Aus der Orthopädischen Klinik
der Heinrich Heine Universität Düsseldorf
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Rüdiger Krauspe

Intraartikuläre Analgesie:
Morphin als Ersatz für Lokalanästhetika vom Amidtyp

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich- Heine- Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Irina Ickert
2014

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Joachim Windolf
Erstgutachter: PD Dr. med. Jörn Kircher
Zweitgutachter: Prof. Dr. med. Pascal Jungbluth

Alles Gute auf der Welt entsteht nur, wenn einer mehr tut als er muss

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

1. Paperveröffentlichung

Ickert I, Herten M, Vogl M, Ziskoven C, Zilkens C, Krauspe R, Kircher J, (2014), Opioids as an alternative to amide-type local anesthetics for intraarticular application. *Knee Surgery Sports Traumatology Arthroscopy*, DOI 10.1007/s00167-014-2989-2

Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit bietet einen Vergleich zwischen Lokalanästhetika (LA) vom Amidtyp und Morphinderivaten in Bezug auf die Chondrotoxizität im Rahmen der intraartikulären Analgesie.

Den Impuls zur Auseinandersetzung mit dieser Thematik bieten die jüngst geschilderten Fälle von artikulärer Chondrolyse nach dem Einsatz von LA vom Amidtyp. In der Orthopädie werden LA regelhaft in der postoperativen Schmerztherapie sowie für diagnostische Tests eingesetzt. So stellten sich im Rahmen dieser Anwendungen vermehrt Fälle von artikulärer Chondrolyse als Nebenwirkung der LA vom Amidtyp heraus. Die Chondrolyse verläuft hierbei gehäuft fulminant, sodass schwerwiegende artikuläre Schäden entstehen, welche Operationen sowie eine langjährige Immobilisation mit Schmerzzuständen nach sich ziehen können. Als eine geeignete Alternative zu den LA vom Amidtyp erscheinen Morphinderivate, welche aus klinischer Sicht bei intraartikulärer Applikation eine ausreichende Schmerzkontrolle erzeugen. Ihr geringes zytotoxische Potential sowie die breite und langjährige Anwendung im Bereich der intravenösen Lokalanästhesie machen diese Substanzen theoretisch zu einem optimalen Ersatz für die bisher verwendeten LA vom Amidtyp.

Folglich untersucht diese Arbeit in Form einer *in vitro* Studie LA vom Amidtyp und Morphinderivate auf signifikante Unterschiede in der chondrotoxischen Potenz im Vergleich zu einer NaCl-Kontrolle. Hierfür wurde ausschließlich humaner Knorpel erst in Monolayerkultur angezüchtet und anschließend in eine dreidimensionale Kultur, ein Alginatbead, übertragen. Es folgten 16 weitere Tage Kultur im Bead und im Anschluss die Inkubation mit den Anästhetika/Kontrolle. Die Viabilität der Proben wurde mittels eines ATP-Assays nach drei Tagen weiterer Kultur erhoben. Insgesamt wurden die Anästhetika vom Amidtyp, Bupivacain und Ropivacain, und die Morphinderivate, Morphin und Morphine-6-Glucuronid (M6G), verwendet.

Die mittels SPSS ausgewerteten Ergebnisse konnten einen klaren Trend bei der Viabilität der Chondrozyten nach LA- Exposition nachweisen. Die LA vom Amidtyp verzeichneten eine signifikante Viabilitätsabnahme, wobei Bupivacain schädlicher als Ropivacain war. In der Gruppe der Morphinderivate wurde sowohl zeit- als auch dosisabhängig kein signifikanter knorpelschädigender Effekt festgestellt.

Abkürzungen

ATP	Adenosintriphosphat
$CaCl_2$	Calciumchlorid
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptid
Cmax	Maximale Konzentration im Plasma
CMF	Cell- associated matrix
COLL II	Kollagen-II
DAPI	4′,6-Diamidin-2-phenylindol
FRM	Further removed matrix
GAG	Glykosaminoglykane
GG-Block	homopolymere Alginatbereiche aus Guluronsäure
M6G	Morphin-6-Glukuronid
MEC	Minimale effektive Plasmakonzentration
PAGCL	Postarthroskopische Glenohumerale Chondrolyse
PCA	Hauptkomponentenanalyse (Principal Component Analysis
pKsa	Säurekonstante im negativ dekadischen Logarithmus
PONV	Postoperative Übelkeit (nausea and vomiting)
RCT	Randomisierte kontrollierte Studie (Trial)
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung....1

1.1 Aktualität der Fragestellung....1

1.2 Wissenschaftlicher Hintergrund - in vivo Studien....2

1.3 Wissenschaftlicher Hintergrund - in vitro Studien....3

1.4 Pharmakologie und Toxikologie der Lokalanästhetika....5

1.5 Opioide als mögliche Alternative....7

1.6 Pharmakologie und Toxikologie der Opioide....7

1.7 Auswahl der Kulturmethode....9

1.8 Projektdesign....11

2 Ziele der Arbeit....13

3 Publizierte Originalarbeit....15

4 Diskussion....24

4.1 Dosis- und Zeitabhängige Chondrotoxizität der LA vom Amidtyp....24

4.2 Mögliche Ursachen für die Toxizität der LA vom Amidtyp....25

4.3 Vergleich der Chondrotoxizität vom Bupivacain und Ropivacain....26

4.4 Morphin und M6G als Alternativen....27

4.4.1 Keine chondrotoxischen Effekte in-vitro nachweisbar....27
4.4.2 Adäquate analgetische Wirkung bei intraartikulärer Applikation....28
4.4.3 Wirkungsmechanismus der Opioide....29
4.4.4 Morphinmetabolit: Morphin-6-glukuronid....29

4.5 Limitationen....31

4.5.1 Verwendeter Spenderknorpel....31
4.5.2 Wahl der Konzentrationen der Testsubstanzen....32

5 Schlussfolgerung....34

6 Literatur-und Quellenverzeichnis....36

1 Einleitung

1.1 Aktualität der Fragestellung

Lokal wirksame Anästhetika vom Amidtyp wie Bupivacin und Ropivacain werden in der medizinischen Praxis seit über 60 Jahren für diagnostische und therapeutische Zwecke eingesetzt. Die klassischen Indikationen für die intraartikuläre Applikation umfassen diagnostische Funktionstests wie Probeinfiltrationen in Schulter- und Hüftgelenke und perioperatives Schmerzmanagement insbesondere bei Arthroskopien. Die Anästhetika werden hierbei entweder als Einmalspritze oder als Infusion mittels Schmerzpumpe mit oder ohne Zusatz von weiteren Medikamenten verabreicht.

In diesem Kontext ist Bupivacain zurzeit das am Häufigsten verwendete und am besten untersuchte Medikament. Die intraartikuläre Applikation von Bupivacain ist lange Zeit als eine sichere Methode mit geringem Nebenwirkungsprofil betrachtet worden. Anfängliche Studien fanden keinen längerfristigen schädlichen Effekt auf das Knorpelgewebe.

Erst 1985 untersuchten Nole et al. die Effekte von Bupivacain *in vivo* und *in vitro* am Tierknorpel. Sie spritzen 0,5% Bupivacain einmalig 6h bis 4 Tage vor der Schlachtung in die Kniegelenke von Hunden und Schweinen (1). Der entnommene Knorpel wurde in Bezug auf auf die Proteoglykan-Syntheseleistung untersucht und mit einer Negativkontrolle und einer Vergleichsgruppe aus dem Labor, welche *in vitro* für 2h mit Bupivacain (0,5 % und 0,25%) inkubiert wurde, verglichen. Es stellte sich heraus, dass die Syntheseleistung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* einen Tag nach der Exposition mit dem LA signifikant abgefallen war. Dieser als chondrotoxisch beschriebene Effekt war nach weiteren 2 Tagen nicht mehr nachweisbar. Auch in den histologischen und elektromikroskopischen Bildern fielen keine Strukturdeviationen im Knorpel auf. Da die isotonische Kochsalzlösung, in der das Bupivacain gelöst war, die Syntheseleistung ebenfalls signifikant verringerte, wurde Diese ursächlich für den Knorpelschaden diskutiert (1). Diese Ergebnisse wurden von einer weiteren Studie von Jaureguito et el. gestützt, welche die Auswirkung von Bupivacain in Kombination mit Morphin auf die Syntheseleistung von humanen Knorpelzellen in vitro untersuchte (2). Auch die pharmakokinetischen Studien boten keine Einwände für den klinischen Einsatz. Die maximale Plasmakonzentration von Bupivacain und Ropivacain nach korrekter intraartikulärer Gabe war derart gering, dass systemisch-toxische Effekte für recht

unwahrscheinlich gehalten wurden (3–5).

Erst die Anhäufung der Fälle von PAGCL (Postarthroskopische Glenohumerale Chondrolyse) nach Schulterarthroskopien mit sukzessivem LA- Einsatz, welche in Form von Fallstudien veröffentlicht wurden, führte zu einer erneuten kritischen Auseinandersetzung mit den LA (6–13). Bei diesen Fällen wurden LA im Rahmen des postoperativen Schmerzmanagement via Schmerzpumpe bis zu 48 Stunden ins Gelenk instilliert. Die ersten klinischen Symptome wie z.B. Schmerzzustände traten bei den jungen Patienten im Durchschnittsalter von 30 Jahren mit einer Latenz von einigen Monaten auf. Im weiteren Verlauf der Erkrankung kam es zu einer schwerwiegenden Immobilisation mit Einschränkungen in der Patientenautonomie und Lebensqualität sowie vermehrter Hospitalisation. In vielen Fällen war ein vorzeitiger endoprothetischer Ersatz der Gelenke im jungen Erwachsenenalter notwendig mit allen dazugehörigen nachteiligen Langzeitfolgen..

Als Reaktion auf die zunehmenden Fälle von PAGCL kamen 2009 in den USA neue Empfehlungen zum Umgang mit LA heraus. Eine wichtige Neuerung war der Verzicht auf LA (Bupivacain, Chlorprocain, Lidocain, Mepivacaine, Procaine und Ropivacaine) im Rahmen von Langzeitanwendungen wie z.B. bei der Therapie mit Schmerzpumpen (14,15). Dem vorangehend waren in verschiedenen Studien sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Chondrotoxizität der LA untersucht worden. Die chondrotoxische Effekte der LA wurden *in vivo* an verschiedenen Tierspezies (Kaninchen (16,17), Ratten (18), Rind (19–21) Menschen (22–24) in unterschiedlichen Versuchsanordnungen untersucht.

1.2 Wissenschaftlicher Hintergrund - *in vivo* Studien

Dogan et al. untersuchten 2004 die Wirkung von 0,5% Bupivacain an 15 Kaninchengelenken. Nach der Einmalgabe des LA wurden die Knorpelexplantate nach einem, zwei und zehn Tagen histologisch ausgewertet. Dabei konnten die Autoren zu allen Messzeitpunkten signifikant mehr Entzündungszeichen sowie eine vermehrte Synovialzellhyperplasie/-hypertrophie in der Experimentalgruppe als in der Negativkontrolle beobachten (17).

Ebenfalls in 2004 wiesen Gomoll et al. in einer Studie an Kaninchengelenken ebenfalls einen chondrotoxischen Effekt von Bupivacain nach, welcher durch den Zusatz von Epinephrin nicht signifikant verändert wurde. Hierbei erfolgte 48 Stunden lang eine kontinuierliche Infusion von 0,25% Bupivacain mit oder ohne Epinephrin. Nach sieben Tagen wurden die Zellviabilität und die Proteoglykansynthese gemessen. (25).

2008 veröffentlichten Gomoll et al. eine weitere Studie mit einem ähnlichen Ansatz jedoch mit den großen Unterschied des Messzeitpunktes der Viabilität. An Stelle von einer Woche post- expositionem wurden die Kaninchengelenke drei Monate später untersucht. Diesmal konnte kein Knorpelschaden bei kompensatorisch gesteigertem Knorpelstoffwechsel nachgewiesen werden, was zur Schlussfolgerung führte, dass der Knorpel nach einem Schaden regenerationsfähig sei, falls neben dem LA keine weitere Noxe/Disposition existierte (16).

In Zusammenschau ergeben diese *in vivo* Studien einen klaren Hinweis auf einen chondrotoxischen Effekt von Bupivacain, welcher bereits nach einer kurzen Expositionszeit nachgewiesen werden konnte und einige Tage anhielt. Ob hieraus Langzeitschäden entstehen können oder sich der Knorpel komplett regeneriert, ist nicht eindeutig geklärt. Nach Gomoll et al. ist dies von weiteren Dispositionsfaktoren abhängig (16).

1.3 Wissenschaftlicher Hintergrund - *in vitro* Studien

Parallel zu den *in vivo* Studien wurden die zytotoxischen Effekte auch auf Zellebene untersucht.

Dragoo et al. erprobten 2008 den Effekt einer kontinuierlichen Gabe der LA auf isolierte, humane Knorpelzellen in einem Bioreaktor, in Monolayerkultur. Die Chondrozyten wurden einen, zwei oder drei Tage lang mit LA als Zusatz zum Nährmedium perfundiert um im Anschluss die Viabilität mittels Zytotoxizität/Viabilitätsassay zu bestimmen. Die Arbeitsgruppe stellte für alle Zeitpunkte einen signifikanten Unterschied zwischen der alleinigen Gabe von Bupivacain und der Kombination mit Epinephrin fest. Ohne Zusatz von Epinephrin zeigte das 0,5% Bupivacain erst nach einer 72 stündiger Inkubation einen chondrotoxischen Effekt, in Kombination mit Epinephrin jedoch zu allen Messzeitpunkten (24).

Chu et al. zeigte dagegen im Jahr 2006, dass bereits eine 15 minütige Inkubation der bovinen Chondrozyten im Alginat mit 0,5% Bupivacain nach einer Woche zu einer 99% Apoptoserate führte (19). Die Folgestudie dieser Arbeitsgruppe im Jahr 2008 konnte bereits einen chondrotoxischen Effekt von 0,25% Bupivacain nach 30 minütiger Inkubation an bovinen und humanen Chondrozyten aufzeigen (22). Zudem gelang es Ihnen diesen Effekt dosis- und zeitabhängig darzustellen. Hierbei wurden die bovinen Chondrozyten in Alginatbeads in 3-dimensionaler Kultur mit verschiedenen Konzentrationen von Bupivacain (0,125%, 0,25% und 0,5%) für 15min, 30min und 60min inkubiert und die Viabilität eine

Stunde, ein Tag und eine Woche nach Exposition gemessen. Dabei korrelierte nicht nur die Expositionszeit der LA negativ mit der Viabilität, sondern auch das Zeitintervall nach der Exposition bis zur Messung. Mit anderen Worten, es gab mehr lebendige Zellen eine Stunde nach der Exposition als eine Woche später. Untersuchte man zu diesen Zeitpunkten die Zellen auf Apoptose- und Nekroseraten, so konnte man feststellen, dass sich vor allem die Apoptoserate während dieser Woche mehr als verdoppelte. In der selbigen Studie wurden bovine und humane Knorpelexplantate mit Bupivacain inkubiert, wobei bei einem Teil der Explantate der erste Zentimeter der Oberfläche abgetragen wurde. Eine intakte Knorpeloberfläche ist ein signifikanter Schutzfaktor und scheint die toxische Wirkung von Bupivacain zu mildern (22).

Die Arbeitsgruppe Piper und Kim et al. arbeitete 2008 sowohl mit humanen Knorpelzellen in Monolayerkultur als auch mit intakten humanen Knorpelexplantaten. In beiden Modellen stellten die Autoren einen signifikant chondrotoxischen Effekt 24 Stunden nach einer 30minütigen Inkubation von 0,5% Bupivacain fest. Über dies untersuchten sie das 0,5% Ropivacain als eine mögliche Alternative und wiesen eine signifikant bessere Verträglichkeit dieser Substanz im Vergleich zu Bupivacain bei gleicher Konzentration nach (26).

Grishko et al. verglichen 2010 ebenfalls Bupivacain mit Ropivacain und mit Lidocain in unterschiedlichen Konzentration auf chondrotoxische Effekte bei humanen Chondrozyten im Monolayer. Einen Tag nach einer einstündigen Exposition konnte nur bei 2%iger Lidocainlösung ein signifikanter und bei 0,5% Bupivacain sowie 1% Lidocain ein nicht-signifikanter Viabilitätsverlust dargestellt werden. 0,5% Ropivacain und alle niedrigeren Konzentrationen verblieben ohne nachweisbaren Effekt. In der durchflusszytometrischen Auswertung wurde eine Nekrose als Mechanismus des Zelltodes zu diesem Zeitpunkt ermittelt. Nach 5 Tagen veränderten sich die Auswertungen deutlich. Bis auf den Fall von das 0,2% Ropivacain verringerte sich die Viabilität signifikant bei allen beteiligten LA. Als Ursache für den protrahierten Zelltod konnte Apoptose sowohl in der Durchflusszytometrie, der DAPI-Färbung als auch über die semiquantitative Bestimmung der Caspase 3 und Caspase 9 im Western-Blot postuliert werden (27).

Lo et al. konnten 2009 auch bei Ropivacain einen signifikanten zeit- und dosisabhängigen chondrotoxischen Effekt bei bovinen Chondrozyten nachweisen (21).

Zusammenfassend bestätigen die Ergebnisse der *in vitro* Studien die Vermutung, dass LA ein chondrotoxisches Potential haben. Dieses Potential ist abhängig von der Inkubationszeit und der Dosis der LA. Zudem gibt es weitere wichtige lokale Faktoren, wie z.

B. die intakte Knorpeloberfläche. Die toxische Wirkung wird sowohl über Nekrose als auch über Apoptose vermittelt. Da der größte Anteil der Zellen über den Apoptoseweg geschädigt wird, ist der Messzeitpunkt für eine realistische Auswertung von Bedeutung. Nach fünf bis sieben Tagen war die Apoptose laut der oben genannten Studien abgeschlossen.

1.4 Pharmakologie und Toxikologie der Lokalanästhetika

Die Ära der Lokalanästhetika begann 1884 mit dem Wiener Ophthalmologen Carl Koller, der seine Arbeit über die lokal-anästhetische Wirkung von Kokain am Auge im Lancet veröffentlichte und somit den Grundstein für die neue Medikamentengruppe legte (28). Kokain wurde im weiteren Verlauf von den LA vom Estertyp abgelöst, da diese Verbindungen stabiler und nicht suchterzeugend waren. Mit dem vom Chemiker Nils Löfgren im Jahr 1943 synthetisierten Lidocain, wurden die LA vom Amidtyp eingeführt (29). Diese zeichnen sich gegenüber den LA vom Estertyp durch eine längere Plasmahalbwertszeit aufgrund eines alternativen Metabolisierungsweg über die Leber, eine große chemische Stabilität und eine geringere allergische Potenz aus. Im Jahr 1996 kam Ropivacain auf den Markt, als erstes LA, welches in der reinen S- Enantiomerform vorlag. Inzwischen wurde Levobupivacain, das reine S- Enantiomer von Bupivacain, eingeführt. Beide S-Enantiomere haben 2005 in Tierstudien eine geringere Kardio- und ZNS- Toxizität gezeigt (30).

Der Wirkmechanismus der LA basiert auf der Blockade der spannungsabhängigen Natriumkanäle an der inneren Seite der Nervenmembran bzw. im Porus des Kanals selbst (31–34). Der verminderte Natriumeinstrom führt zur Hyperpolarisation der Membran, sodass ein Schmerzimpuls in Form des Aktionspotentials nicht mehr weiter geleitet werden kann. Da die LA auf Grund eines Stickstoffkerns schwache Basen sind, sind sie, wie in der Injektionslösung aufbereitet, in der protonierten Form als Salze wasserlöslich. Um aber an ihren Wirkungsort zu gelangen, muss das LA in der deprotonierten, lipidlöslicheren Form vorliegen. Dies ist im Gewebe bei einem Umgebungs- pH-Wert von 7,4 und dem pKs- Wert des LA von 8 laut Henderson-Hasselbalch-Gleichung zu 10% der Fall. Je saurer die Umgebung wie z.B. bei einer Entzündung und je höher der pKs- Wert des LA ist, desto niedriger ist der Anteil an der lipidlöslicheren, basischen Form und umso später und geringer die Wirkung des LA.

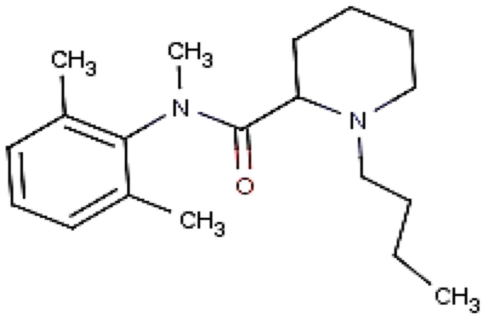

Abb. 1: Strukturformel von Bupivacain, erstellt mit MarvinSketch

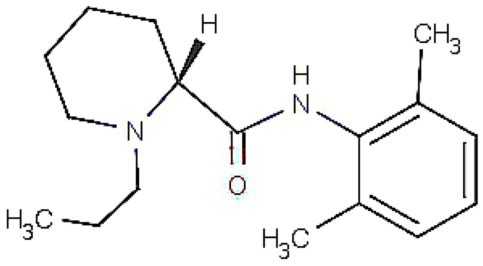

Abb. 2: Strukturformel von Ropivacain, erstellt mit MarvinSketch

Die in der vorliegenden Studie verwendeten LA, Bupivacain. und Ropivacain, entstammen der Pipecoloxylididgruppe der LA von Amidtyp. Die Struktur der beiden Stoffe wie in Abbildung 1 und 2. gezeigt ist bis auf den Austausch von einer Butylgruppe des Bupivacains durch eine Propylgruppe bei Ropivacain identisch. Dieser Unterschied ist für die geringere Lipophilie des Ropivacains verantwortlich. Hierdurch reichert sich das Ropivacain weniger schnell in Nerven- oder Herzgewebe an, sodass die Wahrscheinlichkeit für systemisch- toxische Nebenwirkungen geringer ist (35–39). Die systemische Toxizität wird meist durch eine versehentliche intravasale Injektion erzeugt und betrifft im Wesentlichen das ZNS und das kardiovaskuläre System. Hierbei reagiert das ZNS mit einem initialen Erregungszustand (Tremor, Muskelzuckungen, Schüttelfrost etc.), durch Inaktivierung der inhibitorischen Neurone gefolgt von der Erregungsrückbildung bis zum Koma bei steigender Dosis. Eine objektive Messmethode der ZNS -Toxizität ist die Bestimmung der Krampfschwelle in Tierversuchen. Nach Groban et al. braucht es bei Ropivacain eine 1,5-2,5 höhere Dosis relativ zu Bupivacain um die Krampfschwelle zu erreichen (40). Einen ähnlichen Trend beschreiben Studien von Scott sowie Knudsen et al an freiwilligen Probanden, denen LA per Infusion bis zum Auftreten der ersten ZNS Symptome verabreicht wurde (41,42).

Betrachtet man die Auswirkungen der LA auf das kardiovaskuläre System, so präsentiert sich hier ebenfalls eine zweistufige Symptomatik. Zuerst treten sympathogene Symptome mit Tachykardie und Hypertension auf und in der zweiten Phase folgen Arrhythmien und kontraktile Dysfunktion bis zum kardiogenen Schock.In diesem Zusammenhang konnten Sztark et al. 1998 zeigen, dass das Bupivacain im Vergleich zu Ropivacain die mitochondriale ATP -Synthese der Herzzellen von Ratten um mehr als 60% inhibiert (39). Diese Ergebnisse wurden *in vivo* während der transthorakalen Echokardiographie in den Versuchen von Knudsen et al. 1997 und *in vitro* an isolierten Papillarmuskeln von Ratten von David et al. 2007 bekräftigt (42,43). Das Ropivacain habe die

systolische und diastolische Funktion des Herzen weniger beeinträchtigt.

Insgesamt lässt sich schlussfolgern, dass das Ropivacain in gleicher Dosis wie Bupivacain zentralnervös und kardiovaskulär das besser verträgliche Agens ist.

Allerdings könnte bei gleicher Dosierung die analgetische Potenz geringer sein. Während sich einige Studien für eine Äquipotenz der Analgesie aussprechen (3,44–46), zeigen Weitere dass das Bupivacain das signifikant potentere LA ist (30,47–49). Eine prospektive Studie von Marret et al. konnte 2005 eine bessere Analgesie von Ropivacain in einer leicht höheren Dosis im Vergleich zu Bupivacain darstellen (50).

Um die Unterschiede in der analgetischen Potenz vor allem bei intraartikulärer Gabe zu klären, bedarf es weiterer Studien. Für die Versuchsanordnung wurden im Einklang mit den Auswertungen von Zink et al. 2008 die höhere Konzentration von Ropivacain als die äquipotente Dosis angesehen und genutzt (51).

Letztlich ist noch eine weitere Eigenschaft von Ropivacain vorteilhaft. Im Gegensatz zu den anderen LA besitzt Ropivacain einen stärker ausgeprägten Differentialblock mit geringem motorischen bei adäquatem sensorischen Block (44,52,53).

1.5 Opioide als mögliche Alternative

In der vorliegenden Arbeit wurden Opioidderivate als eine mögliche Alternative zu den LA für die intraartikuläre Analgesie verwendet. Bisher sind für diese Substanzgruppe keine chondrotoxischen Effekte beschrieben. Opioide werden in der intraartikulären Anästhesie als Beimengungen regulär eingesetzt. Die analgetische Potenz der Opioide bei intraartikulärer Anwendung konnte in zahlreichen klinischen Studien nachgewiesen werden (54–56).

1.6 Pharmakologie und Toxikologie der Opioide

Bereits ägyptische Überlieferungen zeugen vom Einsatz der Opioide. Ihr Wirkungsort wurde in den 70er Jahren erstmalig mittels radioaktiver Markierung von Morphin untersucht. Es stellte sich heraus, dass Morphin sich nur in bestimmten Arealen des Gehirns anreichert. Man mutmaßte bereits eine Bindung an vermeintliche „Morphinrezeptoren“ (57). Seit jener Zeit wurden verschiedene Opioidrezeptoren mit ihren Subtypen und mit der über diese Rezeptoren vermittelten Wirkung identifiziert. Die körpereigenen Stoffe, welche diese Rezeptoren nutzen, wurden von Hughes et al. 1975 als „hirneigene Peptide und

Opioidrezeptor-Agonisten“ beschrieben und als Enkephaline bezeichnet (58). Sowohl die Endorphine, wie Enkephaline später genannt wurden, als auch die Morphinderivate entfalten im Körper über die Opioidrezeptoren zahlreiche Effekte wie Analgesie, Euphorie, Obstipation etc. Die für den klinischen Einsatz wichtigste Wirkung ist die Analgesie, welche vor allem über den µ1-Opioidrezeptor vermittelt wird. Dieser befindet sich primär im Hirnstamm und in medialen Thalamuskernen und besteht aus sieben transmembranösen Helices. Bei Bindung eines Opioidagonisten an die präsynaptischen Membran wird ein Gi-Protein gekoppelter, inhibitorischer Signaltransduktionsweg initiiert, der in einer verminderten Freisetzung von schmerzvermittelnden Neurotransmittern wie z.B. Substanz P, Glutamat oder CGRP Calcitonin Gene-Related Peptide) resultiert.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Opioide Morphin und sein aktiven Metabolit,

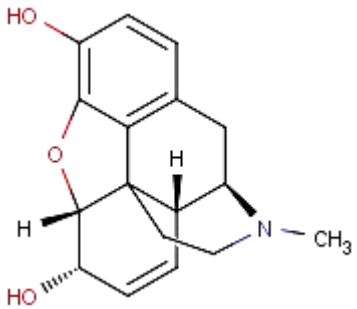

Abb. 3: Strukturformel von Morphin, erstellt mit MarvinSketch

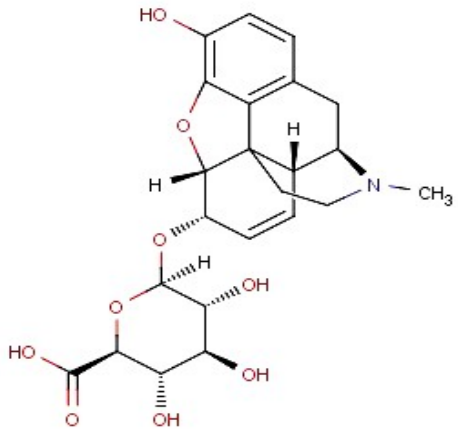

Abb. 4: Strukturformel von Morphin- 6- Glukuronid, erstellt mit MarvinSketch

Morphin-6-Glukuronid (M6G), verwendet.

Das Morphin und viele von ihm abgeleitete Substanzen bestehen wie in Abbildung 3 dargestellt aus einem Benzolring mit einer phenolischen Hydroxylgruppe in Position 3, einer alkoholischen Hydroxylgruppe in Position 6 sowie einen dreiwertigem Stickstoffatom, welches die Lipidlöslichkeit und folglich die analgetische Potenz stark mitbestimmt. Bei einem physiologischen pH- Wert von 7,4 befinden sich 20% des Morphins (pKs- Wert von 8,1) in der nicht ionisierten, lipidlöslicheren Form. Die Metabolisierung von Morphin erfolgt sowohl in der Leber als auch möglicherweise im peripherem Gewebe, wie z. B. der Synovia (55). Es findet eine Demethylierung und Glukuronidierung an den beiden Hydroxylgruppen statt, wobei nur das M6G am µ1-Opioidrezeptor als Agonist wirkt. Das M3G (Morphin- 3-Glukuronid) ist analgetisch unwirksam. Beide Metaboliten werden über die Nieren ausgeschieden. Das Morphin ist zurzeit eines der wichtigsten Analgetika. Nichtsdestotrotz besitzt es wie auch seine aktuellen Derivate eine Reihe von bedeutenden Nebenwirkungen

wie Atemdepression, Sedierung, Übelkeit, PONV (*Postoperative Nausea and Vomiting*) etc. Auf der Suche nach einer Alternative mit ähnlicher Potenz und weniger Nebenwirkungen wird die Rolle des M6G, welches analgetisch wirksam ist und selbst keinem weiteren Abbau mehr unterliegt im experimentellen Setting aktuell geprüft (59).

1.7 Auswahl der Kulturmethode

Bei der Auswahl der Methode spielte der Erhalt des Phänotyps der Chondrozyten eine maßgebende Rolle. Gemäß dem Review von Huch et al., welcher die Kultivierungsmethoden von artikulären Chondrozyten untereinander vergleicht, erweist sich für diese Anforderung eine Anzucht in einem dreidimensionalem System wie z.B dem Alginat als günstig (60).

Der Vorteil der 3D-Anordnung der Zellen im Alginat ist, dass die Chondrozyten laut Häuselmann et al. (61) ihren charakteristischen Phänotyp bis zu 8 Monate beibehalten und selbst in einem Monolayer dedifferenzierte Chondrozyten wieder redifferenzieren können (62–64). Die 3D- Kultur mit einer hoher Zelldichte sowie einem niedrigen Sauerstoffpartialdruck simuliert die Verhältnisse im nativen Knorpel und fördert hiermit den Erhalt des Phänotyps (65,66). Nachteilig ist hierbei die langsame Proliferation der Chondrozyten im Alginat verglichen mit einem zweidimensionalen System (60).

In den methodischen Arbeiten zur optimalen Chondrozytenkultur von Häuselmann et al sowie Chubinskaya et al konnte sowohl an bovinen als auch an humanen Chondrozyten im Alginat der Aufbau einer Matrix aus Kollagen (vor allem Kollagen-II) und Proteoglykanen (vor allem Aggrecan) ähnlich der im nativen hyalinem Knorpel gezeigt werden, die sich in zwei Kompartimente aufteilt: der CM, „*cellassociated matrix*," und der FRM, „*further removed matrix*" (67,68).

Die Ergebnisse von Schulze et al. an humanen Chondrozyten in Alginatkultur legten nahe, dass bereits nach sieben Tagen eine zellassoziierte Matrix vorhanden ist, die eine Dedifferenzierung unwahrscheinlich macht (69).

Alginat ist hauptsächlich durch seinen vielfältigen Einsatz in der Lebensmittelindustrie als Dick- und Stabilisierungsmittel bekannt. Im pharmazeutischen Bereich wird es seit 1980 zur Anzucht und Isolation von Zellen verwendet. Das bei der Zellkultivierung verwendete Alginat ist ein lineares Polysaccharid, welches aus 1-4 beta-D-Mannuronsäure und alpha-L-Guluronsäure besteht. Es wird aus braunen Meeresalgen und bestimmten Bakterien gewonnen. Bei Kontakt mit zweiwertigen Kationen wie Calcium oder Barium verändert das Polysaccharid die räumliche Anordnung nach dem Egg-Box-Modell. Es entsteht der

Eindruck, dass die Calciumionen in einer Nische liegen, die von zwei angrenzenden Polysaccharidketten geformt wird, ähnlich einem Ei in einer Eierschachtel. Dabei interagieren die negativ geladenen Carboxylgruppen der Guluronsäuren mit den Calciumionen. In dieser Anordnung liegen die Polysaccharidketten dichter zusammen; somit wechselt die Alginatsuspension ihre Konsistenz vom Wässrigen ins Gelartige. Die Stabilität des Gels hängt vom Anteil der Guluronsäure und des verwendeten Kations ab. Je mehr Guluronblocks, d.h. homopolymere Bereiche, in denen Guluronsäuren als Blöcke vorliegen, desto mehr Querverbindungen mit Kationen finden statt und desto stabiler und fester ist das Gel (70, 71).

Das Kulturmedium sollte demzufolge eine hinreichende Konzentration an Calcium aufweisen, um die Stabilität der Alginatbeads aufrechtzuerhalten. Calciumchelatoren dagegen können genutzt werden, um die Alginatbeads aufzulösen. Vor zur Fixierung der Alginatbeads in Formalin sollte ein Calcium-Barium-Austausch vollzogen werden, um eine permanente Gelierung zu garantieren (60).

Da die Chondrozyten im Alginat nur langsam proliferieren und aus den Knorpelstückchen erstmals mobilisiert werden mussten, war eine vorgeschaltete Expansion der Zellen im Monolayer notwendig. Hierfür wurde hyaliner Knorpel an makroskopisch intakten Gelenkoberflächen entnommenen, in 20-25mm^3 große Fragmente zerteilt und in Kulturflaschen angezüchtet. Nach dem Erreichen der 90% Konfluenz erfolgte der Transfer in die dreidimensionale Umgebung des Alginats, siehe Abbildung 5.

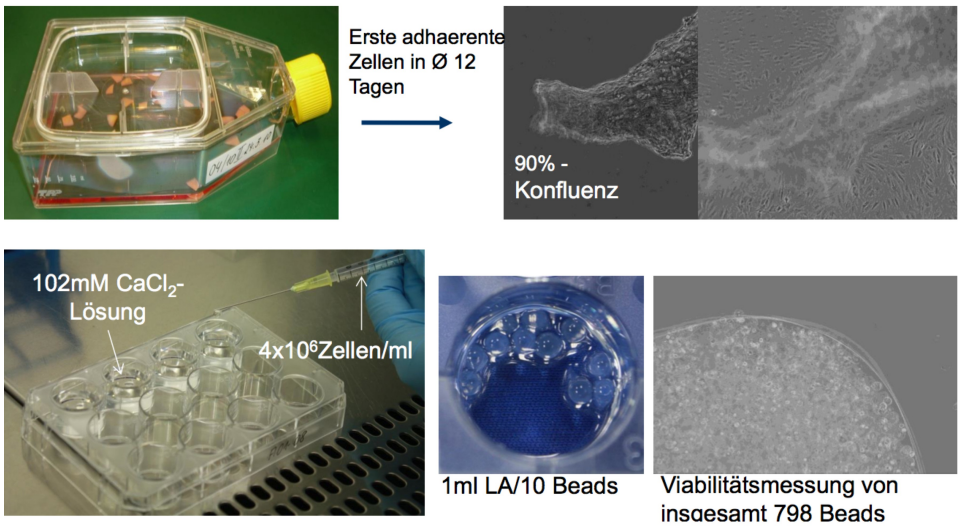

Abb. 5: Zellkultur: Vom Monolayer zur 3D-Kultur im Alginatbead.

1.8 Projektdesign

In der Studie von Chu et al. von 2006 wurde die Zeit-Dosis Wirkungsbeziehung für LA bereits an bovinen Zellen gezeigt, während sie jedoch für für humane Knorpelzellen bisher noch nicht dargestellt wurde (19). Somit war dies ein Ziel dieser Studie. Als eine mögliche Alternative aus der gleichen Medikamentengruppe wurde das Ropivacain auf Grund des potentiell besseren Risikoprofils ausgewählt. In den ausgewerteten Studien wurde Ropivacain bisher in einer Konzentration von 0,5% untersucht. Da es aber in seiner analgetischen Wirkung entsprechend einigen oben genannten Studien weniger potent sein könnte, wurde die Maximalkonzentration in der vorliegender Studie auf 0,75%. erhöht Neben den beiden Lokalanästhetika von Amidtyp wurden Morphinderivate in den Studienaufbau integriert. Die intraartikuläre analgetische Wirkung wurde in klinischen Studien bestätigt, wobei eine *in vitro* eine Untersuchung in Bezug auf die chondrotoxische Potenz bis dato noch aussteht (54,55,72,73). Als Maximalkonzentration wurde für Morphin als auch für M6G 500µg/ml gewählt. Nach Gupta sowie Kalso et al. ist intraartikulär eine höhere Morphin-Dosis im Vergleich zum klinischen Setting notwendig, um einen ausreichenden analgetischen Effekt zu erreichen (54,55). Neben Morphin wurde aus der Gruppe der Opioide M6G als mögliche alternative Substanz für die intraartikuläre Applikation ausgewählt.

Die Expositionszeiten für das Experiment wurden unter Beachtung der zuvor erzielten Ergebnisse der oben genannten Studien gesetzt. Ziel war es, einige Messzeitpunkte zur Vergleichbarkeit aufzugreifen und zugleich die Studie um weitere wichtige Aspekte ergänzen. Bei der Expositionszeit war die Alginat- Diffusionszeit der limitierende Faktor und lag bei einem Minimum von 15 Minuten. Aus der Studie von Tanaka et al. lässt sich ableiten, dass Moleküle bis zu einem Molekulargewicht von $2x\ 10^4$ frei durch die Alginatporen diffundieren. Bei einer ähnlichen Größe wie der des Tryptophans (MW 208), was auf die Experimentalgruppe in Gesamtheit zutrifft, würde der Steady-State-Zustand zwischen Alginat und Medium in weniger als 30 min erreicht werden (74).

Die kurze Expositionszeit in Kombination mit niedrigen Konzentrationen (1x, ½, ¼) wurde im Hinblick auf mögliche zytotoxische Effekte bei einer Einmalgabe im Sinne eines "Single-Shot"-Modells gewählt.

Zur Untersuchung möglicher Langzeitschäden, wie bei der PAGCL (Postarthroskopische Glenohumerale Chondrolyse) nach einer Langzeitexposition mittels

Schmerzpumpe beobachtet, wurden Expositionszeiten bis zu 4 Stunden gewählt. Bei der langen Expositionszeit war zu beachten, dass ab einem bestimmten Schwellenwert die Abwesenheit vom Medium (Nahrung) eine Compoundvariable darstellt. Als Methode zur Messung der Viabilität wurde die ATP -Messung mittels Cell Titer Glo®- Assays verwendet. Da die toxische Wirkung sowohl über die Nekrose- als auch die Apoptose vermittelt wird, wurde der Messzeitpunkt drei Tage nach der Exposition gewählt, um eine Beteiligung beider Prinzipien des Zelltodes zu berücksichtigen.

Als Negativkontrolle wurde bei den Messungen die physiologische Kochsalzlösung verwendet.

2 Ziele der Arbeit

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung und der Vergleich der zytotoxischen Effekte von Lokalanästhetika (LA) vom Amidtyp und der Opioidderivate Morphin und M6G auf humane Chondrozyten.

Hierbei war die Hypothese, dass Morphin und M6G weniger chondrotoxisch als LA vom Amidtyp sind und damit eine knorpelschonende Alternative für die intraartikuläre Anwendung darstellen.

Weiterhin sollte die Frage geklärt werden, ob die zytotoxischen Effekte der LA vom Amidtyp in klinisch relevanter Dosis und Exposition auftreten, insbesondere auch nach der kurzzeitigen Einmalgabe als auch nach längerer Applikation.

Die Ergebnisse dieser Arbeit wären damit in der Lage, wichtige Erkenntnisse aus der Grundlagenforschung mit einem sehr engen Bezug zur Praxis im klinischen Alltag zu liefern.

Voraussetzung und daher primäres Ziel dieser Arbeit war die Etablierung eines standardisierten experimentellen Protokolls für die schnelle Prüfung der Testsubstanzen im Hinblick auf ihre potentielle chondrotoxische Wirkung unter Simulation einer intraartikulären Applikation.

Die methodischen Meilensteine hierzu waren:

- Die Etablierung einer geeigneten Zellkultur für Knorpelgewebe aus primären Knorpelzellen, ohne dass diese dedifferenzieren.
- Die Etablierung geeigneter Marker und Methoden zur Charakterisierung der Knorpelzellen im Alginat (nativ-Färbung) und im Paraffinschnitt (in fixierter Form).
- Die Etablierung geeigneter Methoden zur sensitiven Messung der Viabilität und Stoffwechselleistung der Knorpelzellen im Alginat.

Für die Lokalanästhetika vom Amidtyp, welche bereits für den intraartikulären Einsatz etabliert sind, galt es, eine Zeit/Dosis- Wirkungsbeziehung darzustellen. Zugleich sollte eine Annäherung an eine Empfehlung für den Einsatz dieser Substanzen in zwei verschiedenen klinischen Situationen herausgearbeitet werden:

- dem Einsatz als Einmalspritze (Single-Shot).
- dem Einsatz bei kontinuierlicher Gabe.

Für die Opioide galt es, ihre zytotoxische Wirkung auf humane Chondrozyten zu untersuchen

und im Falle einer Eignung für die intraartikuläre Anwendung zu evaluieren. Hierbei war eine sorgfältige Auseinandersetzung mit den aktuellen klinischen Studien zur analgetischen Potenz und dem Nebenwirkungsprofil unerlässlich.

Die vorliegenden Ergebnisse dieser experimentellen Studie sollen als Grundlage für weitere Anschlussstudien dienen. Hierzu gehören:

- Die Erweiterung des experimentellen Protokolls auf weitere analgetische Substanzen und Zusätze für die intraartikuläre Anwendung.
- Die Erweiterung des experimentellen Protokolls auf anderes Gewebe wie z.B. Sehnen und Bänder.
- Der morphologische Nachweis der intraartikulären Opiat-Rezeptoren auf den Knorpelzellen und dessen Charakterisierung.
- Eine klinische Anwendungsstudie zur intraartikulären Verwendung von Morphin und M6G (placebo-kontrolliert, randomisiert, verblindet, RCT).

3 Publizierte Originalarbeit

Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc
DOI 10.1007/s00167-014-2989-2

EXPERIMENTAL STUDY

Opioids as an alternative to amide-type local anaesthetics for intra-articular application

Irina Ickert · Monika Herten · Melanie Vogl · Christoph Ziskoven · Christoph Zilkens · Rüdiger Krauspe · Jörn Kircher

Received: 6 May 2013 / Accepted: 3 April 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

Abstract
Purpose Recently, the safety profile of local anaesthetics in intra-articular use became into focus of investigation. Opioid drugs have a different mode of action and may be a safe and potent alternative for intra-articular application. The purpose of this in vitro study is to provide evidence for significant chondrotoxicity of amide-type local anaesthetics even after short-term application on human chondrocytes and to demonstrate the absence of such negative effects for opioids [morphine, morphine-6-glucuronide (M6G)].
Method Visually intact cartilage explants of human, mainly osteoarthritic joints ($n = 9$), were harvested and cultivated in monolayer for expansion and transferred into alginate bead. The beads were incubated for increasing incubation times (15 min, 1 and 4 h) in decreasing concentrations (full, ½, ¼ for 15 min) of bupivacaine, ropivacaine, morphine, M6G or saline control. Adenosine triphosphate content of 798 beads was measured 3 days post-incubation to assess cell viability.
Results A clear ranking of cytotoxic potency: bupivacaine > ropivacaine > morphine = M6G = saline was observed. Results reveal a dose- and time-dependent manner of cytotoxic effects on human chondrocytes for bupivacaine and ropivacaine but not for opioids. Cell viability after exposure to morphine and M6G was comparable to exposure to saline.
Conclusion The results confirm dose- and time-dependent cytotoxic effects on human chondrocytes for amide-type local anaesthetics. This study confirms the safety of morphine and M6G in terms of an absence of cytotoxic effects after intra-articular application, making them safe potential alternatives in clinical practice.

Keywords Local anaesthetics · Morphine · Morphine-6-glucuronide · Chondrocytes · Cell viability · Joint

Introduction

Local anaesthetics are an important component of orthopaedic therapy [7–9, 39]. The first report of the possible toxicity of bupivacaine after intra-articular injection for post-arthroscopic analgesia of the knee was described by Liguori et al. [26]. A series of tragic case reports of fulminant chondrolysis at the shoulder joint following the use of intra-articular pain pumps has led to an increased interest in the public sphere and several scientific publications [1, 3, 21, 31].

In addition, the cytotoxicity of local anaesthetics, especially bupivacaine, has been investigated by several authors in articular cartilage cores and chondrocytes from bovine [13, 25, 27, 32], rat [12], rabbit [17] and human cartilage [13, 15, 29].

In contrast to amide-type local anaesthetics, the chondrotoxic potential of opioid drugs on human hyaline cartilage is hardly examined [2].

Unlike local anaesthetics, opioid drugs do not influence sodium channels at the cell membrane; instead, they directly stimulate opioid receptors [10, 33, 38].

I. Ickert · M. Vogl · C. Ziskoven · C. Zilkens · R. Krauspe · J. Kircher
Department of Orthopedics, University Hospital, Heinrich-Heine-University, Duesseldorf, Germany

M. Herten (✉)
Department of Vascular and Endovascular Surgery, University Hospital, Albert-Schweitzer-Campus 1, Building W30, 48149 Münster, Germany
e-mail: Moherten@web.de

Published online: 04 May 2014

The intra-articular use of opioids recently has been proven to be clinically effective and suitable for routine application, especially in inflamed tissue [4, 6, 20, 23, 24, 33].

Its analgesic potential is sufficient for the treatment of severe post-operative pain, but nevertheless it displays several side effects that can seriously compromise its analgesic effectiveness. Similar to morphine, the morphine derivate morphine-6 glucuronide has been proven to be an effective analgesic. In humans, nearly 10 % of morphine is glucuronidated to morphine-6-glucuronide (M6G). Both drugs mediate their analgesic effects via μ1-opioid receptor. M6G is less potent than morphine, but has some important advantages mainly due to his lesser lipophilicity. Applied intravenously, it has a slower onset (15–30 min) and a longer duration of action (>12 h) relative to morphine. At equi-analgesic doses side effects, most notably post-operative nausea, vomiting and respiratory depression are less frequent after M6G treatment, which therefore makes it an attractive alternative to morphine in the management of severe post-operative pain [35, 36]. Due to a lack of metabolites, it has a more favourable pharmacokinetic profile. These substances are thus potential alternatives for intra-articular application.

The present study is a combined investigation of the cytotoxic effects of both amide-type local anaesthetics and opioid drugs on human chondrocytes under the same experimental setting both for long-term/high-dosage uses as well as for short-term and low-dose application. The latter could mimic a "single-shot application" in clinical practice by taking the degree of dilution in the synovial fluid, clearance and absorbance factors into account.

The hypotheses are that even a "single-shot application" of the amide-type local anaesthetics (bupivacaine, ropivacaine) results in significant cytotoxic effects on human chondrocytes and that opioids (morphine, M6G) are without relevant cytotoxicity in this application mode.

Materials and methods

Study population

Exclusion criteria were the presence of substantial degenerative cartilage changes, infections, previous surgery, alignment failure or cruciate ligament rupture. Explants of joint cartilage were taken from peripheral intact parts of the joints (gonarthrosis $n = 4$; coxarthrosis $n = 2$; polydactylous state $n = 3$) in nine patients in total (five male and four female) with an average age of 41 ± 28 years (range 1–78 years). The cartilage explants from polydactyl toes were from non-syndromic sporadic cases and are considered being healthy [28, 30].

Chondrocyte harvesting and culture

Visually intact explants of hyaline joint cartilage from six osteoarthritic and three non-arthritic joints were dissected into 20–25 mm^3 fragments and cultivated in culture flasks using Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Austria) with 4.5 g/l glucose, 20 % foetal bovine serum (PAA), 100 Units/ml penicillin, 100 μg/ml streptomycin and 2 mM glutamine (PAA). The culture conditions were 8.5 % CO_2 and 37 °C. No chondrogenic factors were added. The medium was changed twice a week. Immediately before the cells displayed a confluent monolayer, they were trypsinized and suspended in alginate solution to a three-dimensional conformation. Alginate beads were obtained using the droplet technique as follows: the cells were mixed with sterile 1.2 % (w/v) alginate in a syringe and extruded from the tip of a 22-G needle until they achieved a critical mass, detached and fell into a precipitating solution composed of 1.5 % (w/v) $CaCl_2$ with the pH adjusted to 7.4. After being mixed with gelatin at fixed conditions (30 drops/min, hardening time 10 min), the beads were washed in saline and in medium and cultivated in 6-well plates for 16 days. A total of 798 beads were used from nine different donor cell populations.

Cell characterization

The chondrocytes of the first adhesive cells of the monolayer and of the following passage in the alginate beads were characterized by staining for typical chondrocytes markers as collagen II and GAG.

Histological staining

Glycosaminoglycans (GAG) were identified with 0.1 % Safranin O in a saline solution in both the cell monolayer and the beads. Native stains of GAG in the beads were performed with Safranin O and Alcian blue (0.05 % in sodium acetate buffer pH 5.8 with 0.3 M $MgCl_2$). Additionally, some beads from each patient were fixed in formalin and embedded in paraffin, and the resulting 10 μm thick sections were stained for GAG with 1.9-dimethylmethylene blue (DMMB) (0.021 % in 0.2 % sodium formate, pH 2.3).

Immunohistological staining

Collagen II immunocytochemistry was performed on the paraffin-embedded beads. After fixation, the antigen was retrieved with pepsin (1 mg/ml in Tris–HCl, Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) at a pH of 2 for 10 min at 37 °C. Endogenous peroxidases were blocked with 0.3 % hydrogen peroxide for 30 min. The slides were washed and incubated

with a collagen II alpha 1 chain antibody (1:400 dilution, Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Germany) or the respective negative control mouse IgG1 (Vector, Burlington, CA, USA) in saline-albumin solution overnight at 5 °C. Afterwards, the slides were washed and incubated with a secondary anti-mouse biotin-labelled antibody (Vector) for 60 min at RT. The antibody–antigen complex was visualized using streptavidin peroxidase (Vector) and DAB (Diaminobenzidine, Sigma) as chromogen.

Experimental setup

In our study, we introduced two different experimental setups: one full dosage/long duration (15, 60 and 240 min) with $n = 5$ donors and a second one with low dosage (1, 1/2, and 1/4) and short duration (15 min) with $n = 6$ donors. While cartilage explants from one donor were mostly sufficient for one experimental setup, two donors offered enough material for both setups. Alginate beads from both groups containing chondrocytes were incubated in 24-well chambers ($n = 10$ beads per well) either with ropivacaine (Naropin, AstraZeneca, Wedel, Germany), bupivacaine (Bucain®-Actavis, Actavis, Langenfeld, Germany), morphine (Merck Serono Darmstadt, Germany), M6G (Sigma-Aldrich, Deisenhofen, Germany) or saline as control according to the following scheme (Tables 1, 2). The anaesthetics were diluted with saline.

After incubation with the anaesthetics in the according concentrations and for the respective time periods, the beads were washed three times in saline and cultured in medium, as described above. The cell culture supernatant was collected at day 3 before the incubation and at day 0 and day 3 after the incubation for determination of the collagen II concentration as a marker of the metabolic activity of the cells. After 3 days, the cultivation was stopped. One bead per group was used for cell characterization, whereas nine beads were used for the determination of cell viability.

Cell viability measurement

Cell viability was assessed using the CellTiter-Glo® luminescent cell viability assay (Promega, Mannheim, Germany) [22]. This assay quantifies the presence of adenosine triphosphate (ATP), which identifies the metabolically active cells. Luminescence produced by the luciferase-catalysed reaction of luciferin, and ATP was measured using a multilabel plate reader (VICTOR3™ PerkinElmer LAS, Rodgau-Jügesheim, Germany). In brief, the beads were transferred into 96-well plates (Nunc, Darmstadt, Germany), one bead per well ($n = 9$ per group), and 50 µl CellTiter-Glo® reagent was added to each well. After an incubation period of 10 min at room temperature, the luminescent signal was recorded in counts per second. Additionally, standard measurements with defined numbers of chondrocytes from the monolayer (standard curves) were performed for each patient, and ATP standard curves were plotted with defined ATP concentrations (25–4,000 nM) for each measurement. Interferences of the signal from the alginate material were excluded.

The study was approved by the local Ethics Committee of the Heinrich-Heine-University Düsseldorf (#3333), and informed consent was gathered prior to the study initiation from the patient, caregiver or legal representative.

Statistical analysis

The statistical analysis was performed using commercially available software (SPSS 19.0, Chicago, IL, USA; Microsoft Excel, Redmond, WA, USA). Continuous data were expressed as the mean ± 95 % confidence interval for cell viability and as the mean ± SD for collagen II content. Measurement accuracy was calculated as coefficient of variability (CV) by estimating inter- and intra-assay variance. For the statistical comparisons between the different independent groups, the non-parametric Mann–Whitney

Table 1 First experimental setup: one full dosage and long duration (15, 60 and 240 min), $n = 5$ donors

Incubation time	15 min	60 min	240 min
Ropivacaine full dose 7.5 mg/ml	x	x	x
Bupivacaine full dose 5 mg/ml	x	x	x
Morphine full dose 0.5 mg/ml	x	x	x
Morphine-6 glucuronide full dose 0.5 mg/ml	x	x	x
Control saline NaCl 9 mg/ml	x	x	x

Table 2 Second experimental setup: low dosage (1, 1/2 and 1/4 dosage) and short duration (15 min), $n = 6$ donors

	Ropivacaine			Bupivacaine			Morphine			Morph.-6-glucuronide			Control saline
Concentration	Full	½	¼	Full	½	¼	Full	½	¼	Full	½	¼	
Incubation time 15 min	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

U test was used to compare the cell viability after incubation with the different substances. The level of significance was set at $p < 0.05$.

Results

Cell proliferation and characterization

Adherent cells from all nine patient samples were first visible after 12 ± 5 days and reached confluency after ∅ 33 ± 12 days (Fig. 1).

Cell characterization revealed positive staining of the monolayer cells for Safranin O in all cases. Chondrocytes in the beads stained positively for Safranin O, Alcian blue, DMMB and collagen II in all cases, confirming their chondrocyte character (Fig. 2).

Cell viability

The results of the full dose incubations with increasing incubation times are illustrated in Fig. 3 for $n = 5$ donors.

The ATP measurement accuracy of values revealed inter-assay variance of 7.1 and intra-assay variance of 2.9.

Cell viability decreased significantly ($p = 0.001$) after a single application of 0.5 % bupivacaine for 15 min to 30 % of the NaCl control, and after 60 and 240 min, no vital cells could be detected. In contrast, the short exposure of 0.75 % ropivacaine for 15 min did not significantly interfere with cell viability, which was only slightly reduced to 87 % ($p = 0.013$). Longer incubation times of 60 and 240 min significantly reduced the cell viability to 79 % ($p = 0.01$) and 22 % ($p = 0.001$), respectively, of the control value.

No negative effects on cell viability were detectable after exposure to 0.05 % morphine or 0.05 % M6G. After incubation with morphine for 15 and 60 min, the resulting cell viability was 99 and 102 % of the control value, respectively, and after incubation with M6G for 15 and 60 min, the cell viability was 105 and 100 % of the control value, respectively. Cell viability showed an insignificant decrease to 81 % of the control value only after 240 min of exposure with morphine. With M6G, cell viability remained unaltered regardless of incubation time; after 240 min of exposure, cell viability was 104 % of the control value.

The second methodological step was the establishment of a possible single-shot application model using anaesthetics at full, half and quarter doses with an incubation time of 15 min (Fig. 4) with $n = 6$ donors. Whereas a full dose of bupivacaine significantly reduced cell viability to 19 % of the saline control ($p = 0.001$), this effect was less remarkable after half dosage incubation (84 %, $p = 0.01$) and was 108 % of the saline control (n.s.) after a quarter dose of bupivacaine. Ropivacaine only affected cell viability at the full dose (97 %, n.s.) but not at lower concentrations (106 % for half dose, n.s.; 103 % for quarter dose, n.s.) compared to the saline control.

Morphine did not significantly negatively affect cell viability in any of the concentrations tested; instead, it stimulated the cells (104 % full dose, n.s.; 104 % half dose, n.s.; 102 % quarter dose, n.s.). The same effect was detectable for M6G (106 %, n.s.; 112 %, n.s. and 107 % for full, half and quarter dose incubations, respectively, n.s.).

Discussion

The most important finding of our study is the observation of cytotoxic effects of amide-type local anaesthetics even after short-time incubation and the absence of such relevant effects using opioid drugs.

Our data demonstrated that *ropivacaine is less toxic than bupivacaine* on chondrocytes derived from osteoarthritic and normal polydactylous joints cultured in alginate beads. These findings are in line with the findings of Piper et al. [29] who found 0.5 % ropivacaine to be significantly less toxic than 0.5 % bupivacaine after incubation for 30 min evaluated 1 day post-incubation in human full-thickness articular cartilage explants and chondrocyte cultures.

Because delayed cytotoxic effects have been described by Grishko et al. [18], we selected day 3 for measurement, a time point at which apoptotic effects are already visible, but cell division has not yet taken place. In the present study, *ropivacaine did not cause any viability constraints at any doses used in the short-term setup*, whereas clear cytotoxic effects of full dose ropivacaine after incubation times of 60 and 240 min were detectable. Our findings suggest that the intra-articular use of ropivacaine may be without risk for the shortest period of time necessary.

The deviating effects of ropivacaine described by the aforesaid in vitro studies may be explained by the different time points used for the evaluation of cell viability.

Only with longer incubation periods of 60 and 240 min ropivacaine caused significant effects on cell viability in our study, which is in line with the investigations of Lo et al. [27] on full-thickness bovine cartilage.

The detailed mechanism leading to cellular death is still unknown, but recently impairment of the mitochondrial pathway was found to be involved [18].

The substances used in the present study did not contain any preservatives or pH-changing buffers. Potential effects on the results as described by others can therefore be excluded [5, 16].

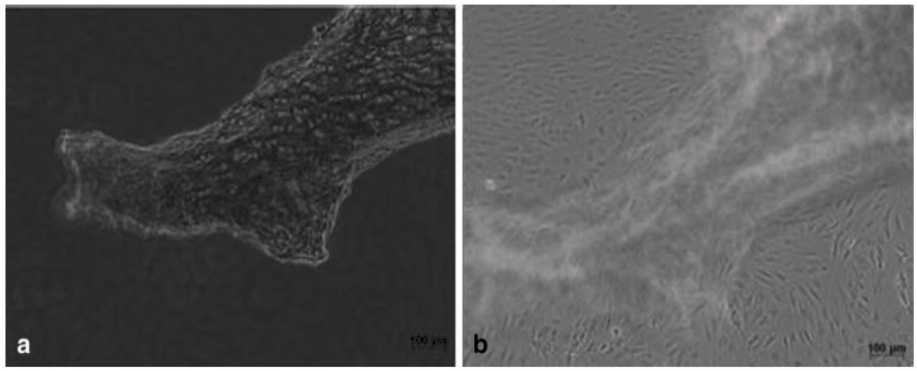

Fig. 1 Cartilage explants with outgrowing first adherent cells after 7 (**a**) and 18 days (**b**) in culture

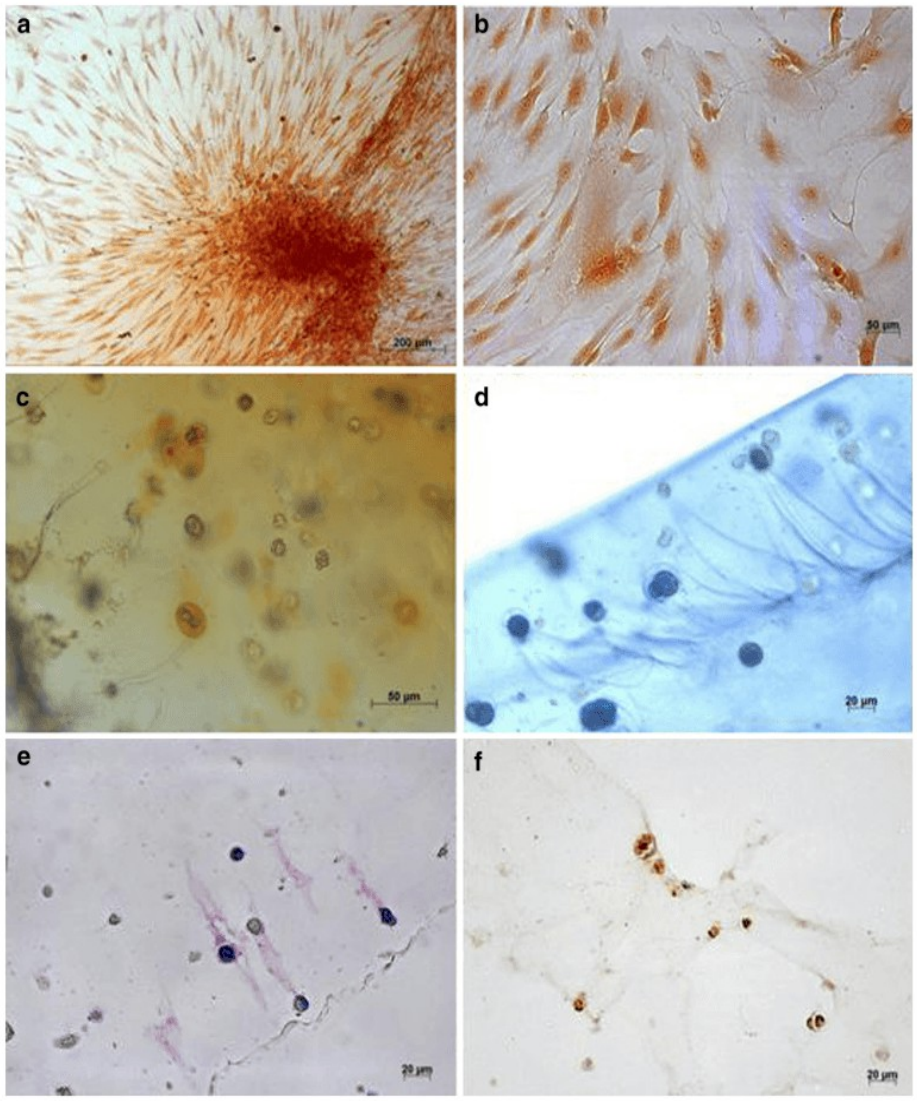

Fig. 2 Characterization of the cells as chondroblasts by staining with Safranin O in the monolayer (**a**, **b**), Safranin O native staining in the alginate beads (**c**), Alcian Blue native staining in the alginate beads (**d**), DMMB staining on paraffin slides (**e**) and collagen II immunohistochemistry on paraffin slides (**f**)

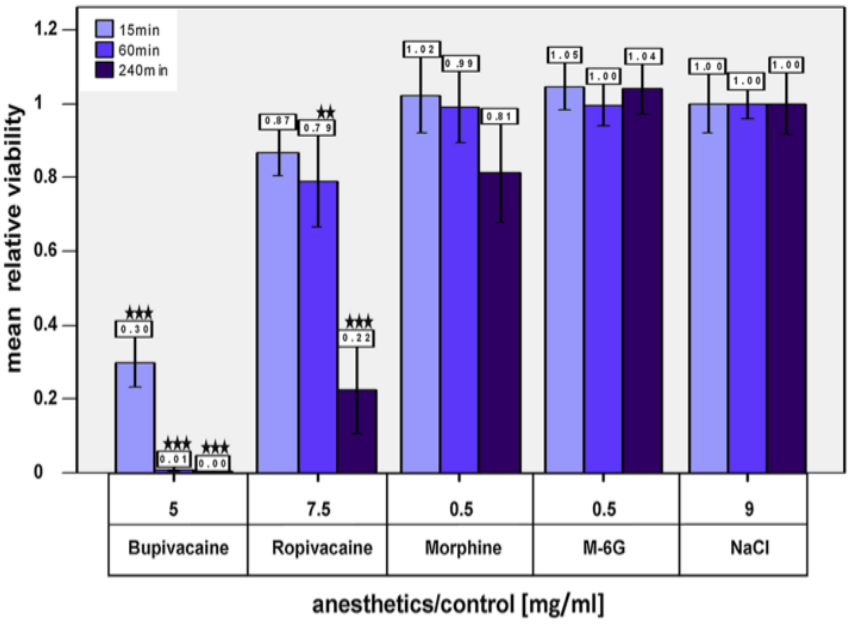

Fig. 3 Average relative cell viability after exposure to the tested drug for 15, 60 and 240 min compared to the saline control ($n = 5$ donors). Mean ± 95 % confidence interval, differences compared to the saline control were significant with $^{**}p = 001$ and *** with $p = 0001$

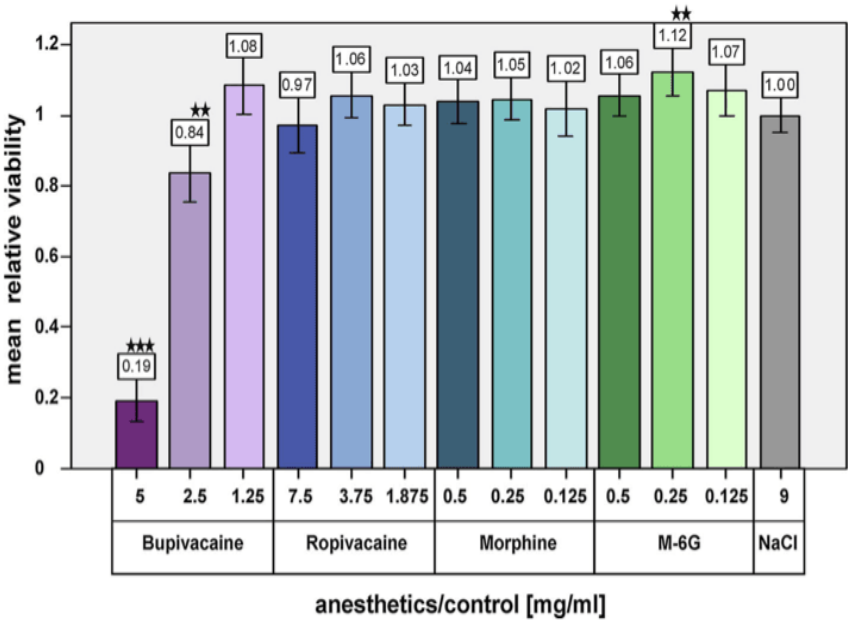

Fig. 4 Average relative cell viability after short-term exposure for 15 min with decreasing concentrations of drug compared to the saline control ($n = 6$ donors) Mean ± 95 % confidence interval, differences compared to saline control were significant with $^{**}p = 001$ and *** with $p = 0001$

Particularly in Europe, intra-articular pain pumps and continuous or repetitive applications of local anaesthetics in a short period of time are rather uncommon, whereas single-shot and repetitive applications with extended time intervals are still very frequently used in clinical practice [7, 8, 39].

The results of this study suggest that after short-term exposure to low concentrations of local anaesthetics, such as in a single-shot application, relevant negative effects could remain in terms of the viability of human chondrocytes. Although ropivacaine is far less cytotoxic than bupivacaine, in our experiments, the negative effects of both are still evident. Furthermore, long-term negative effects are presumably evident based on the findings of some authors in animal and experimental models [13, 18, 19].

Opioids have a different mode of action from local anaesthetics that involve the stimulation of opioid receptors, which is probably the reason for the absence of any relevant cytotoxic effects on human chondrocytes, which is confirmed by the results of our study. We instead observed a slight stimulation of cell viability, although the exact mechanism at the cellular level remains uncertain.

The broad clinical use of the intra-articular application of morphine is limited by known side effects such as nausea and vomiting, and the drug addiction potential also renders prescription and usage quite difficult in most countries with special regulations.

The search for an equipotent analgesic with fewer side effects has led to the natural metabolite M6G. In humans, 60 % of morphine is glucuronidated to M-3G, whereas 6–10 % is glucuronidated to M6G [11]. Although M-3G lacks analgesic properties, animal data have shown M6G to be an analgesic acting at the μ-opioid receptor [37]. In contrast to morphine, M6G causes long-term pain relief in humans; although its analgesic potency is less than that of morphine, equi-analgesic doses are associated with fewer side effects [37].

Morphine-6-glucuronide is still a phase III clinical trial drug and is not yet available on the market and its analgesic potential when used intra-articularly is not yet clearly proofed. Our study showed that M6G does not harm chondrocytes as morphine does not and therefore has the potential to be the superior successor of morphine in the future.

Further investigations will be necessary to test other opioids as alternatives to amide-type local anaesthetics such as tramadol and oxycodone.

The results of this study are limited by the relatively small number of specimens and the wide age range of the individuals at the time of cell harvesting. Although macroscopically intact cartilage was taken from unaffected parts of osteoarthritic joints in six patients, these are obviously considered different in regard to disposition and compensatory potential compared to the non-arthritic joints of the other three patients.

A trend to different results in both subgroups was not observed, but due to the limited number of specimen, a statistical analysis is not reasonable. Furthermore, the single-shot application was simulated by short-term exposure with decreasing concentrations of the drugs, but very little information is available about the intra-articular dilution and degradation of these drugs in vivo.

Alginate diffusion times were not assessed based on the findings of Tanaka et al. [34], who observed a steady state for molecules with similar weight for less than 30 min, but an influence on the results cannot be completely ruled out.

Long-term effects of the tested substances on human chondrocytes at the cellular level, both negative and possible regenerative processes, are beyond the scope of this experimental model.

As has been previously reported, intact articular cartilage may be partially protected from the cytotoxic effects of LA, suggesting that the in vivo effects may be less pronounced than the observed in vitro effects [14]. Although in vitro results cannot be directly extrapolated to clinical practice, they provide important information regarding the intra-articular effect of bupivacaine, ropivacaine, morphine and M6G.

The results of this study suggest preferring ropivacaine over bupivacaine for single-shot intra-articular injections whenever possible.

Opioid drugs appear to be a very good alternative to amide-type local anaesthetics, but further research is necessary to confirm their effectiveness and safety in routine clinical settings.

Conclusions

The results of this study confirm the dose- and time-dependent cytotoxic effects of amide-type local anaesthetics on human chondrocytes. These effects are also relevant for intra-articular single-shot applications of bupivacaine.

The presented data suggest that intra-articular morphine and M6G are not associated with relevant toxicity for human chondrocytes and therefore could be an alternative in clinical practice, if further research data would confirm their effectiveness and safety.

Acknowledgments The present study was financed by a research grant to the Orthopedic Department of the University from the Research Commission of the Medical Faculty University Düsseldorf, Germany.

Conflict of interest None of the authors have any financial and personal relationships with other people or organizations that could potentially and inappropriately influence (bias) the present manuscript and conclusions.

References

1. Anderson SL, Buchko JZ, Taillon MR, Ernst MA (2010) Chondrolysis of the glenohumeral joint after infusion of bupivacaine through an intra-articular pain pump catheter: a report of 18 cases. Arthroscopy 26:451–461
2. Anz A, Smith MJ, Stoker A et al (2009) The effect of bupivacaine and morphine in a coculture model of diarthrodial joints. Arthroscopy 25:225–231
3. Bailie DS, Ellenbecker TS (2009) Severe chondrolysis after shoulder arthroscopy: a case series. J Shoulder Elb Surg 18:742–747
4. Boden BP, Fassler S, Cooper S, Marchetto PA, Moyer RA (1994) Analgesic effect of intraarticular morphine, bupivacaine, and morphine/bupivacaine after arthroscopic knee surgery. Arthroscopy 10:104–107
5. Bogatch MT, Ferachi DG, Kyle B et al (2010) Is chemical incompatibility responsible for chondrocyte death induced by local anesthetics? Am J Sports Med 38:520–526
6. Brandsson S, Karlsson J, Morberg P, Rydgren B, Eriksson BI, Hedner T (2000) Intraarticular morphine after arthroscopic ACL reconstruction: a double-blind placebo-controlled study of 40 patients. Acta Orthop Scand 71:280–285
7. Campo MM, Kerkhoffs GM, Sierevelt IN, Weeseman RR, Van der Vis HM, Albers GH (2012) A randomised controlled trial for the effectiveness of intra-articular ropivacaine and bupivacaine on pain after knee arthroscopy: the DUPRA (Dutch pain relief after arthroscopy)-trial. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 20:239–244
8. Chaumeron A, Audy D, Drolet P, Lavigne M, Vendittoli PA (2013) Periarticular injection in knee arthroplasty improves quadriceps function. Clin Orthop Relat Res 471:2284–2295

9. Chen S, Chen Z, Jin Y et al (2013) Pharmacokinetics and efficacy of ropivacaine in Chinese patients following intra-articular administration. Int J Clin Pharmacol Ther 51:393–400
10. Chen Y, Mestek A, Liu J, Hurley JA, Yu L (1993) Molecular cloning and functional expression of a mu-opioid receptor from rat brain. Mol Pharmacol 44:8–12
11. Christrup LL (1997) Morphine metabolites. Acta Anaesthesiol Scand 41:116–122
12. Chu CR, Coyle CH, Chu CT et al (2010) In vivo effects of single intra-articular injection of 0.5% bupivacaine on articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 92:599–608
13. Chu CR, Izzo NJ, Coyle CH, Papas NE, Logar A (2008) The in vitro effects of bupivacaine on articular chondrocytes. J Bone Joint Surg Br 90:814–820
14. Chu CR, Izzo NJ, Papas NE, Fu FH (2006) In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. Arthroscopy 22:693–699
15. Dragoo JL, Korotkova T, Kanwar R, Wood B (2008) The effect of local anesthetics administered via pain pump on chondrocyte viability. Am J Sports Med 36:1484–1488
16. Dragoo JL, Korotkova T, Kim HJ, Jagadish A (2010) Chondrotoxicity of low pH, epinephrine, and preservatives found in local anesthetics containing epinephrine. Am J Sports Med 38:1154–1159
17. Gomoll AH, Yanke AB, Kang RW et al (2009) Long-term effects of bupivacaine on cartilage in a rabbit shoulder model. Am J Sports Med 37:72–77
18. Grishko V, Xu M, Wilson G, Pearsall A (2010) Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. J Bone Joint Surg Am 92:609–618
19. Gungor I, Yilmaz A, Ozturk AM, Ergun MA, Menevse S, Kaya K (2014) Bupivacaine and levobupivacaine induce apoptosis in rat chondrocyte cell cultures at ultra-low doses. Eur J Orthop Surg Traumatol 24:291–295
20. Gupta A, Bodin L, Holmstrom B, Berggren L (2001) A systematic review of the peripheral analgesic effects of intraarticular morphine. Anesth Analg 93:761–770
21. Hansen BP, Beck CL, Beck EP, Townsley RW (2007) Postarthroscopic glenohumeral chondrolysis. Am J Sports Med 35:1628–1634
22. Herten M, Rothamel D, Schwarz F, Friesen K, Koegler G, Becker J (2009) Surface- and nonsurface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. Clin Oral Investig 13:149–155
23. Jaureguito JW, Wilcox JF, Cohn SJ, Thisted RA, Reider B (1995) A comparison of intraarticular morphine and bupivacaine for pain control after outpatient knee arthroscopy. A prospective, randomized, double-blinded study. Am J Sports Med 23:350–353
24. Kalso E, Smith L, McQuay HJ, Andrew Moore R (2002) No pain, no gain: clinical excellence and scientific rigour-lessons learned from IA morphine. Pain 98:269–275
25. Karpie JC, Chu CR (2007) Lidocaine exhibits dose- and time-dependent cytotoxic effects on bovine articular chondrocytes in vitro. Am J Sports Med 35:1621–1627
26. Liguori GA, Chimento GF, Borow L, Figgie M (2002) Possible bupivacaine toxicity after intraarticular injection for postarthroscopic analgesia of the knee: implications of the surgical procedure. Anesth Analg 94:1010–1013
27. Lo IK, Sciore P, Chung M et al (2009) Local anesthetics induce chondrocyte death in bovine articular cartilage disks in a dose- and duration-dependent manner. Arthroscopy 25:707–715
28. Malik S, Ullah S, Afzal M, Lal K, Haque S (2013) Clinical and descriptive genetic study of polydactyly: a Pakistani experience of 313 cases. Clin Genet. doi:10.1111/cge.12217
29. Piper SL, Kim HT (2008) Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes. J Bone Joint Surg Am 90:986–991
30. Seok HH, Park JU, Kwon ST (2013) New classification of polydactyly of the foot on the basis of syndactylism, axis deviation, and metatarsal extent of extra digit. Arch Plast Surg 40:232–237
31. Serrato JA Jr, Fleckenstein CM, Hasan SS (2011) Glenohumeral chondrolysis associated with use of an intra-articular pain pump delivering local anesthetics following manipulation under anesthesia: a report of four cases. J Bone Joint Surg Am 93:91–98
32. Seshadri V, Coyle CH, Chu CR (2009) Lidocaine potentiates the chondrotoxicity of methylprednisolone. Arthroscopy 25:337–347
33. Stein C, Comisel K, Haimerl E et al (1991) Analgesic effect of intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. N Engl J Med 325:1123–1126
34. Tanaka H, Matsumura M, Veliky IA (1984) Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. Biotechnol Bioeng 26:53–58
35. van Dorp EL, Kest B, Kowalczyk WJ et al (2009) Morphine-6beta-glucuronide rapidly increases pain sensitivity independently of opioid receptor activity in mice and humans. Anesthesiology 110:1356–1363
36. van Dorp EL, Morariu A, Dahan A (2008) Morphine-6-glucuronide: potency and safety compared with morphine. Expert Opin Pharmacother 9:1955–1961
37. van Dorp EL, Romberg R, Sarton E, Bovill JG, Dahan A (2006) Morphine-6-glucuronide: morphine's successor for postoperative pain relief? Anesthes Analg 102:1789–1797
38. Wang JB, Imai Y, Eppler CM, Gregor P, Spivak CE, Uhl GR (1993) mu opiate receptor: cDNA cloning and expression. Proc Nat Acad Sci USA 90:10230–10234
39. Wang X, Jia D, Chen X, Xu Y (2013) Comparison of intra-articular low-dose sufentanil, ropivacaine, and combined sufentanil and ropivacaine on post-operative analgesia of isolated anterior cruciate ligament reconstruction. Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc 21:1140–1145

4 Diskussion

4.1 Dosis- und Zeitabhängige Chondrotoxizität der LA vom Amidtyp

In der vorliegenden Studie wurde eine Dosis- und Zeitabhängigkeit der zytotoxischen Effekte für LA vom Amidtyp an humanen Chondrozyten in 3 D- Kultur aufgezeigt, wobei Bupivacain signifikant chondrotoxischer war im Vergleich zu Ropivacain. Damit werden die Arbeiten von Piper und Kim et al. und Grishko et al. untermauert (26,27). Piper et al. entdeckten diesen Effekt an humanen Chondrozyten in Monolayerkultur und an intakten humanen Knorpelexplantaten. Chondrozyten im Monolayer als auch Knorpelexplantate wurden mit 0,5% Bupivacain und 0,5% Ropivacain 30 Minuten lang inkubiert und die Zellviabilität wurde nach 24 Stunden gemessen. Ropivacain reduzierte die Zellviabilität der Chondrozyten im Monolayer um 36%, Bupivacain um mehr als 60%. An Knorpelexplantaten konnte ein geringerer chondrotoxischer Effekt und auch nur von Bupivacain gezeigt werden. In der vorliegenden Studie reduzierte bereits das 0,25% Bupivacain bei einer 15-minütigen Inkubation die Zellviabilität signifikant. Ropivacain hatte erst nach 60 Minuten Inkubation einen chondrotoxischen Effekt. Der Unterschied im Ausmaß der Ergebnisse könnte vor allem in der Verwendung der verschiedenen Kulturmethoden sowie der unterschiedlichen Messzeitpunkte liegen. Da in der vorliegenden Arbeit die Zellen im Alginat Kollagen-II produzierten und in den Färbungen Hinweise auf eine perizelluläre Matrix sichtbar waren, nimmt die verwendete 3D-Kulturmethode in Bezug auf die Vergleichbarkeit der Daten eine Mittelposition zwischen Monolayer und Nativknorpel ein. Des Weiteren wurde in dieser Arbeit mit 72 Stunden Latenz ein weiter entfernterer Messzeitpunkt für die Viabilität gewählt, damit mehr Zellen in Apoptose erfasst werden konnten. Die Arbeit von Grishko et al. verglich 0,5% und 0,25% Bupivacain und 0,5% und 0,2% Ropivacain auf chondrotoxische Effekte nach einer einstündigen Exposition auf humanen, osteoarthritischen Chondrozyten im Monolayer. Ein Tag nach der Exposition konnte eine nicht signifikante Abnahme der Viabilität durch 0,5% Bupivacain detektiert werden. Ropivacain und 0,25% Bupivacain wiesen keinen chondrotoxischen Effekt auf. Bei einer Viabilitätsmessung nach 5 Tagen wiesen, alle Konzentrationen bis auf das 0,2% Ropivacain signifikante chondrotoxische Effekte auf. Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie konnten einen Anstieg der Zellen in Apoptose bestätigen und im Western- Blot eine Abnahme der Po- Caspase 3 und 9 darstellen,

was auf eine Schädigung der Mitochondrien mit sukzessiver Einleitung der Apoptosekaskade hindeutet. Somit scheinen die LA vom Amidtyp die Chondrozyten sowohl über den Nekrose- als auch Apoptoseweg zu schädigen, sodass der Zeitpunkt der Viabilitätsmessung von wichtiger Bedeutung ist.

4.2 Mögliche Ursachen für die Toxizität der LA vom Amidtyp

Mehrere Arbeitsgruppen beschäftigten sich mit dem Mechanismus, über den Anästhetika ihre Chondrotoxizität vermitteln könnten. Zunächst wurde der Einfluss von Beimengungen und der erhöhten Azidität der LA- Injektionslösungen untersucht. Hierbei konnten Bogatch et al. 2010 zeigen, dass sowohl der pH-Wert von > 3,4 als auch die Beimengung von Epinephrin die Viabilität der Chondrozyten nicht beeinträchtige. Bei einem pH-Wert <3,4 ist ein erhöhter Zelltod möglich. Ferner wurde eine Inkompatibilitätsreaktion im Sinne einer Auskristallisation bei Kontakt zwischen Medium und LA beobachtet. Ob ähnliche Effekte mit Synovialflüssigkeit möglich sind und ob dies einen zytotoxischen Effekt hat, ist bisher nicht geklärt (75).

Auch Dragoo et al. studierten 2010 die Effekte von Epinephrin, Azidität und Konservierungsstoffen. Auch hier zeigte sich das Epinephrin allein nicht chondrotoxisch. In Verbindung mit einem pH-Wert <5 sah man zellschädigende Effekte. Bei den Konservierungsstoffen Methylparaben und Metabisulfide zeigte nur das Letztere einen chondrotoxischen Effekt (76).

In der vorliegenden Studie wurden LA vom Amidtyp sowie Morphine ohne Zusatz von Epinephrin oder Metabisulfid verwendet. Die Alginatbeads vor dem Inkubationsschritt dreimalig mit isotoner NaCl-Lösung gewaschen. Eine Auskristallisation wurde jedoch nicht beobachtet. Der pH- Wert der Inkubationsslösungen lag stets über dem kritischen pH- Wert von 5. Die Osmolaritäten der Lösungen lagen allesamt bei 300 mOsmol lagen, sodass die oben genannten Störvariablen weitestgehend eliminiert werden konnten.

Neben dem physiologischen Ansatz für die LA-induzierte Chondrotoxizität wurde auch auf der molekularen Ebene nach Erklärungsansätzen gesucht. Im Review von Dippenaar et al. aus 2011 werden lokale und systemische toxische Effekte dargestellt, die beide über Interaktionen an Natriumkanälen, Kalium- und Calciumkanälen vermittelt werden. Die Autoren beschreiben zwei grundsätzlich unterschiedliche Signalwege, die zur Zytotoxizität führen können (77). Zum einen kommt es zu einer Akkumulation von intrazellulärem Calcium, das in einer Hyperkontraktion und nachfolgendem Zellschaden mündet. Als

mögliche Ursache wird hier die Interaktion des LA mit dem Ryanidinrezeptor im sarkoplasmatischen Retikulum und die Hemmung der Calcium-ATPase genannt. Das stärker lipophile Bupivacain kann die Zellmembran besser durchwandern, um solche intrazellulären Effekte zu bedingen und übt somit einen stärkeren toxischen Effekt aus. Zum anderen wird ein Signalweg beschrieben, bei dem LA die Apoptose durch eine Entkopplung der Atmungskette einleiten. Eine Schlüsselrolle spielt hierbei ein Kanal auf der inneren Mitochondrienmembran, der „Mitochondrial Permeabilty Transition Pore“ genannt wird und durch LA geöffnet werden kann. Über den offenen Kanal gelangen größere Proteine ins Innere des Mitochondriums, sodass dieses anschwillt. Zudem wird die Membran durchlässig für Protonen, wodurch die Atmungskette entkoppelt wird. Platzt das Mitochondrium, werden Cytochrom C und andere Apoptose- induzierende Faktoren freigesetzt und der Zelltod eingeleitet (77). Dass ähnliche Signalwege auch für Knorpelzellen relevant sein können, wird durch die Arbeit von Grishko et al. 2010 untermauert (27). Auch hier zeigte sich nach Exposition der Knorpelzellen mit verschiedenen LA in unterschiedlicher Dosierung bei allen Proben ein mitochondrialer Schaden und eine eingeleitete Apoptose- Kaskade.

4.3 Vergleich der Chondrotoxizität vom Bupivacain und Ropivacain

In der vorliegenden Arbeit wurde die chondrotoxischen Wirkung von Bupivacain und Ropivacain in equianalgetischer Dosierung verglichen. Während Bupivacain die Viabilität sowohl bei Kurz- als auch Langzeitexposition signifikant verringerte, übt Ropivacain erst bei einer Langzeitinkubation signifikant chondrotoxische Effekte aus.

Dieses Ergebnis ist im Einklang zu der Studie von Lo et al 2009, welche ähnlich zur vorliegenden Studie einen signifikanten, zeit- und dosisabhängigen chondrotoxischen Effekt an bovinen Meniskuszellen für die Langzeitexposition von Ropivacain nachweisen konnte. Nach drei, fünf, acht und zwölf Stunden Inkubation sank die Viabilität auf 62%, 28%, 20% und 0% (21). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Dragoo et al. aus 2012, demnach selbst eine 12- stündige Exposition von humanen Chondrozyten im Monolayer mit 0,5% Ropivacain keine signifikante Viabilitätsabnahme nach sich zog (78). Auch eine sechsstündige Inkubation mit 0,25% Bupivacain ergab keinen signifikanten chondrotoxischen Effekt. Diese Abweichungen von den vorherigen Ergebnissen lassen sich möglicherweise durch eine anderweitige Methodik erklären. Das in diesen Studien genutzte Modell eines Bioreaktors mit kontinuierlichem Fluss per in Reihe geschalteter 6-Wellplatten könnte die Schwierigkeit einer korrekten Verteilung und Durchmischung sowie der entsprechenden

Dosisfindung des zugeführten Agens mit sich bringen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sowie der zuvor genannten Studien weisen auf die Notwendigkeit einer Re- Evaluation des Risiko- Nutzenprofils der LA vom Amidtyp im klinischen Alltag hin. Eine Verfahrensänderung wie in den USA, wo von einer kontinuierlichen intraartikulären Applikation der LA per Schmerzpumpe abgeraten wird, erscheint angeraten (14,15). Für die Anwendung der LA in Form von intraartikulären Kurzzeit-Applikationen wie Einmalspritzen gibt es bisher keine Einschränkungen. Da in Europa gerade diese Anwendungsform mit längeren Zeitintervallen zwischen zwei Anwendungen am häufigsten ist, wurde in der aktuellen Arbeit die Chondrotoxizität für niedrige Konzentrationen von 0,5%, 0,25%, und 0,125% Bupivacain und 0,75%, 0,375% und 0,1875% Ropivacain ausgetestet. Es konnte gezeigt werden, dass bereits eine 15 minütige Exposition von 0,25% Bupivacain (also der kürzesten Exposition in der geringsten Konzentration) signifikant toxische Effekte auf die Viabilität der Knorpelzellen in 3D-Kultur aufweist. Diese Effekte können vermutlich bereits nach einer Einmalspritze im Gelenk auftreten und wären daher für den klinischen Alltag relevant. Ropivacain hingegen ist im direkten Vergleich in equipotenter Dosierung ein knorpelschonenderes Agens und wäre - wann immer möglich - in der klinischen Routine dem Bupivacain vorzuziehen. Da in der vorliegenden Studie ein signifikanter chondrotoxischer Effekt für Ropivacain ab einstündiger Inkubationszeit nachweisbar war, deutet es auch auf eine mögliche Einschränkung im klinischen Alltag für die Handhabung im Rahmen von Schmerzpumpen. Die Übertragung der Ergebnisse in die klinische Behandlungsroutine und ggf. Leitlinien der Fachgesellschaften ist limitiert durch die Verwendung eines *in vitro*-Modells. Andererseits ist aus ethischen Gründen bei bekannten chondrotoxischen Effekten eine klinische Studie nur schwer vorstellbar bzw. unmöglich.

4.4 Morphin und M6G als Alternativen

4.4.1 Keine chondrotoxischen Effekte *in-vitro* nachweisbar

Wichtiges Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist der Nachweis fehlender zytotoxischer Effekte der Testsubstanzen der Opioid-Gruppe sowohl bei allen verwendeten Inkubationszeiten als auch jeder verwendeten Konzentration auf humanen Chondrozyten. Die oben genannten Limitierungen,welche für die intraartikuläre Applikation der LA vom Amidtyp gelten, sind damit irrelevant; das gilt auch für die kontinuierliche Langzeitanwendung.

Diese Substanzen Morphin und M6G wären damit eine mögliche Alternative zu den bisher verwendeten Lokalanästhetika. Experimentelle Daten anderer Autoren zur Zytotoxizität der Morphine auf humanen Gelenkknorpel, wie sie kürzlich für die Lokalanästhetika vorgelegt wurden, existieren für Opioide nicht. Eine klinische Verifizierung der zytotoxischen Unbedenklichkeit vor einem verbreiteten klinischen Einsatz dieser Substanzen wäre daher vonnöten. Bei der Auswertung konnte eine nicht signifikante Erhöhung der Viabilität nach vier Stunden bei M6G feststellt werden. Ob es sich dabei um einen Zufallseffekt handelt, sollte in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

4.4.2 Adäquate analgetische Wirkung bei intraartikulärer Applikation

Eine Erklärung für die fehlende Chondrotoxizität wäre der anderweitige Wirkmechanismus über die μ-Opioidrezeptoren, im Gegensatz zu den LA. Dass Opioide eine adäquate analgetische Wirkung bei intraartikulärer Applikation bieten und somit einen potentiell angemessenen Ersatz für LA vom Amidtyp darstellen, wurde in zahlreichen Studien belegt (54,55). Hierbei zeigen die Ergebnisse, dass die analgetische Wirkung der Opioide durch eine entzündliche Ausgangslage, wie sie beim osteoarthritischen Knorpel vorliegt, verstärkt wird (54,55,79). Die Größe des analgetischen Effekts ist dabei dosisabhängig (55,56,80). Einmalig applizierte Dosen von 25-250μg/ml sind ausreichend, um einen analgetischen Effekt zu erreichen, welcher bis maximal 48 Stunden anhalten kann (54,55,81–86). Nach Gupta et al. 2001 zeigt sich der maximale analgetische Effekt innerhalb von 6-30 Stunden nach Applikation Für die verlängerte Wirkdauer bei intraartikulärer Applikation im Vergleich zur systemischen Gabe bestehen mehrere Erklärungsansätze. Gupta et al. nehmen an, dass ein analgetisch wirksames Abbauprodukt von Morphin, das Morphin-6-Glucuronid, für die verlängerte Analgesie verantwortlich sei. Im Vergleich zu Morphin, mit einer Plasmahalbwertszeit von durchschnittlich drei Stunden, weist das M6G eine Plasmahalbwertszeit von mehr als 12 Stunden. Intraartikuläre Glucuronidasen könnten das Morphin zu Morphin-6-Glukuronid umsetzen (55). Weitere Studien diskutieren als eine mögliche Ursache, eine verzögerte Clearance aus dem Gelenk kombiniert mit relativ niedrigem Blutfluss in der Gelenkregion (83,87). Ob die Analgesie hierbei über eine ausschließlich periphere Schmerzhemmung vermittelt wird, ist noch nicht eindeutig geklärt. Ein systemischer analgetischer Effekt scheint eher unwahrscheinlich (83,88). Die gemessene maximale Konzentration ist mit <10ng/ml deutlich unter der von Dahlström und Nayman 1979 und 1982 postulierten-minimal effektiven-Konzentration (MEC) von 16-17ng/ml (89,90).

Zusammenfassend lässt sich schlussfolgern, dass Morphin bei intraartikulärer Gabe über einen lokalen Effekt hinaus klinisch wirksam ist, seine Wirkung verzögert mit einer Latenz von 1-2 Stunden eintritt und für 24-48h andauert.

4.4.3 Wirkungsmechanismus der Opioide

Neben den klinischen Studien gibt es auch biozytologische Erklärungsansätze, warum intraartikulär applizierte Opioide lokal analgetisch wirksam sind. Die Forschungsgruppe Stein et al. arbeitet seit 1990 an einem „opioid pathway", um die Wirkung der Opioide außerhalb des ZNS zu erklären (87). Sie postulierten folgenden Mechanismus: Die Somata der Spinalnerven sind in der Lage, mRNA und folglich Proteine der μ-, delta- und kappa-Opioidrezeptoren herzustellen und über den anterograden axonalen Transport an den sensorischen Nervenendigungen zu exprimieren. Eines der am besten untersuchten Stimuli für die Hochregulation dieser Rezeptoren ist der Entzündungsvorgang. Es kommt zur Aussprossung der Dendriten, einem vereinfachten Zugang der Opioide zu den Rezeptoren bei geschädigter Perineuralscheide und höherer intrinsischer Aktivität im Rahmen der Azidose. Die endogenen Opioide werden in Granulozyten und Lymphozyten produziert und im entzündlichen Gewebe sezerniert, um die schmerzlindernde Wirkung vermitteln zu können. Somit begünstigt die *a priori* stattgefundene Entzündung oder Gewebeschädigung gewissermaßen die Wirksamkeit der eingesetzten Opioide (87). Diese Ergebnisse sind im Einklang mit der zuvor erwähnten klinischen Studien sowie der Studie von Likar et al, welche bei einer entzündlichen Ausgangslage eine bessere Wirksamkeit der Opioide nachgewiesen haben (54,55,79,91). Laut Stein et al. ist die analgetische Wirkung spezifisch für intraartikulär applizierte Opioide, da sie per Naloxon antagonisierbar ist (92).

Während Opioidrezeptoren auf peripher-sensorischen Nervenzellen als Teil der Schmerzbahn der Wahrnehmung und Verarbeitung der Schmerzstimuli dienen, wurden kürzlich Opioidrezeptoren von Csaba et al. 2002 und Bigliardi-Qi et al. 2004 auch außerhalb von Nervenzellen gefunden (93,94). Die Arbeiten von Elvenes et al. 2003 und Andjelov et el 2006 beschreiben funktionale Opioidrezeptoren auf humanen Chondrozyten, deren Rolle bisher ungeklärt ist (95,96). Somit bleibt der genaue Mechanismus der lokalen Analgesie durch Opioide weiterhin nicht gänzlich geklärt.

4.4.4 Morphinmetabolit: Morphin-6-glukuronid

Da ein breiter klinischer Einsatz von Morphin auf Grund von den häufig auftretenden Nebenwirkungen wie Übelkeit und Erbrechen neben den strengen Verschreibungsvorschriften

bei einem Suchtstoff erschwert ist, wurde M6G ebenfalls in den Versuchsansatz aufgenommen. Laut van Dorp et al. aus dem Jahr 2008 ist M6G basierend auf experimentellen Daten und klinischen Studien der Phase II, möglicherweise ein vorteilhafteres Profil (97).

Erstens biete M6G eine ausreichende Analgesie, die bei intravenöser Applikation in ihrer Potenz mit der von Morphin vergleichbar ist. Da M6G bisher noch nicht intraartikulär angewandt wurde, bleibt das Dosisverhältnis zu Morphin für diese Anwendung noch zu klären. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit zunächst beide Substanzen in gleicher Konzentration verwendet. Bei einer intravenösen Bolus-Applikation kann bei einem Dosis-Quotient(w:w) von 2-3:1(M6G:Morphin) eine äquivalente Analgesie erreicht werden (98–100) Wird das M6G kontinuierlich in Form einer Erhaltungsdosis verabreicht, liegt der Dosis-Quotient bei ca. 1-1,4:1(M6G:Morphin) (101,102).

Zweitens weist M6G eine längere Wirkungsdauer von über 12 Stunden auf und drittens eine bessere Verträglichkeit bei geringeren Fällen von PONV und Atemdepression. Die Wirkung auf die Atemdepression ist bei beiden Substanzen in äquianalgetischen Dosen ähnlich. Ein signifikanter Unterschied konnte aber bei der Einwirkung auf die kompensatorische Antwort während hypoxischer Zustände gezeigt werden, wobei das Morphin den kompensatorischen Ventilationsanstieg ca. 19-50 mal stärker unterdrückt als das 1,5-fach höher dosierte M6G (97,103). Die zugleich 20-fach geringere Affinität zu kappa-Opioidrezeptoren und eine 4-5-fach geringere Affinität zu μ2-Rezeptoren, die beide funktionell mit Atemdepression assoziiert sind, könnte hierbei eine Rolle spielen (101,105). Neben den genannten RCTs aus der Übersichtsarbeit von van Dorp et al., welche eine signifikante Abnahme von PONV-Fällen bei bis zu 50% der Probanden in der M6G-Gruppe im Vergleich zur Morphingruppe nachweisen konnten, wurde 2011 eine Multicenterstudie von Binnigl et al.veröffentlicht, die zu ähnlichen Ergebnisse kommt. Dort wird eine subsignifikante Abnahme von Übelkeit um 27% für die Gesamtzahl der Probanden beschrieben sowie eine Reduktion des Antiemetikagebrauches, des Vorkommens von Vomitus und PONV im Bereich von 30-35% zu Gunsten des M6G (97,105).

Nachteilig ist ein verspäteter Wirkungseintritt des M6G, sodass eine frühere Gabe oder ein supplementärer Wirkstoff notwendig ist. Sein Wirkungseintritt ist vor allem abhängig von der Höhe der verabreichten Dosis und der Applikationsart. Bei intravenöser Gabe ab 0,3mg/kg beträgt die Latenzzeit zwischen 15 und 30 min, sodass eine Gabe 30-60 min vor dem OP-Ende zu empfehlen sei (104).

Insgesamt lässt sich auf Grund der vorhandenen Daten und ausgewerteten Literatur

schlussfolgern, dass das M6G eine adäquate Analgesie bei intravenöser Gabe erzeugt. Der Effekt setzt verzögert ein und dauert bis zu dreimal länger als der von Morphin. Aufgrund der erhöhten Hydrophilie ist das pharmakokinetische Profil im Vergleich zu Morphin verschieden. Bei intraartikulärer Applikation könnte dadurch die intraluminale Verweildauer verlängert sein. Das M6G ist aktuell nur zu experimentellen Zwecken zugelassen und befindet sich in der Phase III klinischer Studien (105). Sollte sich das Morphin-6-Glukuronid klinisch als eine geeignete Alternative zu Morphin erweisen, so bietet die vorliegenden Studie bereits erste Ergebnisse zur *in-vitro* Chondrotoxizität dieser Substanz. Es konnten sowohl in der Kurzzeit- als auch Langzeitinkubation (bis zu 4 Stunden) keine chondrotoxischen Effekte festgestellt werden. Es zeigte sich eher eine subsignifikante Zellvermehrung nach der Langzeitinkubation.

4.5 Limitationen

4.5.1 Verwendeter Spenderknorpel

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie sind durch eine relativ kleine Knorpel-Spenderzahl von 9 Personen limitiert, die zudem noch eine große Alterspanne von 1-78 Jahren abbildet. Die Nummer des Ethikvotums für die hier verwendeten Zellen lautet 3333. Um statistische Relevanz zu erreichen, wurden die Primärzellen im Monolayer expandiert Die Zellen wurden immunhistochemisch und molekularbiologisch auf typische Knorpelmarker wie Kollagen-II und GAG untersucht und konnten eindeutig als Chondrozyten charakterisiert werden. Die Zellen wurden in 3 D-Kultur überführt, indem insgesamt 789 Beads getropft wurden. Nachfolgend wurde jedes Bead einzeln ausgewertet. Bei der Entnahme der Knorpelstücke in den sechs arthrotischen Gelenken wurden nur die makroskopisch gesunden Stellen berücksichtigt, wobei der Knorpel bei den drei jungen Spendern in seiner Gesamtheit verwendet wurde. Durch diesen Knorpel wurde insgesamt die Qualität des entnommenen Materials verbessert. Zugleich unterscheidet sich der junge Knorpel potentiell in Bezug auf die Disposition und Regenerationsfähigkeit und erzeugt hiermit Heterogenität im Ausgangsmaterial. Bei der Auswertung der Daten konnte kein Trend für unterschiedliche Effekte in diesen beiden Subgruppen (Zellen aus gesundem Knorpel Spender n=6 vs. gesundem Knorpel junger Spendern=3) festgestellt werden. Eine statistische Subgruppenanalyse wurde bei geringer Probenanzahl in den Subgruppen nicht durchgeführt. Einer weiteren Einschränkung unterliegt der in der Studie gezogene deduktive Schluss, dass kurzzeitig mit niedrig dosiertem LA exponierte Knorpel-Alginatbeads eine Einmalgabe vom

LA ins Gelenk simulieren. Unter experimentellen Bedingungen gelingt im *in vitro*-Modell nur bedingt die Simulation der natürlichen Abläufe *in vivo*.

4.5.2 Wahl der Konzentrationen der Testsubstanzen

Die effektive Konzentration der Testsubstanzen im Gelenk *in vivo* lässt sich nur schwierig abschätzen. Es existieren bisher keine klinischen Angaben über intraartikuläre Halbwertszeiten für die in dieser Arbeit verwendeten Substanzen. Die genaue Verweildauer der Substanzen im Gelenk und damit die Einwirkzeit auf den Gelenkknorpel als wichtige Einflussgröße bleiben dabei also unbestimmt. Betrachtet man die Synovialhöhle im Sinne eines Kompartimentmodells, so ergeben sich drei wichtige Variablen, die auf die Konzentration des Stoffes im Kompartiment Einfluss nehmen, falls der Stoff an sich inert ist: Invasionsgeschwindigkeit, Eliminationsgeschwindigkeit und das Verteilungsvolumen.

Die Invasionsgeschwindigkeit ist abhängig vom Blutfluss zum Gelenk, dem Konzentrationsgradienten der Stoffe, der Vaskularisierungssituation und der Barriere zwischen den Kompartimenten. Des Weiteren spielt die Größe, Ladung, Konformation sowie das Bindungsverhalten des jeweiligen Stoffes an Transportmolekülen eine große Rolle.

Die Eliminationsgeschwindigkeit wird stark durch die Bindungs- und Verteilungsprozesse im Subsynovium und durch den mechanischen Druck während der Bewegung beeinflusst. Es ergibt sich somit ein multifaktorielles Modell, welches nur schwierig vorhersagbar wird. Viele dieser Variablen verändern sich stark im Alter oder im Entzündungszustand. Das Verteilungsvolumen kann in einem rheumatischen Knie um das 4fache zunehmen (106). In der Übersichtsarbeit von Edward et al. werden relativ kurze intraartikuläre Halbwertszeiten von wenigen Stunden für kleine Moleküle (MW < 10000Da) benannt (107). So konnte bei Pferden eine intraartikuläre terminale HWZ für das Lokalanästhetikum Lidocain von 1,5 Stunden ermittelt werden (108). Die Ursache für die schnelle Elimination der Substanzen aus dem Gelenk wird in der synovialen Ultrastruktur gesehen. Das 50µm dicke Synovium besteht aus diskontinuierlich angeordneten Synovialzellen und einem dichten Kapillargefäßnetz (hohe Kapillargefäßdichte: mit 240/mm²). Die einzelnen Gefäßschlingen reichen nahe an die Synovialhöhle heran (bis zu 35µm) und sind an der zu ihr gerichteten Seite fenestriert, sodass kleine Moleküle wie Lokalanästhetika barrierefrei zwischen dem Plasma und der Synovialflüssigkeit diffundieren (108).

Die Ergebnisse unterstützen den in der vorliegenden Arbeit gewählten Ansatz mit kurzen Inkubationszeiten und niedrigen Konzentrationen. Die Mindest-Inkubationszeit von 15 min musste gewählt werden, damit zugleich eine ausreichende Alginat-Diffusionszeit garantiert

werden konnte. Diese wurde anhand der Angaben von Tanaka et al.gewählt (74), die Alginatdiffusionszeiten abhängig von der Größe der Moleküle untersuchten. Für Moleküle ähnlicher Größe wie im vorliegenden Versuchsansatz konnte ein Steady State in weniger als 30 min erreicht werden.

Trotz der oben genannten Limitationen, zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Studie einen klaren Trend in Bezug auf die Chondrotoxizität und geben wichtige Hinweise auf die Verwendung dieser Substanzen im klinischen Kontext.

5 Schlussfolgerung

In dieser *in vitro*-Studie an humanen Chondrozyten konnten eine fulminante chondrotoxische Wirkung der Lokalanästhetika gezeigt werden. Diese Wirkung konnte sowohl bei Gruppe der jungen Spendern als auch bei den gesunden Arealen arthrotischer Spendergelenke in einer ähnlichen Ausprägung beobachtet werden und war zeit- und dosisabhängig . Schon eine kurze Inkubationszeit von 15 min von 0,25% Bupivacain zeigte eine relevante Chondrotoxizität auf. Hieraus lässt sich für die klinische Anwendung ein bedeutendes toxisches Potential ableiten, dass sich bereits bei einer Einmalgabe in Form eines „Single- Shots“ ins Gelenk entfalten könnte. Der Einfluss von gewissen Dispositionsfaktoren wie Intaktheit der Knorpeloberfläche, Alter des Patienten, Entzündungszustand etc. könnten diesen Effekt verstärken oder kompensieren.

Auf dem Boden der vorliegenden Ergebnisse ist die Applikation von Bupivacain selbst als Einmalgabe kritisch und es wird daher empfohlen, wann immer möglich, auf Ropivacain als das weniger toxisches Agens zurückzugreifen. Es konnte gezeigt werden, dass Ropivacain bei Kurzzeitapplikation eine knorpelschonende Alternative darstellt.

Im Rahmen einer Langzeitanwendung wie z. B. einer Schmerzpumpe weist Ropivacain dennoch eine signifikante Chondrotoxizität auf und sollte falls möglich vermieden werden. Aufgrund des geringen Einflusses auf die Viabilität der Knorpelzellen selbst bei Inkubationszeit von vier Stunden können Morphinderivate als geeignete Schmerzmittel für die Langzeitanwendung eingestuft werden. Da die Wirkung der Morphine erst mit einer Latenz von einigen Minuten beginnt ist initial ggf. eine überlappende Anwendung von Morphin mit Ropivacain sinnvoll. Eine Einschränkung für den breiten Einsatz der Morphine bei postoperativen Eingriffen, stellt das Nebenwirkungsprofil mit PONV sowie die BTM-Rezeptpflicht aufgrund des Suchtprofils dar. Mit dem aktuellen Metabolit des Morphins, den Morphin-6-Glukuronid, scheint das Nutzen-Risikoprofil optimiert worden zu sein und sich eine potentielle Alternative mit verbesserter Pharmakokinetik zu bieten.

Weitere klinische *in vivo*-Studien könnten, die analgetische Equipotenz sowie die Nebenwirkungen bei intraartikulärer Anwendung untersuchen.

In Bezug auf die in dieser Arbeit verwendete Methodik lässt sich schlussfolgern, dass sich die Alginatkultur sehr gut für die Knorpelzellanzucht und Testung der Substanzen eignet. Eine erprobte und höchst sensitive Methode für den Nachweis der Zellviabilität ist die

Messung des ATP- Gehaltes mittels Biolumineszenz. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Methodik nach Adaption sich sehr gut für die Alginatkultur eignet. Der verwendete CellTiter-Glo®- Assay erlaubt jedoch keine Differenzierung zwischen Nekrose oder Apoptose. Für Folgeexperimente wäre deshalb der Einsatz des ApoTox-Glo™ Triplex- Assay vorzuziehen, welcher diese Möglichkeit bietet.

Insgesamt sind weitere analoge Studien in einem größeren Rahmen notwendig, um unsere Ergebnisse zu stützen. Zur besseren Übertragung der *in vitro* Daten in eine *in vivo*-Situation gebraucht es Studien zur Pharmakokinetik (intraartikulärer Clearance etc.) und Pharmakodynamik der LA bei intraartikulärer Anwendung und es sind Toxizitätsversuche an Synovial- und Meniskusgewebe notwendig.

6 Literatur-und Quellenverzeichnis

1. Nole R, Munson NML, Fulkerson JP. Bupivacaine and saline effects on articular cartilage. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 1985;1(2):123–7.

2. Jaureguito JW, Wilcox JF, Thisted RA, Phillips C, Cunningham B, Reider B. The effects of morphine on human articular cartilage of the knee. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 2002;18(6):631–6.

3. Convery PN, Milligan KR, Quinn P, Sjövall J, Gustafsson U. Efficacy and uptake of ropivacaine and bupivacaine after single intra- articular injection in the knee joint. Br J Anaesth. 2001;87(4):570–6.

4. Katz JA, Kaeding CS, Hill JR, Henthorn TK. The pharmacokinetics of bupivacaine when injected intra- articularly after knee arthroscopy. Anesthesia & Analgesia. 1988;67(9):872–5.

5. Bianconi M, Ferraro L, Traina GC, Zanoli G, Antonelli T, Guberti A. Pharmacokinetics and efficacy of ropivacaine continuous wound instillation after joint replacement surgery. Br J Anaesth. 2003;91(6):830–5.

6. Hansen BP, Beck CL, Beck EP, Townsley RW. Postarthroscopic glenohumeral chondrolysis. The American journal of sports medicine. 2007;35(10):1628.

7. Bailie DS, Ellenbecker TS. Severe chondrolysis after shoulder arthroscopy: a case series. Journal of Shoulder and Elbow Surgery. 2009;18(5):742–7.

8. Scheffel PT, Clinton J, Lynch JR, Warme WJ, Bertelsen AL, Matsen III FA. Glenohumeral chondrolysis: A systematic review of 100 cases from the English language literature. Journal of Shoulder and Elbow Surgery. 2010;19(6):944–9.

9. Serrato JA, Fleckenstein CM, Hasan SS. Glenohumeral chondrolysis associated with use of an intra-articular pain pump delivering local anesthetics following manipulation under anesthesia: A Report of Four Cases. The Journal of Bone and Joint Surgery (American) Case Reports. 2011;93(17):e99–1.

10. Anderson SL, Buchko JZ, Taillon MR, Ernst MA. Chondrolysis of the glenohumeral joint after infusion of bupivacaine through an intra-articular pain pump catheter: a report of 18 cases. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 2010;26(4):451–61.

11. Busfield BT, Romero DM. Pain pump use after shoulder arthroscopy as a cause of glenohumeral chondrolysis. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 2009;25(6):647–52.

12. Solomon DJ, Navaie M, Stedje-Larsen ET, Smith JC, Provencher MT. Glenohumeral chondrolysis after arthroscopy: a systematic review of potential contributors and causal pathways. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery.

2009;25(11):1329–42.

13. Bojescul JA, Wilson G, Taylor DC. Idiopathic chondrolysis of the ankle. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 2005;21(2):224–7.

14. Research C for DE and. Postmarket Drug Safety Information for Patients and Providers - Infused Local Anesthetics Information [Internet]. [zitiert 12. Juli 2012]. Verfügbar unter: http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/ucm190328.htm

15. Research C for DE and. Drug Safety Information for Healthcare Professionals - Information for Healthcare Professionals - Chondrolysis Reported with Continuously Infused Local Anesthetics (marketed as bupivacaine, chlorprocaine, lidocaine, mepivacaine, procaine and ropivacaine) [Internet]. [zitiert 12. Juli 2012]. Verfügbar unter: http://www.fda.gov/Drugs/DrugSafety/PostmarketDrugSafetyInformationforPatientsandProviders/DrugSafetyInformationforHeathcareProfessionals/ucm190302.htm

16. Gomoll AH, Yanke AB, Kang RW, Chubinskaya S, Williams JM, Bach BR. Long-term effects of bupivacaine on cartilage in a rabbit shoulder model. The American Journal of Sports Medicine. 2009;37(1):72.

17. Dogan N, Erdem AF, Erman Z, Kizilkaya M. The effects of bupivacaine and neostigmine on articular cartilage and synovium in the rabbit knee joint. The Journal of international medical research. 2004;32(5):513–9.

18. Constance R, Christian H, Charleen T, Michal S, Venkat S, John C. In vivo effects of single intra-articular injection of 0.5% bupivacaine on articular cartilage. The Journal of Bone and Joint Surgery (American). 2010;92(3):599–608.

19. Chu CR, Izzo NJ, Papas NE, Fu FH. In vitro exposure to 0.5% bupivacaine is cytotoxic to bovine articular chondrocytes. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 2006;22(7):693–9.

20. Karpie JC, Chu CR. Lidocaine exhibits dose-and time-dependent cytotoxic effects on bovine articular chondrocytes in vitro. The American journal of sports medicine. 2007;35(10):1621.

21. Lo IKY, Sciore P, Chung M, Liang S, Boorman RB, Thornton GM. Local anesthetics induce chondrocyte death in bovine articular cartilage disks in a dose-and duration-dependent manner. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 2009;25(7):707–15.

22. Chu C, Izzo N, Coyle C, Papas N, Logar A. The in vitro effects of bupivacaine on articular chondrocytes. Journal of Bone and Joint Surgery (British). 2008;90(6):814.

23. Piper SL, Kramer JD, Kim HT, Feeley BT. Effects of local anesthetics on articular cartilage. The American Journal of Sports Medicine. 2011;

24. Dragoo JL, Korotkova T, Kanwar R, Wood B. The effect of local anesthetics administered via pain pump on chondrocyte viability. The American Journal of Sports Medicine. 2008;36(8):1484.

25. Gomoll AH, Kang RW, Williams JM, Bach BR, Cole BJ. Chondrolysis after continuous intra-articular bupivacaine infusion: an experimental model investigating chondrotoxicity in the rabbit shoulder. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 2006;22(8):813–9.

26. Piper SL, Kim HT. Comparison of ropivacaine and bupivacaine toxicity in human articular chondrocytes. The Journal of Bone and Joint Surgery (American). 2008;90(5):986.

27. Grishko V, Xu M, Wilson G, Pearsall AW. Apoptosis and mitochondrial dysfunction in human chondrocytes following exposure to lidocaine, bupivacaine, and ropivacaine. The Journal of Bone and Joint Surgery (American). 2010;92(3):609–18.

28. Koller C. On the use of cocaine for producing anaesthesia on the eye. The Lancet. 1884;124(3197):990–2.

29. Löfgren N. Studies on local anesthetics: Xylocaine, a new synthetic drug [Internet]. Stockholm.; 1948. Verfügbar unter: http://books.google.de/books?id=_SIUAQAAIAAJ

30. Camorcia M, Capogna G, Columb MO. Minimum local analgesic doses of ropivacaine, levobupivacaine, and bupivacaine for intrathecal labor analgesia. Anesthesiology. 2005;102(3):646.

31. Stühmer W, Conti F, Suzuki H, Wang X, Noda M, Yahagi N, u. a. Structural parts involved in activation and inactivation of the sodium channel. Nature. 1989;339(6226):597–603.

32. Catterall WA. From Ionic Currents to Molecular Review Mechanisms: The Structure and Function of Voltage-Gated Sodium Channels. Neuron. 2000;26(1):13–25.

33. Hille B. Ionic channels in excitable membranes. Current problems and biophysical approaches. Biophysical Journal. 1978;22(2):283–94.

34. Scholz A. Mechanisms of (local) anaesthetics on voltage- gated sodium and other ion channels. Br J Anaesth. 2002;89(1):52–61.

35. Leone S, Di Cianni S, Casati A, Fanelli G. Pharmacology, toxicology, and clinical use of new long acting local anesthetics, ropivacaine and levobupivacaine. Acta Biomed. 2008;79(2):92–105.

36. Lefrant J-Y, Coussaye JE de L, Ripart J, Muller L, Lalourcey L, Peray PA. The comparative electrophysiologic and hemodynamic effects of a large dose of ropivacaine and bupivacaine in anesthetized and ventilated piglets. Anesth Analg. 2001;93(6):1598–605.

37. Feldman HS, Arthur GR, Covino BG. Comparative systemic toxicity of convulsant and supraconvulsant doses of intravenous ropivacaine, bupivacaine, and lidocaine in the Conscious Dog. Anesth Analg. 1989;69(6):794–801.

38. Ohmura S, Kawada M, Ohta T, Yamamoto K, Kobayashi T. Systemic toxicity and resuscitation in bupivacaine-, levobupivacaine-, or ropivacaine-infused rats. Anesth Analg. 2001;93(3):743–8.

39. Sztark F, Malgat M, Dabadie P, Mazat JP. Comparison of the effects of bupivacaine and ropivacaine on heart cell mitochondrial bioenergetics. Anesthesiology. 1998;88(5):1340.

40. Groban L. Central nervous system and cardiac effects from long-acting amide local anesthetic toxicity in the intact animal model. Regional anesthesia and pain medicine. 2003;28(1):3.

41. Scott DB, Lee A, Fagan D, Bowler GMR, Bloomfield P, Lundh R. Acute toxicity of ropivacaine compared with that of bupivacaine. Anesth Analg. 1989;69(5):563–9.

42. Knudsen K, Suurküla MB, Blomberg S, Sjövall J, Edvardsson N. Central nervous and cardiovascular effects of i.v. infusions of ropivacaine, bupivacaine and placebo in volunteers. Br J Anaesth. 1997;78(5):507–14.

43. David J-S, Ferreti C, Amour J, Vivien B, Eve O, Petit P. Effects of bupivacaine, levobupivacaine and ropivacaine on myocardial relaxation. Canadian Journal of Anesthesia / Journal canadien d'anesthésie. 2007;54(3):208–17.

44. Klein SM, Greengrass RA, Steele SM, D'Ercole FJ, Speer KP, Gleason DH. A comparison of 0.5% bupivacaine, 0.5% ropivacaine, and 0.75% ropivacaine for interscalene brachial plexus block. Anesth Analg. 1998;87(6):1316–9.

45. Breschan C, Jost R, Krumpholz R, Schaumberger F, Stettner H, Marhofer P, u. a. A prospective study comparing the analgesic efficacy of levobupivacaine, ropivacaine and bupivacaine in pediatric patients undergoing caudal blockade. Pediatric Anesthesia. 2005;15(4):301–6.

46. Benhamou D, Ghosh C, Mercier FJ. A randomized sequential allocation study to determine the minimum effective analgesic concentration of levobupivacaine and ropivacaine in patients receiving epidural analgesia for labor. Anesthesiology. 2003;99(6):1383.

47. Capogna G, Celleno D, Fusco P, Lyons G, Columb M. Relative potencies of bupivacaine and ropivacaine for analgesia in labour. British journal of anaesthesia. 1999;82(3):371–3.

48. Polley LS, Columb MO, Naughton NN, Wagner DS, van de Ven CJM. Relative analgesic potencies of ropivacaine and bupivacaine for epidural analgesia in labor: implications for therapeutic indexes. Anesthesiology. 1999;90(4):944.

49. Buyse I, Stockman W, Columb M, Vandermeersch E, Van de Velde M. Effect of sufentanil on minimum local analgesic concentrations of epidural bupivacaine, ropivacaine and levobupivacaine in nullipara in early labour. International Journal of Obstetric Anesthesia. 2007;16(1):22–8.

50. Marret E, Gentili M, Bonnet MP, Bonnet F. Intra-articular ropivacaine 0.75% and bupivacaine 0.50% for analgesia after arthroscopic knee surgery: A randomized prospective study. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 2005;21(3):313–6.

51. Zink W, Graf BM. The toxicity of local anesthetics: the place of ropivacaine and levobupivacaine. Current Opinion in Anesthesiology. 2008;21(5):645.

52. Borgeat A, Kalberer F, Jacob H, Ruetsch YA, Gerber C. Patient-controlled interscalene analgesia with ropivacaine 0.2% versus bupivacaine 0.15% after major open shoulder surgery: The effects on hand motor function. Anesth Analg. 2001;92(1):218–23.

53. Zaric D, Nydahl PA, Philipson L, Samuelsson L, Heierson A, Axelsson K. The effect of continuous lumbar epidural infusion of ropivacaine (0.1%, 0.2%, and 0.3%) and 0.25% bupivacaine on sensory and motor block in volunteers: a double-blind study. Regional anesthesia. 1996;21(1):14.

54. Kalso E, Smith L, McQuay HJ, Andrew Moore R. No pain, no gain: clinical excellence and scientific rigour–lessons learned from IA morphine. Pain. 2002;98(3):269–75.

55. Gupta A, Bodin L, Holmström B, Berggren L. A systematic review of the peripheral analgesic effects of intraarticular morphine. Anesthesia & Analgesia. 2001;93(3):761–70.

56. Likar R, Kapral S, Steinkellner H, Stein C, Schäfer M. Dose-dependency of intra-articular morphine analgesia. British journal of anaesthesia. 1999;83(2):241.

57. Pert CB, Snyder SH. Opiate receptor: demonstration in nervous tissue. Science. 1973;179(4077):1011–4.

58. Hughes J, Smith TW, Kosterlitz HW, Fothergill LA, Morgan BA, Morris HR. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. Nature. 1975;258(5536):577.

59. Romberg R, Olofsen E, Sarton E, den Hartigh J, Taschner PEM, Dahan A. Pharmacokinetic-pharmacodynamic modeling of morphine-6-glucuronide-induced analgesia in healthy volunteers: absence of sex differences. Anesthesiology. 2004;100(1):120.

60. Huch K, Stöve J, Puhl W, Günther KP. Review and comparison of culture-techniques for articular chondrocytes. Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete. 2002;140(2):145.

61. Hauselmann HJ, Fernandes RJ, Mok SS, Schmid TM, Block JA, Aydelotte MB. Phenotypic stability of bovine articular chondrocytes after long-term culture in alginate beads. Journal of cell science. 1994;107(1):17

62. Bonaventure J, Kadhom N, Cohen-Solal L, Ng KH, Bourguignon J, Lasselin C. Reexpression of cartilage-specific genes by dedifferentiated human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Experimental cell research. 1994;212(1):97–104.

63. Liu H, Lee YW, Dean MF. Re-expression of differentiated proteoglycan phenotype by dedifferentiated human chondrocytes during culture in alginate beads. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects. 1998;1425(3):505–15.

64. Lemare F, Steimberg N, Le Griel C, Demignot S, Adolphe M. Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: Restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to Interleukin-1beta. Journal of cellular physiology. 1998;176(2):303–13.

65. Domm C, Fay J, Schünke M, Kurz B. Die Redifferenzierung von dedifferenzierten Gelenkknorpelzellen in Alginatkultur. Der Orthopäde. 2000;29(2):91–9.

66. Naal F-D, Steinhauser E, Schauwecker J, Diehl P, Mittelmeier W. Tissue engineering von Knochen-und Knorpelgewebe: die Bedeutung von Sauerstoff und Hypoxie. Biomaterialien. 2004;5(1):34–7.

67. Hauselmann HJ, Masuda K, Hunziker EB, Neidhart M, Mok SS, Michel BA. Adult human chondrocytes cultured in alginate form a matrix similar to native human articular cartilage. Am J Physiol Cell Physiol. 1996;271(3):C742–52.

68. Chubinskaya S, Huch K, Schulze M, Otten L, Aydelotte MB, Cole AA. Gene expression by human articular chondrocytes cultured in alginate beads. Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 2001;49(10):1211–9.

69. Schulze M, Kuettner KE, Cole AA. Adulte humane Chondrozyten in Alginatkultur. Der Orthopäde. 2000;29(2):100–6.

70. Grant GT, Morris ER, Rees DA, Smith PJC, Thom D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: The egg-box model. FEBS Letters. 1973;32(1):195–8.

71. Goh CH, Heng PWS, Chan LW. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. Carbohydrate Polymers. 2012;88(1):1–12.

72. Meiser A, Laubenthal H. Klinische Studien zur peripheren Wirksamkeit von Opioiden nach Kniegelenk-Operationen. Der Anaesthesist. 1997;46(10):867–79.

73. Simanski CJP. Pain therapy for the lower extremities. Orthopade. Oktober 2008;37(10):959–60, 962–9.

74. Tanaka H, Matsumura M, Veliky IA. Diffusion characteristics of substrates in Ca-alginate gel beads. Biotechnology and Bioengineering. 1984;26(1):53–8.

75. Bogatch MT, Ferachi DG, Kyle B, Popinchalk S, Howell MH, Ge D. Is chemical incompatibility responsible for chondrocyte death induced by local anesthetics? Am J Sports Med. 2010;38(3):520–6.

76. Dragoo JL, Korotkova T, Kim HJ, Jagadish A. Chondrotoxicity of low pH, epinephrine, and preservatives found in local anesthetics containing epinephrine. Am J Sports Med. 2010;38(6):1154–9.

77. Dippenaar JM. Local anaesthetic toxicity. Southern African Journal of Anaesthesia and Analgesia. 2011;13(3):23–8.

78. Dragoo JL, Braun HJ, Kim HJ, Phan HD, Golish SR. The In vitro chondrotoxicity of single-dose local anesthetics. Am J Sports Med. 2012;40(4):794–9.

79. Rosseland LA, Stubhaug A, Skoglund A, Breivik H. Intra-articular morphine for pain relief after knee arthroscopy. Acta Anaesthesiologica Scandinavica. 1999;43(3):252–7.

80. Kanbak M, Akpolat N, Öcal T, Doral M, Ercan M, Erdem K. Intraarticular morphine administration provides pain relief after knee arthroscopy. European journal of anaesthesiology. 1997;14(2):153–6.

81. Chan ST. Intra-articular morphine and bupivacaine for pain relief after therapeutic arthroscopic knee surgery. Singapore medical journal. 1995;36:35–7.

82. Ho ST, Wang JJ, Liaw WJ, Wong CS, Cherng CH. Analgesic effect of intra-articular morphine after arthroscopic knee surgery in Chinese patients. Acta anaesthesiologica Sinica. 1995;33(2):79.

83. Joshi GP, McCarroll SM, O'Brien TM, Lenane P. Intraarticular analgesia following knee arthroscopy. Anesthesia and analgesia. 1993;76(2):333.

84. Lyons B, Lohan D, Flynn CG, Joshi GP, O'Brien TM, McCarroll M. Intra-articular analgesia for arthroscopic meniscectomy. British journal of anaesthesia. 1995;75(5):552–5.

85. Brandsson S, Karlsson J, Morberg P, Rydgren B, Eriksson BI, Hedner T. Intraarticular morphine after arthroscopic ACL reconstruction: A double-blind placebo-controlled study of 40 patients. Acta Orthopaedica. 2000;71(3):280–5.

86. Khoury GF, Chen AC, Garland DE, Stein C. Intraarticular morphine, bupivacaine, and morphine/bupivacaine for pain control after knee videoarthroscopy. Anesthesiology. 1992;77(2):263.

87. Stein C, Lang LJ. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. Current Opinion in Pharmacology. 2009;9(1):3–8.

88. Richardson MD, Bjorksten AR, Hart JAL, McCullough K. The efficacy of intra-articular morphine for postoperative knee arthroscopy analgesia. Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery. 1997;13(5):584–9.

89. Dahlström B, Tamsen A, Paalzow L, Hartvig P. Patient-controlled analgesic therapy, Part IV: pharmacokinetics and analgesic plasma concentrations of morphine. Clinical pharmacokinetics. 1982;7(3):266.

90. Nayman J. Measurement and control of postoperative pain. Annals of the Royal College of Surgeons of England. 1979;61(6):419.

91. Likar R, Koppert W, Blatnig H, Chiari F, Sittl R, Stein C. Efficacy of peripheral morphine analgesia in inflamed, non-inflamed and perineural tissue of dental surgery patients. Journal of pain and symptom management. 2001;21(4):330–7.

92. Stein C, Comisel K, Haimerl E, Yassouridis A, Lehrberger K, Herz A, u. a. Intraarticular morphine after arthroscopic knee surgery. N Engl J Med. 1991;325:1123–6.

93. Csaba G, Kovács P, Pállinger É. Beta-endorphin in granulocytes. Cell biology international. 2002;26(8):741–3.

94. Bigliardi-Qi M, Sumanovski LT, Büchner S, Rufli T, Bigliardi PL. Mu-opiate receptor and Beta-endorphin expression in nerve endings and keratinocytes in human skin.

Dermatology. 2004;209(3):183–9.

95. Elvenes J, Andjelkov N, Figenschau Y, Seternes T, Bjørkøy G, Johansen O. Expression of functional mu-opioid receptors in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. Biochemical and biophysical research communications. 2003;311(1):202–7.

96. Andjelkov N, Elvenes J, Figenschau Y, Bjorkoy G, Knutsen G, Seternes T. Detection of mRNA transcripts of truncated opiate precursor (POMC) in human cartilage. Cell biochemistry and function. 2006;24(3):229–35.

97. Dorp EL van, Morariu A, Dahan A. Morphine-6-glucuronide: potency and safety compared with morphine. Expert Opinion on Pharmacotherapy. 2008;9(11):1955–61.

98. Romberg R, van Dorp E, Hollander J, Kruit M, Binning A, Smith T. A randomized, double-blind, placebo-controlled pilot Study of iv morphine-6-glucuronide for postoperative pain relief after knee replacement surgery. The Clinical Journal of Pain. 2007;23(3):197–203.

99. Smith T., Binning AR, Dahan A. Efficacy and safety of morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief: A randomized, double-blind study. European Journal of Pain. 2009;13(3):293–9.

100. Kilpatrick GJ, Smith TW. Morphine-6-glucuronide: Actions and mechanisms. Medicinal Research Reviews. 2005;25(5):521–44.

101. Hanna MH, Elliott KM, Fung M. Randomized, double-blind study of the analgesic efficacy of morphine-6-glucuronide versus morphine sulfate for postoperative pain in major surgery. Anesthesiology. 2005;102(4):815.

102. Dahan A, van Dorp E, Sarton E. Postoperative morphine-6-glucuronide versus morphine: equal analgesia but reduced nausea/vomiting. Anesthesiology. 2007;107:A1744.

103. Romberg R, Olofsen E, Sarton E, Teppema L, Dahan A. Pharmacodynamic effect of morphine-6-glucuronide versus morphine on hypoxic and hypercapnic breathing in healthy volunteers. Anesthesiology. 2003;99(4):788.

104. Dahan A, van Dorp E, Smith T, Yassen A. Morphine-6-glucuronide (M6G) for postoperative pain relief. European Journal of Pain. 2008;12(4):403–11.

105. Binningl AR, Przesmyckil K, Sowinskil P, Morrisonl LMM, Smithl TW, Marcusl P. A randomised controlled trial on the efficacy and side-effect profile (nausea/vomiting/sedation) of morphine-6-glucuronide versus morphine for post-operative pain relief after major abdominal surgery. European Journal of Pain. 2011;15(4):402–8.

106. Heilmann HH, Lindenhayn K, Walther HU. Das Synovia-Volumen gesunder und arthrotischer menschlicher Kniegelenke. Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete. 1996;134(2):144–8.

107. Edwards SHR. Intra-articular drug delivery: The challenge to extend drug residence time within the joint. The Veterinary Journal. 2011;190(1):15–21.

108. Levick JR. Microvascular architecture and exchange in synovial joints. Microcirculation. 1995;2(3):217–33.

Danksagung

Mein außerordentlicher Dank gilt in erster Linie meinen beiden Betreuern Priv. -Doz. Dr. med. Jörn Kircher und Dr. rer. nat. Monika Herten, die mich während des gesamten Projektes zielführend begleiteten, sowie dem gesamten orthopädischen Institut für die Ermöglichung der Forschungsarbeit.

Meinem Doktorvater und Mentor Priv. Doz. Dr. med. Kircher danke ich ausdrücklich für die zuverlässige und erfolgreiche Zusammenarbeit und Unterstützung bei der Publikation.

Frau Dr. rer. nat. Monika Herten danke ich herzlich für den unerschöpflichen Fundus an methodischen und wissenschaftlichen Hinweisen während unserer Diskussionen im Labor „bei einer Tasse Tee“ sowie für die souveräne Hilfe bei der Erstellung und Durchführung von Protokollen und der Verarbeitung von Rohdaten.

Des Weiteren möchte ich mich bei Frau Dr. Lensing Höhn sowie meiner Kollegin Melanie Vogel für die tatkräftige Unterstützung im Labor danken sowie dem gesamten Team des zahnmedizinischen Forschungslabor für die Zurverfügungsstellung ihrer Ressourcen.

Der Dank an meine Familie geht weit über diese Arbeit hinaus; Euch zum Stolz gilt diese Arbeit.

Wenn man ein neues Arbeitsfeld betritt, ist man als Lehrling von der Erfahrung und der Expertise der Tutoren abhängig. Diese ermöglichen das effiziente und erfolgreiche Voranschreiten. Somit danke ich jedem, der mich auf meinem Wege begleitet hat.