Der Einfluss von Antiseptika auf mesenchymale adipogene Stammzellen

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Veronica Ott

aus Viersen

Berichter: Herr Univ.-Prof. Dr. med. Dr. med. univ. Prof. h. c. mutt. Norbert Pallua
Herr Prof. Dr. rer. nat. Hans-Peter Horz

Tag der mündlichen Prüfung: 03.09.2021

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Universitätsbibliothek online verfügbar.

Meiner Familie

und

Priv.-Doz. Dr. med. Bong-Sung Kim

Teile dieser Dissertation wurden im März 2017 im 139. Band von Plastic and Reconstructive Surgery, auf den Seiten 625 – 637 in dem Beitrag „The Effect of Antiseptics on Adipose-Derived Stem Cells“ veröffentlicht.

Die Autoren waren:

B. S. Kim, V. Ott, A. Böcker, J. P. Stromps, N. Paul, Z. Alharbi, E. Cakmak, J. Bernhagen, R. Bucala, N. Pallua

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis ..... *i*

Abkürzungsverzeichnis ..... *iv*

1 Einleitung *1*

1.1 Wundinfektion **1**

1.1.1 Haut als Barrierefunktion 1

1.1.2 Wundinfektionen in der Plastischen Chirurgie 1

1.1.3 Therapie der Wundinfektion, allgemein 2

1.2 Antiseptika und Wunddesinfektion **3**

1.2.1 Geschichte 3

1.2.2 Unterschied zwischen Antibiotika und Antiseptika 4

1.2.3 Antimikrobielle Wirksamkeit von Antibiotika und Antiseptika 5

1.2.4 Auswahl der Antiseptika 6

1.2.4.1 Octenisept® 7

1.2.4.2 Polyhexanid 8

1.2.4.3 Betaisodona® 10

1.2.4.4 Mafenidacetat 11

1.2.5 Zytotoxizität von Antibiotika und Antiseptika auf Keratinozyten, Fibroblasten und sonstige Zellen 12

1.3 Fettgewebe **13**

1.3.1 Aufbau des Fettgewebes 13

1.3.2 Physiologie und Funktion von Fettgewebe 13

1.3.3 Mesenchymale Stammzellen 14

1.3.4 MSZ in der Wundheilung 15

2 Zielsetzung *17*

3 Material und Methoden *18*

3.1 Material **18**

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien 18

3.1.2 Geräte 20

3.1.3 Plastikmaterialien 21

3.1.4 Puffer und Lösungen 23

3.1.4.1 Paraformaldehyd-Lösung 23

3.1.4.2 Kollagenase-Lösung 23

3.1.4.3 Kultivierungsmedien ... 24
3.1.4.4 Oil Red-O Assay ... 25
3.1.4.5 Lavasept® und Polyhexanid ... 25
3.1.5 Software ... 26
3.2 Methoden ... 26
3.2.1 Gewinnung der MSZ aus humanen Proben ... 26
3.2.2 Inkubation und Passagierung ... 28
3.2.3 Messung der Viabilität der MSZ ... 29
3.2.4 Nekrose/Apoptosebestimmung ... 30
3.2.5 Messung der adipogenen Differenzierung ... 30
3.2.6 Statistische Auswertung ... 32
4 Ergebnisse ... 33
4.1 Viabilitätsassay ... 33
4.1.1 Ergebnisse der mit Mafenid behandelten Zellen ... 43
4.2 Adipogene Differenzierung ... 45
4.2.1 Einmalige Behandlung ... 45
4.2.2 Kontinuierliche Behandlung ... 47
4.3 Apoptose-/Nekrosebestimmung ... 48
4.3.1 Medium und 0,9 % NaCl-Lösung ... 49
4.3.2 Octenisept® ... 51
4.3.3 Betaisodona® ... 52
4.3.4 Polyhexanid-haltige Antiseptika ... 53
4.3.5 Mafenid ... 55
4.4 Zusammenfassung ... 57
5 Diskussion ... 58
5.1 Viabilitätsassay und Vitalitätsassay ... 58
5.1.1 Erläuterung der Assays zur Untersuchung der Zytotoxizität ... 58
5.1.1.1 Viabilitätsassay ... 58
5.1.1.2 Vitalitätsassays ... 59
5.1.2 Auswirkung der Antiseptika auf Zellviabilität und -vitalität ... 59
5.1.3 Auswertung nach Antiseptika ... 61
5.1.3.1 Octenisept® ... 61
5.1.3.2 Betaisodona® ... 63
5.1.3.3 Prontosan® und Lavasept® ... 65
5.1.3.4 Mafenid ... 67
5.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Viabilitäts- und Vitalitätsassays ... 68

5.1.5 Interpretation der Ergebnisse des Viabilitäts- und Vitalitätsassays bezüglich der medizinischen Anwendung 69

5.2 Differenzierungsbestimmung 70

6 Ausblick 73

7 Zusammenfassung 75

Literaturverzeichnis 77

Anhang 90

Abbildungsverzeichnis 90

Tabellenverzeichnis 92

Auflistung der eigenen Publikationen 93

Danksagung 94

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung 95

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung 96

Lebenslauf 97

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	Zweimal destilliertes Wasser
bFGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	fetales Kälberserum
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung (≈9,81 m/s^2)
HEPES	Hydroxyethylpiperazin-Ethansulfonsäure
Hoechst	Hoechst 33342: Trihydrochloride, trihydrate
IBMX	3-Isobutyl-1-Methylxanthin
KCl	Kaliumchlorid
m	männlich
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mm	Millimeter
min	Minute
MSZ	mesenchymale Stammzellen
m/s^2	Meter pro Sekunde zum Quadrat
NaCl	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
o.g.	oben genannt
PBS/ PBS^{2-}	Phosphate Buffered Saline Dulbecco
PFA	Paraformaldehyd-Lösung
s.	siehe
sog.	sogenannt
T3	Triiodthyronin
U/min	Umdrehungen pro Minute

u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
Vgl.	Vergleich
w	weiblich
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius
%	Prozent

1 Einleitung

1.1 Wundinfektion

1.1.1 Haut als Barrierefunktion

Verletzungen des Haut-Weichteilmantels sind eine alltägliche Herausforderung für Ärzte jeder Fachrichtung. Die Haut, als größtes Organ des Menschen, hat viele Funktionen. Sie gewährleistet die Integrität des Körpers und einen mechanischen Schutz der darunterliegenden Strukturen. Sie verhindert den Verlust von Wasser und Wärme. Durch die Verletzung der Haut ist diese natürliche Barriere aufgehoben, Mikroorganismen dringen in den Körper ein, vermehren sich und es kommt häufig zu einer klinisch relevanten Infektion (Frank et al. 2005). Nicht nur der Aufwand und die Kosten der Behandlung von Infektionen sind hoch, sie stellen vor allem eine in schwerwiegenden Fällen lebensbedrohliche Komplikation für den Patienten dar (Siaw-Sakyi 2017).

1.1.2 Wundinfektionen in der Plastischen Chirurgie

Im unkompliziertesten Fall behindert eine Wundinfektion den physiologischen Wundheilungsprozess, sodass dieser nicht mehr in seiner geordneten und fein abgestimmten Form zielführend ablaufen kann (Braiman-Wiksman et al. 2007). Mit dieser Störung können Infektionen zur Entwicklung von chronischen Wunden führen, die ein häufiges Krankheitsbild in der plastischen Chirurgie darstellen und eine Prävalenz von etwa 1% haben (Hassan et al. 2014). Eine Chronifizierung entsteht vor allem dann, wenn die Keimbesiedlung nicht ausreichend eingeschränkt werden kann. Diese kann entweder chirurgisch oder antimikrobiell behandelt werden. Je nach Umfang des Defekts und der mikrobiellen Besiedlung sind beide zur Heilungsunterstützung nötig. Die chirurgische Behandlung beschreibt die mechanische Sanierung, also die Entfernung des infektiösen Belags und Gewebes. Die antimikrobielle Behandlung umfasst chemische Verfahren zur Infektionsbekämpfung, also die direkte Abtötung der Keime, ohne sie mechanisch zu entfernen. Das beinhaltet Antiseptika und Antibiotika, allerdings auch andere Verfahren, wie die Hyperbare Sauerstofftherapie.

Die anhaltende, lokale Infektion führt zu einer Immunantwort mit Initiierung und Unterhaltung eines inflammatorischen Milieus, welches zu einer weiteren Verzögerung der Wundheilung und somit zu einem schwer zu durchbrechenden, sich selbst aufrechterhaltenden Kreislauf führt (Nikoletopoulou et al. 2013). Eine Kompromittierung der für das Gewebe überlebenswichtigen Funktionen, insbesondere der Durchblutung, führt zu Nekrosen (dem vollständigen, unkontrollierten Absterben des betroffenen Gewebes). Resultierende Defekte müssen abhängig von ihrem Ausmaß unter Umständen aufwändig rekonstruiert werden. Ohne effektive Behandlung können Wundinfektionen jedoch vor allem sehr schwerwiegende Folgen haben, bis hin zum Tod des Patienten.

Die spezifischen mikrobiologischen Aspekte einer Wunde, vor allem einer chronischen Wunde, beschreiben sich durch ihren oft komplexen polymikrobiellen, pathogenen Biofilm. Er entsteht, wenn sich Bakterien an und in der offenen Wunde ansiedeln. Dabei exkretieren sie extrazelluläre, polymere Substanzen, die mit Wasser Hydrogele und somit einen schleimartigen, schützenden Film um sich bilden. Ein hohes Risiko bei Biofilmen ist ihre teilweise ungeklärte, hohe Antibiotikaresistenz (Bowler 2018). Auch können Wunden durch Pilze und Viren besiedelt werden, die ebenfalls einen heilungsretardierenden Effekt hervorrufen. Durch mikrobiologische Besiedlung sind chronische Wunden oft mit häufigen Arztbesuchen oder langen Krankenhausaufenthalten mit unter Umständen breiter, sowie lange währender Antibiotikatherapie assoziiert. Dies verstärkt natürlich oft die Neigung zur Resistenzbildung gegen Antibiotika, durch die Infizierung mit nosokomialen Keimen. Daher ist eine genaue Untersuchung des Wundmaterials zur Identifizierung des Pathogens unabdingbar für eine zielführende Therapie, denn die Maßnahmen müssen an die spezifischen Voraussetzungen der Wunde und der Keim-Besiedlung angepasst sein (Bowler et al. 2001a, Bowler 2018).

1.1.3 Therapie der Wundinfektion, allgemein

Es gibt unterschiedliche Möglichkeiten, eine Infektion zu bekämpfen oder ihr vorzubeugen. Eine phasengerechte Therapie wird mehrmals dem Zustand der Wunde, unter Berücksichtigung der Möglichkeiten des Patienten, angepasst, um eine möglichst schonende und gleichzeitig effektive Keimeradikation zu

erreichen. Die beiden grundsätzlichen Möglichkeiten der Behandlung sind die operative und die konservative oder antimikrobielle Methode.

Für das operative Verfahren gibt eine Auswahl physikalischer Methoden, wie die Reinigung oder sogar das operative Débridement der Wunde. Bei einem Débridement wird nekrotisches und infiziertes Gewebe abgetragen. Das Ziel ist die Herstellung eines hygienischen Wundmilieus. Eine andere physikalische Maßnahme zur Infektbekämpfung ist die Vakuumtherapie, bei der für eine bestimmte Zeit mittels eines antimikrobiellen Schwamms und einer Pumpe ein Unterdruck auf das infizierte Gebiet einwirkt und zur Verbesserung der Wundverhältnisse für eine weitergehende Deckung des Defekts sorgt. Weitere Verfahren, wie die hyperbare Sauerstofftherapie, sind ein Spezialgebiet der plastischen Chirurgie und werden nicht ubiquitär eingesetzt.

Die vorrangige Methode zur Keimelimination ist in den meisten Fällen aber die chemische, antimikrobielle Therapie mittels Antibiotika oder Antiseptika (Bowler et al. 2001b).

1.2 Antiseptika und Wunddesinfektion

1.2.1 Geschichte

Hinweise auf die Medikation mit antimikrobiell wirksamen Pflanzen lassen sich bis in die frühe archäologisch belegbare Vorgeschichte finden, durch Homo neanderthalensis vor etwa 49.000 Jahren, zur Zeit des Paläolithikums (Weyrich et al. 2017). Ähnlich ist es mit antiseptischen Substanzen. Spätestens im Neolithikum (11.500 v. Chr.) wurden Pflanzen wie Salbei und Moos eingesetzt, um Wunden keimarm zu halten und die Wundheilung zu verbessern. Die Nutzung von Honig dafür könnte sogar noch älter sein (Mavroforou et al. 2007).

Es wurden immer wieder unterschiedliche Substanzen eingesetzt, die oft sogar einen therapeutischen Effekt hatten. In der Neuzeit entwickelten Ende des 18. Jahrhundert bis zu 80% aller Patienten nach Operationen eine Wundinfektion, sodass mit großem Eifer verschiedenste Substanzen zu dem Zweck der Infektionsbekämpfung entwickelt wurden (Jessney 2012, Roth & Brill 2010). Der Grundstein der wissenschaftlichen Aufklärung wurde durch Louis Pasteur (1822 – 1895) gelegt, der mit seinen Experimenten zur Gärung die Existenz von Mikroorganismen nachwies und unter anderem die Keimtheorie mitbegründete.

Diese unabhängig auch von Robert Koch (1843 – 1910) und Joseph Lister (1827 – 1912) entwickelte Theorie besagte, dass Krankheiten durch Mikroorganismen hervorgerufen werden (Tan & Rogers 2007). Lister war der Erste, der 1865 einen antiseptisch wirksamen Verband mit Phenolen entwickelte (Jessney 2012). Paul Ehrlich und seine Kollegen entdeckten 1910 das erste Antibiotikum (Arsphenamin), dessen Wirkspektrum allerdings auf Spirochäten begrenzt war (Zaffiri et al. 2012). Alexander Flemming entdeckte 1928 mit Penicillin das erste Antibiotikum mit breiterem Spektrum, das ab 1942 in großem Maßstab synthetisiert und eingesetzt wurde (Fleming 1929, Patterson & Stankewicz 2018).

1.2.2 Unterschied zwischen Antibiotika und Antiseptika

Antiseptika und Antibiotika sind chemische Mittel zur Bekämpfung oder Prävention von Keimbesiedlung. Antiseptika sind meist kleine, zytotoxische Moleküle mit niedriger Spezifität. Das europäische Komitee für Normung definiert „Antiseptik“ wie folgt (CEN/TC 216/HWG N 18): „Behandlung von lebendem Gewebe mit dem Ziel, eine Infektion dadurch zu bekämpfen und/oder der Ausbreitung einer Infektion dadurch vorzubeugen, daß die Anzahl der Krankheitserreger durch Abtötung bzw. Inaktivierung vermindert und die Vermehrung der nicht abgetöteten bzw. inaktivierten möglichst lang anhaltend gehemmt wird.“ (Kramer et al. 2013). Gerichtet sind Antiseptika gegen Bakterien, Viren, Pilze, Algen oder Dauerformen von Endoparasiten. Sie basieren auf verschiedenen Konzepten der Tötung von Mikroorganismen: Zerstörung der Zellwand durch Herabsetzung der Oberflächenspannung, Denaturierung oder Störung des Energiestoffwechsels.

Antibiotika sind hingegen meist komplexere Moleküle, die auf spezifische Zell-Bestandteile ausgerichtet sind. Ihre Angriffspunkte sind zum Beispiel bakterielle Ribosomen, Energiestoffwechsel oder Zellwandsynthese. Man kann sie, im Gegensatz zu Antiseptika, systemisch einsetzen, denn ihre Wirkmechanismen sind auf Bakterieneigenschaften ausgerichtet und schaden eukaryotischen Zellen in der Regel nicht (Willenegger 1994).

Die Nachteile von Antibiotika sind allerdings umfangreich. Sie haben in der Regel ein begrenztes Anwendungsspektrum, sind strengen Dosierungs- und Applikationsrichtlinien unterworfen und sind, aufgrund ihrer primär systemischen

Applikation, reich an Nebenwirkungen. Auf Grund ihrer Spezifität haben sie im Gegensatz zu Antiseptika kaum Einfluss auf menschlichen Zellen, sind aber auch anfälliger für Abwehrmechanismen und vor allem Resistenzbildung der Mikroorganismen (Golkar et al. 2014, Singh et al. 2014, Teepe et al. 1993).

Zum alltäglichen Wundmanagement sind Antiseptika üblich, da sie kostengünstig und effektiv sind (Bowler et al. 2001b, Daeschlein 2013). Da sie ausschließlich topisch eingesetzt werden, haben sie wenig systemische Nebenwirkungen. Dennoch können sie unter anderem allergische Reaktionen provozieren und in schweren Fällen andere Nebenwirkungen aufweisen, so wie Nierenversagen oder Kreislaufentgleisung (Hasanvand et al. 2015b). Außerdem besitzen sie einen zytotoxischen Effekt auch gegenüber humanen Zellen, sodass sie Gewebsirritation bis hin zur Gewebsnekrose auslösen können. Zusätzlich können Pathogene Resistenzen gegen sie entwickeln (Hasanvand et al. 2015a, Hubner & Kramer 2010, Opstrup et al. 2014).

Die Wirkspektren von Antibiotika und Antiseptika sind weitestgehend beschrieben, womit sich ihre Anwendung in einer spezifischen Situation meinst sehr gut kalkulieren lässt. Bei einem systemischen oder nicht oberflächlichen bakteriellen Infekt sind Antibiotika die Mittel der Wahl. Bei lokalen, zugänglichen Infekten werden eher Antiseptika verwendet, die nicht systemisch verabreicht werden können. In vereinzelten Situationen werden auch Antibiotika lokal (meist in Form einer Salbe, manchmal in Form einer Lösung) appliziert.

1.2.3 Antimikrobielle Wirksamkeit von Antibiotika und Antiseptika

Grundsätzlich ist festzustellen, dass Antiseptika in der Regel ein breiteres Wirkspektrum als Antibiotika haben. Die meisten der am häufigsten verwendeten Hautdesinfektionsmittel sind bakterizid, fungizid und wirksam gegen eine Vielzahl pathogener Viren. Octenidin (z.B. Wirkstoff von Octenisept®), das sowohl zur Haut- und Schleimhaut- als auch zur Wunddesinfektion als ein Standardmittel verwendet wird, ist laut Aussage des Herstellers gegen Bakterien, Pilze, Hefen und einige lipophile Viren wirksam. Ähnlich oft verwendet werden Povidion-Iod-Präparate wie Betaisodona®, die eine vergleichbare Wirksamkeit haben. Polyhexanid dagegen deckt keine Viren ab und ist ausschließlich bakterizid und fungizid (Daeschlein 2013). Mafenidacetat gehört zur Gruppe der Sulfonamide

und ist somit ein äußerlich angewendetes Antibiotikum. Es wird hauptsächlich in der Verbrennungschirurgie als lokales Bakterizid verwendet.

Antibiotika wirken im Allgemeinen äußerst spezifisch. Definitionsgemäß sind Antibiotika Substanzen, die ausschließlich gegen Prokaryonten wirken, selten wirken Stoffe diese Gruppe aber auch gegen Protozoen, zum Beispiel Sulfadiazin als Sulfonamid-Antibiotikum gegen Toxoplasmose oder Doxycyclin gegen Malaria (Boggild et al. 2014).

Es gibt nur wenige „Breitbandantibiotika“, die gegen ein großes Spektrum gram-negativer und –positiver Bakterien wirkungsvoll sind. Darunter z.B. Aminopenicilline, Cephalosporine und Fluorchinolone. Diese werden oft für eine kalkulierte Chemotherapie verwendet, bei welcher der Erreger nicht bekannt ist und es gilt, eine große Anzahl möglicher pathogener Keime abzudecken. Viele Antibiotika haben jedoch durch ihre gegebene Funktionsweise oder durch bakterielle Resistenzbildung ein stark begrenztes Spektrum, wie z.B. Aminoglykoside oder Glykopeptide.

Sowohl im Fall der Antiseptika als auch im Fall der Antibiotika ist wegen ihrer unterschiedlichen Wirksamkeiten immer eine gezielte Therapie gegen einen nach Möglichkeit genau bestimmten Keim zu empfehlen.

1.2.4 Auswahl der Antiseptika

In der Wundtherapie spielen Antiseptika eine entscheidende Rolle, da bedingt durch die eingeschränkte Durchblutung der häufig kritischen Wunden systemisch angewandte Antibiotika nicht in den adäquaten Konzentrationen das Wundgebiet erreichen. Für die Auswahl der Antiseptika für diese Arbeit wurden solche erwogen, die in der klinischen Situation mit großer Regelmäßigkeit zum Einsatz kommen. Des Weiteren wurden lediglich antimikrobielle Lösungen ausgewählt, die bei der Behandlung tieferer Wunden verwendet werden und nicht zur reinen Hautdesinfektion. Die endgültige Auswahl umfasst fünf handelsübliche Antiseptika: Octenisept®, Betaisodona®, Prontosan®, Lavasept®, sowie das topisch eingesetzte Antibiotikum Mafenid.

1.2.4.1 Octenisept®

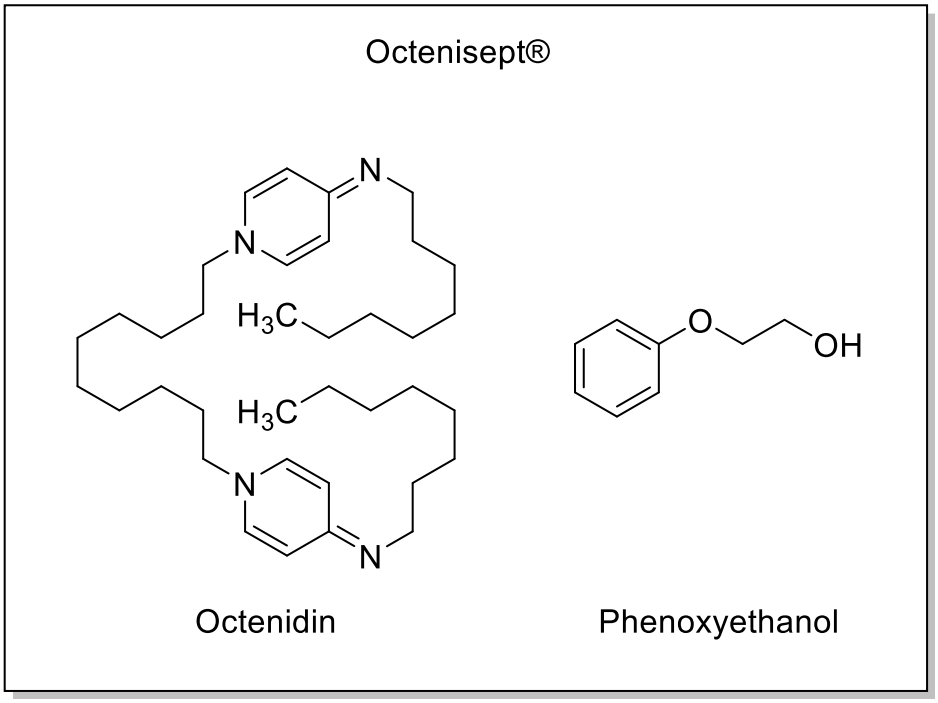

Abbildung 1: Chemische Strukturen der einzelnen Wirkstoffe von Octenisept®.
links: der Hauptwirkstoff Octenidin; rechts: Phenoxyethanol.

Octenisept® ist ein Kombinationspräparat aus Octenidin als Dihydrochlorid, das zur chemischen Gruppe der Bispyridine gehört, und Phenoxyethanol (s. Abb. 1). Der Hauptwirkstoff Octenidin ist ein kationenaktiver Wirkstoff, der sich gegen die Zellwand oder Zellmembran von Mikroorganismen richtet (Christiansen 1988).

Vor mehr als 20 Jahren eingeführt, ist es auf Grund seiner schnellen Wirksamkeit und Effizienz ein Standard-Antiseptikum in Europa geworden und wird für die Haut-, Schleimhaut- und Wunddesinfektion eingesetzt. (Assadian 2016, Daeschlein 2013, Hubner et al. 2010, Kim et al. 2017, Koburger et al. 2010). Das Produkt der Firma Schülke & Mayr GmbH, das in dieser Arbeit verwendet wurde, besitzt eine Wirkstoffkonzentration von 0,1 % Octenidindihydrochlorid und 2,0 % Phenoxyethanol. Octenisept® wirkt sowohl bakterizid gegen grampositive und gramnegative Bakterien, viruzid gegen lipophile Viren, mikrobizid gegen *Trichomonas vaginalis* sowie fungizid, jedoch nicht sporizid (Eldeniz et al. 2015, Harke 1989, Kung et al. 2016b). Es wird standardmäßig gegen Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Kolonisierung eingesetzt, zur Vorbereitung der Harnblasen-Katheterisierung und zur Wunddesinfektion (Danilevicius et al. 2015a). Darüber hinaus zeigt es eine gute antiinfektive Aktivität als Nahtmaterial-Umhüllung, an Insertionsstellen peripherer und zentraler Katheter, als Wundverbands-Bestandteil und auf chronischen Wunden

wie venösen Beinulcera (Bilir et al. 2013, Dettenkofer et al. 2002a, Hammerle & Strohal 2016b, Moritz et al. 2014a, Obermeier et al. 2015).

Allerdings sind auch gehäuft Komplikationen bei der Anwendung von Octenisept® aufgetreten wie z.B. chemisch induzierte Peritonitis nach abdominal-Lavage, prolongierte Ödeme, Nekrosen und Gewebsschwellungen, so wie Hand-Phlegmonen bei Kindern (Franz & Vogelin 2012, Hulsemann & Habenicht 2009, Hupuczi & Papp 2005, Parlakgumus et al. 2005, Schupp & Holland-Cunz 2009a). Daher wird von dem Gebrauch des Antiseptikums unter hohem Druck oder ohne Abfluss in tiefen Geweben gewarnt (Kim et al. 2017).

Es besteht eine experimentell bestätigte Zytotoxizität gegen Keratinozyten, Fibroblasten und Chondrozyten (Hirsch et al. 2009b, Hirsch et al. 2010, Jenull et al. 2015a, Muller & Kramer 2005b).

1.2.4.2 Polyhexanid

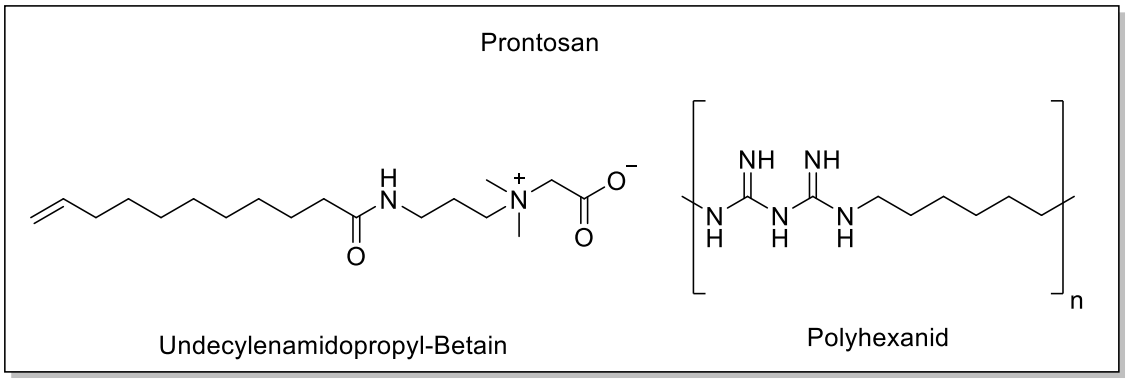

Abbildung 2: Strukturelle Darstellung der Wirkstoffe in Prontosan®.
links: Undecylenamidopropyl-Betain; rechts: Polyhexanid.

Polyhexymethylenbiguanid (Polyhexanid) (s. Abb. 2 rechts) wird unter anderem auch als Wirkstoff in Prontosan® und Lavasept® verwendet (Egli-Gany et al. 2012). Prontosan® enthält neben Polyhexanid auch noch Undecylenamidopropyl-Betain (s. Abb. 2).

In dieser Arbeit wurde mit einer Spüllösung Prontosan® gearbeitet mit je 0,1 % Undecylenamidopropyl-Betain und 0,1 % Polyhexanid. Lavasept® hingegen hat nur Polyhexanid als Wirkstoff, wird allerdings mit Ringer-Lösung verdünnt. In dieser Arbeit wurde mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration von 4 mg/ml Polyhexanid in Ringer-Lösung gearbeitet, was einer Konzentration von 0,4 % entspricht.

Polyhexanid wurde in den 1980ern erstmals wissenschaftlich vorgestellt und ist ein Breitspektrum-Antiseptikum mit guter Gewebstoleranz und wenigen Anwendungsrisiken (Kaehn 2010, Roth & Brill 2010). Es ist bakterizid, sowohl gegen gramnegative, als auch grampositive Stämme, und es wurde eine viruzide Wirkung gegen den Papilloma-Virus nachgewiesen (Anderson et al. 2013, Banovic et al. 2013, Fabry et al. 2006, Koban et al. 2012, Kuznetsova et al. 2015, Wiegand et al. 2017). Polyhexanid-haltige Antiseptika werden für infizierte akute oder chronische Wunden empfohlen, da der Wirkstoff eine gute Verträglichkeit und Gewebegängigkeit hat. Zudem konnten Eberlein und Assadian zeigen, dass er wundheilungsfördernd ist (Eberlein & Assadian 2010). Wiederum zeigten Boer *et al.* eine zytotoxische Wirkung bzgl. der Repopularisierung dezellularisierter Carotidenimplantate durch Endothelzellen und Fibroblasten (Boer et al. 2013a). Der generelle Konsens ist jedoch, dass das Mittel wenig bis nicht zytotoxisch ist, speziell auch gegen mesenchymale Stammzellen (MSZ) (Hirsch et al. 2010, van Meurs et al. 2014).

Auch die beiden in dieser Arbeit ausgewählten Polyhexanid-Präperate, Prontosan® und Lavasept®, haben ähnliche Anwendungsgebiete. Beide sind ein gutes Mittel zur Behandlung chronischer Wunden, entweder als Spüllösung oder in einem Wundverband (Bellingeri et al. 2016, Horrocks 2006, Napavichayanun et al. 2016). Es ist möglich, sie bei Verbrennungen 2. Grades anzuwenden und bei Infektionen orthopädischer Prothesen oder Osteomyelitis (Daeschlein et al. 2007a, Dettmers et al. 2016, Kuznetsov et al. 2009, Lehner et al. 2011).

Um einen Vergleich der Wirkstoffkonzentrationen und eine Aussage über die Wirkung des Zusatzwirkstoffs von Prontosan® machen zu können wurden zu jedem der Stoffe Versuche angesetzt.

1.2.4.3 Betaisodona®

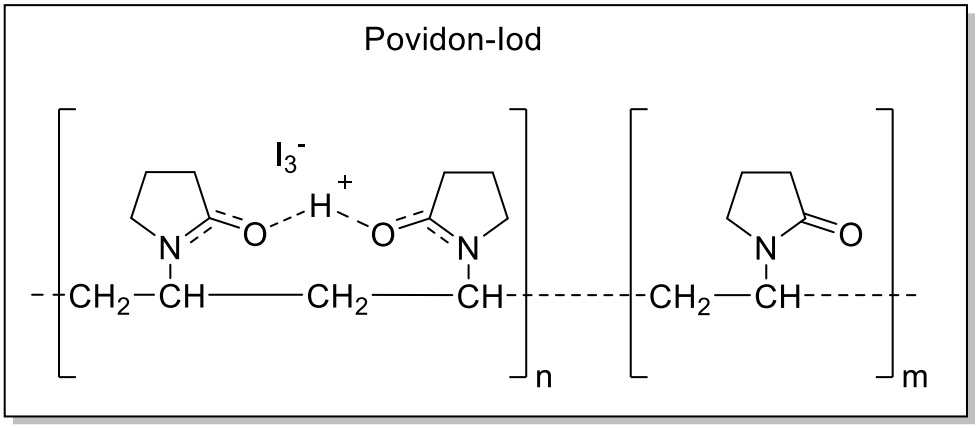

Abbildung 3: Strukturelle Darstellung von Povidon-Iod (Betaisodona®)

Iod wird schon seit mehr als 150 Jahren als Antiseptikum verwendet, die heute gebräuchliche, weiterentwickelte Lösung zur Desinfektion enthält Iod und Polyvinylpyrrolidon (Povidon) (s. Abb. 3) und ist in Deutschland unter anderem unter dem Handelsnamen Betaisodona® bekannt (Durani & Leaper 2008a). In dieser Arbeit wurde das Produkt der Firma Mundipharma mit der Wirkstoffkonzentration 100 mg/ml verwendet.

Wie Octenisept® hat Betaisodona® ein breites antibakterielles Wirkspektrum. Zusätzlich ist es fungizid und viruzid (Bonowitz et al. 2001, Capriotti et al. 2016, Durani & Leaper 2008a, Pinto et al. 2015). Es wird unter anderem zur Wunddesinfektion, antiseptischen Desinfektion von Operationsgebieten, MRSA-Eradikation und auf chronischen Wunden wie venösen Beinulcera verwendet und kann sogar bei Verbrennungen eingesetzt werden (Bennett et al. 2001, Darouiche et al. 2010, O'Meara et al. 2014, Rode et al. 1981, Srinivas et al. 2015). Es sind allerdings Infektionen durch intraoperative Spülung mit Povidion-Iod bekannt und der Wirkstoff ist nachweislich zytotoxisch für Keratinozyten, Fibroblasten und Osteoblasten (Cabral & Fernandes 2007, Damour et al. 1992, Hirsch et al. 2009b, Mueller et al. 2015). Im Gegensatz zu Octenisept®, gibt es für Betaisodona® unterschiedliche Erkenntnisse über die Frage seiner zytotoxischen Wirkung auf Chondrozyten (Muller & Kramer 2005b, Schaumburger et al. 2010).

1.2.4.4 Mafenidacetat

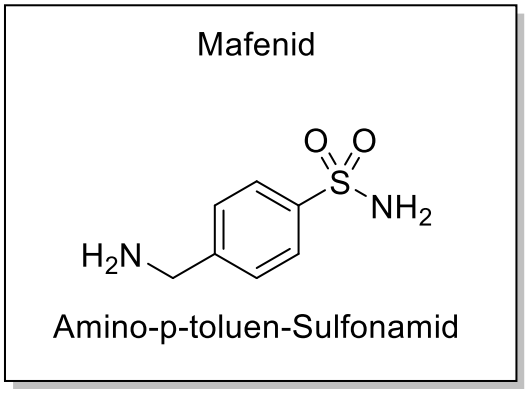

Abbildung 4. Strukturelle Darstellung von Amino-*p*-toluen-Sulfonamid.

Der Wirkstoff von Mafenid ist Amino-*p*-toluen-sulfonamidmonoacetat (Mafenidacetat), das zu der Gruppe der Sulfonamide gezählt wird (s. Abb. 4). Es wird von der Firma Fagron mit einer Wirkstoffkonzentration von 5 % hergestellt.

Es wirkt bakteriostatisch, was bedeutet, dass es Bakterien nicht abtötet, aber an der Vermehrung hindert, und ist teilweise fungizid (Barsoumian et al. 2013, Ibrahim et al. 2014b). Es wird hauptsächlich für Verbrennungen, vor allem für schwere Verbrennungen eingesetzt, wobei es sich im Vergleich mit Konkurrenten, wie Povidion-Iod-basierte Antiseptika, behauptet (Bennett et al. 2001, Rode et al. 1981). Auch bei Brandwunden im Gesicht und auf den Ohren wird es verwendet, ist hier jedoch anderen Agenzien (Cloramphenicol 3 %, Prednisolon 5 % oder Bacitracin) unterlegen (Haik et al. 2005). Es findet auch Einsatz bei Wunden, die nicht durch Verbrennung verursacht sind, zum Beispiel bei chronischen Wunden. Jedoch ist die Anwendung dabei nicht komplikationsfrei. Generell kann es bei der Applikation zu starken Schmerzen kommen, außerdem ist eine systemische Azidose als Reaktion möglich. Der Wirkstoff fördert durch die Veränderung des PH-Wertes und die fehlende fungizide Wirkung auf bestimmte Pilze die Ausbreitung von *Candida*-Spezien (Barillo 2002, Berger 2002, Breton 2001b).

Zudem beeinträchtigt Mafenidacetat die Wundheilung, verursacht lokale Immun-Dysfunktionen, langanhaltende Inflammationsreaktionen und somit eine Retardierung des Heilungsprozesses (Maghsoudi et al. 2011b, Zahmatkesh et al. 2015a, Zapata-Sirvent & Hansbrough 1993). Der Wirkstoff ist zytotoxisch gegen Keratinozyten, Fibroblasten und Osteoblasten (Barsoumian et al. 2013, Boyce et al. 1999). Trotz seiner Nachteile wird Mafenid allgemein als Mittel mit eher spezifischem Anwendungsgebiet geschätzt und der Gebrauch ist verbreitet.

1.2.5 Zytotoxizität von Antibiotika und Antiseptika auf Keratinozyten, Fibroblasten und sonstige Zellen

Es wurden bereits viele Untersuchungen und Studien zu der Zytotoxizität von Antibiotika und Antiseptika auf verschiedene Zelltypen der Haut durchgeführt. Der Fokus lag besonders auf der Auswirkung auf Keratinozyten, dem am häufigsten vorkommenden Zelltyp der Epidermis. Der allgemeine Konsens ist, dass die meisten Antiseptika in klinisch gebräuchlichen, aber auch schon sehr viel geringeren Konzentrationen, zytotoxisch auf Keratinozyten wirken (Damour et al. 1992, Fromm-Dornieden et al. 2015, Hirsch et al. 2009b, Hirsch et al. 2010, Kolbenschlag et al. 2012, Tatnall et al. 1990, Teepe et al. 1993).

Viele dieser Studien erfassen auch die Wirkung auf Fibroblasten. Hier verhielten sich Antibiotika und Antiseptika ähnlich zytotoxisch wie bei Keratinozyten. (Muller & Kramer 2008, Thomas et al. 2009).

Weitere Studien zeigen einen ähnlich negativen Effekt auf menschliche Chondrozyten (Schaumburger et al. 2010), Osteoblasten und Endothelzellen (Ince et al. 2007a). Meist wurden die Versuche *in vitro* an menschlichen Zellen durchgeführt, es gab aber auch Untersuchungen an verschiedenen Kleintiermodellen, so z.B. an Ovarien am Hamstermodell (Muller & Kramer 2006).

Die meisten Ansätze betrachten die Auswirkungen von Antibiotika und Antiseptika auf Bestandteile der Haut - und untergeordnet des Bindegewebes - als erstes Gewebe, das bei einer Verwundung mit Mikroorganismen und somit auch mit Antiseptika in Berührung kommt. Aber sobald eine Wunde über die sehr dünne Schicht der Haut hinausgeht, ist auch das subkutane Fettgewebe im Fall einer Infektion betroffen. Eine Kontamination ist in diesem Fall oft gefährlicher, da das subkutane Fettgewebe zur diffusen Infektionsausbreitung neigt und die große Gefahr der Infektion tieferer Gewebsschichten besteht. Für die Infektion aseptischer Wunden nach einer Operation ist adipöses Fettgewebe ein gut untersuchter Risikofaktor (Lee et al. 2016, Lee et al. 2011). Dies lässt vielleicht sogar einen Zusammenhang zwischen der Wahrscheinlichkeit einer Infektion von Wunden und der Adipositas vermuten. Aber Fettgewebe hat auch ein großes regeneratives Potential und spielt eine aktive Rolle in der Wundheilung (Aoki et al. 2004, Campbell et al. 2010, Hassan et al. 2014, Kim et al. 2007, Lee et al.

2012, Moon et al. 2012, Schmidt & Horsley 2013, Sugihara et al. 2001, Toyserkani et al. 2015b).

Fettgewebe kommt regelmäßig in Kontakt mit Antiseptika, vor allem bei Krankheitsbildern der plastischen Chirurgie: Präventiv, z.B. bei der Desinfizierung im Rahmen der Operationsvorbereitung bei Wunden oder auch beim Ausspülen von infizierten Wunden, in Wundverbänden oder einfach als Teil der Routine eines Verbandwechsels (Kim et al. 2017). Im Hinblick auf diese häufige Exposition und die Eigenschaften von Fettgewebe ist es umso interessanter und wichtiger, seine Reaktion auf Antiseptika zu erforschen.

1.3 Fettgewebe

1.3.1 Aufbau des Fettgewebes

In allen lockeren Bindegeweben des Körpers finden sich vereinzelt Adipozyten, um kleine Gefäße herum und in kleinen Ansammlungen eingebettet in Fasern. Die Gewebe, in denen sie akkumulieren und zur Gewebs-definierenden Zell-Art werden, nennt man deshalb Fettgewebe. Hier haben sie eine an Drüsenkörper erinnernde Struktur, in Läppchen, die durch bindegewebliche Septen voneinander getrennt sind. Alle Läppchen sind permanent am Metabolismus beteiligt und daher reich vaskularisiert.

Das Fettgewebe beinhaltet neben Fett- und Bindegewebszellen und Gefäßen auch Zellen des Immunsystems, die je nach Zustand des Gewebes rekrutiert werden und ihre immunologische Funktion exekutieren. Adipozyten gehen - so wie auch Bindegewebszellen - aus mesenchymalen Stammzellen hervor, die sich deswegen in großer Zahl in Fettgewebe finden lassen. (Petersen 2013)

1.3.2 Physiologie und Funktion von Fettgewebe

Fettgewebe ist ein wichtiges Bindegewebe des menschlichen Organismus. Es besteht vorwiegend aus sogenannten Adipozyten, Fettzellen. Zunächst muss man univakuoläres (weißes) von peurivakuolärem (braunem) Fettgewebe unterscheiden. Letzteres dient der Wärmeerzeugung und ist beim Erwachsenen

nur noch in kleinen Mengen vorhanden. Man unterscheidet außerdem Arten von univakuolärem Fettgewebe nach ihren verschiedenen Eigenschaften. Den größten Teil des Fettgewebes eines Menschen bildet das „Speicherfett“, das sich hauptsächlich im Unterhautbindegewebe, den Mesenterien und dem Peritoneum befindet. Die Adipozyten speichern Energie in Form von Fettsäuren und können diese Energie bei Bedarf auch wieder freisetzen. Daher ist Speicherfett eine wichtige Energieressource des Menschen (Petersen 2013). Zudem sekretiert es Hormone und hat somit Anteil an der endokrinen Homöostase des Körpers. Eine andere Funktion dieses Fetts beschreibt sich mit dem Begriff „Isolierfett“. Neben seiner Funktion als Energiespeicher dienen besonders die Fettschichten des Unterhautgewebes, im Bauchraum und um die Niere der Temperaturerhaltung des Körpers.

Baufett ist ein strukturelles Element zur Einbettung und druckelastischen Polsterung anderer Körperstrukturen. Beispiele dafür sind die Fettpolster an Ferse und Sohlenballen, in der Orbita (*Corpus adiposum orbitae*), an der Wange (*Corpus adiposum buccae*) und der „Hoffa-Fettkörper“ im Kniegelenk. Dieses Fett nimmt nicht am regulären Energiestoffwechsel teil und wird nur in extremen Mangelsituationen verbraucht (Petersen 2013).

Es gibt Hinweise auf immunologische Einflussnahme des Fettgewebes (Blüher 2014). Fettgewebe spielt außerdem eine wichtige Rolle für die Gewebsregeneration, was vor allem am Beispiel von Zellen des Bindegewebes und der Haut untersucht wurde. Es stellt Gewebsmodulatoren und Zytokine bereit und nimmt damit Einfluss auf Entzündungsprozesse und Wundheilung (Aoki et al. 2004, Campbell et al. 2010, Hassan et al. 2014, Kim et al. 2007, Lee et al. 2012, Moon et al. 2012, Schmidt & Horsley 2013, Sugihara et al. 2001, Toyserkani et al. 2015b).

1.3.3 Mesenchymale Stammzellen

MSZ können in verschiedenen Geweben, meist in perivaskulären Nischen, gefunden werden. Aber vor allem werden sie aus Knochenmark, Blut, Fettgewebe, Placenta und umbilikalem Blut gewonnen (Hass et al. 2011). Sie sind multipotent und wurden durch die „International Society for Cellular Therapy“ (ISCT) durch das minimale Kriterium des Nachweises der Oberflächenmarker

CD73, CD90, CD105 definiert. Oft werden zusätzlich CD29 und CD34 genutzt (Davies et al. 2015, Dominici et al. 2006, Kim et al. 2017, Suga et al. 2009).

Ihre Fähigkeit zur Unterstützung der Gewebsregeneration bei Inflammation, Wunden und sogar manchen Krebs-Arten hat sie zu der am häufigsten untersuchten Stammzellsorte gemacht (Hass et al. 2011, Wang et al. 2013). Vor allem Fettgewebe, als ein sich aus dem Mesoderm entwickelndes Gewebe (Minteer et al. 2013), hat sich als reiche Quelle für MSZs erwiesen (Bunnell et al. 2008, Zuk et al. 2001). Zusätzlich ist es leicht zugänglich. Die hier vorkommenden, adipogenen MSZ können zu Knochen-, Knorpel-, Muskel- und Fettgewebe, so wie zu Keratinozyten, Fibroblasten und Endothelzellen differenzieren.

1.3.4 MSZ in der Wundheilung

Auf Grund der oben genannten Eigenschaften der MSZs wird die Möglichkeit ihres Einsatzes zur Therapie vieler Krankheitsbilder intensiv erforscht. Hierzu gehören Osteoarthritis, Diabetes mellitus, Herzkrankheiten und andere (Hassan et al. 2014, Kern et al. 2006, Lee et al. 2012, Minteer et al. 2013, Shingyochi et al. 2015, Toyserkani et al. 2015b). Ein anderes Anwendungsgebiet ist die Wiederherstellung von Weichgewebe. Diese könnte therapeutisch bei der Behandlung von chronischen Wunden und bei der Rekonstruktion nach Operationen, wie Mastektomien und Gesichtschirurgie, oder bei anderen Einsatzmöglichkeiten des Tissue Engineering zur Anwendung gebracht werden (Minteer et al. 2013).

Eine große Rolle hierfür spielt auch die Beteiligung der Zellen in der Wundheilung. MSZ greifen aktiv in die Entzündungsreaktion ein, indem sie Einfluss auf die Ausschüttung von Zytokinen von dendritischen Zellen, T-Zellen, T-Helferzellen und natürlichen Killerzellen verschieben, sodass weniger Interferon γ und Interleukin 4 freigesetzt wird. Zudem regulieren sie die Zahl der regulatorischen T-Zellen (T regs) hoch und hemmen die B- und T-Zell-Proliferation (Aggarwal & Pittenger 2005a, Augello et al. 2007b).

Auch der direkte Einfluss von Fettgewebe auf die Gewebsregeneration ist gut untersucht. Durch Bereitstellung von Zytokinen, aber auch direkt durch Differenzierung der MSZ (Aoki et al. 2004, Campbell et al. 2010, Hassan et al.

2014, Kim et al. 2007, Lee et al. 2012, Moon et al. 2012, Schmidt & Horsley 2013, Sugihara et al. 2001, Toyserkani et al. 2015b). Dies wurde in *in vitro*-Versuchen bestätigt, die den Einfluss der Anwesenheit von Fettgewebe/MSZ auf die Teilungsrate von Keratinozyten und Fibroblasten untersucht haben. In anderen Versuchen wurde die Kultivierung von Keratinozyten oder Fibroblasten mit zuvor durch MSZ konditioniertem Nährmedium vorgenommen. Viele Studien sind sich einig über die positive Auswirkung beider Ansätze auf die so simulierte Wundheilung (Campbell et al. 2010, Kim et al. 2007, Lee et al. 2012, Moon et al. 2012). Aufgrund dieser Eigenschaften werden MSZ mit anderen Vorläuferzellen, Fibroblasten, T regs und Makrophagen zusammen in die Gruppe der „adipose derived regeneratory cells“ (aus Fettgewebe stammende, regenerative Zellen) gerechnet (Kesten & Fraser 2016).

Die häufigste Zellart des Fettgewebes sind zwar die Adipozyten, aber MSZ sind deren direkte Vorläuferzellen und haben einen wichtigen Anteil zu den Wundheilungs- und regulatorischen Eigenschaften des Fettgewebes. Sie sind insofern eine einflussreiche, charakterisierende Zellart des Gewebes, weswegen sie spezifisch in dieser Arbeit untersucht werden.

2 Zielsetzung

MSZ spielen eine bestimmende Rolle für die endokrinen, die immunologischen und die gewebsregeneratorischen Fähigkeiten des Fettgewebes. Sie kommen bei der Behandlung von tiefen Wunden mit exponiertem Fettgewebe regelmäßig in Kontakt mit verschiedenen Antiseptika. In dieser Arbeit soll die zytotoxische Wirkung ausgewählter Antiseptika und lokaler Antibiotika auf MSZ ermittelt werden. Spezifisch sollen die Auswirkungen auf die Viabilität, adipogene Differenzierung, sowie Nekrose/Apoptose der MSZ in einem *in vitro*-Setting untersucht werden.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien, die nicht mit einem Firmennamen verbunden sind, stammen aus der Hausapotheke des Uniklinikums Aachen.

Tabelle 1: In dieser Arbeit eingesetzte Materialien

Chemikalie	**Hersteller**
3-Isobutyl-1-Methylxanthin (IBMX)	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt
AlamarBlue™ Cell Viability Reagenz	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA
Aqua bidest.	
Basic Fibroblast Growth Factor (bFGF)	Biochrom GmbH, Berlin
Betaisodona® Lösung	Mundipharma GmbH, Frankfurt am Main
Bovine Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich Corporation, St Louis, MO, USA
Calciumchloird ($CaCl_2$)	Merck KGaA, Darmstadt
Collagenase: Typ CLS I	Biochrom GmbH, Berlin
D-(+)- Glucose	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt
Dexametason	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt
DMEM/F-12 (1:1) (1X) + GlutaMAX™-I	Gibco®; Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
Ethanol	AppliChem GmbH, BioChemical Chemical Synthesis Services, Darmstadt
Fetal Calve Serum (FCS)	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
HEPES Pufferan®	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe

Hoechst 33342: Trihydrochloride, trihydrate	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt
Insulin	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	Carl Roth GmbH&Co.KG, Karlsruhe
Isopropanol	Merck KGgA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA, Darmstadt
Lavasept® Konzentrat 20 %	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Mafenide Acetate	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid Lösung 0,9 % (NaCl-Lösung 0,9%)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Octenisept® Wunddesinfektion	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt
Oil Red O	Fluka BioChemika, Buchs, Schweiz
Paraformaldehyd (PFA) - Paraformaldehyd-Lösung (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt
Phosphate Buffered Saline Dulbecco (PBS)	Biochrom GmbH; Berlin
Polyihexanid-Lösung 20 %	Fagron GmbH&Co.KG, Rotterdam, NL
PrestoBlue™ Cell Viability Reagent	Life Technologies Corporation; Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
Prontosan® Wundspüllösung	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Propidiumiodid Lösung	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt
Ringer Lösung	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Rosiglitazon	LKT Laboratories Inc., St. Paul, MN, USA
Sterillium	BODE Chemie GmbH, Hamburg
Transferrin	Sigma-Aldrich; Merck KGaA, Darmstadt

Triiodthyronin (T3)	Sigma-Aldrich; Darmstadt	Merck KGaA,
Trypsin, in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) gelöst	Sigma-Aldrich; Darmstadt	Merck KGaA,

3.1.2 Geräte

Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Geräte

Gerät	**Hersteller**
ALJ160-NM Waage	Kern&Sohn GmbH, Balingen
Autoclav	Thermo Fisher Scientific Systec, Wettenberg
Brutschrank BBD 6220	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Brutschrank HERAcell® 240	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Feinwaage	Sartorius AG, Göttingen
Gefrierschrank -20 °C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Gefrierschrank -73 °C	Jewett, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Hera Cell Vios 250i CO_2	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
Heraeus Multifuge 3SR+ Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA
Inverses Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena
Kühlschrank 4 °C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Magnetrührer: MR 3002	Heidolph Instruments GmbH&Co., Schwabach
Neubauer-Zählkammer	BLAUBRAND®; Brand GmbH&CoKG, Wertheim
Reader: FluoStar OPTIMA	BMG LABTECH GmbH, Offenburg

Sterile Werkbank, Uniflow Biohazard	UniEquip Laborgerätebau & Vertriebs GmbH, Martinsried, Planegg
TELAVAL 31 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Jena
Vortex: REAX 2000	Heidolph Instruments GmbH&Co., Schwabach
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
Zentrifuge, Minifuge T®	Heraeus Holding GmbH, Hanau

3.1.3 Plastikmaterialien

Tabelle 3: In der Arbeit eingesetzte Plastikmaterialien

Gerät	**Hersteller**
12- Well-Platten Cellstar®	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
24-Well-Platten: Multiwell	Corning Inc., Corning, NY, USA
Stripette® 5, 10, 25 ml	Corning Inc., Corning, NY, USA
6 Well-Platten Falcon	Corning Inc., Corning, NY, USA
96-well-Platte für colorimetrische Messungen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
BD-Discardit II Sterile Filter: Millex GP 0,22 µm	Merck KGaA, Darmstadt
Cellstar^{r} Cell culture dishes 145/20 mm	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen
EpT.I.P.S Reloads	Eppendorf AG, Hamburg
Filter 250 µm Porengröße	neoLab Migge GmbH, Heidelberg
Handschuhe: nitrile powder free Medical Examination Gloves	Abena GmbH, Zörbig

Kryoröhrchen Low Temperature Freezer Vials	VWR International Co, West Chester, PA, USA
Multipette	Eppendorf AG, Hamburg
Netzgerät	Pharmacia LKB Biotechnology AB, Uppsala, Schweden
Nunc-Immunoplate: F96 Maxisorp	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Parafilm „M" ®Laboratory film	Bemis Company Inc., Neenah, WI, USA
Pipetten 0,5, 20, 100, 200, 1000 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten: Combitips plus 0,5 ml, 2,5 ml, 5,0 ml, 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettenspitzen 1000 µl, 200 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Pipettenspitzen 20 µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe: Multipette® M4	Eppendorf AG, Hamburg
Pipettierhilfe: Pipetus-akku	Hirschmann-Laborgeräte GmbH&Co.KG, Eberstadt
Polystyrene Round-bottom tube-Falcon 5ml	Corning Science Mexico SA, Reynosa, Tamaulipas, Mexiko
PS Microplate: 96-Well, flat bottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reagiergefäße (Safe-lock Tubes) 1,5 ml, 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Schwämme	Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, USA

Selecta Faltenfilter	SCHLEICHER + SCHÜLL GmbH, Whatman plc, Maidstone, Vereinigtes Königreich
Sterile Syringe Filter 0,2 µm	Corning Inc., Corning, NY, USA
Sterilfilter 22 µm	Corning Inc., Corning, NY, USA
TC-Schale 100	Sarstedt AG&Co.KG, Nümbrecht
Zentrifugenröhrchen: 50 ml	Sarstedt AG&Co.Kg, Nümbrecht

3.1.4 Puffer und Lösungen

3.1.4.1 Paraformaldehyd-Lösung

Die Lösung zur Fixierung wurde mit der Paraformaldehyd (PFA) - Konzentrationslösung der Firma Merck KGaA aus Darmstadt und Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) der Firma Biochrom GmbH aus Berlin angesetzt. Die Endkonzentration des Wirkstoffs war 4%.

3.1.4.2 Kollagenase-Lösung

Für die Zubereitung der Kollagenase-Lösung wurde zunächst der Kollagenase-Puffer (s. Tabelle 4) hergestellt. Zur Fertigstellung der Kollagenase-Lösung wurde bovines Serumalbumin (BSA) und die Kollagenase (s. Tabelle 5) erst kurz vor Gebrauch zum Puffer gegeben.

Tabelle 4: Zusammensetzung des Kollagenase-Puffers

Reagenz	**Konzentration**
HEPES	100 mM
NaCl	120 mM
KCl	50 mM

CaCl	1 mM
Glucose	5 mM

Tabelle 5: Zusätze für die Herstellung der Kollagenase-Lösung

Reagenz	Konzentration
BSA	1 %
Kollagenase Typ I	0,2 %

3.1.4.3 Kultivierungsmedien

Die Zellen wurden mit DMEM/F-12 (1:1) (1X) + GlutaMAX™-I der Firma Gibco®; Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA inkubiert. Dem Medium wurden hierzu andere Bestandteile zugemischt, wie in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: Zusammensetzung des Nährmediums zur normalen Kultivierung

Reagenz	Konzentration
FCS	10 %
Penicillin/Streptomycin	1 %
bFGF	1 ng/ml

Weiterhin wurden zwei Medien zur adipogenen Differenzierung verwendet, „Hauner 1“ und „Hauner 2“. Die Zusätze hierfür sind in Tabelle 7 dargestellt. Das verwendete Medium „Hauner 2“ wurde aus den gleichen Reagenzien wie für „Hauner 1“ hergestellt, nur IBMX und Rosiglitazon entfielen.

Tabelle 7: Zusammensetzung der beiden Hauner-Medien zur adipogenen Differenzierung

Reagenz	Konzentration
Penicillin/Streptomycin	1 %
IMBX	2 % (nur Hauner 1)
Rosiglitazon	0,5 % (nur Hauner 1)
Transferrin	0,4 %

Dexamethason	0,4 %
Insulin	0,015 %
T3	0,01 %

3.1.4.4 Oil Red-O Assay

Zur Testung der adipogenen Differenzierung wurde der Oil Red-O Assay verwendet. Hierfür wurde eine Stammlösung angesetzt, die bis zu ein Jahr genutzt werden konnte. Sie bestand aus Oil Red-O, dem 30 % Isopropanol (99 %) zugesetzt wurde.
Zur Herstellung der Arbeitslösung wurde die Stammlösung in einem Verhältnis von 3:2 mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Lösung wurde für 10 min inkubiert und dann durch ein Whatman paper filtriert. Die Lösung musste innerhalb von drei Stunden verwendet werden.

3.1.4.5 Lavasept® und Polyhexanid

Lavasept® wurde in der 20 % Konzentration von der Firma B.Braun Melsungen AG geliefert und durch uns, entsprechend der Empfehlung des Herstellers, 1:500 mit Ringer-Lösung (ebenfalls von der Firma B. Braun Melsungen AG) verdünnt, sodass die in den Experimenten angewandte Konzentration 0,04 % Polyhexanid-Wirkstoff entsprach. Der Hersteller empfiehlt eine Gebrauchskonzentration von 0,02 – 0,04 %. Die höhere Konzentration wurde gewählt, um eine optimale Vergleichbarkeit mit dem Produkt der Hausapotheke des Klinikums herzustellen, das ebenfalls eine Wirkstoffkonzentration von 0,04 % Polyhexanid hatte. Dieses Produkt wurde aus einer 20 % Polyhexanid-Lösung der Firma Fagron GmbH&Co.KG und Ringer-Lösung ebenfalls im Verhältnis 1:500 (B. Braun Melsungen AG) hergestellt.

3.1.5 Software

Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Software

Software	Anbieter
Diskus Fluoreszenzmikroskop	Leica Mikrosystems GmbH
Prism 7	GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA
SPSS Statistics 25	International Business Machines Corp. , Armonk, NY, USA
Word, Version 16.19	Microsoft Corp., Redmond, WA; USA
Excel, Version 16.19	Microsoft Corp., Redmond, WA; USA

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinnung der MSZ aus humanen Proben

Das humane Fettgewebe wurde von der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie des Universitätsklinikums der RWTH Aachen zur Verfügung gestellt.

Die Studie wurde von der Ethikkommission unter der laufenden Nummer EK163/07 genehmigt und alle Experimente wurden unter Beachtung und Befolgung der Prinzipien der Deklaration von Helsinki zu ethischen Richtlinien der medizinischen Forschung am Menschen durchgeführt. Die Proben wurden von 12 Patienten in unauffälligem gesundheitlichem Zustand, mit einem mittleren Alter von 42,01 ± 17 Jahren als *en bloc* Präparat oder Lipoaspirat gewonnen. Von den Patienten waren sieben weiblich und fünf männlich. Alle Patienten hatten sich entweder Liposuktionen oder Lappenplastiken im Universitätsklinikum Aachen unterzogen. Die Entnahmestellen waren Abdomen, Fuß oder Mamma. Die Proben wurden aus dem OP abgeholt und ohne weitere Verzögerung für die Experimente vorbereitet. Eine Übersicht der Patienten ist in Tabelle 9 dargestellt.

Tabelle 9: Form und Stelle der Gewebsentnahme, sowie das Alter und Geschlecht (w = weiblich; m = männlich) der jeweiligen Patienten.

Patient Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	Entnahmestelle	Form
1	w	49	Abdomen	Lipoaspirat
2	m	21	Abdomen	Lipoaspirat
3	w	65	Fuß	Lipoaspirat
4	w	13	Abdomen	Lipoaspirat
5	w	62	Mamma	Lipoaspirat
6	m	21	Mamma	Lipoaspirat
7	m	43	Abdomen	Lipoaspirat
8	w	58	Abdomen	*en bloc*
9	w	45	Abdomen	Lipoaspirat
10	m	59	Abdomen	Lipoaspirat
11	m	28	Mamma	*en bloc*
12	w	41	Abdomen	Lipoaspirat

Alle Schritte der Stammzellgewinnung wurden unter streng sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die *en bloc* Präparate wurden zunächst manuell zerkleinert, die Fettläppchen isoliert und vom umgebenden Bindegewebe getrennt. Die Kollagenase-Lösung wurde frisch angesetzt und durch einen 0,2 µm Spritzenfilter filtriert. Die isolierten Fettläppchen wurden im Verhältnis 1:1 in die Kollagenase-Lösung gegeben und manuell weiter zerkleinert. Nachdem die Suspension 45 min bei 37 °C in einem Schüttelinkubator mit 250 U/min inkubiert worden war, wurde sie durch einen 250 µm-Filter filtriert und die Zellen wurden bei 300 x *g* für 10 min sedimentiert. Daraufhin wurde sowohl die ölige Phase sowie der wässrige Überstand entfernt. Das Zellsediment wurde in 30 ml PBS-Lösung suspendiert und erneut mit 300 x *g* sedimentiert. Anschließend wurde das Zellsediment in 10 ml Nährmedium suspendiert. Zur Quantifizierung der Zellen wurde die Zell-Konzentration mittels Neubauer-Kammer bestimmt. Es wurden jeweils 2 ml Zellsuspension pro Platte auf mehrere 10 ml-Petri-Schalen überführt und mit Nährmedium auf 10 ml aufgefüllt.

Die Lipoaspirat-Proben wurden in einem 50 ml-Zentrifugenröhrchen mit 10 –

20 ml 0,9 % NaCl-Lösung verdünnt und dann mit 300 x *g* für 10 min zentrifugiert. Die ölige obere Phase wurde entfernt und die mittlere Schicht, das Fettgewebe, mit einer Pipette in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt. Die Kollagenase-Lösung wurde im Verhältnis 1:1 zu dem Fettgewebe gegeben. Die weiteren Schritte der Isolierung erfolgten wie bei den *en bloc* Präparaten.

3.2.2 Inkubation und Passagierung

Die Inkubation erfolgte bei 37 °C und 5 % CO_2. Als Nährmedium für die auf Proliferation ausgerichteten Experimente und einfache Inkubation diente das in 3.2.1 beschriebene Kultivierungsmedium.

Das Kultivierungsmedium wurde zweimal pro Woche gewechselt, die Proben jede Woche passagiert. Entsprechend der Zellmenge wurden die Zellen hierbei entweder auf 10 ml- oder auf 25 ml-Platten neu ausgesät. Für die Passagierung wurde das Medium entfernt, die Platten einmal mit PBS-Lösung gewaschen und mit Trypsin/EDTA (3 ml für 10 ml-Platten, 5 ml für 25 ml-Platten) 5 min inkubiert. Nach einer Kontrolle der Ablösung der Zellen vom Plattenboden via Mikroskop wurde der Trypsinverdau mit 1 ml FCS pro Platte gestoppt und die Zellsuspension in ein 50 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Platten wurden mit jeweils 10 ml PBS-Lösung gewaschen, die dann ebenfalls in das Zentrifugenröhrchen überführt wurden. Die Suspension wurde mit 300 x *g* für 10 min zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und das Zellsediment mit 10 ml Kulturmedium suspendiert. Die Zellkonzentration wurde mittels Neubauer-Kammer ermittelt und die Zellsuspension entsprechend der absoluten Zellzahl auf 10 ml- bzw. 25 ml-Petrischalen aufgeteilt. Alle Experimente wurden mit Zellen der ersten bis dritten Generation durchgeführt. Durch diese Selektion sollte eine Annäherung der proliferativen Potentiale der einzelnen Proben hergestellt werden, die in höheren Passagen ihre Proliferationsaktivität reduzieren

3.2.3 Messung der Viabilität der MSZ

Für die Behandlung der MSZs mit verschiedenen Antiseptika wurden je 7000 Zellen pro Well in eine 24-Well-Platte in 500 µL Kultivierungsmedium gegeben und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Konzentrationen der Antiseptika (s. 3.2.2) für 5 min behandelt. Als Kontrolle wurde ein Ansatz mit reinem Nährmedium ohne Zusätze, so wie ein Ansatz mit 0,9 % NaCl-Lösung als Ersatz für die Antiseptika mitgeführt.

Tabelle 10: Für den Viabilitätsansatz verwendete Antiseptika und ihre Konzentrationen

Antiseptikum	verwendete Konzentration
Octenisept®	1, 2,5, 5, 7,5, 10, 25 %
Betaisodona®	1, 2,5, 5, 7,5, 10, 25 %
Prontosan®	1, 2,5, 5, 7,5, 10, 25 %
Lavasept®	1, 2,5, 5, 7,5, 10, 25 %
Mafenid	1, 2,5, 5, 7,5, 10, 25 %

Für den Versuchsansatz zur Viabilitätstestung wurde zunächst das gleichmäßige Wachstum und die Adhäsion der Zellen in jedem Well mittels Mikroskopie überprüft. Die erste Messung der Viabilität wurde mit Hilfe des AlamarBlue-Assays durchgeführt, indem jeweils 50 µl des Reagenzes dem Nährmedium hinzugefügt wurden, was einer Verdünnung von 1:10 entspricht. Nach 90 min wurden Proben des Nährmediums mit AlamarBlue abgenommen und entsprechend Tabelle 5 für die doppelte Messung in eine 96-Well-Platte überführt. Die Absorption wurde bei 570 nm bestimmt. Später wurde vom Produkt AlamarBlue auf PrestoBlue gewechselt und die Inkubationszeit auf 20 min angepasst, was sich für die Aussagekraft der Ergebnisse als ausreichend erwies. Als Blank wurde Kulturmedium mit Färbung aus einem Well ohne Zellen verwendet.

Anschließend wurde das restliche Nährmedium abgenommen und die Wells wurden einmal mit vorgewärmten 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Die Antiseptika wurden in den jeweiligen Konzentrationen mit Nährmedium verdünnt, zu 200 µl pro Well appliziert und 5 min inkubiert. Daraufhin wurden die Lösungen

abgenommen und die Wells dreimal mit vorgewärmter 0,9 % NaCl-Lösung gespült. Sie wurden erneut mit 500 µl Nährmedium befüllt und es wurde sofort ein erneuter Viabilitätsassay durchgeführt (siehe oben). Die neuen Werte wurden zu den vorherigen Werten in Relation gesetzt, wobei die unbehandelten Werte als Grundlage dienten und somit als 100 % genutzt wurden.

So wurde an den postexperimentellen Tagen 1 bis 5 alle 24 Stunden verfahren und die Ergebnisse des Assays jeweils in Relation zu dem ersten Assay (vor Behandlung) gesetzt.

3.2.4 Nekrose/Apoptosebestimmung

Die Nekrose/Apoptose-Bestimmung wurde mit den zuvor für den Viabilitätsassay verwendeten Zellen direkt nach der Behandlung, an Tag 1 nach der Behandlung und direkt nach der letzten Messung an Tag 5 vorgenommen. In die Wells wurde jeweils 1 µl Propidiumiodid und genauso viel Hoechst-Reagenz gegeben und für 5 min inkubiert. Das Nährmedium wurde aus den Wells entfernt und sie wurden dreimal mit PBS-Lösung gespült. Danach wurden sie mit 4 % PFA-Lösung für 10 min fixiert. Die Lösung wurde abgesaugt und die Wells wurden erneut mit PBS-Lösung gespült. Anschließend wurde jedes Well mit 250 µl PBS-Lösung befüllt und die Proben wurden sofort fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet.

3.2.5 Messung der adipogenen Differenzierung

Für die Messung der Differenzierungsmöglichkeiten der Zellen nach Behandlung mit Antiseptika wurden sie zunächst zu 400.000 Zellen/Well auf drei 12-Well Platten ausgesät und etwa 24 Stunden mit Kulturmedium bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit den in Tabelle 11 aufgelisteten Antiseptika in entsprechenden Konzentrationen behandelt.

Tabelle 11: Für den Differenzierungsansatz verwendete Antiseptika und Konzentrationen

Antiseptikum	verwendete Konzentration
Octenisept®	1, 2,5, 5, 7,5 %
Betaisodona®	1, 2,5, 5, 7,5 %
Prontosan®	1, 2,5, 5, 7,5 %
Lavasept®	1, 2,5, 5, 7,5 %
Mafenid	1, 2,5, 5, 7,5 %

Die Behandlung erfolgte analog zu der Behandlung der Proben für den Viabilitätsassay. Zunächst wurde das Kulturmedium entfernt und die Wells wurden einmal mit vorgewärmter 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Die Antiseptika wurden in den jeweiligen Konzentrationen mit Kulturmedium verdünnt, zu 500 µl pro Well appliziert und 5 min belassen. Daraufhin wurden die Lösungen entfernt und die Wells dreimal mit vorgewärmter 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Danach wurde nicht das übliche Nährmedium sondern das Differenzierungsmedium „Hauner 1“ zu 500 µl pro Well appliziert. Davon ausgenommen war das Well, das ausschließlich mit Kulturmedium behandelt werden sollte, als Kontrolle. Alle zwei Tage fand ein Mediumswechsel statt, nach einer Woche wurde zu dem Medium „Hauner 2“ gewechselt. Die Behandlung wurde noch für eine weitere Woche fortgeführt. Nach 14 Tagen wurde zur Testung der Differenzierung ein Oil-Red-Assay durchgeführt. Hierfür wurde zunächst aus der Stammlösung die Arbeitslösung hergestellt.

Die Platten wurden vor der Anwendung des Oil Red-O Assays zweimal mit PBS gewaschen und mit 4 % PFA-Lösung bei Raumtemperatur für 20 min fixiert. Die Lösung wurde entfernt, die Wells wurden mit PBS gewaschen. Für den Differenzierungsassay wurden 500 µl der filtrierten Lösung in jedes Well mit Zellen gegeben und in ein Well ohne Zellen, das als Vergleichswert (Blank) diente. Nach 15 min wurde die Lösung entfernt und die behandelten Wells wurden vorsichtig 3-mal mit destilliertem Wasser gewaschen. Daraufhin wurde der Farbstoff mit 500 µl Isopropanol pro Well für 15 min unter Zuhilfenahme eines Plattenschüttlers aus den Zellen gelöst. Zur Messung wurden 100 µl aus jedem Well im Doppelansatz in eine 96-Well-Platte überführt. Die Licht-Absorption der Proben wurde bei 510 nm gemessen und gegen den Blank ausgewertet.

In einem zweiten Ansatz wurden die Antiseptika (nach einigen Vorversuchen) in Konzentrationen von 0,05 und 0,1 % in den Differenzierungsmedien zugesetzt, sodass die Zellen, statt einmal 5 min lang behandelt zu werden, unter dem kontinuierlichen Einfluss der Antiseptika standen. Die NaCl-Probe wurde mit 0,1 % NaCl-Lösung in Differenzierungsmedium angesetzt. Die Auswertung mittels Oil-Red erfolgte wie bei dem ersten Ansatz zur Differenzierungsbestimmung.

3.2.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurde zu der Aufbereitung der Rohdaten zunächst Excel, Version 16.19 der Firma Microsoft Corp. verwendet. Die Box-Plots zur spezifischen Auswertung einzeln betrachteter Tage oder Antiseptika wurden ebenfalls mit Excel erstellt. Außerdem angewendet wurde das Programm Prism, Version 5.03 der Firma Graph-Pad Software Inc., das vor allem zur Erstellung graphischer Darstellungen, zur Durchführung des Tukey‘s multiple comparison test und des One Way ANOVA genutzt wurde. Als Signifikanzniveaus wurden die Abstufungen $p<0,05$, $p<0,01$ und $p<0,001$ zur differenzierteren Auswertung gewählt und in den Darstellungen graphisch kenntlich gemacht. Die Daten der Box-Plots werden als „mean ± SEM“ angegeben. Des Weiteren wurde das Programm SPSS, Version 24 und 25 der Firma International Business Mashine Corp. (IBM) verwendet.

Alle Ergebnisse wurden im Doppelansatz erstellt. Die Normalverteilung wurde mittels Shapiro-Wilk-Test gemessen.

4 Ergebnisse

4.1 Viabilitätsassay

Das Ergebnis eines Viabilitäts-Tests wird von der Stoffwechselaktivität lebender Zellen bestimmt. Der Wert setzt sich aus der Menge vorhandener, lebender Zellen und deren metabolischer Aktivität zusammen. Der Assay ist eine übliche Methode, um den Gesundheitszustand einer Zellkolonie zu bestimmen und eignet sich sehr gut dafür, einen generellen Eindruck von dem zytotoxischen Einfluss von Substanzen auf Zellen, wie hier Antiseptika auf MSZ, zu gewinnen.

Die Durchführung des Viabilitätsassays erfolgte direkt vor und nach der Behandlung und an jedem der fünf darauffolgenden Tage. Um einen direkten Vergleich herzustellen wurden die Antiseptika einander in den gleichen Konzentrationen gegenübergestellt. Die Messdaten vor Behandlung wurden für jedes Well individuell als 100% definiert (Daten nicht gezeigt) und alle folgenden Messwerte in Relation zu diesen gesetzt. Alle Ergebnisse werden als Mittelwert ±SEM dargestellt. Die Signifikanzen wurden mittels des One way ANOVA und Tukey's multiple comparison test ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen werden mittels Buchstaben über den betreffenden Säulen dargestellt. Die Agenzien werden mit o für Octenisept®, b für Betaisodona®, p für Prontosan®, l für Lavasept®, m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung und k für Kulturmedium abgekürzt. Dabei steht die Schreibweise x für ein $p<0,05$, *x* für ein $p<0,01$ und ***x*** für ein $p<0,001$.

Die Abbildungen 6 – 11 repräsentieren jeweils eine Konzentration der Antiseptika (1 %, 2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 % und 25 %). Die Diagramme sind nach Messtagen geordnet.

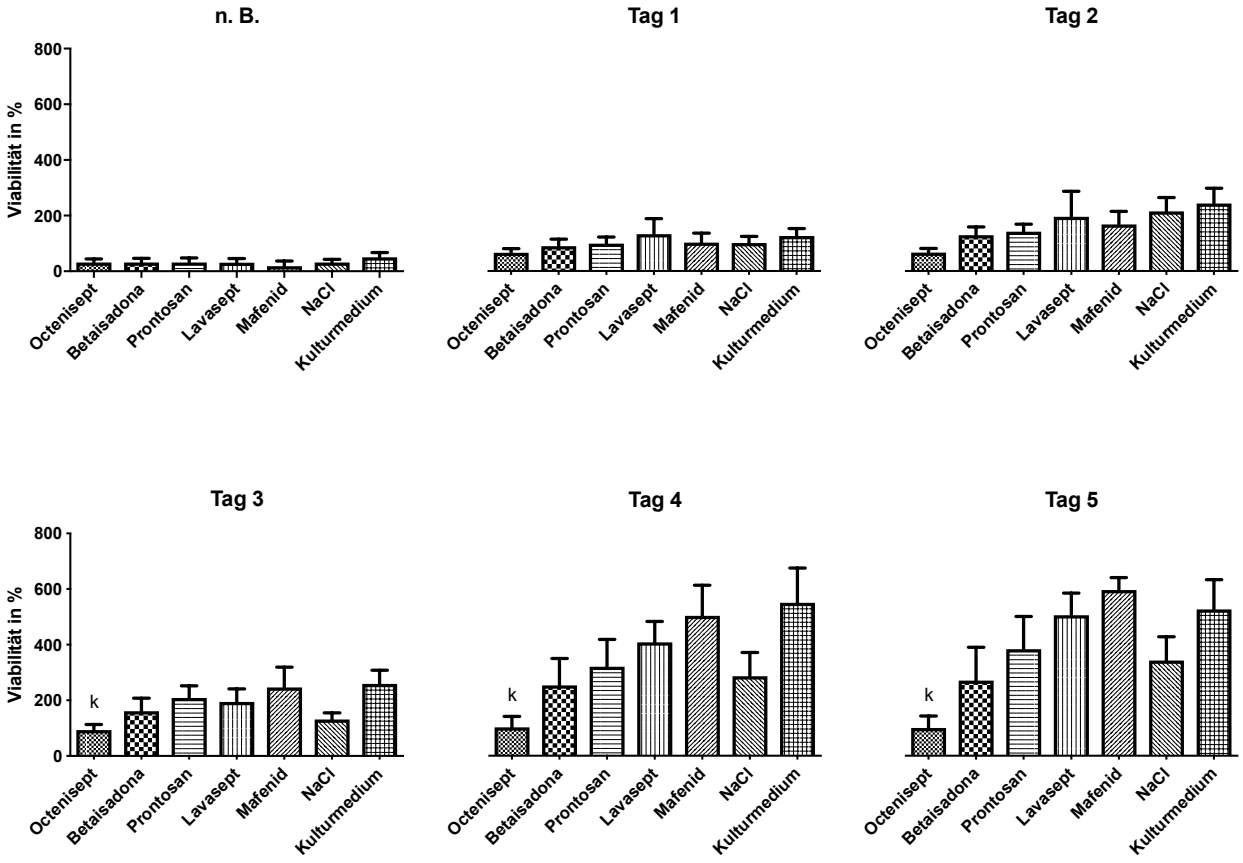

Abbildung 5: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 1 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium.
Die Messzeitpunkte waren direkt nach der Behandlung (n.B.), sowie nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen nach der Behandlung. Die Signifikanzen werden durch die Anfangsbuchstaben der jeweiligen Probe abgekürzt. Dabei steht o für Octenisept®, b für Betaisodona®, p für Prontosan®, l für Lavasept®, m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung und k für Kulturmedium. Zur Darstellung der Signifikanzen werden die Schreibweisen x für $p<0,05$, *x* für $p<0,01$ und ***x*** für $p<0,001$ verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels des One way ANOVA und Tukey's multiple comparison test ermittelt.

Abbildung 6 zeigt die Viabilität der MSZ nach Behandlung mit einer 1 % Antiseptika-Konzentration. Die Werte für die Viabilität der MSZ nach Behandlung mit 1 %-Lösungen Antiseptika zeigten noch nicht viele signifikante Unterschiede (Abb. 6). Die Viabilität aller MSZ stieg über die Messtage an. Dabei stieg die Viabilität von Octenisept® nur sehr gering und zeigte von Tag 3 bis Tag 5 einen signifikanten Unterschied mit $p<0,05$ zur Positiv-Probe (Kulturmedium). Generell waren erst ab dem 4. Tag leichte, aber nicht signifikante Unterschiede in der Viabilität zwischen den vier übrigen Antiseptika-behandelten Zellproben erkennbar. Dabei zeigte die Viabilität der Lavasept®- und Mafenid-Probe ab dem 4. Tag etwas höhere Werte als die der 0,9 % NaCl-Lösung-Probe, es waren jedoch keine Signifikanzen feststellbar. In der Konzentration von 1 % unterschied sich das Ergebnis der Mafenid-behandelten Zellen kaum von der Positiv-Probe. In dieser niedrigen Konzentration von 1 % zeigten sich nur kleine Unterschiede zwischen der zytotoxischen Wirkung von Betaisodona® und Prontosan®. Nach der Behandlung mit Betaisodona® ergaben sich an Tag 5 im Vergleich jedoch etwas schlechtere Werte.

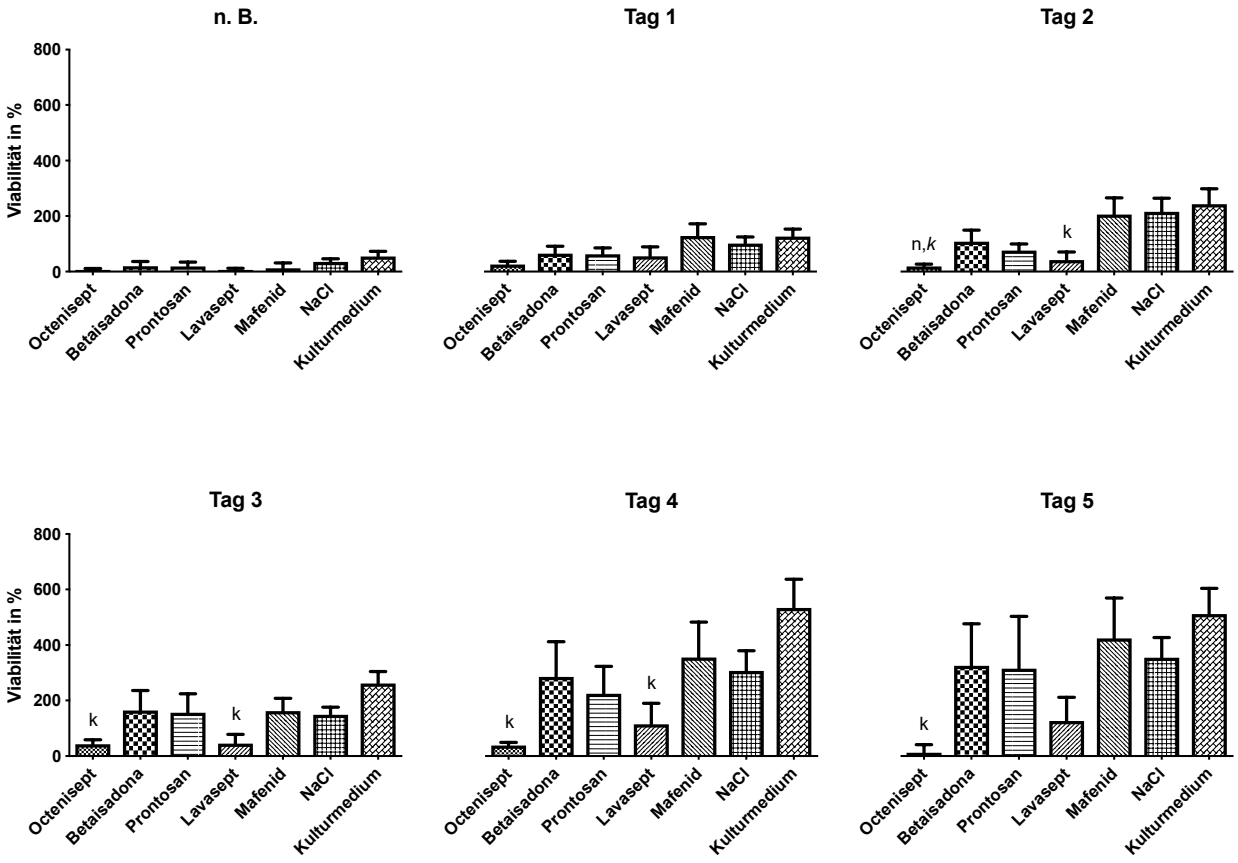

Abbildung 7: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 2,5 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium.
Die Messzeitpunkte waren direkt nach der Behandlung (n.B.), sowie nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen nach der Behandlung. Die Signifikanzen werden durch die Anfangsbuchstaben der jeweiligen Probe abgekürzt. Dabei steht o für Octenisept®, b für Betaisodona®, p für Prontosan®, l für Lavasept®, m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung und k für Kulturmedium. Zur Darstellung der Signifikanzen werden die Schreibweisen x für $p<0,05$, *x* für $p<0,01$ und ***x*** für $p<0,001$ verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels des One way ANOVA und Tukey's multiple comparison test ermittelt.

In Abbildung 7 zeigten die MSZ bei einer 2,5 % Verdünnung der Antiseptika schon an Tag 1 sehr unterschiedliche Ergebnisse. Octenisept® erwies sich auch in dieser Konzentration als das Antiseptikum, das die Viabilität am meisten beeinträchtigte, so dass diese auch nach 5 Tagen noch annähernd bei 0 % lag. Ab dem zweiten Messtag zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen der Octenisept®-Probe und der mit 0,9 % NaCl-Lösung behandelten Zellen mit $p<0,05$ und der Kulturmedium-Probe mit $p<0,01$. Die Zellen hatten nach der Behandlung mit Betaisodona®, Prontosan® und Lavasept® im Vergleich zu den Werten bei Behandlung mit der niedrigeren Konzentration etwas schlechtere Werte für die Viabilität. In der Konzentration von 2,5 % verhielt sich die Lavasept®- etwas ähnlicher zu der Octenisept®-Probe. Beide Proben unterschieden sich teilweise zu mehreren Zeitpunkten mit einer Signifikanz von $p<0,05$ von der Kulturmedium-Probe. Die Viabilitäten der Betaisodona®- und Prontosan®-Lösung und der 0,9 % NaCl-Kontrolle waren einander ab Tag drei sehr ähnlich. Die Werte für Mafenid waren erneut vergleichbar mit denen der Kulturmedium-Kontrolle.

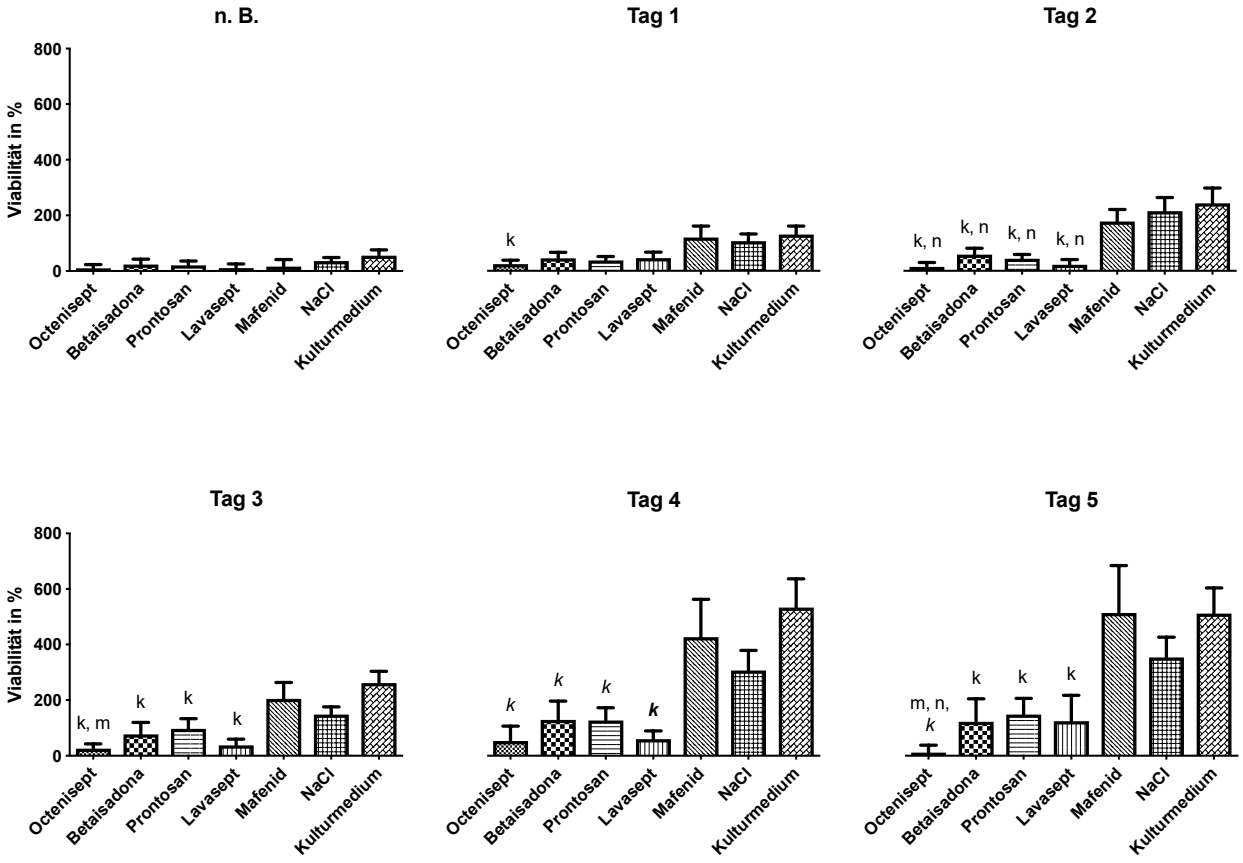

Abbildung 8: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 5 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium.
Die Messzeitpunkte waren direkt nach der Behandlung (n.B.), sowie nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen nach der Behandlung. Die Signifikanzen werden durch die Anfangsbuchstaben der jeweiligen Probe abgekürzt. Dabei steht o für Octenisept®, b für Betaisodona®, p für Prontosan®, l für Lavasept®, m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung und k für Kulturmedium. Zur Darstellung der Signifikanzen werden die Schreibweisen x für $p<0,05$, *x* für $p<0,01$ und ***x*** für $p<0,001$ verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels des One way ANOVA und Tukey's multiple comparison test ermittelt.

Die Ergebnisse der Zellen, die mit einer 5 % Konzentration der Antiseptika behandelt wurden (Abb. 8), unterschieden sich schon am ersten Tag nach der Behandlung stark von den Ergebnissen nach Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen. Alle Antiseptika-Proben außer Mafenid zeigten nun eine deutlich niedrigere Viabilität. Es gab nun bereits an Tag eins einen signifikanten Unterschied von $p<0,05$ zwischen der Octenisept®- und der Kulturmedium-Probe, der an späteren Tagen sogar $p<0,01$ betrug. Auch zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen Octenisept®, bzw. der 0,9 % NaCl-Lösung und Mafenid ($p<0,05$). Ab Tag zwei gab es Signifikanzen von $p<0,05$ zwischen den Proben von Betaisodona®, Prontosan® und Lavasept® gegenüber 0,9 % NaCl-Lösung und Kulturmedium, teilweise mit $p<0,01$. Bis zum fünften Tag nach der Behandlung waren die Werte der Zellen nach Behandlung mit Prontosan®, Betaisodona® und Lavasept® vergleichbar, während die mit Octenisept® behandelten Zellen nach wie vor etwa bei 0 lagen. Die Werte für die Mafenid-Probe waren auch in dieser Konzentration am fünften Tag nach der Behandlung vergleichbar mit denen der Kulturmedium-Probe.

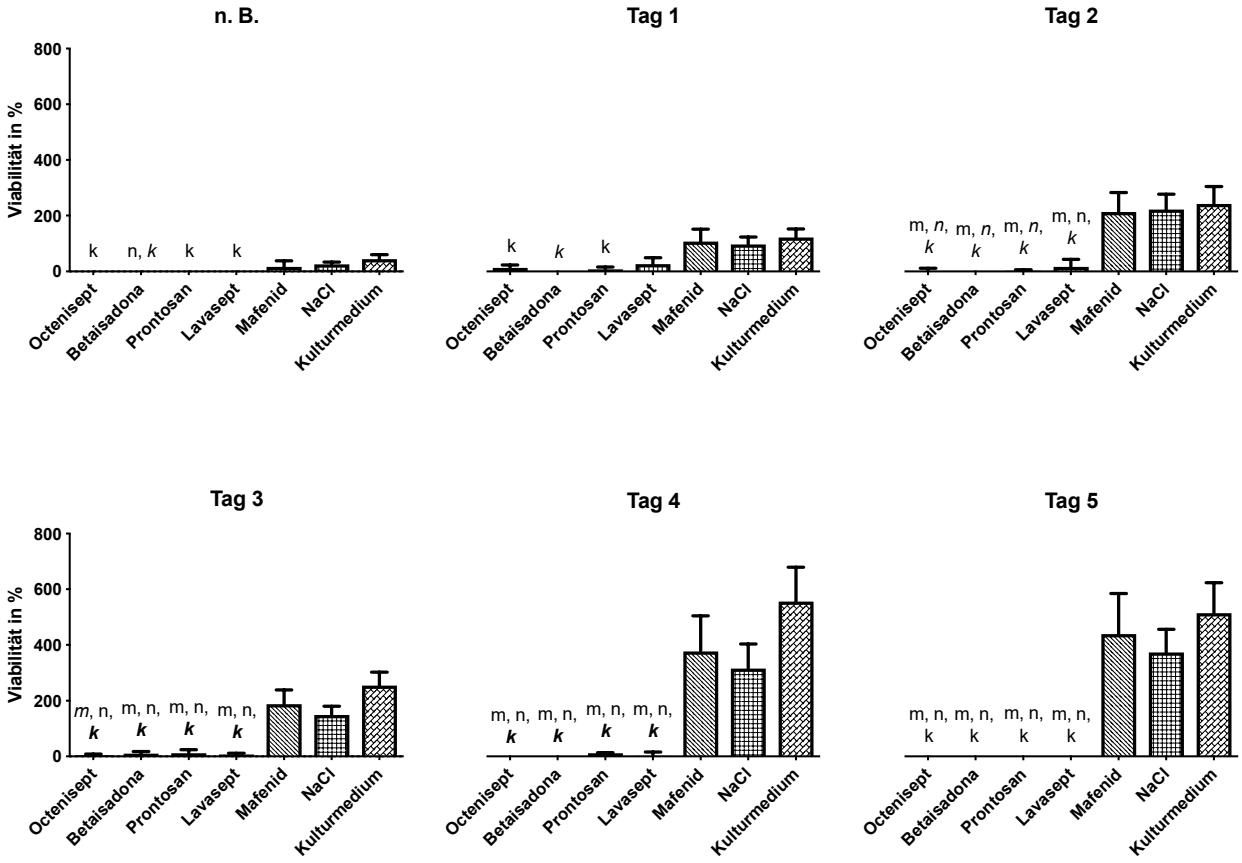

Abbildung 9: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 7,5 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium.
Die Messzeitpunkte waren direkt nach der Behandlung (n.B.), sowie nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen nach der Behandlung. Die Signifikanzen werden durch die Anfangsbuchstaben der jeweiligen Probe abgekürzt. Dabei steht o für Octenisept®, b für Betaisodona®, p für Prontosan®, l für Lavasept®, m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung und k für Kulturmedium. Zur Darstellung der Signifikanzen werden die Schreibweisen x für $p<0,05$, *x* für $p<0,01$ und ***x*** für $p<0,001$ verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels des One way ANOVA und Tukey's multiple comparison test ermittelt.

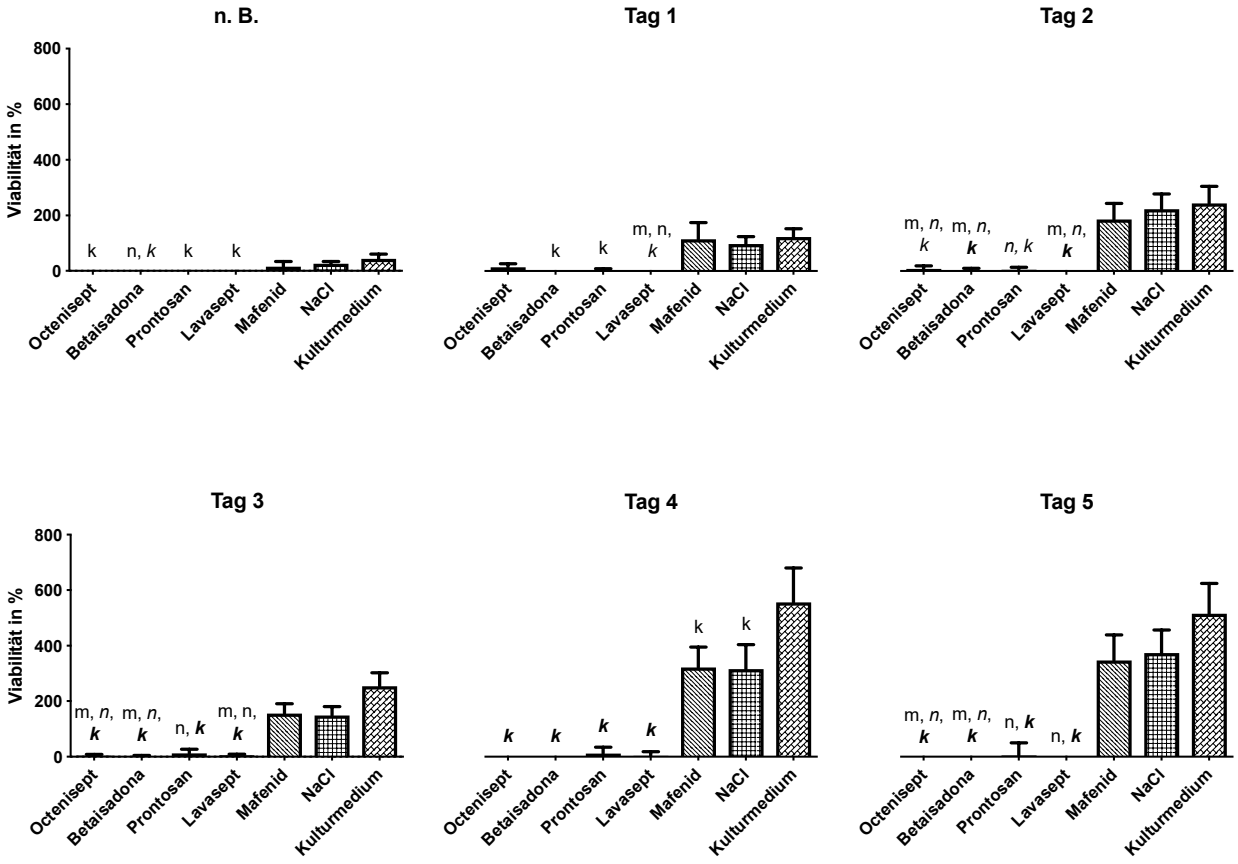

Abbildung 10: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 10 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium.
Die Messzeitpunkte waren direkt nach der Behandlung (n.B.), sowie nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen nach der Behandlung. Die Signifikanzen werden durch die Anfangsbuchstaben der jeweiligen Probe abgekürzt. Dabei steht o für Octenisept®, b für Betaisodona®, p für Prontosan®, l für Lavasept®, m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung und k für Kulturmedium. Zur Darstellung der Signifikanzen werden die Schreibweisen x für p<0,05, *x* für p<0,01 und ***x*** für p<0,001 verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels des One way ANOVA und Tukey's multiple comparison test ermittelt.

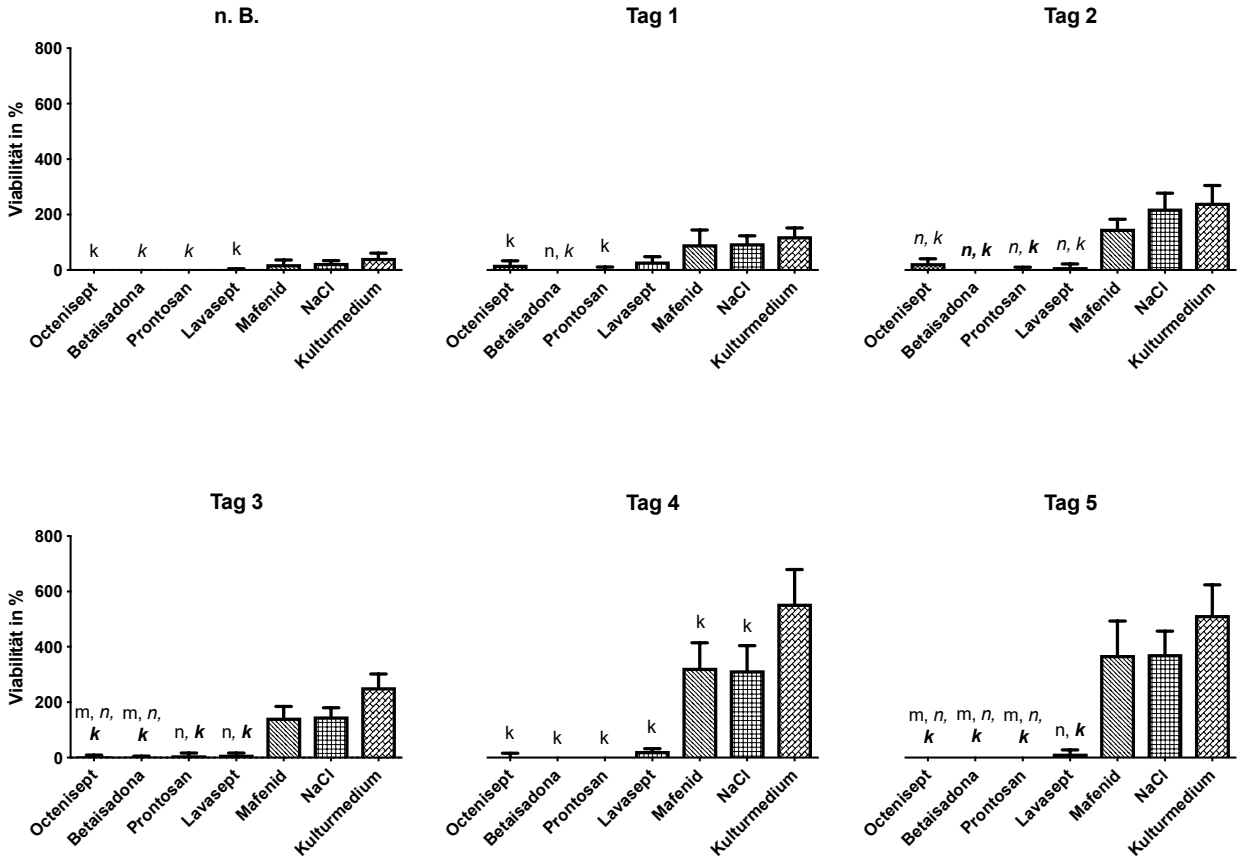

Abbildung 11: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 25 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium.
Die Messzeitpunkte waren direkt nach der Behandlung (n.B.), sowie nach 1, 2, 3, 4 und 5 Tagen nach der Behandlung. Die Signifikanzen werden durch die Anfangsbuchstaben der jeweiligen Probe abgekürzt. Dabei steht o für Octenisept®, b für Betaisodona®, p für Prontosan®, l für Lavasept®, m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung und k für Kulturmedium. Zur Darstellung der Signifikanzen werden die Schreibweisen x für $p<0,05$, *x* für $p<0,01$ und ***x*** für $p<0,001$ verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels ds One way ANOVA und Tukey's multiple comparison test ermittelt.

Ab der Konzentration von 7,5 % aufsteigend ähnelten sich die Ergebnisse für die Viabilität der Zellen, wie in den Abbildungen 9, 10 und 11 zu sehen. Ein deutlicher Sprung war im Unterschied von einer 5 %- zu einer 7,5 %-Lösung für alle Agenzien außer Mafenid zu erkennen. Auch die Ergebnisse für Prontosan®, Betaisodona® und Lavasept® unterschieden sich nun kaum mehr von 0 und stiegen auch kaum noch über die Tage an. Schon direkt nach Behandlung gab es signifikante Unterschiede zwischen der Octenisept®-, Prontosan®-, Betaisodona®- und Lavasept®-Probe und den Zellen ohne Behandlung (p<0,05). An den weiteren Tagen und bei den höheren Konzentrationen kommen signifikante Unterschiede zu der 0,9 % NaCl-Lösung-Probe und der Mafenid-Probe hinzu und die Signifikanzen erreichen p<0,01 und sogar p<0,001

Die Werte der mit Mafenid behandelten Zellen waren selbst bei einer 25 % Konzentration an allen Tagen vergleichbar mit denen der 0,9 % NaCl-Lösung- und der Kulturmedium-Probe. Bei den Konzentrationen von 10 % und 25 % gab es jedoch vereinzelt Signifikanzen im Unterschied zu der Positiv-Kontrolle (p<0,05).

4.1.1 Ergebnisse der mit Mafenid behandelten Zellen

Mafenid stach im Viabilitätsassay als das am wenigsten die Ergebnisse beeinflussende Agens heraus. In Abbildung 12 werden daher die Ergebnisse der Mafenid-Probe gesondert nach Tagen dargestellt.

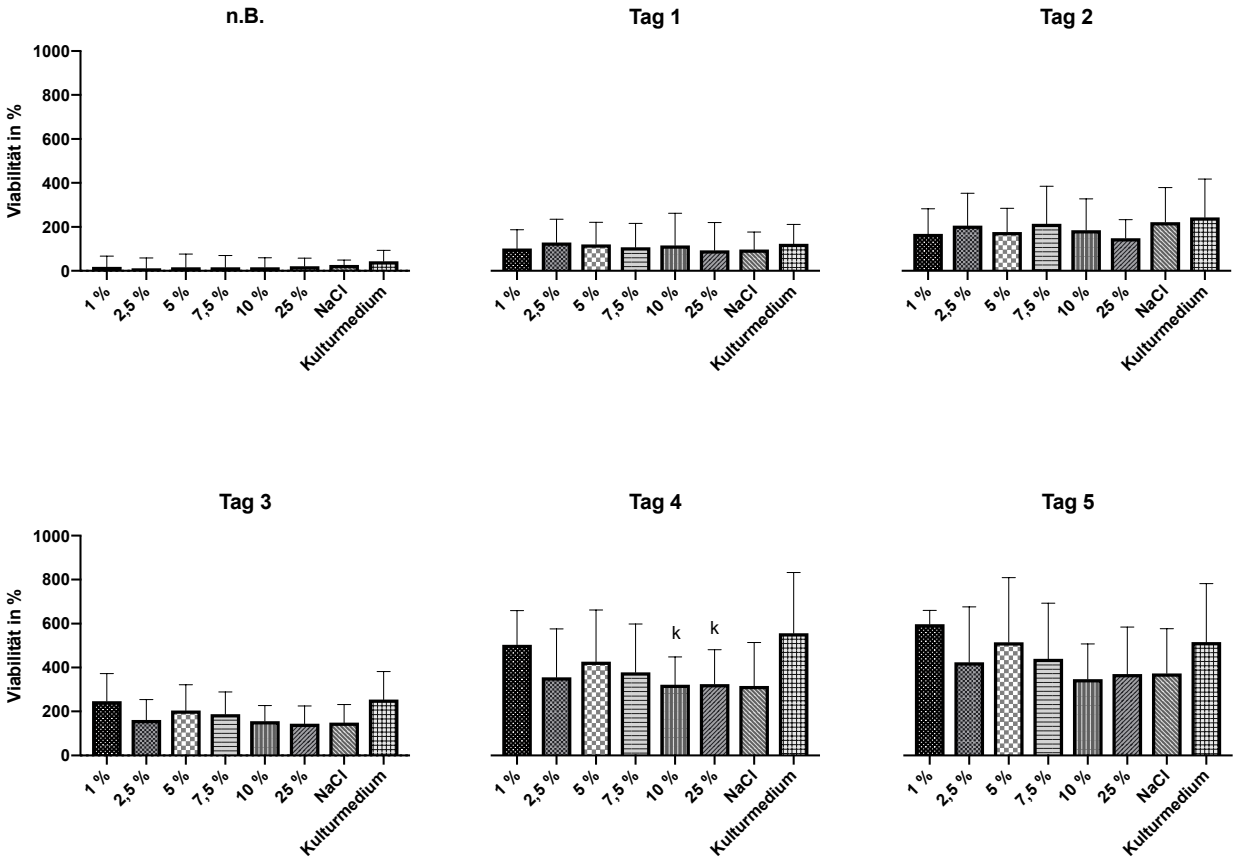

Abbildung 12: Viabilität der MSZ nach Behandlung mit Mafenid zu unterschiedlichen Konzentrationen direkt nach der Behandlung (n.B.), sowie 1, 2, 3, 4 und 5 Tage danach.
Die Signifikanzen werden durch die Anfangsbuchstaben der jeweiligen Probe abgekürzt. Dabei steht m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung und k für Kulturmedium. Zur Darstellung der Signifikanzen werden die Schreibweisen x für $p<0,05$ verwendet. Die Signifikanzen wurden mittels des One way ANOVA und Tukey's multiple comparison test ermittelt.

Die Ähnlichkeit zwischen allen Probeergebnissen ist sofort offensichtlich. Tatsächlich zeigten sich bis Tag 3 kaum Unterschiede zwischen den Konzentrationen. Ab Tag 4 schienen die Viabilitäten der MSZ nach Behandlung mit 10 % und 25 % niedriger als die nach Behandlung mit niedrigeren Konzentrationen. Es ergaben sich jedoch keine signifikanten Unterschiede, außer an Tag 4 zwischen 10 %, 25 % und der Kulturmedium-Probe. Tatsächlich waren selbst die Ergebnisse nach Behandlung mit den höheren Konzentrationen denen der Probe, die mit 0,9 % NaCl-Lösung behandelt wurde, sehr ähnlich.

4.2 Adipogene Differenzierung

Das Potential zur Differenzierung der MSZ in Adipozyten ist eine zentrale Eigenschaft dieser Zellen, die die regenerative Ressource des Fettgewebes bilden. Deswegen wurde diese Eigenschaft im zweiten Versuchsansatz dieser Arbeit untersucht.

4.2.1 Einmalige Behandlung

Die Differenzierungsversuche wurden durch die grundlegenden Modalitäten des Versuchsaufbaus sehr eingeschränkt. Viele Zellen waren durch die Antiseptika so beeinträchtigt, dass sie abstarben und somit, mit den Konzentrationen aufsteigend, nicht mehr statistisch erfassbar waren. Sehr oft war in den höheren Konzentrationen keine signifikante Menge an Zellen zur Auswertung mehr vorhanden. Um eine Verfälschung der Messung des Anteils der differenzierten Zellen zu verhindern, umfasst die Statistik nur das niedrigere Spektrum der Konzentrationen: 1 %, 2,5 %, 5 %, und 7,5 %. Die Ergebnisse sind in Abbildung 13 dargestellt. Die Probe des Differenzierungsmediums kann hierbei als Positiv-Probe, die des Proliferationsmediums als Negativ-Probe betrachtet werden. Die Signifikanzen wurden mittels des One way ANOVA und Tukey’s multiple comparison test ermittelt.

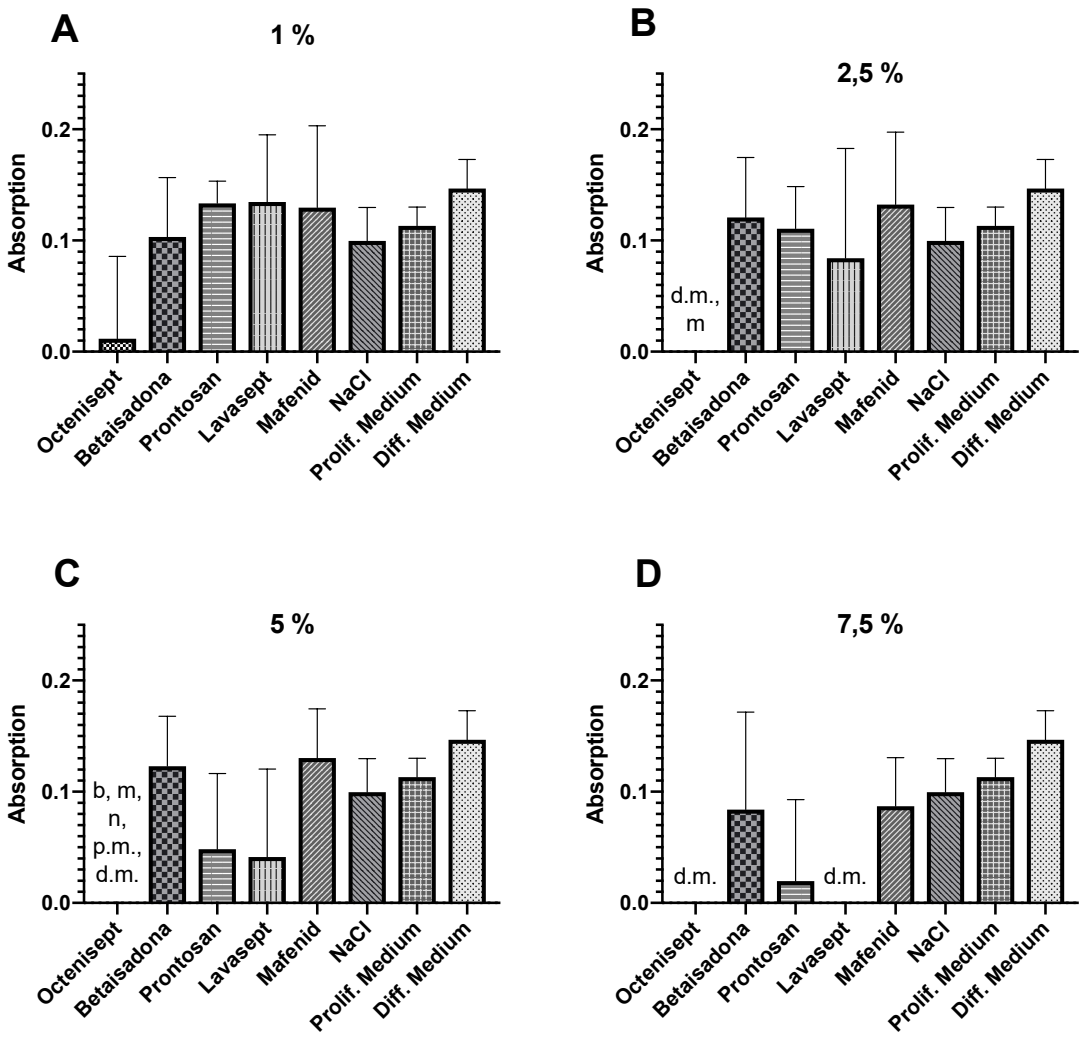

Abbildung 13: Bestimmung des Anteils der zu Adipozyten differenzierten MSZ nach einmaliger Behandlung mit verschiedenen Antiseptika zu 1 % (A), 2,5 % (B), 5 % (C) und 7,5 % (D) Konzentrationen.
Ausgewertet mittels Oil Red O, gemessen bei einer Wellenlänge von 518 nm. Darstellung der Signifikanzen: normal p<0,05 (bestimmt mit One way ANOVA und Tukey's multiple comparrison Test). Die Agenzien werden mit o für Octenisept®, b für Betaisodona®, p für Prontosan®, l für Lavasept®, m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung und p.m. Proliferationsmedium und d.m. für Differenzierungsmedium abgekürzt.

Nach der Behandlung der MSZ mit einer 1 %-Verdünnung der Antiseptika zeigten die Proben, bis auf die mit Octenisept® behandelten Zellen, keinen Unterschied zu der Negativ- oder der Positivprobe. Die Differenzierung war nach einer Behandlung der Zellen mit 1 % Octenisept® war jedoch bereits reduziert, wenn sich auch keine Signifikanz errechnen ließ. Ähnlich verhielt es sich bei den mit einer 2,5 % Konzentration behandelten Proben. Der Wert für die Lavasept®-Probe scheint im Vergleich zu der niedrigeren Konzentration geringer. Signifikante Unterschiede zeigten sich jedoch nur für Octenisept® im Vergleich zu der Differenzierungsmedium- (p<0,05) und der Mafenid-Probe (p<0,05). Die Behandlung mit einer 2,5 % sowie mit allen höheren Konzentrationen von

Octenisept® führt zu einem Mittelwert der Absorption, der sich unterhalb des Blanks befindet.

Nach der Behandlung mit 5 % konzentrierten Antiseptika waren die Werte der Prontosan®- und Lavasept®-Probe im Vergleich den kleineren Konzentration erniedrigt. Signifikante Unterschiede zeigten sich allerdings weiterhin nur für die Octenisept®-Probe im Vergleich zu der Betaisodona®-, Mafenid-, 0,9 % NaCl-Lösung- und Proliferationsmedium-Probe (p<0,05) sowie im Vergleich zur Differenzierungsmedium-Probe (p<0,01).

Für die letzte Konzentration von 7,5 % lag nunmehr auch der Mittelwert der Absorption der mit Lavasept® behandelten Zellen unterhalb des Blanks. Die Ergebnisse der Lavasept®- und Octenisept®-Probe zeigten mit p<0,05 einen signifikanten Unterschied im Vergleich zu der Probe des Differenzierungsmediums. Die Werte für Prontosan® zeigten eine starke Streuung, waren jedoch im Mittel ebenfalls sehr niedrig. Annähernd vergleichbar mit der Negativ-, sowie mit der 0,9 % NaCl-Lösung-Probe waren die Werte für Betaisodona® und Mafenid.

4.2.2 Kontinuierliche Behandlung

Zur Alternierung der Modalitäten wurde ein neuer Versuchsansatz entworfen, der eine Zumischung sehr niedriger Konzentrationen der Antiseptika in die Differenzierungsmedien und keine einmalige, sondern eine kontinuierliche Behandlung beinhaltete. Die hierfür gewählten Konzentrationen waren 0,05 und 0,1 % Antiseptikum zu Differenzierungsmedium (s. Abb. 14). Die Signifikanzen wurden auch hier mittels des One way ANOVA und Tukey's multiple comparison test ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen den Werten werden mit Kleinbuchstaben über der Säule der Probe des niedrigeren Wertes angezeigt. Dabei steht x für ein p<0,05 und x für ein p<0,01. Die Agenzien werden mit o für Octenisept®, b für Betaisodona®, p für Prontosan®, l für Lavasept®, m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung, p.m. Proliferationsmedium und d.m. für Differenzierungsmedium abgekürzt. In diesem Fall werden zur Verdeutlichung der Unterschiede Werte im negativen Bereich dargestellt.

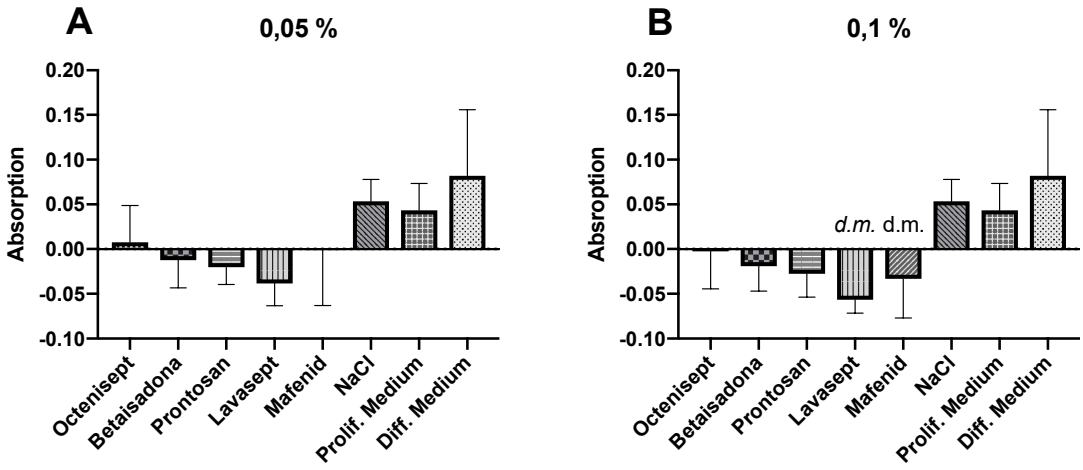

Abbildung 14: Bestimmung des Anteils der zu Adipozyten differenzierten MSZ nach kontinuierlicher Behandlung mit verschiedenen Antiseptika zu 0,05 % (A) und 0,1 % (B) Konzentrationen.
Ausgewertet mittels Oil Red O, gemessen bei einer Wellenlänge von 518 nm. Darstellung der Signifikanzen: normal p<0,05 (bestimmt mit One way ANOVA und Tukey's multiple comparrison Test). Die Agenzien werden mit o für Octenisept®, b für Betaisodona®, p für Prontosan®, l für Lavasept®, m für Mafenid, n für 0,9 % NaCl-Lösung und p.m. Proliferationsmedium und d.m. für Differenzierungsmedium abgekürzt.

Wie zu erkennen ist, lagen die meisten der Werte für die mit jedem der getesteten Antiseptika behandelten Zellen im negativen Bereich. Die Ausnahme bildete die Octenisept®-Probe nach Behandlung mit einer 0,05 % Konzentration des Antiseptikums (s. Abb. 14 A). Statistisch relevante Unterschiede ließen sich jedoch nur für die Zellen nach Behandlung mit einer 0,1 % Konzentration von Lavasept® (p<0,01) und Mafenid (p<0,05) im Vergleich zur positiv-Kontrolle erkennen.
Für diesen Ansatz ist anzumerken, dass der Wert für die mit 0,9 % NaCl-Lösung behandelten Zellen sichtbar über dem der Negativ-Kontrolle lag. Er wich jedoch in keinem der Ansätze signifikant von der Negativ- oder der Positiv-Kontrolle ab. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Zumischung von 0,05 %, so wie 0,1 % NaCl-Lösung in Nährmedium nur einen sehr geringen Effekt auf die Differenzierung der Zellen hatte. Hingegen hatten alle verwendeten Antiseptika einen starken negativen Effekt auf diese Zelleigenschaft.

4.3 Apoptose-/Nekrosebestimmung

Zur Feststellung der Auswirkungen des zytotoxischen Effekts der Antiseptika auf die Zellen wurde ein Vitalitätsassay durchgeführt. Verwendet wurden Propidium-

Iodid-Lösung und Hoechst. Dies sind Fluoreszenzfärbungen, mit deren Hilfe es möglich war, den Zustand der Zellen und ob sie sich in Apoptose oder Nekrose befanden, zu ermitteln. Die Funktionsweise beider Farbstoffe beruht auf ihrer Interskalierung mit der Kern-DNS. Propidiumiodid eignet sich zum Nachweis von Nekrose, denn der Farbstoff kann die intakte Zellmembran nicht durchbringen. Es bindet somit nur an frei exponierte DNS, was auf eine stattgefundene Nekrose einer Zelle schließen lässt. Hoechst hingegen färbt die DNS aller vitalen oder avitalen Zellen an, denn es kann die Zellmembran passieren. Bei dem Prozess der Apoptose bleibt diese intakt, somit eignet sich Hoechst zum Nachweis dieser Variante des Zelltods.

Der Assay wurde an Tag 1 und 5 nach der Behandlung mit den ausgewählten Antiseptika durchgeführt. Die Färbung mit Propidiumiodid hat bei allen Ansätzen nahezu keine Zellen angefärbt (Daten nicht gezeigt). Die Färbung mit Hoechst färbt sowohl vitale, als auch apoptotische und nekrotische Zellen. Ein Indikator für Apoptose können die Schrumpfung des Zellkerns oder der ganzen Zelle, Kondensation des Chromatins oder Ausstülpungen der Kernmembran, sog. *apoptotic bodies*, sein. Diese Vorgänge konnten, im Gegensatz zur Nekrose, in vielen Fällen beobachtet werden.

Der Vitalitätsassay wurde nicht bei allen Versuchsansätzen durchgeführt, sondern nur bei solchen, deren Ergebniss des Viabilitätsassays im ungefähren statistischen Mittel lag. So konnte in gewissem Umfang gewährleistet werden, dass die entstandenen Bilder repräsentativ sind.

4.3.1 Medium und 0,9 % NaCl-Lösung

Zellen wurden gemäß dem Protokoll des Viabilitätsassays mit Antiseptika behandelt und mit 0,9 % NaCl-Lösung gewaschen. Zur Kontrolle wurden zwei Proben angelegt, von denen die eine nur gewaschen und die andere zuvor zusätzlich für 5 Minuten mit 0,9 % NaCl-Lösung inkubiert wurde. Die hier in Abbildung 15 a) und b) dargestellten Zellkulturen wurden nur dem Wasch-Schritt unterzogen.

Diese Proben wurden an Tag 1 und 5 nach der Behandlung fixiert und ausgewertet.

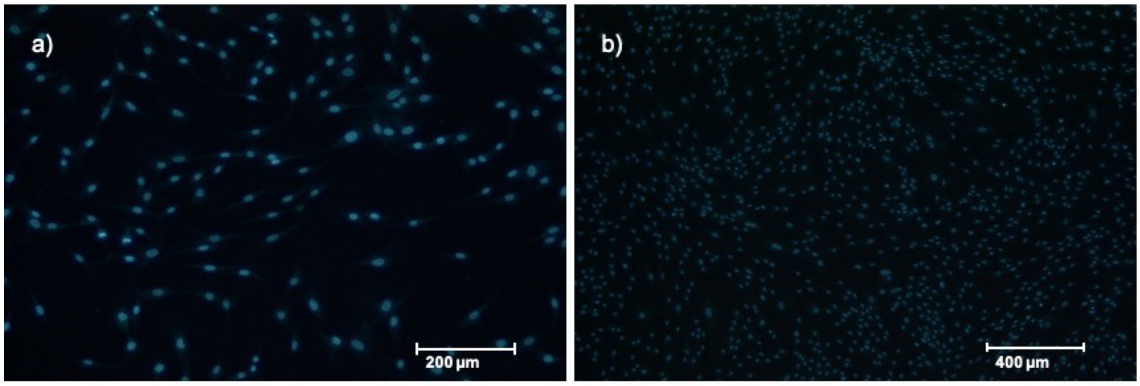

Abbildung 15: Mit Hoechst gefärbte MSZ ohne Behandlung an Tag 1 (a) und an Tag 5 (b).
Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei 200- und 100-facher Vergrößerung mit einem inversem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Sowohl die Zellen in Abbildung 15 a) als auch in 15 b) wiesen keine Anzeichen von Apoptose oder Nekrose auf. In beiden Proben waren stattdessen vereinzelte Mitosen festzustellen. Abbildung b) zeigt die Zellen an Tag 5 mit einem erwartungsgemäß dichteren Zellwachstum, als an Tag 1 (Abb. a)).

Abbildungen 16 a) und b) zeigt den Einfluss einer Behandlung mit 0,9% NaCl-Lösung auf die mesenchymalen Stammzellen.

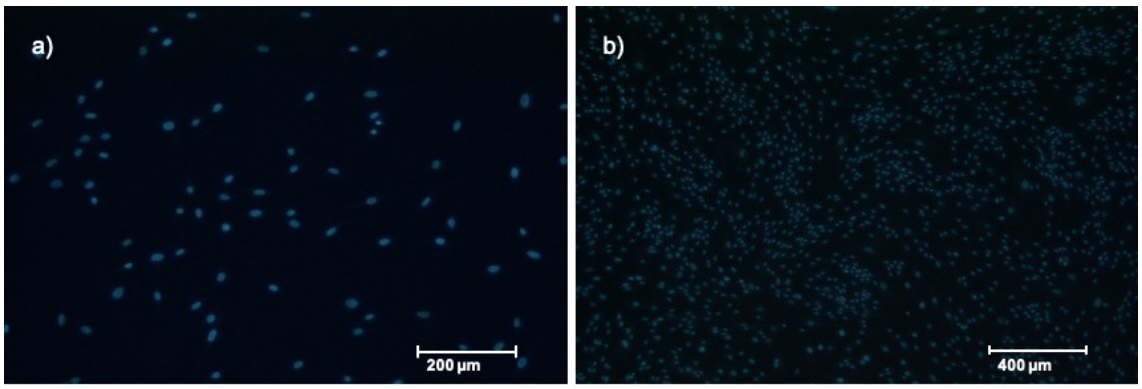

Abbildung 16: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 0,9 % NaCl-Lösung an Tag 1 (a) und an Tag 5 (b).
Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei 200- und 100-facher Vergrößerung mit einem inversem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

In der Färbung von Tag 1 (Abb. 16 a)) nach der Behandlung ließen sich Zeichen von Chromatinkondensation erkennen, sowie Dysmorphien von Zellkernen, was ein Zeichen von Apoptose sein kann. Am 5. Tag hingegen (Abb. 16 b)) wies die auf die gleiche Art behandelte Kultur keine Apoptose-Anzeichen mehr auf. Der

Zustand dieser Zellen ähnelte dem derjenigen, die nicht behandelt wurden (Abb. 15 b)).

4.3.2 Octenisept®

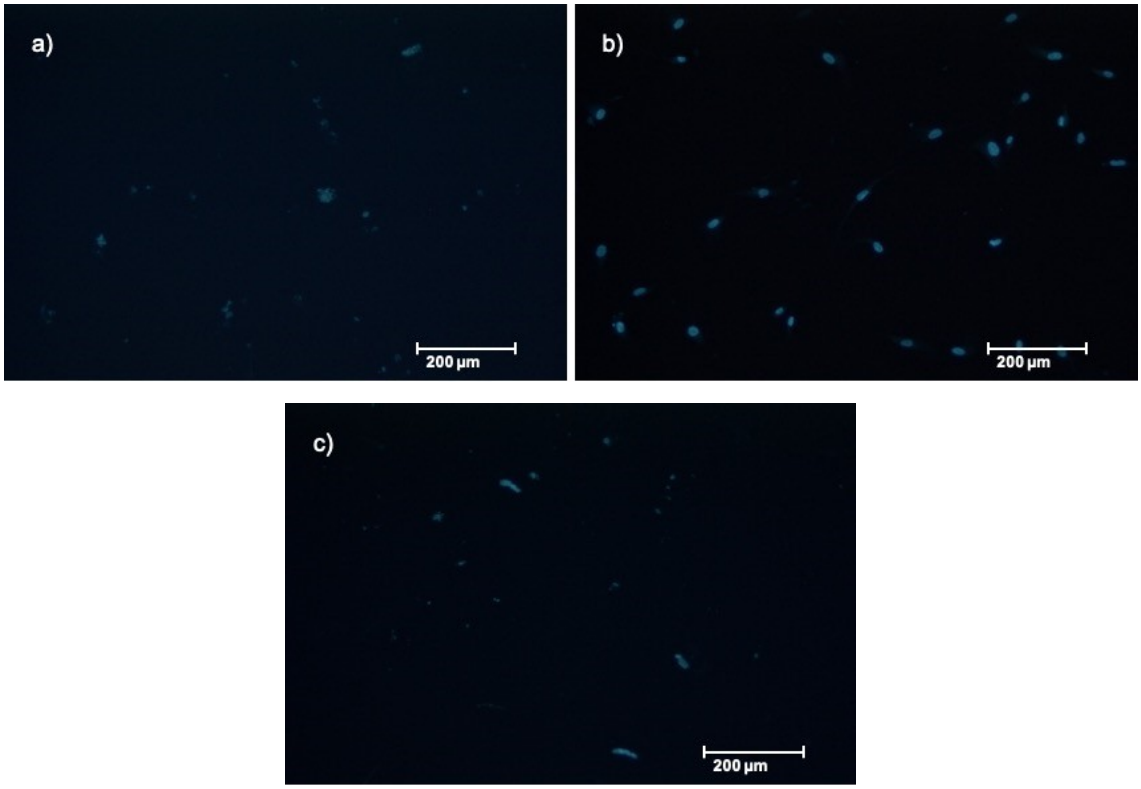

Abbildung 17: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 7,5 % Octenisept®-Lösung an Tag 1 (a) und mit 2,5 % Octenisept®-Lösung (b) und 7,5 % Octenisept®-Lösung an Tag 5 (c) nach Behandlung.
Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei 200- und 100-facher Vergrößerung mit einem inversem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Abbildung 17 a) zeigt das Bild der Zellen nach der Behandlung mit 7,5% Octenisept®-Lösung an Tag 1. Es ließen sich kaum noch Zellen erkennen, stattdessen waren Fragmente abgetöteter Zellen sichtbar. Dieser Zustand ähnelt dem in Abbildung c) dargestellten, auf der Zellen unter derselben Behandlung nach 5 Tagen abgebildet wurden. Nach wie vor waren Zellfragmente zu erkennen und die bestehenden Zellen zeigten Zeichen der Apoptose (*apoptotic bodies*).

Auch die Abbildung der Zellen nach Behandlung mit 2,5% Octenisept®-Lösung an Tag 5 (Abb. 17 b)) zeigte Zellfragmente und Zellen mit Anzeichen von Apoptose, jedoch in weit kleinerem Ausmaß. Es waren außerdem

erwartungsgemäß mehr Zellen vorhanden als in Abbildung c), der Probe, die mit der höheren Konzentration behandelt worden war.

4.3.3 Betaisodona®

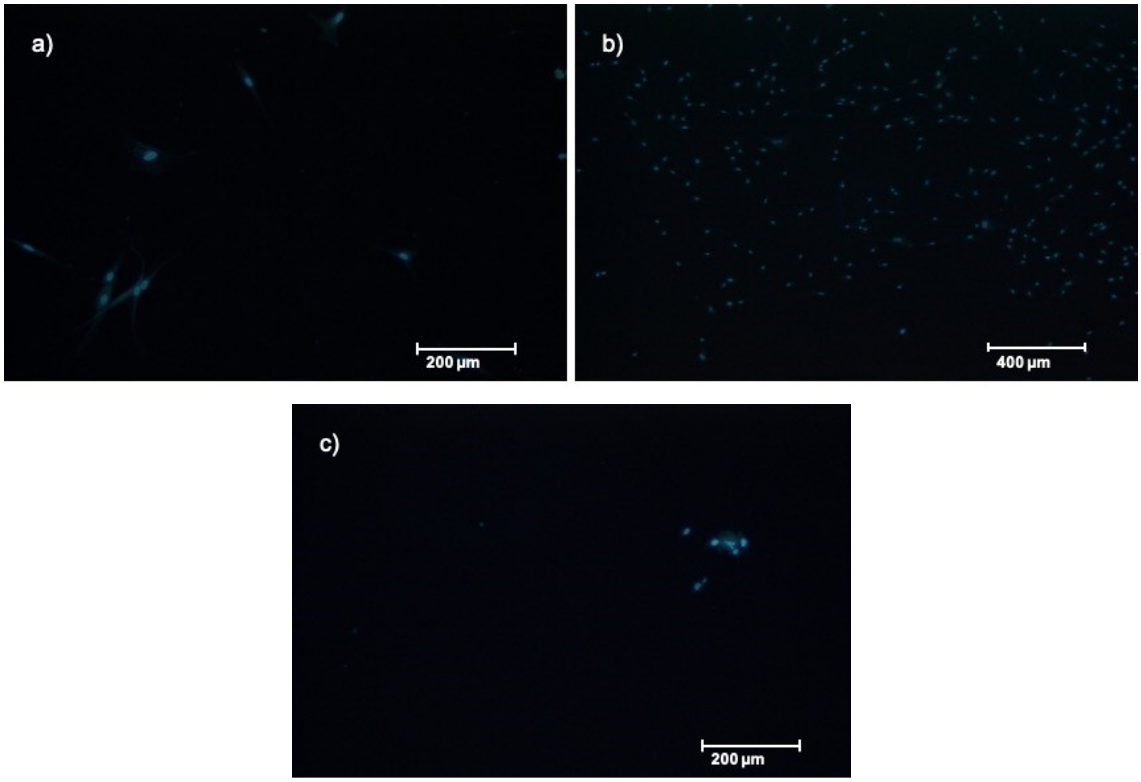

Abbildung 18: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 5 % Betaisodona®-Lösung an Tag 1 (a) und mit 2,5 % Betaisodona®-Lösung (b) und 7,5 % Betaisodona®-Lösung an Tag 5 (c) nach Behandlung.
Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei 200- und 100-facher Vergrößerung mit einem inversem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Wie zu erwarten war die Zellzahl nach Behandlung mit 5% Betaisodona®-Lösung an Tag 1 (Abb. 18 a)) deutlich reduziert gegenüber derjenigen der Probe ohne Behandlung (Abb. 15). Die Zellen waren nur noch in kleinen Ansammlungen vorhanden wie auf der Abbildung zu sehen, jedoch nicht in apoptotischem oder nekrotischem Zustand. Das Bild zu dem Einfluss von 5 % Betaisodona®-Lösung auf die MSZ (Abb. 18 a)) ist beispielhaft für alle getesteten Konzentrationen von Betaisodona®-Lösung an Tag 1. In den Konzentrationen von 1, 2,5, 7,5, 10 und 25 % fanden sich identische, sehr seltene Ansammlungen von Zellen in nicht apoptotischem oder nekrotischem Zustand (Daten nicht gezeigt). Dies war nicht nur für die Zellen nach Behandlung mit allen getesteten Konzentrationen an Tag

1, sondern auch an Tag 5 festzustellen. Die Abbildung Zellen nach Behandlung mit 2,5% Betaisodona®-Lösung an Tag 5 (Abb. 18 b)) und die Abbildung der Zellen nach Behandlung mit 7,5% Betaisodona®-Lösung an Tag 5 (Abb. 18 c)) zeigen, dass unter 2,5% Betaisodona®-Behandlung bis zum 5. Tag noch ein gewisses Wachstum stattgefunden hatte, wohingegen bei 7,5% Betaisodona®-Behandlung kaum Zellen vorhanden waren. Zudem wirkten die wenigen vorhandenen Zellen in Abbildung c) diskonfiguriert.

4.3.4 Polyhexanid-haltige Antiseptika

Als Beispiel für den Einfluss von Lavasept® auf die MSZ wurden Bilder, die nach der Behandlung mit 2,5 % und 7,5 % Lavsept-Lösung ausgewählt, jeweils an Tag 1 und 5, aufgenommen.

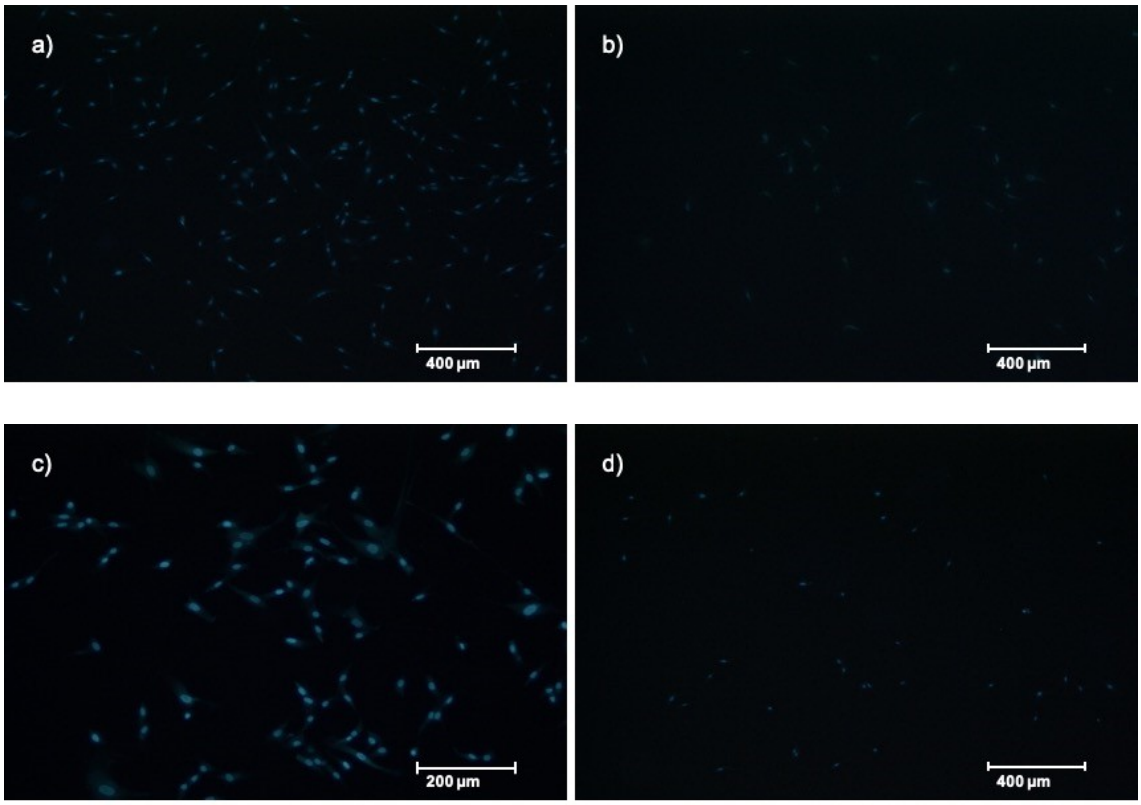

Abbildung 19: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 2,5 % Lavasept®-Lösung (a) und 7,5 % Lavasept®-Lösung an Tag 1 (b) und mit 2,5 % Lavasept®-Lösung (c) und 7,5 % Lavasept®-Lösung an Tag 5 (d) nach Behandlung.
Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei 200- und 100-facher Vergrößerung mit einem inversem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

Das Aussehen der Zellen am 1. Tag nach Behandlung mit 2,5% Lavasept®-Lösung gegenüber dem nach Behandlung mit einer 7,5%-Konzentration zum gleichen Zeitpunkt unterscheidet sich hinsichtlich Zellzahl und -konfiguration (Abb. 19 a) und b)). Die Zellen und Zellfragmente in Abbildung b) waren nur schwach angefärbt, schienen jedoch dysmorph und teilweise in apoptotischem Zustand.

Ein deutlicher Unterschied war auch zwischen der Anzahl der Zellen nach Behandlung mit 2,5% Lavasept®-Lösung (Abb. 19 c)) und mit 7,5% Lavasept® Lösung (Abb. 19 d)) an Tag 5 zu sehen. Auch hier waren deutlich weniger Zellen in Abbildung 19 d) zu erkennen als in Abbildung 19 c). In keiner der Abbildungen vom 5. Tag nach der Behandlung ließen sich jedoch Anzeichen für Apoptose oder Nekrose erkennen.

Bei den Zellen, die mit Prontosan® behandelt wurden, konnten ebenfalls weder Anzeichen von Nekrose noch Apoptose beobachtet werden. Die Abbildung der Zellen nach Behandlung mit 2,5% Prontosan®-Lösung an Tag 5 (20 b)) zeigt noch am ehesten eine in Apoptose befindliche Zelle mit einem angedeuteten *apoptotic body*, was jedoch eher schlecht bestimmbar war. In Abbildung b) lassen sich deutlich mehr Zellen erkennen als in der Abbildung der Zellen nach Behandlung mit 7,5% Prontosan®-Lösung an Tag 5 (Abb. 20 c)). Sowohl Abb. 20 b) als auch 20 c) zeigen eine im Vergleich zu der Abbildung der Zellen nach Behandlung mit 5 % Prontosan®-Lösung an Tag 1 (Abb. 20 a)) kaum erhöhte Zelldichte. Die Zellzahl in allen Abbildungen war gegenüber dem Ansatz ohne Behandlung (Abb. 15) deutlich vermindert.

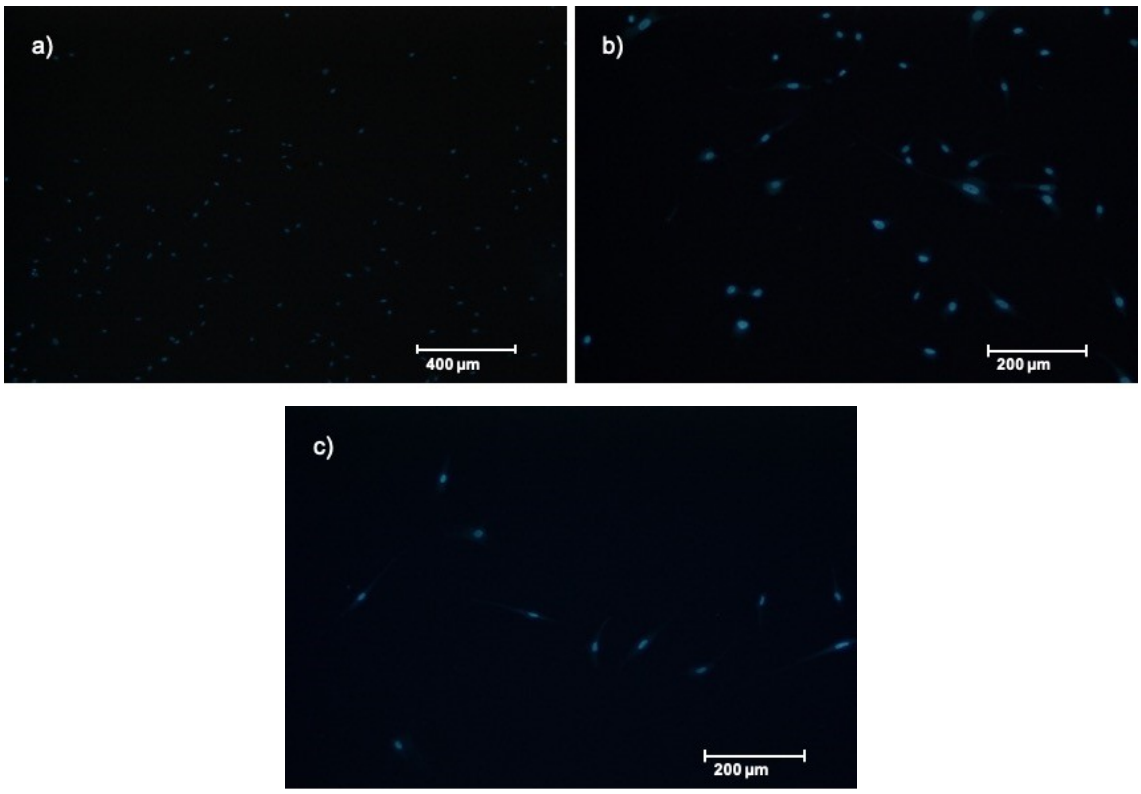

Abbildung 20: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 5 % Prontosan®-Lösung an Tag 1 (a) und mit 2,5 % Prontosan®-Lösung (b) und 7,5 % Pronrosan-Lösung an Tag 5 (c) nach Behandlung.
Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei 200- und 100-facher Vergrößerung mit einem inversem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

4.3.5 Mafenid

Für Mafenid wurden drei Bilder ausgewählt, die die Zellen nach der Behandlung mit 7,5 % Lösung am ersten Tag und 2,5 % und 7,5 % Lösung am fünften Tag darstellen. Ein Bild der Probe an Tag 1 nach der Behandlung mit 2,5 % Lösung wird nicht gezeigt, da hier keine Pathologien feststellbar waren.

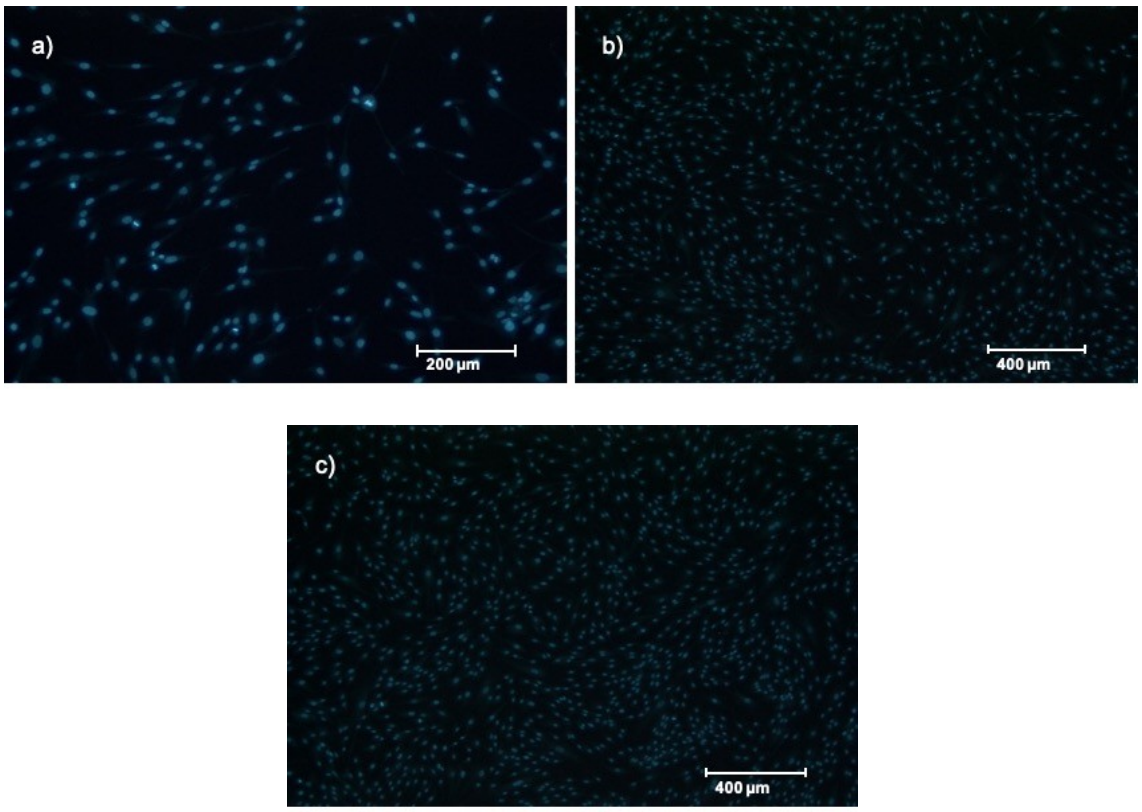

Abbildung 21: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 7,5 % Mafenid-Lösung an Tag 1 (a) und an Tag 5 (b) und nach Behandlung mit 2,5 % Mafenid-Lösung an Tag 5 (c). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden bei 200- und 100-facher Vergrößerung mit einem inversem Fluoreszenzmikroskop aufgenommen.

In der Abbildung der Zellen nach Behandlung mit 7,5% Mafenid-Lösung an Tag 1 (Abb. 21 a)) sind weniger Zellen zu sehen als in Abbildung der Zellen nach der gleichen Behandlung an Tag 5 (Abb. 21 b)). Der Bildausschnitt in Abbildung 21 a) wurde kleiner gewählt, um einen genaueren Eindruck von dem Zustand der vorhandenen Zellen zu gewinnen. Zu erkennen waren dysmorphe Zellen mit Anzeichen der Apoptose sowie einem fragmentierten Kern. Es waren jedoch auch mitotische Zellen zu erkennen, was eher auf eine geringe Schädigung der betroffenen Zellen schließen lässt.

Der Vergleich zu den Zellen nach Behandlung mit 7,5 % und 2,5% Mafenid-Lösung an Tag 5 (Abb. 21 b) und c)) ergab eindeutige Unterschiede in der Zellzahl. Beide Bilder zeigen auch unter der stärkeren Vergrößerung (Daten nicht gezeigt) jedoch optisch gesunde und einige mitotische Zellen. Sie zeigen zudem eine relativ dicht bewachsene Platte, ähnlich dem Grad der Bewachsung, der in der Abbildung der Zellen ohne antiseptische Behandlung an Tag 5 (15 b)) zu sehen ist.

4.4 Zusammenfassung

Alle getesteten Agenzien zeigten in den verwendeten Konzentrationen einen viabilitätsmindernden Effekt auf die MSZ. Am stärksten war dieser Effekt nach der Behandlung mit Octenisept®: Er war bereits bei der niedrigsten gewählten Konzentration von 1 % zu erkennen. Auch die Ergebnisse von Lavasept® und Betaisodona® zeigten im Vergleich zu denen der Vergleichsproben eine merkliche Verschlechterung der Viabilität. Jedoch gibt es bereits bei einer Konzentration von 5 %, spätestens bei 7,5 % eine große Ähnlichkeit zwischen den Ergebnissen aller Agenzien, außer Mafenid. Die Werte der mit diesem Antibiotikum behandelten Zellen wurden erst bei einer Konzentration von 10 % schlechter als die der Kulturmedium-Probe und waren etwa auf einem Niveau mit denen der 0,9 % NaCl-Lösung-Probe.

Auch in den Versuchsansätzen zur Bestimmung der Differenzierung der MSZ nach Behandlung ließen alle Antiseptika einen negativen Einfluss erkennen. In dem Ansatz der einmaligen Behandlung war der Unterschied zu der Positivkontrolle nur bei der Mafenid-, der. Betaisodona®- und der Prontosan® - Probe nicht durch Signifikanzen feststellbar. Für diesen Ansatz erzielten die mit Mafenid und Betaisodona® behandelten MSZ von allen Behandelten die höchsten Ergebnisse. Im Ansatz der kontinuierlichen Behandlung waren die Werte aller behandelten Zellen erheblich niedriger.

Der Vitalitätsassay mittels Hoechst-Fluoreszenzfärbung wurde durchgeführt, um den Zustand der Zellen nach der Behandlung mit den ausgewählten Antiseptika qualitativ zu beurteilen. Viele Zellen zeigten morphologische Veränderungen und die genannten spezifischen Anzeichen für Apoptose, abhängig von dem Agens, mit dem sie behandelt wurden und dessen Konzentration in der Lösung. Zudem waren häufig angefärbte Kernfragmente zu sehen, die auf eine stattgehabte Apoptose oder Nekrose hinweisen. Die Kontrollen (Zellen ohne Behandlung oder mit Behandlung mit 0,9 % NaCl-Lösung) ergaben hingegen keines der genannten Zeichen, dafür regelrechtes Wachstum und einige Mitosen.

5 Diskussion

Im klinischen Alltag richtet sich die Auswahl von Antiseptika oft nach Kriterien wie Kosten oder Verfügbarkeit (Durani & Leaper 2008a), sodass eine geplante Anwendung nach der Abwägung von spezifischer, antimikrobieller Effizienz und Zytotoxizität eher die Ausnahme ist, obgleich sie Standard sein sollte (Daeschlein 2013, Durani & Leaper 2008a, Hirsch et al. 2010). Die Verwendung von Antiseptika ist notwendig, um Infektionen zu verhindern oder sie zu bekämpfen. Jedoch gibt es einige Anhaltspunkte dafür, dass die hier verwendeten Agenzien auch negative Auswirkungen auf den Organismus haben, unter anderem in Form von Zytotoxizität. Die Gewebe, die am häufigsten mit Antiseptika in Berührung kommen, sind die Haut und das Unterhautfettgewebe. Wir haben es uns daher in dieser Arbeit zur Aufgabe gemacht, die Zytotoxizität verschiedener handelsüblicher Antiseptika auf MSZ als Hauptzellart des Unterhautfettgewebes zu untersuchen.

5.1 Viabilitätsassay und Vitalitätsassay

5.1.1 Erläuterung der Assays zur Untersuchung der Zytotoxizität

Zur Untersuchung der Zytotoxizität der Antiseptika auf die MSZ wurden vor allem Viabilitäts- und Vitalitätsassays durchgeführt, nachdem die Zellen mit den Antiseptika behandelt worden waren.

5.1.1.1 Viabilitätsassay

Die Viabilität ist nicht gleichzusetzen mit dem quantitativen Vorhandensein lebendiger Zellen. In dem Viabilitätsassay wird der allgemeine Zellmetabolismus der gesamten Population gemessen. Durch diesen Versuchsansatz werden also Quantität und Qualität der Zellprobe zusammen festgestellt, die nur durch zusätzliche Versuche getrennt voneinander ermittelt werden können. Es können also keine differenzierten Aussagen zur Stoffwechselaktivität der Zellen oder zur Quantität der noch lebenden Zellen gemacht werden.

Der in dieser Arbeit verwendete PrestoBlue Viabilitätsassay basiert auf dem blauen Redox-Farbstoff Resazurin. Resazurin wird durch metabolisch aktive Zellen zu rosafarbenem Resofurin reduziert. Durch die bathochrome Verschiebung der Absorption bei der Reduktion von Resazurin zu Resofurin kann via spektrometrischer Messung der Anteil des reduzierten Stoffes kalkuliert und somit die metabolische Aktivität der Zellpopulation ermittelt werden.

5.1.1.2 Vitalitätsassays

Zur weiteren Untersuchung der Zytotoxizität wurden neben dem Viabilitätsassay noch zwei Vitalitätsassays durchgeführt. Diese dienten der genaueren Untersuchung des Zelltodes nach der Behandlung mit den Antiseptika. Dabei wurde die DNS der Zellen mit Propidiumiodid und Hoechst 33342 gefärbt. Propidiumiodid färbt grundsätzlich nur die DNS von Zellen an, die sich in Nekrose befinden, da es die intakte Zellmembran nicht überwinden kann. Hoechst 33342 hingegen färbt alle Zellen an, da es ebenfalls an DNS bindet, die Zellmembran jedoch überwinden kann. Schrumpfung oder Fragmentierung der Zelle oder des Zellkerns, Kondensation des Chromatins oder Ausstülpungen der Zellmembran können dabei Hinweise auf eine Apoptose sein (Scheunert et al. 2002). Die gleichzeitige Färbung mit Propidiumiodid und Hoechst 33342 würde also eine Nekrose anzeigen.

5.1.2 Auswirkung der Antiseptika auf Zellviabilität und -vitalität

Die Ergebnisse des Viabilitätsassays und der Vitalitätsassays sind nicht direkt miteinander vergleichbar. Es stand keine quantitative Auswertungsmethode zur Verfügung, sodass Zellzahlen nach der Behandlung nicht miteinander abgeglichen werden konnten. Nur durch den Vergleich der Bilder des ersten und fünften Tages nach der Behandlung können quantitative Unterschiede der Zellen im Vitalitätsassay abgeschätzt werden. Auf die gleiche Art sind die Ergebnisse des Viabilitätsassays zwischen den Messtagen vergleichbar, durch den Vergleich der Viabilität. So lassen sich für beide Assays Eindrücke über den Schweregrad

der Beeinträchtigung der Zellen durch die unterschiedlichen Antiseptika gewinnen. Dies macht es möglich, die Ergebnisse der beiden Assays ansatzweise miteinander zu vergleichen. Es muss jedoch angemerkt werden, dass der Vitalitätsassay keine quantitative sondern eine qualitative Auswertung des Einflusses der Antiseptika auf die MSZ darstellte.

Da keine Zellen mit Propidiumiodid angefärbt wurden kann darauf geschlossen werden, dass sich keine der Zellen in akuter Nekrose befanden. Eine Erklärung für den fehlenden Nachweis des Vorgangs könnte sein, dass die Zellen vermutlich während oder kurz nach der Behandlung nekrotisch wurden und nicht mehr später, als der direkte Einfluss der Antiseptika aufgehoben war. Die nekrotischen Zellen wurden vermutlich durch die Waschschritte mit 0,9 % NaCl-Lösung, die sich an die Behandlung anschlossen, von den Platten entfernt. Dafür, dass ein solcher Vorgang anzunehmen ist, spricht die relativ niedrige Zellzahl auf den Platten nach der Behandlung, da die Zellen zuvor recht dicht ausgesät wurden waren. Die Vermutung wird zudem durch die Ergebnisse des Viabilitätsassays gestützt, die nach der Behandlung deutlich niedrigere Werte zeigen als davor.

Die Ergebnisse des Viabilitätsassays, die in den folgenden Kapiteln diskutiert werden, waren in einigen Bildern der Hoechst 33342-Färbungen der Kulturen wiedererkennbar. Ein eindeutiges Beispiel sind die Kulturen ohne Behandlung im Vergleich mit den Kulturen mit Behandlung durch 0,9 % NaCl-Lösung. Die Zellen zeigten im Viabilitätsassay direkt nach der Behandlung mit 0,9 % NaCl-Lösung eine schwächere Viabilität als diejenigen ohne Behandlung und die Werte glichen sich bis Tag 5 nicht vollständig an. Die 0,9 % NaCl-Lösung schien jedoch deutlich weniger zytotoxischen Effekt zu haben als fast alle untersuchten Antiseptika. Dies lässt sich auch in der Dichte des Bewuchses der Platten dieser Kulturen am fünften Tag nach der Behandlung feststellen. Die Zellen, die mit 0,9 % NaCl-Lösung behandelt wurden, wiesen ein weniger dichtes Wachstum auf, als diejenigen, die keine Behandlung durchlaufen hatten. Dies spricht wie die Ergebnisse des Viabilitätsassays für eine gewisse zytotoxische Wirkung von 0,9 % NaCl-Lösung auf MSZ.

Grundsätzlich ließ sich Ähnliches über die Zellen nach Behandlung mit allen getesteten Antiseptika sagen. Die Bilder der Vitalitätsmessungen stimmten mit den Ergebnissen des Viabilitätsassays, soweit es bestimmbar war, etwa überein. Die Zellen zeigten unter Behandlung mit manchen Antiseptika, die sich im

Viabilitätsassay als die zytotoxischeren herausgestellt haben, eine stärkere Beeinträchtigung. Dies war durch die veränderte Anzahl der Zellen und der Zellkonfiguration erkennbar.

5.1.3 Auswertung nach Antiseptika

5.1.3.1 Octenisept®

Octenisept®, das vor mehr als 20 Jahren eingeführt wurde, ist eines der am besten untersuchten Antiseptika. Der Hauptwirkstoff Octenidin wirkt gegen die Zellwand oder Zellmembran von Mikroorganismen und ist somit recht unspezifisch antiseptisch und zytotoxisch (Christiansen 1988). Es wird für ein breites Spektrum von Haut-, Schleimhaut- und Wunddesinfektionen eingesetzt (Assadian 2016, Daeschlein 2013, Hubner et al. 2010, Kim et al. 2017, Koburger et al. 2010). Es besitzt ein breites, spezienübergreifendes Wirkspektrum (Eldeniz et al. 2015, Harke 1989, Kung et al. 2016b).

Die Ergebnisse des in dieser Arbeit durchgeführten Viabilitätsassays zeigen einen verhältnismäßig starken zytotoxischen Effekt von Octenisept® auf MSZ. Es war, teilweise mit großem Abstand, das am meisten zytotoxische der getesteten Antiseptika. Bereits bei der niedrigsten getesteten Konzentration von 1 % Antiseptikum zu Kulturmedium zeigte sich ein signifikanter Unterschied der Ergebnisse im Vergleich zur Positiv-Kontrolle. Fünf Tage nach einer Behandlung mit 2,5 % des Antiseptikums war nahezu keine Viabilität mehr nachweisbar.

Die Auswertung der Versuchs mit einer Lösung von 2,5 % zeigte zudem eine unerwartete Besonderheit: Hier sah man, dass der zytotoxische Effekt von Octenisept® im Gegensatz zu allen anderen getesteten Antiseptika sein volles Ausmaß verzögert erreichte Die Viabilität schien erst langsam zu steigen, um dann gegen Tag fünf wieder abzufallen. Diese verzögerte zytotoxische Wirkung ließ sich auch nach der Behandlung mit einer 5 %igen Konzentration des Antiseptikums beobachten, doch ab der Konzentration von 7,5 % war auch an den ersten Tagen nach der Behandlung keine signifikante Viabilität mehr festzustellen.

Das Phänomen der verzögerten Zytotoxizität von Octenisept® konnte auch durch den Vitalitätsassay nachgewiesen werden. Dies zeigt sich in den Bildern, die von

den Zellen nach einer Behandlung mit 7,5 % Octenisept®-Lösung aufgenommen wurden. Am fünften Tag nach der Behandlung schienen sich einige Zellen in akuter Apoptose zu befinden, was bei den anderen Antiseptika an diesem Tag nicht zu beobachten war. Dies spricht für eine verzögerte zytotoxische Wirkung von Octenisept®, die erst nach einiger Zeit zur Apoptose der MSZ führt. Dies gilt jedoch nur für Konzentrationen bis 7,5 %, darüber hinaus ist die Wirkung auch im Vitalitätstest akut zytotoxisch und nicht mehr verzögert. Bei den Bildern der Kulturen, die mit Octenisept® behandelt worden waren, fielen zudem vermehrt Zellfragmente auf, was ein Zeichen für stattgehabte Nekrose und Apoptose ist. Die Platten wurden jedoch täglich gespült, sodass die Zellfragmente entfernt worden wären, wären sie sofort nach oder bei der Behandlung aufgetreten. Da sie sich noch auf der Platte befanden, kann der Zelltod also nur nach den Waschschritten und im Laufe des Tages vor der Durchführung des jeweiligen Assays stattgefunden haben. Dies beweist eine noch Tage nach der Behandlung eintretende Apoptose oder Nekrose aufgrund des Kontakts mit diesem Antiseptikum. Solche Zelltrümmer wurden bei keiner anderen Kultur in diesem Umfang beobachtet, was wiederum die starke zytotoxische Wirkung von Octenisept® beweist (Muller & Kramer 2005a). Diese Bilanz spiegelt die Ergebnisse des Viabilitätsassays wider.

Es gibt allerdings auch Hinweise darauf, dass die *in-vitro* Ergebnisse für dieses Antiseptikum von bereits durchgeführten *in-vivo* Studien abweichen (Jenull et al. 2015b). Die hier erbrachten Ergebnisse sind typisch für *in vitro*-Studienergebnisse über dieses Antiseptikum, wohingegen sich die Ergebnisse vieler klinischer Studien positiv über das Antiseptikum äußern (Danilevicius et al. 2015b, Dettenkofer et al. 2002b, Hammerle & Strohal 2016a, Kung et al. 2016a, Moritz et al. 2014b, Obermeier et al. 2015). Dies mag mit den unterschiedlichen Studiendesigns zusammenhängen. Dagegen stehen die schon genannten Berichte über chemisch induzierte Peritonitis, prolongierte Ödeme, Nekrosen, Gewebsschwellungen und Hand-Phlegmonen bei Kindern (Franz & Vogelin 2012, Hulsemann & Habenicht 2009, Hupuczi & Papp 2005, Parlakgumus et al. 2005, Schupp & Holland-Cunz 2009a). Experimentell wurde eine Zytotoxizität gegen Keratinozyten, Fibroblasten und Chondrozyten bestätigt (Hirsch et al. 2009b, Hirsch et al. 2010, Jenull et al. 2015a, Muller & Kramer 2005b). Diese Arbeit beweist in *in-vitro* Ergebnissen eine zytotoxische Wirkung von Octenisept® auf MSZ. Jede *in vitro*-Studie ist jedoch nur ein sehr stark vereinfachtes Modell,

das höchstens einen groben Eindruck bieten kann, denn der menschliche Organismus ist sehr viel komplexer. Zukünftige *in-vivo* Studien müssen den zytotoxischen Effekt auf Fettgewebe bestätigen.

Eine allgemeine Empfehlung über die Verwendung von Octenisept® abzugeben ist wegen dieser widersprüchlichen Aussagen kompliziert. Die einzige mögliche Lösung ist, dass spezifische Studienergebnisse als Handlungsgrundlage für die in diesen untersuchten Anwendungen zu Rate gezogen und generelle Empfehlungen oder Warnungen zunächst vermieden werden müssen.

5.1.3.2 Betaisodona®

Iod ist wohl einer der ältesten, heute noch verwendeten Bestandteile von Antiseptika (Durani & Leaper 2008a). Betaisodona® ist eines der gebräuchlichsten und bekanntesten Antiseptika aus dieser Gruppe. Es ist erste Wahl für ein weites Spektrum medizinischer Anwendungen (Bennett et al. 2001, Darouiche et al. 2010, O'Meara et al. 2014, Rode et al. 1981, Srinivas et al. 2015). Aus diesem Grund wurde es für die Untersuchung in dieser Arbeit ausgewählt.

Die Ergebnisse der mit Betaisodona® behandelten MSZ in dem Viabilitätsassay lagen im Vergleich mit allen getesteten Antiseptika eher im Mittelfeld. Die Viabilität der MSZ nach Behandlung mit 1 % Betaisodona® war die zweitniedrigste nach der Probe, die mit Octenisept® behandelt wurde. Nach der Behandlung mit einer 2,5 %- und 5 %-Lösung jedoch waren die Viabilitäten der mit anderen Antiseptika behandelten MSZ im Vergleich niedriger. Auch für dieses Antiseptikum gilt jedoch, dass ab einer Konzentration von 7,5 % keine Viabilität der Zellen mehr nachweisbar war. Eine zytotoxische Wirkung von Betaisodona® auf MSZ ist somit eindeutig gegeben, jedoch nicht so stark wie bei Octenisept®.

Auch in vergangenen Studien hatte das Antiseptikum sich als zytotoxisch erwiesen, gegen Keratinozyten, Osteoblasten und Fibroblasten (Cabral & Fernandes 2007, Damour et al. 1992, Hirsch et al. 2009b, Mueller et al. 2015). Die Zytotoxizität gegen Chondrozyten ist nicht klar erwiesen (Muller & Kramer 2005b, Schaumburger et al. 2010). Die Ergebnisse dieser Studie passen gut zu dem bisher ermittelten wissenschaftlichen Standpunkt.

Die Ergebnisse, die Betaisodona® im Vitalitätsassay hervorbrachte, unterschieden sich in Hinsicht auf das Maß der Beeinträchtigung der Zellen nicht

signifikant von denen, die durch Octenisept® hervorgerufen wurden. Bereits nach der Behandlung mit einer Konzentration von 1 % waren kaum noch lebende Zellen erkennbar, was sich über alle getesteten Konzentrationen fortsetzte. Im Gegensatz zu der Octenisept®-Probe bildeten hier jedoch die wenigen nach der Behandlung noch lebenden Zellen kleine Inselpopulationen und schienen in der Regel weniger stark beeinträchtigt als MSZ nach Behandlung mit anderen Antiseptika. Über den Pathomechanismus, der dies verursacht, können nur Vermutungen angestellt werden. Eine mögliche Erklärung ist, dass die Anwesenheit mehrerer anderer Zellen in der direkten Umgebung einen protektiven Effekt auf die einzelne Zelle hat, entweder durch eine Verkleinerung der zugänglichen Zelloberfläche oder sogar der kompletten Abschirmung. Diese Hypothese könnte getestet werden, indem die Zellen in einer kleineren Zellzahl auf die gleiche Fläche ausgesät werden, sodass sie wenig direkten Kontakt zueinander haben. Obgleich die Zellen in dieser Arbeit in einer empfohlenen Menge ausgesät wurden, könnte hier eine Fehlerquelle für den Versuch vorliegen. Natürlich würde dies nicht erklären, warum dieses Phänomen nur bei den mit Betaisodona® behandelten Zellen aufgetreten ist. Eventuell könnte sich dies mit einer schwächeren Gewebsgängigkeit des Produkts erklären lassen. Dieselben Einschränkungen gelten auch für eine andere Erklärungsmöglichkeit: Die Zellen könnten endokrine Einflussnahme auf ihre direkten Nachbarn haben, sodass Ansammlungen von Zellen durch gegenseitige zytoprotektive Beeinflussung besser geschützt sind. Dass MSZ grundsätzlich endokrine Eigenschaften haben, wurde in einigen Versuchsansätzen bestätigt (Aggarwal & Pittenger 2005b, Augello et al. 2007a, Toyserkani et al. 2015a). Diese Studien stellen somit fest, dass MSZ heilungsfördernde Substanzen an ihre Umgebung abgeben. Dies sollte jedoch einen protektiven Einfluss auf die ganze Platte gehabt haben und nicht nur auf die nahe-wachsenden Zellen. Eine juxtakrine Wirkung von MSZ ist hingegen noch nicht untersucht worden. Diese Hypothese scheint also weniger wahrscheinlich und müsste durch zukünftige Untersuchungen evaluiert werden.

Zusammenfassend lässt sich über die Ergebnisse des Viabilitäts- und Vitalitätsassays für Betaisodona® sagen, dass sie voneinander abzuweichen scheinen. Der Einfluss des Antiseptikums auf die MSZ hinsichtlich der Vitalität scheint im Vergleich zu den anderen Antiseptika stärker zu sein als der Einfluss, der im Viabilitätsassay zu beobachten war. Dies könnte ein Hinweis darauf sein,

dass Betaisodona® den Zellmetabolismus per se sehr viel weniger stark beeinträchtigt als die anderen getesteten Antiseptika, deren Werte für die Viabilität niedriger, bei denen jedoch mehr Zellen vorhanden waren. In beiden Versuchsansätzen jedoch schnitt Betaisodona® schlechter als Mafenid und besser als Octenisept® ab, die Unterschiede lagen in den Differenzen zu den Polyhexanid-haltigen Antiseptika. Sicher kann jedoch gesagt werden, dass Betaisodona® in der vom Hersteller empfohlenen Konzentration des Wirkstoffes einen zytotoxischen Effekt auf MSZ besitzt, jedoch auch schon bei sehr viel niedrigeren Konzentrationen. Wie auch für alle andere getesteten Antiseptika lässt sich durch das *vitro*-Versuchsdesign keine klare Handlungsanweisung ableiten.

5.1.3.3 Prontosan® und Lavasept®

Polyhexanid ist ein Breitspektrum-Antiseptikum mit guter Gewebstoleranz und wenigen Anwendungsrisiken (Kaehn 2010, Roth & Brill 2010). Polyhexanid-haltige Antiseptika sind gegen ein großes Spektrum von Pathogenen wirksam und besitzen eine gute Verträglichkeit und Gewebsgängigkeit, weswegen sie für viele medizinische Anwendungen in Frage kommen (Daeschlein et al. 2007b). Es gibt widersprüchliche Hinweise auf eine heilungsfördernde und auch eine zytotoxische Wirkung des Agens (Boer et al. 2013b, Eberlein & Assadian 2010). Allgemein wird das Mittel als eines der eher gewebsschonenden angesehen, auch was MSZ betrifft (Hirsch et al. 2010, van Meurs et al. 2014). Daher wurden die zwei Polyhexanid enthaltenden Antiseptika, Prontosan® und Lavasept®, genauer untersucht. Prontosan® enthält neben Polyhexanid das Tensid Undecylenamidopropyl-Betain, welche zusammen den so genannten „Polyhexanid-Betain-Komplex“ bilden (Klasinc et al. 2018). Lavasept® enthält nur Polyhexanid als Wirkstoff.

Generell gab es zwischen den Ergebnissen der beiden Antiseptika keine signifikanten Unterschiede, lediglich bei den geringen Konzentrationen von 1 % und 2,5 % konnten leichte nicht-signifikante Unterschiede beobachtet werden. Es ist zu vermuten, dass diese Differenz eher willkürlich ist und nach weiteren Messungen statistisch ausgeglichen werden würde. Prontosan® und Lavasept® haben sich im Viabilitäts- und Vitalitätsassay als ähnlich zytotoxisch

herausgestellt. Der Bereich der Konzentrationen beider Antiseptika, in dem noch eine gewisse Viabilität der Zellen nach Behandlung nachzuweisen war, lag zwischen 1 und 7,5 %. Ab einer 7,5 % Konzentration des jeweiligen Antiseptikums schließlich war keine relevante Viabilität der Zellen nach Behandlung mehr feststellbar, so wie es für alle bisher besprochenen Antiseptika galt. Dies ist eine sehr viel geringere Konzentration als die, mit der die Antiseptika geliefert werden, bzw. was die Empfehlung des Herstellers bezüglich der Konzentration für die Anwendung ist. Beide Polyhexanid-Antiseptika zeigten eine zytotoxische Wirkung, die zwischen der von Mafenid und Octenisept® lag und in manchen Konzentrationen größer, in manchen kleiner war, als die von Betasiodona®.

Im Vitalitätsassay zeigten sich ebenfalls keine erheblichen Unterschiede zwischen den beiden Antiseptika. Der Vergleich der Antiseptika im Viabilitätsassay lässt ein ähnliches Level der Zytotoxizität der Polyhexanid-haltigen Antiseptika ersehen, so wie es auch der Vitalitätsassay ergab. Eine Besonderheit fiel bei den Bildern des Vitalitätsassays der Zellen nach Prontosan®-, aber auch nach Lavasept®-Behandlung auf: Diese Antiseptika haben in den Färbungen, trotz einer ansonsten mit Betaisodona® vergleichbaren Wirkung, keine eindeutig nachweisbare Nekrose oder Apoptose hervorgerufen. Es kann also angenommen werden, dass die niedrige Zellzahl trotz fehlender oder weniger Apoptosen daran liegen könnte, dass Polyhexanid eine weniger starke Apoptose-induzierende, als eher eine proliferationshemmende Wirkung auf die Zellen hat. Eine wundheilungs-verzögernde Wirkung, deren Grundlage eine Proliferations-hemmende Wirkung sein könnte, wurde bereits bestätigt (Kramer et al. 2004).

Trotz der unterschiedlichen Konzentrationen von Polyhexanid in den beiden verwendeten Präparaten lassen sich keine signifikanten Unterschiede in der zytotoxischen Wirkung beider feststellen. Dies mag auch darin begründet liegen, dass Polyhexanid-Konzentration in Prontosan® zwar nur ein Viertel derer in Lavasept® beträgt, Prontosan® jedoch zusätzlich einen weiteren Wirkstoff enthält (Undecylenamidopropyl-Betain). Durch die Einflüsse, die dieser Stoff auf die MSZ hat, sind Unterschiede in den Ergebnissen, die die beiden Antiseptika hervorrufen, schlecht vorhersagbar. Undecylenamidopropyl-Betain scheint jedoch generell die zytotoxische Wirkung von Prontosan® auf das Maß derer von 0,4 % Lavasept® hinauf zu setzen.

Beide Polyhexanid-haltigen Stoffe zeigten bereits ab einer Verdünnung von 7,5 % der handelsüblichen Konzentration eine zytotoxische Wirkung des Wirkstoffes Polyhexanid auf MSZ. Daher konnte in dieser Arbeit der zytotoxische Effekt von Polyhexanid bestätigt werden und das bereits in niedrigen Konzentrationen. Wie für alle getesteten Antiseptika lässt sich auch hieraus keine definitive Handlungsempfehlung ableiten.

5.1.3.4 Mafenid

Das topisch zur Anwendung kommende Antibiotikum Mafenid ist bakteriostatisch und teilweise fungizid, womit es im Vergleich zu den anderen getesteten Antiseptika ein eher begrenztes Anwendungsspektrum hat (Barsoumian et al. 2013, Ibrahim et al. 2014b). Er ist hauptsächlich zur Behandlung von Verbrennungen verbreitet und hierfür Mittel erster Wahl, kann aber auch zur Behandlung chronischer Wunden eingesetzt werden (Bennett et al. 2001, Rode et al. 1981). Studien konnten allerdings zeigen, dass Mafenid die Wundheilung beeinträchtigt und verlangsamt (Maghsoudi et al. 2011b, Zahmatkesh et al. 2015a, Zapata-Sirvent & Hansbrough 1993). Eine zytotoxische Wirkung gegen Keratinozyten, Fibroblasten und Osteoblasten konnte bereits experimentell bestätigt werden (Barsoumian et al. 2013, Boyce et al. 1999). Mafenid ist ein in der plastischen Chirurgie häufig angewendetes Antiseptikum und wurde deshalb zur Untersuchung in dieser Arbeit ausgewählt.

In dem Viabilitätsassay zeigte Mafenid mit Abstand die geringste zytotoxische Wirkung auf die MSZ. Nur nach Behandlung mit den höheren Konzentrationen von 10 und 25 % zeigte sich im Verlauf ein signifikanter Unterschied zu der Positiv-Probe. Jedoch erholten sich die Zellen trotzdem in einem Maß, das der 0,9 % NaCl-Lösung-Probe vergleichbar war. Auch der Vitalitätsassay zeigte ein sehr geringes Maß an Zytotoxizität und die entstandenen Bilder ähneln sehr denen der Kulturmedium-Probe.

Eine so gewebsschonende Wirkung im Vergleich zu anderen Antiseptika ist bisher nicht experimentell erfasst worden. Die wenigen bisher durchgeführten *in vitro*-Studien an anderen Zellen und *in vivo*-Studien an lebendem Gewebe zeigten eindeutig einen negativen Effekt (Maghsoudi et al. 2011, Zahmatkesh et

al. 2015, Zapata-Sirvent & Hansbrough 1993, Barsoumian et al. 2013, Boyce et al. 1999). Der unterschiedliche Ton dieser Arbeit mag darin begründet liegen, dass, außer in Vorversuchen, nicht mit der vom Hersteller gelieferten Konzentration des Antiseptikums experimentiert wurde. Diese Konzentration hatte sich auch in unseren Versuchen als determinierend zytotoxisch erwiesen. Nur in starker Verdünnung und im Vergleich mit anderen Antiseptika kann dieses Präparat also als zellschonend bezeichnet werden. Allerdings gibt es für Mafenid Hinweise, dass eine geringere Konzentration von 2,5 % für die Anwendungen an Brandwunden ausreichend sein könnte (Ibrahim et al. 2014a).

Die eher spärliche Literatur-Lage zu dem Thema der Anwendung und Zytotoxizität von Mafenid ist vielleicht damit zu erklären, dass Mafenid, anders als die anderen getesteten Antiseptika, kein Breitbandantiseptikum ist. Der Anwendungsbereich, obwohl durch aktuelle Untersuchungsergebnisse immer weiter vergrößert, ist recht begrenzt, sodass ein Vergleich zu anderen Antiseptika, die ein breiteres Spektrum haben, vielleicht nicht sinnvoll erscheint. Wenn davon ausgegangen werden kann, dass eine niedrigere Konzentration das Agens auch weniger zytotoxisch machen könnte, wie in dieser Arbeit gezeigt, dann könnte dies ein zusätzliches Argument für eine breitere Anwendung sein, sodass es sich als wirkungsvoll für andere Anwendungsgebiete und Wundtypen erweist. In dieser Arbeit wurde jedoch nur der Einfluss auf MSZ untersucht, nicht die Konzentrations-abhängige antimikrobielle Wirkung. Weitere *in-vivo* Studien sind notwendig, um aufzuzeigen, ob sich Mafenid für ein breiteres Spektrum von medizinischen Anforderungen verwenden ließe und so zytotoxischere Antiseptika ersetzen könnte.

5.1.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Viabilitäts- und Vitalitätsassays

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ergebnisse des Vitalitätsassays und die des Viabilitätsansatzes einander bestätigten und ergänzten. Die Antiseptika, die sich bereits im zuvor durchgeführten Viabilitätsassay als die zytotoxischeren herausgestellt hatten, zeigten im Vitalitätsassay die größte Verminderung der Zellzahl und riefen die meisten nachweisbaren Apoptosen

oder Nekrosen hervor. Eine große Ausnahme stellte Mafenid da, das, im Vergleich zu den getesteten Antiseptika, einen nur gering ausgeprägten zytotoxischen Effekt zeigte. Weitere Experimente sind nötig, um die Ergebnisse zu verifizieren und einen umfassenden Erklärungsansatz zu suchen. Nicht nur für das Ausmaß der zytotoxischen Wirkung, sondern auch für spezifische Phänomene wie die verzögerte Zytotoxizität von Octenisept® bei den geringeren Konzentrationen, das Ausbleiben von Apoptosen, also der über die Behandlung hinaus anhaltenden Wirkung von Polyhexanid oder das Wachstumsmuster von mit Betaisodona® behandelten MSZ wäre das sinnvoll.

5.1.5 Interpretation der Ergebnisse des Viabilitäts- und Vitalitätsassays bezüglich der medizinischen Anwendung

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass alle Antiseptika einen mehr oder weniger großen zytotoxischen Effekt hatten. Dies jedoch ist nur einer der Faktoren zur Evaluierung von Antiseptika für den klinischen Gebrauch. Zunächst lassen sich durch *in vitro*-Versuche die tatsächlichen Auswirkungen von Antiseptika auf Gewebe oft nur grob abschätzen. Wenn dieser Einfluss *in vivo* auf gesundes Gewebe bestimmt ist, dann lässt sich daraus eine genauere Aussage über ihre Auswirkungen auf infiziertes Gewebe sagen (Ansell et al. 2014). Der für diese Bestimmung signifikante Faktor ist vor allem die spezifische antimikrobielle Wirkung der Antiseptika. Es gibt Hinweise darauf, dass die Polyhexanid-haltigen Antiseptika im Vergleich ein gutes Verhältnis von Zytotoxizität zu antimikrobiellem Effekt haben. Dies wurde an Keratinozyten und Fibroblasten getestet (Hirsch et al. 2009a). Dieses Verhältnis ist, vor allem an MSZ, nicht hinreichend untersucht, es steht allerdings zu vermuten, dass die antiseptische Wirkung, ebenso wie die zytotoxische Wirkung, mit der Konzentration abnimmt (Daeschlein 2013, Durani & Leaper 2008b, Ince et al. 2007b). Wenn davon auszugehen ist, dann ist berechtigterweise anzumerken, dass die in diesem Experiment vorgenommene Bestimmung des zytotoxischen Potentials jedes Antiseptikums abhängig von der jeweiligen Verdünnung von wenig klinischem Interesse ist. Obgleich die Bestimmung, welches Antiseptikum mehr oder weniger zytotoxisch ist, zwar grundsätzlich wichtig ist, waren alle getesteten

Antiseptika doch in der von dem Hersteller gelieferten oder empfohlenen Konzentration gleich zytotoxisch, insofern, dass sich keine Viabilität mehr nachweisen ließ.

Dazu kommt, dass mit dem immer weiter fortschreitenden Stand der Forschung die optimalen Anwendungsgebiete verschiedener Antiseptika immer besser abgegrenzt werden können. Das gilt zum Beispiel im Fall der herausragenden Rolle von Mafenid für Verbrennungswunden, aber auch der möglichen Anwendung für andere Wund-Typen (Breton 2001a, Rode et al. 1981). Klinisch gewonnene Erkenntnisse darüber, für welche Verwendungen sich spezifische Stoffe am besten eignen, sind natürlich aussagekräftiger als *in vitro*-Studien. Nichts desto trotz sind *in vitro*-Studien ein wichtiger Baustein zum weiteren wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn, um die Auswirkungen von Antiseptika auf den Organismus möglichst gut zu verstehen.

5.2 Differenzierungsbestimmung

In dieser Arbeit wurden signifikante Unterschiede in der Zytotoxizität verschiedener handelsüblicher Antiseptika aufgezeigt und differenziert, wie sie sich auf unterschiedliche Zelleigenschaften auswirken. Im Viabilitätsansatz und Vitalitätsansatz konnte gezeigt werden, dass alle getesteten Antiseptika negative Auswirkungen auf Viabilität und Vitalität hatten, selbst in sehr kleinen, nicht im klinischen Gebrauch üblichen Konzentrationen. Ein naheliegender Versuchsansatz war daher zu testen, wie sich Antiseptika auf die Fähigkeit der MSZ zur Differenzierung zu Adipozyten auswirken.

Diese Fähigkeit ist, außerhalb ihrer regulatorischen Fähigkeiten, ihre Hauptaufgabe im Fettgewebe. Sie trägt, durch den Ersatz des Gewebes, zur Heilung von Wunden bei. Die Testung dieses Aspektes war also entscheidend zur Evaluierung der heilungsverzögernden Wirkung von Antiseptika auf MSZ.

Die naheliegende Versuchsmethode war, die MSZ einmalig zu behandeln und dann die Differenzierung einzuleiten, so wie es bei einer einmaligen Wunddesinfektion üblich wäre. Dieser Ansatz jedoch brachte eine offensichtliche Fehlerquelle mit sich: Der Anteil der differenzierten Zellen ist zwischen verschiedenen Proben nur bei gleich dicht bewachsenen Platten auswertbar. Da

die Antiseptika jedoch, auch in geringen Dosierungen, in unterschiedlichem Maß zum Zelltod führten war dieser gleiche Bewuchs nicht mehr gegeben. Dazu kam, dass die Zellen auch nachträglich in unterschiedlichem Maß geschädigt waren, sodass sich im Prozess der Abnahme und des Auftragens von Nährmedium ein unterschiedliches Maß von Zellen löste und entfernt wurde. Dieser Effekt wurde im Laufe der Differenzierungsbehandlung und schließlich der Auswertung mittels Oil-Red O immer stärker, da Adipozyten weniger adhärent sind als MSZ. Die erbrachten Ergebnisse stellen also eher die Zytotoxizität der Antiseptika dar als ihren Einfluss auf die Fähigkeit der Zellen zur differenzieren. Dieser Aspekt war nur mikroskopisch evaluierbar, es fehlten jedoch die Mittel, um den Anteil der differenzierten Zellen auf diese Weise statistisch auszuwerten. Dem Anschein nach hatten Octenisept® und Betaisodona® einen stärkeren Effekt, da weniger Zellen zu Adipozyten differenziert waren. Jedoch war in allen Proben außer der Mafenid-Probe ein größerer Anteil nicht differenzierter Zellen zu erkennen als in der Positiv-Probe. Dies bedeutet, dass alle getesteten Agenzien außer Mafenid eine differenzierungshemmende Wirkung haben.

Wegen dieser Fehlerquelle wurde ein zweiter Versuchsansatz implementiert. Dieser beinhaltete eine kontinuierliche Behandlung der MSZ, indem sehr geringe Dosen von Antiseptika in das Differenzierungs-induzierende Medium gemischt wurden. Das ungefähre Äquivalent dessen kann vielleicht in einer täglichen Spülung chronischer oder kontaminierter Wunden gesehen werden, obwohl hierbei natürlich mit handelsüblichen Konzentrationen von Antiseptika gearbeitet wird. Der Anteil der Zellen, die durch die zytotoxische Wirkung der Verdünnungen starb und somit nicht mehr ausgewertet werden konnte, war für diesen Ansatz erheblich kleiner. Dies konnte durch mikroskopische Evaluierung bestätigt werden. Die Oil-Red-Auswertung erbrachte deutlich niedrigere Ergebnisse für die mit Antiseptika behandelten Zellen. Diese Ergebnisse zeigten einen negativen Effekt der Antiseptika auf die Differenzierung, der bei einer höheren Konzentration entsprechend größer ausfiel. Da die Differenzierung beeinflusst ist, kann somit ein negativer Einfluss der getesteten Antiseptika auf die Wundheilung vermutet werden. Jedoch muss auch hier angemerkt werden, dass die meisten der Werte der mit Antiseptika behandelten Zellen unterhalb des Blanks lagen. Es gab jedoch keine signifikanten Unterschiede zu dem Blank oder der Profilerationsmedium-Probe (der Negativ-Probe), sodass geschlussfolgert werden kann, dass alle Antiseptika

die Differenzierung vollständig unterdrückt oder zumindest in starkem Maß eingeschränkt haben. Dies stimmt mit dem Konsens der Literatur überein (Maghsoudi et al. 2011a, Roth & Brill 2010, Schupp & Holland-Cunz 2009b, Zahmatkesh et al. 2015b).

Aus diesem Experiment lassen sich jedoch leider keine Unterschiede im Maß dieser Wirkung zwischen den verschiedenen Antiseptika erkennen. Wiederholte Messungen und mehr sowie geringere Konzentrationen sind notwendig, um diese Differenz zu ermitteln. Jedoch stellt sich die Frage der Relevanz oder der Sinnhaftigkeit einer solchen weiteren Untersuchung. Die im zweiten Versuchsansatz verwendeten Konzentrationen sind so gering, dass ein ausreichender antimikrobieller Effekt höchst fragwürdig ist. Doch selbst diese sehr geringen Konzentrationen hatten eine vollständige oder nahezu vollständige Unterdrückung der Differenzierung zur Folge. Zudem einen gab es einen verbleibenden zytotoxischen Effekt, der die Ergebnisse aller mit Antiseptika behandelten Proben unter dem Ergebnis der Negativ-Probe liegen ließ (zumindest subjektiv, wenn auch nicht statistisch relevant). Dieser Effekt ist durch Zelltod zu erklären. Es kann somit argumentiert werden, dass auch aus diesem Experiment ein starker Einfluss der Antiseptika abzusehen ist. Relevanter als weitere *in vitro*-Experimente wären *in vivo*-Experimente, die direkt die wundheilungsverzögernden Wirkungen der Antiseptika vergleichen. Solche Untersuchungen gibt es zwar für einzelne Antiinfektiva, z.B. Mafenid, Octenisept® und den Wirkstoff Polyhexanid, doch vergleichende Studien, bei denen alle Antiseptika am gleichen Modell und unter gleichen experimentellen Bedingungen getestet werden, wären ein sinnvoller Weg, Aufschluss über diese Eigenschaft der Antiseptika zu gewinnen (Boer et al. 2013b, Eberlein & Assadian 2010, Maghsoudi et al. 2011a, Roth & Brill 2010, Schupp & Holland-Cunz 2009b, Zahmatkesh et al. 2015b).

6 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche liefern eine Basis, die weiter verifiziert und differenziert werden muss. Ein wichtiger Aspekt dessen ist die Unterscheidung der verschiedenen Parameter, die von dem Viabilitätsassay abgedeckt werden: Metabolismus und Anzahl lebender Zellen. Dass es unterschiedliche Auswirkungen der Antiseptika auf diese Parameter gibt, wurde mit dem Versuchsansatz mit Betaisodona® gezeigt. Dieses Antiseptikum schien den Metabolismus weniger stark zu beeinträchtigen als andere Antiseptika. Dies könnte durch eine quantitative Untersuchung wie die FACS-Untersuchung belegt werden, die spezifisch die Anzahl der Zellen erfassen würde. Der Abgleich dieser Anzahl mit den Ergebnissen eines Viabilitätsassays würde ein genaueres Bild ergeben, ähnlich den Ergebnissen der für diese Thesis durchgeführten vergeichenden Analyse von Viabilitäts- und Vitalitätsansatz.

Der Vitalitätsassay wies in dieser Arbeit keine Nekrosen nach, was nicht dem Assay, sondern den multiplen Waschschritten zuzuschreiben sein könnte. Um das Verhältnis von Nekrose zu Apoptose zu ermitteln, wäre eine FACS-basierte Differenzierung oder ein anderes gleichwertiges Verfahren anzudenken. Eine weitere Möglichkeit, die Ergebnisse des Vitalitätsassays weiter aufzuschlüsseln, wäre die Anzahl der Zellen zu verändern, sodass eventuelle Fehler, wie das Wachstum in Ansammlungen bei Betaisodona®, ausgeschlossen werden können.

Der Differenzierungsansatz könnte mit noch niedrigeren Konzentrationen der Antiseptika durchgeführt werden, um eine Beeinflussung der Differenzierung spezifisch zu ermitteln. Jedoch handelt es sich bei den hier gewählten Konzentrationen bereits um derart niedrige Verdünnungen, dass die klinische Bedeutsamkeit der Ergebnisse fraglich wäre.

Antiseptika sind ein so wichtiges medizinisches Werkzeug, dass die Untersuchung ihrer Auswirkung auf den Organismus ein wichtiger Forschungsgegenstand ist. Vor allem in den letzten Jahren sind die Eingrenzung und Erfassung ihrer Anwendungsspektren immer weiter definiert worden. Obwohl die antimikrobielle Wirkung vieler Mittel gut untersucht ist, steht die Erfassung ihrer zytotoxischen Wirkung noch am Anfang. Die Untersuchungen an Fibroblasten, Chondrozyten, Keratinozyten, mesenchymalen Stammzellen und

anderen Zellarten sind in den meisten Fällen selektiv, und es handelt sich weitestgehend um *in vitro*-Studien, wie auch bei dieser Arbeit. Umfassendere *in vivo*-Studien sind nötig, um die Gefahren und Potentiale der einzelnen Mittel für die medizinische Anwendung abzuschätzen.

7 Zusammenfassung

Antiseptika sind in der Klinik so wichtig und allgegenwärtig, dass sie kaum wegzudenken sind. Sie dienen der Desinfizierung von Wunden oder von Körperregionen vor und bei chirurgischen Eingriffen und entfalten eine breite antimikrobielle Wirksamkeit. Bei der Anwendung von Antiseptika kommt in tiefen Wunden auch das Fettgewebe in Kontakt mit ihnen.

Das Fettgewebe erfüllt viele Funktionen für den menschlichen Körper. Es dient als Energiespeicher, Bauelement und Temperaturisolierung, hat aber auch einen Einfluss auf das humorale Gleichgewicht und beeinflusst die Wundheilung. Eine wichtige Zellart dieses Gewebes sind mesenchymale Stammzellen (MSZ), die die regenerative Ressource dieses Gewebes darstellen. Es wurden bereits zahlreiche *in-vivo* und *in-vitro* Studien zu der Zytotoxizität von Antiseptika auf Zellen der Haut und anderer Gewebe durchgeführt, jedoch noch keine, die sich der Wirkung auf das Fettgewebe widmet. Daher wurde in dieser Arbeit die Zytotoxizität verschiedener handelsüblicher Antiseptika auf MSZ untersucht. Die ausgewählten Antiseptika sind solche, die ein breites Anwendungsspektrum haben, so wie auch solche, die besonders in dem Feld der plastischen Chirurgie angewendet werden, so wie Mafenid als topisch zur Anwendung kommendes Antibiotkum in der Verbrennungschirurgie.

Die Ergebnisse der Untersuchung waren, dass Octenisept®, ein weit verbreitetes Antiseptikum, das für ein weites Spektrum der medizinischen Anforderungen angewendet wird, im Vergleich den stärksten zytotoxischen Effekt auf die MSZ hatte und bereits in den geringsten Konzentrationen stark zytotoxisch war. Die Antiseptika Betaisodona®, Prontosan® und Lavasept® lagen im Mittelfeld, doch auch sie zeigten schon bei einer Konzentration von 7,5 % der handelsüblichen Konzentration eine nachweisbare zytotoxische Wirkung. Mafenid war in unseren Versuchen das mit Abstand am wenigsten zytotoxische topische Agens, das auch bei einer Konzentration von 25 % der handelsüblichen Konzentration keinen starken Einfluss auf die MSZ zeigte.

Da es sich in dieser Arbeit um erste *in vitro*-Versuche handelt, ist eine direkte Translation der Ergebnisse in die Klinik nicht möglich. Unterstützt durch zusätzliche *in vivo*-Versuche könnten jedoch auf Basis dieser Arbeit in Zukunft wertvolle Erkenntnisse in der möglichst effizienten und für das Fettgewebe schonende antimikrobiellen Lokaltherapie etabliert werde

Literaturverzeichnis

Aggarwal, S., Pittenger, M.F.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood (2005a) 105: 1815-1822

Aggarwal, S., Pittenger, M.F.: Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. Blood (2005b) 105: 1815-1822

Anderson, M.J., Scholz, M.T., Parks, P.J., Peterson, M.L.: Ex vivo porcine vaginal mucosal model of infection for determining effectiveness and toxicity of antiseptics. J Appl Microbiol (2013) 115: 679-688

Ansell, D.M., Campbell, L., Thomason, H.A., Brass, A., Hardman, M.J.: A statistical analysis of murine incisional and excisional acute wound models. Wound Repair Regen (2014) 22: 281-287

Aoki, S., Toda, S., Ando, T., Sugihara, H.: Bone marrow stromal cells, preadipocytes, and dermal fibroblasts promote epidermal regeneration in their distinctive fashions. Mol Biol Cell (2004) 15: 4647-4657

Assadian, O.: Octenidine dihydrochloride: chemical characteristics and antimicrobial properties. Journal of wound care (2016) 25: S3-6

Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Cancedda, R., Pennesi, G.: Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum (2007a) 56: 1175-1186

Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Cancedda, R., Pennesi, G.: Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. Arthritis Rheum (2007b) 56: 1175-1186

Banovic, F., Bozic, F., Lemo, N.: In vitro comparison of the effectiveness of polihexanide and chlorhexidine against canine isolates of Staphylococcus pseudintermedius, Pseudomonas aeruginosa and Malassezia pachydermatis. Vet Dermatol (2013) 24: 409-413, e488-409

Barillo, D.J.: Using mafenide acetate in acute and chronic wounds. Ostomy Wound Manage (2002) Suppl: 5-10

Barsoumian, A., Sanchez, C.J., Mende, K., Tully, C.C., Beckius, M.L., Akers, K.S., Wenke, J.C., Murray, C.K.: In vitro toxicity and activity of Dakin's solution, mafenide acetate, and amphotericin B on filamentous fungi and human cells. J Orthop Trauma (2013) 27: 428-436

Bellingeri, A., Falciani, F., Traspedini, P., Moscatelli, A., Russo, A., Tino, G., Chiari, P., Peghetti, A.: Effect of a wound cleansing solution on wound bed preparation and inflammation in chronic wounds: a single-blind RCT. Journal of wound care (2016) 25: 160, 162-166, 168

Bennett, L.L., Rosenblum, R.S., Perlov, C., Davidson, J.M., Barton, R.M., Nanney, L.B.: An in vivo comparison of topical agents on wound repair. Plast Reconstr Surg (2001) 108: 675-687

Berger, A.: Handbuch der Verbrennungstherapie. ecomed-Storck GmbH, (2002)

Bilir, A., Yelken, B., Erkan, A.: Cholorhexidine, octenidine or povidone iodine for catheter related infections: A randomized controlled trial. J Res Med Sci (2013) 18: 510-512

Blüher, M.: Das Fettgewebe–ein endokrines Organ. Der Internist (2014) 55: 687-698

Boer, U., Spengler, C., Klingenberg, M., Jonigk, D., Harder, M., Kreipe, H.H., Haverich, A., Wilhelmi, M.: Cytotoxic effects of polyhexanide on cellular repopulation and calcification of decellularized equine carotids in vitro and in vivo. Int J Artif Organs (2013a) 36: 184-194

Boer, U., Spengler, C., Klingenberg, M., Jonigk, D., Harder, M., Kreipe, H.H., Haverich, A., Wilhelmi, M.: Cytotoxic effects of polyhexanide on cellular repopulation and calcification of decellularized equine carotids in vitro and in vivo. Int J Artif Organs (2013b) 36: 184-194

Boggild, A., Brophy, J., Charlebois, P., Crockett, M., Geduld, J., Ghesquiere, W., McDonald, P., Plourde, P., Teitelbaum, P., Tepper, M., Schofield, S., McCarthy, A.: Summary of recommendations for the prevention of malaria by the Committee to Advise on Tropical Medicine and Travel (CATMAT). Can Commun Dis Rep (2014) 40: 118-132

Bonowitz, A., Schaller, M., Laude, J., Reimer, K., Korting, H.C.: Comparative therapeutic and toxic effects of different povidone iodine (PVP-I) formulations in a model of oral candidosis based on in vitro reconstituted epithelium. J Drug Target (2001) 9: 75-83

Bowler, L.D., Bart, A., van der Ende, A.: Representational difference analysis. Methods Mol Med (2001a) 67: 231-255

Bowler, P.G.: Antibiotic resistance and biofilm tolerance: a combined threat in the treatment of chronic infections. J Wound Care (2018) 27: 273-277

Bowler, P.G., Duerden, B.I., Armstrong, D.G.: Wound microbiology and associated approaches to wound management. Clin Microbiol Rev (2001b) 14: 244-269

Boyce, S.T., Supp, A.P., Swope, V.B., Warden, G.D.: Topical sulfamylon reduces engraftment of cultured skin substitutes on athymic mice. J Burn Care Rehabil (1999) 20: 33-36

Braiman-Wiksman, L., Solomonik, I., Spira, R., Tennenbaum, T.: Novel insights into wound healing sequence of events. Toxicol Pathol (2007) 35: 767-779

Breton, D.W.: Off-label drug use in WOC nursing: issues related to use of mafenide acetate to treat infected chronic wounds. J Wound Ostomy Continence Nurs (2001a) 28: 253-258

Breton, D.W.: Off-label drug use in WOC nursing: issues related to use of mafenide acetate to treat infected chronic wounds. J Wound Ostomy Continence Nurs (2001b) 28: 253-258

Bunnell, B.A., Flaat, M., Gagliardi, C., Patel, B., Ripoll, C.: Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation. Methods (2008) 45: 115-120

Cabral, C.T., Fernandes, M.H.: In vitro comparison of chlorhexidine and povidone-iodine on the long-term proliferation and functional activity of human alveolar bone cells. Clin Oral Investig (2007) 11: 155-164

Campbell, C.A., Cairns, B.A., Meyer, A.A., Hultman, C.S.: Adipocytes constitutively release factors that accelerate keratinocyte proliferation in vitro. Ann Plast Surg (2010) 64: 327-332

Capriotti, K., Stewart, K., Pelletier, J., Capriotti, J.: Molluscum Contagiosum Viral Infection Treated With a Dilute Povidone-Iodine/Dimethylsulfoxide Preparation. Dermatol Ther (Heidelb) (2016) 6: 101-103

Christiansen, B.: [The effectiveness of a skin disinfectant with a cation active additive]. Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B (1988) 186: 368-374

Daeschlein, G.: Antimicrobial and antiseptic strategies in wound management. Int Wound J (2013) 10 Suppl 1: 9-14

Daeschlein, G., Assadian, O., Bruck, J.C., Meinl, C., Kramer, A., Koch, S.: Feasibility and clinical applicability of polihexanide for treatment of second-degree burn wounds. Skin Pharmacol Physiol (2007a) 20: 292-296

Daeschlein, G., Assadian, O., Bruck, J.C., Meinl, C., Kramer, A., Koch, S.: Feasibility and clinical applicability of polihexanide for treatment of second-degree burn wounds. Skin Pharmacol Physiol (2007b) 20: 292-296

Damour, O., Hua, S.Z., Lasne, F., Villain, M., Rousselle, P., Collombel, C.: Cytotoxicity evaluation of antiseptics and antibiotics on cultured human fibroblasts and keratinocytes. Burns (1992) 18: 479-485

Danilevicius, M., Juzeniene, A., Juzenaite-Karneckiene, I., Versinina, A.: MRSA decontamination using octenidine-based products. Br J Nurs (2015a) 24: S36, S38-40

Danilevicius, M., Juzeniene, A., Juzenaite-Karneckiene, I., Versinina, A.: MRSA decontamination using octenidine-based products. Br J Nurs (2015b) 24: S36, S38-40

Darouiche, R.O., Wall, M.J., Jr., Itani, K.M., Otterson, M.F., Webb, A.L., Carrick, M.M., Miller, H.J., Awad, S.S., Crosby, C.T., Mosier, M.C., Alsharif, A., Berger, D.H.: Chlorhexidine-Alcohol versus Povidone-Iodine for Surgical-Site Antisepsis. N Engl J Med (2010) 362: 18-26

Davies, O.G., Cooper, P.R., Shelton, R.M., Smith, A.J., Scheven, B.A.: Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. J Tissue Eng (2015) 6: 2041731415592356

Dettenkofer, M., Jonas, D., Wiechmann, C., Rossner, R., Frank, U., Zentner, J., Daschner, F.D.: Effect of skin disinfection with octenidine dihydrochloride on insertion site colonization of intravascular catheters. Infection (2002a) 30: 282-285

Dettenkofer, M., Jonas, D., Wiechmann, C., Rossner, R., Frank, U., Zentner, J., Daschner, F.D.: Effect of skin disinfection with octenidine dihydrochloride on insertion site colonization of intravascular catheters. Infection (2002b) 30: 282-285

Dettmers, R., Brekelmans, W., Leijnen, M., van der Burg, B., Ritchie, E.: Negative Pressure Wound Therapy With Instillation and Dwell Time Used to Treat Infected Orthopedic Implants: A 4-patient Case Series. Ostomy Wound Manage (2016) 62: 30-40

Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., Horwitz, E.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. Cytotherapy (2006) 8: 315-317

Durani, P., Leaper, D.: Povidone-iodine: use in hand disinfection, skin preparation and antiseptic irrigation. Int Wound J (2008a) 5: 376-387

Durani, P., Leaper, D.: Povidone-iodine: use in hand disinfection, skin preparation and antiseptic irrigation. Int Wound J (2008b) 5: 376-387

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

Egli-Gany, D., Brill, F.H., Hintzpeter, M., Andree, S., Pavel, V.: Evaluation of the antiseptic efficacy and local tolerability of a polihexanide-based antiseptic on resident skin flora. Adv Skin Wound Care (2012) 25: 404-408

Eldeniz, A.U., Guneser, M.B., Akbulut, M.B.: Comparative antifungal efficacy of light-activated disinfection and octenidine hydrochloride with contemporary endodontic irrigants. Lasers Med Sci (2015) 30: 669-675

Fabry, W., Trampenau, C., Bettag, C., Handschin, A.E., Lettgen, B., Huber, F.X., Hillmeier, J., Kock, H.J.: Bacterial decontamination of surgical wounds treated with Lavasept. Int J Hyg Environ Health (2006) 209: 567-573

Fleming, A.: On the Antibacterial Action of Cultures of a Penicillium, with Special Reference to their Use in the Isolation of B. influenzæ. British journal of experimental pathology (1929) 10: 226-236

Frank, C., Bayoumi, I., Westendorp, C.: Approach to infected skin ulcers. Can Fam Physician (2005) 51: 1352-1359

Franz, T., Vogelin, E.: Aseptic tissue necrosis and chronic inflammation after irrigation of penetrating hand wounds using Octenisept(R). J Hand Surg Eur Vol (2012) 37: 61-64

Fromm-Dornieden, C., Rembe, J.D., Schafer, N., Bohm, J., Stuermer, E.K.: Cetylpyridinium chloride and miramistin as antiseptic substances in chronic wound management - prospects and limitations. J Med Microbiol (2015) 64: 407-414

Golkar, Z., Bagasra, O., Pace, D.G.: Bacteriophage therapy: a potential solution for the antibiotic resistance crisis. J Infect Dev Ctries (2014) 8: 129-136

Haik, J., Ashkenazy, O., Sinai, S., Tessone, A., Barda, Y., Winkler, E., Orenstein, A., Mendes, D.: Burn care standards in Israel: lack of consensus. Burns (2005) 31: 845-849

Hammerle, G., Strohal, R.: Efficacy and cost-effectiveness of octenidine wound gel in the treatment of chronic venous leg ulcers in comparison to modern wound dressings. Int Wound J (2016a) 13: 182-188

Hammerle, G., Strohal, R.: Efficacy and cost-effectiveness of octenidine wound gel in the treatment of chronic venous leg ulcers in comparison to modern wound dressings. Int Wound J (2016b) 13: 182-188

Harke, H.P.: [Octenidine dihydrochloride, properties of a new antimicrobial agent]. Zentralbl Hyg Umweltmed (1989) 188: 188-193

Hasanvand, A., Ghafourian, S., Taherikalani, M., Jalilian, F.A., Sadeghifard, N., Pakzad, I.: Antiseptic Resistance in Methicillin Sensitive and Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Isolates from Some Major Hospitals, Iran. Recent Pat Antiinfect Drug Discov (2015a) 10: 105-112

Hasanvand, A., Ghafourian, S., Taherikalani, M., Jalilian, F.A., Sadeghifard, N., Pakzad, I.: Antiseptic Resistance in Methicillin Sensitive and Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Isolates from Some Major Hospitals, Iran. Recent Pat Antiinfect Drug Discov (2015b) 10: 105-112

Hass, R., Kasper, C., Bohm, S., Jacobs, R.: Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. Cell Commun Signal (2011) 9: 12

Hassan, W.U., Greiser, U., Wang, W.: Role of adipose-derived stem cells in wound healing. Wound Repair Regen (2014) 22: 313-325

Hirsch, T., Jacobsen, F., Rittig, A., Goertz, O., Niederbichler, A., Steinau, H.U., Seipp, H.M., Steinstraesser, L.: [A comparative in vitro study of cell toxicity of clinically used antiseptics]. Hautarzt (2009a) 60: 984-991

Hirsch, T., Jacobsen, F., Rittig, A., Goertz, O., Niederbichler, A., Steinau, H.U., Seipp, H.M., Steinstraesser, L.: [A comparative in vitro study of cell toxicity of clinically used antiseptics]. Hautarzt (2009b) 60: 984-991

Hirsch, T., Koerber, A., Jacobsen, F., Dissemond, J., Steinau, H.U., Gatermann, S., Al-Benna, S., Kesting, M., Seipp, H.M., Steinstraesser, L.: Evaluation of toxic side effects of clinically used skin antiseptics in vitro. J Surg Res (2010) 164: 344-350

Horrocks, A.: Prontosan wound irrigation and gel: management of chronic wounds. Br J Nurs (2006) 15: 1222, 1224-1228

Hubner, N.O., Kramer, A.: Review on the efficacy, safety and clinical applications of polihexanide, a modern wound antiseptic. Skin Pharmacol Physiol (2010) 23 Suppl: 17-27

Hubner, N.O., Siebert, J., Kramer, A.: Octenidine dihydrochloride, a modern antiseptic for skin, mucous membranes and wounds. Skin Pharmacol Physiol (2010) 23: 244-258

Hulsemann, W., Habenicht, R.: [Severe side effects after Octenisept irrigation of penetrating wounds in children]. Handchir Mikrochir Plast Chir (2009) 41: 277-282

Hupuczi, P., Papp, Z.: Postoperative ascites associated with intraperitoneal antiseptic lavage. Obstet Gynecol (2005) 105: 1267-1268

Ibrahim, A., Fagan, S., Keaney, T., Sarhane, K.A., Hursey, D.A., Chang, P., Sheridan, R., Ryan, C., Tompkins, R., Goverman, J.: A simple cost-saving measure: 2.5% mafenide acetate solution. J Burn Care Res (2014a) 35: 349-353

Ibrahim, A., Fagan, S., Keaney, T., Sarhane, K.A., Hursey, D.A., Chang, P., Sheridan, R., Ryan, C., Tompkins, R., Goverman, J.: A simple cost-saving measure: 2.5% mafenide acetate solution. J Burn Care Res (2014b) 35: 349-353

Ince, A., Schutze, N., Hendrich, C., Jakob, F., Eulert, J., Lohr, J.F.: Effect of polyhexanide and gentamycin on human osteoblasts and endothelial cells. Swiss Med Wkly (2007a) 137: 139-145

Ince, A., Schutze, N., Hendrich, C., Jakob, F., Eulert, J., Lohr, J.F.: Effect of polyhexanide and gentamycin on human osteoblasts and endothelial cells. Swiss Med Wkly (2007b) 137: 139-145

Jenull, S., Hojdar, K., Laggner, H., Velimirov, B., Zemann, N., Huettinger, M.: Cell growth and migration under octenidine-antiseptic treatment. Journal of wound care (2015a) 24: 280, 282-284, 286-288

Jenull, S., Hojdar, K., Laggner, H., Velimirov, B., Zemann, N., Huettinger, M.: Cell growth and migration under octenidine-antiseptic treatment. J Wound Care (2015b) 24: 280, 282-284, 286-288

Jessney, B.: Joseph Lister (1827-1912): a pioneer of antiseptic surgery remembered a century after his death. J Med Biogr (2012) 20: 107-110

Kaehn, K.: Polihexanide: a safe and highly effective biocide. Skin Pharmacol Physiol (2010) 23 Suppl: 7-16

Kern, S., Eichler, H., Stoeve, J., Kluter, H., Bieback, K.: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. Stem Cells (2006) 24: 1294-1301

Kesten, S., Fraser, J.K.: Autologous Adipose Derived Regenerative Cells: A Platform for Therapeutic Applications. Surg Technol Int (2016) XXIX: 38-44

Kim, B.S., Ott, V., Boecker, A.H., Stromps, J.P., Paul, N.E., Alharbi, Z., Cakmak, E., Bernhagen, J., Bucala, R., Pallua, N.: The Effect of Antiseptics on Adipose-Derived Stem Cells. Plast Reconstr Surg (2017) 139: 625-637

Kim, W.S., Park, B.S., Sung, J.H., Yang, J.M., Park, S.B., Kwak, S.J., Park, J.S.: Wound healing effect of adipose-derived stem cells: a critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. J Dermatol Sci (2007) 48: 15-24

Klasinc, R., Augustin, L.A., Below, H., Baguhl, R., Assadian, O., Presterl, E., Kramer, A.: Evaluation of three experimental in vitro models for the assessment of the mechanical cleansing efficacy of wound irrigation solutions. Int Wound J (2018) 15: 140-147

Koban, I., Bender, C.P., Assadian, O., Kramer, A., Hubner, N.O.: Clinical use of the antiseptic polihexanide for genital tract infections. Skin Pharmacol Physiol (2012) 25: 298-304

Koburger, T., Hubner, N.O., 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) 65: 1712-1719

Kolbenschlag, J., Goertz, O., Behr, B., Daigeler, A., Lehnhardt, M., Hirsch, T.: [Skin antiseptics in plastic surgery]. Handchir Mikrochir Plast Chir (2012) 44: 254-258

Kramer, A., Gröschel, D., Heeg, P., Hingst, V., Krasilnikow, A., Reybrouck, G., Rüden, H., Werner, H.J.K.A.: von Antiseptika. (2013): 1

Kramer, A., Roth, B., Müller, G., Rudolph, P., Klöcker, N.: Influence of the Antiseptic Agents Polyhexanide and Octenidine on FL Cells and on Healing of Experimental Superficial Aseptic Wounds in Piglets. Skin Pharmacology and Physiology (2004) 17: 141-146

Kung, E., Pietrzak, J., Klaus, C., Walochnik, J.: In vitro effect of octenidine dihydrochloride against Trichomonas vaginalis. Int J Antimicrob Agents (2016a) 47: 232-234

Kung, E., Pietrzak, J., Klaus, C., Walochnik, J.: In vitro effect of octenidine dihydrochloride against Trichomonas vaginalis. Int J Antimicrob Agents (2016b) 47: 232-234

Kuznetsov, N.A., Nikitin, V.G., Teleshova, E.B., Mil'chakov, A.A.: [Biodegradable implants and antiseptics for the treatment of postoperative osteomyelitis]. Khirurgiia (Mosk) (2009): 31-35

Kuznetsova, M.V., Encheva, Y.A., Samartsev, V.A.: [Influence of Chlorhexidine and Prontosan on Dual Species and Monospecies Biofilms Formed by Staphylococcus aureus and Pseudomonas aeruginosa]. Antibiot Khimioter (2015) 60: 15-22

Lee, J.J., Odeh, K.I., Holcombe, S.A., Patel, R.D., Wang, S.C., Goulet, J.A., Graziano, G.P.: Fat Thickness as a Risk Factor for Infection in Lumbar Spine Surgery. Orthopedics (2016) 39: e1124-e1128

Lee, J.S., Terjimanian, M.N., Tishberg, L.M., Alawieh, A.Z., Harbaugh, C.M., Sheetz, K.H., Holcombe, S.A., Wang, S.C., Sonnenday, C.J., Englesbe, M.J.: Surgical site infection and analytic morphometric assessment of body composition in patients undergoing midline laparotomy. J Am Coll Surg (2011) 213: 236-244

Lee, S.H., Jin, S.Y., Song, J.S., Seo, K.K., Cho, K.H.: Paracrine effects of adipose-derived stem cells on keratinocytes and dermal fibroblasts. Ann Dermatol (2012) 24: 136-143

Lehner, B., Fleischmann, W., Becker, R., Jukema, G.N.: First experiences with negative pressure wound therapy and instillation in the treatment of infected orthopaedic implants: a clinical observational study. Int Orthop (2011) 35: 1415-1420

Maghsoudi, H., Salehi, F., Khosrowshahi, M.K., Baghaei, M., Nasirzadeh, M., Shams, R.: Comparison between topical honey and mafenide acetate in treatment of burn wounds. Ann Burns Fire Disasters (2011a) 24: 132-137

Maghsoudi, H., Salehi, F., Khosrowshahi, M.K., Baghaei, M., Nasirzadeh, M., Shams, R.: Comparison between topical honey and mafenide acetate in treatment of burn wounds. Ann Burns Fire Disasters (2011b) 24: 132-137

Mavroforou, A., Koutsias, S., Fafoulakis, F., Balogiannis, I., Stamatiou, G., Giannoukas, A.D.: The evolution of lower limb amputation through the ages. Historical note. Int Angiol (2007) 26: 385-389

Minteer, D., Marra, K.G., Rubin, J.P.: Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. Adv Biochem Eng Biotechnol (2013) 129: 59-71

Moon, K.M., Park, Y.H., Lee, J.S., Chae, Y.B., Kim, M.M., Kim, D.S., Kim, B.W., Nam, S.W., Lee, J.H.: The effect of secretory factors of adipose-derived stem cells on human keratinocytes. Int J Mol Sci (2012) 13: 1239-1257

Moritz, S., Wiegand, C., Wesarg, F., Hessler, N., Muller, F.A., Kralisch, D., Hipler, U.C., Fischer, D.: Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. Int J Pharm (2014a) 471: 45-55

Moritz, S., Wiegand, C., Wesarg, F., Hessler, N., Muller, F.A., Kralisch, D., Hipler, U.C., Fischer, D.: Active wound dressings based on bacterial nanocellulose as drug delivery system for octenidine. Int J Pharm (2014b) 471: 45-55

Mueller, T.C., Loos, M., Haller, B., Mihaljevic, A.L., Nitsche, U., Wilhelm, D., Friess, H., Kleeff, J., Bader, F.G.: Intra-operative wound irrigation to reduce surgical site infections after abdominal surgery: a systematic review and meta-analysis. Langenbecks Arch Surg (2015) 400: 167-181

Muller, G., Kramer, A.: Biocompatibility index of antiseptic agents by parallel assessment of antimicrobial activity and cellular cytotoxicity. J Antimicrob Chemother (2008) 61: 1281-1287

Muller, G., Kramer, A.: Comparative study of in vitro cytotoxicity of povidone-iodine in solution, in ointment or in a liposomal formulation (Repithel) and selected antiseptics. Dermatology (2006) 212 Suppl 1: 91-93

Muller, G., Kramer, A.: Effect of selected wound antiseptics on adult articular cartilage (bovine sesamoid bone) in the presence of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Orthop Res (2005a) 23: 127-133

Muller, G., Kramer, A.: Effect of selected wound antiseptics on adult articular cartilage (bovine sesamoid bone) in the presence of Escherichia coli and Staphylococcus aureus. J Orthop Res (2005b) 23: 127-133

Napavichayanun, S., Yamdech, R., Aramwit, P.: The safety and efficacy of bacterial nanocellulose wound dressing incorporating sericin and polyhexamethylene biguanide: in vitro, in vivo and clinical studies. Arch Dermatol Res (2016) 308: 123-132

Nikoletopoulou, V., Markaki, M., Palikaras, K., Tavernarakis, N.: Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. Biochim Biophys Acta (2013) 1833: 3448-3459

O'Meara, S., Al-Kurdi, D., Ologun, Y., Ovington, L.G., Martyn-St James, M., Richardson, R.: Antibiotics and antiseptics for venous leg ulcers. Cochrane Database Syst Rev (2014): CD003557

Obermeier, A., Schneider, J., Fohr, P., Wehner, S., Kuhn, K.D., Stemberger, A., Schieker, M., Burgkart, R.: In vitro evaluation of novel antimicrobial coatings for surgical sutures using octenidine. BMC Microbiol (2015) 15: 186

Opstrup, M.S., Malling, H.J., Kroigaard, M., Mosbech, H., Skov, P.S., Poulsen, L.K., Garvey, L.H.: Standardized testing with chlorhexidine in perioperative allergy--a large single-centre evaluation. Allergy (2014) 69: 1390-1396

Parlakgumus, A., Baykal, A., Aran, O.: An unusual cause of chemical peritonitis. Acta Chir Belg (2005) 105: 322-323

Patterson, R.A., Stankewicz, H.A.: Penicillin, Allergy. In: StatPearls. (2018).

Petersen, H.: Histologie und mikroskopische Anatomie. Springer-Verlag, (2013)

Pinto, R.D., Lira, R.P., Abe, R.Y., Zacchia, R.S., Felix, J.P., Pereira, A.V., Arieta, C.E., de Castro, R.S., Bonon, S.H.: Dexamethasone/Povidone Eye Drops versus Artificial Tears for Treatment of Presumed Viral Conjunctivitis: A Randomized Clinical Trial. Curr Eye Res (2015) 40: 870-877

Rode, H., de Wet, P.M., Davies, M.R., Cywes, S.: An experimental evaluation of the germicidal efficacy of three topical antimicrobial agents in burns. Prog Pediatr Surg (1981) 14: 189-208

Roth, B., Brill, F.H.: Polihexanide for wound treatment--how it began. Skin Pharmacol Physiol (2010) 23 Suppl: 4-6

Schaumburger, J., Beckmann, J., Springorum, H.R., Handel, M., Anders, S., Kalteis, T., Grifka, J., Rath, B.: [Toxicity of antiseptics on chondrocytes in vitro]. Z Orthop Unfall (2010) 148: 39-43

Scheunert, S., Nüssler, A., Rüggeberg, A., Bachem, M., Müller, A., Platz, K., Gerlach, H., Neuhaus, P., Schumacher, G.: Der physiologische Östrogenmetabolit 2-Methoxyestradiol induziert tumorspezifische Apoptose bei Zellen humaner hepatozellulärer Karzinome und führt zu Tumorhemmung in vivo. Springer, (2002)

Schmidt, B.A., Horsley, V.: Intradermal adipocytes mediate fibroblast recruitment during skin wound healing. Development (2013) 140: 1517-1527

Schupp, C.J., Holland-Cunz, S.: Persistent subcutaneous oedema and aseptic fatty tissue necrosis after using octenisept. Eur J Pediatr Surg (2009a) 19: 179-183

Schupp, C.J., Holland-Cunz, S.: Persistent subcutaneous oedema and aseptic fatty tissue necrosis after using octenisept. Eur J Pediatr Surg (2009b) 19: 179-183

Shingyochi, Y., Orbay, H., Mizuno, H.: Adipose-derived stem cells for wound repair and regeneration. Expert Opin Biol Ther (2015) 15: 1285-1292

Siaw-Sakyi, V.: Early wound infection identification using the WIRE tool in community health care settings: An audit report. Br J Community Nurs (2017) 22: S20-S27

Singh, R., Sripada, L., Singh, R.: Side effects of antibiotics during bacterial infection: mitochondria, the main target in host cell. Mitochondrion (2014) 16: 50-54

Srinivas, A., Kaman, L., Raj, P., Gautam, V., Dahiya, D., Singh, G., Singh, R., Medhi, B.: Comparison of the efficacy of chlorhexidine gluconate versus povidone iodine as preoperative skin preparation for the prevention of surgical site infections in clean-contaminated upper abdominal surgeries. Surg Today (2015) 45: 1378-1384

Suga, H., Matsumoto, D., Eto, H., Inoue, K., Aoi, N., Kato, H., Araki, J., Yoshimura, K.: Functional implications of CD34 expression in human adipose-derived stem/progenitor cells. Stem Cells Dev (2009) 18: 1201-1210

Sugihara, H., Toda, S., Yonemitsu, N., Watanabe, K.: Effects of fat cells on keratinocytes and fibroblasts in a reconstructed rat skin model using collagen gel matrix culture. Br J Dermatol (2001) 144: 244-253

Tan, S.Y., Rogers, L.: Louis Pasteur (1822-1895): the germ theorist. Singapore Med J (2007) 48: 4-5

Tatnall, F.M., Leigh, I.M., Gibson, J.R.: Comparative study of antiseptic toxicity on basal keratinocytes, transformed human keratinocytes and fibroblasts. Skin Pharmacol (1990) 3: 157-163

Teepe, R.G., Koebrugge, E.J., Lowik, C.W., Petit, P.L., Bosboom, R.W., Twiss, I.M., Boxma, H., Vermeer, B.J., Ponec, M.: Cytotoxic effects of topical antimicrobial and antiseptic agents on human keratinocytes in vitro. J Trauma (1993) 35: 8-19

Thomas, G.W., Rael, L.T., Bar-Or, R., Shimonkevitz, R., Mains, C.W., Slone, D.S., Craun, M.L., Bar-Or, D.: Mechanisms of delayed wound healing by commonly used antiseptics. J Trauma (2009) 66: 82-90; discussion 90-81

Toyserkani, N.M., Christensen, M.L., Sheikh, S.P., Sorensen, J.A.: Adipose-Derived Stem Cells: New Treatment for Wound Healing? Ann Plast Surg (2015a) 75: 117-123

Toyserkani, N.M., Christensen, M.L., Sheikh, S.P., Sorensen, J.A.: Adipose-Derived Stem Cells: New Treatment for Wound Healing? Ann Plast Surg (2015b) 75: 117-123

van Meurs, S.J., Gawlitta, D., Heemstra, K.A., Poolman, R.W., Vogely, H.C., Kruyt, M.C.: Selection of an optimal antiseptic solution for intraoperative irrigation: an in vitro study. J Bone Joint Surg Am (2014) 96: 285-291

Wang, W.Z., Fang, X.H., Williams, S.J., Stephenson, L.L., Baynosa, R.C., Wong, N., Khiabani, K.T., Zamboni, W.A.: Analysis for apoptosis and necrosis on adipocytes, stromal vascular fraction, and adipose-derived stem cells in human lipoaspirates after liposuction. Plast Reconstr Surg (2013) 131: 77e-85e

Weyrich, L.S., Duchene, S., Soubrier, J., Arriola, L., Llamas, B., Breen, J., Morris, A.G., Alt, K.W., Caramelli, D., Dresely, V., Farrell, M., Farrer, A.G., Francken, M., Gully, N., Haak, W., Hardy, K., Harvati, K., Held, P., Holmes, E.C., Kaidonis, J., Lalueza-Fox, C., de la Rasilla, M., Rosas, A., Semal, P., Soltysiak, A., Townsend, G., Usai, D., Wahl, J., Huson, D.H., Dobney, K., Cooper, A.: Neanderthal behaviour, diet, and disease inferred from ancient DNA in dental calculus. Nature (2017) 544: 357-361

Wiegand, C., Eberlein, T., Andriessen, A.: Antibacterial activity of polihexanide formulations in a co-culture of HaCaT keratinocytes and Staphylococcus aureus and at different pH levels. Wound Repair Regen (2017) 25: 423-431

Willenegger, H.: Lokale Antiseptika in der Chirurgie-Wiedergeburt und Weiterentwicklung. Unfallchirurgie (1994) 20: 94-110

Zaffiri, L., Gardner, J., Toledo-Pereyra, L.H.: History of antibiotics. From salvarsan to cephalosporins. J Invest Surg (2012) 25: 67-77

Zahmatkesh, M., Manesh, M.J., Babashahabi, R.: Effect of Olea ointment and Acetate Mafenide on burn wounds - A randomized clinical trial. Iran J Nurs Midwifery Res (2015a) 20: 599-603

Zahmatkesh, M., Manesh, M.J., Babashahabi, R.: Effect of Olea ointment and Acetate Mafenide on burn wounds - A randomized clinical trial. Iran J Nurs Midwifery Res (2015b) 20: 599-603

Zapata-Sirvent, R.L., Hansbrough, J.F.: Cytotoxicity to human leukocytes by topical antimicrobial agents used for burn care. J Burn Care Rehabil (1993) 14: 132-140

Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., Hedrick, M.H.: Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. Tissue Eng (2001) 7: 211-228

Anhang

Abbildungsverzeichnis

Der Einfluss von Antiseptika auf mesenchymale adipogene Stammzellen i
Abbildung 1: Chemische Strukturen der einzelnen Wirkstoffe von Octenisept®..7
Abbildung 2: Strukturelle Darstellung der Wirkstoffe in Prontosan®. 8
links: Undecylenamidopropyl-Betain; rechts: Polyhexanid. 8
Abbildung 3: Strukturelle Darstellung von Povidon-Iod (Betaisodona®) 10
Abbildung 4. Strukturelle Darstellung von Amino-*p*-toluen-Sulfonamid. 11
Abbildung 6: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 1 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium. 34
Abbildung 7: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 2,5 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium. 36
Abbildung 8: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 5 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium. 38
Abbildung 9: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 7,5 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium. 40
Abbildung 10: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 10 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium. 41
Abbildung 11: Viabilität der MSZ nach der Behandlung mit einer 25 % Konzentrationen der Antiseptika in Kulturmedium. 42
Abbildung 12: Viabilität der MSZ nach Behandlung mit Mafenid zu unterschiedlichen Konzentrationen direkt nach der Behandlung (n.B.), sowie 1, 2, 3, 4 und 5 Tage danach. 44
Abbildung 13: Bestimmung des Anteils der zu Adipozyten differenzierten MSZ nach einmaliger Behandlung mit verschiedenen Antiseptika zu 1 % (A), 2,5 % (B), 5 % (C) und 7,5 % (D) Konzentrationen. 46
Abbildung 14: Bestimmung des Anteils der zu Adipozyten differenzierten MSZ nach kontinuierlicher Behandlung mit verschiedenen Antiseptika zu 0,05 % (A) und 0,1 % (B) Konzentrationen. 48
Abbildung 15: Mit Hoechst gefärbte MSZ ohne Behandlung an Tag 1 (a) und an Tag 5 (b). 50
Abbildung 16: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 0,9 % NaCl-Lösung an Tag 1 (a) und an Tag 5 (b). 50

Abbildung 17: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 7,5 % Octenisept®-Lösung an Tag 1 (a) und mit 2,5 % Octenisept®-Lösung (b) und 7,5 % Octenisept®-Lösung an Tag 5 (c) nach Behandlung. 51
Abbildung 18: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 5 % Betaisodona®-Lösung an Tag 1 (a) und mit 2,5 % Betaisodona®-Lösung (b) und 7,5 % Betaisodona®-Lösung an Tag 5 (c) nach Behandlung. 52
Abbildung 19: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 2,5 % Lavasept®-Lösung (a) und 7,5 % Lavasept®-Lösung an Tag 1 (b) und mit 2,5 % Lavasept®-Lösung (c) und 7,5 % Lavasept®-Lösung an Tag 5 (d) nach Behandlung. 53
Abbildung 20: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 5 % Prontosan®-Lösung an Tag 1 (a) und mit 2,5 % Prontosan®-Lösung (b) und 7,5 % Pronrosan-Lösung an Tag 5 (c) nach Behandlung. 55
Abbildung 21: Mit Hoechst gefärbte MSZ nach Behandlung mit 7,5 % Mafenid-Lösung an Tag 1 (a) und an Tag 5 (b) und nach Behandlung mit 2,5 % Mafenid-Lösung an Tag 5 (c). 56

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: In dieser Arbeit eingesetzte Materialien 18
Tabelle 2: In dieser Arbeit eingesetzte Geräte 20
Tabelle 3: In der Arbeit eingesetzte Plastikmaterialien 21
Tabelle 4: Zusammensetzung des Kollagenase-Puffers.....23
Tabelle 5: Zusätze für die Herstellung der Kollagenase-Lösung.....24
Tabelle 6: Zusammensetzung des Nährmediums zur normalen Kultivierung ...24
Tabelle 7: Zusammensetzung der beiden Hauner-Medien zur adipogenen Differenzierung 24
Tabelle 8: In dieser Arbeit verwendete Software 26
Tabelle 9: Form und Stelle der Gewebsentnahme, sowie das Alter und Geschlecht (w = weiblich; m = männlich) der jeweiligen Patienten.....27
Tabelle 10: Für den Viabilitätsansatz verwendete Antiseptika und ihrer Konzentrationen.....29
Tabelle 11: Für den Differenzierungsansatz verwendete Antiseptika unf Konzentrationen.....31

Auflistung der eigenen Publikationen

B Kim, B.S., Ott, V., Boecker, A.H., Stromps, J.P., Paul, N.E., Alharbi, Z., Cakmak, E., Bernhagen, J., Bucala, R., Pallua, N.: The Effect of Antiseptics on Adipose-Derived Stem Cells. Plast Reconstr Surg (2017) 139: 625-637

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlich bei allen am Projekt beteiligten Personen bedanken:
Bei Univ.-Prof. Dr. Dr. med. Prof. h.c. mult. Norbert Pallua für die Überlassung des Themas an mich, Betreuung, Beratung, Bereitstellung der fachlichen und materiellen Ressourcen und die Möglichkeit, die Arbeit in seinem Institut durchzuführen.
Bei Priv.-Doz. Dr. med. Bong-Sung Kim, ohne dessen Konzeption, Anleitung, Anregung, Hilfe bei der Durchführung und der Auswertung und endloser Geduld diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.
Danke auch an Andrea Dresen, die maßgeblich bei der Einarbeitung und bei der Korrektur geholfen hat.
Ebenso vielen Dank an die anderen Autoren der Veröffentlichung „The Effect of Antiseptics on Adipose-Derived Stem Cells“: Dr. med. Arne Böcker, Dr. med. Jan-Philipp Stromps, Nora Paul, Master of Science in Biologie, Dr. med. Ziyad I. Alharbi, Dr. med. Ercan Cakmak, Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Bernhagen und Prof. Richard Bucala, M. D., P.H.D..
Besonders dankbar bin ich auch meiner Mit-Doktorantin Yuriko Yoshinoya und meiner Freundin Thurid Eckhardt für ihren moralischen Beistand während des Schreibens.
Zuletzt will ich noch meiner Familie und meinen Freunden für ihre uneingeschränkte Unterstützung danken.

Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten

- bei mir, Veronica Ott, Theaterstraße 18, 52062 Aachen,

  oder

- in der Klinik für Plastische Chirurgie, Hand- und Verbrennungschirurgie des Universitätsklinikums Aachen

  oder

- bei Priv.-Doz. Dr.med. Bong-Sung Kim,

hinterlegt sind.

Eidesstattliche Erklärung gemäß § 5 Abs. (1) und § 11 Abs. (3) 12. der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich, Veronica Ott, an Eides statt, dass ich folgende in der von mir selbstständig erstellten Dissertation „Der Einfluss von Antiseptika auf mesenchymale adipogene Stammzellen“ dargestellten Ergebnisse erhoben habe.

Bei der Durchführung der Arbeit hatte ich folgende Hilfestellungen, die in der Danksagung angegeben sind.

	V. Ott	B. S. Kim	A. Böcker	J. P. Stromps	N. Paul	Z. Alharbi	E. Cakmak	J. Bernhagen	R. Bucala	N. Pallua	A. Dresen	Summe (%)
Einarbeitung		10									90	100
Studienüberwa- chung		30						10	10	50		100
Studiendesign/Kon-zeption	10	70								20		100
Datenauswertung	50	30					10			10		100
Durchführung der Experimente	100											100
Statistische Auswertung	55	20	10	5	5	5						100
Bereitstellung von Materialien		50						10	10	30		100
Interpretation der Datenauswertung	65	15	5					5	5	5		100
Verfassung des Manuskripts	100											100
Korrektur des Manuskripts		95									5	100

_____

Unterschrift der Doktorandin/des Doktoranden

Als Betreuer der obigen Dissertation bestätige ich die Angaben von Veronica Ott.

_____

Unterschrift des Doktorvaters

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Veronica Ott
Anschrift	Theaterstraße 18, 52062 Aachen
Geburtsdatum	04.02.1992 (Viersen)
Familienstand	ledig
Mutter	Sieglinde Christiane Johanna Jansen-Winkeln (geb. Klinge)
Vater	Wilfried Wilhelm Alfred Ott
Nationalität	Deutsch

Studium der Humanmedizin

seit Okt 2012	**Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen**
Okt 2016	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
Okt 2018	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Ausbildung

Okt 2010 – Feb 2012	**kbs, Akademie für Gesundheitsberufe** Ausbildung zur Operationstechnischen Assistentin

Schulbildung

Aug 1999 – Juli 2003	**katholische Grundschule Venn**
Aug 2003 – Juli 2007	**Stift. Hum. Gymnasium,** Mönchengladbach Überspringen der 8. Klasse
Juli 2007 – Jan 2008	**Privates Internatsgymnasium Schloss Torgelow,** Torgelow am See, Mecklenburg-Vorpommern Stipendiantin, Überspringen der 12. Klasse
Jan 2008 – Juni 2010	**Math. Nat. Gymnasium,** Mönchengladbach Abschluss mit dem Abitur