entfernt und die Sehnenzellen zur weiteren Vermehrung passagiert oder für die spätere Verwendung eingefroren.

#### 3.2.1.2 Zellpassagierung

Die Arbeit erfolgte unter keimarmen Bedingungen unter dem Laminar Air Flow. Unter dem Lichtmikroskop wurden die Kulturflaschen zunächst auf Verunreinigungen überprüft und das Zellwachstum eingeschätzt. Zur Passagierung sollten die Tenozyten als überwiegend konfluente Zellmonolayer (Konfluenzgrad 70-80%) auf dem Flaschenboden gewachsen sein. Die Umsetzung erfolgte abhängig vom Zellwachstum zumeist in einem Drei-Tagesrhythmus (Montag, Mittwoch, Freitag). Aus einer Kulturflasche konnten 2 bis maximal 3 neue Flaschen angesetzt werden. Zunächst wurde das alte Kulturmedium aus den Flaschen entfernt und die Flaschen einmalig mit PBS w/o (ohne Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup>) gespült. Um eine Ablösung der Zellen von dem Kulturflaschenboden zu erreichen, wurden je Flasche 2 ml Trypsin hinzugefügt, der gesamte Flaschenboden gleichmäßig damit benetzt, das überschüssige Trypsin abgekippt und bis

zur Ablösung für etwa 3-5 min im Brutschrank inkubiert. Der enzymatische Ablösungsprozess wurde anschließend durch vorsichtiges mechanisches Klopfen gegen die Flasche unterstützt. Durch Zugabe von Kulturmedium wurde die Enzymreaktion anschließend gestoppt und die Zellen mittels einer Pipette aufgenommen und vereinzelt. Die Verteilung der Sehnenzellen auf bereits mit Kulturmedium (10 ml) befüllte Zellkulturflaschen erfolgte in einem Verhältnis 1:2 bzw. 1:3. Bei höheren Passagezahlen kann es zu einem für die Versuche ungünstigen, deutlich langsameren Zellwachstum und Zellsyntheseumsatz kommen, daher wurden für diese Arbeit nur Zellen bis Passage 11 verwendet.

### **3.2.1.3 Einfrieren von Sehnenzellen**

Kulturflaschen mit konfluenten Zellmonolayern wurden zweifach mit 10 ml Hanks-Salt Solution (ohne  $\text{Ca}^{2+}$ /  $\text{Mg}^{2+}$ ) gespült. Anschließend wurden die Zellen enzymatisch mit Trypsin vom Flaschenboden gelöst. Durch Aufziehen und Ablassen mittels einer Pipette wurde daraus eine Zellsuspension hergestellt. Die Zellsuspensionen mehrerer Kulturflaschen wurden in sterilen Röhrchen vereint, bei 1000 Umdrehungen/min und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert und der Überstand anschließend abgezogen. Um möglichst alle Trypsinreste aus dem Zellpellet herauszuwaschen, wurde der Spül- und Zentrifugationsvorgang nochmals wiederholt, das verbleibende Zellpellet in frisch hergestelltem Einfriermedium resuspendiert und je 1,5 ml der Zelllösung in Cryoröhrchen überführt. Die Cryoröhrchen konnten anschließend in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox (Cryobox) für 24 h bei  $-80^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und anschließend in flüssigem Stickstoff bei  $-196^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. Bei längerer Lagerung ist es zu einem deutlich langsameren Zellwachstum gekommen. Daher wurden für Versuche nur Zellen mit einer Lagerung weniger als 6 Monate verwendet.

### **3.2.1.4 Auftauen von Sehnenzellen**

Bei Bedarf konnten die eingefrorenen Proben schonend aufgetaut werden. Hierfür wurden die zuvor im flüssigen Stickstoff gelagerten Cryoröhrchen zunächst in lauwarmem Wasser langsam aufgetaut. Anschließend wurde der gesamte Röhrcheninhalt in 10% Kulturmedium suspendiert und in Kulturflaschen überführt. Das im Einfriermedium enthaltende DMSO kann zu Schäden an der aufgetauten Zelle führen. Daher erfolgte 24 h nach dem Auftauen der Proben ein Wechsel des Mediums, um letzte Reste des Einfriermediums zu entfernen. Im Anschluss konnten die Zellen weiter zur Zellpassagierung oder für Versuche verwendet werden.

### **3.2.1.5 Zellzahlbestimmung**

Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der Neubauer Zählkammer. Hierzu wurde zunächst die Lösung der Zellen aus den Kulturflaschen mit Trypsin nach dem gleichen Verfahren wie auch schon beim Passagieren und Einfrieren der Zellen angewendet. Die in Kulturmedium suspendierten Zellen wurden in sterile Röhrchen überführt und bei 1000 U/min und bei 4° C für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurde die Flüssigkeit über dem Zellpellet vorsichtig soweit abpipettiert, bis nur noch ca. 1 ml im Röhrchen verblieb. Mittels einer Pipette wurden die Zellen durch sehr vorsichtiges Ansaugen und Ablassen wieder in Suspension gebracht, um Schäden an den Zellen zu vermeiden. Auf die äußeren Längsbalken der Neubauer Zählkammer wurde jeweils ein kleiner Tropfen Wasser gegeben und das Deckgläschen sehr vorsichtig angedrückt, bis im Licht so genannte Newton'sche Ringe zu sehen waren. Ein Tropfen der Zellsuspension wurde an das untere Ende der Zählkammer getropft und durch Unterdruck zwischen Zählkammer und Deckgläschen angesaugt. Unter dem Lichtmikroskop konnte nun die Zellzahl auf den 4 Quadranten der Zählkammer, bestehend aus jeweils 16 kleineren Unterquadranten, ausgezählt und zur Gesamtzellzahl addiert werden. Zur Errechnung der Zellzahl pro ml erfolgte nun die Division durch 4 und Multiplikation mit  $10^4$  (Gesamtzellzahl / 4 x  $10^4$ ). Die Zielzellzahl für Versuche mit Tenozyten lag bei 15.000-20.000 Zellen/ml.

## **3.2.2 Hämofiltrat (HF)**

### **3.2.2.1 Gewinnung des Hämofiltrats (HF)**

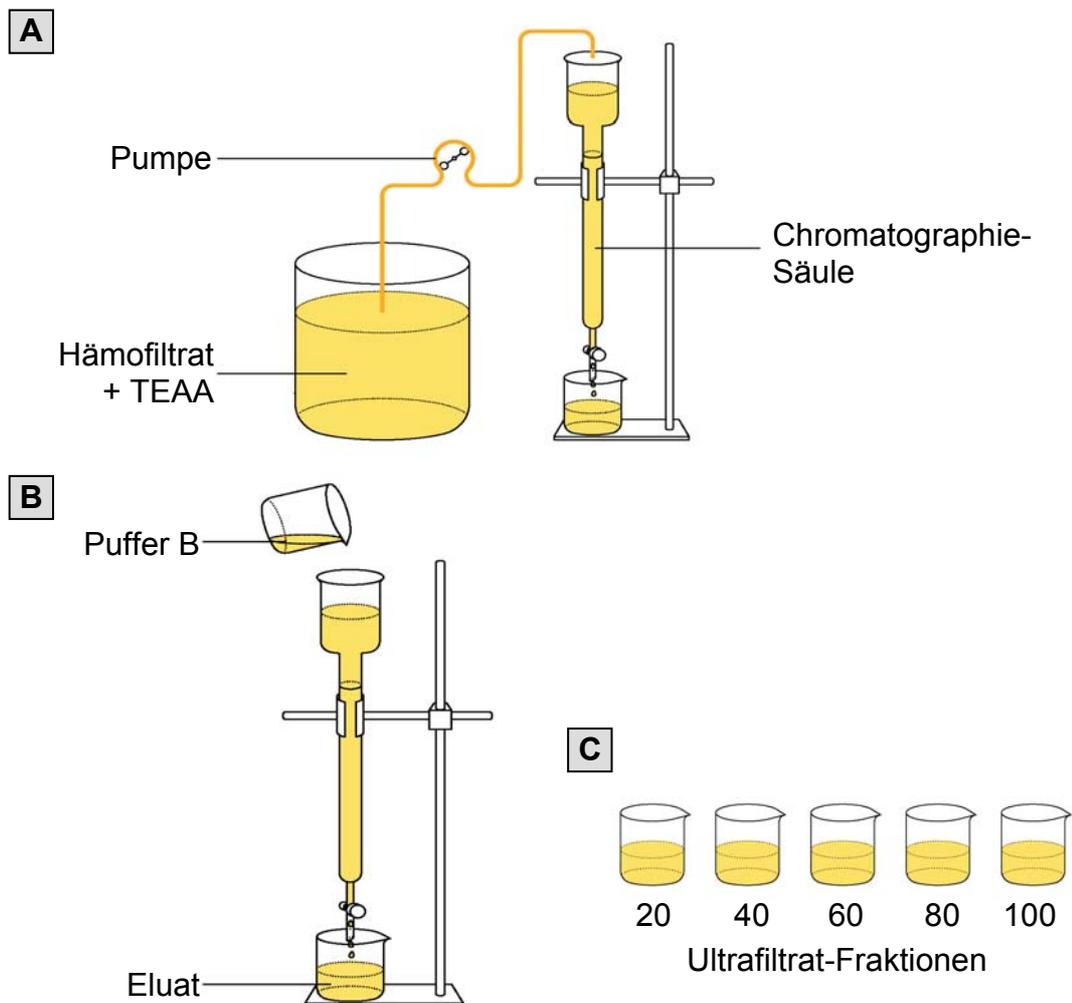
Das Hämofiltrat wurde von der Medizinischen Klinik IV für Nephrologie und Endokrinologie der Charité Universitätsmedizin Berlin, Campus Benjamin Franklin, zur Verfügung gestellt. Das Filtrat wurde in anonymisierter Form übergeben. Bekannt war, dass es sich um einen chronisch nierenerkrankten (Stadium 5) Patienten handelte. Calcium- und Parathormonspiegel im Serum lagen im Normbereich.

### **3.2.2.2 Biochemische Aufbereitung des Ultrafiltrats (UF)**

Der erste Schritt der Aufbereitung bestand in einer Aufkonzentrierung mittels Reversed-Phase-Chromatographie. Zur Vorbereitung wurde die LiChroprep<sup>®</sup> Chromatographie-Säule mit 300 ml (5-faches Säulenvolumen) Puffer A äquilibriert und ein Ausgangsvolumen von 5 Litern der Hämofiltratprobe mit Triethylammoniumacetat (TEAA) zu einer Endkonzentration von 40 mM TEAA versetzt. Der Probenauftrag erfolgte über Nacht bei einer Flussrate von 1

ml/min. Anschließend wurde die Säule mit 250 ml Puffer A Lösung gespült, um nicht-gebundene Substanzen auszuspülen (Abbildung 6, A).

Die Elution der aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften in der Chromatographie-Säule gebundenen Substanzen erfolgte stufenweise mit je 100 ml von Puffer B in den jeweils unterschiedlichen Konzentrationen 20%, 40%, 60%, 80% und 100% (Abbildung 6, B). Das hierbei entstandene Eluat (Elutionsstufen) wurde in 2 Fraktionen von jeweils 50 ml aufgefangen, mit jeweils 50 ml Bidest-Wasser versetzt und sofort bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Im Anschluss konnten die gefrorenen Eluat-Proben gefriergetrocknet (lyophilisiert) und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert werden. In einem letzten Schritt wurde jede Eluatprobe in 100 ml Bidest-Wasser aufgelöst und in 10 Probenröhrchen à 10 ml fraktioniert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert (Abbildung 6, C). Die Benennung der gewonnenen Ultrafiltrat-Fractionen richtete sich nach dem im Elutionsprozess verwendeten ACN-Gehalt im Puffer B (20%-, 40%-, 60%-, 80%-, 100%-iges ACN). Im Folgenden wird daher beispielsweise die Bezeichnung Ultrafiltrat-20 für die durch 20%-iges ACN eluierte Fraktion verwendet.



**Abbildung 6: Aufbereitung des Hämofiltrats in verschiedenen Ultrafiltrat-Fractionen**

### 3.2.3 Versuchsaufbau für die Inkubation mit Testsubstanzen

Ziel der Versuchsreihe war es, zeit- und konzentrationsabhängige Effekte von Ultrafiltrat und Ciprofloxacin allein und in Kombination auf humane Tenozyten *in vitro* darzustellen. Da es zu den Versuchen mit Ultrafiltrat keine Erfahrungswerte gab, wurde eine Reihe von Vorversuchen durchgeführt. Hierbei wurde die Verträglichkeit von Ultrafiltrat mit dem verwendeten Zellmedium ausgetestet, ein Vergleich von steril filtrierten und unfiltrierten Proben sowie eine mögliche sofortige zytotoxische Wirkung des Ultrafiltrats auf die Sehnenzellen ausgeschlossen. Für alle Versuche wurden zunächst die primären humanen Tenozyten als Monolayer in Kulturflaschen gezüchtet. Nach 24 h erfolgte eine Umstellung auf ein Kulturmedium mit 5% FKS Konzentration. Nach weiteren 24 h konnte die Inkubation mit den Testsubstanzen erfolgen. Alle Versuche erfolgten im Doppelansatz.

#### Untersuchung der Effekte von Ultrafiltrat auf humane Tenozyten *in vitro*

Für die Untersuchung der Effekte von Ultrafiltrat auf humane Tenozyten wurden Ultrafiltrat-20, -40, -60, -80, und -100 in 10%-iger Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (Kulturmedium) getestet.

Testsubstanzen:	Kontrolle**	UF*-20	UF*-40	UF*-60	UF*-80	UF*-100
Inkubationszeit 24 h	-	-	-	-	-	-
Inkubationszeit 72 h	-	-	-	-	-	-

\*UF = Ultrafiltrat 10%-ige Konzentration

\*\*Kontrolle = Kulturmedium mit 5%-FKS-Konzentration

#### Untersuchung der Effekte von Ciprofloxacin auf humane Tenozyten *in vitro*

Die Untersuchung der Effekte von Ciprofloxacin auf Tenozyten erfolgte mit 1, 3, 10 und 30 mg Ciprofloxacin/l Medium.

Testsubstanzen:	Kontrolle**	C*-1 mg/l	C*-3 mg/l	C*-10mg/l	C*-30mg/l
Inkubationszeit 24 h	-	-	-	-	-
Inkubationszeit 72 h	-	-	-	-	-

\*C = Ciprofloxacin in mg/l Kulturmedium

\*\* Kontrolle = Kulturmedium mit 5%-FKS-Konzentration

### Untersuchung der Effekte einer kombinierten Inkubation von Ultrafiltrat-40 und Ciprofloxacin auf humane Tenozyten *in vitro*

Die kombinierte Behandlung von Tenozyten wurde mit Ciprofloxacin in einer Konzentration von 10 und 30 mg/l Medium und Ultrafiltrat-40 durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 72 h.

Testsubstanzen:	Kontrolle**	UF*-40
Kontrolle**	-	-
Ciprofloxacin 10 mg/l	-	-
Ciprofloxacin 30 mg/l	-	-

\*UF = Ultrafiltrat 10%-ige Konzentration

\*\*Kontrolle = Kulturmedium mit 5%-FKS-Konzentration

Die verwendeten Ciprofloxacin-Konzentrationen 1-3 mg/l entsprechen den gemessenen Spitzenkonzentrationen im Plasma bei Gabe einer Standarddosis (500 mg Ciprofloxacin oral) in einer Behandlungssituation (Dudley, 2003). Da nach intravenöser Gabe auch deutlich höhere Spiegel erreicht werden können und da bei Chinolonen eine gewisse Tendenz zur Anreicherung im Bindegewebe bekannt ist, wurden auch höhere Konzentrationen (10, 30 mg/l) getestet (van Zanten et al., 2008).

Die Probenentnahme für die Versuche der Sehnenzellen und Ultrafiltrat, bzw. Ciprofloxacin allein erfolgte jeweils nach 24 und nach 72 Inkubationsstunden. Der Versuchsaufbau für die kombinierte Inkubation mit Ultrafiltrat und Ciprofloxacin sah nur eine Probenentnahme nach 72 h vor.

Die Endkonzentrationen wurden nach folgendem Schema durch Verdünnung der handelsüblichen Infusionslösung Ciprobay® 400 erzielt:

Konzentration Ciprofloxacin	Verdünnungsfaktor
2000 mg/1000 ml	Ausgangskonzentration
100 mg/l	1:20
30 mg/l	1:3,33
10 mg/l	1:3
3 mg/l	1:3,33
1 mg/l	1:3,33

### **3.2.4 Lichtmikroskopie**

Die Tenozyten wurden nach Inkubation mit Ultrafiltrat nach 2h, 24 h, 48h und 72 h unter dem Lichtmikroskop beurteilt. Fotografien wurden nach 24 und 72 h bei einer Vergrößerung von 200 x angefertigt.

## **3.3 Immunhistochemische und biochemische Untersuchungen**

### **3.3.1 Immunhistochemie**

Mit Hilfe von Antikörpern können im Rahmen der durchgeführten immunhistochemischen Untersuchung Proteine nachgewiesen werden. Dabei wird ein Antikörper eingesetzt, der an das Protein ankoppelt. Ein sekundärer mit einem fluoreszierenden Stoff versehener Antikörper koppelt wiederum am ersten Antikörper an und macht dadurch die Proteine sichtbar.

Für diese Untersuchung war es nicht erforderlich, die zu untersuchenden Proben zu lysieren. Dadurch war auch eine Lokalisierung der nachzuweisenden Proteine innerhalb der Zelle möglich. Dies ist im nachfolgend ebenfalls beschriebenen Western Blot Verfahren dagegen nicht möglich.

Für den immunhistochemischen Nachweis wurden die humanen Tenozyten nach Behandlung mit den Testsubstanzen mittels Trypsin enzymatisch aus den Kulturflaschen gelöst und in Reagenzröhrchen überführt. Da es aufgrund der Behandlung mit den Testsubstanzen zu unterschiedlich starkem Zellwachstum kam, wurde durch Zellzählung und anschließender Verdünnung eine gleiche Zellzahl pro Probe hergestellt.

#### **3.3.1.1 Cytospin**

Die Cytospin-Methode ermöglicht über die Nutzung der Zentrifugalkraft ein konzentriertes Auftragen der Zelllösung auf ein definiertes Areal des Objektträgers.

Hierbei wurden die Zellen enzymatisch aus den Kulturflaschen gelöst und bei 1000 U/min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in PBS w/o (ohne  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ ) aufgelöst und mittels Cytospin auf die Objektträger übertragen.

Ziel war es, gerade so viele Zellen in Lösung aufzutragen, dass sich nach Übertragung auf den Objektträger keine Zellüberlappungen oder Verklumpungen bildeten.

Nach mindestens zweistündiger Trockenphase bei Raumtemperatur erfolgte für 10 min ein Fixierbad in 100% Aceton. Nach erneuter Trocknung waren die Zellen für mehrere Monate haltbar.

Die enzymatische Ablösung mit Trypsin, die Einwirkung der Zentrifugalkräfte des Cytospin und die Fixierung mit Aceton bewirken einen Verlust der für Sehnenzellen typischen spindelförmigen Morphologie. Die Zellen erscheinen nun unter dem Lichtmikroskop rundlich.

### **3.3.1.2 Durchführung und Auswertung der immunhistochemischen Untersuchung**

Nachdem die Zellen über das Cytospin-Verfahren auf Objektträger aufgetragen und fixiert worden waren konnte die immunhistochemische Behandlung erfolgen. Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken wurde zunächst eine 15minütige Inkubation der fixierten Proben mit 0,5% BSA in PBS in einer Färbekammer durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Proben zweimal jeweils 10 Minuten in PBS vorsichtig gewaschen, anschließend getrocknet und mit 10µl Antikörper behandelt.

Bei höheren Antikörperkonzentrationen entstanden deutlich mehr unspezifische Färbungen. Aus diesem Grund wurden nur Ergebnisse der Ansätze mit Antikörperkonzentrationen von 1:30 und 1:50 ausgewertet.

Anschließend wurden die Proben zwei Stunden inkubiert und zweimal bei Raumtemperatur gespült. Danach erfolgte die Auftragung des sekundären Antikörpers für 60 Minuten ebenfalls bei Raumtemperatur. Außerdem wurde eine Kontrolle angesetzt, die nur mit dem sekundären Antikörper inkubiert wurde. Um das Austrocknen und Auskristallisieren des sekundären Antikörpers zu verhindern, wurden die Proben nach nochmaligem Spülen mit einem Tropfen 0,1% p-Phenylendiamin in Glycerin/PBS benetzt. Das Fotografieren der Proben, erfolgte unmittelbar nach der Immunmarkierung.

Um die Subjektivität bei der anschließenden Auswertung der Fotografien als mögliche Fehlerquelle zu minimieren, erfolgten das Fotografieren und die Auswertung „verblindet“. Die Proben wurden von einer zweiten Person angereicht, so dass das Fotografieren und Auswerten ohne Kenntnis über die Probe erfolgte. Erst nach erfolgter Auswertung wurden die Proben mit Hilfe einer Nummerierung zugeordnet.

Im Rahmen der Auswertung wurde durch eine Bildanalyse gemessen, welche Fluoreszenzintensität das untersuchte Präparat innerhalb einer definierten Grundfläche erzeugt. Dazu wurde zunächst jeweils eine Grundfläche auf dem Präparat definiert, welche über die verschiedenen Proben bezüglich Größe und Anzahl der darin enthaltenen Zellen vergleichbar ist. Um Schwankungen bzgl. Anzahl und Größe der untersuchten Zellen zu minimieren, wurden 5-10 Fotografien je Probe an unterschiedlichen Stellen aufgenommen und jeweils ca. 4-8 Zellen pro ausgewerteter Fläche ausgewählt. Um eine Verfälschung der Auswertung zu vermeiden,

mussten dabei Flächen mit ausgeprägtem Hintergrundleuchten sowie starker Konfluenz und Überlappung von Zellen ebenfalls vermieden werden.

Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte mit Hilfe der Software „Scion Image“ (Scion Corporation, Frederick, MD, USA). Mit Hilfe der Fotoanlage wurden von jedem Präparat ein Graustufen- und ein Farbbild erzeugt. Das monochrome Bild wurde in ein Schwarz-Weiß-Bild umgewandelt. Mit Hilfe des Schwellenwert-Verfahrens wurde das Farbbild mit dem Binärbild in Bezug gesetzt: Ein Leuchtpunkt im Farbbild entspricht nach Angleichung einem schwarzen Punkt im invertierten Schwarz-Weiß-Bild. Die schwarze Fläche wird ins Verhältnis zu der gesamten Grundfläche gesetzt. Der resultierende prozentuale Wert ermöglicht einen Vergleich der Fluoreszenzintensität der Proben gegeneinander und wird mit nachfolgender Formel bestimmt.

$$\text{Fluoreszenz (in \%)} = \frac{\text{Messwert} \cdot 100}{\text{Grundfläche}}$$

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchung wurden anschließend mit einem einfaktoriellem ANOVA und einem post hoc Dunnett-t-Test statistisch überprüft,  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

### 3.3.2 SDS-Gelelektrophorese und Western Blotting

Das Western Blot Verfahren wurde zum Nachweis spezifischer Proteine angewendet. Mit Hilfe der Gel-Elektrophoresetechnik (SDS-Page-Technik) wurde das zu untersuchende Proteingemisch entsprechend ihrer elektrischen Ladung und Größe in einem Polyacrylamidgel in Proteinbanden aufgetrennt. In einem zweiten Schritt wurden die Proteine aus dem Gel mittels einem senkrecht zum Polyacrylamidgel angelegtem elektrischem Feld (Tank-Blot-System) auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Das spezifische elektrophoretische Auftrennungsmuster blieb hierbei erhalten. Nach Blockung unspezifischer Bindungen konnte die Inkubation mit spezifischen Antikörpern (mono- oder polyklonal) erfolgen, die spezifisch an die einzelnen Proteinbanden banden. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden in wiederholten Waschschritten mit Pufferlösung entfernt. Es folgte die Inkubation mit sekundärem Antikörper. Dieses Enzym-Antikörper-Konjugat enthielt alkalische Phosphatase, welche bei Kontakt mit Entwicklersubstrat (BCIP-NBT Solution) eine Farbreaktion erfährt und das Protein auf diese Weise indirekt sichtbar machte. Anhand der Intensität der abgelaufenen Farbreaktion

konnte indirekt ein Rückschluss auf die Proteinmenge und Vergleiche mit benachbart aufgetragenen Proben gezogen werden.

### 3.3.2.1 Probenvorbereitung

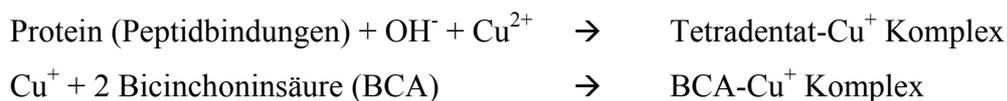
#### Zellyse

Entsprechend dem Versuchsaufbau wurden die Proben nach entsprechender Inkubationszeit mit den Testsubstanzen entnommen. Es folgte eine dreifache Spülung der Tenozyten mit Hank's Salzlösung. Der Zellabbauprozess (Lyse) wurde anschließend mit dem Auftragen von 300 µl Lysepuffer pro Kulturflasche über 30 min eingeleitet. Der Abbauprozess lief über 30 min, wobei die Kulturflaschen auf Eis gelagert wurden, um einen zu schnellen Abbau/Denaturierung der Zellen zu vermeiden. Nach 15 min wurden die Proben mittels einer Pipette mechanisch homogenisiert. Anschließend wurde das Lysat für 30 min zentrifugiert (1.000 U/min, bei 4° C), um eine Trennung von Zelltrümmern (Pellet) von den löslichen Proteinfractionen zu erreichen. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Bearbeitung bei -80° C gelagert.

#### Bestimmung der Gesamtproteinkonzentration

Die Einstellung der Versuchsproben auf die gleiche Gesamtproteinkonzentration ist notwendig und Voraussetzung, um vergleichende Aussagen über die Dichte der Banden im Western Blot Verfahren treffen zu können.

Hierfür wurde zunächst die Gesamtproteinkonzentration jeder einzelnen Versuchsprobe (Lysat) nach der Biuret-Reaktion und mittels photochemischer Analyse bestimmt. Dieser Methode liegt die Eigenschaft von Proteinen zugrunde, im alkalischen Bereich  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  zu reduzieren. Über diese Reduktion bildet das reduzierte Kupfer mit dem Reagenz Bicinchoninsäure einen gefärbten Kupferkomplex.



Für die photochemische Auswertung wurden in eine 96-Well-Lochplatte neben einer Standard-Verdünnungsreihe (2 mg/l bovines Serumalbumin, BSA) und eines Blank-Feldes jeweils 3 Wells pro Probe mit je 10 µl der Zellysate-Probe und 1 ml des frisch hergestellten Reagenzgemisches gegeben und für 30 min bei 60° C im Wärmeschrank inkubiert. Die Lichtabsorption des violett gefärbten Bicinchoninsäure-Kupfer-Komplexes wurde photometrisch bei 562

nm dreifach bestimmt. Nach Reduktion konnten alle Proben durch Verdünnung mit Lysispuffer auf etwa 90-100 µg/ml Gesamtproteinkonzentration gebracht werden.

### **Reduktion**

Eine Stabilisierung und damit dauerhafte Lagerfähigkeit der Proben wurde über Reduktion erreicht. Hierfür wurden 1000 µl Probe mit 250 µl Sample Buffer (5x) und 62,5 µl 2-Mercaptoethanol versetzt und bei 95° C im Thermoblock für 10 min unter dem Abzug reduziert. Anschließend waren die Proben stabil und eine Lagerung bei -20° C konnte erfolgen.

### **3.3.2.2 SDS-Gelelektrophorese**

Für die SDS-Gelelektrophorese wurden abhängig vom Molekulargewicht der zu untersuchenden Proteine Polyacrylamidgele der Konzentrationen 5% und 7,5% gegossen. Die Proben wurden aufgetragen und die enthaltenen Proteine zuerst mit Sammelgel 15 min mit 80V und danach im Trenngel ca. 1 h mit 120V elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Aqua dest. verdünnter Laufpuffer (1x) wurde für die Elektrophorese benutzt.

### **3.3.2.3 Western Blot**

Zur Durchführung der Immundetektion wurden die im vorherigen Schritt elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf Nitrocellulose-Membranen übertragen. Um eine Luftblasenbildung oder Austrocknung zu verhindern, wurde das Gel in Transferpuffer zunächst auf Filterpapier übertragen. Anschließend erfolgte die Überdeckung mit der Membran und das Einbringen in die Transfereinheit als „Sandwich“. Das Übertragen der Proteine auf die Membran in Transferpuffer wurde unter Eiskühlung bei 120V für 60 min. durchgeführt.

Um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurden die Membranen über Nacht bei 4-8° C in Blockpuffer gegeben. Danach erfolgte die Inkubation der Membranen (1-1.5 h bei Raumtemperatur) mit dem jeweiligen primären Antikörper, der spezifisch gegen das Zielprotein gerichtet war.

Der primäre Antikörper wurde im Verhältnis 1:1.000-3:1.000 mit Blockpuffer verdünnt. Überschüssiger primärer Antikörper wurde entfernt durch 3malige Waschung der Membranen für jeweils 10-15 min und anschließender Inkubation für 30 min mit dem an alkalische Phosphatase konjugierten, sekundären Antikörper (entsprechend des primären Antikörpers mono- oder polyklonal). Der sekundäre Antikörper wurde in Blockpuffer im Verhältnis 1:4.000 verdünnt.

Die spezifische Bindung des primären Antikörpers an das Zielprotein konnte nach 3maliger Spülung mit verdünntem (1x, mit Aqua dest.) Tris Puffer pH 9,5 durch Nitroblautetrazolium und 5-Brom-4-Chlor-3-indolylphosphat (BCIP/NBT Solution) als Substrat für die alkalische Phosphatase sichtbar gemacht werden. Das Entwicklersubstrat (BCIP/NBT Solution) wurde in verdünntem Tris Puffer (pH 9,5, 1x) im Verhältnis 1:5 verdünnt. Für die nachfolgende densitometrische Auswertung wurde jeweils nur die prominenteste Bande herangezogen.

#### **3.3.2.4 Densitometrische und statistische Auswertung**

Um die angefertigten Western Blots auszuwerten, wurde die optometrische Dichte der einzelnen Banden gemessen. Zunächst wurden alle Blots mit einem Scanner und dem Programm Presto Mr. Photo (Version 1.5, New Soft Technology Corporation) bei 2.400 dpi eingescannt. Die eingescannten Banden wurden anschließend mit einem Rahmen markiert. Zusätzlich wurde eine Leerprobe markiert. Die Quantifizierung des spezifischen Proteins je Probe erfolgte, indem die optometrische Dichte der Proben ins Verhältnis mit der Leerprobe gesetzt wurde. Die Markierung und Auswertung erfolgte mit dem Programm Advanced Image Data Analyzer, AIDA (Version 3.44.035, Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH).

Die Testsubstanzen wurden gegenüber der Kontrolle auf statistisch signifikante Unterschiede untersucht. Zur Prüfung der statistischen Signifikanz wurde ein einfaktorielles ANOVA und ein post hoc Dunnett-t-Test herangezogen.  $p < 0,05$  wurde als statistisch signifikant angesehen.

## 4 Ergebnisse

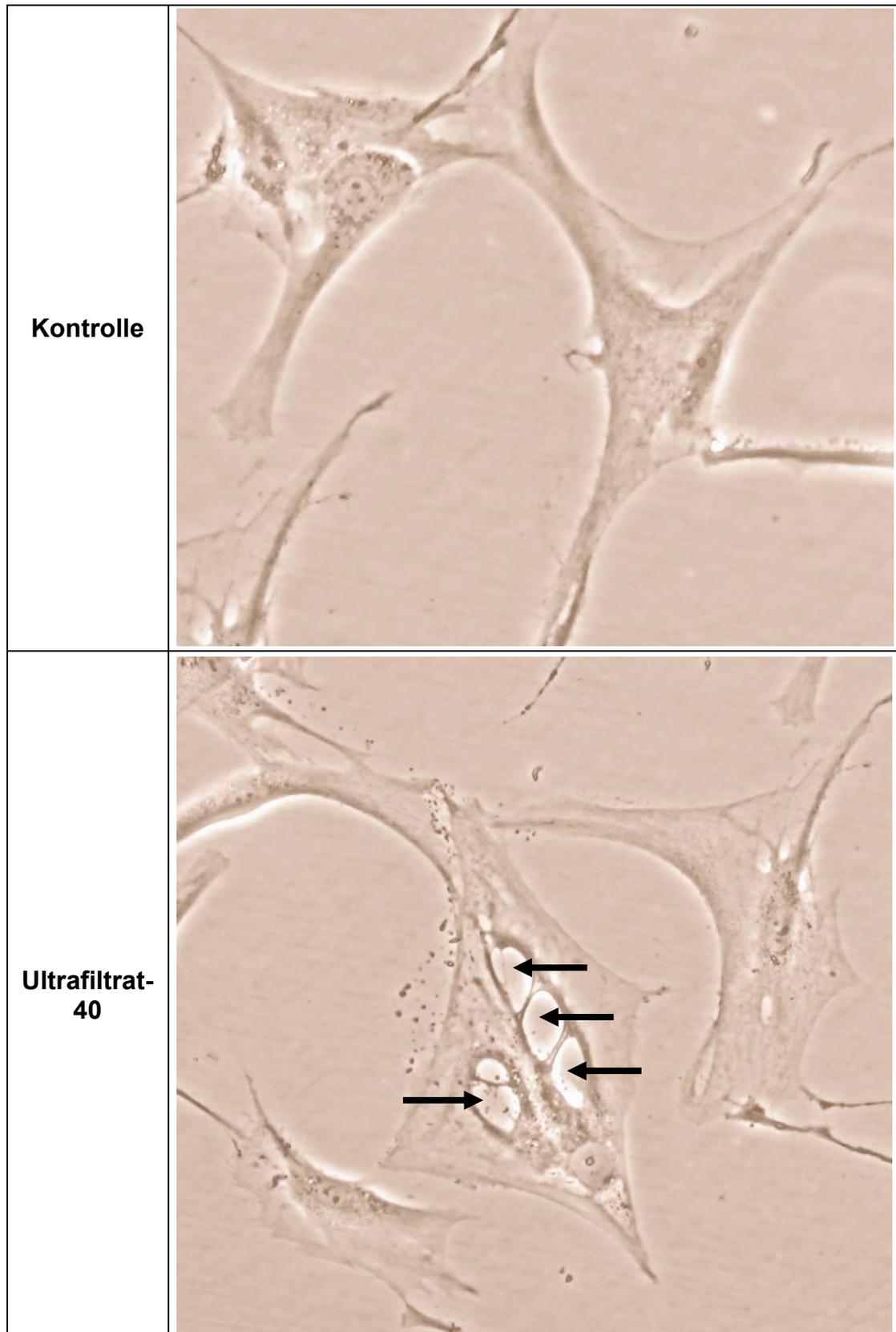
### 4.1 Lichtmikroskopie

Mittels lichtmikroskopischer Untersuchung konnten die primären Sehnenzellkulturen dargestellt werden und das Wachstum sowie eine eventuelle Verunreinigung mit anderen Zelltypen, wie z.B. Fibrozyten, ausgeschlossen werden. Die verwendeten primären Sehnenzellkulturen zeigten die typischen charakteristischen Merkmale dieses Zelltyps, mit spindelförmigen Zellen und langgestreckten Zellausläufern mit Kontakten zu Nachbarzellen.

In ersten Vorversuchen wurde mit der lichtmikroskopischen Untersuchung eine Verträglichkeit der Tenozyten mit dem Kulturmedium und den verschiedenen Hämofiltratfraktionen in unterschiedlicher Konzentration überwacht. Hierbei zeigten sich weder Sterilitätsprobleme (Bakterien- oder Pilzwuchs) noch eine Ablösung der Sehnenzellen. Für alle folgenden Untersuchungen mit Hämofiltrat wurde die Höhe der Hämofiltratkonzentration auf 10% des Gesamtvolumens festgelegt.

Im Rahmen der lichtmikroskopischen Analysen/Vorversuche stellten sich bei der Behandlung der Sehnenzellen mit Hämofiltrat der Fraktionen 20, 80, 100 über 24 und 72 Stunden im Vergleich zur Kontrolle keine wesentlichen Unterschiede dar. Zellen, die mit Hämofiltrat der Fraktion 40 behandelt wurden, zeigten bereits nach 24 Stunden auffällige morphologische Veränderungen, wie eine vermehrte intrazelluläre Vakuolenbildung (Abbildung 7). Eine mögliche Zunahme dieser Veränderungen von einer 24 h Inkubationszeit zu 72 h Inkubationszeit konnte lichtmikroskopisch nicht quantifiziert werden. Zellen, die mit Hämofiltrat 60 behandelt wurden, zeigten diese Veränderungen in geringerem Maße.

Die Ergebnisse der lichtmikroskopischen Untersuchungen sowie weiterer Vorversuche, führten dazu, dass im Rahmen dieser Arbeit ein besonderer Fokus auf die Effekte von Hämofiltrat 40 auf humane Tenozyten gesetzt wurde.



**Abbildung 7: Lichtmikroskopische Aufnahme humaner Tenozyten nach Behandlung mit Ultrafiltrat-40 in 10%iger Konzentration über 72 h im Vergleich zur Kontrolle. Die Pfeile markieren auffällige morphologische Veränderungen (Vergrößerung 400x)**

## 4.2 Immunhistochemie

Als semiquantitatives Verfahren wurde eine immunhistochemische Analyse durchgeführt. Damit wurden Effekte nachgewiesen, welche bei Inkubation humaner Tenozyten mit verschiedenen Ultrafiltrat-Fractionen und Ciprofloxacin in unterschiedlicher Konzentration *in vitro* hervorgerufen wurden. Hierbei wurde zunächst in Einzeltestungen untersucht, welchen Effekt zum einen unterschiedliche Ultrafiltrat-Fractionen und zum anderen Ciprofloxacin in verschiedenen Konzentrationen auf die humanen Sehnenzellen haben. Anschließend folgte eine Kombinationstestung von Ultrafiltrat-40 sowie verschiedener Ciprofloxacin-Konzentrationen. Für den Nachweis eines möglichen sehnenschädigenden Potentials der getesteten Substanzen auf die Sehnenzellen wurde in den Proben immunhistochemisch Collagen Typ I sowie für den Kombinationsversuch Fibronectin dargestellt. Collagen I eignet sich als Hauptmatrixprotein für den Nachweis von Effekten auf die extrazelluläre Matrix. Ein verminderter Nachweis in den Proben stellt eine verminderte Syntheseleistung und somit einen tendotoxischen Effekt auf die Sehnenzelle dar. Fibronectin vermittelt, eingelagert zwischen Collagenfibrillen, eine wichtige Integrationsfunktion in Bezug auf Zell-Matrix-Kontakte. Fibronectin eignet sich daher, schädigende Effekte der Testsubstanzen auf die Integrität der extrazellulären Matrix nachzuweisen, beispielsweise durch den Nachweis einer Reduktion des Fibronectin-Gehaltes.

### 4.2.1 Einfluss von Ultrafiltrat auf humane Tenozyten *in vitro*

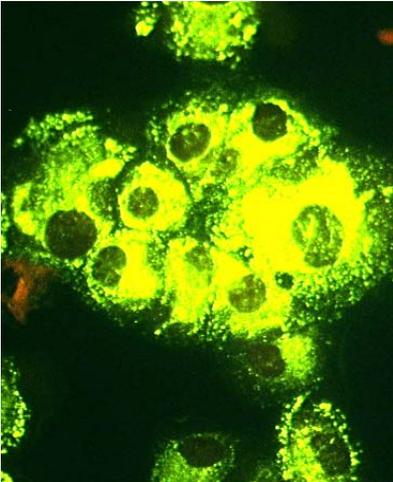
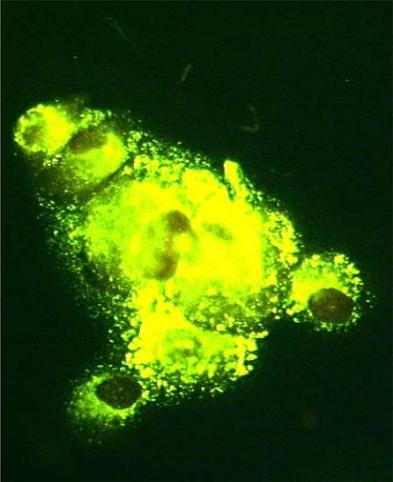
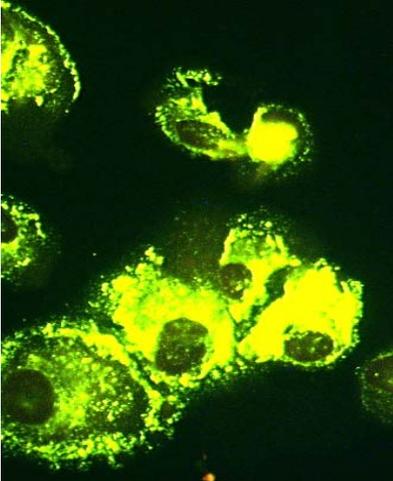
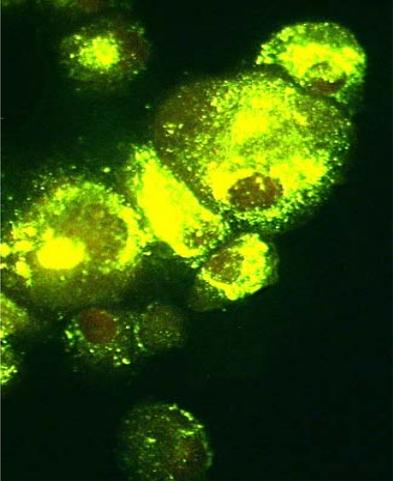
Die Behandlung humaner Sehnenzellen mit Ultrafiltrat-Substraten, welche bei der Elution mit 20%-, 40%-, 60%-, 80%- und 100%-igem ACN gewonnen wurden (im Folgenden: Ultrafiltrat-20, Ultrafiltrat-40, Ultrafiltrat-60, Ultrafiltrat-80, Ultrafiltrat-100), in einer 10%igen Konzentration im Kulturmedium führte im Vergleich zur Kontrolle bereits nach

24 h Inkubation zu einer Verminderung von Collagen Typ I.

Die unterschiedlichen Ultrafiltrat-Substrate schienen dabei einen unterschiedlich starken Effekt auf die Verminderung von Collagen Typ I zu haben. Während es bereits bei Ultrafiltrat-20, -80 und -100 zu signifikanten Effekten kam, konnte bei Ultrafiltrat-60 und insbesondere bei Ultrafiltrat-40 eine besonders starke Abnahme von Collagen Typ I nachgewiesen werden. Eine verlängerte Inkubation über 72 h verstärkte diese Effekte in der gleichen Rangfolge. Insbesondere Ultrafiltrat-40 führte zu einer starken Reduktion der Collagen Typ I Synthese. Im Vergleich zur Kontrolle reduzierte Ultrafiltrat-40 Collagen Typ I nach 24 h Inkubation um etwa 70% (Abbildung 8 und Abbildung 9). Im Vergleich dazu führte Ultrafiltrat-20 nach 24 h

Inkubation zu einer Reduktion von Collagen I um ca. 36%, Ultrafiltrat-60 verminderte um etwa 44%, Ultrafiltrat-80 um ca. 40% und Ultrafiltrat-100 um etwa 34%.

Die in der Abbildung 8 dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen Sehnenzellen nach Behandlung mit den unterschiedlichen Ultrafiltrat-Fractionen über 24 und 72 Stunden. Die Zellen wurden mit Anti-Collagen Typ I und einem fluoreszierenden Sekundärrantikörper behandelt, so dass die Stärke der fluoreszierenden Leuchtkraft auf den Aufnahmen mit der Menge von Collagen Typ I korreliert. Der Collagen Typ I-Antikörper bindet auch an intrazelluläre Vorstufen von Collagen Typ I, die hier mit abgebildet sind. Aufgrund von Waschprozessen im Rahmen der immunhistochemischen Aufbereitung ist extrazelluläres Collagen weitgehend entfernt worden. Für die immunhistochemische Untersuchung wurden die Zellen über Zentrifugalkräfte auf Objektträger geschleudert und haben dabei ihr typisches spindelförmiges Aussehen verloren.

Anti-Collagen Typ I	Inkubationszeit 24 h	Inkubationszeit 72 h
Kontrolle		
Ultrafiltrat-20	<p data-bbox="475 875 890 1077"><b>Kontrolle:</b> Humane Tenozyten 24 h inkubiert mit Kulturmedium; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>  <p data-bbox="475 1632 890 1865"><b>Ultrafiltrat-20 (UF 20):</b> Humane Tenozyten 24 h inkubiert mit Ultrafiltrat-20 in 10%iger Konzentration; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>	<p data-bbox="938 875 1353 1077"><b>Kontrolle:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Kulturmedium; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>  <p data-bbox="938 1632 1353 1865"><b>Ultrafiltrat-20 (UF 20):</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Ultrafiltrat-20 in 10%iger Konzentration; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>

**Abbildung 8: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Tenozyten: Immunhistochemisch mit Collagen Typ I-Antikörpern behandelt. Effekt einer 24 h und 72 h Inkubation mit Ultrafiltrat im Vergleich zur Kontrolle (Lichtmikroskopische Vergrößerung 200x)**

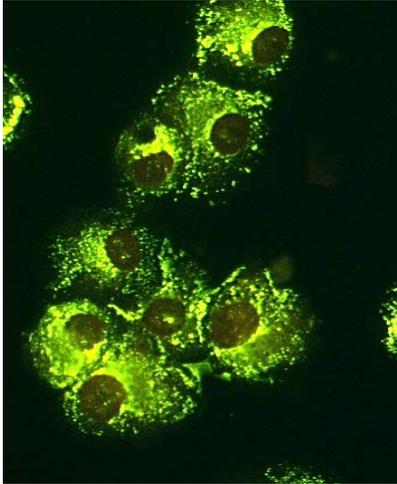
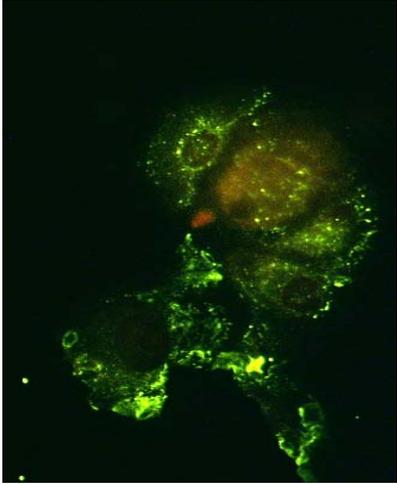
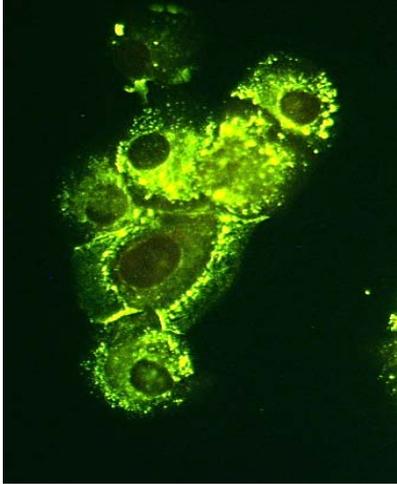
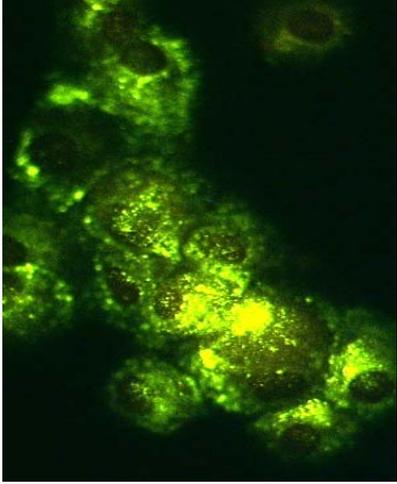
Anti-Collagen Typ I	Inkubationszeit 24 h	Inkubationszeit 72 h
<b>Ultrafiltrat-40</b>		
	<p><b>Ultrafiltrat -40 (UF 40):</b> Humane Tenozyten 24 h inkubiert mit Ultrafiltrat-40 in 10%iger Konzentration; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>	<p><b>Ultrafiltrat-40 (UF 40):</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Ultrafiltrat-40 in 10%iger Konzentration; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>
<b>Ultrafiltrat-60</b>		
	<p><b>Ultrafiltrat-60 (UF 60):</b> Humane Tenozyten 24 h inkubiert mit Ultrafiltrat-60 in 10%iger Konzentration; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>	<p><b>Ultrafiltrat-60 (UF 60):</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Ultrafiltrat-60 in 10%iger Konzentration; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>

Abbildung 8 (Fortsetzung)

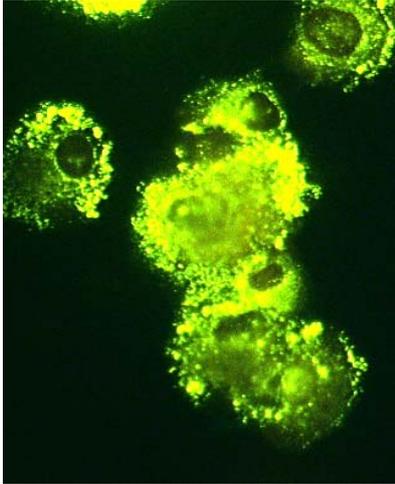
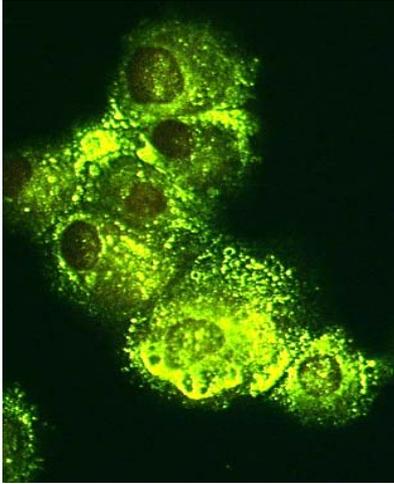
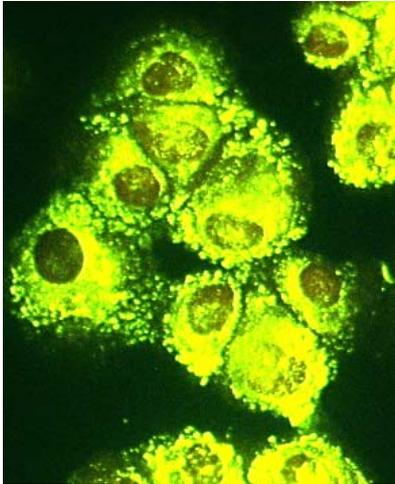
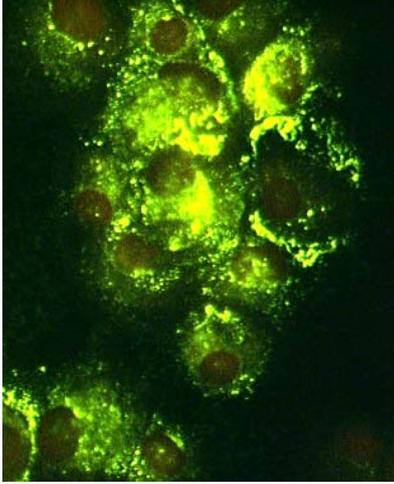
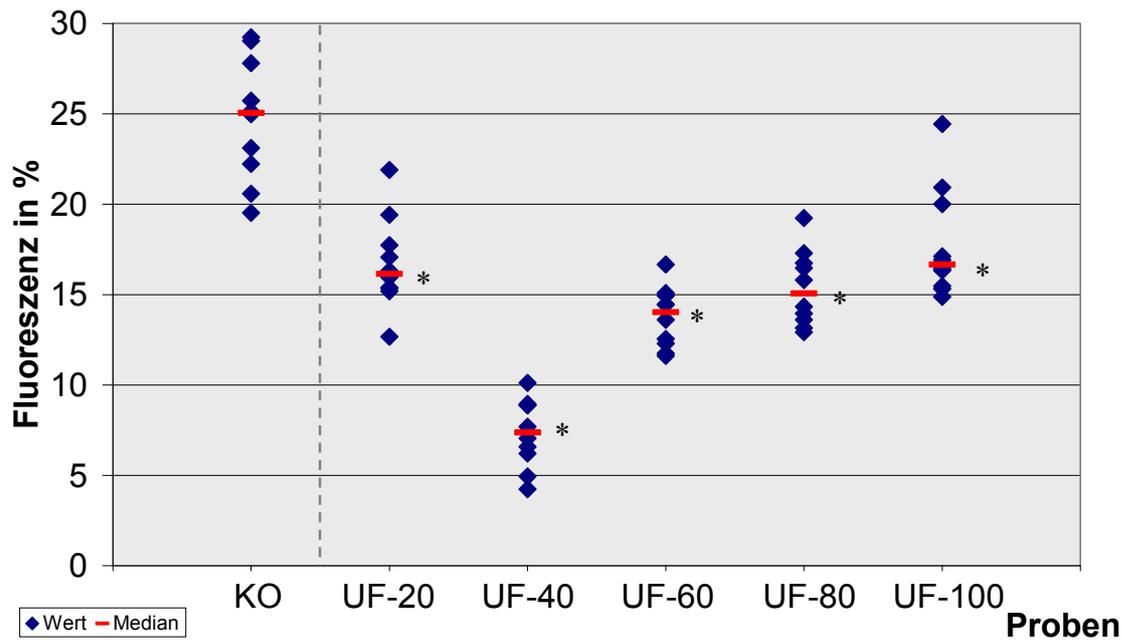
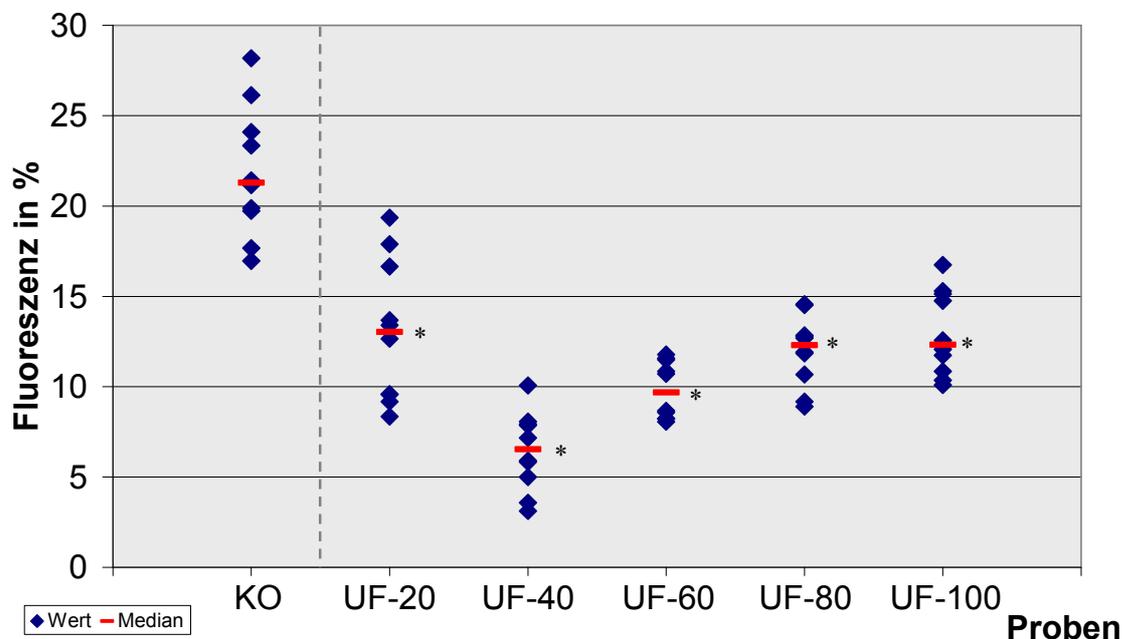
Anti-Collagen Typ I	Inkubationszeit 24 h	Inkubationszeit 72 h
<b>Ultrafiltrat-80</b>		
	<p><b>Ultrafiltrat-80 (UF 80):</b> Humane Tenozyten 24 h inkubiert mit Ultrafiltrat-80 in 10%iger Konzentration; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>	<p><b>Ultrafiltrat-80 (UF 80):</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Ultrafiltrat-80 in 10%iger Konzentration; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>
<b>Ultrafiltrat-100</b>		
	<p><b>Ultrafiltrat-100 (UF 100):</b> Humane Tenozyten 24 h inkubiert mit Ultrafiltrat-100 in 10%iger Konzentration; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>	<p><b>Ultrafiltrat-100 (UF 100):</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Ultrafiltrat-100 in 10%iger Konzentration; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>

Abbildung 8 (Fortsetzung)

Die Kontrollen (Abbildung 8, Kontrolle 24 und 72 h) zeigen eine starke Fluoreszenz, die das Zytoplasma fast vollständig von fluoreszierenden, Anti-Collagen I- bindenden Arealen erfüllt. Die Aufnahmen der Zellen, die mit Ultrafiltrat-20 über 24 und 72 h behandelt wurden, zeigen im Vergleich zur Kontrolle eine etwas schwächere, jedoch immer noch kräftige Fluoreszenz, mit jetzt randständiger Betonung. Zwischen der über 24 und der über 72 h behandelten Probe ist visuell kein Unterschied zu erkennen (Abbildung 8, Ultrafiltrat-20). Die mit Ultrafiltrat-40 behandelten humanen Tenozyten zeigen bereits nach 24 h Inkubation eine sehr starke Reduktion der Fluoreszenzen im Vergleich zur Kontrolle. Lediglich wenige punktförmige Fluoreszenzen sind randständig noch auszumachen (Abbildung 8, Ultrafiltrat-40). Die mit Ultrafiltrat-60 behandelten Zellen weisen bereits nach 24 h eine deutliche Fluoreszenzminderung auf, nach 72 h Inkubationszeit ist dieser Effekt noch deutlicher (Abbildung 8, Ultrafiltrat-60). Bei der Inkubation mit Ultrafiltrat-80 konnte nach 24 h eine kräftige Fluoreszenz nachgewiesen werden, welche die Zellkerne zum Teil überlagert. Die 72 h-Probe ist deutlich verblasst, zeigt aber punkt- und fleckförmige Fluoreszenzen im gesamten Zytoplasma (Abbildung 8, Ultrafiltrat-80). Die Ultrafiltrat-100-Probe zeigt nach 24 h sehr intensive Fluoreszenzen, nach 72 h Inkubation ist die Fluoreszenzstärke abgeblasst, aber über das gesamte Zytoplasma verteilt (Abbildung 8, Ultrafiltrat-100).



**Abbildung 9:** Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Collagen Typ I in humanen Tenozyten: Effekt einer 24 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ultrafiltrat (UF)-20, -40, -60, -80, -100 in 10%iger Konzentration auf die Syntheseleistung von Collagen Typ I im Vergleich zur Kontrolle (KO) in der Mehrfachbestimmung (10 Datenpunkte pro Probe). Angabe der Prozentwerte der Fluoreszenz und der Mediane. \*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunett-t-Test)

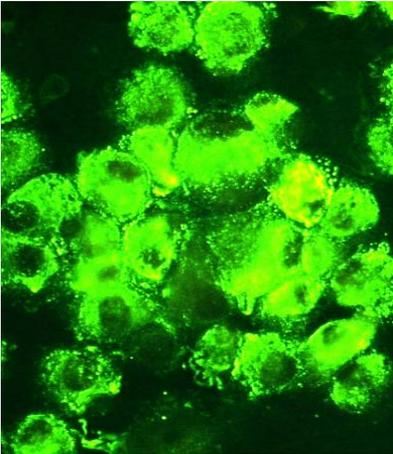
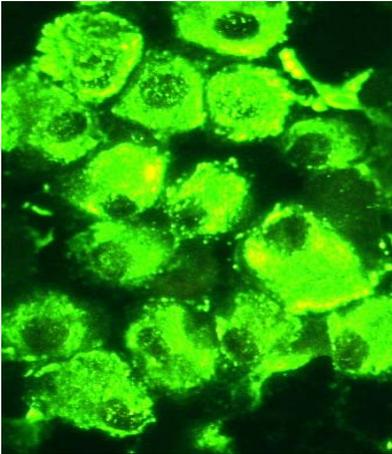
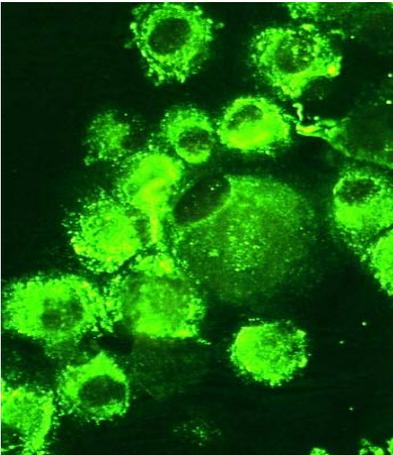
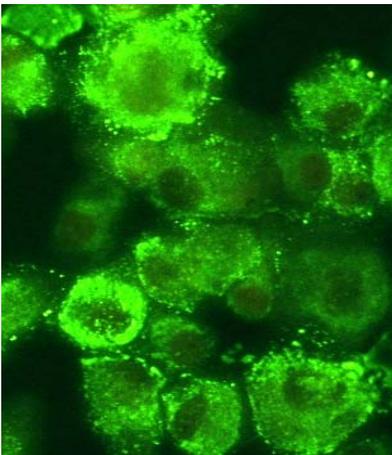


**Abbildung 10:** Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Collagen Typ I in humanen Tenozyten: Effekt einer 72 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ultrafiltrat (UF)-20, -40, -60, -80, -100 in 10%iger Konzentration auf die Syntheseleistung von Collagen Typ I im Vergleich zur Kontrolle (KO) in der Mehrfachbestimmung (10 Datenpunkte pro Probe). Angabe der Prozentwerte der Fluoreszenz und der Mediane. \*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunett-t-Test)

#### **4.2.2 Einfluss von Ciprofloxacin auf humane Tenozyten *in vitro***

Nach Inkubation humaner Sehnenzellen mit Ciprofloxacin in den Konzentrationen 1, 3, 10 und 30 mg/l konnte nach 24 h Inkubation bereits bei 1 mg/l eine Reduktion von Collagen Typ I nachgewiesen werden (Abbildung 11, Abbildung 12 und Abbildung 13). Dieser Effekt wurde zeitabhängig verstärkt, so dass es bei einer 72 h Behandlung zu einer verstärkten Reduktion der Collagen-Menge kam. Der reduzierende Effekt auf Collagen Typ I war bereits nach 24 h Inkubation und nach 72 h Inkubation für die Ciprofloxacin-Konzentrationen 3, 10 und 30 mg/l signifikant.

Die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen Tenozyten nach Inkubation mit verschiedenen Ciprofloxacin-Konzentrationen über 24 und 72 Stunden. Dargestellt ist der immunhistochemische Nachweis von Collagen Typ I, mittels Collagen Typ I Antikörper und einem fluoreszierenden Sekundärantikörper, der den Rückschluss auf die Menge Collagen I anhand der Intensität der Fluoreszenz zulässt. Der Collagen Typ I-Antikörper bindet auch an intrazelluläre Vorstufen von Collagen Typ I. Aufgrund von Waschprozessen im Rahmen der immunhistochemischen Aufbereitung ist extrazelluläres Collagen weitgehend entfernt worden. Aufgrund des angewendeten Zentrifugationsverfahren haben die Zellen ihre typische spindelförmige Morphologie verloren.

Anti-Collagen Typ I	Inkubationszeit 24 h	Inkubationszeit 72 h
<b>Kontrolle</b>		
<b>1 mg/l Ciprofloxacin</b>		
	<p><b>Ciprofloxacin 1 mg/l 24:</b> Humane Tenozyten 24 h inkubiert mit Ciprofloxacin 1 mg/l; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>	<p><b>Ciprofloxacin 1 mg/l 72:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Ciprofloxacin 1 mg/l; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>

**Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch mit Collagen-Typ-I-Antikörpern behandelter humaner Tenozyten. Effekt einer 24 h und 72 h Inkubation mit Ciprofloxacin (1, 3, 10, 30 mg/l) im Vergleich zur Kontrolle (Lichtmikroskopische Vergrößerung 200x)**

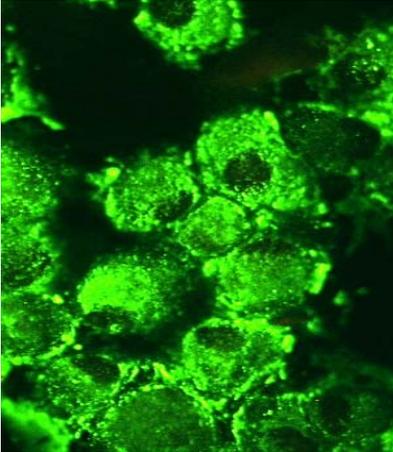
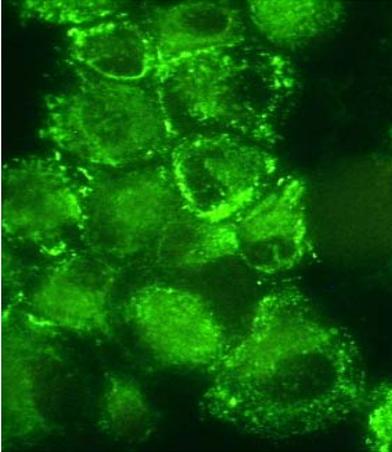
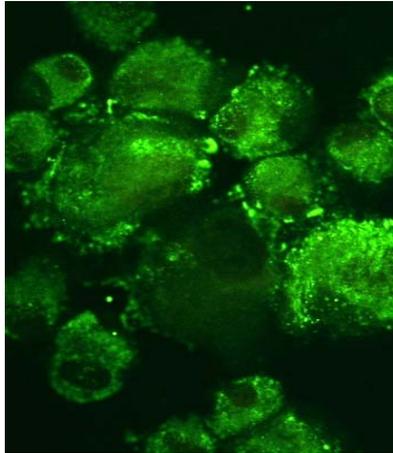
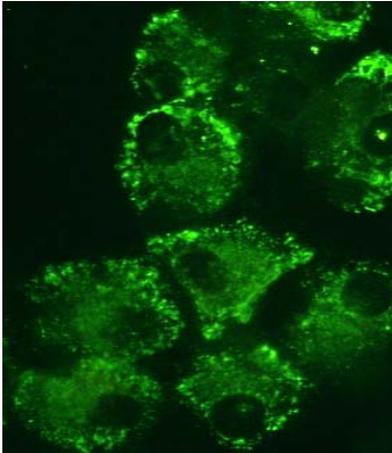
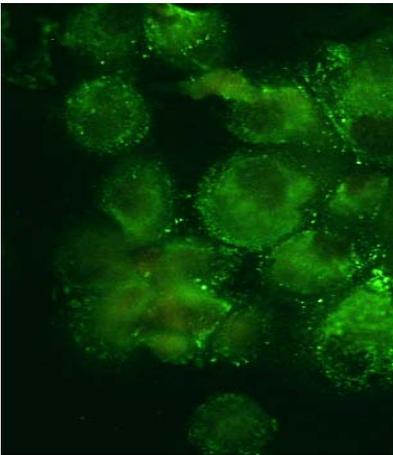
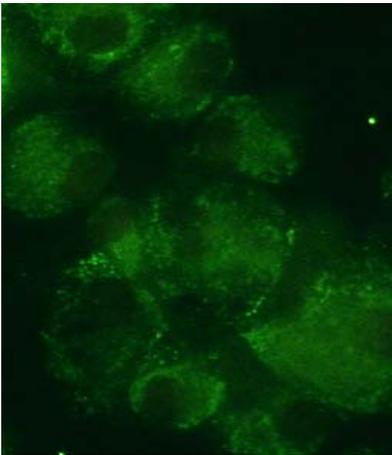
Anti-Collagen Typ I	Inkubationszeit 24 h	Inkubationszeit 72 h
<b>3 mg/l Ciproflo- xacin</b>		
	<b>Ciprofloxacin 3 mg/l 24:</b> Humane Tenozyten 24 h inku- biert mit Ciprofloxacin 3 mg/l; Immunhistochemischer Nach- weis mit Anti-Collagen Typ I	<b>Ciprofloxacin 3 mg/l 72:</b> Humane Tenozyten 72 h inku- biert mit Ciprofloxacin 3 mg/l; Immunhistochemischer Nach- weis mit Anti-Collagen Typ I
<b>10 mg/l Ciprofloxacin</b>		
	<b>Ciprofloxacin 10 mg/l 24:</b> Humane Tenozyten 24 h inku- biert mit Ciprofloxacin 10 mg/l; Immunhistochemischer Nach- weis mit Anti-Collagen Typ I	<b>Ciprofloxacin 10 mg/l 72:</b> Humane Tenozyten 72 h inku- biert mit Ciprofloxacin 10 mg/l; Immunhistochemischer Nach- weis mit Anti-Collagen Typ I

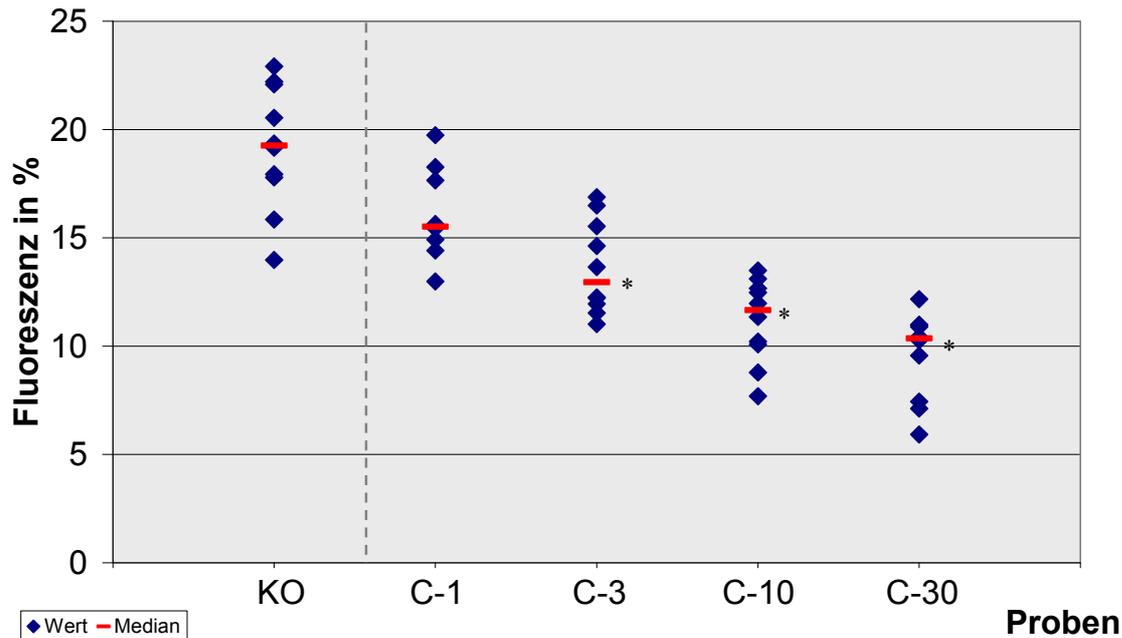
Abbildung 11 (Fortsetzung)

Anti-Collagen Typ I	Inkubationszeit 24 h	Inkubationszeit 72 h
<b>30 mg/l Ciprofloxacin</b>		
	<p><b>Ciprofloxacin 30 mg/l 24:</b> Humane Tenozyten 24 h inkubiert mit Ciprofloxacin 30 mg/l; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>	<p><b>Ciprofloxacin 30 mg/l 72:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Ciprofloxacin 30 mg/l; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>

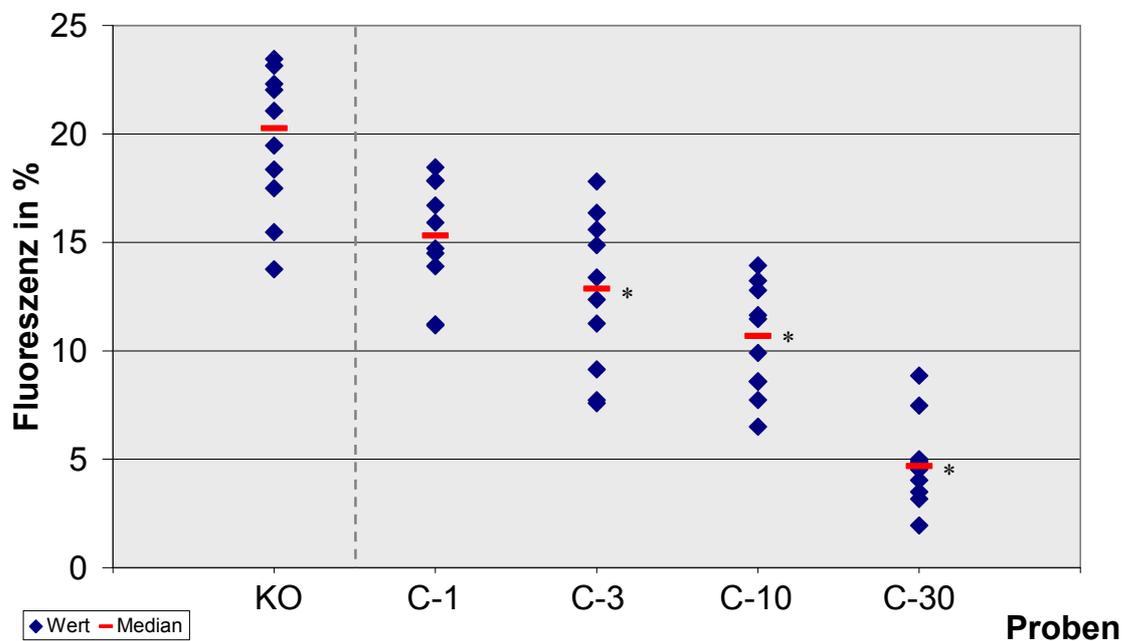
### Abbildung 11 (Fortsetzung)

Die Kontrollen (Abbildung 11, Aufnahme Kontrolle 24 und 72) zeigen eine kräftige Fluoreszenz. Das Zytoplasma ist hierbei fast vollständig von fluoreszierenden Anti-Collagen-I-bindenden Vesikeln gefüllt. Die Zellkerne sind dunkel gegen das fluoreszierende Zytoplasma abzugrenzen. Die Aufnahme der mit Ciprofloxacin 1 mg/l inkubierten Tenozyten weist in der über 24 h inkubierten Probe ebenfalls eine kräftige Fluoreszenz auf, insbesondere jedoch bei einer größeren Zelle im Bildzentrum stellt sich das Collagen weniger flächenhaft und vermehrt randständig dar. Dies könnten erste Hinweise auf eine reduzierte intrazelluläre Collagensynthese sein. Dieser Trend verstärkt sich in der über 72 h inkubierten Probe, die ein Verblässen des zentralen Zytoplasmas und vermehrt randständige Fluoreszenzen aufweist (Abbildung 11, Ciprofloxacin 1 mg/l). Ähnlich der mit Ciprofloxacin 1 mg/l behandelten Probe zeigen auch die mit Ciprofloxacin 3 mg/l über 24 h inkubierten Zellen immer noch eine kräftige Fluoreszenz, jedoch zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle bereits ein leichtes Verblässen. Nach 72 h findet man ein deutliches Verblässen der Fluoreszenz im Zytoplasma (Abbildung 11, Ciprofloxacin 3 mg/l). Die mit Ciprofloxacin 10 mg/l behandelten Zellen weisen bereits nach 24 h eine deutliche Reduktion der Fluoreszenz auf. Nach 72 h-iger Behand-

lung mit 10 mg/l finden sich fast nur noch randständige fleckförmige Fluoreszenzen (Abbildung 11, Ciprofloxacin 10 mg/l). Bei Behandlung mit 30 mg/l Ciprofloxacin über 24 und 72 h lassen sich im immunhistochemischen Collagen-I-Nachweis nur noch wenige fleckförmige Fluoreszenzen nahe der Zellmembran nachweisen. Zellen und Zellkerne sind bei diesen Aufnahmen kaum noch zu identifizieren (Abbildung 11, Ciprofloxacin 30 mg/l).



**Abbildung 12:** Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Collagen Typ I in humanen Tenozyten: Effekt einer 24 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ciprofloxacin (C) 1, 3, 10, 30 mg/l auf die Syntheseleistung von Collagen Typ I im Vergleich zur Kontrolle (KO) in der Mehrfachbestimmung (10 Datenpunkte pro Probe). Angabe der Prozentwerte der Fluoreszenz und der Mediane. \*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test)



**Abbildung 13:** Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Collagen Typ I in humanen Tenozyten: Effekt einer 72 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ciprofloxacin (C) 1, 3, 10, 30 mg/l auf die Syntheseleistung von Collagen Typ I im Vergleich zur Kontrolle (KO) in der Mehrfachbestimmung (10 Datenpunkte pro Probe). Angabe der Prozentwerte der Fluoreszenz und der Mediane. \*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test)

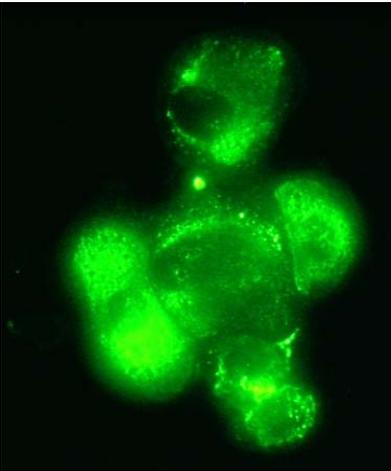
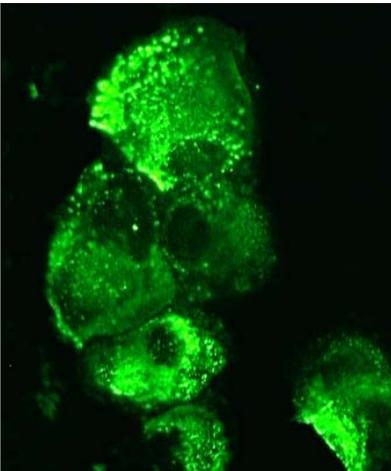
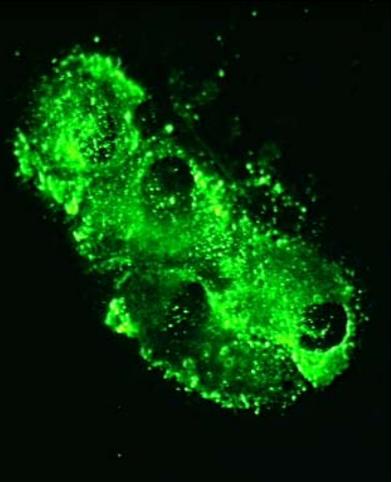
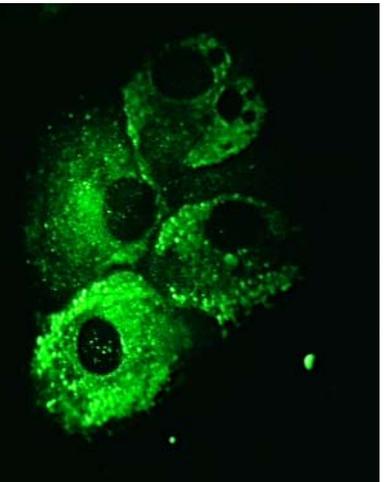
### **4.2.3 Einfluss von Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40 auf humane Tenozyten *in vitro***

Nach der Einzeltestung der Effekte von Ultrafiltrat und Ciprofloxacin auf humane Tenozyten, sollte eine kombinierte Testung eventuelle additive oder synergistische Effekte darstellen. Um mögliche, in der Kombination auftretende Effekte nachzuweisen, sollten, basierend auf den Ergebnissen der Vorversuche die Testsubstanzen der Ultrafiltrat-Fraktion und Konzentration gewählt werden, die bereits einen deutlichen Effekt in der Einzeltestung gezeigt hatten. Demnach wurden Tenozyten mit Ciprofloxacin in einer Konzentration von 10 und 30 mg/l sowie eine Kontrolle in Vergleich zu einer kombinierten Behandlung mit Ultrafiltrat-40 in 10%iger Konzentration gesetzt. Die Inkubationszeit wurde auf 72 Stunden festgesetzt.

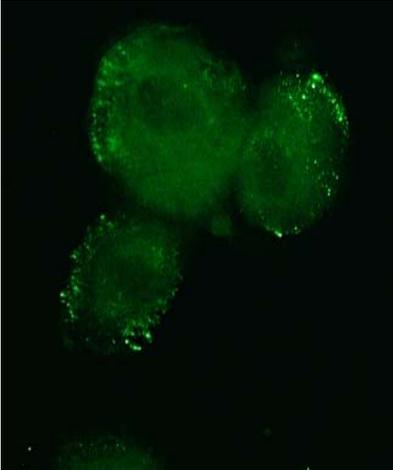
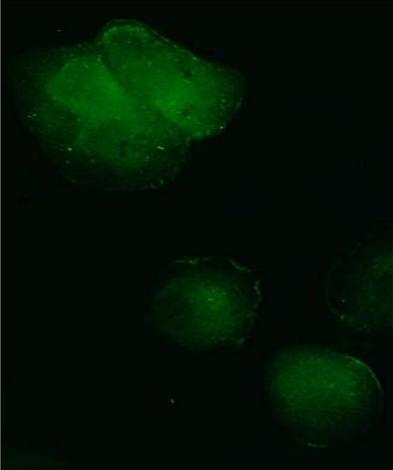
#### **Effekte auf das Hauptmatrixprotein Collagen Typ I**

Im Vergleich zur unbehandelten, beziehungsweise nur mit Ciprofloxacin behandelten Kontrolle, zeigte sich in der kombinierten Testung der Substanzen jeweils eine verstärkte Reduktion der Menge von Collagen Typ I (Abbildung 14 und Abbildung 15). In der statistischen Auswertung zeigte sich bei Behandlung in der kombinierten Inkubation der Tenozyten mit der niedrigeren Ciprofloxacin-Konzentration von 10 mg/l und Ultrafiltrat-40 ein signifikanter Unterschied (\*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle) im Vergleich zur nur mit 10 mg/l Ciprofloxacin behandelten Probe. Die kombinierte Behandlung von 30 mg/l und Ultrafiltrat führte zwar im Vergleich zur Kontrolle zur stärksten Reduktion von Collagen I, der Unterschied zur alleinigen Behandlung mit Ciprofloxacin 30 mg/l war in der statistischen Auswertung jedoch nicht signifikant (Abbildung 15).

Die in der Abbildung 14 dargestellten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen humane Tenozyten nach kombinierter Behandlung mit Ciprofloxacin 10 und 30 mg/l sowie Ultrafiltrat-40 über 72 h. Dargestellt ist der Nachweis mit Anti-Collagen I, so dass die fluoreszierende Leuchtkraft mit der nachgewiesenen Menge Collagen I korreliert.

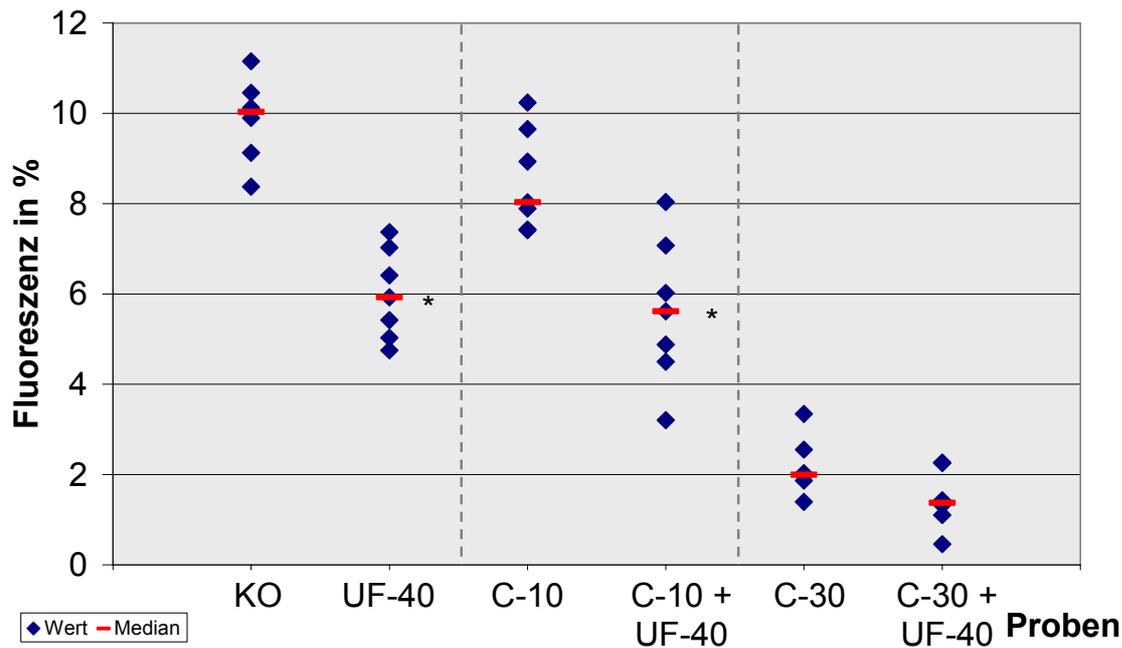
Anti-Collagen Typ I	Ohne Ultrafiltrat	Mit Ultrafiltrat-40
0 mg/l Ciprofloxacin		
	<p><b>Kontrolle:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Kulturmedium; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>	<p><b>Ultrafiltrat (UF 40):</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Ultrafiltrat-40; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>
10 mg/l Ciprofloxacin		
	<p><b>10 mg/l Ciprofloxacin:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit 10 mg/l Ciprofloxacin. Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>	<p><b>10 mg/l Ciprofloxacin+UF 40:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit 10 mg/l Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>

**Abbildung 14: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch mit Collagen-Typ-I-Antikörpern behandelter humaner Tenozyten. Effekt einer 72 h Inkubation mit Ciprofloxacin (10, 30 mg/l) und Ultrafiltrat-40 (UF 40) im Vergleich zur Kontrolle (Lichtmikroskopische Vergrößerung 200x)**

Anti-Collagen Typ I	Ohne Ultrafiltrat	Mit Ultrafiltrat-40
30 mg/l Ciprofloxacin		
	<p><b>30 mg/l Ciprofloxacin:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit 30 mg/l Ciproflox- acin; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>	<p><b>30 mg/l Ciprofloxacin+UF 40:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit 30 mg/l Ciproflox- acin und Ultrafiltrat-40; Immun- histochemischer Nachweis mit Anti-Collagen Typ I</p>

**Abbildung 14 (Fortsetzung)**

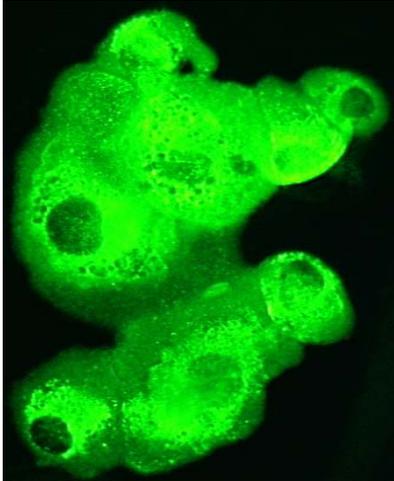
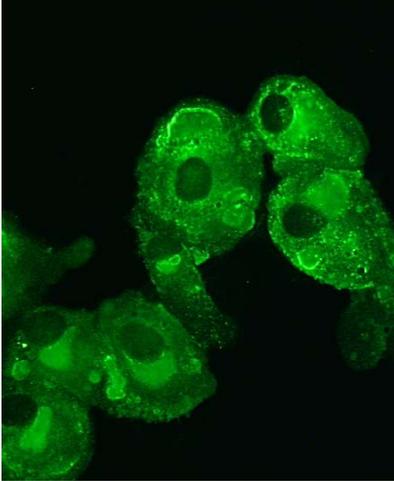
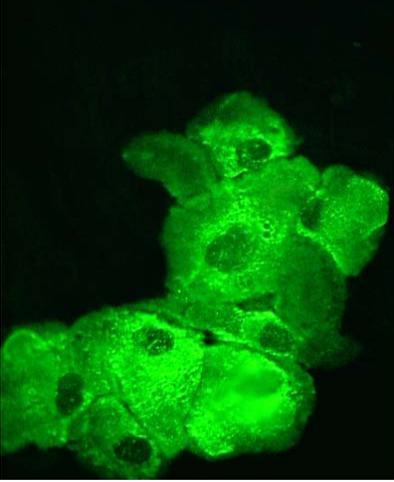
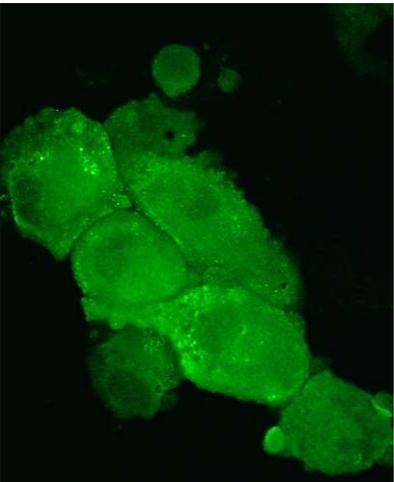
Die Kontrollen zeigen hierbei eine kräftige, über das gesamte Zytoplasma verteilte Fluoreszenz. Die Zellkerne lassen sich deutlich abgrenzen (Abbildung 14, Kontrolle). Die Aufnahme der Sehnenzellen, die nur mit Ultrafiltrat-40 behandelt wurden zeigt insgesamt eine im Vergleich zur Kontrolle verminderte Fluoreszenz. Es lassen sich aber im Zytoplasma und zellmembranständig punktförmige Fluoreszenzen nachweisen (Abbildung 14, Ultrafiltrat-40). Eine kombinierte Inkubation mit Ciprofloxacin 10 mg/l und Ultrafiltrat-40 führte im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit Ciprofloxacin zu einem verstärkten Fluoreszenzverlust insbesondere im zentralen Zytoplasma und somit zu einem geringeren Nachweis von Collagen Typ I (Abbildung 14, Ciprofloxacin 10 mg/l und Ciprofloxacin 10 mg/l + UF 40). Die kombinierte Inkubation mit 30 mg/l Ciprofloxacin mit Ultrafiltrat-40 führte zur stärksten Fluoreszenzabnahme. Es sind nur noch wenige punktförmige Fluoreszenzen randständig zu erkennen. Zellen und Zellkerne sind kaum noch zu differenzieren (Abbildung 14, Ciprofloxacin 30 mg/l und Ciprofloxacin 30 mg/l + UF 40).



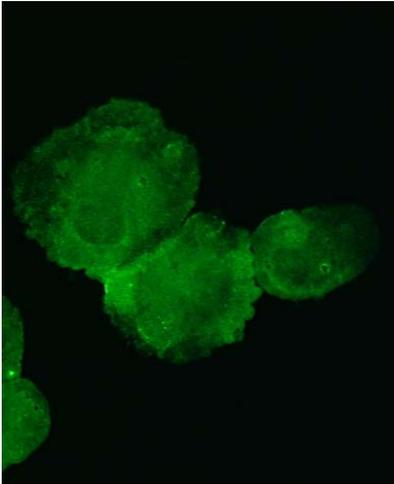
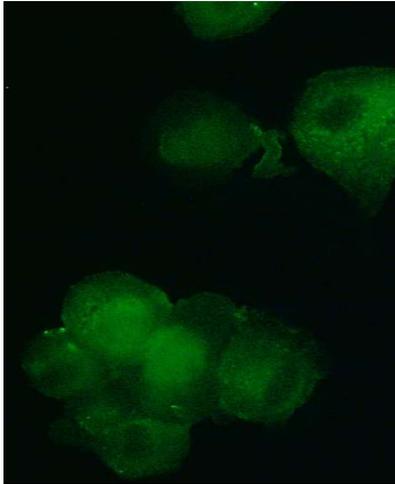
**Abbildung 15:** Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Collagen Typ I in humanen Tenozyten: Effekt einer 72 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ciprofloxacin (C) (0, 10, 30 mg/l) und Ultrafiltrat-40 (UF 40) auf die Syntheseleistung von Collagen Typ I im Vergleich zur Kontrolle (KO) in der Mehrfachbestimmung (8 Datenpunkte pro Probe). Angabe der Prozentwerte der Fluoreszenz und der Mediane. \*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test)

#### Effekte auf die Integrität der extrazellulären Matrix am Beispiel von Fibronectin

Für Fibronectin konnte der verstärkte Effekt einer kombinierten Behandlung gezeigt werden (Abbildung 16 und Abbildung 17). Analog zur Untersuchung auf Collagen I zeigte die Behandlung der Zellen mit Ciprofloxacin in den Konzentrationen 10 und 30 mg/l im Vergleich zur Kontrolle eine deutliche Reduktion von Fibronectin. In Kombination mit Ultrafiltrat-40 war dieser Effekt jedoch weitaus stärker. Bei Inkubation mit 10 mg/l Ciprofloxacin und Ultrafiltrat zeigte sich auch hier ein signifikanter Unterschied im Vergleich zur allein mit dem Antibiotikum behandelten Probe (Abbildung 17). Die höchste getestete Ciprofloxacin-Konzentration von 30 mg/l führte in Kombination mit Ultrafiltrat zur stärksten Fibronectinreduktion im Vergleich zur Kontrolle. Bei bereits durch die alleinige Behandlung mit 30 mg Ciprofloxacin/l Medium stark dezimierter Fibronectinmenge war der Unterschied in der kombinierte Inkubation mit dem Ultrafiltrat in der statistischen Auswertung jedoch nicht signifikant.

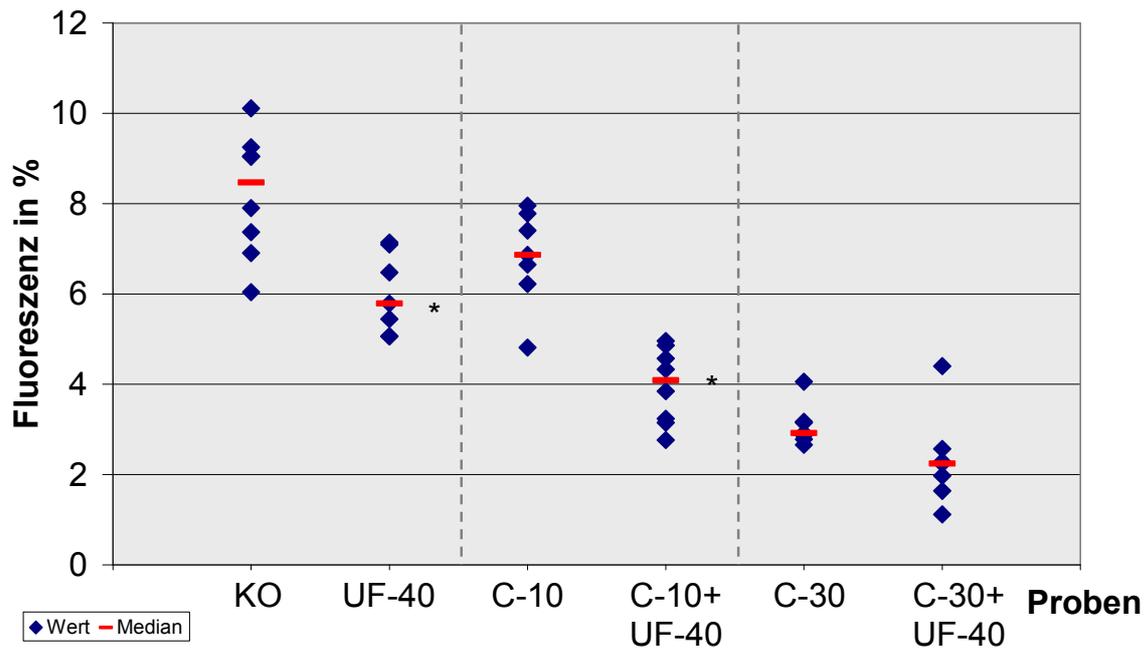
Anti-Fibronectin	Ohne Ultrafiltrat	Mit Ultrafiltrat-40
Ohne Ciprofloxacin		
	<p><b>Kontrolle:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Kulturmedium; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Fibronectin</p>	<p><b>Ultrafiltrat (UF 40):</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit Ultrafiltrat-40; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Fibronectin</p>
10 mg/l Ciprofloxacin		
	<p><b>10 mg/l Ciprofloxacin:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit 10 mg/l Ciprofloxacin; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Fibronectin</p>	<p><b>10 mg/l Ciprofloxacin+UF 40:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit 10 mg/l Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Fibronectin</p>

**Abbildung 16: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen immunhistochemisch mit Fibronectin-Antikörpern behandelter humaner Tenozyten. Effekt einer 72 h Inkubation mit Ciprofloxacin (10, 30 mg/l) und Ultrafiltrat-40 (UF 40) im Vergleich zur Kontrolle (Lichtmikroskopische Vergrößerung 200x)**

Anti-Fibronectin	Ohne Ultrafiltrat	Mit Ultrafiltrat-40
30 mg/l Ciprofloxacin		
	<p><b>30 mg/l Ciprofloxacin:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit 30 mg/l Ciprofloxacin; Immunhistochemischer Nachweis mit Anti-Fibronectin</p>	<p><b>30 mg/l Ciprofloxacin+UF 40:</b> Humane Tenozyten 72 h inkubiert mit 30 mg/l Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40; Immunhisto-chemischer Nachweis mit Anti- Fibronectin</p>

#### Abbildung 16 (Fortsetzung)

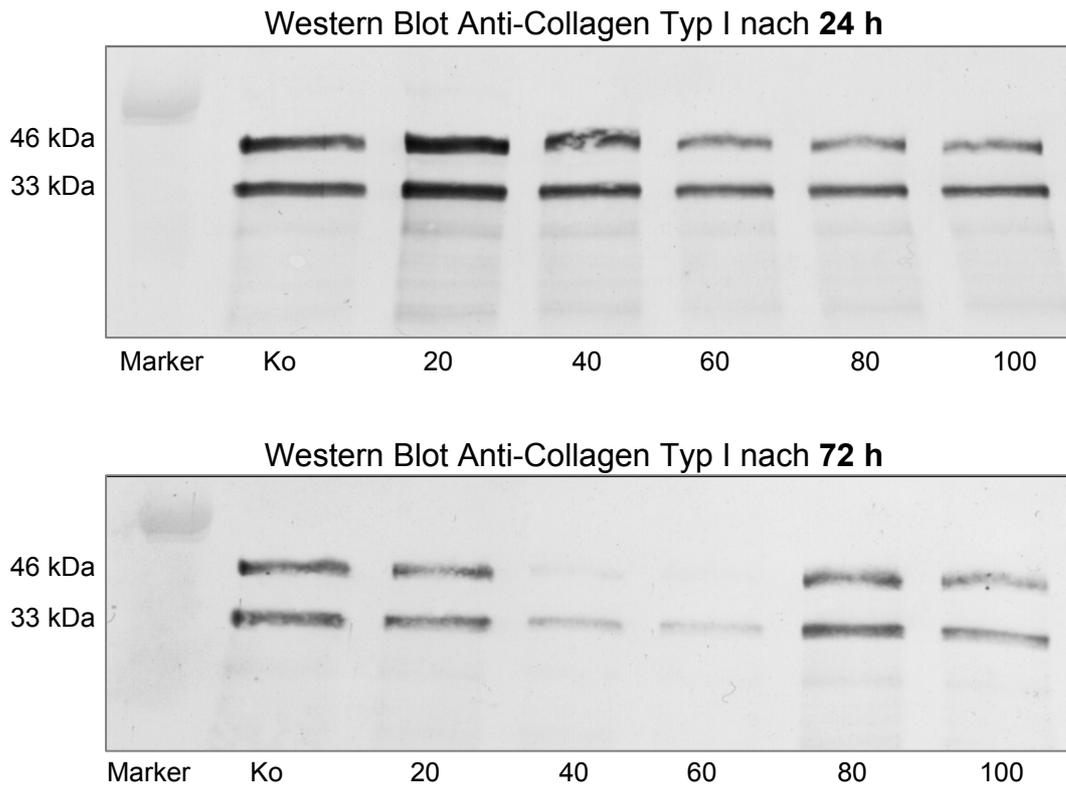
Abbildung 16 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen humaner Tenozyten nach kombinierter Behandlung mit Ciprofloxacin 10 und 30 mg/l sowie Ultrafiltrat-40 über 72 h. Dargestellt ist der Nachweis mit Anti-Fibronectin, so dass die Intensität der Fluoreszenz mit der Fibronectinmenge korreliert. Die Kontrolle weist eine sehr starke Fluoreszenz auf, welche das gesamte Zytoplasma der Tenozyten überstrahlt (Abbildung 16, Kontrolle). Im Vergleich dazu ist bei der mit Ultrafiltrat-40 behandelten Probe bereits ein Verblässen und randständige Betonung der Fluoreszenz zu beobachten (Abbildung 16, Ultrafiltrat-40). Die Behandlung mit Ciprofloxacin 10 mg/l führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer mäßigen Fluoreszenzminde- rung. Im Vergleich zur Ultrafiltrat-40-Probe finden sich noch mehr fluoreszierende Areale. In kombinierter Behandlung mit Ciprofloxacin 10 mg/l sowie Ultrafiltrat-40 ist ein deutlicher Fluoreszenzverlust dargestellt (Abbildung 16, Ciprofloxacin 10 mg/l und Ciprofloxacin 10 mg/l + Ultrafiltrat-40). Die Inkubation mit Ciprofloxacin 30 mg/l führte zu einer starken Fluoreszenzminderung. Die Zellkerne sind noch dezent abgrenzbar. Bei kombinierter Exposition der Zellen mit Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40 zeigt sich ein deutlicher Fluoreszenzverlust. Insgesamt ist Fibronectin kaum noch fluoreszenzmikroskopisch nachweisbar.



**Abbildung 17: Daten aus der Bildanalyse einer immunhistochemischen Darstellung von Fibronectin in humanen Tenozyten: Effekt einer 72 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ciprofloxacin (C) (0, 10, 30 mg/l) und Ultrafiltrat-40 (UF-40) auf die Syntheseleistung von Fibronectin im Vergleich zur Kontrolle (KO) in der Mehrfachbestimmung (8 Datenpunkte pro Probe). Angabe der Prozentwerte der Fluoreszenz und der Mediane. \*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle (ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test)**

### 4.3 Western Blot

Um eine mögliche Zytotoxizität des Ultrafiltrats auf die humanen Tenozyten zu untersuchen und um die beobachteten Veränderungen bei der Quantifizierung mittels Bildanalyse abzusichern, wurde neben der Immunhistochemie auch Western Blotting angewandt. Da mittels immunhistochemischem Nachweis aber auch eine Lokalisation des nachgewiesenen Proteins und ein morphologischer Vergleich unter dem Fluoreszenzmikroskop möglich ist, wurde für alle weiterführenden Versuche der immunhistochemische Nachweis gewählt. Auch im Western Blot Verfahren zeigten sich ähnliche Effekte, wie sie auch immunhistochemisch dargestellt werden konnten. In Abbildung 18 ist exemplarisch der Effekt einer 24 und 72 h Inkubation von humanen Tenozyten mit Ultrafiltrat-20, -40, -60, -80 und -100 im Vergleich zur Kontrolle dargestellt. Mittels Western Blotting wurde mit Anti-Collagen-I-Antikörpern das in der Probe enthaltene Collagen Typ I nachgewiesen. Nach 72 h Inkubation ist in den mit Ultrafiltrat-40 und -60 behandelten Proben deutlich weniger Collagen Typ I im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar. Bei Behandlung mit Ultrafiltrat-20, -80, -100 war im Vergleich zur Kontrolle kein deutlicher Effekt nachweisbar.



**Abbildung 18: Western Blot: Effekt einer 24 h und 72 h Inkubation von humanen Sehnenzellen mit Ultrafiltrat-20, -40, -60, -80, -100 in 10%iger Konzentration auf Collagen Typ I im Vergleich zur Kontrolle (Ko)**

## 5 Diskussion

Die Substanzklasse der Chinolone gehört zu den wichtigsten und am häufigsten eingesetzten antibakteriell wirksamen Chemotherapeutika. Ihre Bedeutung beruht auf ihrer guten Aktivität gegen ein breites Spektrum von Erregern, ihrer hervorragenden Gewebegängigkeit, ihrer bisher noch guten Resistenzlage und ihrer im Allgemeinen guten Verträglichkeit. Einer der wichtigsten Vertreter der Chinolone ist Ciprofloxacin. Als seltene und unter antibakteriellen Substanzen ungewöhnliche Nebenwirkung können Chinolone jedoch Schäden am juvenilen Gelenkknorpel in Form von Chinolon-induzierten Arthropathien sowie an Sehnen in Form von Chinolon-induzierten Tendopathien hervorrufen. Das sehnenschädigende Potential der Chinolone ist seit Anfang der Achtziger Jahre in zahlreichen Fallberichten und einigen retrospektiven Studien dokumentiert worden (Sendzik et al., 2009a).

Angaben zur Häufigkeit der Chinolon-induzierten Tendopathien variieren in der Fachliteratur deutlich. Gründe hierfür sind, dass neben wenigen retrospektiven Studien vor allem Fallberichte als Informationsquelle dienen. Diese klinischen Berichte werden jedoch oft nur beim Eintreten einer Sehnenruptur verfasst. Viele Fälle einer mit schmerzhaften Symptomen einhergehenden Tendinitis werden jedoch vermutlich gar nicht erfasst. Erschwerend kommt hinzu, dass ein Kausalzusammenhang zu einer Therapie mit Chinolonen oft nur schwer herzustellen ist. Dies liegt vor allem an der mitunter erheblichen Latenzzeit von bis zu 180 Tagen und mehr, die zwischen Beginn einer Chinolon-Therapie und dem Auftreten erster Symptome liegen kann (Haddow et al., 2003, Khaliq and Zhanel, 2003, van der Linden et al., 2003). Die Ursache für diese große Latenzzeit ist unklar. Es werden neben einer möglichen genetischen Prädisposition bestehende Vorerkrankungen, begleitende Medikationen sowie das Alter und geschlechtsspezifische Faktoren diskutiert (Pierfitte and Royer, 1996).

Neben der Erfassung von Fällen Chinolon-induzierter Tendopathien scheint insbesondere die Berücksichtigung bestimmter Risikofaktoren, wie z.B. ein erhöhtes Alter, die Höhe der Inzidenz stark zu beeinflussen. So ermittelten van der Linden et al. anhand einer retrospektiven Studie über einen Zeitraum von 10 Jahren das Risiko für eine Chinolon-induzierte Achillessehnenruptur angegeben als angepasste OR von 4,3 (95%-KI: 2,4-7,8). Für Patienten zwischen 60-79 Jahren lag die OR bereits bei 6,4 (95%-KI: 3,0-13,7) und für Patienten älter als 80 Jahre ergab sich eine OR von 20,4 (95%-KI: 4,6-90,1) (van der Linden et al., 2003).

Anhand dieser Zahlen wird deutlich, dass die Identifizierung und Charakterisierung von Risikofaktoren und deren Einfluss auf den Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tendopathie zunehmend an Bedeutung gewinnt und ins Zentrum der Chinolon-Forschung rückt.

Aus bisher vorliegenden klinischen Studien und Fallberichten konnten folgende Faktoren abgeleitet werden, für die ein erhöhtes Risiko zur Entwicklung einer Chinolon-induzierten Tendopathie zu bestehen scheint: erhöhtes Lebensalter (>60 Jahre), begleitende Glukokortikoidtherapie (insbesondere bei systemischer Applikation und Langzeittherapie) (van der Linden et al., 2003), einem Hyperparathyroidismus sowie das Vorliegen einer chronischen Nierenerkrankung im terminalen dialysepflichtigen Stadium (Stadium 5) (Khaliq and Zhanel, 2003, Palmer et al., 2004, Pouzaud et al., 2006, Muzi et al., 2007). Bei Vorliegen von Adipositas, einer rheumatoiden Arthritis sowie eines männlichen Geschlechts scheint das Risiko für eine Sehnenruptur erhöht (Seeger et al., 2006).

Insbesondere beim kumulativen Vorliegen mehrerer Risikofaktoren scheint das individuelle Risiko anzusteigen. Interessanterweise haben Patienten mit anamnestisch bekannter Chinolon-induzierter Tendopathie ein erhöhtes Risiko, bei erneuter Chinolon-Gabe wiederholt eine Tendopathie zu entwickeln (Maurin, 2008). Dies legt die Vermutung nahe, dass eine genetische Prädisposition ebenfalls eine Rolle spielen könnte.

Die Ursache für das erhöhte Risiko bei chronisch nierenkrankten Patienten und der zugrunde liegende Pathomechanismus sind noch weitgehend ungeklärt. Die in der Literatur verfügbaren Daten beziehen sich weitestgehend auf klinische Beobachtungen eines erhöhten Risikos, nähere Untersuchungen und Informationen zum zugrunde liegenden Mechanismus liegen noch nicht vor.

Auch ohne begleitende Chinolon-Therapie wurden bei Patienten mit chronischer Nierenerkrankung spontane Sehnenrupturen beobachtet (Jones and Kjellstrand, 1996, Palmer et al., 2004). Neben der Achillessehne können hierbei auch andere Körpersehnen betroffen sein (Morein et al., 1977, Basic-Jukic et al., 2009). Je länger eine dialysepflichtige Nierenerkrankung vorlag, desto höher scheint das Tenopathie-Risiko (Morein et al., 1977, Shah, 2002, Jones and Kjellstrand, 1996).

Einige Autoren sehen nicht primär die chronische Nierenerkrankung und Niereninsuffizienz sondern vielmehr den bei einer chronischen Nierenerkrankung, insbesondere im dialysepflichtigen Endstadium (Stadium 5), häufig vorliegenden sekundären Hyperparathyroidismus ursächlich (Hofmann et al., 1990, Jones and Kjellstrand, 1996, Palmer et al., 2004, Ureten et al., 2008). Verantwortlich hierfür könnte der durch einen Hyperparathyroidismus bewirkte Mangel an frei verfügbarem Magnesium im Gewebe sein (Hofmann et al., 1990, Jones and Kjellstrand, 1996, Shah, 2002, Palmer et al., 2004, Ureten et al., 2008). Es liegen jedoch auch Fallberichte chronisch niereninsuffizienter Patienten vor, bei denen es trotz physiologischem Parathormonspiegel im Serum zu einer Chinolon-induzierten Tendopathie gekommen ist

(Maurin, 2008). Auch eine verminderte renale Elimination des Chinolons mit einer daraus resultierenden erhöhten Arzneimittelkonzentration im Plasma und Gewebe sehen einige Kritiker als Erklärung für das erhöhte Risiko bei chronisch nierenerkrankten Patienten (Melhus, 2005).

Die Elimination der Fluorchinolone erfolgt zu unterschiedlichen Anteilen über die Nieren. So erfolgt die renale Elimination bei Ciprofloxacin zu 25-35%, bei Ofloxacin und Levofloxacin zu >90% (Melhus, 2005). Bei Einschränkung der Nierenfunktion (auch altersbedingt) ist die Dosierung der Chinolone daher adäquat zu reduzieren. Eine Überdosierung als Ursache der Chinolon-induzierten Tendopathie ist sonst nicht auszuschließen (Melhus, 2005).

Das häufig gleichzeitige Vorliegen mehrerer potentieller Risikofaktoren macht eine Abschätzung und Identifizierung des tatsächlich vorliegenden Risikos schwierig.

Die Zahl chronisch nierenerkrankter Patienten wird in Folge stark steigender Erkrankungszahlen der so genannten „Zivilisationskrankheiten“ Diabetes mellitus und Hypertonie, welche die häufigste Ursache chronischer Nierenerkrankungen darstellen, in den nächsten Jahren deutlich zunehmen. Auch die Tatsache, dass bei Patienten mit fortgeschrittenen chronischen Nierenerkrankungen aufgrund einer erhöhten Infektneigung Chinolone besonders häufig eingesetzt werden, macht die weitere Untersuchung dieses Risikofaktors so wichtig. Im Rahmen dieser Arbeit sollten Voraussetzungen für die Untersuchungen des potentiellen Risikofaktors chronische Nierenerkrankung geschaffen werden.

Zunächst wurden mit Hilfe eines *in vitro* Sehnenzellkulturmodells die tenotoxischen Effekte von Ciprofloxacin auf humane Tenozyten untersucht. Zur Simulation der Bedingungen einer dialysepflichtigen Nierenerkrankung im Organismus wurde biochemisch aufbereitetes Hämofiltrat eines chronisch nierenerkrankten Menschen verwendet. Ausgehend von der Annahme, dass im Blut von Patienten mit einer chronisch eingeschränkten Nierenleistung bestimmte urämische Toxine vorliegen könnten, die einen additiven oder synergistischen Effekt auf das tendotoxische Potential der Chinolone haben, wurde in dieser Arbeit in einem bisher im Zusammenhang mit Experimenten zur Chinolon-induzierten Tendopathie nicht beschriebenen innovativen Ansatz das sehnenschädigende Potential verschiedener aus Hämofiltrat gewonnener Ultrafiltrat-Fractionen an Primärkulturen humaner Sehnenzellen allein und in Kombination mit Ciprofloxacin getestet.

Grundlage dieses Ansatzes war eine bereits 2003 durchgeführte Untersuchung mit Hämofiltrat als Blutplasmäquivalent. Hierbei untersuchten Jankowski und Mitarbeiter ausgehend von Hämofiltrat chronisch nierenerkrankter Patienten die Effekte von urämischen Toxinen auf die NO-Expression in mononukleären Leukozyten (Jankowski et al., 2003). Hintergrund die-

ser Studie ist, dass bei Patienten mit terminaler Nierenerkrankung eine auffällig häufige Sterblichkeit bedingt durch arteriosklerotische Veränderungen zu beobachten war. NO hemmt die arteriosklerotischen Prozesse und Entzündungen der Gefäßwand durch Hemmung der Zellproliferation und Zytokin-induzierten Expression von Adhäsionsmolekülen und proinflammatorischen Zytokinen. Die Autoren untersuchten den Einfluss von aufbereitetem Hämofiltrat von nierenerkrankten Patienten im Stadium 5 sowie Plasma gesunder Kontrollpatienten auf die NO-Expression von mononuklearen Leukozyten. Während es bei den Kontrollgruppen zu keinem Effekt kam, inhibierte das Hämofiltrat die NO-Expression. In weiteren Untersuchungen wurde das Hämofiltrat soweit fraktioniert, dass mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie Phenylacetat als ursächlicher Faktor für die NO-Hemmung identifiziert werden konnte. Im Gegensatz zu den gesunden Probanden lag Phenylacetat bei den Probanden mit eingeschränkter Nierenfunktion in erhöhter Konzentration vor (Jankowski et al., 2003). Diese Studie veranschaulicht, wie Hämofiltrat als Blutplasmaäquivalent eingesetzt und zur Identifizierung von urämischen Toxinen und zur Untersuchung der terminalen Nierenerkrankung als Risikofaktor herangezogen werden kann.

Hämofiltrat wird schon seit einigen Jahren als Blutplasmaäquivalent zur systematischen Isolation zirkulierender menschlicher Peptide eingesetzt. Bei diesem so genannten „Peptide Trapping“ werden, analog dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verfahren, alle im Hämofiltrat von Patienten mit chronischem Nierenversagen (Stadium 5) enthaltenen Proteine biochemisch extrahiert. Mittels verschiedener chromatographischer Techniken wird anschließend eine systematische Separation der Peptide erreicht. Anhand ihrer Massen- und Chromatographie-spezifischen Eigenschaften können einzelne Peptide ausgewählt und mittels Aminosäuresequenzanalyse und Suche in Datenbanken als Teile größerer Proteine oder bisher unbekannte Peptidhormone identifiziert werden (Schulz-Knappe et al., 1996, Schulz-Knappe et al., 1997, Raida et al., 1999, Jankowski et al., 2003). Zudem bietet Hämofiltrat den großen Vorteil, dass es als Abfallprodukt der Hämofiltration in großen Mengen anfällt (30-40 Liter/Hämofiltration). Eine ethisch problematische Verwendung von Blutprodukten, welche für die Versorgung von Patienten benötigt werden und für schwer erkrankte Patienten belastende Blutentnahmen werden so zudem vermieden.

Ciprofloxacin führte bei den untersuchten humanen Tenozyten konzentrations- und zeitabhängig zu zellschädigenden Effekten. Bereits bei den niedrigsten getesteten Konzentrationen von 1 und 3 mg/l konnten geringe tenotoxische Effekte nachgewiesen werden. Diese Kon-

zentrationen entsprechen den Konzentrationen im Blusplasma des Menschen unter einer Ciprofloxacin-Therapie bei oraler Applikation (500 mg/l oral: 1,5-2,9 mg/l) (Dudley, 2003).

Bei der Untersuchung von Ultrafiltrat-Substraten am *in vitro* Zellmodell konnte ein zeitabhängiger sehnenschädigender Effekt bei allen Fraktionen festgestellt werden. Ultrafiltrat-40 führte jedoch im Vergleich zu den anderen Substraten zu einem deutlicheren Effekt. Bei kombinierter Exposition der humanen Tenozyten konnte eine Potenzierung des tenotoxischen Effekts von Ciprofloxacin plus Ultrafiltrat-40 festgestellt werden.

Als Marker für den sehnenschädigenden Effekt konnten eine zeit- und konzentrationsabhängige Reduktion des Hauptmatrixproteins Collagen Typ I sowie von Fibronectin, welches wichtig für die Integrität der extrazellulären Matrix ist, mittels immunhistochemischer und biochemischer Nachweismethoden festgestellt werden.

### **5.1 Chinolon-induzierte Effekte auf Tenozyten *in vivo* und *in vitro***

Den bisherigen Erkenntnissen zur tenotoxischen Wirkung von Chinolonen und dem zugrunde liegenden Pathomechanismus liegen im wesentlichen Daten und Ergebnisse aus *in vitro* Studien am Zellkulturmodell mit humanen und tierischen Zellen, tierexperimentelle Studien und publizierte klinische Humandaten und Fallberichte zu Grunde.

Die bisher publizierten Untersuchungen aus *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen konnten einige Hinweise und Erkenntnisse zum Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tendopathie geben. Allerdings liegen bisher zu dem Einfluss verschiedener Risikofaktoren wie etwa der chronischen Nierenerkrankung kaum Erkenntnisse vor.

Zum rationalen Vergleich verschiedener Substanzen, zur Untersuchung von Kombinationseffekten und zur Entschlüsselung von Pathomechanismen bieten *in vitro* Studien die besten Voraussetzungen. Sie sind vor allem für die früh-experimentellen Phasen geeignet, weshalb sie auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurden. Ein Nachteil der *in vitro* Studien ist jedoch, dass Ergebnisse dieser Studienform die größte Entfernung zu tatsächlichen Humanverhältnissen haben und eine Übertragung auf den lebenden menschlichen Organismus nicht direkt möglich ist.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte das tendotoxische Potential von Ciprofloxacin, einem wichtigen Vertreter der Substanzgruppe der Chinolone in allen getesteten Konzentrationen nachgewiesen werden. Immunhistochemisch konnte der Verlust an extrazellulärer Matrix bereits bei den niedrigsten getesteten Ciprofloxacin-Konzentrationen von 1 und 3 mg/l Medium anhand einer Reduktion des Hauptmatrixproteins Collagen Typ I nachgewiesen werden.

Für die Konzentrationen 3, 10 und 30 mg/l Medium war der Unterschied im Vergleich zur Kontrolle signifikant (\*  $p < 0,05$  gegen Kontrolle; ANOVA und post hoc Dunnett-t-Test).

Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit bisherigen Erkenntnissen aus *in vitro* Studien. So konnte Sendzik eine konzentrations- und zeitabhängige Reduktion von Collagen Typ I durch Ciprofloxacin und Levofloxacin am humanen *in vitro* Modell nachweisen, jedoch lag die niedrigste Testkonzentration bei 3 mg Ciprofloxacin/l Medium (Sendzik, 2006).

Auch Williams et al. konnten in einer *in vitro* Studie an Achillessehnen von Kaninchen einen durch Ciprofloxacin verursachten Effekt auf die extrazelluläre Matrix feststellen. Neben dem Effekt auf die Collagen-Synthese konnte zudem eine Reduktion von Proteoglykanen und eine verminderte Zellproliferation festgestellt werden (Williams et al., 2000). Eine verminderte Zellproliferation konnten auch Yoon und Mitarbeiter bei Untersuchungen von Effekten von Enrofloxacin auf Hühnersehnenzellen feststellen. Auch Simonin et al. konnten Chinolon-induzierte Veränderungen an der extrazellulären Matrix nachweisen. So führte die Behandlung von Achillessehnenzellen von Nagern mit Pefloxacin zu einer Veränderung im Proteoglykanmetabolismus, der zu einer Oxidation von Collagen führte (Simonin et al., 2000). Im Zusammenhang dazu steht eine Studie von 2004, bei der die zytotoxische Wirkung verschiedener Chinolone ebenfalls im Zusammenhang mit „frühem oxidativen Stress“ gesehen wurde (Pouzaud et al., 2004, Pouzaud et al., 2006).

Auch in verschiedenen tierexperimentellen *in vivo* Studien konnten Chinolon-induzierte tendotoxische Effekte nachgewiesen werden. Kato und Mitarbeiter untersuchten den Effekt von 10 verschiedenen Chinolonen auf juvenile Ratten und konnten histologisch deutliche Veränderungen, wie irregulär angeordnete oder abgelöste Collagenfaserbündel, eine Entzündungsreaktion in Form einer Infiltration mononukleärer Zellen im Bereich der Sehnenscheide, pyknotische und fragmentierte Zellkerne (Tenozyten) sowie Ödembildung an Sehne, Synovia (Synovialmembran) und angrenzenden Muskeln feststellen (Kato et al., 1995a, Kashida and Kato, 1997a, Kashida and Kato, 1997c, Kashida and Kato, 1997b). Im Gegensatz zu dieser Arbeitsgruppe, untersuchten Shakibaei und Mitarbeiter mittels Elektronenmikroskopie Chinolon-induzierte ultrastrukturelle Veränderungen der Zelle. Bei einer Studie an Ratten konnten hierbei verschiedene pathologische Veränderungen auf Zellstrukturebene festgestellt werden. So stellten sich eine erhöhte Anzahl von Vakuolen und Vesikeln im Zytoplasma, eine Zellkernverdichtung sowie geschwollene Zellorganellen, z.B. Mitochondrien und raues endoplasmatisches Retikulum, dar. Als Effekte auf die extrazelluläre Matrix konnten ein erhöhter Abstand zwischen den einzelnen Collagenfibrillen sowie eine generelle Abnahme des Col-

lagenfibrillendurchmessers festgestellt werden (Shakibaei et al., 2000, Shakibaei and Stahlmann, 2003).

Auf Proteinebene konnten Shakibaei et al. biochemisch eine Reduktion von Collagen Typ I, Fibronectin und Elastin sowie Integrine in einer weiteren *in vivo* Studie an Hundesehnen nachweisen (Shakibaei et al., 2001a). Auch diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten der vorliegenden Arbeit.

Aufgrund der großen Ähnlichkeit der Gewebeeigenschaften von Knorpel und Sehne können wahrscheinlich viele Erkenntnisse zum Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Chondrotoxizität auf die Chinolon-induzierte Tenotoxizität übertragen werden. Zudem konnten im Tierversuch an Sehnenzellen beobachtete Effekte bereits auch an humanen Tenozyten erbracht werden (Pouzaud et al., 2004, Sendzik et al., 2005). Zusammenfassend lassen sich aus den bisherigen Erkenntnissen aus *in vitro* und *in vivo* Studien folgende Hypothesen zum Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tendopathie ableiten. Die Eigenschaft der Chinolone, mit (zweiwertigen) Kationen chelatartige Komplexverbindungen einzugehen, scheint dabei von zentraler Bedeutung.

Das Binden und die damit verbundene Reduktion des funktionell verfügbaren Magnesiums im Bindegewebe könnte zur vermehrten Bildung von freien Radikalen führen, welche unter anderem über eine Aktivierung von Matrix-abbauenden Proteasen zu einer Schädigung der Matrix führen können (Simonin et al., 2000, Pouzaud et al., 2004). Auch wichtige Zell-Matrix-Interaktionen, welche über kationabhängige transmembranäre Rezeptoren ( $\beta$ 1-Integrine) vermittelt werden, können durch die Komplexbindung von Magnesiumionen gestört werden. Eine Störung der Integrinfunktion kann zu einer Beeinträchtigung des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg führen, welcher Einfluss auf die Zelldifferenzierung oder auch Einleitung des programmierten Zelltodes (Apoptose) hat (Shakibaei et al., 2001b). Diese Hypothese wird auch durch eine tierexperimentelle Studie an juvenilen Hunden gestützt, bei der nach magnesiumarmer Diät ähnliche Effekte auftraten (Reduktion Collagen Typ I und Fibronectin), wie bei einer Behandlung mit Ciprofloxacin (Shakibaei et al., 2001a).

Die vorliegenden Humandaten zur Chinolon-induzierten Tendopathie umfassen Fallberichte sowie einige retrospektive Studien. Diese Daten besitzen unmittelbare Relevanz für eine Risikoabschätzung. Für die Klärung des Pathomechanismus einer Chinolon-induzierten Tendopathie sind sie jedoch kaum geeignet. Sie können jedoch wertvolle Hinweise für die Identifizierung von begleitenden Risikofaktoren liefern und einen groben Risikovergleich der verschiedenen Fluorchinolone untereinander ermöglichen. Angaben über Risikoinzidenzen von

Chinolon-induzierten Tendinitiden und Sehnenrupturen müssen jedoch auch im Hinblick auf eine mögliche Untererfassung der Chinolon-induzierten Tendinitis kritisch betrachtet werden. Die Daten aus retrospektiven Studien deuten darauf hin, dass für die verschiedenen Fluorchinolone ein unterschiedlich hohes Tendopathierisiko besteht. So scheint es unter Ofloxacin- und Pefloxacin-Behandlung häufiger zu einer Tendopathie zu kommen, als unter Ciprofloxacin (van der Linden et al., 1999, van der Linden et al., 2001, van der Linden et al., 2002, Haddow et al., 2003, Khaliq and Zhanel, 2003, van der Linden et al., 2003).

Eine genauere Untersuchung des tendotoxischen Potentials der einzelnen Fluorchinolone untereinander wurde vor dem Hintergrund dieser klinischen Erfahrungen auch in einigen *in vitro* Studien durchgeführt. So konnte etwa Sendzik eine höhere tenotoxische Aktivität von Ciprofloxacin gegenüber Levofloxacin feststellen (Sendzik, 2006). Die Übertragung der *in vitro* Daten auf die therapeutische Situation macht jedoch auch eine Berücksichtigung der pharmakokinetischen Unterschiede erforderlich.

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten niedrigen Konzentrationen von 1 und 3 mg/l Ciprofloxacin wurden in Anlehnung an die pharmakokinetischen Eigenschaften von Ciprofloxacin im Menschen nach oraler Verabreichung gewählt. So werden bei Verabreichung der therapeutischen Standarddosierung von 500 mg Ciprofloxacin per os maximale Spitzenkonzentrationen von 1,5-2,9 mg/l im Plasma gemessen. Bei intravenöser Gabe liegen diese Werte bei Gabe von 400 mg/l bei 3,4-6,7 mg/l. Bei schwerkranken Patienten wurden sogar Werte bis zu 18 mg/l gemessen (Dudley, 2003, van Zanten et al., 2008).

Dennoch können die gemessenen Spitzenkonzentrationen nicht unbedingt mit der konstanten *in vitro* Konzentration gleichgesetzt werden. Es muss auch berücksichtigt werden, dass sich Chinolone im Knorpel und aufgrund der ähnlichen Gewebebeschaffenheit vermutlich auch in der Sehne anreichern und so in höherer Konzentration vorliegen als im Blutplasma, daher sind auch die verwendeten Ciprofloxacin-Konzentrationen von 10 und 30 mg/l durchaus im oberen therapeutischen Bereich zu sehen.

Auch die in der vorliegenden Arbeit gewählte maximale Inkubationszeit von 72 Stunden entspricht zwar nicht der üblichen Therapiedauer von 5-7 Tagen, jedoch weisen einige Fallberichte darauf hin, dass Tendopathien bereits innerhalb von 3 Tagen auftreten können (Haddow et al., 2003).

## **5.2 Effekte von Ultrafiltrat auf Tenozyten *in vitro***

Klinische Beobachtungen zeigen, dass es bei Patienten mit chronisch eingeschränkter Nierenfunktion, insbesondere im terminalen dialysepflichtigen Stadium 5, zum Auftreten von Ten-

dopathien und Sehnenrupturen kommen kann (Hofmann et al., 1990, Jones and Kjellstrand, 1996, Palmer et al., 2004, Ureten et al., 2008). Als Ursache wird der Einfluss urämischer Toxine diskutiert (Morein et al., 1977). Für die Untersuchungen dieser Arbeit wurde Hämofiltrat vom chronisch nierenerkrankten Patienten biochemisch aufbereitet und aufgrund der Ladungseigenschaften der enthaltenden Peptide in fünf verschiedene so genannte Ultrafiltrat-Fractionen extrahiert und eluiert (Ultrafiltrat-20, -40, -60, -80, -100).

In der Literatur liegen keine Daten zu *in vitro* Arbeiten mit Hämofiltrat und Tenozyten vor. Nach Behandlung der humanen Tenozyten mit den Ultrafiltrat-Substraten konnten bereits nach 24 h Inkubation bei Ultrafiltrat-40 auffällige morphologische Veränderungen in Form einer vermehrten Vakuolen- und Vesikelbildung unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden.

Auf Proteinebene kam es nach Behandlung der humanen Tenozyten *in vitro* unterschiedlich stark ausgeprägt bei allen getesteten Ultrafiltrat-Substraten zu einer zeitabhängigen Reduktion von Collagen Typ I im Vergleich zur Kontrolle. Im immunhistochemischen Nachweis zeigte insbesondere Ultrafiltrat-40 einen sehr deutlichen Effekt. Im Western Blotting war eine deutliche Reduktion von Collagen Typ I (und Fibronectin) neben der mit Ultrafiltrat-40 behandelten Probe auch bei dem Ultrafiltrat-60-Substrat auffällig.

Die Behandlung von Tenozyten mit Ultrafiltrat allein scheint also ähnlich den Chinolonen, einen tenotoxischen Effekt zu haben und zu einer Verminderung der Collagen- und Fibronectinsynthese und Zellviabilität zu führen.

Die getesteten Ultrafiltrat-Substrate, die alle in der gleichen 10-prozentigen Konzentration verwendet wurden, haben nicht im gleichen Ausmaß zu einer Reduktion von Collagen Typ I und Fibronectin geführt. Ein ähnlich ausgeprägter Effekt hätte auch für einen tenotoxischen Effekt, verursacht durch bei der Aufbereitung des Hämofiltrat verwendete Lösungsmittel (Acetonitril), sprechen können. So aber weisen die Ergebnisse zumindest auf ein zusätzlich vorliegendes unterschiedliches tenotoxisches Potential der Ultrafiltrat-Fractionen hin. Insbesondere die Ultrafiltrat-40 und -60 haben zu einer deutlichen Reduktion von Collagen Typ I und Fibronectin geführt. Dies lässt die Vermutung zu, dass sich nach biochemischer Auftrennung der Proteinbestandteile in die verschiedenen Fractionen ein oder mehrere Peptide bzw. Faktoren angesammelt haben, welche über ein besonders hohes tenotoxisches Potential verfügen. Diese Hypothese wird auch durch die Tatsache bestärkt, dass die beiden Fractionen im Elutionsprozess nebeneinander lagen. Es könnte sich also um das gleiche urämische Toxin handeln.

Es könnte sich also, ähnlich der Untersuchung von Jankowski und Mitarbeitern zur Wirkung von Phenylacetat auf die NO-Expression mononuklearer Leukozyten, um einen Plasmabestandteil handeln, der bei Patienten mit eingeschränkter Nierenleistung in erhöhter Konzentration vorliegt und als urämisches Toxin tenotoxische Effekte auf Sehnenzellen bewirkt (Jankowski et al., 2003).

### **5.3 Effekte einer kombinierten Exposition mit Ciprofloxacin und Ultrafiltrat auf Tenozyten *in vitro***

Klinische Beobachtungen zeigen eine Risikoerhöhung für eine Chinolon-induzierte Tendopathie bei gleichzeitig vorliegender chronisch eingeschränkter Nierenfunktion (Jones and Kjellstrand, 1996, Palmer et al., 2004, Maurin, 2008). In der Literatur liegen bisher noch keine Daten für die zugrunde liegenden Mechanismen dieser Risikoverstärkung vor.

Die Frage, ob das insbesondere in dem Ultrafiltrat-40 vorliegende urämische Toxin in Kombination mit Ciprofloxacin zu einer Potenzierung des in der Einzeltestung beobachteten tenotoxischen Effektes führt, wurde im Rahmen dieser Arbeit in einer kombinierten Behandlung von humanen Tenozyten mit verschiedenen Ciprofloxacin-Konzentrationen und Ultrafiltrat-40 in 10% Konzentration über 72 Stunden untersucht.

Es wurde Ultrafiltrat-40 verwendet, da bei dieser Fraktion in den Einzeltestungen und in der immunhistologischen und lichtmikroskopischen Untersuchung die deutlichsten Effekten beobachtet werden konnten. Auch für Ciprofloxacin wurden Konzentrationen gewählt, die die deutlichsten Effekte hervorriefen (10 und 30 mg/l). Da von einer Anreicherung des Chinolons im Gewebe ausgegangen werden muss, entsprechen diese Ciprofloxacin-Konzentrationen durchaus einer unter therapeutischen Bedingungen erreichbaren Wirkstoffkonzentration im Gewebe.

Die kombinierte Inkubation von humanen Tenozyten mit Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40 zeigte eine Ciprofloxacin-konzentrationsabhängige Reduktion von Collagen Typ I im Vergleich zur Kontrolle. Im Vergleich zur jeweils nur mit Ultrafiltrat oder Ciprofloxacin behandelten Probe kam es bei kombinierter Exposition der Tenozyten mit beiden Testsubstanzen zu einer deutlichen Effektsteigerung. Das in dem Ultrafiltrat enthaltene sehnenzellschädigende Toxin scheint in Kombination mit Ciprofloxacin einen additiven tenotoxischen Effekt zu haben. Ob es sich bei dieser Effektverstärkung auch um einen synergistischen oder additiven Effekt handelt, kann anhand der Untersuchungen dieser Arbeit nicht abgeleitet werden.

## 5.4 Ausblick

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das verwendete *in vitro* Zellmodell geeignet ist, um tenotoxische Effekte an humanen Tenozyten nachzuweisen und den Risikofaktor chronische Nierenerkrankung anhand von aufbereitetem Hämofiltrat zu simulieren und näher zu untersuchen. Zudem konnten additive Effekte der tenotoxischen Wirkung von Ciprofloxacin und Ultrafiltrat nachgewiesen werden. Anhand der Untersuchungen dieser Arbeit können noch keine abschließenden Aussagen über einen möglicherweise vorliegenden Synergismus von Ultrafiltrat und Chinolon getroffen werden. Eine mögliche Erklärung der Effektverstärkung könnte jedoch, ähnlich der Hypothese zur Potenzialverstärkung bei Glukokortikoiden und Chinolonen, eine Kreuzung in der Signalübertragung auf Signaltransduktionsebene mit nachfolgender Aktivierung gleicher Transkriptionsverfahren sein. Zur Klärung dieser Hypothese müssen die Angriffspunkte des Ultrafiltrats im Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tenopathie weiter untersucht werden. Hierfür sollten z.B. Untersuchungen von Schlüsselproteinen der Signaltransduktionsprozesse zum Beispiel mit dem Western Blot Verfahren oder auf RNA-Ebene mit PCR-Verfahren folgen.

Die Verwendung von Ultrafiltrat zur Simulation des Risikofaktors chronische Nierenerkrankung bietet als innovativer Ansatz Voraussetzungen für weiterführende Untersuchungen von urämischen Toxinen, die für die Klärung des zugrunde liegenden Pathomechanismus hilfreich sein könnten. Die im Ultrafiltrat enthaltenen Substanzen können auch im Serum nierengesunder Patienten vorliegen. In einer naturwissenschaftlichen Arbeit, die zurzeit am Institut für klinische Pharmakologie und Toxikologie der Medizinischen Fakultät der Charité Universitätsmedizin Berlin von Cornelius Kreuzer durchgeführt wird, werden weitere Untersuchungen und biochemische Analyseverfahren durchgeführt, die zur Identifizierung der im Ultrafiltrat enthaltenen tenotoxischen Stoffe führen sollen.

Mit dieser Kenntnis könnten Dialyseprozesse oder Medikationen gezielt angepasst, das Risiko für diese schwerwiegende unerwünschte Chinolon-Wirkung reduziert und die Morbidität dieses bereits schwer erkrankten Patientenkollektivs gesenkt werden.

## 6 Zusammenfassung

Aufgrund ihres breiten Wirkspektrums, welches auch einige Keime mit Resistenzentwicklung gegenüber Standardantibiotika einschließt, ihrer guten Gewebegängigkeit und ihrer noch relativ guten Resistenzlage, stellen Chinolone eine wichtige und häufig indizierte Substanzklasse antibakteriell wirksamer Therapeutika dar.

Sie werden insbesondere bei Infektionen der Harn- und Atemwege sowie zur Behandlung von anderen systemischen Infektionen und Sepsis eingesetzt. Ciprofloxacin ist ein wichtiger und häufig eingesetzter Vertreter der Chinolone.

Als seltene unerwünschte Arzneimittelwirkung können Chinolone zu Tendopathien in Form von unspezifischen Tendinitiden bis zur kompletten Sehnenruptur führen. Obwohl in den vergangenen Jahren viele Erkenntnisse hinzugewonnen werden konnten, ist der Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tendopathie nicht vollkommen geklärt. Insbesondere die Rolle einiger durch klinische Beobachtungen identifizierter Risikofaktoren ist noch unklar. Neben einem erhöhtem Lebensalter, einer gleichzeitigen oder vorangegangenen Glukokortikoidtherapie ist bei Vorliegen einer chronischen Niereninsuffizienz ein erhöhtes Risiko für eine Chinolon-induzierte Tendopathie beobachtet worden. Bei steigender Zahl chronisch niereninsuffizienter Patienten gewinnt die Untersuchung und Klärung dieses Risikofaktors an Bedeutung. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung eines *in vitro* Sehnenzellkulturmodells zur Simulation des Risikofaktors chronische Niereninsuffizienz. Mit Hilfe dieses Modells sollte die Voraussetzung für weitere Versuche und neue Erkenntnisse zum Mechanismus des tenotoxischen Potentials der Chinolone und dem Einfluss des Risikofaktors chronische Niereninsuffizienz geschaffen werden. Zur Simulation der chronischen Niereninsuffizienz wurde biochemisch aufbereitetes und fraktioniertes Hämofiltrat verwendet, welches bei der Hämofiltration chronisch niereninsuffizienter Patienten anfällt. Hämofiltrat stellt ein Blutplasmaäquivalent dar, welches als geeignetes Ausgangssubstrat zur Isolierung und Identifizierung von humanen Peptiden und anderen Stoffen verwendet werden kann.

Die Verwendung von Hämofiltratfraktionen zur Untersuchung tenotoxischer Effekte stellt einen innovativen Ansatz dar.

Mit Hilfe des Zellmodells sollten im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* die Effekte von Ciprofloxacin und verschiedenen Ultrafiltrat-Substraten allein und in Kombination an Primärkulturen humaner Tenozyten im Monolayer untersucht werden. Die Analyse erfolgte sowohl morphologisch mittels Lichtmikroskopie als auch immunhistochemisch unter Einsatz einer semiquantitativen Auswertung durch Bildanalyse.

Bei Untersuchung der Effekte von Ciprofloxacin allein konnten bereits für die niedrigste verwendete Konzentration von 1 mg/l Effekte auf die Sehnenzelle beobachtet werden. Ein signifikanter Effekt konnte ab einer Ciprofloxacin-Konzentration von 3 mg/l nachgewiesen werden, welche unter therapeutischen Bedingungen erreicht wird.

Bei den *in vitro* Untersuchungen verschiedener aus Hämofiltrat gewonnenen Ultrafiltrat-Substraten konnte für alle verwendeten Fraktionen ein signifikanter Effekt auf die humanen Tenozyten in Form einer Abnahme des Hauptmatrixproteins Collagen Typ I nachgewiesen werden. Besonders auffällig war jedoch der Effekt des Ultrafiltrat-40, das wiederholt zu den deutlichsten Effekten führte.

Auch morphologische Veränderungen konnten unter dem Lichtmikroskop beobachtet werden. So zeigte sich bei Inkubation mit Ultrafiltrat-40 bereits nach 24 h Inkubation eine im Vergleich zur Kontrolle auffällige Vakuolen- und Vesikelbildungen bei den humanen Tenozyten. In der kombinierten Testung von Ciprofloxacin 10 oder 30 mg/l sowie Ultrafiltrat-40 konnten additive Effekte nachgewiesen werden. In Kombination zeigte sich jeweils eine Verstärkung der reduzierenden Effekte auf Collagen Typ I sowie auf Fibronectin.

Der in Kombination von Ciprofloxacin und Ultrafiltrat-40 aufgetretene additive tenotoxische Effekt steht in Übereinstimmung mit der klinisch beobachteten Risikoerhöhung für Chinolon-induzierte Tendopathien bei Patienten mit einer chronischen Niereninsuffizienz.

Das im Rahmen dieser Arbeit etablierte *in vitro* Modell erlaubt die Simulierung des Risikofaktors chronische Niereninsuffizienz und bietet die Voraussetzung für weiterführende Untersuchungen von urämischen Toxinen, welche auch im Serum nierengesunder Patienten vorliegen können und ihre Bedeutung beim Pathomechanismus der Chinolon-induzierten Tendopathie. Zudem bietet es die Möglichkeit im Rahmen weiterer Untersuchungen und biochemischer Analyseverfahren ursächliche tenotoxische Faktoren zu isolieren und zu identifizieren.

## 7 Literaturverzeichnis

- BARRY, A. L., FUCHS, P. C. & BROWN, S. D. (2001) In vitro activities of three nonfluorinated quinolones against representative bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 45, 1923-7.
- BASIC-JUKIC, N., JURIC, I., RACKI, S. & KES, P. (2009) Spontaneous tendon ruptures in patients with end-stage renal disease. *Kidney Blood Press Res*, 32, 32-6.
- BENJAMIN, M. & RALPHS, J. R. (2000) The cell and developmental biology of tendons and ligaments. *Int Rev Cytol*, 196, 85-130.
- BOWIE, W. R., WILLETTS, V. & JEWESSON, P. J. (1989) Adverse reactions in a dose-ranging study with a new long-acting fluoroquinolone, fleroxacin. *Antimicrob Agents Chemother*, 33, 1778-82.
- BRAUN, D., PETITPAIN, N., COSSERAT, F., LOEUILLE, D., BITAR, S., GILLET, P. & TRECHOT, P. (2004) Rupture of multiple tendons after levofloxacin therapy. *Joint Bone Spine*, 71, 586-7.
- BURKHARDT, J. E., HILL, M. A., CARLTON, W. W. & KESTERSON, J. W. (1990) Histologic and histochemical changes in articular cartilages of immature beagle dogs dosed with difloxacin, a fluoroquinolone. *Vet Pathol*, 27, 162-70.
- CASPIAN, J. M., LUCHI, M., MOFFAT, R. E. & HINTHORN, D. (2000) Quinolones and tendon ruptures. *South Med J*, 93, 488-91.
- COWAN, M. A. & ALEXANDER, S. (1961) Simultaneous bilateral rupture of Achilles tendons due to triamcinolone. *Br Med J*, 1, 1658.
- CRONIN, M. E. (1988) Musculoskeletal manifestations of systemic lupus erythematosus. *Rheum Dis Clin North Am*, 14, 99-116.
- CSIZY, M. & HINTERMANN, B. (2001) Rupture of the Achilles tendon after local steroid injection. Case reports and consequences for treatment. *Swiss Surg*, 7, 184-9.
- DOMAGALA, J. M. (1994) Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *J Antimicrob Chemother*, 33, 685-706.
- DONCK, J. B., SEGAERT, M. F. & VANRENTERGHEM, Y. F. (1994) Fluoroquinolones and Achilles tendinopathy in renal transplant recipients. *Transplantation*, 58, 736-7.
- DUDLEY, M. N. (2003) Pharmacokinetics of fluoroquinolones. IN HOOPER, D. E. & RUBINSTEIN, E. (Eds.) *Quinolone Antimicrobial Agents*. 3 ed., Press Washington DC, S. 115-132.
- FÖRSTER, C., KOCIOK, K., SHAKIBAEI, M., MERKER, H. J. & STAHLMANN, R. (1996) Quinolone-induced cartilage lesions are not reversible in rats. *Arch Toxicol*, 70, 474-81.
- FRANZ, H. E. & HÖRL, W. H. (1997) *Blutreinigungsverfahren Technik und Klinik; 189 Tabellen*, Stuttgart New York, Thieme.
- FREI, U. & SCHÖBER-HALSTENBERG, H.-J. (2006) *Nierenersatztherapie in Deutschland. QuaSi-Niere Jahresbericht 2005/2006*, Berlin, QuaSi-Niere gGmbH.
- GRANT, W. P., SULLIVAN, R., SONENSHINE, D. E., ADAM, M., SLUSSER, J. H., CARSON, K. A. & VINIK, A. I. (1997) Electron microscopic investigation of the effects of diabetes mellitus on the Achilles tendon. *J Foot Ankle Surg*, 36, 272-8; discussion 330.
- HADDOW, L. J., CHANDRA SEKHAR, M., HAJELA, V. & GOPAL RAO, G. (2003) Spontaneous Achilles tendon rupture in patients treated with levofloxacin. *J Antimicrob Chemother*, 51, 747-8.
- HASSLACHER, C. (2003) *Diabetische Nephropathie - Prävention und Therapie*, Bremen, Uni-Med.

- HAYES, D. W., JR., GILBERTSON, E. K., MANDRACCHIA, V. J. & DOLPHIN, T. F. (2000) Tendon pathology in the foot. The use of corticosteroid injection therapy. *Clin Podiatr Med Surg*, 17, 723-35.
- HEISIG, P. & WIEDEMANN, B. (2001) [Action and reaction. Actions and resistance mechanisms of quinolone]. *Pharm Unserer Zeit*, 30, 382-93.
- HEROLD, G. (2005) *Innere Medizin Eine vorlesungsorientierte Darstellung*, Köln, Herold, G.
- HOFMANN, G. O., WEBER, T. & LOB, G. (1990) Tendon rupture in chronic kidney insufficiency--"uremic tendonopathy"? A literature-supported documentation of 3 cases. *Chirurg*, 61, 434-7.
- HYNES, R. O. (1992) Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25.
- INGHAM, B. & BRETNALL, D. W. (1977) Arthropathy induced by antibacterial fused N-alkyl-3-pyridone-carboxylic acids. *Toxikology Letters*, 21-26.
- IVASKA, J. & HEINO, J. (2000) Adhesion receptors and cell invasion: mechanisms of integrin-guided degradation of extracellular matrix. *Cell Mol Life Sci*, 57, 16-24.
- JANKOWSKI, J., VAN DER GIET, M., JANKOWSKI, V., SCHMIDT, S., HEMEIER, M., MAHN, B., GIEBING, G., TOLLE, M., LUFTMANN, H., SCHLUTER, H., ZIDEK, W. & TEPEL, M. (2003) Increased plasma phenylacetic acid in patients with end-stage renal failure inhibits iNOS expression. *J Clin Invest*, 112, 256-64.
- JONES, N. & KJELLSTRAND, C. M. (1996) Spontaneous tendon ruptures in patients on chronic dialysis. *Am J Kidney Dis*, 28, 861-6.
- JOZSA, L., KANNUS, P., BALINT, J. B. & REFFY, A. (1991) Three-dimensional ultrastructure of human tendons. *Acta Anat (Basel)*, 142, 306-12.
- JOZSA, L., KVIST, M., BALINT, B. J., REFFY, A., JARVINEN, M., LEHTO, M. & BARZO, M. (1989) The role of recreational sport activity in Achilles tendon rupture. A clinical, pathoanatomical, and sociological study of 292 cases. *Am J Sports Med*, 17, 338-43.
- KANNUS, P. (2000) Structure of the tendon connective tissue. *Scand J Med Sci Sports*, 10, 312-20.
- KAO, N. L., MOY, J. N. & RICHMOND, G. W. (1992) Achilles tendon rupture: an under-rated complication of corticosteroid treatment. *Thorax*, 47, 484.
- KASHIDA, Y. & KATO, M. (1997a) Characterization of fluoroquinolone-induced Achilles tendon toxicity in rats: comparison of toxicities of 10 fluoroquinolones and effects of anti-inflammatory compounds. *Antimicrob Agents Chemother*, 41, 2389-93.
- KASHIDA, Y. & KATO, M. (1997b) Possible involvement of nitric oxide in the quinolone-induced tendon lesions in rats. *Drugs Exp Clin Res*, 23, 139-43.
- KASHIDA, Y. & KATO, M. (1997c) Toxic effects of quinolone antibacterial agents on the musculoskeletal system in juvenile rats. *Toxicol Pathol*, 25, 635-43.
- KATO, M. & ONODERA, T. (1988a) Effect of ofloxacin on the uptake of [3H]thymidine by articular cartilage cells in the rat. *Toxicol Lett*, 44, 131-42.
- KATO, M. & ONODERA, T. (1988b) Morphological investigation of cavity formation in articular cartilage induced by ofloxacin in rats. *Fundam Appl Toxicol*, 11, 110-9.
- KATO, M. & ONODERA, T. (1988c) Morphological investigation of osteochondrosis induced by ofloxacin in rats. *Fundam Appl Toxicol*, 11, 120-31.
- KATO, M., TAKADA, S., KASHIDA, Y. & NOMURA, M. (1995a) Histological examination on Achilles tendon lesions induced by quinolone antibacterial agents in juvenile rats. *Toxicol Pathol*, 23, 385-92.
- KATO, M., TAKADA, S., OGAWARA, S. & TAKAYAMA, S. (1995b) Effect of levofloxacin on glycosaminoglycan and DNA synthesis of cultured rabbit chondrocytes at

- concentrations inducing cartilage lesions in vivo. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 1979-83.
- KHALIQ, Y. & ZHANEL, G. G. (2003) Fluoroquinolone-associated tendinopathy: a critical review of the literature. *Clin Infect Dis*, 36, 1404-10.
- KINZIG-SCHIPPERS, M., FUHR, U., ZAIGLER, M., DAMMEYER, J., RUSING, G., LABEDZKI, A., BULITTA, J. & SORGEL, F. (1999) Interaction of pefloxacin and enoxacin with the human cytochrome P450 enzyme CYP1A2. *Clin Pharmacol Ther*, 65, 262-74.
- KOTNIS, R. A., HALSTEAD, J. C. & HORMBREY, P. J. (1999) Atraumatic bilateral Achilles tendon rupture: an association of systemic steroid treatment. *J Accid Emerg Med*, 16, 378-9.
- LAUZON, C., CARETTE, S. & MATHON, G. (1987) Multiple tendon rupture at unusual sites in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol*, 14, 369-71.
- LEPPILAHTI, J. & ORAVA, S. (1998) Total Achilles tendon rupture. A review. *Sports Med*, 25, 79-100.
- LEPPILAHTI, J., PURANEN, J. & ORAVA, S. (1996) Incidence of Achilles tendon rupture. *Acta Orthop Scand*, 67, 277-9.
- LESHER, G. Y., FROELICH, E. J., GRUETT, M. D., BAILEY, J. H. & BRUNDAGE, R. P. (1962) 1,8-Naphthyridine Derivatives. a New Class of Chemotherapeutic Agents. *J Med Pharm Chem*, 91, 1063-5.
- MAURIN, N. (2008) Fluorochinolon-induzierte Achillessehnenruptur [Fluoroquinolone-induced Achilles tendon rupture]. *Dtsch Med Wochenschr*, 133, 241-4.
- MELHUS, A. (2005) Fluoroquinolones and tendon disorders. *Expert Opin Drug Saf*, 4, 299-309.
- MOREIN, G., GOLDSCHMIDT, Z., PAUKER, M., SEELENFREUND, M., ROSENFELD, J. B. & FRIED, A. (1977) Spontaneous tendon ruptures in patients treated by chronic hemodialysis. *Clin Orthop Relat Res*, 209-13.
- MUZI, F., GRAVANTE, G., TATI, E. & TATI, G. (2007) Fluoroquinolones-induced tendinitis and tendon rupture in kidney transplant recipients: 2 cases and a review of the literature. *Transplant Proc*, 39, 1673-5.
- NABER, K. G. & ADAM, D. (1998) Classification of fluoroquinolones. *Int J Antimicrob Agents*, 10, 255-7.
- NKF (2002) K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification. *Am J Kidney Dis*, 39, S1-266.
- PALMER, S., BIRKS, C., DUNBAR, J. & WALKER, R. (2004) Simultaneous multiple tendon ruptures complicating a seizure in a haemodialysis patient. *Nephrology (Carlton)*, 9, 262-4.
- PALU, G., VALISENA, S., CIARROCCHI, G., GATTO, B. & PALUMBO, M. (1992) Quinolone binding to DNA is mediated by magnesium ions. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 9671-5.
- PIERFITTE, C. & ROYER, R. J. (1996) Tendon disorders with fluoroquinolones. *Therapie*, 51, 419-20.
- POTTS, J. R. & CAMPBELL, I. D. (1996) Structure and function of fibronectin modules. *Matrix Biol*, 15, 313-20; discussion 321.
- POUZAUD, F., BERNARD-BEAUBOIS, K., THEVENIN, M., WARNET, J. M., HAYEM, G. & RAT, P. (2004) In vitro discrimination of fluoroquinolones toxicity on tendon cells: involvement of oxidative stress. *J Pharmacol Exp Ther*, 308, 394-402.
- POUZAUD, F., DUTOT, M., MARTIN, C., DEBRAY, M., WARNET, J. M. & RAT, P. (2006) Age-dependent effects on redox status, oxidative stress, mitochondrial activity and toxicity induced by fluoroquinolones on primary cultures of rabbit tendon cells. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 143, 232-41.

- RAIDA, M., SCHULZ-KNAPPE, P., HEINE, G. & FORSSMANN, W. G. (1999) Liquid chromatography and electrospray mass spectrometric mapping of peptides from human plasma filtrate. *J Am Soc Mass Spectrom*, 10, 45-54.
- ROCK, E., ASTIER, C., LAB, C., MALPUECH, C., NOWACKI, W., GUEUX, E., MAZUR, A. & RAYSSIGUIER, Y. (1995) Magnesium deficiency in rats induces a rise in plasma nitric oxide. *Magnes Res*, 8, 237-42.
- RUBINSTEIN, E. & CAMM, J. (2002) Cardiotoxicity of fluoroquinolones. *J Antimicrob Chemother*, 49, 593-6.
- SAINT, F., GUEGUEN, G., BISERTE, J., FONTAINE, C. & MAZEMAN, E. (2000) Rupture of the patellar ligament one month after treatment with fluoroquinolone. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*, 86, 495-7.
- SCHULZ-KNAPPE, P., RAIDA, M., MEYER, M., QUELLHORST, E. A. & FORSSMANN, W. G. (1996) Systematic isolation of circulating human peptides: the concept of peptide trapping. *Eur J Med Res*, 1, 223-36.
- SCHULZ-KNAPPE, P., SCHRADER, M., STANDKER, L., RICHTER, R., HESS, R., JURGENS, M. & FORSSMANN, W. G. (1997) Peptide bank generated by large-scale preparation of circulating human peptides. *J Chromatogr A*, 776, 125-32.
- SEEGER, J. D., WEST, W. A., FIFE, D., NOEL, G. J., JOHNSON, L. N. & WALKER, A. M. (2006) Achilles tendon rupture and its association with fluoroquinolone antibiotics and other potential risk factors in a managed care population. *Pharmacoepidemiol Drug Saf*, 15, 784-92.
- SENDZIK, J. (2006) *Wirkung von Glukokortikoiden und Chinolonen auf Tenozyten vom Menschen in vitro*, Berlin, Weißensee Verlag.
- SENDZIK, J., LODE, H. & STAHLMANN, R. (2009a) Quinolone-induced arthropathy: an update focusing on new mechanistic and clinical data. *Int J Antimicrob Agents*, 33, 194-200.
- SENDZIK, J., SHAKIBAEI, M., SCHAFFER-KORTING, M., LODE, H. & STAHLMANN, R. (2009b) Synergistic effects of dexamethasone and quinolones on human-derived tendon cells. *Int J Antimicrob Agents*.
- SENDZIK, J., SHAKIBAEI, M., SCHAFFER-KORTING, M. & STAHLMANN, R. (2005) Fluoroquinolones cause changes in extracellular matrix, signalling proteins, metalloproteinases and caspase-3 in cultured human tendon cells. *Toxicology*, 212, 24-36.
- SHAH, M. K. (2002) Simultaneous bilateral quadriceps tendon rupture in renal patients. *Clin Nephrol*, 58, 118-21.
- SHAKERI-NEJAD, K., SHAKIBAEI, M. & STAHLMANN, R. (2005) Chinolon-induzierte Tendopathien. *Arzneimitteltherapie*, 23, 122-9.
- SHAKERI-NEJAD, K. & STAHLMANN, R. (2006) Drug interactions during therapy with three major groups of antimicrobial agents. *Expert Opin Pharmacother*, 7, 639-51.
- SHAKIBAEI, M., DE SOUZA, P., VAN SICKLE, D. & STAHLMANN, R. (2001a) Biochemical changes in Achilles tendon from juvenile dogs after treatment with ciprofloxacin or feeding a magnesium-deficient diet. *Arch Toxicol*, 75, 369-74.
- SHAKIBAEI, M., PFISTER, K., SCHWABE, R., VORMANN, J. & STAHLMANN, R. (2000) Ultrastructure of Achilles tendons of rats treated with ofloxacin and fed a normal or magnesium-deficient diet. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 261-6.
- SHAKIBAEI, M., SCHULZE-TANZIL, G., DE SOUZA, P., JOHN, T., RAHMANZADEH, M., RAHMANZADEH, R. & MERKER, H. J. (2001b) Inhibition of mitogen-activated protein kinase kinase induces apoptosis of human chondrocytes. *J Biol Chem*, 276, 13289-94.
- SHAKIBAEI, M. & STAHLMANN, R. (2001) Ultrastructure of Achilles tendon from rats after treatment with fleroxacin. *Arch Toxicol*, 75, 97-102.

- SHAKIBAEI, M. & STAHLMANN, R. (2003) Ultrastructural changes induced by the des-F(6)-quinolone garenoxacin (BMS-284756) and two fluoroquinolones in Achilles tendon from immature rats. *Arch Toxicol*, 77, 521-6.
- SHEN, L. L., BARANOWSKI, J. & PERNET, A. G. (1989) Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: specificity and cooperativity of drug binding to DNA. *Biochemistry*, 28, 3879-85.
- SIMONIN, M. A., GEGOUT-POTTIE, P., MINN, A., GILLET, P., NETTER, P. & TER-LAIN, B. (1999) Proteoglycan and collagen biochemical variations during fluoroquinolone-induced chondrotoxicity in mice. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 2915-21.
- SIMONIN, M. A., GEGOUT-POTTIE, P., MINN, A., GILLET, P., NETTER, P. & TER-LAIN, B. (2000) Pefloxacin-induced achilles tendon toxicity in rodents: biochemical changes in proteoglycan synthesis and oxidative damage to collagen. *Antimicrob Agents Chemother*, 44, 867-72.
- SMAILL, G. B. (1961) Bilateral rupture of Achilles tendons. *Br Med J*, 1, 1658.
- STAHLMANN, R., DEPPERMAN, K., SCHULZ-SCHALGE, T. & LODE, H. (1992) Klinisch relevante Arzneimittel-Interaktionen während einer Behandlung mit Chinolonen. *Chemoth J*, 1, 7-10.
- STAHLMANN, R., FÖRSTER, C., SHAKIBAEI, M., VORMANN, J., GÜNTHER, T. & MERKER, H. J. (1995) Magnesium deficiency induces joint cartilage lesions in juvenile rats which are identical to quinolone-induced arthropathy. *Antimicrob Agents Chemother*, 39, 2013-8.
- STAHLMANN, R., KUHNER, S., SHAKIBAEI, M., FLORES, J., VORMANN, J. & VAN SICKLE, D. C. (2000a) Effects of magnesium deficiency on joint cartilage in immature beagle dogs: immunohistochemistry, electron microscopy, and mineral concentrations. *Arch Toxicol*, 73, 573-80.
- STAHLMANN, R., KUHNER, S., SHAKIBAEI, M., SCHWABE, R., FLORES, J., EVANDER, S. A. & VAN SICKLE, D. C. (2000b) Chondrotoxicity of ciprofloxacin in immature beagle dogs: immunohistochemistry, electron microscopy and drug plasma concentrations. *Arch Toxicol*, 73, 564-72.
- STAHLMANN, R. & LODE, H. (1999) Toxicity of quinolones. *Drugs*, 58 Suppl 2, 37-42.
- STAHLMANN, R. & LODE, H. (2000) Safety overview. Toxicity, adverse effect, and drug interactions. IN ANDRIOLE, V. (Ed.) *The Quinolones*. 3 ed. London, GB Academic Press, S. 397-453.
- STAHLMANN, R. & LODE, H. (2008) Antibiotika und Chemotherapeutika - antiinfektiöse Therapie. IN AKTORIES, K., FÖRSTERMANN, U., HOFMANN, F. B. & STARKE, K. (Eds.) *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie für Studenten der Medizin, Veterinärmedizin, Pharmazie, Chemie und Biologie sowie Ärzte, Tierärzte und Apotheker*. München, Elsevier Urban & Fischer, S. 788-928.
- STAHLMANN, R., MERKER, H. J., HINZ, N., CHAHOUD, I., WEBB, J., HEGER, W. & NEUBERT, D. (1990) Ofloxacin in juvenile non-human primates and rats. Arthropathia and drug plasma concentrations. *Arch Toxicol*, 64, 193-204.
- TAKAHATA, M., MITSUYAMA, J., YAMASHIRO, Y., YONEZAWA, M., ARAKI, H., TODO, Y., MINAMI, S., WATANABE, Y. & NARITA, H. (1999) In vitro and in vivo antimicrobial activities of T-3811ME, a novel des-F(6)-quinolone. *Antimicrob Agents Chemother*, 43, 1077-84.
- THERMANN, H., HUFNER, T. & TSCHERNE, H. (2000) [Achilles tendon rupture]. *Orthopade*, 29, 235-50.
- URETEN, K., OZTURK, M. A., OZBEK, M. & UNVERDI, S. (2008) Spontaneous and simultaneous rupture of both Achilles tendons and pathological fracture of the femur neck in a patient receiving long-term hemodialysis. *Int Urol Nephrol*, 40, 1103-6.

- VAN DER FLIER, A. & SONNENBERG, A. (2001) Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res*, 305, 285-98.
- VAN DER LINDEN, P. D., STURKENBOOM, M. C., HERINGS, R. M., LEUFKENS, H. G. & STRICKER, B. H. (2002) Fluoroquinolones and risk of Achilles tendon disorders: case-control study. *BMJ*, 324, 1306-7.
- VAN DER LINDEN, P. D., STURKENBOOM, M. C., HERINGS, R. M., LEUFKENS, H. M., ROWLANDS, S. & STRICKER, B. H. (2003) Increased risk of achilles tendon rupture with quinolone antibacterial use, especially in elderly patients taking oral corticosteroids. *Arch Intern Med*, 163, 1801-7.
- VAN DER LINDEN, P. D., VAN DE LEI, J., NAB, H. W., KNOL, A. & STRICKER, B. H. (1999) Achilles tendinitis associated with fluoroquinolones. *Br J Clin Pharmacol*, 48, 433-7.
- VAN DER LINDEN, P. D., VAN PUIJENBROEK, E. P., FEENSTRA, J., VELD, B. A., STURKENBOOM, M. C., HERINGS, R. M., LEUFKENS, H. G. & STRICKER, B. H. (2001) Tendon disorders attributed to fluoroquinolones: a study on 42 spontaneous reports in the period 1988 to 1998. *Arthritis Rheum*, 45, 235-9.
- VAN ZANTEN, A. R., POLDERMAN, K. H., VAN GEIJLSWIJK, I. M., VAN DER MEER, G. Y., SCHOUTEN, M. A. & GIRBES, A. R. (2008) Ciprofloxacin pharmacokinetics in critically ill patients: a prospective cohort study. *J Crit Care*, 23, 422-30.
- VYAS, H. & KRISHNASWAMY, G. (2007) Images in clinical medicine. Quinolone-associated rupture of the Achilles' tendon. *N Engl J Med*, 357, 2067.
- WAHBA, I. M. & MAK, R. H. (2007) Obesity and obesity-initiated metabolic syndrome: mechanistic links to chronic kidney disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 2, 550-62.
- WILLIAMS, R. J., III, ATTIA, E., WICKIEWICZ, T. L. & HANNAFIN, J. A. (2000) The effect of ciprofloxacin on tendon, paratenon, and capsular fibroblast metabolism. *Am J Sports Med*, 28, 364-9.
- WIRTH, C. J. & CARLS, J. (2000) [Pathology of acute and chronic tendon injuries]. *Orthopäde*, 29, 174-81.
- ZABRANIECKI, L., NEGRIER, I., VERGNE, P., ARNAUD, M., BONNET, C., BERTIN, P. & TREVES, R. (1996) Fluoroquinolone induced tendinopathy: report of 6 cases. *J Rheumatol*, 23, 516-20.

## **Lebenslauf**

Der Lebenslauf ist in der elektronischen Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

## Veröffentlichungen

### **19<sup>th</sup> European Students Conference, September 2008, Berlin**

POORBIAZAR, M, SENDZIK, J, BAUMANN-WILSCHKE, I, JANKOWSKI, J, STAHL-MANN, R (2008)

Effects of Ciprofloxacin and a Hemofiltrate-fraction obtained from patients with chronic kidney disease on human tenocytes *in vitro*

European Journal of Medical Research, 13, (Suppl II) S 122, Abstract-Nr. 602

### **European Scientific Conference on Applied Infectious Disease Epidemiology, Oktober 2009, Stockholm**

POORBIAZAR, M, MOHR, O, ECKMANNNS, T, KRAUSE, G, POGGENSEE, G (2009)

Passenger flow with different means of transport in Europe: Is the risk of transmission of infectious diseases in ground conveyances a neglected issue? Analysis of Statistical Data for the REACT Project

Abstract book ESCAIDE 2009, S 95, Abstract-Nr. 20090083

Available online: <http://www.escaide.eu/en/articles/escaide/2009/home.cfm>

MOHR, O, POORBIAZAR, M, POGGENSEE, G, ECKMANNNS, T, KRAUSE, G (2009)

Factors triggering the initiation of international contact tracing in public ground conveyances

Abstract book ESCAIDE 2009, S 36, Abstract-Nr. 20090038

Available online: <http://www.escaide.eu/en/articles/escaide/2009/home.cfm>

POGGENSEE, G, MOHR, O, POORBIAZAR, M, ECKMANNNS, T, KRAUSE, G (2009)

Systematic literature review on the transmission of communicable diseases in public ground Conveyances

Abstract book ESCAIDE 2009, S 94, Abstract-Nr. 20090074

Available online: <http://www.escaide.eu/en/articles/escaide/2009/home.cfm>

**IEA-EEF European Congress of Epidemiology, August 2009, Warschau**

POORBIAZAR, M, MOHR, O, VELASCO, E, ECKMANNNS, T, KRAUSE, G, POGGEN-  
SEE, G (2009)

Overview on European Passenger Transport Statistics/Flow: Analysis of statistical data for the  
REACT Projekt (Response to Emerging infectious diseases: Assessment and development of  
Core capacities and Tools)

European Journal of Epidemiology, 24, (Suppl 1), S 77, Abstract-Nr.188

**Weitere Veröffentlichungen**

ECKMANNNS, T, POORBIAZAR, M, RÜDEN, H, LÜDER, F, (2006)

Representative survey of the scope of legionnaires' disease and of diagnostic methods and  
transmission control practices in Germany.

In: Cianciotto NP et al. (eds.), *Legionella - State of the art 30 years after its recognition 2006*  
Washington, DC: ASM Press, p. 132-134

NOVEL INFLUENZA A(H1N1) INVESTIGATION TEAM

Description of the early stage of pandemic (H1N1) 2009 in Germany, 27 April-16 June 2009  
Euro Surveill. 2009 Aug 6;14(31). pii: 19295

GILSDORF, A., POGGENSEE, G., WORKING GROUP PANDEMIC INFLUENZA  
A(H1N1)

Influenza A(H1N1)v in Germany: the first 10,000 cases

Euro Surveill. 2009 Aug 27;14(34). pii: 19318

## Erklärung

Ich, Mona Poorbiazar, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Einfluss von Ciprofloxacin und verschiedenen Hämofiltrat-Fraktionen vom Patienten mit chronischer Nierenerkrankung auf Tenozyten des Menschen *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 Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Ralf Stahlmann, für die Vergabe des Dissertationsthemas und stete Unterstützung. Seine engagierte und zielgerichtete Betreuung schuf ideale Rahmenbedingungen für dieses Promotionsvorhaben.

Herrn Prof. Dr. Joachim Jankowski danke ich herzlich für die Einweisung und tatkräftige Unterstützung bei der Aufbereitung des Hämofiltrats.

Mein herzlicher Dank gilt Frau Dr. Judith Schwarz für ihre kompetente fachliche Unterstützung und große Hilfsbereitschaft. Darüber hinaus danke ich Ihnen herzlich für Ihre Zuversicht, Ihre unermüdlichen Ermunterungen und für Ihre Freundschaft.

Frau Irmela Baumann-Wilschke danke ich herzlich für die Einführung in verschiedene Labortechniken, Ihre tatkräftige Hilfestellung und ganz besonders für die herzliche Atmosphäre im Labor und die vielen angeregten Gespräche.

Herrn André Krieger danke ich für die wunderbare Zusammenarbeit und Wegbegleitung.

Frau Heidi Petrosius danke ich für Ihre große Hilfsbereitschaft.

Herrn Harald Weinrich danke ich sehr herzlich für die Lösung vielfältigster EDV-Probleme und Frau Dipl. math. Christine Gericke für Ihre Unterstützung bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Ein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie für Ihre uneingeschränkte Unterstützung und Atif für seine große Zuversicht, seinen unbeirrbaren Optimismus und die vielen motivierenden und aufbauenden Worte.