

Aus der Klinik für Orthopädie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Der Einfluss von Antiseptika auf humane Chondrozyten in vitro

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Stephanie Dähn-Wollenberg
aus Hagenow

Gutachter/in: 1. Priv.-Doz. Dr. med. G. Matziolis
 2. Prof. Dr. med. R. Becker
 3. Priv.-Doz. Dr. med. D. Kendoff

Datum der Promotion: 03.06.2012

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Ursachen, Inzidenz, Diagnostik von Gelenkinfektionen.....	6
1.2 Einteilung und stadiengerechte Therapie	7
1.3 Miko- und Makroanatomie des hyalinen Knorpels.....	11
1.4 Formen des Zelltods	15
1.4.1 Nekrose	15
1.4.2 Apoptose	16
1.5 Antiseptika	18
1.5.1 Polihexanid.....	18
1.5.2 Wasserstoffperoxid.....	20
1.6 Hypothesen.....	21
2 Methodik	22
2.1 Materialien	22
2.2 Isolation und Kultur der Chondrozyten	23
2.3 Bestimmung von Nekrose mittels LDH	24
2.4 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität mittels Cell Counter	25
2.5 Bestimmung der Proteoglykansynthese in Alginatbeads.....	26
2.5.1 Prinzip von Alginatbeads.....	26
2.5.2 Herstellung der Alginatbeads	27
2.5.3 Alcianblau-Färbung	27
2.5 Bestimmung der Zellmorphologie	28
2.6 Immunhistologie mit Fluoresceindiacetat, Annexin-V und Propidiumiodid.....	29
2.7 FACS-Analyse mit Annexin-V, 7-AAD und Caspasen	31
2.8 Statistik	32
3 Ergebnisse	33
3.1 Vitalitätsmessung der Chondrozyten	33
3.1.1 LDH-Aktivitätsbestimmung	33
3.1.2 Zellzahl und vitale Zellen.....	37
3.1.3 Nachweis der Proteoglykansynthese	42
3.1.4 Ergebnisse zur Zellmorphologie.....	46
3.2 Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie	48
3.2.1 Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid	48
3.2.2 Annexin-V und Propidiumiodid	50
4.3. Ergebnisse der FACS Analyse.....	51
4 Diskussion	57
4.1 Diskussion der Versuchsbedingungen	57
4.2 Limitationen der Studie	59
4.3 Toxizität der Antiseptika.....	60
4.4 Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose	64
4.5 Relevanz für die Klinik	66

5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	68
7	Sebstständigkeitserklärung	75
8	Lebenslauf	76
9	Anhang.....	78
10	Danksagung	79

Abkürzungsverzeichnis

7-AAD	7-Aminoactinomycin D
Apaf-1	Apoptosis activation factor 1
CaCl ₂	Calciumchlorid
CRP	C-reaktives Protein
DISC	death-inducing signaling complex
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FADD	Fas-associated death domain
FBS	fötales Kälberserum
FDA	Fluoresceindiacetat
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GAG	Glykosaminoglykan
H.E.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
LDH	Laktatdehydrogenase
MRT	Magnetresonanztomographie
PBS	phosphate buffered solution
PI	Propidiumiodid
PG	Proteoglykansynthese
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	rounds per minute
TNF	Tumornekrosefaktor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling
(z)VAD-FMK	carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon

1 Einleitung

1.1 Ursachen, Inzidenz, Diagnostik von Gelenkinfektionen

Die septische Arthritis oder bakterielle Arthritis kommt in der Allgemeinbevölkerung mit einer Häufigkeit von 2 bis 5 auf 100 000 Einwohner pro Jahr vor (1). Unter dem klinischen Bild der plötzlich aufgetretenen schmerzhaften Gelenkschwellung nimmt sie einen Anteil von 8 % ein. Damit ist die Inzidenz zwar im Allgemeinen nicht sehr hoch, die Erkrankung tritt aber bei Hochrisikopatienten mit z.B. rheumatoider Arthritis etwa zehnmal häufiger auf (2).

Definitionsgemäß ist die septische Arthritis eine durch bakterielle Erreger ausgelöste Infektion der Gelenkhöhle. Kommt es im Verlauf zur Bildung von Pus entsteht ein Empyem.

Der häufigste Pathomechanismus der bakteriellen Arthritis ist die hämatogene Streuung von pyogenen Erregern im Rahmen einer entzündlichen Grunderkrankung (3). An zweiter Stelle stehen iatrogene Übertragungswege durch Gelenkpunktionen oder lokale Kortikoidinjektion (4). Hier sind vor allem Knie- und Hüftgelenke betroffen (5). Das Risiko einer Infektion durch Arthroscopien ist nach Angaben in der Literatur eher gering. Rein diagnostische Arthroscopien haben eine Infektionsrate von 0,14 % (6) bis 0,42 % (7), die der operativen Eingriffe während einer Arthroscopie ist mit 0,23 % im Mittel sogar noch geringer (8). Mit zukünftig steigender Anzahl der Eingriffe wird diese Komponente eine größere Rolle einnehmen.

Individuelle Risikofaktoren können die Entstehung eines Gelenkinfekts begünstigen. Dazu zählen vor allem Vorerkrankungen wie Rheumatoide Arthritis, Diabetes mellitus, Nikotinabusus und Adipositas, aber auch vorangegangene Behandlung mit Kortikosteroiden und anderen Immunsuppressiva (9).

Obwohl jede Art von Bakterium als Auslöser für das Krankheitsbild in Betracht kommt, sind die häufigsten Vertreter Staphylokokken und Streptokokken. In vielen Studien wird mehr als die Hälfte der Gelenkinfekte durch *Staphylococcus aureus* ausgelöst (10, 11). Die Angaben reichen von 49,4 % (12) bis zu 80 % der Fälle, wobei die angegebene Häufigkeit vom Alter der untersuchten Patientengruppe abhängig ist (13). Die Infektionswahrscheinlichkeit mit *Staph. aureus* nimmt mit dem Lebensalter zu. Am zweithäufigsten wurde *Staphylococcus epidermidis* nachgewiesen (1, 14). Weitaus seltener ist der Nachweis von gramnegativen Erregern und Mykobakterien (15). Nicht immer kann bei dem Verdacht auf einen Gelenkinfekt ein Erreger nachgewiesen

werden, die Literaturangaben schwanken hier zwischen 63 % und 100 % (16, 17). Falsch negative Ergebnisse ereignen sich besonders dann, wenn schon vor der Probenentnahme mit einer antibiotischen Therapie begonnen wurde (18).

Die Klinik des Gelenkinfekts äußert sich typischerweise mit den Zeichen einer Entzündungsreaktion: periartikuläre Rötung, Hyperthermie, schmerzhafte Bewegungseinschränkung und Schwellung des betroffenen Gelenks sind häufig. Fieber kann zu Beginn vorhanden sein oder im Verlauf auftreten. Bei Gelenken mit ausgeprägtem Weichteilmantel wie dem Hüft- oder Schultergelenk kann das klinische Erscheinungsbild weniger ausgeprägt sein. Die oben genannten Symptome sind zwar typisch für die septische Arthritis, aber nicht sehr spezifisch. Differentialdiagnostisch kommen Erkrankungen wie der akute Gichtanfall, die rheumatoide Arthritis oder eine reaktive Arthritis sowie andere nicht infektiöse Gelenkbeschwerden in Betracht (19, 20). Zu diagnostischen und Verlaufszwecken sollten CRP, Leukozytenzahl, Blutsenkungsgeschwindigkeit und Procalcitonin im Blut bestimmt und Blutkulturen angelegt werden (13). Da die Erhöhung dieser Parameter ebenfalls nicht spezifisch ist, sollte eine sterile Gelenkpunktion mit Versuch der Erregerbestimmung erfolgen. Gleichzeitig kann die Synovialflüssigkeit visuell beurteilt werden, je nach Stadium der Erkrankung kann sie trübe, flockig oder eitrig sein. Auch hier sollten die Leukozyten bestimmt werden, Werte von über 35 000/ml gelten als stark verdächtig für einen Infekt (21). Bildgebende Verfahren können das Ausmaß des Infektes und eine eventuelle Beteiligung benachbarter Gelenkstrukturen dokumentieren. Als diagnostisches Mittel sind Röntgen, Sonographie oder MRT eher ungeeignet, denn mit Hilfe dieser Verfahren ist der Nachweis eines septischen Geschehens nicht zu erbringen. Daher ist der Keimnachweis das sicherste differentialdiagnostische Mittel zur Diagnose der bakteriellen Arthritis. Nach dem erstellten Resistogramm richtet sich nach der chirurgischen auch die gezielte Antibiotikatherapie. Wie oben schon erwähnt, lässt sich in einigen Fällen trotz bestehenden bakteriellen Geschehens kein Erreger anzüchten. Dennoch sollte unverzüglich mit der Therapie begonnen werden, da wegen der Schwere der Erkrankung ein abwartendes Verhalten nicht zu vertreten ist.

1.2 Einteilung und stadiengerechte Therapie

Nach dem zeitlichen Auftreten der Gelenkinfektion infolge operativer Maßnahmen lassen sich drei Stadien in die akute, subakute und chronische Arthritis unterscheiden.

Der Frühinfekt tritt innerhalb der ersten drei Monate postoperativ auf und stellt den geringeren Anteil der Infekte dar. Treten erste klinische Zeichen nach mehr als zwölf Monaten postoperativ auf, spricht man von einer chronischen Entzündung. Für die Ursache des Spätinfekts kommen Keime mit geringer Virulenz und eine späte hämatogene Aussaat in Frage (21).

Zu therapeutischen Zwecken existieren für die septische Arthritis Einteilungen nach dem Fortschreiten der Infektion. Eine derzeit gängige Klassifikation ist die Einteilung nach Gächter. Anhand des arthroskopisch festgestellten Gelenkschadens ist sie in vier Schweregrade unterteilt (22):

Stadium I: trübe Synovia, Rötung der Synovialmembran, evt. petechiale Blutungen, keine radiologischen Veränderungen

Stadium II: schwere Entzündung mit Fibrinablagerungen, Empyem, keine radiologischen Veränderungen

Stadium III: Verdickung der Synovialmembran, Kompartimentformation (Badeschwamm ähnliches Bild), noch keine radiologischen Veränderungen

Stadium IV: aggressive Pannusbildung mit Infiltration und evt. Unterminierung des Knorpels, radiologisch subchondrale Osteolysen, knöcherne Erosionen- und Zystenbildung

Andere Autoren treffen klinisch oder laborchemisch orientierte Differenzierungen:

- Kuner: I Synovialis purulenta, II Gelenkempyem, III Panarthritis, IV chronische Arthritis (23)

- Pfeiffenberger und Meiss: I milde Infektion (24h-5d), II mäßige Infektion (5-10d), III schwere Infektion (>10d) mit Nekrosen (A) oder ohne Nekrosen (B) (24).

Da die bakterielle Arthritis die aggressivste Form der Gelenkentzündung darstellt und schon nach sehr kurzem Verlauf zu erheblichen Knorpeldestruktionen führt, sollte schnellstmöglich die Infektsanierung erfolgen. Dabei hat sich gezeigt, dass die Chancen der komplikationslosen Ausheilung stark vom Stadium der Erkrankung abhängen (25, 26). Die Mortalität ist auch heute noch, trotz weitreichender Möglichkeiten wie intraartikulärer Antibiotikagabe und großzügiger arthroskopischer Gelenkspülung mit 11 % vergleichsweise hoch (27), bei älteren Patienten mit Vorerkrankungen sogar

zwischen 19 bis 33 % (1, 28). Auch das Ausmaß therapeutischer Maßnahmen richtet sich nach der Stadieneinteilung. Bereits bei dem Verdacht auf eine Gelenkinfektion sollte nach erfolgter Probenentnahme zum Keimnachweis die systemische Gabe eines Breitspektrumantibiotikums erfolgen. Grundsätzlich ist eine antibiotische Therapie in jedem Stadium indiziert und sollte vier bis sechs Wochen fortgesetzt werden (22, 29). Entsprechend des AntibioGRAMMS muss die Antibiotikatherapie im Verlauf angepasst werden. Ein akuter Gelenkinfekt stellt aber immer eine Indikation zur chirurgischen Therapie dar. Eine Orientierung bietet die oben genannte Einteilung nach Gächter.

Im Stadium I steht die Druckentlastung des Gelenks, mit bestmöglicher Drainage purulenter Gelenkflüssigkeit im Vordergrund. In der Vergangenheit gab es uneinheitliche Meinungen, ob die alleinige Nadelaspiration oder die Arthroskopie hierzu ein adäquates Mittel darstellen (30). Eine ausreichende Drainage des Gelenks ist aber mit alleiniger Aspiration zu bezweifeln (1, 16, 31). Bis heute hat sich die ausgeprägte arthroskopische Lavage aller Gelenkkompartimente weithin durchgesetzt, sie ist effektiver als die Nadelaspiration und auch das funktionelle Outcome ist besser (32, 33). Zum Spülen können ein bis zwei Liter Ringerlösung oder NaCl ohne Zusätze verwendet werden. Bei anhaltenden klinischen und laborchemischen Zeichen muss die Lavage innerhalb weniger Tage wiederholt werden (16). Revisionen im Stadium I sind im Vergleich zu fortgeschritteneren Stadien aber seltener (34).

Die Therapie im Stadium II ist ähnlich der des Stadium I. Die arthroskopische Spülung sollte hier in jedem Fall in den Folgetagen wiederholt werden. Ein intraoperatives Débridement kann vorgenommen werden, eventuelle Fibrinbeläge sollten entfernt werden. Das intraartikuläre Einlegen lokal applizierbarer Antibiotika in Form von resorbierbaren Schwämmen, Ketten oder Kollagenvlies wird ebenfalls differenziert betrachtet, da es Untersuchungen gibt, die nach systemischer Gabe einen genügend hohen Antibiotikaspiegel im Gelenk nachweisen (16). Der Therapieerfolg kann anhand der Entzündungswerte (CRP, Leukozyten) im Blut kontrolliert werden.

Im Stadium III kann bei ausgeprägter Synovialitis eine Synovialektomie vorgenommen werden. Manche Autoren sprechen sich allerdings dafür aus, dass die Synovialmembran als physiologische Barriere gegen die Infektionsausbreitung intakt bleiben sollte (22, 30). Dagegen spricht, nach Meinung anderer Autoren, dass bei Erhalt

der Synovialis mit einem Fortbestehen der Infektion bzw. einem Rezidiv gerechnet werden muss (35). Einige Operateure finden einen Kompromiss im Entfernen der bestehenden Fibrinbeläge und Eiterherde im Bereich der Synovialis ohne komplette Synovektomie (16).

Bei großen Gelenken wie dem Kniegelenk sollte die intraoperative Menge an Spülflüssigkeit mindestens fünf Liter, besser noch 10 bis 15 Liter betragen.

Für das Stadium IV ist ein rein arthroskopisches Vorgehen, je nach Erfahrung des Operateurs, meist nicht ausreichend. Empfohlen wird die Arthrotomie zur offenen Synovialektomie. Neben den im Stadium III durchgeführten Maßnahmen sollte zusätzlich eine sorgfältige Entfernung aller nekrotischen Knochen- und Knorpelanteile erfolgen (16). Hierbei ist es wichtig, auch die schwer zugänglichen Gelenkanteile von Synovialis zu befreien (35). Anschließend muss das Gelenk wiederum ausführlich gespült werden.

Die stadiengerechte Therapie mit arthroskopischer Spülung in Verbindung mit systemischer Antibiotikagabe erzielte in der Vergangenheit gute Ergebnisse mit Heilungschancen von 90 bis 100 %, wobei der Therapieerfolg vom Stadium der Erkrankung abhängig war (30, 36). Entscheidend wirkt sich außerdem die aggressive postoperative Mobilisierung aus, die Gelenkversteifung und Muskelatrophie verhindern soll. Hier gilt es, zwischen Ruhigstellung zur Infektausheilung und Bewegung des Gelenks abzuwägen.

Die Prognose der septischen Arthritis ist stark davon abhängig, in welchem Stadium die Diagnose gestellt wird und in welchem Ausmaß die Therapiemöglichkeiten ausgeschöpft werden. Dabei ist das oberste Ziel, die Gelenkentzündung so schnell wie möglich zu beseitigen. In frühen Stadien kann eine konsequente Therapie zu sehr guten Ergebnissen führen.

Dauert die Entzündung an, wird eine Beeinträchtigung der Knorpelschicht wahrscheinlicher. Keime wie der häufig vorkommende *Staphylococcus aureus* führen schon nach 24 Stunden zu einer erhöhten Freisetzung von knorpelspezifischen Proteoglykanen aus der Matrix (37, 38), was sukzessive zu einem Verlust der Knorpelmatrix von über 40 % führen kann (39, 40). Versuche in vitro zeigten, dass *Staphylococcus aureus* und *Escherichia coli* nach 48stündigem Kontakt zum Untergang

von Chondrozyten führten (41). Somit kann verzögertes Therapiemanagement zu einer Zunahme der Morbidität von 25 bis 50 % führen. Es sind Fälle von Destruktionen von Knorpel und Knochen, sowie pathologischen Dislokationen und Versteifungen von Gelenken beschrieben (42). In der Konsequenz erhöht sich ebenfalls die Mortalität auf 10 bis 15 % (43).

1.3 Miko- und Makroanatomie des hyalinen Knorpels

Gelenkknorpel ist ein komplexes Gewebe aus hyalinem Knorpel, welches als wenige Millimeter messende Schicht die Oberflächen von knöchernen Gelenkstrukturen überzieht. Er gewährleistet eine gleichmäßige Verteilung der Spannungen auf die Gelenkflächen und den darunter liegenden Knochen. Er dient der einheitlichen Kraftübertragung, fungiert als Stoßdämpfer, reduziert Scherkräfte und bietet dem subchondralen Gewebe mechanischen Schutz. So können Kräfte, die beim Laufen entstehen und mitunter das 500fache des Körpergewichts betragen, gleichmäßig auf die knöchernen Gelenkanteile übertragen werden. Mithilfe der Gelenkkapsel und dem angrenzenden Band- und Muskelapparat ermöglicht er eine stabile Gelenkführung. Durch die Synovia, die Gelenkflüssigkeit, wiederum, wird der Knorpel mit Nährstoffen versorgt, behält seine Elastizität und Festigkeit und vermindert zusammen mit ihr die Scherkräfte, die beim Gleiten der Gelenkflächen aufeinander entstehen, ohne hohe energetische Verluste (44, 45).

Knorpelgewebe entsteht durch die Differenzierung von pluripotenten mesenchymalen Stammzellen zu Chondroblasten, den Knorpelbildnern. Diese Vorläuferzellen produzieren die Knorpelmatrix und wachsen zu ausgereiften Knorpelzellen, den Chondrozyten, heran (46).

Hyaliner Knorpel ist, mit Ausnahme des Gelenkknorpels, von einer Knorpelhaut, dem Perichondrium, umgeben. Die innere Schicht des Perichondriums (Stratum chondrogenicum) enthält noch undifferenzierte mesenchymale Zellen, die sich bei Bedarf in Chondroblasten umwandeln und eine gewisse Zellregeneration möglich machen können. Außerdem enthält sie Gefäße, mittels derer die Versorgung des Knorpels durch Diffusion gewährleistet wird (47).

Der hyaline Knorpel im Gelenk besitzt kein Perichondrium. Seine Ernährung findet im Wachstum noch durch im Knochen befindliche, subchondrale Gefäße statt. Mit der Reifung der Knorpelzellen kommt es jedoch zu Verkalkungen im Knorpelgewebe und

eine Versorgung des Knorpels ist nur noch durch die Synovialflüssigkeit im Gelenkspalt möglich. Der adulte Gelenkknorpel ist also gefäßfrei und nicht innerviert (48, 49). Die postmitotischen Chondrozyten sind nicht mehr teilungsfähig und können sich nicht regenerieren, durch die fehlende Durchblutung ist eine Einwanderung von neuen Stammzellen nicht möglich. Deshalb hat Knorpelgewebe eine nur geringe Heilungstendenz.

Die Chondrozyten sind umgeben von einer extrazellulären Matrix (EZM). Der Anteil der Zellen an der gesamten Knorpelmasse beträgt nur etwa 10 %. Die Chondroblasten synthetisieren die Matrixbestandteile und geben sie in ihre Umgebung ab (50). Reife Knorpelzellen sind für den ständigen Umsatz der EZM verantwortlich. Sie bauen Matrixbestandteile ab und resynthetisieren sie nach Bedarf. Die Hauptkomponenten der EZM sind Proteoglykane und Kollagene.

Proteoglykane besitzen ein Kernprotein, an welches lange modifizierte Kohlenhydratketten, die Glykosaminoglykane (GAG), kovalent gebunden sind. Im Gelenkknorpel ist Aggrecan das vorherrschende Proteoglykan, seine Kohlenhydratseitenketten bestehen aus Chondroitin- und Keratansulfat (51). Das Kernprotein interagiert mit einem weiteren GAG, der Hyaluronsäure und formt so die komplexen Makromoleküle des Aggrecans.

Die Proteoglykane vernetzen sich mit den Kollagenfibrillen und verleihen dem Knorpel seine Druckelastizität, indem sie, ähnlich einem Schwamm, Wasser binden. Die Vernetzung mit Kollagen schützt das Knorpelgewebe jedoch vor dem Aufquellen durch zuviel Flüssigkeit und davor, dass sich die Proteoglykane durch ihre negativen Ladungen gegenseitig abstoßen (52).

Die Kollagenfibrillen des hyalinen Knorpelgewebes bestehen überwiegend aus Kollagen des Typs II und zu kleineren Anteilen aus Kollagen Typ VI, IX, X und XI und sind verantwortlich für die hohe Zugfestigkeit des Knorpels. Die Kollagenfibrillen des Gelenkknorpels sind mit 50-100 nm kräftiger als im übrigen hyalinen Knorpel (15-20 nm) und arkadenförmig angeordnet. Aufgrund dieser Struktur lässt sich von der Oberfläche zum subchondralen Knochen eine histologische Einteilung in vier Schichten vornehmen (53):

- | | |
|-----|-----------------------------------|
| I | Tangentialzone |
| II | Übergangszone |
| III | Radiärzone |
| IV | Zone des mineralisierten Knorpels |

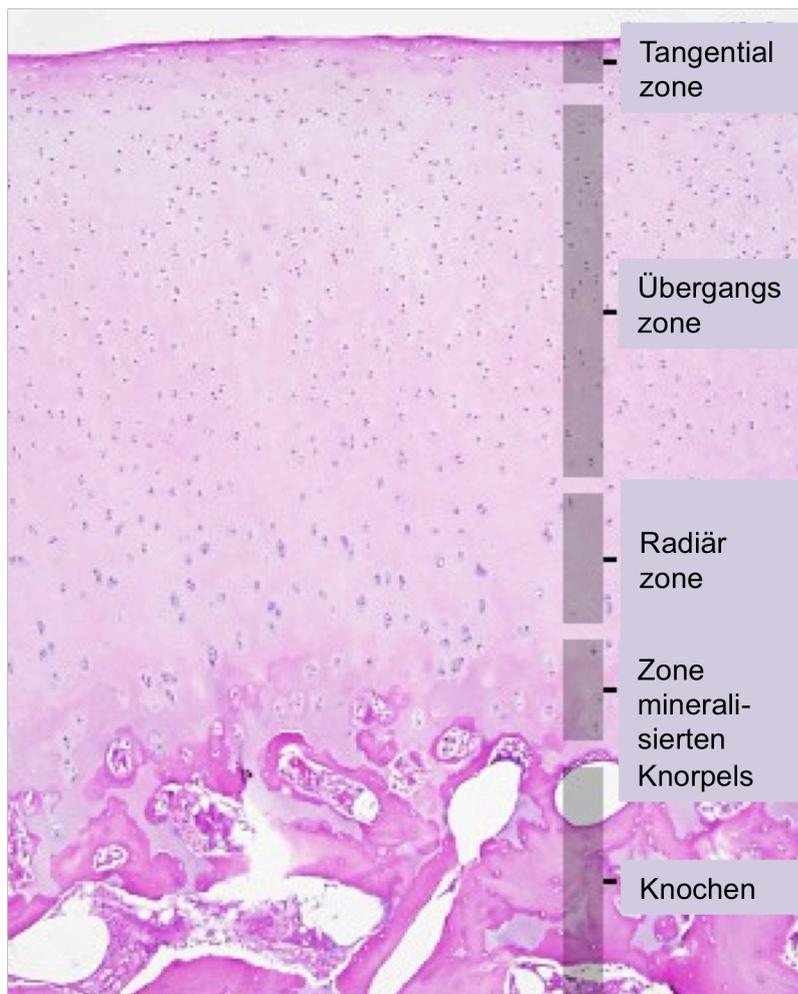


Abb. 1 Aufbau des hyalinen Knorpels in H.E. Färbung. Gut zu erkennen sind die unterschiedlichen Knorpelschichten (modifiziert nach (54)).

In der oberflächlichen Tangentialzone sind die Kollagenfibrillen trajektorieell ausgerichtet, d.h. in Richtung der größten Zugspannung, und verlaufen tangential zur Oberfläche. Die Chondrozyten liegen parallel zum Kollagen und sind spindelförmig, der Gehalt an Proteoglykanen ist gering.

In der Übergangzone, auch Transitionszone, liegen die Knorpelzellen in kleineren Gruppen, sogenannten Chondronen, zusammen. Die Konzentration an Proteoglykanen ist hier im Vergleich zur Tangentialzone höher.

Die dritte, die Radiärzone, ist die breiteste Schicht. Hier ordnen sich die, jetzt ellipsoid geformten, Chondrozyten säulenartig entlang der Kollagenfasern an und stehen senkrecht zur Oberfläche. Es findet sich der höchste Gehalt an Proteoglykanen. Die

Radiärzone wird nach unten von der tieferen Zone, einer basophilen Grenzlinie, von der vierten Schicht demarkiert.

Die Mineralisationszone ist die Schicht mit dem geringsten Gehalt an Proteoglykanen. Hier sind die Kollagenfibrillen verankert, sie strahlen senkrecht in diese Zone ein. In der Extrazellulärmatrix befinden sich Kalzifizierungen aus Hydroxylapatitkristallen. Die vereinzelt Chondrozyten zeigen nur geringe Syntheseaktivität. Die Mineralisationszone trennt den hyalinen Knorpel vom subchondralen Knochen.

Aufgrund der unterschiedlichen Anordnung und Konzentration der EZM-Komponenten besitzen die vier Schichten des Knorpelgewebes verschiedene biomechanische Eigenschaften.

Die Chondrozyten selbst nehmen in der Gesamtmasse des Knorpels nur einen Anteil von ein bis zehn Prozent ein (55). Morphologisch sind die Zellen in vivo oval bis rund und liegen in kleineren Gruppen zusammen. Diese Zellgruppen und die sie unmittelbar umgebende Extrazellulärmatrix bezeichnet man als Chondron (47).

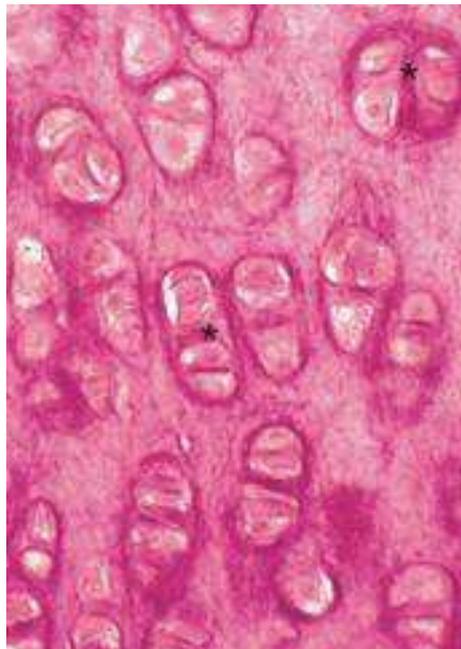


Abb. 2 Mikroskopische Darstellung der paarigen Chondrone (*) (56).

Die Aufgabe der Chondrozyten besteht in der Aufrechterhaltung der Homöostase des Knorpels. Sie sind für die Synthese und den Abbau der Proteoglykane und des Kollagens verantwortlich und können ihre metabolische Aktivität den Änderungen in der Matrixkomposition anpassen. Um Zellantworten auf veränderte physikalische oder

humorale Stimuli des Extrazellulärums zu koordinieren, interagieren die Chondrozyten mit ihrer Umgebung über Transmembranrezeptoren (57). Eine wichtige Rolle nehmen dabei die Integrine, eine Gruppe von Oberflächenrezeptoren, ein. Integrine sind zelluläre Heterodimere, die an verschiedene Extrazellulärmatrixmoleküle gebunden sind. Sie stehen gleichzeitig in direktem Kontakt zum Cytoskelett des Chondrozyten und sind in der Lage, sowohl mechanische, als auch biochemische Signale aus der EZM an die Knorpelzelle zu übertragen (58).

Die Struktur der EZM stellt aber nicht nur ein Kommunikationsnetzwerk dar, sondern trägt auch zur Stabilisierung, Formgebung und Differenzierung der Chondrozyten bei. Es ist bekannt, dass Defekte der Knorpelstruktur, z.B. bei Arthrose, mit Änderungen der Chondrozyteneigenschaften einher gehen (59). Auch die Kultivierung von Knorpelzellen *in vitro* hat zur Folge, dass die Zellen einen anderen Phänotyp annehmen (60) und die Syntheseleistung von EZM-Komponenten umstellen.

1.4 Formen des Zelltods

Zytotoxische Ereignisse führen zum Untergang von Gewebe. Je nach Art der Schädigung lassen sich im Wesentlichen zwei Vorgänge des Zelltods unterscheiden: Nekrose und Apoptose. Während man von der Apoptose als einem geordneten, Energie verbrauchenden Prozess ausgeht, der nur einzelne Zellen oder Zellnester betrifft, wird im Zusammenhang mit der Nekrose auch häufig vom Energie unabhängigen akzidentiellen Zelltod gesprochen (61).

1.4.1 Nekrose

Nekrose ist der Untergang von Zellen infolge irreversibler endogener oder exogener Schädigung. Endogene Ursachen für den Zellzerfall können Hypoxie oder Ischämie sein. Als exogene Einwirkungen kommen chemische Noxen oder physikalische Kräfte, aber auch Krankheitserreger wie Viren und Bakterien in Betracht (47).

Nekrosen gehen häufig mit einer Entzündungsreaktion einher, da der ungeordnete Zelltod die Einwanderung von Leukozyten in das Gewebe nach sich zieht. Der Grund hierfür ist der zunehmende Integritätsverlust der Zellmembran. Es kommt zur Zunahme des Zellvolumens, häufig verbunden mit einer Zerreißung des Zytoskeletts und einem unkontrollierten Ausstrom von Intrazellulärbestandteilen. Zu diesen Substanzen zählen Zytokine, wie Interleukin-8, oder Nekrosefaktor κB , die Makrophagen oder Neutrophile

Granulozyten anlocken, aber auch Toxine und cytoplasmatische Enzyme werden freigesetzt (62). Auch das intrazelluläre Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) wird bei Nekrosevorgängen in den Extrazellulärraum ausgeschüttet. Es kommt in allen Zellen vor und lässt sich daher gut als Nekrosemarker im Extrazellulärraum bestimmen.

1.4.2 Apoptose

Die Apoptose ist als programmierter Zelltod ein streng regulierter Vorgang. Er ist notwendig für die embryonale Formgebung, zur Eliminierung potentiell schädlicher oder entarteter Zellen und dient dem Erhalt der Zellanzahl und der Regulation der Immunantwort. Apoptose kann durch eine Vielzahl von sowohl physiologischen als auch pathologischen Stimuli initiiert oder inhibiert werden (63).

Während der Nekrosevorgang eine Beeinträchtigung benachbarter Zellen nach sich zieht, kommt es bei der Apoptose in der Regel nicht zur Entzündungsreaktion umliegender Gewebe. Auch morphologisch stellt sich der Apoptosevorgang anders dar als die Nekrose. Apoptotische Zellen schrumpfen und lösen sich schnell aus dem Zellverband heraus. Das Chromatin kondensiert und fragmentiert, der Zellkern wird pyknotisch, es kommt zur Bildung sogenannter Apoptosekörperchen. Zellorganellen und Zellmembran bleiben initial intakt. Bevor es, wie bei der Nekrose, zur Zellyse und dem Austreten von Zytoplasma kommen kann, werden die Zellen von Makrophagen oder umgebenden Zellen phagozytiert (64-66).

Es sind zur Zeit drei Signalwege des programmierten Zelltods erforscht, der intrinsische, der extrinsische und der stressinduzierte Weg über das Endoplasmatische Retikulum (ER) (61).

Allen Signalwegen gemeinsam ist die Aktivierung von Caspasen. Das sind Proteasen, die in ihrem aktiven Zentrum die Aminosäure Cystein enthalten und Zielproteine spezifisch nach der Aminosäure Aspartat schneiden. Es sind verschiedene humane Caspasen bekannt und kategorisiert, darunter die Initiatorcaspasen-2, -8, -9, -10, die Effektorcaspasen-3, -6, -7 und inflammatorische Caspasen-1, -4,-5. Sie spielen eine wichtige Rolle für die Regulation und Signalweiterleitung während der Apoptose und liegen in Zellen als proteolytisch inaktive Procaspasen vor. Werden die Initiatorcaspasen durch einen der beiden Apoptosewege aktiviert, folgt eine Caspase-Kaskade, d.h. die Aktivierung nachgeschalteter Exekutionscaspasen, die eine

proteolytische DNA-Fragmentierung und Inaktivierung von Überlebensproteinen induziert.

Der extrinsische Apoptoseweg wird über extrazelluläre Apoptose-stimulierende Liganden vermittelt, die an Oberflächenrezeptoren der Zelle binden. Zu diesen sogenannten Todesrezeptoren gehören Fas-, TNF- oder TRAIL-Rezeptoren. Ihre Aktivierung führt zur Oligomerisierung der Rezeptoren und der Rekrutierung des Adapterproteins FADD (Fas-associated death domain) und Caspase-8, was die Bildung des death-inducing signaling complexes (DISC) zur Folge hat. Daraufhin werden die Effektorcaspasen -3, -6 und -7 aktiviert und das eigentliche Zelltodprogramm wird eingeleitet (67).

Für den intrinsischen Apoptoseweg nimmt das Mitochondrium eine zentrale Regulationsfunktion ein. Bei Schädigung der DNA vermittelt beispielsweise das Tumorsuppressorprotein p53 die Einleitung des Selbstzerstörungsprogramms, indem es die Transkription von Genen der Bcl-2 Familie induziert. Bcl-2-Gene regulieren die Permeabilität der Mitochondrienmembran für Cytochrom c. Die Erhöhung des intrazellulären Cytochrom c wirkt apoptogen, denn es bindet an den apoptosis-activating factor 1 (Apaf-1) und Procaspase-9. Diese generieren einen DISC-ähnlichen Komplex, das Apoptosom (68). Es kommt zur Aktivierung von Caspase-9 und der Effektorcaspase-3, sowie weiterer proteolytischer Enzyme. An dieser Stelle konvergieren intrinsischer und extrinsischer Signalweg der Apoptose.

Ein relativ neu entdeckter Weg ist der ER-Stress induzierte Apoptoseweg. Das ER ist als Zellorganell für die Synthese und Faltung von neu synthetisierten Proteinen der Zelle verantwortlich und hält die Kalziumhomöostase der Zelle aufrecht. Induzierend für den ER-Apoptosepfad kommen verschiedene Auslöser wie Änderung des Glykosylierungsstatus oder des Energiehaushaltes der Zelle oder eine vermehrte Kalziumfreisetzung aus dem ER in Frage (69). Dies führt zur Akkumulation missgefalteter Proteine in der Zelle, was wiederum zu einer Aktivierung der Caspase-12 führt. Dieser Weg scheint unabhängig vom mitochondrialen oder Todesrezeptorpfad. Allerdings wird auch hier die Caspasenkaskade angestoßen. Eine zentrale Rolle nimmt dabei die am ER membranständige Caspase-12 ein. Sie aktiviert die zytosolische Procaspase-9, die nachfolgend Caspase-3 aktiviert (70).

Letztendlich führen alle drei Mechanismen zum geordneten Abbau der Zelle in kleinere Bestandteile. Diese sogenannten Apoptosekörperchen können von Makrophagen oder Nachbarzellen phagozytiert werden.

1.5 Antiseptika

Antiseptika werden im weitesten Sinne dazu gebraucht, Wundinfektionen zu verhindern oder zu therapieren. Dabei sollte die Keimzahl zuverlässig reduziert werden, ohne das umgebende Gewebe zu sehr zu schädigen. Die Wirkung gegen Krankheitserreger sollte also hoch sein, während die Gewebetoxizität gering bleiben sollte. Hierbei ist ein breites Wirkungsspektrum gegen Bakterien, Pilze, Viren und Sporen wichtig. Antiseptika sollten sich nicht nachteilig auf die Wundheilung auswirken. Sie sollten keine systemische Wirkung entfalten und nach Möglichkeit hypoallergen sein. In Gegenwart organischer Substanzen und bei hoher Keimlast sollte die Wirksamkeit erhalten bleiben oder nur geringfügig vermindert sein. Die Wirkung sollte schnell eintreten und es sollten keine Resistenzen gegen das Agens auftreten.

1.5.1 Polihexanid

Polihexanid ist ein Biguanid zur lokalen Anwendung und stellt eines der am häufigsten verwendeten Antiseptika dar. In der handelsfertigen Gebrauchslösung ist es unter dem Namen Lavasept® erhältlich.

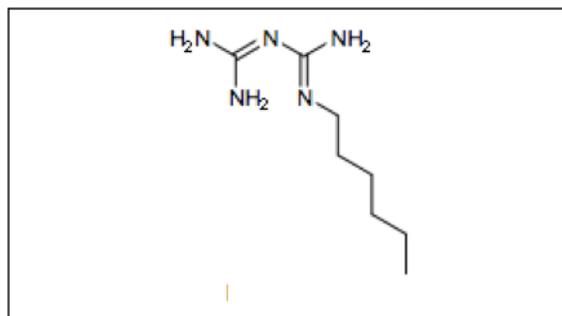


Abb. 3 Chemische Struktur von Polihexanid (71).

Durch den Zusatz von Macrogolum 4000, einem Polyethylenglycol, wird die Oberflächenspannung der wässrigen Lösung herab gesetzt und seine Bioverfügbarkeit und Toxizität positiv beeinflusst. Daraus resultiert ein breites Wirkspektrum gegen grampositive und gramnegative Bakterien.

Der Wirkmechanismus von Polihexanid beruht auf der kationischen Ladung der Biguanide. Durch sie erfolgt die Bindung an anionisch geladene, saure Phospholipide der Bakterienmembranen. Dadurch wird die Permeabilität der Zellaußenhaut beeinflusst und es kommt zur Hemmung metabolischer Prozesse (72, 73). Der nachfolgende Ausstrom von Cytoplasma führt letztlich zum Untergang der Bakterienzelle. Die Affinität

zu neutralen Phospholipiden, wie denen der menschlichen Zellwand ist dagegen gering, daher die selektive Wirkung gegen Bakterien und die gute humanspezifische Gewebeverträglichkeit.

Die Verwendung von Polihexanid darf ausschließlich in verdünnter Form erfolgen. Die übliche Anwendungskonzentration liegt im Bereich von 0,1, 0,2 bzw. 0,4 mg/ml (0,01, 0,02, 0,04 %). Als Verdünnungsmedium eignet sich Ringerlösung ohne Laktat oder physiologische Kochsalzlösung. Bei stark verschmutzten, putriden oder chronischen Wunden werden höhere Konzentrationen empfohlen (0,04 %), zur Wunddekontamination eignen sich schwächer konzentrierte Lösungen (0,01 %) (74), denn Polihexanid erreicht selbst in geringen Konzentrationen eine zuverlässige antiseptische Wirkung (75).

Polihexanid weist eine starke keimreduzierende Wirkung bei hoher Gewebetoleranz und geringem Allergiepotezial auf. Es wird nicht resorbiert und hat damit keine systemischen Nebenwirkungen. Bis heute sind keine Resistenzen bekannt (73, 76). Damit ist Polihexanid als lokales Antiseptikum ein probates Mittel gegen das zunehmende Vorkommen von Antibiotika resistenten Erregern.

Weitere Indikationsgebiete umfassen die chirurgische Wundbehandlung bei akuten oder chronischen Knochen- und Weichteilinfektionen als Wundspülung oder Spül-Saug-Drainage, zur äußeren Anwendung mittels Feuchtkompresse, zur antiseptischen Abdeckung von infektiösen Wunden und zur intraoperativen Prophylaxespülung. Da Polihexanid die Wundheilung anregt und die Reepithelialisierung nicht verhindert, kommt es besonders zur Therapie von Verbrennungswunden zur Anwendung (77).

Nachteile von Polihexanid bestehen in der geringen Toxizität gegenüber Viren und Sporen und der vergleichsweise langen Einwirkzeit. Nach Herstellerangaben beträgt die Einwirkzeit 10 bis 15 Minuten. Hübner et al. haben eine volle Entfaltung des antiseptischen Effekts schon nach fünf Minuten nachgewiesen (73). Allerdings verlängert sich der Wirkeintritt bei hoher Blutbelastung erregerabhängig auf bis zu 20 Minuten (78). Gegenanzeigen bestehen bei Gebrauch im Bereich des zentralen Nervensystems und der Hirnhaut, im Mittel- und Innenohr, sowie intraperitoneal.

Die intraartikuläre Anwendung von Polihexanid wird kontrovers diskutiert. Der Gebrauch des Antiseptikums zur Gelenkspülung ist im Allgemeinen wegen der Knorpeltoxizität kontraindiziert (74). Studien haben jedoch ergeben, dass die hohe Bakterizidität auch in geringeren Konzentrationen im Gelenk erhalten bleibt und die Gefahr für das Knorpelgewebe bei Verdünnungen auf bis zu 0,005 % verringert werden kann (79).

1.5.2 Wasserstoffperoxid

Wasserstoffperoxid (H_2O_2) ist eine stark reaktive flüssige Verbindung aus Wasserstoff und Sauerstoff.

Es ist eine schwache Säure und wirkt gegenüber den meisten Substanzen oxidierend. In Gegenwart von Licht, Wärme oder Metallen als Katalysatoren zerfällt Wasserstoffperoxid spontan zu Wasser und Sauerstoff $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$. Dabei werden 98,3 kJ/mol Energie frei. Der frei werdende Sauerstoff entweicht als Gas unter der typischen Bläschen- und Schaumbildung.

Wasserstoffperoxid liegt in wässriger Lösung verdünnt in 3 bis 30 %iger Form vor, erhältlich sind aber ebenso Konzentrationen bis 90 %. Hochkonzentrierte Lösungen sind reizend und gesundheitsschädlich und führen zu Verätzungen der Haut und Schleimhäute. Zur medizinischen Anwendung sind Konzentrationen von 1,5 bis 6 % gebräuchlich. Während H_2O_2 in der Industrie immer mehr Verwendung z.B. in Weichmachern, zur Kaltseptik in der Getränkeabfüllung oder als Bleichmittel findet, wird es in der antiseptischen Wundbehandlung differenziert betrachtet. Zwar ist die Wirkung von H_2O_2 keimreduzierend, eine Schädigung des umgebenden Gewebes jedoch nicht ausgeschlossen. Trotz der breiten Anwendung von Wasserstoffperoxid, existieren nur relativ wenige Studien über die antiseptische Effektivität.

Das zelldestruktive Potential von Wasserstoffperoxid besteht in der Bildung hochreaktiver Hydroxylradikale, die mit einer Änderung von Lipid-, Protein- und DNA-Strukturen einhergeht (80). Extrazellulär ist H_2O_2 in der Lage, Zellen durch eine irreversible Membrandepolarisation zu schädigen. Wasserstoffperoxid oder freie Radikale entstehen als reaktive Sauerstoffspezies (ROS) in allen atmenden Zellen als kurzzeitige Zwischenprodukte. Um die zytotoxische Wirkung zu neutralisieren, besitzen aerobe Zellen Enzyme wie Katalase, Superoxiddismutase oder Peroxidase (81). Zwar weist H_2O_2 ein breites Wirkungsspektrum gegen Viren, Bakterien und Hefen auf, das Vorhandensein von Peroxidase und Katalase in einigen Organismen kann jedoch Toleranz gegenüber geringeren Konzentrationen von Wasserstoffperoxid hervorrufen (80).

Hinzu kommt, dass die Wirkung von Wasserstoffperoxid in Labortests unter in vivo Bedingungen, also nach Zugabe von Proteinen und Blut, im Vergleich zu anderen Antiseptika stark abgeschwächt wird. Selbst bei längerer Einwirkzeit von 10 Minuten kann die keimreduzierende Wirkung nicht an die anderer Antiseptika reichen (82).

Ein entscheidender Faktor für die Wundheilung ist die Reepithelialisierung durch Keratinozyten. Wasserstoffperoxid scheint diesen Vorgang zu inhibieren, da es schon in sehr viel geringeren Konzentrationen die Einwanderung und Proliferation der Keratinozyten auf dem angewandten Wundbereich zu hemmen scheint (83). So wird der Einsatz bei chronischen Wunden nicht empfohlen, da die Wundheilung verzögert wird.

Zur Gewebetoxizität werden in der Literatur verschiedene Angaben zu H_2O_2 gemacht. Während Kalteis et al. keine Auswirkungen auf umgebende Zellen feststellen konnten, haben Kramer et al. im Verhältnis zur Wirksamkeit eine geringe Verträglichkeit nachgewiesen (84).

1.6 Hypothesen

Im Rahmen dieser Promotion sollten folgende Hypothesen überprüft werden:

- Antiseptika wirken zytotoxisch auf Chondrozyten in vitro
- die Zytotoxizität wird sowohl über Nekrose als auch Apoptose vermittelt
- geringere Konzentrationen und Einwirkzeiten haben geringere zytotoxische Effekte

2 Methodik

2.1 Materialien

DMEM/ Hams F-12	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Fetales Kälberserum, FCS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Trypsin EDTA	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Cytotoxicity Detection Kit (LDH)	Roche, Mannheim, Deutschland
Polyhexanid	Charité
H ₂ O ₂	Charité
CaCl ₂	Charité
Alginategel	Sigma Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Pronase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Collagenase A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Propidiumiodid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
FDA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
CaspACE™ FITC-VAD-FMK	Promega, Madison, WI, USA
Annexin-V Apoptosis Detection Kit	BD Biosciences, San José, CA, USA
7-AAD Staining Solution	BD Biosciences, San José, CA, USA
Taurolidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Staurosporin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland
Triton X100	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Deutschland

- Kulturmedium: DMEM F- 12, FCS inaktiviert (10 %), Penicillin/Streptomycin (1 %)
- Verdau-Medium 1: Kulturmedium plus Pronase (1mg/ml)
- Verdau-Medium 2: Kulturmedium plus Collagenase (1mg/ml)
- Katalysatorlösung (1ml): Diaphonase/NAD⁺ Mixtur, Lyophilisat + H₂O dist. (1ml)
- Dye-Lösung (45ml): Jodotetrazolchlorid (INT), Natriumlaktat
- LDH-Reaktionslösung: Katalysatorlösung + Dye-Lösung (46ml)

- chondrogenes Medium: DMEM Hams-F12, 10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 % Glutamatsulfat, Ascorbinsäure, TGF-beta, Dexamethason
- RNase (0,5 mg) plus Stammkonzentration (61 mg/ml)
- Propidiumiodid (50 ug/ml)
- Ethanol 100 %
- PBS plus FBS 2 %

Axiovert 40 C Lichtmikroskop	Zeiss Göttingen, Deutschland
CASY [®] 1 TTC Cell Counter	SchärfeSystem, Reutlingen, Deutschland
Zellkulturflaschen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Brutschrank BBD 6220	Heraeus-Instruments, Hanau, Deutschland
Sterilbank HERA-safe	Heraeus-Instruments, Hanau, Deutschland
Nylonfilter	Beckman-Coulter, Fullerton, CA
Glasfaserfilter FP 30/0,2	Whatman Inc., Clifton, NJ, USA
Fluoreszenzmikroskop CKX 41	Olympus, Hamburg, Deutschland
LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences, San José, CA, USA
Digitalkamera EOS 500 D	Canon Inc., Tokyo, Japan
FlowJo Software	Tree Star Ashland, OR, USA
ImageJ Software	NIH Images, Bethesda, Maryland, USA

2.2 Isolation und Kultur der Chondrozyten

Das zur Isolation der Chondrozyten verwendete Gewebe stammte aus dem Centrum für muskuloskeletale Chirurgie (CMSC) der Charité-Universitätsmedizin Berlin Campus Mitte. Entnommen wurde Knorpel-Knochen-Gewebe von Probanden, die aufgrund von Gelenkarthrose des Knies oder der Hüfte einen prothetischen Gelenkersatz erhielten. Voraussetzung hierfür war die schriftliche Zustimmung der Patienten zur Verwendung des Spendermaterials und dass die Patienten zu keiner Zeit klinische Anzeichen eines Infektes gezeigt hatten. Nach intraoperativer Entnahme wurde das Material bei 5 Grad Celsius aufbewahrt und zügig im Labor weiterverarbeitet.

Mit Hilfe von Skalpell und Pinzette wurde das Knorpelgewebe unter sterilen Laborbedingungen vom Knochen getrennt, in 1 mm³ große Stücke zerkleinert, mit PBS gewaschen und in ein Verdaumedium mit 10 % Protease überführt. Das Knorpel-Protease-Gemisch wurde anschließend für 30 Minuten im Brutschrank bei 37 Grad Celsius, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Danach folgten zweimaliges Waschen mit Phosphate buffered Saline (PBS) und die Überführung der Gewebestücke in das steril filtrierte Verdau-Medium 2 mit Kollagenase. Die erneute Inkubation im Brutschrank erfolgte für zwölf Stunden.

Anschließend wurde das Medium mit einem Zellfilter filtriert, um nicht verdaute Residuen zu entfernen und bei 1200 rpm für acht Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen und das Pellet mit PBS gewaschen. Dies wurde ein weiteres Mal wiederholt.

Die isolierten Chondrozyten wurden in Kulturflaschen überführt und mit Kulturmedium Hams F-12 plus 10 %igen FCS sowie dem Zusatz von 1 %igem Antibiotikum (Penicillin und Streptomycin) im Brutschrank kultiviert.

Der Wechsel des Kulturmediums erfolgte alle zwei bis drei Tage. Für die Versuche wurden Primärzellen, sowie Chondrozyten der ersten Passage verwendet. Die Passage erfolgte bei 80 % Subkonfluenz. Vor der Trypsinisierung der Zellen wurde zweimal mit PBS gewaschen, 4,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung zugegeben und für 10 Minuten im Brutschrank inkubiert. Die Ablösung der Chondrozyten vom Zellkulturflaschenboden wurde mittels Lichtmikroskop kontrolliert, gegebenenfalls wurden anhaftende Zellen durch Abklopfen abgelöst und Trypsin durch Zugabe serumhaltigen Mediums inaktiviert. Die Aussaat der Chondrozyten erfolgte auf die Wellplatten oder auf weitere Kulturflaschen.

2.3 Bestimmung von Nekrose mittels LDH

Der LDH-Assay beruht auf dem Prinzip der enzymatischen Aktivitätsmessung der Laktatdehydrogenase im Zellkulturmedium durch enzymatische Umsetzung eines roten Formazansalzes.

Bei Schädigung der Zellmembranintegrität, z.B. bei Zellnekrose, gelangt die zytosolische LDH rasch in den Extrazellulärraum, wo sie weiterhin enzymatisch aktiv bleibt. Sie ist ein unspezifischer Marker für Zellschäden oder –untergang, wobei der

Grad der Schädigung mit der Höhe der extrazellulären LDH-Konzentration korreliert (85).

Für die LDH-Assay-Versuche wurde wie folgt vorgegangen:

Die Chondrozyten wurden mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen pro Well in 24-Well-Platten mit 500 μl Kulturmedium für 24 Stunden übertragen. Nachdem das Kulturmedium entfernt wurde, wurden die Zellen pro Well mit 100 μl verschiedener Konzentrationen von Antiseptika für unterschiedliche Einwirkzeiten versetzt.

In einem ersten Versuch sollten die verschiedenen Einwirkzeiten miteinander verglichen werden. Dazu wurden die Chondrozyten mit den unverdünnten Antiseptikalösungen inkubiert. Polihexanid lag dabei in 0,04 % Verdünnung vor, Wasserstoffperoxid in 3 %. Die Inkubationszeiten betragen 10, 20 und 30 Minuten.

Ein weiterer Versuch wurde von den Verdünnungen abhängig gemacht. Die zu vergleichenden Konzentrationen stellten die unverdünnte Lösung (100 %) und eine zehnfach verdünnte Lösung (10 % = 0,004 % Polihexanid, 0,3 % Wasserstoffperoxid) der Antiseptika dar. Um einen möglichst frühen Effekt zu bemerken, wurden die Zeitintervalle mit 5, 15 und 30 Minuten gewählt.

Zur Bestimmung der LDH-Aktivität wurden je 100 μl des Überstandes in 96 Wellplatten zu je 100 μl LDH-Medium mit Natriumlaktat, NAD^+ , Jodtetrazolchlorid und Diaphorase gegeben. Die aus den Chondrozyten freigesetzte LDH oxidiert Laktat zu Pyruvat, wobei das Coenzym NAD^+ zu NADH/H^+ reduziert wird. Die zugesetzte Diaphorase katalysiert die Übertragung der Wasserstoffionen des NADH/H^+ auf das Jodtetrazolchlorid zu einem rot gefärbten schwer löslichen Formazansalz. Die Farbstoffbildung kann kolorimetrisch mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 490 nm gemessen werden. Die Intensität der Rotfärbung ist proportional zur LDH-Freisetzung im Überstand, was wiederum dem Grad der Zellschädigung entspricht (86, 87). Die Aktivität der LDH in Anwesenheit der Antiseptika wurde prozentuell zur totalen Aktivität der Positivkontrolle wiedergegeben. Als Positivkontrolle wurde das Zellnekrose induzierende Triton X100 verwendet, die Negativkontrolle stellte die Beimpfung mit PBS dar.

2.4 Bestimmung von Zellzahl und Vitalität mittels Cell Counter

Zur Quantifizierung der vitalen Zellen wurden die Chondrozyten mit 100 μl Trypsin aus dem Well gelöst und im CASY[®] Cell Counter analysiert. Das Zählprinzip beruht auf der

Änderung des elektrischen Widerstandes in einem Spannungsfeld. Aus einem Probenbecher mit isotonischer Elektrolytlösung (CASY[®]ton) werden 400 µl der Zellsuspension zur Messung in eine Kapillare mit einem Innendurchmesser von 150 µm eingezogen. Sobald eine Zelle das elektrische Feld zwischen zwei Platinelektroden passiert, entsteht aus der Änderung des Widerstandes ein elektrischer Impuls. Vitale Zellen mit intakter Zellmembran wirken wie elektrische Isolatoren und jede Zelle im elektrischen Feld erzeugt einen Puls. So kann nicht nur die absolute Zellzahl festgestellt werden, es besteht weiterhin die Möglichkeit, vitale von avitalen Zellen zu diskriminieren. Abgestorbene Zellen haben nämlich keine intakte Zellmembran mehr und sind damit leitfähiger für den elektrischen Strom. Der im Feld erzeugte Widerstand ist geringer als der der vitalen Zellen, da nur der kleinere Zellkern als Puls gemessen wird. Dies wird mit Hilfe der Pulsflächenanalyse in einer hochauflösenden Größenverteilung aufgezeichnet und stellt die Anzahl der vitalen und der toten Zellen dar.

2.5 Bestimmung der Proteoglykansynthese in Alginatbeads

2.5.1 Prinzip von Alginatbeads

Für die Kultivierung von Knorpelzellen haben sich in den vergangenen Jahren verschiedene Verfahren etabliert. Eine gängige Methode ist die Anzüchtung von Zellen in Monolayer-Kulturen. Voraussetzung hierfür ist das Herauslösen der Chondrozyten aus der Extrazellulärmatrix. Die isolierten Zellen werden in Kulturflaschen mit Nährmedium ausgesät, wo sie eine einfache Zellschicht (Monolayer) bilden. Vorteile bestehen in der vergleichsweise einfachen Umsetzung dieses Verfahrens und der Gewinnung großer Zellzahlen, da die Zellen eine hohe mitotische Aktivität aufweisen. Nachteilig wirkt sich allerdings der Verlust der phänotypischen Eigenschaften der Chondrozyten aus. Schon nach kurzem Verlauf der Monolayer-Kultivierung nehmen die Chondrozyten einen Fibroblasten ähnlichen Phänotyp an. Die Zellen sind nicht mehr oval, sondern spindelförmig mit länglichen Zytoplasmaausläufern. Gleichzeitig synthetisieren sie nicht mehr die Knorpel spezifischen EZM-Komponenten. Die Produktion von Proteoglykanen ist deutlich eingeschränkt und das knorpelspezifische Kollagen Typ II wird durch die Synthese von Kollagen Typ I ersetzt (88).

Mit der Verwendung von dreidimensionalen Kulturmedien wie Agarose oder Alginat kann diese Dedifferenzierung der Chondrozyten zunächst verhindert werden (89).

Alginate besteht aus linearen Polymeren und wird aus Braunalgen gewonnen. In Gegenwart von Kalziumionen bildet es ein grobporiges Gel. Werden Knorpelzellen in diesen Kulturen gezüchtet, bilden sie auch nach längerer Kultivierung Matrixbestandteile aus, die denen in vivo sehr ähnlich sind. Selbst zuvor dedifferenzierte Zellen aus Monolayer-Kulturen redifferenzieren in Alginatkulturen und nehmen die Synthese von Kollagen Typ II wieder auf (90).

Da es für die Bestimmung der Proteoglykansynthese wichtig ist, die Entdifferenzierung der Chondrozyten bei längerer Kultivierung in zweidimensionalen Kulturen zu verhindern, damit sie weiterhin knorpelspezifische Matrix und damit auch Proteoglykane synthetisieren, wurden für diesen Versuch dreidimensionale Kulturen in Alginate angefertigt.

2.5.2 Herstellung der Alginatbeads

Die Chondrozyten wurden wie zuvor mit Trypsin vom Boden der Kulturflaschen gelöst und mit Casy Cell Counter gezählt. Aus 240 mg Alginatpulver wurden 600 ml des 4,8 %igen Alginatgels hergestellt. Zu einem Bead von 0,1 ml wurden etwa 5×10^5 Zellen hinzugefügt. Nach Zugabe von CaCl_2 bildeten sich die Beads aus. Die Kügelchen wurden mit chondrogenem Medium versetzt und für zwei Wochen inkubiert.

Es wurde dann Polihexanid (0,04 %), H_2O_2 (3 %) und PBS als Negativkontrolle für 10 und 30 Minuten zugegeben. Danach wurden die Alginatbeads gewaschen und in chondrogenem Medium für weitere 3 Wochen rekultiviert.

2.5.3 Alcianblau-Färbung

Zur visuellen Quantifizierung der Proteoglykansynthese als Zeichen der Vitalität der Chondrozyten wurde Alcianblau-Färbung verwendet.

Alcianblau bindet an die polyanionischen Proteoglykane der EZM im Sauren (pH 2,5) und färbt sie bläulich. Die Intensität der Blaufärbung korreliert mit der Menge der anfärbbaren Proteoglykane. Ein hoher Proteoglykananteil in der Extrazellulärmatrix spricht dafür, dass die vorhandenen Chondrozyten ihre Syntheseleistung über die Zeit der Rekultivierung aufrecht halten konnten.

Nach dreiwöchiger Inkubation wurden die Alginatbeads zweifach mit PBS gewaschen, mit 4 %igem Formalin fixiert und für 30 Minuten gewässert. Nachdem die Zellen mit H.E. gefärbt wurden, wurde den Alginatbeads mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe

(70-100 % Ethanol) die Flüssigkeit entzogen (10 Min. 70 %, 25 Min. 80 %, 25 Min. 90 %, 30 Min 96 %, zweimal 60 Min. 100 % Ethanol). Der Alkohol wurde mit Xylol für 30 Minuten ausgewaschen. Nach der Infiltration mit flüssigem Paraffin (60 °C) für 60 Minuten folgte die Teilung der Blöcke in 4 µm starke Schnitte, die zum Ausdehnen in 56 °C warmem Aqua dest aufgefangan wurden. Die Schnitte trockneten über Nacht bei 37 °C auf beschichteten Objektträgern.

Dann wurde für 10 Minuten wieder mit Xylol (zweimal je 10 Min.) und einer absteigenden Alkoholreihe (100, 96, 90, 80, 70 % für je 2 Min.) gewaschen. Als nächstes wurden die Schnitte mit 3 %iger Essigsäure drei Minuten lang gewässert und in 1 %iger Alcianblau-Färbung gelöst in 3 %iger Essigsäure (pH 2,5) eingestellt. Nach dreißigminütiger Färbedauer erfolgte die erneute Reinigung mit 3 % Essigsäure und Aqua dest. Die anschließende Kernfärbung mit Kernechtrot dauerte fünf Minuten, es folgten Spülen mit Aqua dest, die aufsteigende Alkoholreihe (70 bis 96 % Alkohol), Reinigung mit Xylol und Eindeckeln der Schnitte mit Vitroclud.

Lichtmikroskopische Analysen der Schnitte konnten anschließend durchgeführt werden. Die Gesichtsfelder wurden mit einer Digitalkamera digitalisiert und mittels ImageJ (GNU Lizenz) ausgewertet. Dazu wurden visuell repräsentative Analysebereiche festgelegt, das heißt Zell-Matrix-Areale und Areale ohne Matrix. Der Level der Blaufärbung in den Arealen wurde gemessen. Es wurde angenommen, dass die Intensität der blauen Farbe in Relation zur Proteoglykankonzentration zu setzen ist.

2.5 Bestimmung der Zellmorphologie

Da sich Nekrose und Apoptose auch in den Auswirkungen auf die Morphologie der geschädigten Zellen unterscheiden lassen, wurden die Zellen ebenfalls lichtmikroskopisch untersucht.

Die Chondrozyten wurden auf 24-Well-Platten bis zur Subkonfluenz inkubiert und anschließend mit 100 µl 0,04 %iger Polihexanidlösung und 3 %igem Wasserstoffperoxid für 30 Minuten beimpft. Als Kontrolle dienten Chondrozyten mit PBS und Triton X100. Sofort nach Ablauf der vorgegebenen Zeit wurden die Ergebnisse unter dem Lichtmikroskop interpretiert und mit der Negativkontrolle und Positivkontrolle verglichen. Von den Gesichtsfeldern wurden repräsentative digitale Bilder erstellt.

2.6 Immunhistologie mit Fluoresceindiacetat, Annexin-V und Propidiumiodid

Das Prinzip der Fluoreszenzmikroskopie beruht auf der Emission von Licht bestimmter Wellenlänge durch mit einer anderen Wellenlänge angeregte fluoreszierende Stoffe. Diese Stoffe können beispielsweise selbst fluoreszierend sein oder sie wurden mit bestimmten fluoreszierenden Farbstoffen gefärbt, den sog. Fluorochromen. Wird nun das zu untersuchende Präparat mit Licht geeigneter Wellenlänge und Intensität beschienen, wird dieses Licht mit einer längeren Wellenlänge wieder ausgesendet und ist als Fluoreszenz wahrnehmbar. Spezielle Filter des Fluoreszenzmikroskops lassen nur die Wellenlänge des emittierten Lichts passieren (91). Zur fluoreszenzmikroskopischen Vitalitätsmessung der Chondrozyten wurden Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid verwendet. Fluoresceindiacetat (FDA) leuchtet selbst nicht, wird aber von Esterasen in das grün leuchtende Fluorescein hydrolysiert, welches fluoreszenzoptisch nachgewiesen werden kann. Bei Anregung mit blauem Licht mit der Wellenlänge von 488 nm emittiert FDA grünes Licht mit 520 nm. Der biochemische Umsatz zum Fluorescein kann nur in vitalen Zellen stattfinden. Avitale Zellen besitzen keine Esteraseaktivität. Sie bilden kein Fluorescein und werden demnach nicht angefärbt.

Propidiumiodid (PI) ist ein Farbstoff, der häufig zur Zellzyklusanalyse verwendet wird. PI passiert die Zellmembran und interkaliert mit der Zell-DNA. Der Farbstoff führt unter Blauanregung zu einer stark roten Fluoreszenz (Emissionsmaximum 637 nm). Da PI intakte Zellmembranen nicht permeieren kann, wird lediglich die DNA von Zellen mit durchlässiger Membran angefärbt. Die Anfärbbarkeit weist also auf avitale Zellen hin. Die Chondrozyten wurden auf Chamber Slides mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² ausgesät und mit 0,04 % Polihexanid behandelt.

Zur Positivkontrolle diente Triton X als Nekroseinduktor. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen mit PBS gewaschen und mit FDA-Lösung (3 µg/ml) bei 37° C für 15 Minuten gefärbt. Nach weiterem Waschen erfolgte die Gegenfärbung mit PI-Lösung (3 µg/ml) bei Raumtemperatur für zwei Minuten. Nach Entfernung des PI wurde das Ergebnis sofort fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen mit Annexin-V in Verbindung mit Propidiumiodid markiert. Mit Hilfe dieser Farbstoffe lassen sich apoptotische von spätapoptotischen bzw. nekrotischen Zellen differenzieren.

Annexin-V ist ein Calcium abhängiges Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin. Phosphatidylserin ist ein Phospholipid und befindet sich in lebenden Zellen an der inneren Zellmembran. In frühen Stadien der Apoptose wird es in die Außenmembran transloziert (92, 93). Hier kann Annexin-V an das exprimierte Phosphatidylserin binden und apoptotische Zellen markieren. Da Annexin-V selbst keine fluoreszierenden Eigenschaften besitzt, wird es mit Fluoresceinisothiocyanat (FITC) konjugiert. Das grün fluoreszierende FITC absorbiert Licht der Wellenlänge von 492 nm und hat ein Emissionsmaximum bei 520 nm.

Auch nekrotische Zellen binden Annexin-V, aufgrund des Verlustes der Membranintegrität kann Annexin-V an Phosphatidylserin jedoch an der inneren Zellmembran binden. Um nun nekrotische von apoptotischen Zellen zu differenzieren, wird Propidiumiodid eingesetzt. Die DNA der Apoptosezellen wird nicht von PI angefärbt, da die Zellmembran in frühen Stadien der Apoptose intakt bleibt. Die Zellmembran der spätapoptotischen sowie der nekrotischen Zellen ist jedoch permeabel für PI und die DNA wird rot gefärbt.

Die Fluorochrome können als Doppelfärbung kombiniert werden, da sie über unterschiedliche Emissionsspektren verfügen. Die nekrotischen Zellen sind somit Annexin-positiv und PI-positiv, die apoptotischen Zellen sind Annexin-positiv, aber PI-negativ.

Für die Fluoreszenzmikroskopie mit Annexin-V wurden die Chondrozyten auf Chamber Slides mit einer Dichte von 2×10^4 Zellen/cm² ausgesät. Die Zellen wurden mit 0,04 % Polihexanid und 3 % Wasserstoffperoxid für 60 Minuten beimpft. PBS-inkubierte Zellen wurden zur Negativkontrolle verwendet. Nachdem die Antiseptika entfernt wurden, folgten die Färbungen mit Annexin-V (20 µg/ml) und Propidiumiodid (20 µg/ml) für 15 Minuten. Die Annexin-V-Färbung erfolgte in Gegenwart des Annexin-Bindungs-Puffers, der eine hohe Konzentration an Kalzium enthält. Nach Entfernung der Lösungen wurde das Ergebnis sofort fluoreszenzmikroskopisch dokumentiert.

In einem weiteren Versuch wurden die Zellen mit 0,04 % Polihexanid für 30 Minuten inkubiert. Das weitere Vorgehen erfolgte wie oben.

2.7 FACS-Analyse mit Annexin-V, 7-AAD und Caspasen

FACS (fluorescence activated cell sorting) ist eine Form der Durchflusszytometrie, bei der fluoreszenzoptisch markierte Zellen einen Laserstrahl geeigneter Wellenlänge passieren und optische Signale emittieren.

Die markierten Zellen werden in der FACS-Suspension in eine Kapillare eingezogen und einzeln an dem Laserstrahl vorbei geleitet. Dabei kommt es zur Streuung von Licht. Für die Durchflusszytometrie ergeben sich durch das Vorwärtsstreulicht (FSC, forward scatter) und das Seitenstreulicht (SSC, sideward scatter) Rückschlüsse auf das Volumen der Zellen sowie Struktur und Größe des Zellkerns. Bei der FACS-Analyse können mit Hilfe verschiedener Marker zusätzlich apoptotische von nekrotischen Zellen, ähnlich der Fluoreszenzmikroskopie differenziert werden. Die an die Zellen gebundenen Fluorochrome werden über den Laser angeregt und die emittierte Lichtmenge registriert. Zur Diskriminierung von frühen und späten Apoptosestadien können Stoffe wie Annexin-V, Caspaseninhibitoren und 7-AAD verwendet werden.

7-Aminoactinomycin D ist ein orange rotes Peptid, das als Zellfarbstoff zum Nachweis von Apoptose verwendet wird. Da 7-AAD ebenso spezifisch wie PI mit der DNA avitaler Zellen interkaliert, kann es in Kombination mit FITC markierten Antikörpern zur Doppelfärbung anstelle des PI verwendet werden. 7-AAD kann ebenfalls die intakte Membran von Zellen nicht überwinden und kann deshalb nur DNA von Zellen mit einer bereits durchlässigen Membran anfärben. Das Emissionsmaximum von 7-AAD liegt bei 650 nm noch weiter im roten Bereich und als das des PI. In Verbindung mit der Annexin- V-Färbung lassen sich durch die 7-AAD negative und positive Anfärbbarkeit frühapoptotische von spätapoptotischen (nekrotischen) Zellen in der Durchflusszytometrie unterscheiden.

Mit Hilfe des CaspAce™ FITC-VAD-FMK Markers lassen sich intrazelluläre Apoptosesignale nachweisen. Der Caspaseinhibitor z-VAD-FMK (carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]-fluoromethylketon) wird wegen seiner chemischen Struktur direkt in die apoptotische Zelle aufgenommen und bindet dort irreversibel an alle aktivierten Caspasen. Die Analyse in der Durchflusszytometrie dient dem schnellen und direkten Nachweis von Caspaseaktivität und damit von Apoptose.

Für den Versuch wurden die Chondrozyten auf 24-Well-Platten bis zur Subkonfluenz kultiviert. Je 100 µl von 0,04 % Polihexanid und 3 % Wasserstoffperoxid wurden für die

Zeiträume von 15, 30 und 60 Minuten hinzugegeben. Zur Kontrolle dienten Chondrozyten mit PBS und Chondrozyten, die mit dem Apoptoseinduktor Staurosporin behandelt worden sind. Entsprechend des Herstellerprotokolls wurden die Zellen mit 10 μM FITC-VAD-FMK bei 37 °C für 20 Minuten gefärbt und danach gewaschen. Annexin-V und 7-AAD wurden in einer Verdünnung von 1:20 beigegeben und für weitere 15 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von Bindepuffer wurden die Zellen sofort mit der Durchflusszytometrie analysiert.

Frühapoptotische Zellen wurden dabei Annexin-V positiv und 7-AAD negativ oder Caspase-positiv und 7-AAD negativ definiert. Spätapoptotische oder nekrotische Zellen sollten Annexin-V positiv und 7-AAD positiv oder Caspase-positiv und 7-AAD positiv sein.

2.8 Statistik

Die statistische Analyse der Versuche zur Vitalitätsmessung erfolgte mit dem nonparametrischen Wilcoxon Paardifferenztest für verbundene Stichproben mit $n=6$.

Die Versuche zur Untersuchung der Apoptose wurden mit der Varianzanalyse ANOVA (Analysis of Variance) und anschließendem Dunnett's multiple post hoc Vergleichstest geprüft.

Das Signifikanzniveau für alle statistischen Untersuchungen betrug $p<0,05$.

3 Ergebnisse

3.1 Vitalitätsmessung der Chondrozyten

3.1.1 LDH-Aktivitätsbestimmung

Die LDH-Aktivität, als Indikator für den Verlust der Zellmembranintegrität, wurde im Überstand der Zellkultur bestimmt. Im ersten Versuch ging es um die allgemeine Darstellung der LDH-Aktivität in den einzelnen Proben nach 10, 20 und 30 Minuten, die mit der Negativkontrolle PBS und der Positivkontrolle mit Triton X100, einem bekannten Induktor der Zellnekrose, verglichen wurde. In Abb. 4 findet sich die prozentuale Darstellung. Erwartungsgemäß waren die LDH-Aktivitätswerte für Triton X100 entsprechend hoch (144 %), für PBS entsprechend niedrig (4,5 %). Polihexanid erreichte bereits nach 10 Minuten signifikant höhere LDH-Aktivitätswerte im Vergleich zur Kontrolle (34 %; 5 ± 1 vs. 34 ± 2 ; $p < 0,05$), die nach 20 und 30 Minuten sukzessive anstiegen (41 % und 49 %). Dies spricht dafür, dass der Grad der Zellschädigung von der Dauer der Exposition abhängig ist.

Für Wasserstoffperoxid konnte zu keinem der gemessenen Zeitpunkte eine signifikante Aktivität der LDH im Überstand beobachtet werden. Die Werte entsprachen der Größenordnung der Negativkontrolle mit PBS (3 %, 3,25 % und 3,75 %).

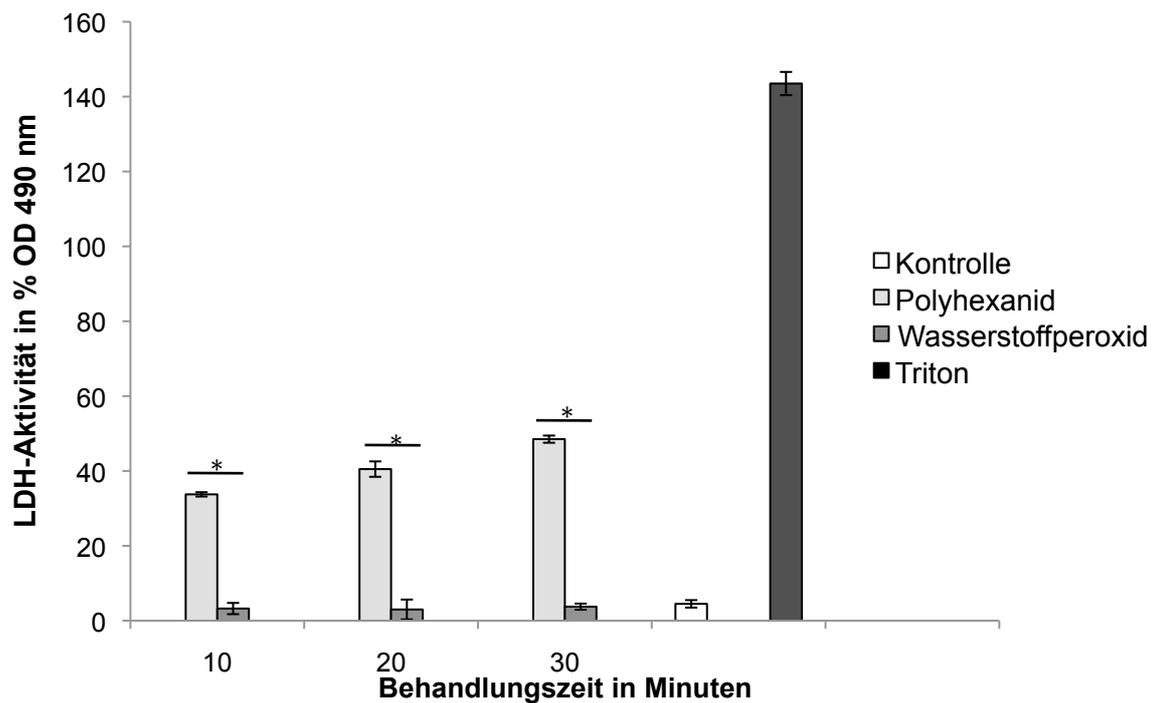


Abb. 4 Aktivität der Laktatdehydrogenase in % nach 10, 20 und 30 Minuten Inkubation mit Polyhexanid und Wasserstoffperoxid im Vergleich zu PBS (Kontrolle) und Triton X100, * $p < 0,05$.

In einem weiteren Versuch sollte die LDH-Aktivität in Abhängigkeit der Antiseptikakonzentration miteinander verglichen werden. Für eine genauere Darstellung wurde für die erste Messung ein kleineres Zeitintervall von 5 Minuten gewählt.

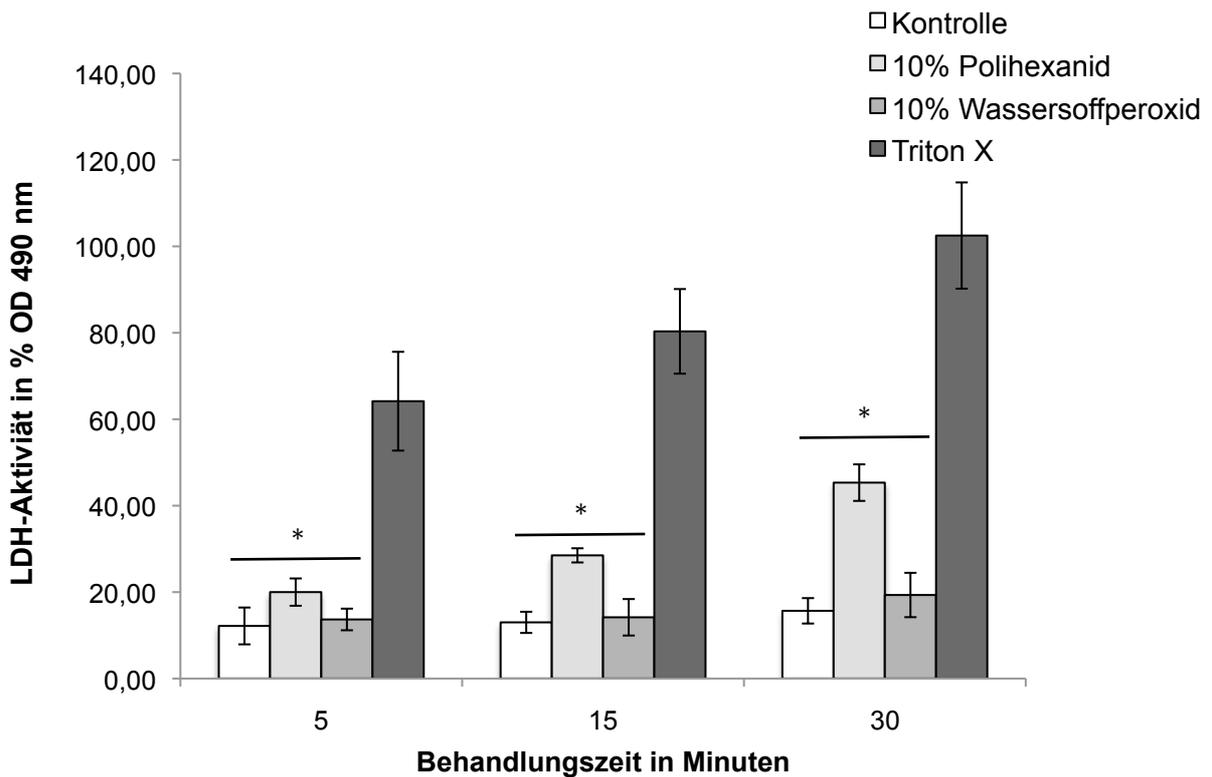


Abb. 5 Darstellung der Aktivität der Laktatdehydrogenase bei 490 nm in % bei Inkubation mit 0,004 % Polyhexanid und 0,3 % Wasserstoffperoxid (=10 %) zu den Zeitpunkten nach 5,15 und 30 Minuten im Vergleich zu PBS (Kontrolle) und Triton X100. *p<0,05

Bereits nach dieser Zeit zeigte Polihexanid in der 10fachen Verdünnung einen signifikanten Anstieg der LDH im Vergleich zur Negativkontrolle mit PBS (12 ± 4 vs. 20 ± 3 , $p < 0,05$). Nach 15 und 30 Minuten waren ebenfalls signifikant erhöhte Werte ermittelbar (13 ± 2 vs. 29 ± 2 ; 16 ± 3 vs. 45 ± 4 , $p < 0,05$). Dass in der Negativkontrolle ebenfalls höhere Werte mit Verlängerung der Zeitspanne gemessen wurden, spricht dafür, dass eine gewisse Beschädigung der Chondrozytenmembranen auch ohne Antiseptikaeinfluss stattfindet.

Die Behandlung mit Wasserstoffperoxid hingegen führte zu keinem der Zeitpunkte zu signifikanten Erhöhungen der LDH-Werte im Vergleich zur PBS-Kontrolle (12 ± 4 vs. 14 ± 3 ; 13 ± 2 vs. 14 ± 4 ; 16 ± 3 vs. 19 ± 5 , n.s. nach 5, 15 und 30 Minuten).

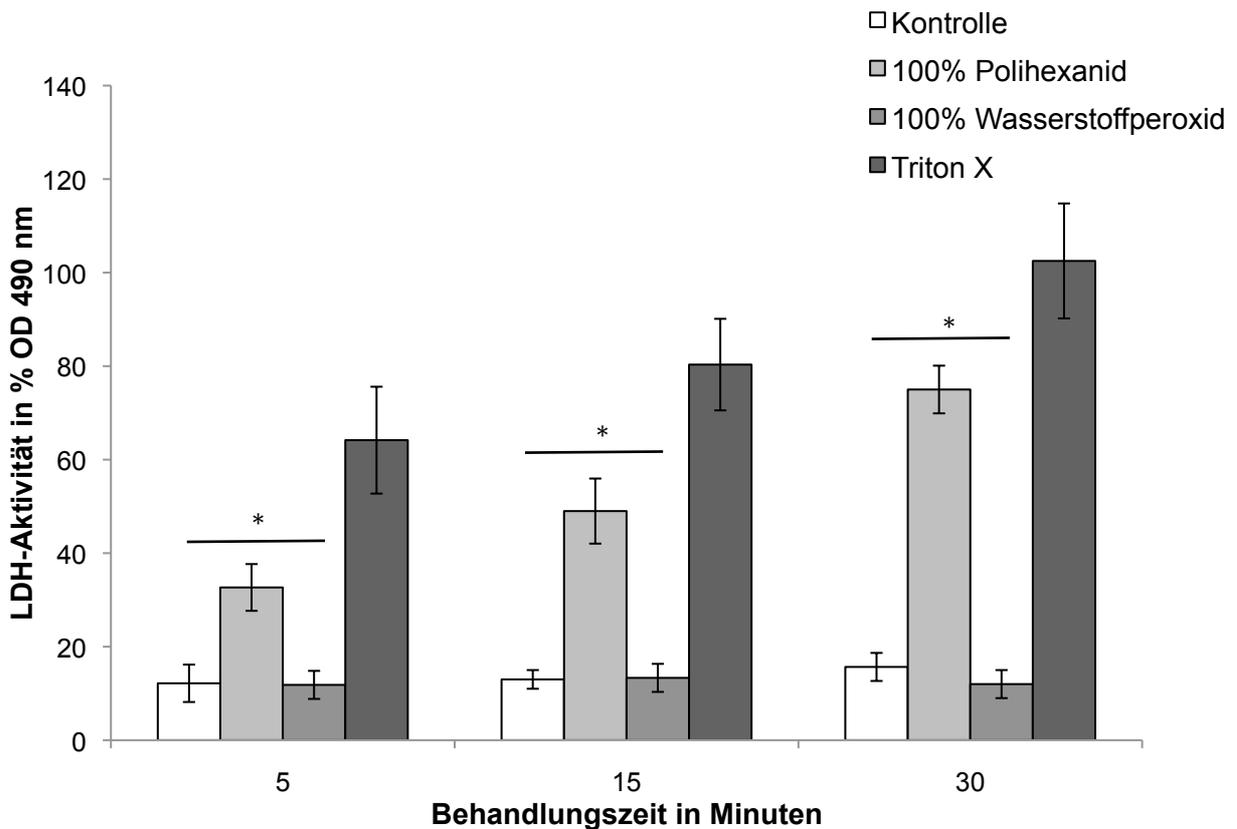


Abb. 6 Aktivität der Laktatdehydrogenase in % bei Inkubation mit 0,04 % Polyhexanid und 3 % Wasserstoffperoxid (=100 %) zu den Zeitpunkten nach 5, 15 und 30 Minuten im Vergleich zu PBS (Kontrolle) und Triton X100, *p<0,05.

Der zweite Versuch mit den unverdünnten Lösungen zeigte in Bezug auf Polihexanid eine weitere signifikante Zunahme der LDH-Aktivität im Vergleich zur 10fach verdünnten Lösung und zur Kontrolle (12 ± 4 vs. 33 ± 5 ; 13 ± 2 vs. 49 ± 7 ; 16 ± 3 vs. 75 ± 5).

Eine Zunahme der LDH-Aktivität durch Wasserstoffperoxid konnte jedoch auch hier nicht festgestellt werden. H_2O_2 erreichte sowohl in der verdünnten als auch in der unverdünnten Lösung lediglich Werte im Bereich der Negativkontrolle (12 ± 4 vs. 12 ± 3 ; 13 ± 2 vs. 13 ± 4 ; 16 ± 3 vs. 12 ± 3 , n.s.). Um eine Interaktion der Wasserstoffatome des H_2O_2 mit $NADH/H^+$, aufgrund der es möglicherweise nicht zu einem Farbumschlag kommt, obwohl LDH im Überstand vorhanden war, auszuschließen, wurde ein Nebenversuch des LDH-Assays an zerstörten Erythrozyten durchgeführt. Der Überstand wurde ebenfalls abpipettiert und mit Wasserstoffperoxid und der Negativkontrolle mit PBS beimpft. Es zeigte sich hierbei kein Unterschied in der LDH-Erhöhung, weshalb folgerichtig ist, dass H_2O_2 die LDH-

Reaktion nicht inhibiert, sondern in der vorgegebenen Zeit mit den verwendeten Konzentrationen wahrscheinlich keinen Austritt des intrazellulären Enzyms verursacht.

3.1.2 Zellzahl und vitale Zellen

Die Höhe der Gesamtzellzahl in der nicht antiseptisch behandelten Kontrolle mit PBS lag bei $12,92 \text{ pro } 100 \mu\text{l} \times 10^3$. Mit $p < 0,05$ war die totale Zellanzahl schon nach 5 Minuten der Antiseptikabeimpfung für beide Antiseptika signifikant geringer.

Für die 10 %ige Polihexanidlösung (Abb. 7A) ergab sich eine Reduktion im Vergleich zum Kontrollmedium auf 10, 9 und 8 Zellen pro $100 \mu\text{l} \times 10^3$ nach 5, 15 und 30 Minuten. Die verdünnte Wasserstoffperoxidlösung erreichte sogar eine Reduktion der Gesamtzellzahl auf 7, 6 und 6 Zellen pro $100 \mu\text{l} \times 10^3$ nach 5, 15 und 30 Minuten Expositionszeit.

Die unverdünnten Lösungen wirkten sich stärker auf die Minderung der Gesamtzellzahl aus. Polihexanid erreichte hier eine Minderung der totalen Zellzahl von 7, 6 und 5 Zellen pro $100 \mu\text{l} \times 10^3$ zu den Messzeitpunkten. Wasserstoffperoxid minderte die Zellzahl um 6, 5 und 4 pro $100 \mu\text{l} \times 10^3$.

In beiden Versuchen waren die Zellzahlminderungen nach Exposition mit Wasserstoffperoxid stärker ausgeprägt als mit Polihexanid.

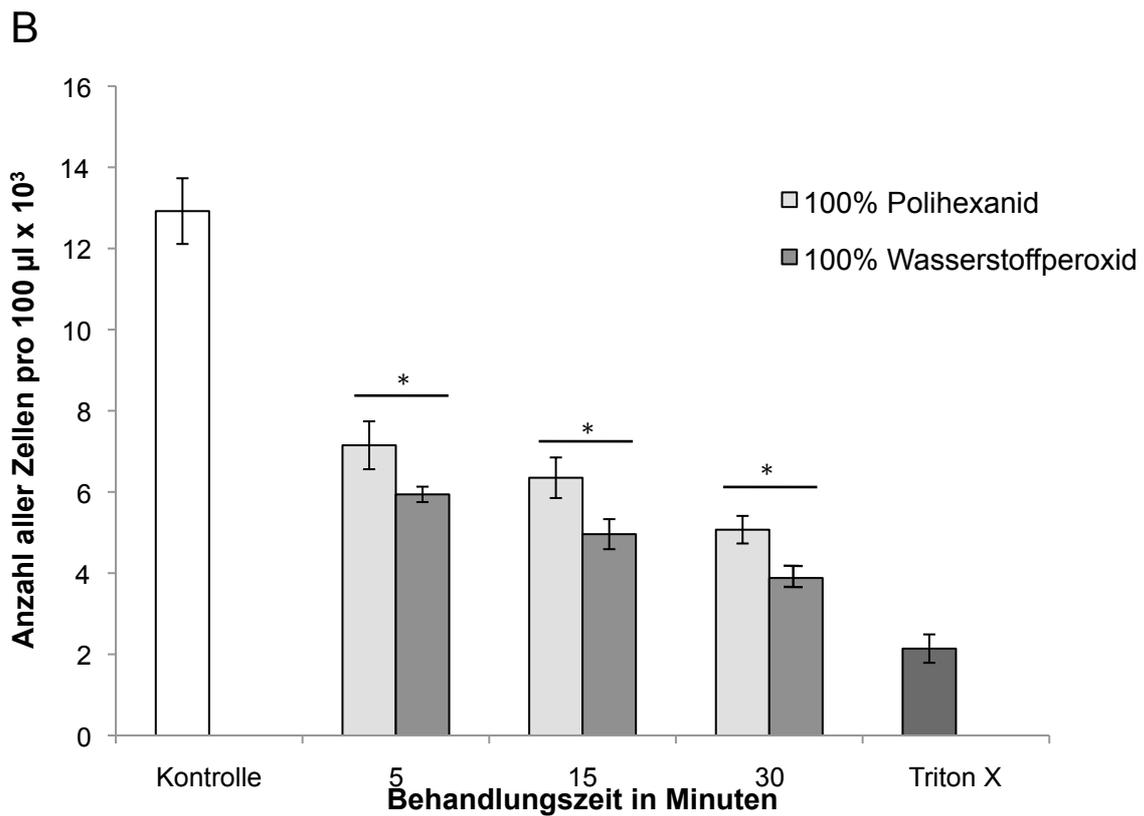
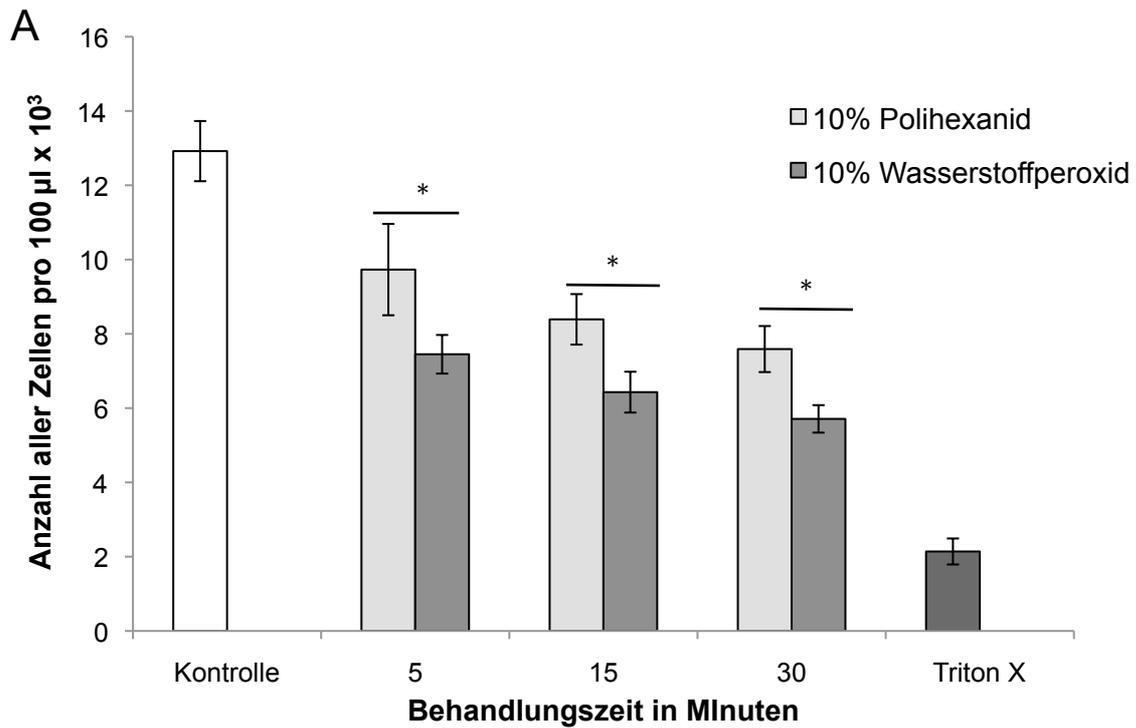


Abb. 7 Höhe der totalen Zellanzahl mit CASY® Cell Counter nach 5, 15 und 30 Minuten mit Inkubation mit 10 % (A) und 100 % (B) Antiseptikallösung pro 100 µl x 10³ zu Vergleichsmedien mit PBS (Kontrolle) und Triton X, *p<0,05.

Die Hälfte der Zellen wurde nach Behandlung mit den Antiseptika zweimalig mit physiologischer Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) gespült. Wurden die Zellen mit Polihexanid oder H₂O₂ behandelt, resultierte aus dem anschließenden Waschen eine signifikant höhere Zunahme der vitalen Zellen und der Gesamtzellzahl ($p < 0,05$). Die Höhe der vitalen Zellen in der nicht antiseptisch behandelten Kontrolle mit PBS lag bei $10 \text{ pro } 100 \mu\text{l} \times 10^3$, die der Gesamtzellzahl bei $14 \text{ pro } 100 \mu\text{l} \times 10^3$.

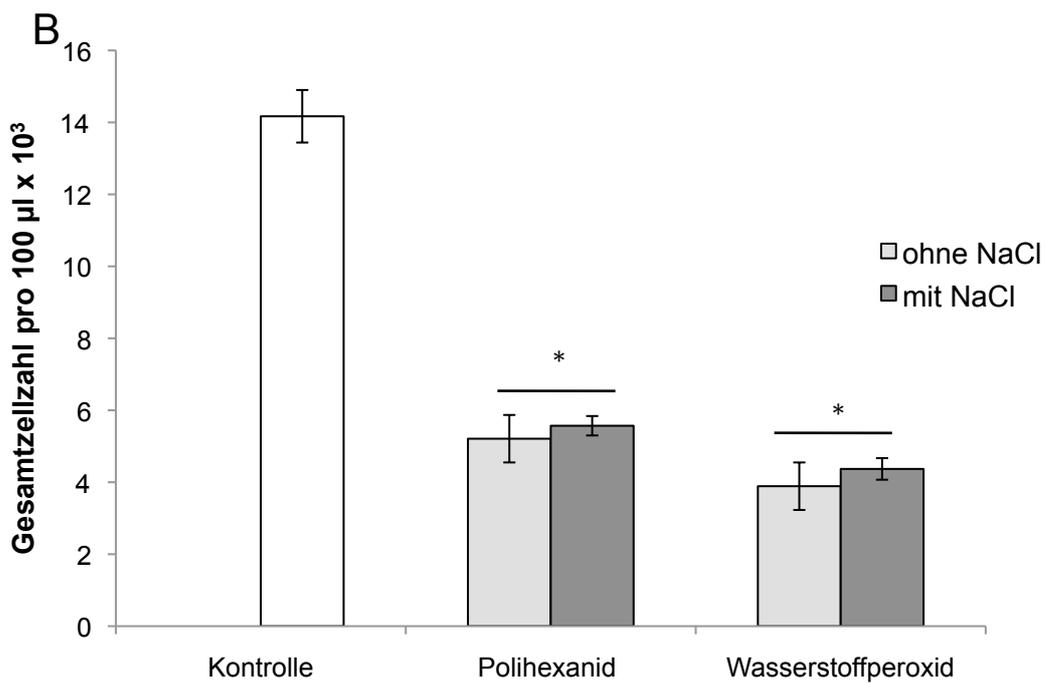
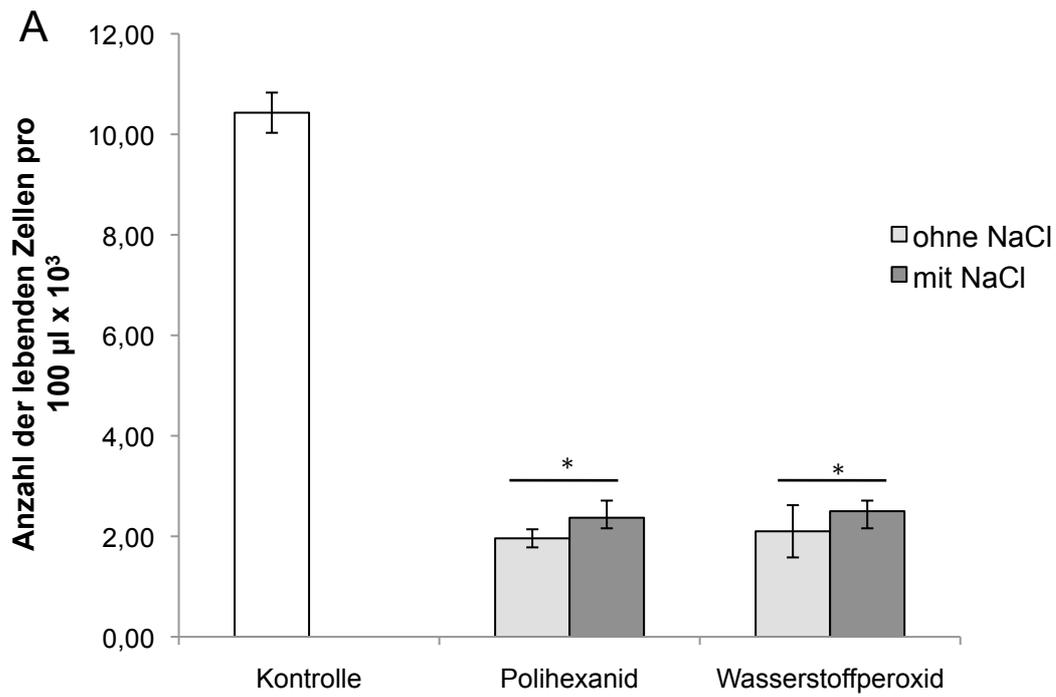
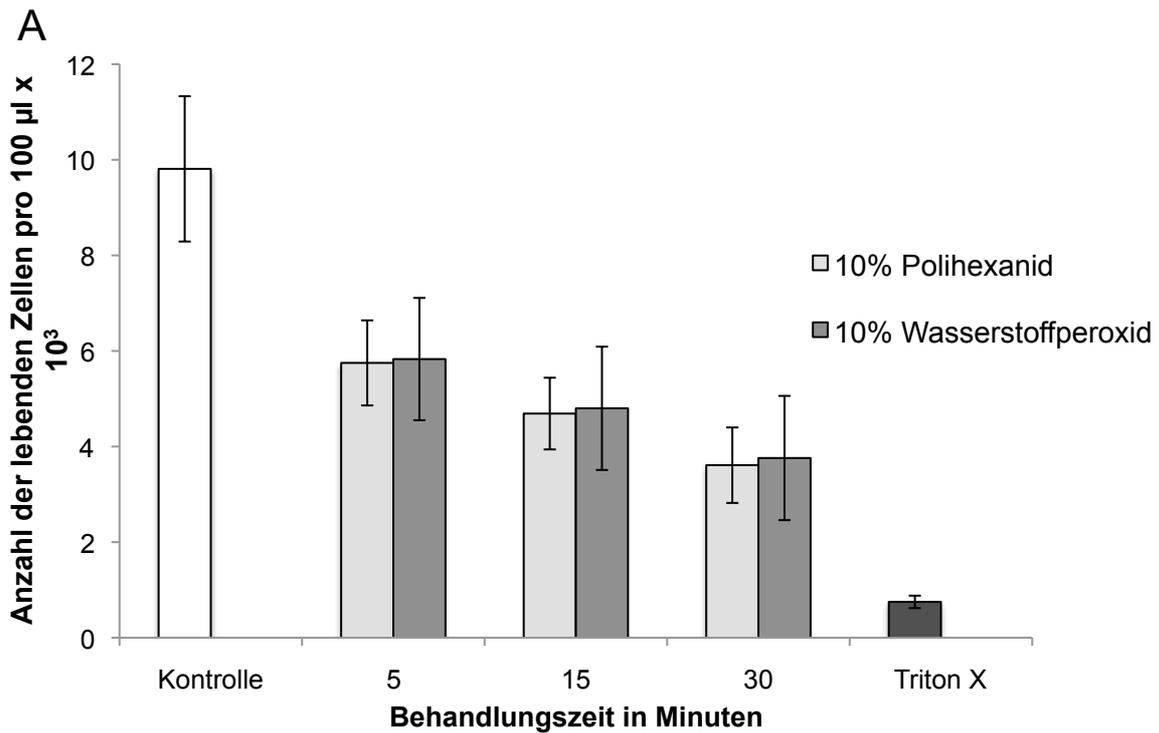


Abb. 8 Darstellung der vitalen Zellen (A) und der Gesamtzellzahl (B) pro 100 µl x 10³ nach Spülung mit 0,9 % Natriumchloridlösung und ohne. Die Chondrozyten wurden mit Polihexanid und Wasserstoffperoxid inkubiert und mit der Kontrolle mit PBS mittels Wilcoxon-Test verglichen, *p<0,05.

Die unterschiedlichen Konzentrationen der Antiseptika wirkten sich ebenfalls auf die Ergebnisse aus. Während sich die Anwendung der unverdünnten Lösungen (100 %) von Polyhexanid und H_2O_2 verglichen miteinander deutlich auf die Vitalität der Chondrozyten auswirkte, waren bei 10 %iger Verdünnung (0,004 % Polyhexanid, 0,3 % H_2O_2) keine differenten Auswirkungen messbar.

Die Gesamtzellanzahl war bei Polyhexanid und Wasserstoffperoxid jedoch bei jeder Verdünnung signifikant gemindert.



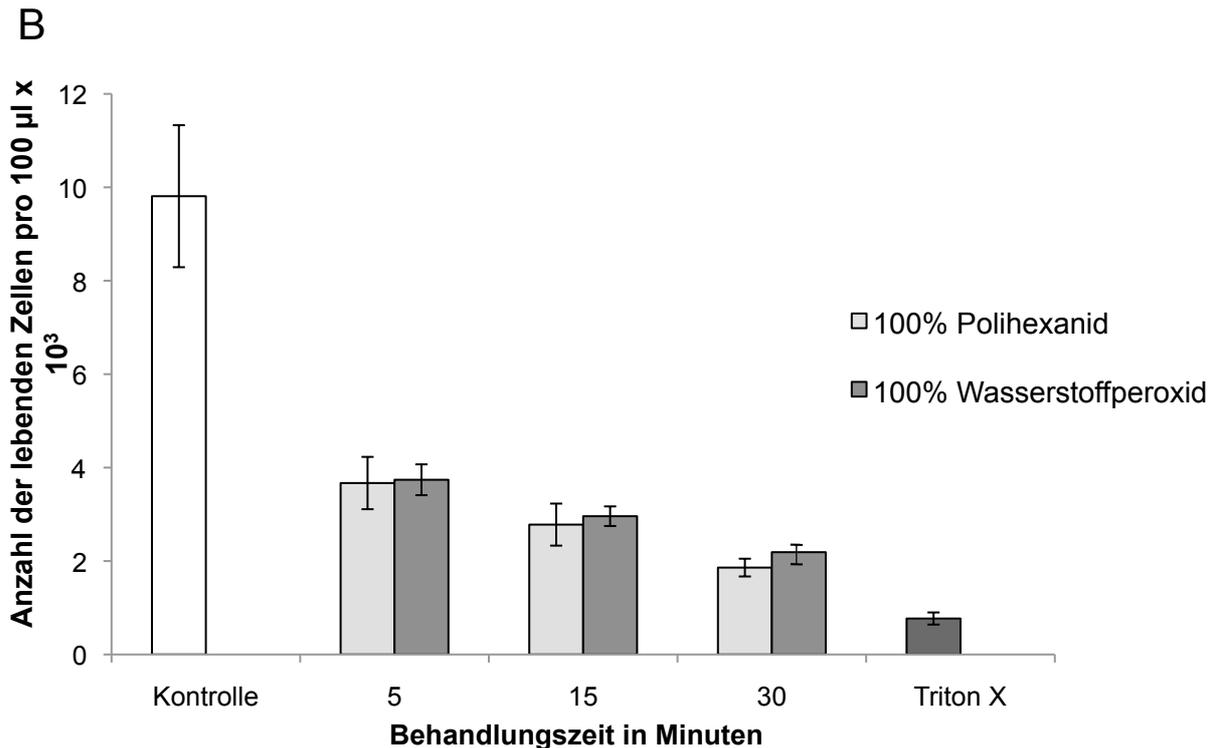


Abb. 9 Vitale Chondrozyten pro 100 µl x 10³ nach Inkubation mit 10% (A) und 100% (B) Polihexanid und Wasserstoffperoxid. Die Messungen erfolgten nach 5, 15 und 30 Minuten und wurden gegen die Positivkontrolle mit PBS (Kontrolle) und die Negativkontrolle mit Triton X100 verglichen. *p<0,05 signifikant.

3.1.3 Nachweis der Proteoglykansynthese

Die histologische Analyse der Alcianblaufärbung zur Beurteilung der Proteoglykansynthese der Chondrozyten zeigte nach drei Wochen eine Intensitätsminderung der Blaufärbung bei Antiseptikabehandlung gegenüber der Kontrolle mit PBS. Die Positivkontrolle (A) wies eine gleichmäßig blau leuchtende Färbung auf. Das bedeutet eine erhaltene Proteoglykansynthese, was intakte Zellen voraussetzt, die metabolisch aktiv sind.

Lichtmikroskopisch ließen sich auch Unterschiede in der Intensität der Färbung im Vergleich der Antiseptika untereinander feststellen. Die Wasserstoffperoxid inkubierten Schnitte (B) hatten eine geringere Blaufärbung als die der Positivkontrolle mit PBS, jedoch eine stärkere Blaufärbung als die Schnitte, die mit Polihexanid inkubiert worden waren (C). Unter der Annahme, dass geschädigte Chondrozyten weniger Proteoglykane bilden als intakte Zellen, ist wahrscheinlich, dass mit Polihexanid inkubierte Zellen eine stärkere Inhibierung der

Proteoglykansynthese aufweisen als Zellen, die mit Wasserstoffperoxid in Kontakt kamen.

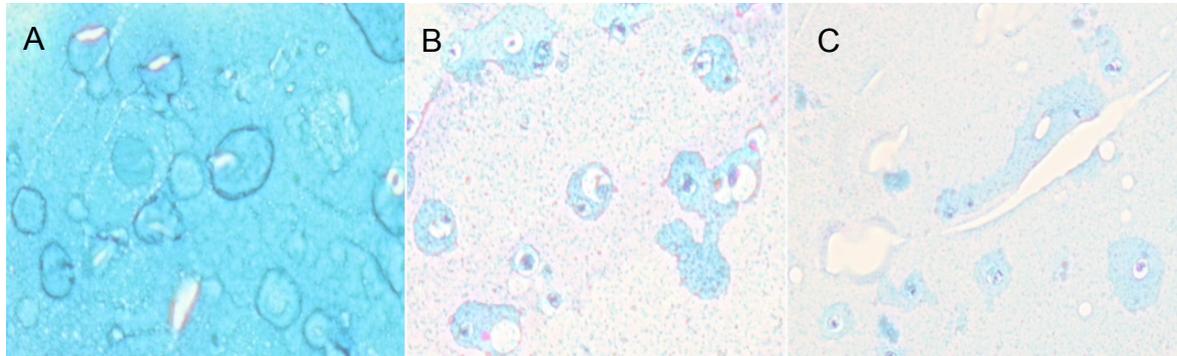


Abb. 10 Lichtmikroskopische Darstellung der Proteoglykansynthese nach Alcianblaufärbung. Die Chondrozyten wurden für 30 Minuten mit verschiedenen Antiseptika inkubiert und für drei Wochen rekultiviert. A: Kontrolle mit PBS B: Wasserstoffperoxid C: Polihexanid

Die Blaufärbung der lichtmikroskopischen Schnitte wurde mit ImageJ digital analysiert und die Ergebnisse mit dem Wilcoxon Test miteinander verglichen. Abb. 11 zeigt die grafische Darstellung der Ergebnisse nach 10 und 30 Minuten Einwirkzeit mit den Antiseptika. Sichtbar wird die hohe Intensität der Blaufärbung in den PBS inkubierten Schnitten zu beiden Zeitpunkten (59 ± 2). Die visuelle Quantifizierung der Alcianblaufärbung nach 10 und 30 Minuten Inkubationszeit zeigte, dass Wasserstoffperoxid eine deutlich geringere Intensität der Färbung als die Kontrolle mit PBS aber keine signifikant höhere Intensität gegenüber Polihexanid nach 10 Minuten ($15 \pm 1,29$ vs. $12 \pm 4,13$; n.s.) im Gegensatz zu 30 Minuten ($12 \pm 0,56$ vs. 10 ± 1 , $p < 0,05$). Das entspricht einer Abnahme der Blaufärbung durch Wasserstoffperoxid um 75 % nach 10 Minuten und 79 % nach 30 Minuten, sowie 79 % nach 10 Minuten und 82 % nach 30 Minuten durch Polihexanid im Vergleich zur Kontrolle. Vorausgesetzt die Intensität der Alcianblaufärbung entspricht der Höhe der Proteoglykansynthese, wird sie in beiden Fällen bereits nach 10 Minuten im Vergleich zur Kontrolle um fast 80 % gemindert. Die Ergebnisse entsprachen den lichtmikroskopischen Beobachtungen.

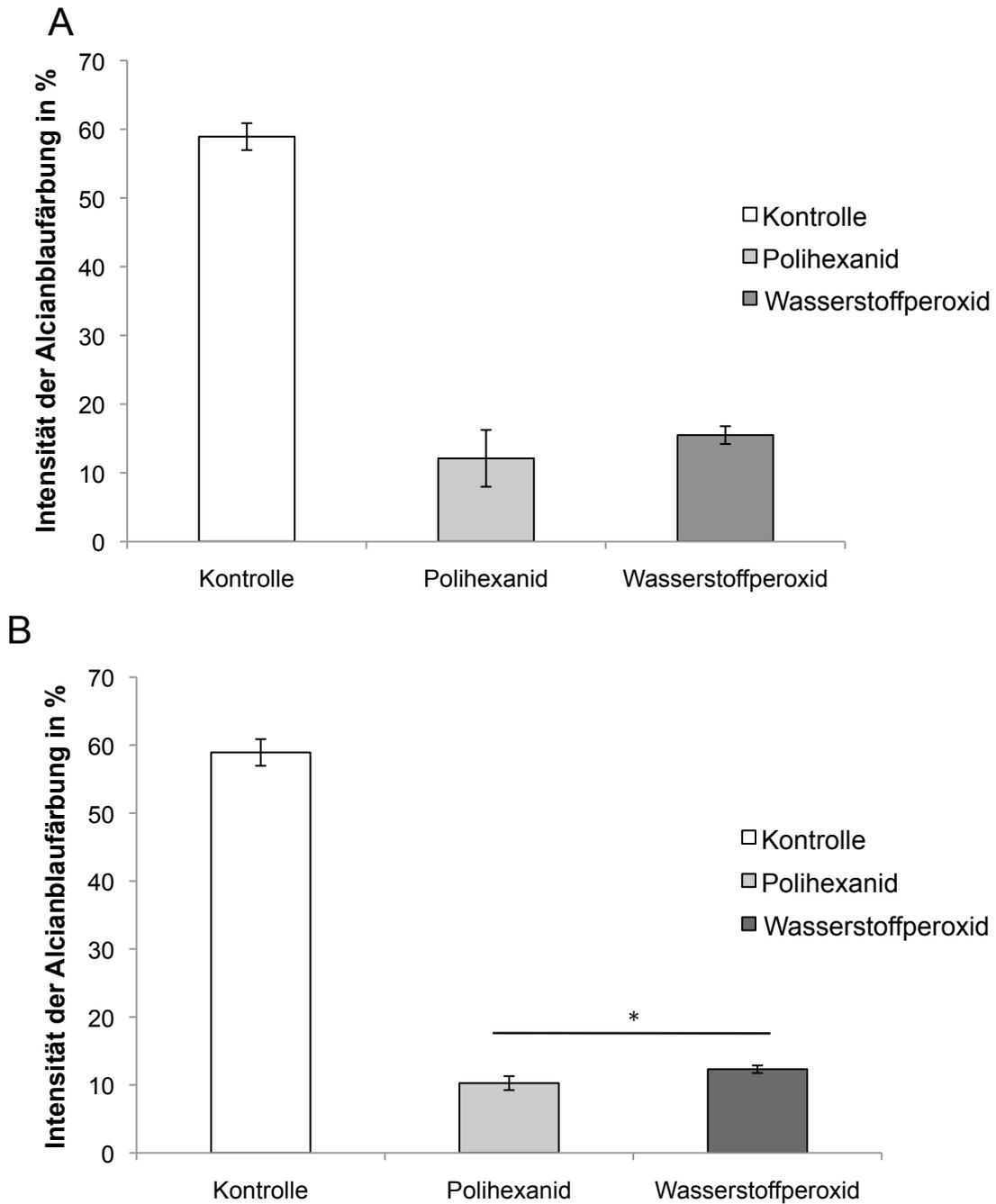


Abb. 11 Intensität der Alcianblaufärbung nach Inkubation mit Polihexanid und Wasserstoffperoxid. Die Färbungen wurden nach 10 (A) Minuten und nach 30 (B) Minuten mit der Kontrolle (Kontrolle) der PBS inkubierten Chondrozyten verglichen. N=4 Mean±SEM; Wilcoxon Test, *p<0,05.

Die digitalisierten Gesichtsfelder wurden nach Anzahl der Zellen pro Gesichtsfeld analysiert. Die Auswertung erfolgte mittels nonparametrischem Wilcoxon Test, ein $p < 0,05$ wurde als signifikant definiert. Abbildung 12 zeigt, dass hinsichtlich der Zellzahlen pro Gesichtsfeld keine signifikanten Unterschiede zwischen der Kontrolle, Polihexanid und Wasserstoffperoxid bestanden.

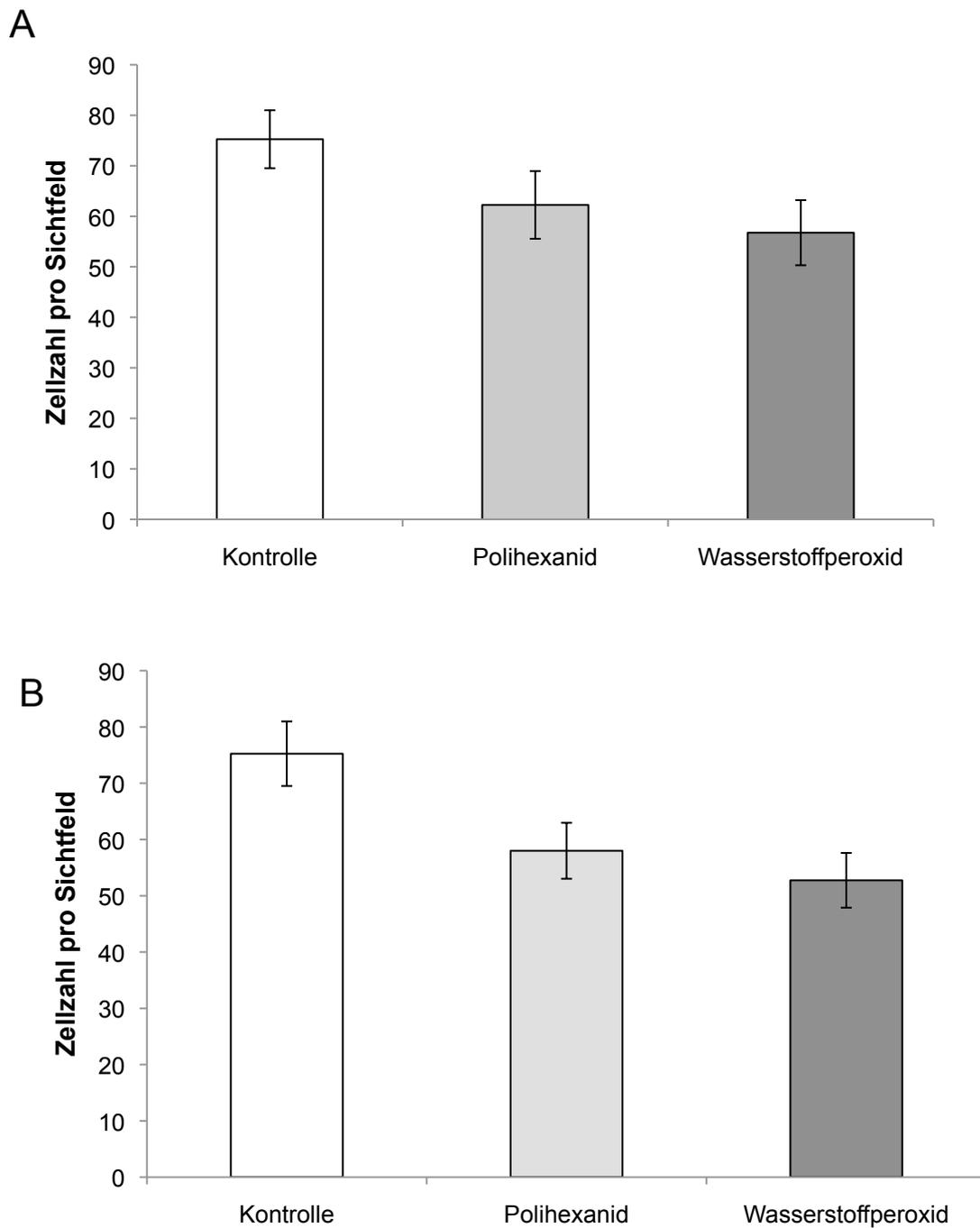


Abb. 12 Abgebildet sind Diagramme zur Zellzahl pro Gesichtsfeld nach 10 (A) und 30 (B) Minuten. Mit Polihexanid und Wasserstoffperoxid inkubierte Zellen wurden gegen die Positivkontrolle mit PBS mit dem Wilcoxon Test verglichen.

3.1.4 Ergebnisse zur Zellmorphologie

Die lichtmikroskopische Beurteilung der Zellmorphologie nach Inkubation mit den Antiseptika lässt Rückschlüsse auf die Art der Zellschädigung zu. Die Beobachtung von Zellschrumpfung und der Verlust von Zellkontakten sprechen eher für apoptotische Zellen. Die Zunahme des Zellvolumens gibt Hinweise auf das Vorliegen von Zelluntergang durch Nekrose.

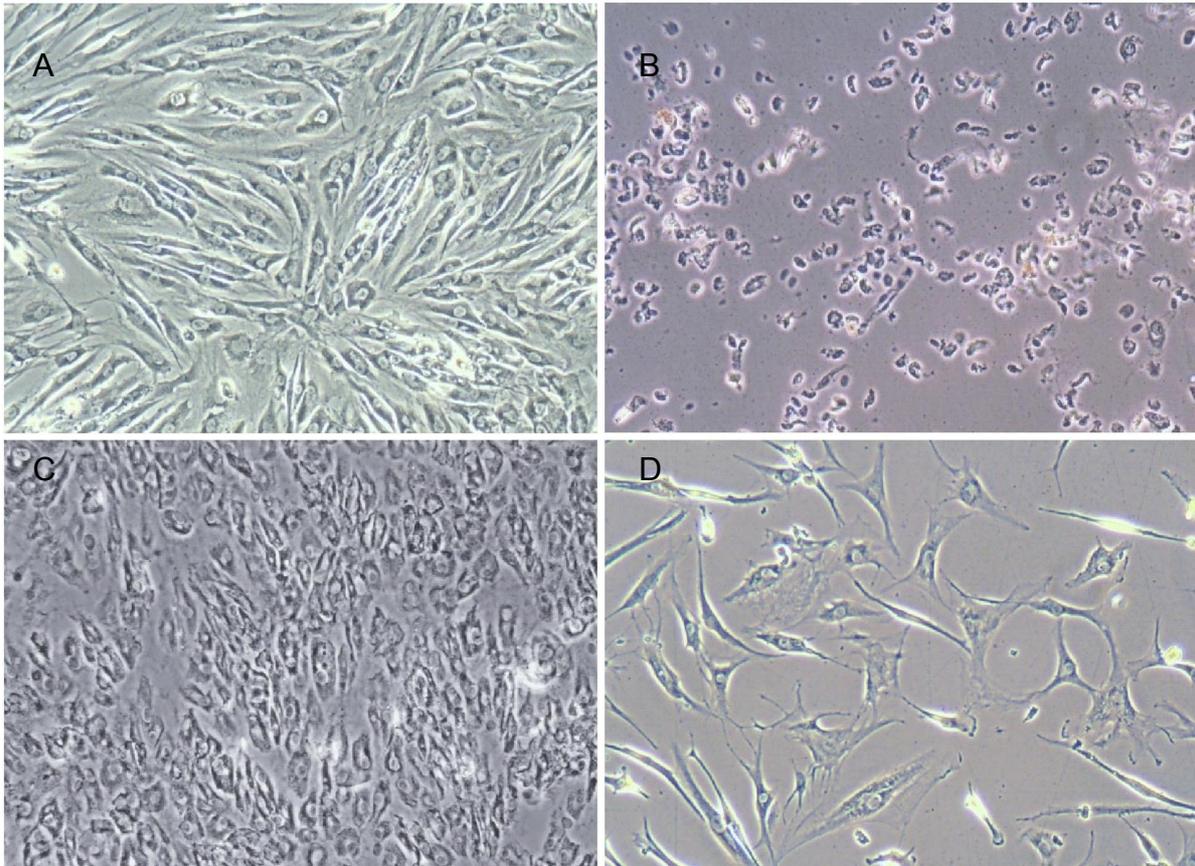


Abb. 13 Repräsentative Bildausschnitte der lichtmikroskopischen Analyse der Chondrozyten nach 30 Minuten. Die Zellen wurden mit Polihexanid und Wasserstoffperoxid inkubiert. A: PBS B: Triton X100 C: Wasserstoffperoxid D: Polihexanid

Die Chondrozyten wurden für 30 Minuten den Antiseptika ausgesetzt und die Ergebnisse anschließend lichtmikroskopisch interpretiert.

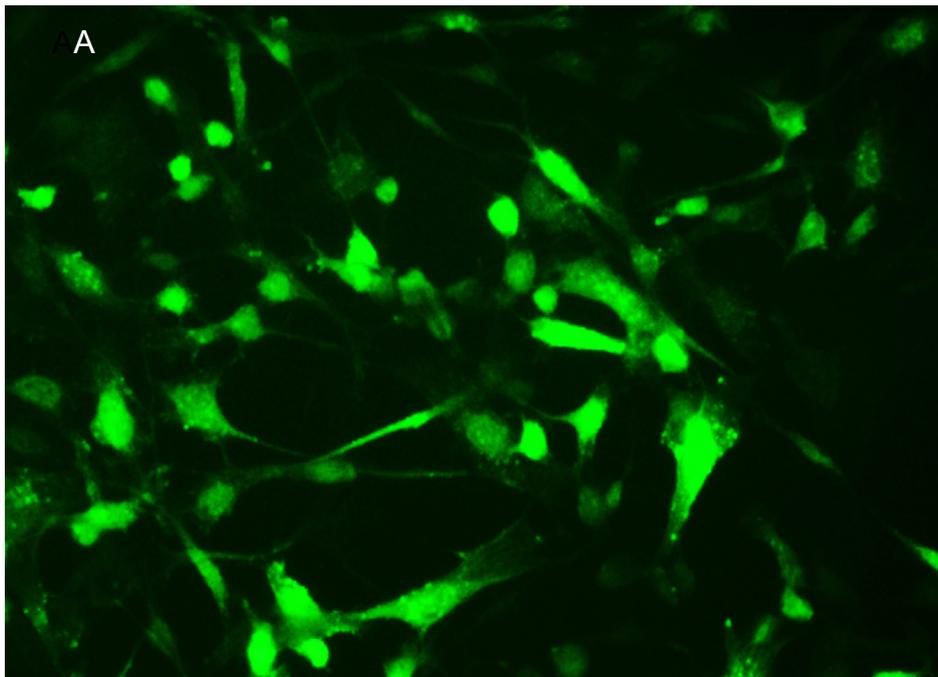
Erwartungsgemäß wiesen die Chondrozyten der Negativkontrolle (PBS) keine strukturellen oder morphologisch wahrnehmbaren Veränderungen auf. Die Zellen der Positivkontrolle mit dem Nekroseinduktor Triton X100 lagen nur noch als stark geschrumpfte Zellbestandteile vor. Die Analyse der mit Wasserstoffperoxid behandelten Zellen (C) zeigte verkleinerte runde Zellen, mit Verlust der Zellkontakte, am ehesten im Sinne des Apoptosevorgangs.

Knorpelzellen, die mit Polihexanid inkubiert wurden (D), erschienen aufgetrieben und ließen Strukturdefekte in der Zellmembran erkennen, was typische morphologische Merkmale der Nekrose wären.

3.2 Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie

3.2.1 Fluoresceindiacetat und Propidiumiodid

Die mit Polihexanid inkubierten Chondrozyten wurden mit Hilfe der Lebendfärbung FDA und PI gefärbt, um vitale von avitalen Zellen unterscheiden zu können. Zusätzlich wurden sie mit der Negativ- und Positivkontrolle fluoreszenzmikroskopisch verglichen. Die mit Polihexanid inkubierten Zellen zeigen, wie die Negativkontrolle mit PBS, lediglich eine Anfärbbarkeit mit FDA. Dies lässt auf eine intakte Zellmembran und Esteraseaktivität schließen. Avitale Zellen können durch FDA nicht angefärbt werden und werden durch die Färbung mit PI rot markiert, wie in der Positivkontrolle mit Triton X100 zu erkennen war. PI markierte Zellen waren in der Probe der mit Polihexanid inkubierten Chondrozyten nicht detektierbar, weshalb die Vermutung nahe liegt, dass hier keine Zellen im Nekrorestadium vorlagen.



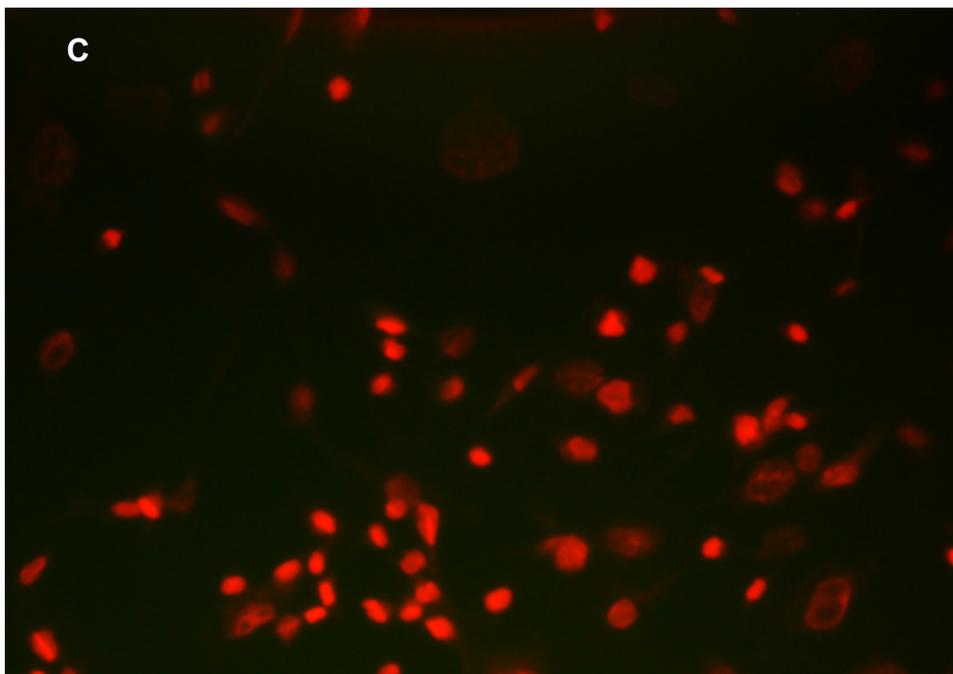
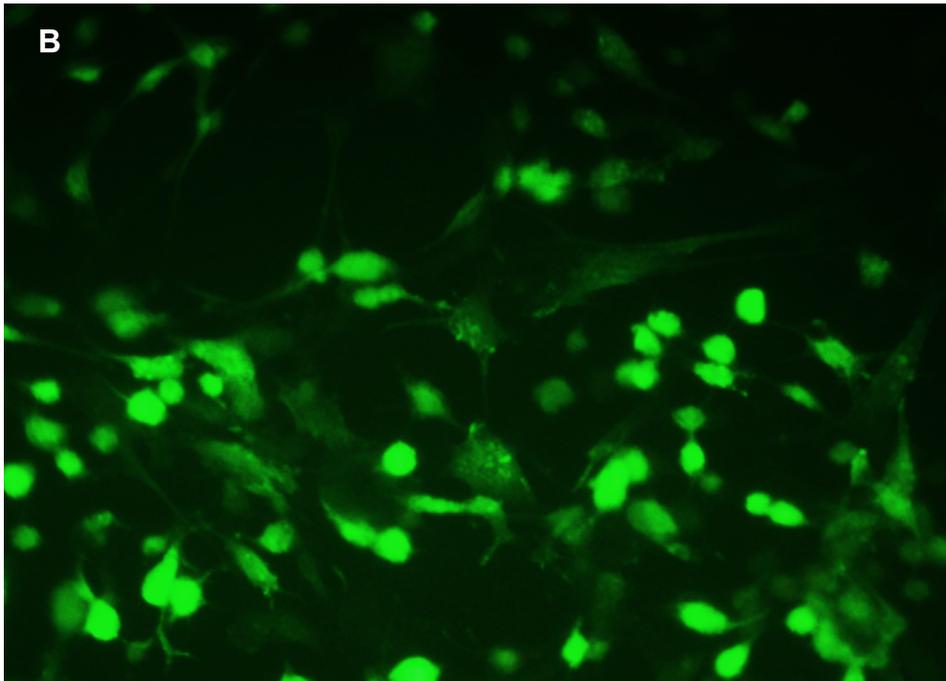


Abb. 14 Fluoreszenzoptische Färbung der Chondrozyten mit FDA (grün) und PI (rot). Die Zellen wurden mit PBS (Negativkontrolle), Polihexanid und Triton X100 (Positivkontrolle) inkubiert. A: PBS B:Polihexanid C:Triton X100

3.2.2 Annexin-V und Propidiumiodid

Um verschiedene Apoptosestadien der Chondrozyten mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops nachzuweisen, wurden die Zellen mit Polihexanid und Wasserstoffperoxid für den Zeitraum von 60 Minuten inkubiert und anschließend mit Annexin-V und Propidiumiodid gefärbt. Die fluoreszenzoptische Darstellung zeigt, dass die mit PBS inkubierte Negativkontrolle (A) Annexin-V negativ und PI negativ war. Hier kam es durch die intakte Zellmembran weder zu einer Bindung von Annexin-V an Phosphatidylserin, noch zur Interkalation von PI mit der DNA im Zellkern.

Die mit Polihexanid inkubierten Chondrozyten waren Annexin-V positiv und PI negativ. Die Chondrozyten sind homogen grün gefärbt, der rote Farbstoff des PI ist nicht detektierbar. Das bedeutet, dass das Annexin-V an das auf der Zelloberfläche exprimierte Phosphatidylserin gebunden hat, die Zellmembran aber nicht permeabel für Propidiumiodid war. Diese spezifische Anfärbbarkeit spricht für ein frühapoptotisches Stadium. Wasserstoffperoxid inkubierte Zellen emittierten Licht mit grüner und roter Wellenlänge, waren demnach also Annexin-V und PI positiv. Wie in Abbildung 15B (H_2O_2) zu sehen ist, sind die Zellen nicht so gleichmäßig gefärbt wie in Abb. 15C (Polihexanid). Es ist davon auszugehen, dass Annexin-V hier an das Phosphatidylserin der Innenfläche der Membran gebunden hat. Die roten Bereiche entsprechen der Interkalation von PI in die DNA, was nur möglich ist, wenn die Zellmembran bereits Defekte aufweist. Dieses Färbungsmuster, sprich Annexin-Färbung der Innenmembran und PI-Färbung der Zellkerne, ist typisch für spätapoptotische Zellen.

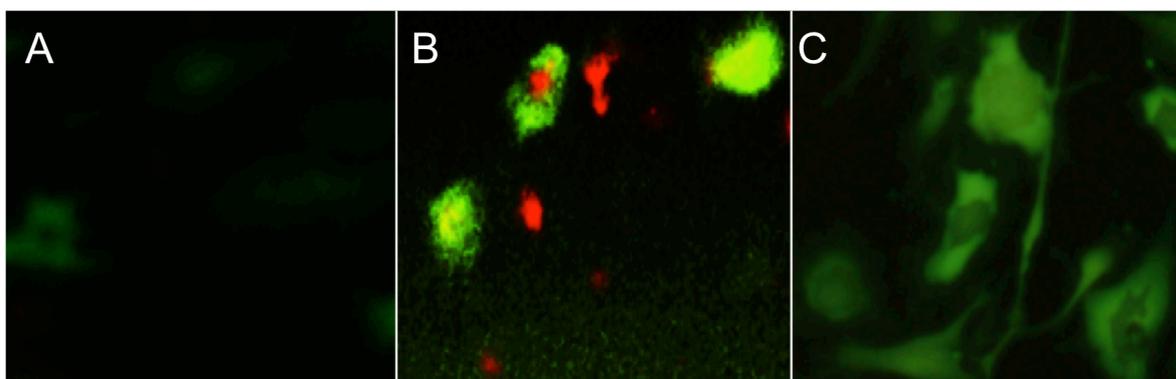


Abb. 15 Bildausschnitte der fluoreszenzmikroskopischen Färbung mit Annexin-V (grün) und PI (rot) nach 60 minütiger Inkubation mit den Antiseptika. A: Kontrolle mit PBS B: Wasserstoffperoxid C: Polihexanid

4.3. Ergebnisse der FACS Analyse

Die Chondrozyten wurden für 15, 30 und 60 Minuten mit 0,04 % Polihexanid und 3 % Wasserstoffperoxid behandelt, mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert, ein $p < 0,05$ galt als signifikant. Als Negativkontrolle der Apoptose dienten PBS inkubierte Chondrozyten. Eine Positivkontrolle stellt die Inkubation mit dem Apoptose einleitenden Staurosporin dar. Frühapoptotische Stadien wurden als Annexin-V positiv und 7-AAD negativ, spätapoptotische als Annexin-V positiv und 7AAD positiv definiert.

Für Polihexanid ergab sich daher eine signifikante Erhöhung der prozentualen frühapoptotischen Zellen im Vergleich zur Kontrolle mit PBS nach 15, 30 und 60 Minuten (7 ± 1 vs. 90 ± 6 ; 7 ± 1 vs. 91 ± 3 ; 7 ± 1 vs. 91 ± 2 ; $p < 0,001$). Ein signifikanter Nachweis von erhöhten spätapoptotischen Zellen nach 15, 30 und 60 Minuten konnte für Polihexanid nicht ermittelt werden (Abb.16B).

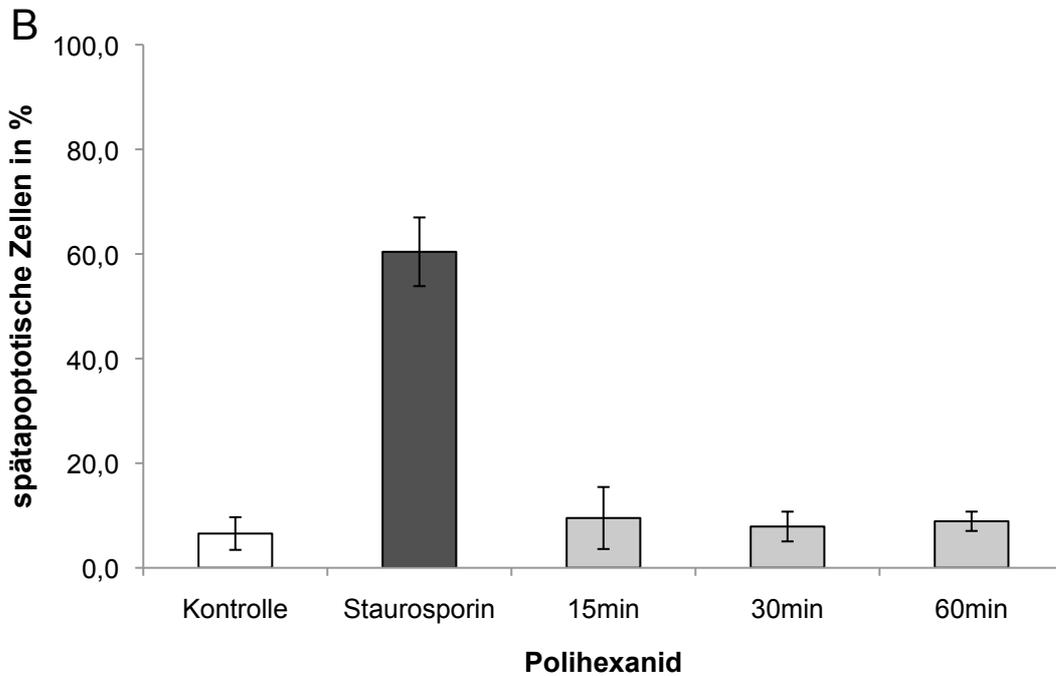
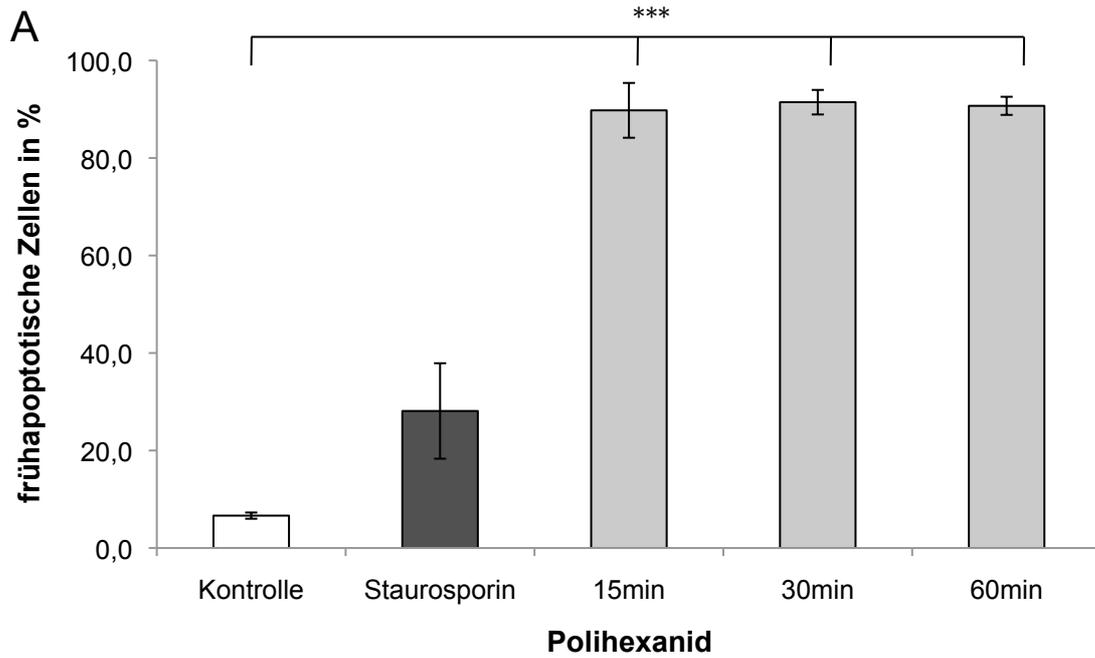
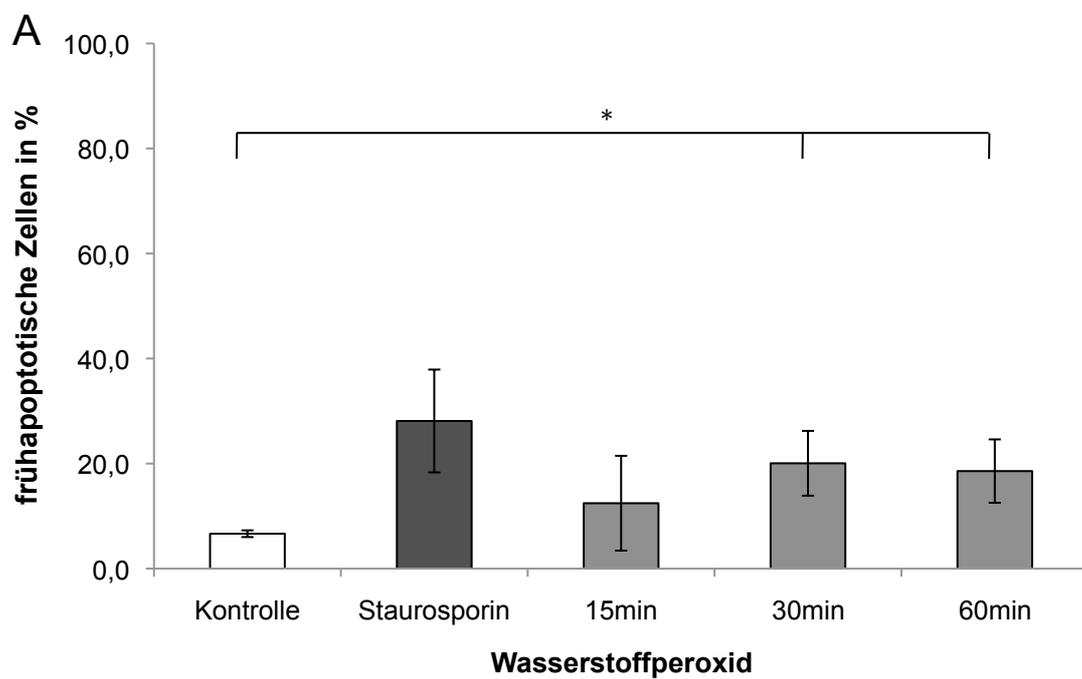


Abb. 16 Darstellung der prozentualen Erhöhung der frühapoptotischen Zellzahlen (A) und spätapoptotischen Zellzahlen (B) nach Inkubation mit Polihexanid für 15, 30 und 60 Minuten verglichen mit PBS (Kontrolle) und Staurosporin in der FACS-Analyse. Die Färbung erfolgte mit Annexin-V und 7-AAD. Frühapoptotische Zellen stellen sich Annexin-V+ und 7AAD- dar. Spätapoptotische Zellen färben sich Annexin V+ und 7-AAD+, n=3, mean±SEM; *p<0,05, ***p<0,0001.

Wasserstoffperoxid zeigte nach 15 Minuten keine signifikante Erhöhung der frühapoptotischen Zellen im Vergleich zur PBS-Kontrolle (7 ± 1 vs. 13 ± 9 , n.s.). Erst nach 30 Minuten ergab sich eine Erhöhung der Zellen im frühapoptotischen Stadium, die auch nach 60 Minuten nachzuweisen war (7 ± 1 vs. 20 ± 6 ; 7 ± 1 vs. 19 ± 6 ; $p < 0,05$).

Der Nachweis von spätapoptotischen Zellen war nach 30 und 60 Minuten signifikant erhöht (7 ± 1 vs. 72 ± 7 ; 7 ± 1 vs. 68 ± 13 ; $p < 0,05$).



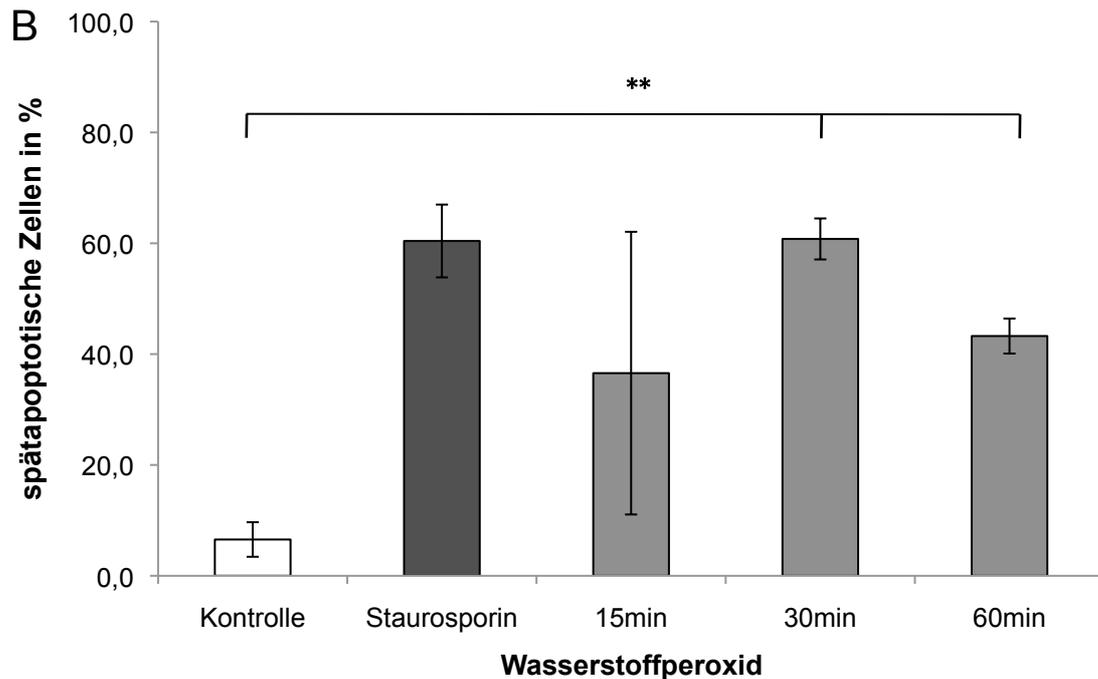


Abb. 17 Darstellung der prozentualen Erhöhung der frühapoptotischen Zellzahlen (A) und spätapoptotischen Zellzahlen (B) nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid für 15, 30 und 60 Minuten verglichen mit PBS (Kontrolle) und Staurosporin in der FACS-Analyse. Die Färbung erfolgte mit Annexin- V und 7AAD. Frühapoptotische Zellen stellen sich Annexin V+ und 7AAD- dar. Spätapoptotische Zellen färbten sich Annexin V+ und 7AAD+, n=3, mean±SEM; *p<0,05; **p<0,001.

Um die bisherigen Ergebnisse zur Apoptose zu bestätigen, wollten wir zusätzlich die Expression von aktiven Caspasen mittels FACS untersuchen. Die Aktivierung von Caspasen ist ein essentieller Vorgang während der Apoptose. Um auch hier eine Differenzierung zwischen früher und später Apoptose vornehmen zu können, wurden die Zellen ebenfalls mit 7-AAD gefärbt. Ein frühapoptotisches Stadium wurde als Caspase+ und 7-AAD- definiert, spätapoptotische Zellen sollten Caspase+ und 7-AAD+ sein.

Auch dieser Versuch zeigte die signifikante Erhöhung der frühapoptotischen Zellen für Polihexanid nach 15, 30 und 60 Minuten. Die Zahl der spätapoptotischen Zellen war zu keinem Messpunkt erhöht.

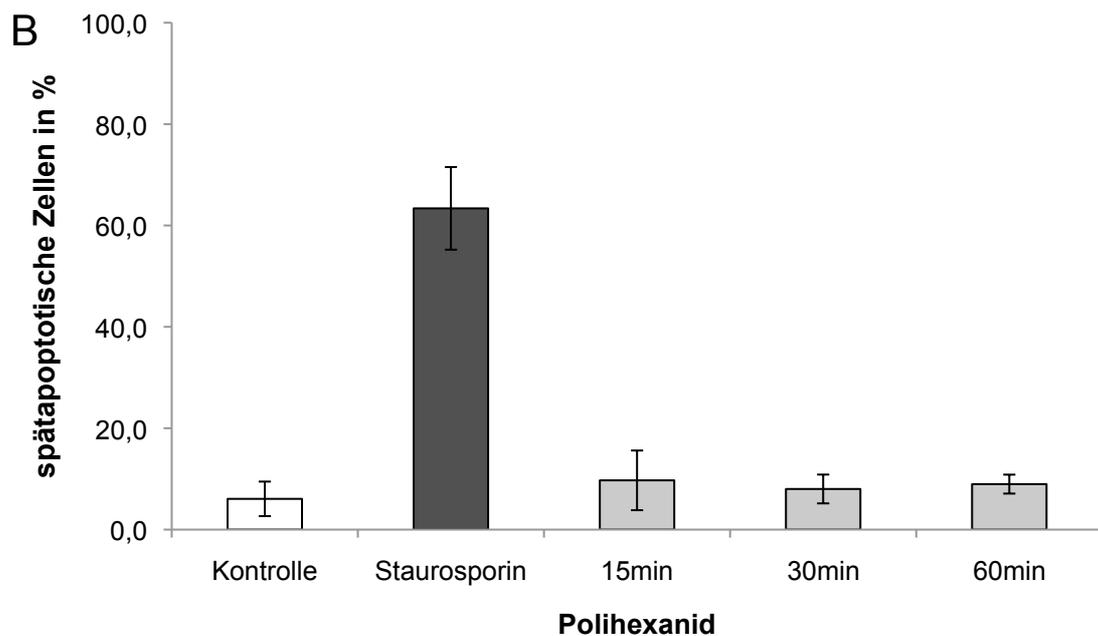
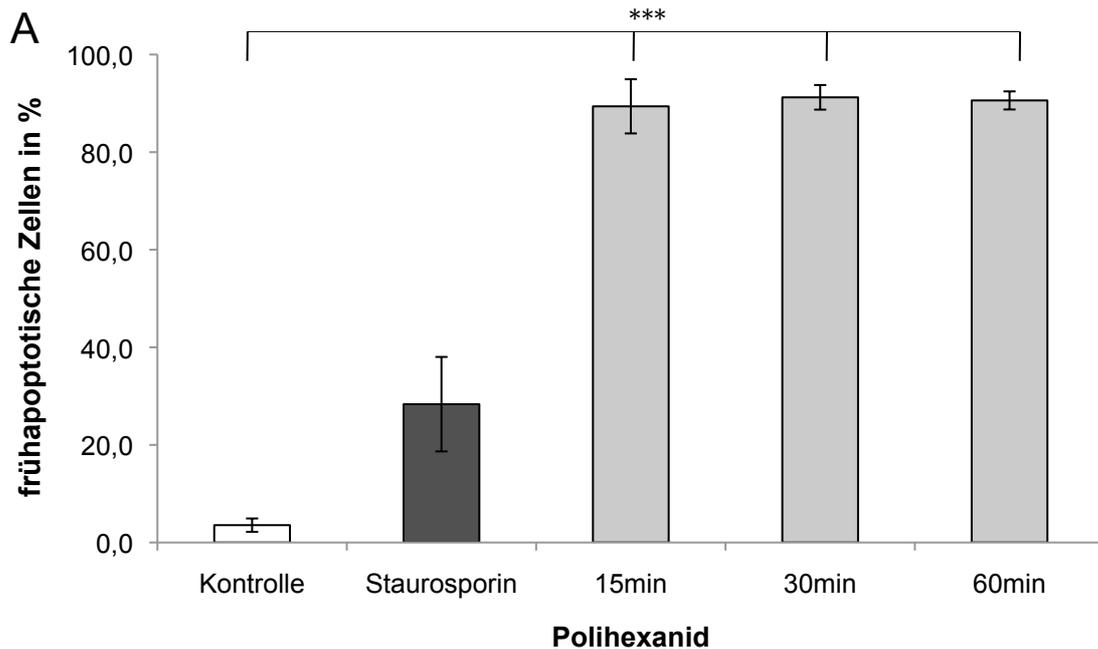


Abb. 15 Darstellung der prozentualen Erhöhung der frühapoptotischen Zellzahlen (A) und spätapoptotischen Zellzahlen (B) nach Inkubation mit Polihexanid für 15, 30 und 60 Minuten verglichen mit PBS (Kontrolle) und Staurosporin in der FACS-Analyse. Die Färbung erfolgte mit aktivierten Caspasen und 7-AAD. Frühapoptotische Zellen stellen sich Caspase+ und 7-AAD- dar. Spätapoptotische Zellen färben sich Caspase+ und 7-AAD+, n=3, mean±SEM, *p<0,05; ***p<0,0001.

Die vorherigen Ergebnisse zu Wasserstoffperoxid bestätigten sich hier ebenfalls. Im frühapoptotischen Stadium war keine signifikante Erhöhung aktiver Caspasen zu verzeichnen. Signifikant erhöhte Werte ergaben sich lediglich für die

spätapoptotischen Zellen. Auch hier war der Anstieg bereits nach 15 Minuten signifikant.

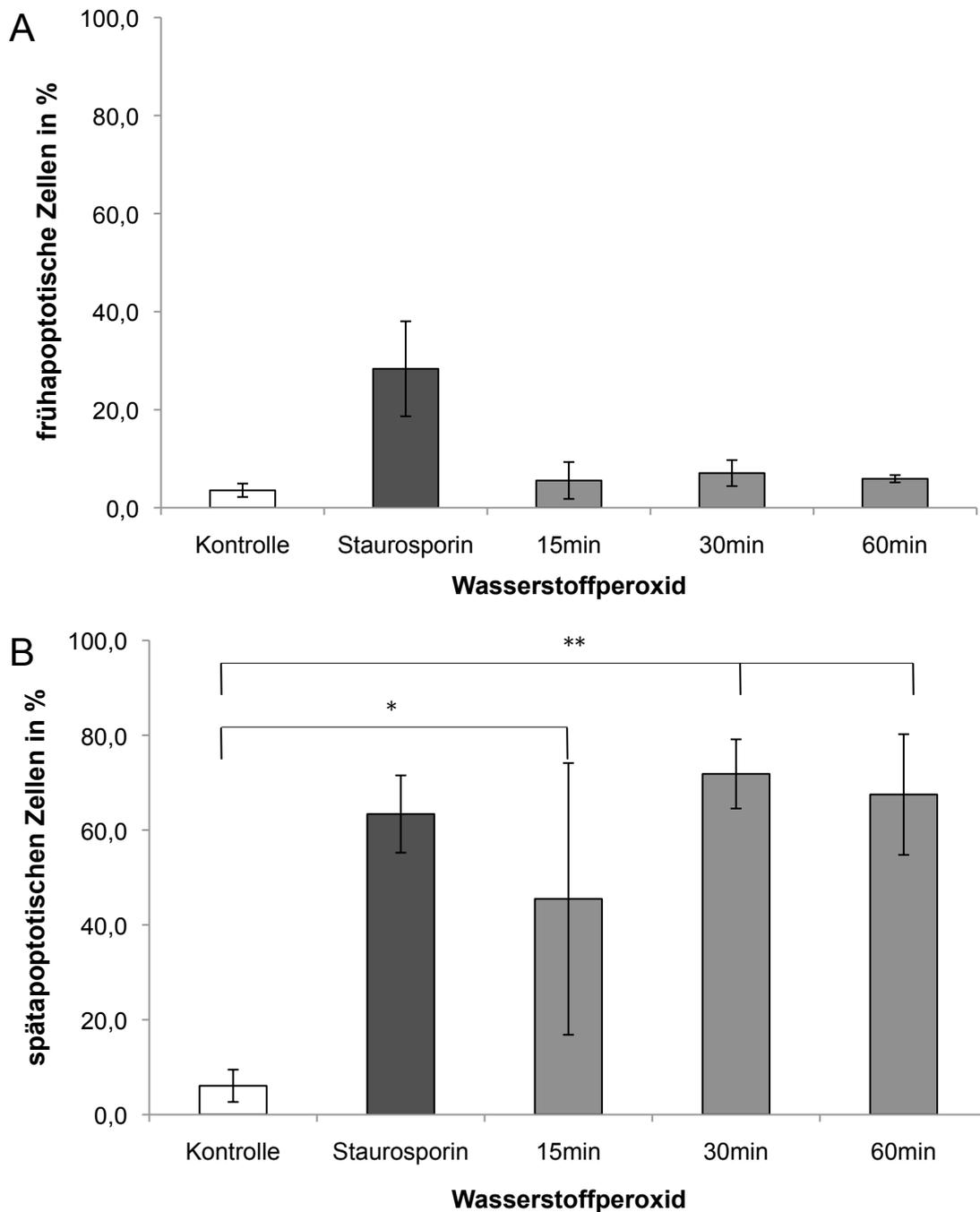


Abb. 16 Darstellung der prozentualen Erhöhung der frühapoptotischen Zellzahlen (A) und spätapoptotischen Zellzahlen (B) nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid für 15, 30 und 60 Minuten verglichen mit PBS (control) und Staurosporin in der FACS-Analyse. Die Färbung erfolgte mit aktivierten Caspasen und 7-AAD. Frühapoptotische Zellen stellen sich Caspase+ und 7-AAD- dar. Spätapoptotische Zellen färbten sich Caspase+ und 7-AAD+, n=3,mean±SEM;*p<0,05;**p<0,001.

4 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit sollte das Ausmaß der Zellschädigung durch die beiden Antiseptika Polihexanid und Wasserstoffperoxid mit verschiedenen Konzentrationen und Einwirkzeiten auf humane Chondrozyten in vitro untersucht werden.

Weiterführend sollte festgestellt werden, welche Art des Zelluntergangs auf zellularer Ebene stattfindet (Apoptose vs. Nekrose), um herauszufinden, welche möglichen Folgen der intraartikuläre Einsatz von Antiseptika auf die Gelenkknorpelhomöostase haben könnte.

Da eine generelle Schädigung von Knorpelgewebe durch den Gebrauch von Antiseptika möglich ist, sollte in dieser Arbeit das zytotoxische Potential von Polihexanid im Vergleich zu Wasserstoffperoxid bewertet werden. Im Folgenden wurden die Chondrozyten nach Beimpfung mit den Antiseptika aufgrund ihrer morphologischen Eigenschaften, der Zellmembranintegrität, der Synthesefähigkeit von Matrixkomponenten und der vitalen Zellzahlen evaluiert. Zum Nachweis von apoptotischen oder nekrotischen Vorgängen wurden fluoreszenz- und durchflusszytometrische Untersuchungen durchgeführt.

Die Annahme, dass beide Antiseptika zellschädigende Auswirkungen auf die humanen Chondrozyten haben, konnte bestätigt werden.

In Zusammenschau aller Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass Wasserstoffperoxid ein höheres zytotoxisches Potential als Polihexanid aufweist. Hinsichtlich der Art des Zelluntergangs zeigten die Versuche, dass Wasserstoffperoxid Nekrose induziert wohingegen Polihexanid Apoptose initiiert.

4.1 Diskussion der Versuchsbedingungen

Für die Versuche sollten die Antiseptikallösungen in klinisch relevanten Konzentrationen vorliegen. Um jedoch eine möglichst geringe toxische Wirkung der Antiseptika auf die Chondrozyten zu erreichen, wurden die handelsüblichen Konzentrationen, die zur Wundantiseptik verwendet werden, variiert. Denn vorausgegangene Studien haben festgestellt, dass es nach Inkubation mit 1 % konzentrierter Polihexanidlösung bei vielen Zellpopulationen bereits zu einer signifikanten Vitalitätsminderung kommt (75). Dabei scheint die Toxizität von der Zellart abhängig zu sein, denn diese Konzentration

von Polihexanid hatte deutlich stärkere Einflüsse auf die Vitalität von humanen Fibroblasten und Keratinozyten der Zelllinie HaCaT als auf primäre humane Keratinozyten (75). Um also möglichst authentische und vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, wurden in dieser Studie anstelle von Zelllinien primäre humane Chondrozyten verwendet.

Weiterhin stellte sich die Frage, ob mit der Verringerung der Konzentrationen auch eine ausreichende bakterizide Wirkung der Antiseptika nachgewiesen werden kann. Dabei haben sich unsere gewählten Konzentrationen von 10 und 100 % (0,004 und 0,04 % für Polihexanid und 0,3 und 3 % für Wasserstoffperoxid) als geeignet herausgestellt. Studien an Bindegewebszellen haben für diese Konzentrationen eine noch ausreichende Wirkung gegenüber den häufigsten Infekterregern nachgewiesen, wobei die Gewebetoxizität gering blieb (73, 75, 94, 95).

Die Einwirkzeiten von 5 bis 30 Minuten entsprechen der Dauer, für die eine Inkubation mit Antiseptika in der septischen Gelenkchirurgie als realistisch erscheint. Für diese relativ kurzen Einwirkzeiten finden sich in der Literatur kaum Vergleichsmodelle. Da die Erforschung der zytotoxischen Effekte von Wasserstoffperoxid häufig mit der endogenen Entstehung von radikalen Sauerstoffspezies bei Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis im Vordergrund stehen, wurden für die in der Vergangenheit durchgeführten Studien wesentlich längere Expositionszeiten gewählt (96). Auch für Polihexanid als primäres Wundantiseptikum zur äußeren Anwendung finden sich in der Literatur Expositionszeiten, die in der Gelenkchirurgie nicht realisiert werden (97). Trotzdem erreicht Polihexanid auch bei kurzer Einwirkzeit eine zuverlässige Reduktion der Keimzahl. Müller und Kramer (2008) haben bei Verdünnungen auf bis zu 0,005 % bei 30minütiger Expositionszeit eine Keimreduktion von $3\log_{10}$ nachweisen können (79). Weitere Unterschiede im Versuchsaufbau finden sich in der Auswahl der Zellen. Nur wenige Studien beschäftigten sich explizit mit der zytotoxischen Auswirkung der oben genannten Antiseptika auf humane Chondrozyten.

Für den Nachweis der Proteoglykansynthese war es wichtig, den chondrogenen Metabolismus der Zellen aufrecht zu erhalten. Aus der Matrix isolierte Chondrozyten in zweidimensionalen Monolayer-Kulturen verlieren bereits ab der zweiten Passage ihre spezifischen Eigenschaften und dedifferenzieren zu Fibroblasten ähnlichen Zellen. Da diese die Proteoglykansynthese stark einschränken, wurden für den Versuch dreidimensionale Alginatkulturen verwendet. In diesen Kulturen können auch vorher differenzierte Chondrozyten redifferenzieren und die Synthese der knorpelspezifischen

Matrixbestandteile wieder aufnehmen (98). Sie bleiben über Wochen und Monate phänotypisch stabil und synthetisieren über einen langen Zeitraum ebenfalls knorpeltypische Extrazellulärmatrix (89). Damit war es uns möglich, das zytotoxische Potential der Antiseptika insgesamt auf Knorpel ähnliches Gewebe zu untersuchen.

In den übrigen Versuchen wurden jedoch aus der Knorpelmatrix gelöste Chondrozyten verwendet, da Auswirkungen der Antiseptika auf die Zellmorphologie oder das Austreten von Intrazellulärsubstanzen an isolierten Chondrozyten einfacher nachzuweisen waren. Um auch hier der Dedifferenzierung vorzubeugen, wurden die Kulturen mit einer Mindestanzahl von 10^6 Zellen angelegt, da es bei höherer Zelldichte zu Interaktionen der Chondrozyten untereinander kommt welche der Dedifferenzierung entgegenwirken. Selbst zuvor dedifferenzierte Knorpelzellen nehmen bei Zell-Zell-Kontakten ihre knorpelspezifische metabolische Aktivität wieder auf (99, 100).

4.2 Limitationen der Studie

Das entnommene Gewebe stammte von Patienten, die aufgrund einer Gelenkarthrose einen totalen Gelenkersatz erhalten haben. In der Literatur gibt es unterschiedliche Angaben über die Qualität von Knorpelzellen aus arthrotischen Gelenken. Einerseits wird die Theorie vertreten, dass die defekte Knorpelmasse schon in vivo eine höhere Anzahl von apoptotischen Zellen enthält. Die Anzahl der ohnehin schon nur spärlich vorhandenen Chondrozyten verringert sich dadurch weiter (101-103). Andere Autoren sehen das Problem der Arthrose in der geringeren Proliferationsneigung der Chondrozyten von Extrazellulärmatrixbestandteilen wie Proteoglykanen (104). Das Resultat beider Vorgänge ist die Entstehung von qualitativ minderwertiger Knorpelmasse (105).

Um für die Versuche eine möglichst geringe Anzahl apoptotischer oder mangelhafter Knorpelzellen zu erhalten, wurde von dem vorhandenen Material lediglich das Gewebe aus dem gesunden Kompartiment verwendet. Das makroskopisch intakte Gewebe sollte keine Höhenminderung, Erweichung, Aufrauungen oder Verkalkungen aufweisen und befand sich nicht in den Hauptbelastungszonen der Gelenkfläche.

Zum Nachweis der Proteoglykansynthese mit der Alcianblaumethode erfolgte eine Auswertung der Ergebnisse durch lichtmikroskopische Analyse. Daher konnte hier lediglich eine semiquantitative Bestimmung erfolgen.

Die Versuchsbedingungen erfolgten nicht an Knorpelgewebe *in vivo*, wo die vorhandene Knorpelmatrix gleichzeitig eine Barrierefunktion übernehmen kann, sondern an Monolayerkulturen bzw. Alginatbeads *in vitro*. Die Chondrozyten der zweidimensionalen Kulturen kamen direkt mit den Antiseptika in Kontakt. Die Ergebnisse könnten demnach größere zytotoxische Ausmaße zeigen, als sie *in vivo* ablaufen. Für die dreidimensionalen Kulturen ergaben sich weniger starke Einschränkungen in der Zellvitälität, was auf das Vorhandensein einer Matrix-ähnlichen Umgebung der Chondrozyten in den Alginatbeads zurück zu führen sein wird. Somit lassen die Gegebenheiten *in vitro* lediglich Rückschlüsse auf die *in vivo* Situation zu.

4.3 Toxizität der Antiseptika

Hinsichtlich der Zytotoxizität konnte mit Hilfe der durchgeführten Vitalitätsmessungen gezeigt werden, dass Polihexanid einen zytotoxischen Effekt auf humane Chondrozyten hat und diese Wirkung außerdem von der Kontaktzeit abhängig ist und durch anschließendes ausgiebiges Spülen der Zellen mit Natriumchloridlösung verringert werden kann.

Es sanken sowohl die totale Zellanzahl als auch die Anzahl der lebenden Chondrozyten nach der Beimpfung mit Polihexanid. Bei genauerer Betrachtung zeigte sich der größte Zellverlust um rund 40 % nach bereits fünf Minuten. Bei höheren Konzentrationen kam es zu einer weiteren signifikanten Abnahme der lebenden Zellen. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommen auch Ince et al., die in ihrer Studie osteoblastäre und endotheliale Zellen verwendeten. Die dort angegebene Konzentration von 0,01 % Polihexanid zeigte eine signifikante Erniedrigung der Zellviabilität und Veränderungen der Zellmorphologie. Die Zellen wurden als sphärisch beschrieben und verloren nach längerer Kontaktzeit ihr typisches Aussehen. Mit insgesamt sechs Stunden war die Einwirkzeit jedoch im Vergleich zu der vorliegenden Studie deutlich verlängert (97).

Eine andere Studie von Schaumburger et al. lässt sich aufgrund ähnlicher Methoden gut mit unseren Ergebnissen vergleichen. Geprüft wurde hier die Wirkung von Povidon-Jod, Polihexanid und Wasserstoffperoxid auf humane Chondrozyten, wobei die Einwirkzeit für die Antiseptika in Verdünnungen von 1 bis 100 % der handelsüblichen Antiseptikalösung ebenfalls fünf Minuten betrug (106). Auch diese Studie konnte eine Reduktion der Vitälität der Chondrozyten durch Polihexanid nachweisen, wobei

signifikante Werte lediglich bei höheren Konzentrationen (10 %ige Lösung) als in der vorliegenden Studie auftraten.

In ihrer Studie hat die Applikation von 1 %iger Wasserstoffperoxidlösung zu einer Verminderung der Chondrozytenvitälität auf unter 25 % geführt und die DNA-Synthese auf 20 % der Kontrollgruppe reduziert. Damit haben Schaumburger et al. in vergleichbaren Konzentrationen größere zytotoxische Effekte von H₂O₂ auf die Knorpelzellen festgestellt. Bezogen auf die Auswirkungen bezüglich der totalen Zellanzahl vitaler Chondrozyten konnten in dieser Studie keine signifikanten Unterschiede der beiden Antiseptika im Vergleich nachgewiesen werden.

Bereits nach fünf minütiger Einwirkzeit zeigte sich in dieser Arbeit eine signifikante Erhöhung der LDH-Aktivität, was für die Zerstörung von Zellmembranen und den Austritt von Intrazellulärbestandteilen spricht. Dabei ergab sich der größte resultierende Zellschaden nach der längsten Einwirkzeit von 30 Minuten mit der unverdünnten Polihexanidlösung.

Überraschenderweise konnten ähnliche Werte für Wasserstoffperoxid in unseren Versuchen zur LDH-Synthese nicht ermittelt werden. Weder die 10 %ige noch die 100 %ige Konzentrationslösung ergab eine Erhöhung der LDH-Aktivität im Überstand. Auch nach der maximalen Inkubationszeit von 30 Minuten konnten keine signifikant höheren Werte als die der Kontrolle festgestellt werden, im Gegenteil. Der Nachweis der LDH-Aktivität lag sogar unter dem der Kontrolle. Auch Bates und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie mit bovinen Knorpelzellen, die für 120 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen von Wasserstoffperoxid in Kontakt kamen, keine Beeinträchtigung der Chondrozyten im Sinne einer LDH-Freisetzung feststellen (96).

Dass trotzdem eine Zellschädigung stattgefunden hat, lassen unsere weiteren Versuche und die Angaben in der Literatur vermuten, denn sowohl die Gesamtzellzahl als auch die Anzahl der vitalen Chondrozyten waren nach der Inkubation mit 100 % Wasserstoffperoxid signifikant verringert. Dies würde auch mit den Ergebnissen von Thomas et al. übereinstimmen, die eine dosis abhängige Beeinträchtigung auf die Migration und Proliferation von Wasserstoffperoxid auf Fibroblasten heraus fanden (107).

Die kontroversen Ergebnisse in Bezug auf die Freisetzung der LDH könnten bedeuten, dass das Agens zwar die Zelle schädigt, die Zellmembran jedoch zunächst intakt bleibt und ein Austritt von Intrazellulärbestandteilen nicht oder nur in geringem Maße

stattfindet, bzw. nicht in der vorgegebenen Zeit. Dafür sprechen auch die lichtmikroskopischen Betrachtungen, in denen sich die Zellen deutlich geschrumpft präsentieren.

Möglich wäre auch gewesen, dass H_2O_2 die Bildung des Formazansalzes, dessen Farbumschlag gemessen wird, inhibiert, indem es die Übertragung der Wasserstoffatome auf das Jodtetrazolchlorid verhindert. Das enzymatisch entstandene NADH/H könnte daher durch H_2O_2 oxidiert werden, indem Wasserstoffperoxid mit den Wasserstoffatomen zu Wasser reagiert. Es würde also trotz freigesetzter LDH kein Farbumschlag zustande kommen und der Nachweis der LDH-Reaktion würde entfallen. Dies konnten wir jedoch in einem Nebenversuch ausschließen, weshalb von der ersten Theorie ausgegangen werden muss, nämlich dass in den vorgegebenen Konzentrationen und Einwirkzeiten keine Schädigung der Zellen durch Wasserstoffperoxid im Sinne eines Plasmaaustrittes kommt.

Um die Syntheseleistung der Chondrozyten nach Inkubation mit den Antiseptika festzustellen, wurde die Proteoglykansynthese mit Hilfe der Alcianblaufärbung nachgewiesen. Im Vergleich zu den Kontrollschnitten wurde die Synthese der Proteoglykane bei beiden Antiseptika signifikant eingeschränkt.

Intaktes Knorpelgewebe unterliegt normalerweise einer strengen Regulation von Neusynthese und Abbau von Knorpelmatrixbestandteilen. Der Verlust oder die verminderte Produktion der hochmolekularen Proteoglykane durch die Einwirkung von Antiseptika ist insofern problematisch, als dass eine minderwertige Matrix entsteht, die den allgemeinen biomechanischen Anforderungen im Gelenk nicht mehr standhalten kann. In diesem Zusammenhang kann das entstandene Ungleichgewicht der Knorpelhomöostase zur Entstehung von Gelenkarthrose beitragen (108-110).

Unsere Ergebnisse zur Proteoglykansynthese ließen sich mit einigen vorausgegangen Versuchen in der Literatur vergleichen und bestätigen (96, 111, 112). So haben beispielsweise Asada et al. in ihrem Versuch mit Kälberknorpelzellen ebenfalls eine Einschränkung der Glykosaminoglykansynthese durch Wasserstoffperoxid feststellen können. Die Kontaktzeit mit Wasserstoffperoxid betrug in diesem Versuch vier Stunden. Die verwendeten Konzentrationen variierten von 1 bis 1000 μM (112). Die Messung der Proteoglykansynthese wurde mit Hilfe des Einbaus von $[^{35} S]$ Sulfat in den Glykosaminoglykaneinbau vorgenommen. Hier zeigte sich eine dosis abhängige Abnahme der Proteoglykansynthese. Baker et al. gaben an, dass der Mechanismus der

Beeinflussung der PG-Synthese während oder bei der Synthese des Kernproteins stattfinden muss (113). Panasyuk und Mitarbeiter fanden hierzu heraus, dass reaktive Wasserstoffspezies, also vor allem H_2O_2 , den Einbau von Sulfaten und Glukosaminen in die Proteoglykane verhindern (114).

Auch für Polihexanid konnte die Beeinträchtigung der Proteoglykansynthese an Hand der Alcianblaufärbung in den vorliegenden Versuchen nachgewiesen werden.

Müller und Kramer (2005) konnten in ihrem Tiermodell mit Rinderknorpelzellen ebenfalls eine Minderung der Proteoglykansynthese durch Polihexanid feststellen (95). Aufgrund der geringeren Intensität der Alcianblaufärbung ist davon auszugehen, dass die Proteoglykansynthese durch Polihexanid stärker inhibiert wird als durch Wasserstoffperoxid.

Als Erklärungsansatz für die vergleichsweise größere Beeinflussung der Proteoglykansynthese durch Polihexanid nennen Müller und Kramer die in einer vorangegangenen Studie untersuchte Interaktion von polykationisch aktiven Antiseptika mit den knorpelspezifischen Proteoglykanen. Denn das kationisch geladene Biguanid Polihexanid bindet vor allem an anionisch geladene Molekülbestandteile. Besonders groß ist die Anziehungskraft zu den sauren Phospholipiden der Bakterienzellmembranen. Daher kommt es kaum zu Interaktionen mit neutralen Phospholipiden humaner Zelloberflächen. Die in der Knorpelmatrix befindlichen anionischen Sulfatgruppen der Proteoglykane gehen aber ebenfalls eine Wechselwirkung mit Polihexanid ein, was wiederum Auswirkungen auf die Proteoglykansynthese hat (115). Die Abwesenheit von Bakterienbestandteilen im Versuchsaufbau könnte zu der starken Interaktion von Polihexanid mit der Knorpelmatrix geführt haben.

In den vorausgegangenen Untersuchungen der Monolayerkulturen zeigten die Antiseptika signifikante Einschränkungen auf die Zellvitalität und die Zellanzahl. Die Analyse der Zellzahlen der dreidimensionalen Kulturen konnte jedoch keine signifikante Abnahme der Zellen nach Inkubation mit Wasserstoffperoxid oder Polihexanid nachweisen. Auch dies mag auf die Barrierewirkung der in dreidimensionalen Kulturen erhaltenen Knorpelmatrix zurück zu führen sein.

4.4 Differenzierung zwischen Apoptose und Nekrose

Es konnte in den vorliegenden Versuchen fluoreszenzoptisch und immunhistochemisch nachgewiesen werden, dass Polihexanid nach dem Kontakt mit humanen Chondrozyten apoptotische Vorgänge in den Zellen induziert. Nach bereits 15 Minuten Expositionszeit zeigte sich eine signifikant erhöhte Anfärbbarkeit mit den frühapoptotischen Markern Annexin- V und die Bindung des Caspaseinhibitors z-VAD-FMK an aktivierte Caspasen. Die mit Wasserstoffperoxid inkubierten Chondrozyten zeigten hingegen, dass es sich bei der Art der Schädigung um spätapoptotische bzw. nekrotische Zellabläufe handeln muss.

Eine Unterscheidung dieser beiden Formen des Zelltodes ist wichtig, da sie verschiedene Konsequenzen für den Zellverband nach sich ziehen.

Frühapoptotische Zellen behalten ihre Zellmembranintegrität und signalisieren durch Liganden an der Zelloberfläche nach außen ein Phagozytosesignal. Wichtig ist hierbei, dass durch die immer noch intakte Zellmembran potenziell schädliche Intrazellulärbestandteile nicht nach extrazellulär gelangen und eine eventuelle Entzündungsreaktion verhindert werden kann (90). Einer dieser Liganden, der die Zelle nach außen als phagozytosebereit kennzeichnet, ist u.a. das Membranprotein Phosphatidylserin (116-118). Es wird bei frühapoptotischen Zellen von der inneren Zellmembran in die äußere Schicht transloziert (119). Die Expression von Phosphatidylserin konnten wir mit Hilfe der Annexin-V-Färbung auf der Oberfläche der mit Polihexanid inkubierten Chondrozyten nachweisen. Spätapoptotische und nekrotische Zellen können ebenfalls mit Annexin-V angefärbt werden (120). Daher muss mit einem weiteren Farbstoff bewiesen werden, dass die Zellmembran der frühapoptotischen Zellen intakt ist. Zu diesem Zweck verwendeten wir Zusatzfärbungen mit Propidiumiodid und 7-AAD.

Wird die beschädigte Zelle nicht rechtzeitig aus dem Zellverband beseitigt, wird ihre Zellmembran sukzessive permeabel für Moleküle wie Propidiumiodid (PI) und 7-AAD. Zellen, deren Membran für Moleküle durchlässig werden, befinden sich in einem spätapoptotischen Stadium, das auch als sekundäre Nekrose bezeichnet wird. Sekundäre Nekrosen können zu Gewebeverletzungen, Entzündungsreaktionen und Autoimmunantworten führen (121, 122). Diese inflammatorischen Prozesse haben weitreichende Folgen für das Nachbargewebe der betroffenen Zellen und können in Bezug auf das Knorpelgewebe nicht nur einen oberflächlichen Defekt verursachen, sondern ebenfalls tiefe Schichten affektieren. Eine großflächige Entzündungsreaktion

der Chondrozyten kann im avaskulären Gelenkknorpel kaum repariert werden. Eine postexpositionelle Arthrose ist die Folge (123, 124). Unsere Ergebnisse zeigen Annexin und Caspase positive Zellen für Polihexanid, die gleichzeitig PI und 7-AAD negativ sind, was charakteristisch für frühapoptotische Zellen ist (120, 125). Wasserstoffperoxid inkubierte Zellen stellten sich PI und 7-AAD positiv dar. Die Vermutung liegt demnach nahe, dass Wasserstoffperoxid einen größeren zytotoxischen Effekt auf das Knorpelgewebe hat, da es spätapoptotische oder sogar Nekrosevorgänge induziert. Asada und Mitarbeiter kamen 1999 nach ihren Untersuchungen zur Zelltoxizität zu dem Ergebnis, dass Wasserstoffperoxid in Chondrozyten Apoptose induziert (112). Nachgewiesen wurden in dieser Studie apoptotische Vorgänge mit Hilfe des TUNEL-Assays (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end-labeling), einer häufig gebräuchlichen Methode für den Nachweis von DNA-Strangbrüchen. Diese Methode wurde von Gavrieli und Mitarbeitern für die Detektion von apoptotischen Zellen verwendet, da DNA-Fragmentationen seinerzeit als das charakteristische Merkmal des programmierten Zelltodes galt (126). Einige Autoren haben jedoch herausgefunden, dass DNA-Strangbrüche nicht Apoptose spezifisch sind und auch in nekrotischen Zellen vorkommen (127, 128). Damit würden durch den TUNEL-Assay nekrotische Zellen fälschlicherweise als apoptotisch markiert. Weiterentwicklungen der Methode und der Vorbehandlung der zu untersuchenden Zellen gelten nun als zuverlässig in der Detektion von spätapoptotischen Zellen (129, 130). Demnach ist nicht klar, ob in der Studie von Asada et al. die Anwendung des TUNEL-Assays ein probates Mittel zum Nachweis der Apoptoseinduktion nach Wasserstoffperoxid darstellt. Um die Ergebnisse ihrer Arbeit zu fundieren, wurden die Chondrozyten zusätzlich mit Annexin-V und PI gefärbt. Eine Anfärbbarkeit von einem Drittel der Zellen mit dem Apoptosemarker Annexin-V zeigte sich erst nach 60 Minuten Inkubationszeit, ohne dass eine gleichzeitige PI-Bindung stattfand. Nach weiteren drei Stunden zeigten sich fast alle Zellen Annexin-V und PI positiv, sprich spätapoptotisch/nekrotisch. Auch in unserem Versuch zeigten sich nach 60 Minuten Inkubationszeit Zellen, die mit PI markiert werden konnten. Zusätzlich wiesen wir eine signifikante Bindung von 7-AAD nach bereits 15 Minuten nach.

4.5 Relevanz für die Klinik

Aufgrund der Nekroseinduktion durch H_2O_2 sollte dieses in der septischen Gelenkchirurgie nicht verwendet werden. Polihexanid zeigt zwar auch eine von Konzentrationen und Einwirkzeiten abhängige Toxizität, entfaltet diese aber über den geordneten Weg der Apoptose. Es empfiehlt sich daher für den klinischen Einsatz in verdünnter Konzentration (< 0,01 %) bei limitierter Einwirkzeit (< 15 Minuten) und anschließender ausgiebiger Auswaschung mit Ringerlösung.

5 Zusammenfassung

Auf den Gebrauch von Antiseptika in der chirurgischen Therapie der septischen Arthritis ist in der Vergangenheit weitestgehend verzichtet worden, denn Versuche zur Zelltoxizität verschiedener antiseptischer Lösungen konnten ein zytotoxisches Potential dieser nachweisen. Da Gelenkknorpelzellen lediglich über geringe regeneratorische Fähigkeit verfügen, ist eine Schädigung der Zellen durch Antiseptika problematisch.

Bisherige Studien zur Zytotoxizität von Antiseptika verwendeten hohe Konzentrationen und Expositionszeiten, die in der septischen Gelenkchirurgie nicht üblich sind. In der vorliegenden Studie wurden daher klinisch relevante Konzentrationen und Einwirkzeiten (5 bis 30 Minuten) von Polihexanid (0,04 bis 0,004 %) und Wasserstoffperoxid (0,3 bis 3 %) verwendet. Weiterhin wurden die zytotoxischen Effekte mit Hinblick auf apoptotische und nekrotische Zellschädigungen mittels Fluoreszenzmikroskopie und FACS-Analyse differenziert.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die untersuchten Antiseptika die Vitalität primärer humaner Chondrozyten *in vitro* beeinträchtigen und die Proteoglykansynthese hemmen. Dieser Effekt ist sowohl von der Expositionszeit als auch von der Wirkstoffkonzentration abhängig. Es zeigte sich, dass Polihexanid apoptotische Zellschäden verursacht und Wasserstoffperoxid im Gegensatz dazu spätapoptotische bzw. nekrotische Vorgänge induziert.

Wasserstoffperoxid sollte daher in der septischen Gelenkchirurgie nicht in Kontakt mit Knorpelgewebe kommen. Trotz der in der Literatur beschriebenen guten Gewebeerträglichkeit von Polihexanid sollte es in Konzentrationen unter 0,01 % verwendet werden und nicht länger als 15 Minuten Kontakt mit dem Gelenkknorpel haben. In diesem Bereich ist eine hinreichende Bakterizidität bei akzeptabler Toxizität gegenüber Knorpelzellen zu erwarten.

6 Literaturverzeichnis

1. Shirtliff ME, Mader JT. Acute Septic Arthritis. *Clinical Microbiology Reviews*. 2002;15(4):527-44.
2. Schiavon F, Favero M, Carraro V, Riato L. [Septic arthritis: what is the role for the rheumatologist?]. *Reumatismo*. 2008 Jan-Mar;60(1):1-5.
3. Klein RS. Joint infection, with consideration of underlying disease and sources of bacteremia in hematogenous infection. *Clin Geriatr Med*. 1988 May;4(2):375-94.
4. Hunter JA, Blyth TH. A risk-benefit assessment of intra-articular corticosteroids in rheumatic disorders. *Drug Saf*. 1999 Nov;21(5):353-65.
5. Gaine WJ, Ramamohan NA, Hussein NA, Hullin MG, McCreath SW. Wound infection in hip and knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br*. 2000 May;82(4):561-5.
6. Geirsson AJ, Statkevicius S, Vikingsson A. Septic arthritis in Iceland 1990-2002: increasing incidence due to iatrogenic infections. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 2007;67(5):638-43.
7. Armstrong RW, Bolding F, Joseph R. Septic arthritis following arthroscopy: clinical syndromes and analysis of risk factors. *Arthroscopy*. 1992;8(2):213-23.
8. Jerosch J, Prymka M. [Arthroscopic therapy of septic arthritis. Surgical technique and results]. *Unfallchirurg*. 1998 Jun;101(6):454-60.
9. Margaretten ME, Kohlwes J, Moore D, Bent S. Does this adult patient have septic arthritis? *JAMA*. 2007 Apr 4;297(13):1478-88.
10. Armstrong RW, Bolding F. Septic arthritis after arthroscopy: the contributing roles of intraarticular steroids and environmental factors. *Am J Infect Control*. 1994 Feb;22(1):16-8.
11. Newman JH. Review of septic arthritis throughout the antibiotic era. *Ann Rheum Dis*. 1976 Jun;35(3):198-205.
12. Clerc O, Prod'hom G, Greub G, Zanetti G, Senn L. Adult native septic arthritis: a review of 10 years of experience and lessons for empirical antibiotic therapy. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011;66(5):1168-73.
13. Bonhoeffer J, Haeberle B, Schaad UB, Heininger U. Diagnosis of acute haematogenous osteomyelitis and septic arthritis: 20 years experience at the University Children's Hospital Basel. *Swiss Med Wkly*. 2001 Oct 6;131(39-40):575-81.
14. Dickie AS. Current concepts in the management of infections in bones and joints. *Drugs*. 1986 Nov;32(5):458-75.
15. Ryan MJ, Kavanagh R, Wall PG, Hazleman BL. Bacterial joint infections in England and Wales: analysis of bacterial isolates over a four year period. *Br J Rheumatol*. 1997 Mar;36(3):370-3.
16. Jerosch J. Akuter Gelenkinfekt. *Der Orthopaede*. 2004;33(11):1309-20.
17. Thiery JA. Arthroscopic drainage in septic arthritides of the knee: a multicenter study. *Arthroscopy*. 1989;5(1):65-9.
18. Mathews CJ, Weston VC, Jones A, Field M, Coakley G. Bacterial septic arthritis in adults. *Lancet*. 2010 Mar 6;375(9717):846-55.
19. Ma L, Cranney A, Holroyd-Leduc JM. Acute monoarthritis: What is the cause of my patient's painful swollen joint? *Canadian Medical Association Journal*. 2009;180(1):59-65.
20. Bombaci H, Canbora K, Onur G, Gorgec M, Dosoglu N. [Diagnosis of septic arthritis and initial antibiotic treatment]. *Acta Orthop Traumatol Turc*. 2005;39(4):307-15.
21. Scharf HP RA. *Orthopädie und Unfallchirurgie*. München2009.

22. Stutz G, Gachter A. [Diagnosis and stage-related therapy of joint infections]. *Unfallchirurg*. 2001 Aug;104(8):682-6.
23. Kuner EH, Thurck HU, von der Lippe I. [Diagnosis and therapy of acute infections of the knee joint]. *Unfallchirurgie*. 1987 Oct;13(5):249-54.
24. Pfeiffenberger J, Meiss L. Septic conditions of the shoulder--an up-dating of treatment strategies. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1996;115(6):325-31.
25. Balabaud L, Gaudias J, Boeri C, Jenny J-Y, Kehr P. Results of treatment of septic knee arthritis: a retrospective series of 40 cases. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2006;15(4):387-92.
26. Broy SB, Schmid FR. A comparison of medical drainage (needle aspiration) and surgical drainage (arthrotomy or arthroscopy) in the initial treatment of infected joints. *Clin Rheum Dis*. 1986 Aug;12(2):501-22.
27. Gupta MN, Sturrock RD, Field M. A prospective 2-year study of 75 patients with adult-onset septic arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. 2001 Jan;40(1):24-30.
28. Goldenberg DL, Brandt KD, Cohen AS, Cathcart ES. Treatment of septic arthritis: comparison of needle aspiration and surgery as initial modes of joint drainage. *Arthritis Rheum*. 1975 Jan-Feb;18(1):83-90.
29. Visser S, Tupper J. Septic until proven otherwise: approach to and treatment of the septic joint in adult patients. *Can Fam Physician*. 2009 Apr;55(4):374-5.
30. Ateschrang A, Albrecht D, Schroeter S, Weise K, Dolderer J. Current concepts review: Septic arthritis of the knee pathophysiology, diagnostics, and therapy. *Wiener klinische Wochenschrift*. 2011;123(7-8):191-7.
31. Goldenberg DL, Cohen AS. Acute infectious arthritis. A review of patients with nongonococcal joint infections (with emphasis on therapy and prognosis). *Am J Med*. 1976 Mar;60(3):369-77.
32. van Oosterhout M. Superior effect of arthroscopic lavage compared with needle aspiration in the treatment of inflammatory arthritis of the knee. *Rheumatology*. 2003;42(1):102-7.
33. Bussiere F, Beaufils P. [Role of arthroscopy in the treatment of pyogenic arthritis of the knee in adults. Report of 16 cases]. *Rev Chir Orthop Reparatrice Appar Mot*. 1999 Dec;85(8):803-10.
34. Kirchhoff C, Braunstein V, Buhmann Kirchhoff S, Oedekoven T, Mutschler W, Biberthaler P. Stage-dependant management of septic arthritis of the shoulder in adults. *Int Orthop*. 2009 Aug;33(4):1015-24.
35. Schmidt HGK, Gerlach U-J, Schoop R. Empyembehandlung. *Trauma und Berufskrankheit*. 2005;7:120-9.
36. Stutz G, Kuster MS, Kleinstuck F, Gachter A. Arthroscopic management of septic arthritis: stages of infection and results. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*. 2000;8(5):270-4.
37. Brand HS, van Kampen GP, van der Korst JK. A *Staphylococcus aureus* factor exclusively removes large proteoglycan monomers from explants of articular cartilage. *J Rheumatol*. 1990 Apr;17(4):538-43.
38. Smith RL, Schurman DJ. Bacterial arthritis. A staphylococcal proteoglycan-releasing factor. *Arthritis Rheum*. 1986 Nov;29(11):1378-86.
39. Daniel D, Akeson W, Amiel D, Ryder M, Boyer J. Lavage of septic joints in rabbits: effects of chondrolysis. *J Bone Joint Surg Am*. 1976 Apr;58(3):393-5.
40. Williams RJ, 3rd, Smith RL, Schurman DJ. Septic arthritis. Staphylococcal induction of chondrocyte proteolytic activity. *Arthritis Rheum*. 1990 Apr;33(4):533-41.
41. Smith RL, Merchant TC, Schurman DJ. In vitro cartilage degradation by *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Arthritis Rheum*. 1982 Apr;25(4):441-6.

42. Kariminasab MH, Shayesteh Azar M, Sajjadi Saravi M. Surgical intervention for treatment of septic arthritis in infancy and childhood; a retrospective study. *Arch Iran Med.* 2009 Jul;12(4):409-11.
43. Sadowski CM, Gabay C. [Septic arthritis]. *Rev Med Suisse.* 2006 Mar 15;2(57):702-4, 7-8.
44. Kurz B, Jin M, Patwari P, Cheng DM, Lark MW, Grodzinsky AJ. Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression. *J Orthop Res.* 2001 Nov;19(6):1140-6.
45. Adams MA. The mechanical environment of chondrocytes in articular cartilage. *Biorheology.* 2006;43(3-4):537-45.
46. Junqueira LCU CJ, Gratzl M. *Histologie.* München: Springer Medizin Verlag; 2005.
47. Lüllmann-Rauch R. *Histologie.* Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag; 2003.
48. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* 1998;47:477-86.
49. Gardner DL. Problems and paradigms in joint pathology. *J Anat.* 1994 Jun;184 (Pt 3):465-76.
50. Sellards RA, Nho SJ, Cole BJ. Chondral injuries. *Curr Opin Rheumatol.* 2002 Mar;14(2):134-41.
51. Carney SL, Muir H. The structure and function of cartilage proteoglycans. *Physiol Rev.* 1988 Jul;68(3):858-910.
52. Athanasiou KA, Rosenwasser MP, Buckwalter JA, Malinin TI, Mow VC. Interspecies comparisons of in situ intrinsic mechanical properties of distal femoral cartilage. *J Orthop Res.* 1991 May;9(3):330-40.
53. Kuettner KE. Biochemistry of articular cartilage in health and disease. *Clin Biochem.* 1992 Jun;25(3):155-63.
54. Hill M. Bone Development. 2011 [updated 27.09.2011; cited 2011 25.10.2011]; Available from: http://php.med.unsw.edu.au/embryology/index.php?title=Bone_Development.
55. Poole AR, Kojima T, Yasuda T, Mwale F, Kobayashi M, Lavery S. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin Orthop Relat Res.* 2001 Oct(391 Suppl):S26-33.
56. [updated 13.01.2007; cited 2011 25.10.2011]; Available from: http://medizin.me.ohost.de/medizin/historicken/histo_ricken-Dateien/frame.htm.
57. Knudson W, Loeser RF. CD44 and integrin matrix receptors participate in cartilage homeostasis. *Cell Mol Life Sci.* 2002 Jan;59(1):36-44.
58. Kim SH, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol.* 2011 May;209(2):139-51.
59. Dreier R. Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders. *Arthritis Res Ther.* 2010;12(5):216.
60. Archer CW, McDowell J, Bayliss MT, Stephens MD, Bentley G. Phenotypic modulation in sub-populations of human articular chondrocytes in vitro. *J Cell Sci.* 1990 Oct;97 (Pt 2):361-71.
61. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.
62. Li HN, Barlow PG, Bylund J, Mackellar A, Bjorstad A, Conlon J, et al. Secondary necrosis of apoptotic neutrophils induced by the human cathelicidin LL-37 is not

- proinflammatory to phagocytosing macrophages. *J Leukoc Biol.* 2009 Oct;86(4):891-902.
63. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
64. Platt N, da Silva RP, Gordon S. Recognizing death: the phagocytosis of apoptotic cells. *Trends Cell Biol.* 1998 Sep;8(9):365-72.
65. Patel VA, Lee DJ, Longacre-Antoni A, Feng L, Lieberthal W, Rauch J, et al. Apoptotic and necrotic cells as sentinels of local tissue stress and inflammation: response pathways initiated in nearby viable cells. *Autoimmunity.* 2009 May;42(4):317-21.
66. Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz.* 1999 May;24(3):189-95.
67. Harper N, Hughes M, MacFarlane M, Cohen GM. Fas-associated death domain protein and caspase-8 are not recruited to the tumor necrosis factor receptor 1 signaling complex during tumor necrosis factor-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 2003 Jul 11;278(28):25534-41.
68. Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther.* 2005 Feb;4(2):139-63.
69. Shiraishi H, Okamoto H, Yoshimura A, Yoshida H. ER stress-induced apoptosis and caspase-12 activation occurs downstream of mitochondrial apoptosis involving Apaf-1. *J Cell Sci.* 2006 Oct 1;119(Pt 19):3958-66.
70. Szegezdi E, Fitzgerald U, Samali A. Caspase-12 and ER-stress-mediated apoptosis: the story so far. *Ann N Y Acad Sci.* 2003 Dec;1010:186-94.
71. Polihexanid. [updated 10.12.2010; cited 2011 25.10.2011]; Available from: <http://www.pharmawiki.ch/wiki/index.php?wiki=Polihexanid>.
72. Ikeda T, Ledwith A, Bamford CH, Hann RA. Interaction of a polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1984 Jan 11;769(1):57-66.
73. Hubner NO, Kramer A. Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. *Skin Pharmacol Physiol.* 2010;23 Suppl:17-27.
74. Dissemmond J, Gerber V, Kramer A, Riepe G, Strohal R, Vassel-Biergans A, et al. A practice-oriented recommendation for treatment of critically colonised and locally infected wounds using polihexanide. *J Tissue Viability.* 2010 Aug;19(3):106-15.
75. Hirsch T, Jacobsen F, Rittig A, Goertz O, Niederbichler A, Steinau HU, et al. [A comparative in vitro study of cell toxicity of clinically used antiseptics]. *Hautarzt.* 2009 Dec;60(12):984-91.
76. Eberlein T, Assadian O. Clinical use of polihexanide on acute and chronic wounds for antisepsis and decontamination. *Skin Pharmacol Physiol.* 2010;23 Suppl:45-51.
77. Daeschlein G, Assadian O, Bruck JC, Meinel C, Kramer A, Koch S. Feasibility and clinical applicability of polihexanide for treatment of second-degree burn wounds. *Skin Pharmacol Physiol.* 2007;20(6):292-6.
78. Koburger T, Hubner NO, Braun M, Siebert J, Kramer A. Standardized comparison of antiseptic efficacy of triclosan, PVP-iodine, octenidine dihydrochloride, polyhexanide and chlorhexidine digluconate. *J Antimicrob Chemother.* 2010 Aug;65(8):1712-9.
79. Muller G, Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *J Antimicrob Chemother.* 2008 Jun;61(6):1281-7.

80. McDonnell G, Russell AD. Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clin Microbiol Rev.* 1999 Jan;12(1):147-79.
81. Smith MA, Herson PS, Lee K, Pinnock RD, Ashford ML. Hydrogen-peroxide-induced toxicity of rat striatal neurones involves activation of a non-selective cation channel. *J Physiol.* 2003 Mar 1;547(Pt 2):417-25.
82. Pitten FA, Werner HP, Kramer A. A standardized test to assess the impact of different organic challenges on the antimicrobial activity of antiseptics. *J Hosp Infect.* 2003 Oct;55(2):108-15.
83. O'Toole EA, Goel M, Woodley DT. Hydrogen peroxide inhibits human keratinocyte migration. *Dermatol Surg.* 1996 Jun;22(6):525-9.
84. Kalteis T, Luring C, Schaumburger J, Perlick L, Bathis H, Grifka J. [Tissue toxicity of antiseptics]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 2003 Mar-Apr;141(2):233-8.
85. Jauregui HO, Hayner NT, Driscoll JL, Williams-Holland R, Lipsky MH, Galletti PM. Trypan blue dye uptake and lactate dehydrogenase in adult rat hepatocytes--freshly isolated cells, cell suspensions, and primary monolayer cultures. *In Vitro.* 1981 Dec;17(12):1100-10.
86. Szekeres J, Pacsa AS, Pejtsik B. Measurement of lymphocyte cytotoxicity by assessing endogenous alkaline phosphatase activity of the target cells. *J Immunol Methods.* 1981;40(2):151-4.
87. Murphy EJ, Roberts E, Anderson DK, Horrocks LA. Cytotoxicity of aluminum silicates in primary neuronal cultures. *Neuroscience.* 1993 Nov;57(2):483-90.
88. Benya PD, Shaffer JD. Dedifferentiated chondrocytes reexpress the differentiated collagen phenotype when cultured in agarose gels. *Cell.* 1982 Aug;30(1):215-24.
89. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB, et al. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. *J Cell Sci.* 1994 Jan;107 (Pt 1):17-27.
90. Fuss M, Ehlers EM, Russlies M, Rohwedel J, Behrens P. Characteristics of human chondrocytes, osteoblasts and fibroblasts seeded onto a type I/III collagen sponge under different culture conditions. A light, scanning and transmission electron microscopy study. *Ann Anat.* 2000 Jul;182(4):303-10.
91. Mulisch M WU. *Romeis Mikroskopische Technik.* Heidelberg: Springer Akademischer Verlag; 2010.
92. Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, van Schie RC, LaFace DM, et al. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med.* 1995 Nov 1;182(5):1545-56.
93. Verhoven B, Krahling S, Schlegel RA, Williamson P. Regulation of phosphatidylserine exposure and phagocytosis of apoptotic T lymphocytes. *Cell Death Differ.* 1999 Mar;6(3):262-70.
94. Muller G, Kramer A. Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2008;61(6):1281-7.
95. Müller G, Kramer A. Effect of selected wound antiseptics on adult articular cartilage (bovine sesamoid bone) in the presence of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Orthopaedic Research.* 2005;23(1):127-33.
96. Bates EJ, Johnson CC, Lowther DA. Inhibition of proteoglycan synthesis by hydrogen peroxide in cultured bovine articular cartilage. *Biochim Biophys Acta.* 1985 Feb 15;838(2):221-8.

97. Ince A, Schutze N, Hendrich C, Jakob F, Eulert J, Lohr JF. Effect of polyhexanide and gentamycin on human osteoblasts and endothelial cells. *Swiss Med Wkly*. 2007 Mar 10;137(9-10):139-45.
98. Shakibaei M, De Souza P. Differentiation of mesenchymal limb bud cells to chondrocytes in alginate beads. *Cell Biol Int*. 1997 Feb;21(2):75-86.
99. Levitt D, Dorfman A. Concepts and mechanisms of cartilage differentiation. *Curr Top Dev Biol*. 1974;8:103-49.
100. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C, et al. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. *Exp Cell Res*. 1994 May;212(1):97-104.
101. Hashimoto S, Ochs RL, Komiya S, Lotz M. Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum*. 1998 Sep;41(9):1632-8.
102. Buckwalter JA, Mankin HJ. Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect*. 1998;47:487-504.
103. Stockwell RA. The interrelationship of cell density and cartilage thickness in mammalian articular cartilage. *J Anat*. 1971 Sep;109(Pt 3):411-21.
104. Aigner T, Hemmel M, Neureiter D, Gebhard PM, Zeiler G, Kirchner T, et al. Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritis human articular knee cartilage: a study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage. *Arthritis Rheum*. 2001 Jun;44(6):1304-12.
105. Martin JA, Buckwalter JA. Roles of articular cartilage aging and chondrocyte senescence in the pathogenesis of osteoarthritis. *Iowa Orthop J*. 2001;21:1-7.
106. Schaumburger J, Beckmann J, Springorum HR, Handel M, Anders S, Kalteis T, et al. [Toxicity of antiseptics on chondrocytes in vitro]. *Z Orthop Unfall*. 2010 Jan;148(1):39-43.
107. Thomas GW, Rael LT, Bar-Or R, Shimonkevitz R, Mains CW, Slone DS, et al. Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics. *J Trauma*. 2009 Jan;66(1):82-90; discussion -1.
108. Saxne T, Heinegard D, Wollheim FA. Cartilage proteoglycans in synovial fluid and serum in patients with inflammatory joint disease. Relation to systemic treatment. *Arthritis Rheum*. 1987 Sep;30(9):972-9.
109. Silverman B, Cawston TE, Page Thomas DP, Dingle JT, Hazleman BL. The sulphated glycosaminoglycan levels in synovial fluid aspirates in patients with acute and chronic joint disease. *Br J Rheumatol*. 1990 Oct;29(5):340-4.
110. Ratcliffe A, Shurety W, Caterson B. The quantitation of a native chondroitin sulfate epitope in synovial fluid lavages and articular cartilage from canine experimental osteoarthritis and disuse atrophy. *Arthritis Rheum*. 1993 Apr;36(4):543-51.
111. Schalkwijk J, van den Berg WB, van de Putte LB, Joosten LA. Hydrogen peroxide suppresses the proteoglycan synthesis of intact articular cartilage. *J Rheumatol*. 1985 Apr;12(2):205-10.
112. Asada S, Fukuda K, Oh M, Hamanishi C, Tanaka S. Effect of hydrogen peroxide on the metabolism of articular chondrocytes. *Inflamm Res*. 1999 Jul;48(7):399-403.
113. Baker MS, Feigan J, Lowther DA. Chondrocyte antioxidant defences: the roles of catalase and glutathione peroxidase in protection against H₂O₂ dependent inhibition of proteoglycan biosynthesis. *J Rheumatol*. 1988 Apr;15(4):670-7.
114. Panasyuk A, Frati E, Ribault D, Mitrovic D. Effect of reactive oxygen species on the biosynthesis and structure of newly synthesized proteoglycans. *Free Radic Biol Med*. 1994 Feb;16(2):157-67.

115. Muller G, Kramer A. In vitro action of a combination of selected antimicrobial agents and chondroitin sulfate. *Chem Biol Interact.* 2000 Jan 15;124(2):77-85.
116. Kiss RS, Elliott MR, Ma Z, Marcel YL, Ravichandran KS. Apoptotic cells induce a phosphatidylserine-dependent homeostatic response from phagocytes. *Curr Biol.* 2006 Nov 21;16(22):2252-8.
117. Stepanek O, Brdicka T, Angelisova P, Horvath O, Spicka J, Stockbauer P, et al. Interaction of late apoptotic and necrotic cells with vitronectin. *PLoS One.* 2011;6(5):e19243.
118. Ravichandran KS, Lorenz U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. *Nat Rev Immunol.* 2007 Dec;7(12):964-74.
119. van Engeland M, Nieland LJ, Ramaekers FC, Schutte B, Reutelingsperger CP. Annexin V-affinity assay: a review on an apoptosis detection system based on phosphatidylserine exposure. *Cytometry.* 1998 Jan 1;31(1):1-9.
120. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods.* 1995 Jul 17;184(1):39-51.
121. Silva MT, do Vale A, dos Santos NM. Secondary necrosis in multicellular animals: an outcome of apoptosis with pathogenic implications. *Apoptosis.* 2008 Apr;13(4):463-82.
122. Poon IK, Hulett MD, Parish CR. Molecular mechanisms of late apoptotic/necrotic cell clearance. *Cell Death Differ.* 2010 Mar;17(3):381-97.
123. Martin JA, Klingelutz AJ, Moussavi-Harami F, Buckwalter JA. Effects of oxidative damage and telomerase activity on human articular cartilage chondrocyte senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* 2004 Apr;59(4):324-37.
124. Yudoh K, Nguyen T, Nakamura H, Hongo-Masuko K, Kato T, Nishioka K. Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther.* 2005;7(2):R380-91.
125. Walsh GM, Dewson G, Wardlaw AJ, Levi-Schaffer F, Moqbel R. A comparative study of different methods for the assessment of apoptosis and necrosis in human eosinophils. *J Immunol Methods.* 1998 Aug 1;217(1-2):153-63.
126. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992 Nov;119(3):493-501.
127. Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R. In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note. *Hepatology.* 1995 May;21(5):1465-8.
128. Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport.* 1995 Dec 29;7(1):61-4.
129. Negoescu A, Lorimier P, Labat-Moleur F, Drouet C, Robert C, Guillermet C, et al. In situ apoptotic cell labeling by the TUNEL method: improvement and evaluation on cell preparations. *J Histochem Cytochem.* 1996 Sep;44(9):959-68.
130. Negoescu A, Guillermet C, Lorimier P, Brambilla E, Labat-Moleur F. Importance of DNA fragmentation in apoptosis with regard to TUNEL specificity. *Biomed Pharmacother.* 1998;52(6):252-8.

7 Selbstständigkeitserklärung

„Ich, Stephanie Dähn-Wollenberg, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Der Einfluss von Antiseptika auf humane Chondrozyten 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 20.11.2011

Unterschrift

8 Lebenslauf

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

9 Anhang

Publikationen

Röhner E, Hoff P, Winkler T, von Roth P, Seeger JB, Perka C, Matziolis G. Polyhexanide and hydrogen peroxide inhibit proteoglykan synthesis of human chondrocytes. *J Histotechnol* 2011;34:35-39

Röhner E, Kolar P, Seeger JB, Arnholdt J, Thiele K, Perka C, Matziolis G. Toxicity of antiseptics against chondrocytes: What is best for the cartilage in septic surgery? *Int Orthop* 2011;35:1719-23

Abstracts

Röhner E, Seeger JB, Hoff P, Dähn-Wollenberg S, Perka C, Matziolis G. Toxicity of polyhexanide and hydrogen peroxide on human chondrocytes in vitro. *Orthopedics* 2011;34:e290-4

Röhner E, Seeger JB, Hoff P, Pfitzner T, Preininger B, Andreas K, Buttgerit F, Perka C, Matziolis G. Preferred use of polyhexanide in orthopedic surgery. *Orthopedics* 2011;34:e664-8

10 Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Georg Matziolis für die Überlassung des Themas, die gute Betreuung und die hilfreichen Ratschläge danken, sowie Herrn Dr. Robert Hube.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herrn Dr. Eric Röhner, der mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand und viel zum Gelingen der Dissertation beigetragen hat. Ich bedanke mich herzlich bei Frau Dr. Paula Hoff für die Unterstützung im Rahmen der Fluoreszenzmikroskopie.

Weiterhin möchte ich meiner Familie danken, besonders meinen Eltern, dafür, dass sie immer für mich da waren und mir soviel ermöglicht haben.

Als letztes danke ich Jens Gürtler für seine uneingeschränkte Unterstützung nicht nur bei der Anfertigung dieser Arbeit.