

**Die Wirkung von verschiedenen Kollagenhydrolysaten auf
den Metabolismus des humanen Gelenkknorpels**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Saskia Schadow
aus Mühlendorf

Gießen 2013

Aus dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie
Labor für experimentelle Orthopädie
Leiter: Prof. Dr. J. Steinmeyer

Gutachter: Prof. Dr. Steinmeyer

Gutachter: Prof. Dr. Borggrefe

Tag der Disputation: 02. Juni 2014

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	5
1.1	Gelenkaufbau	5
1.2	Anatomie und Physiologie des Gelenkknorpels	5
1.2.1	Chondrozyten	6
1.2.2	Kollagene	6
1.2.3	Proteoglykane	7
1.3	Osteoarthritis	9
1.3.1	Pathogenese	10
1.3.1.1	Katabole Mechanismen	12
1.3.1.2	Anabole Mechanismen	15
1.3.1.3	Rolle des subchondralen Knochens und des kalzifizierten Knorpels	16
1.3.1.4	Rolle der Synovia	17
1.3.2	Therapieoptionen	17
1.4	Zielsetzung der Arbeit	24
2	Material und Methoden	27
2.1	Material	27
2.1.1	Probenmaterial	27
2.1.2	Gruppeneinteilung	27
2.1.3	Geräte	29
2.1.4	Verbrauchsmaterialien	30
2.1.5	Chemikalien	31
2.1.6	Lösungen und Puffer	34
2.1.7	Kollagenhydrolysate	37
2.2	Methoden	38
2.2.1	Präparation der Knorpelexplantate	38
2.2.2	Allgemeine Überlegungen zur Kollagensynthese	38
2.2.2.1	Kultivierung und radioaktive Markierung der Knorpelexplantate .	39
2.2.2.2	Analyse der Knorpelexplantate	41
2.2.3	Vorversuche zur Kollagensynthese	43
2.2.3.1	Überprüfung des β -Flüssigkeitsszintillationszählers	43
2.2.3.2	Entfernen der nicht-inkorporierten radioaktiven Präcursor wäh- rend der Kultivierung	45

2.2.3.3	Aufreinigung der Stammlösung der Präcursor mittels der Hydroxyprolin-Nachweismethode	45
2.2.3.4	Trocknung der Explantate mit Aceton	46
2.2.3.5	Verdünnung der Knorpelproben	46
2.2.3.6	Zeitfenster für die photometrische Messung	47
2.2.3.7	Absorptionsspektrum	47
2.2.3.8	Radioaktive Markierung	47
2.2.3.9	Aufreinigung von Hydroxyprolin	48
2.2.4	Vorversuche zur Degradation	48
2.2.4.1	MMP-1-, MMP-3- und MMP-13-ELISA	49
2.2.4.2	Kollagen Typ II- und C1,2C-ELISA	49
2.2.4.3	Proteoglykan-Nachweis	49
2.2.4.4	NO-Nachweis	50
2.2.5	Hauptversuch 1: Wirkung von RDH, RDH-N und CH-alpha [®] auf die Kollagensynthese von humanen Knorpel-explantaten aus mittleren OA-Stadien	50
2.2.6	Hauptversuch 2: Wirkung von RDH, RDH-N und CH-alpha [®] auf die Kollagensynthese von humanen Knorpel-explantaten aus frühen OA-Stadien	50
2.2.7	Hauptversuch 3: Wirkung von FGH, FGH-N und Mobiforte [®] auf die Kollagensynthese von humanen Knorpel-explantaten aus mittleren OA-Stadien	50
2.2.8	Hauptversuch 4: Wirkung von RDH, RDH-N und CH-alpha [®] auf degradative Prozesse in humanen Knorpel-explantaten aus mittleren OA-Stadien	51
2.2.9	Hauptversuch 5: Wirkung von FGH, FGH-N und Mobiforte [®] auf degradative Prozesse in humanen Knorpel-explantaten aus mittleren OA-Stadien	52
2.2.10	Analyse der Nährmedien und der Knorpel-explantate	52
2.2.10.1	Kollagensynthese	52
2.2.10.2	Freisetzung von Kollagen Typ II	53
2.2.10.3	Freisetzung von Proteoglykanen	53
2.2.10.4	Freisetzung von Prostaglandin E ₂	54
2.2.10.5	Freisetzung von NO	55
2.2.10.6	Gehalt an MMPs im Nährmedium	55

2.2.10.7	Gehalt von TIMP-1 im Nährmedium	56
2.3	Statistische Analyse	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Vorversuche	58
3.1.1	Überprüfung des β -Flüssigkeitsszintillationszähler	58
3.1.2	Entfernung der nicht-inkorporierten radioaktiven Präcursor wäh- rend der Kultivierung	58
3.1.3	Aufreinigung der Stammlösung der Präcursor mittels der Hydroxy- prolin-Nachweismethode	59
3.1.4	Trocknung der Explantate mit Aceton	62
3.1.5	Verdünnung der Knorpelproben	63
3.1.6	Zeitfenster für die photometrische Messung	64
3.1.7	Absorptionsspektrum	64
3.1.8	Radioaktive Markierung	65
3.1.9	Aufreinigung von Hydroxyprolin	67
3.1.10	Vorversuche zur Degradation	67
3.2	Hauptversuche	68
3.2.1	Kollagensynthese	68
3.2.1.1	Analyse der Knorpelimplantate	69
3.2.1.2	Analyse der Medien	73
3.2.2	Freisetzung von Kollagen Typ II	73
3.2.3	Freisetzung von Proteoglykanen	74
3.2.4	Freisetzung von Prostaglandin E ₂	76
3.2.5	Freisetzung von NO	78
3.2.6	Gehalt an MMPs in den Nährmedien	78
3.2.7	Gehalt von TIMP-1 in den Nährmedien	83
4	Diskussion	85
4.1	Methodik	86
4.2	Die Wirkung der Kollagenhydrolysate	88
5	Zusammenfassung	97
6	Summary	100
7	Abkürzungsverzeichnis	102

8	Abbildungsverzeichnis	104
9	Tabellenverzeichnis	105
10	Literaturverzeichnis	106
11	Tabellarischer Anhang	116
12	Publikationsverzeichnis	171
13	Ehrenwörtliche Erklärung	172
14	Danksagung	173

1 Einleitung

1.1 Gelenkaufbau

Das Gelenk besteht aus zwei miteinander artikulierenden Knochen, welche durch einen umgebenden Kapsel-Band-Apparat stabilisiert werden. Die mit hyalinem Knorpel überzogenen Gelenkflächen sind durch einen Gelenkspalt getrennt. Die dadurch entstehende Gelenkhöhle ist mit Synovialflüssigkeit gefüllt und nach außen durch eine Kapsel abgegrenzt (siehe Abb. 1) [24]. Die Kapsel übernimmt zusammen mit den Ligamenten Aufgaben im Bereich der mechanischen Stabilität und der gleichmäßigen Gelenkbelastung [79]. Die Synovialflüssigkeit, welche die Reibung zwischen den Gelenkflächen herabsetzt und als Stoßdämpfer dient, ist ein Ultrafiltrat des Blutes dem die Membrana synovialis der Gelenkkapsel noch weitere Substanzen hinzufügt. Die Zellen der Membrana synovialis sind daher in der Lage die molekulare Zusammensetzung der Synovia zu verändern und somit die metabolische Homöostase des Gelenkes mitzubestimmen [24, 79].

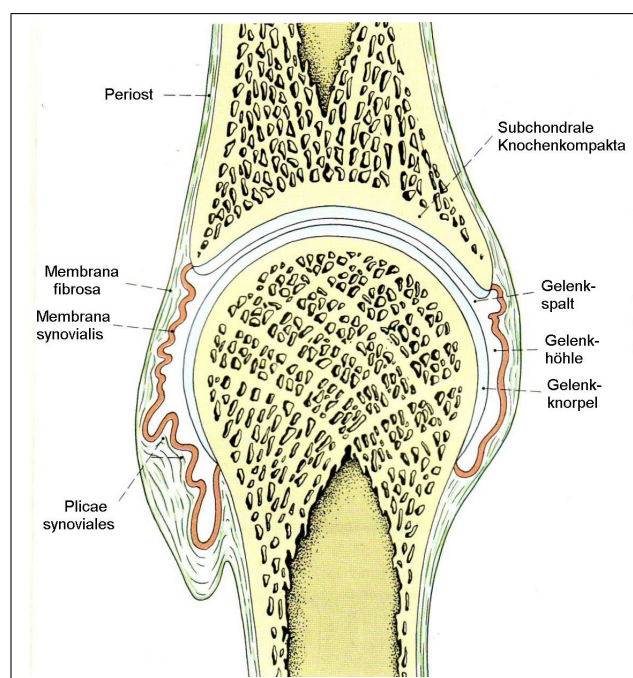


Abb. 1: Gelenkaufbau [24]

1.2 Anatomie und Physiologie des Gelenkknorpels

Der hyaline Knorpel hat die Funktion, durch seine glatte Oberfläche und seine viskoelastischen Eigenschaften ein reibungsfreies Gleiten, sowie eine gleichmäßige Kraftübertragung zwischen den Gelenkflächen zu ermöglichen [24]. Er besteht aus Chondrozyten und einer extrazellulären Matrix, dessen Hauptaufgabe in der Auf-

rechterhaltung der mechanischen Eigenschaften des Knorpels liegt [24]. Die Matrix besteht im Wesentlichen aus ca. 75 % Wasser, ca. 15 % Kollagen, vorwiegend Kollagen Typ II, ca. 12 % Proteoglykanen, vorwiegend Aggrekan, sowie aus weiteren Proteinen und Glykoproteinen. Chondrozyten machen je nach Quellenangabe etwa 0,1 - 2 % des Knorpelgewebes aus [54, 60].

1.2.1 Chondrozyten

Die Zellen des Knorpelgewebes leiten sich von mesenchymalen Stammzellen ab. Durch die Synthese der extrazellulären Matrix verlieren sie im Laufe der Entwicklung ihre Verbindung zueinander, so dass im Knorpelgewebe die Chondrozyten vereinzelt oder in kleinen Gruppen isogener Zellen, sogenannter Chondrone, vorliegen. Die Chondrone werden von einer kapselartigen territorialen Matrix umgeben und stellen eine Art verformbares, druckelastisches Zellpolster dar. Die Chondrozyten sind für den Auf- und Abbau der extrazellulären Matrix verantwortlich und versuchen sich bei Änderungen der Beanspruchung an die neue Situation durch eine veränderte Syntheseleistung anzupassen. Durch das Fehlen eines Perichondriums sowie von Blutgefäßen ist der Gelenkknorpel nur begrenzt zur Regeneration fähig. Da im adulten Knorpel Chondroblasten fehlen, ist dessen Reparationsleistung vorwiegend durch vermehrte oder modifizierte Syntheseleistung der Chondrozyten bedingt [24].

1.2.2 Kollagene

Kollagene sind besonders zugstarke Strukturen, die je nach Ausrichtung und Anordnung dem Knorpelgewebe Zugfestigkeit in eine oder mehrere Richtungen verleihen. Sie gehören zu einer Gruppe von 28 verschiedenen Proteinmolekülen (Typ I - XXVIII), die unterschiedliche, extrazelluläre Matrixstrukturen ausbilden. Derzeit kennt man 13 weitere Proteine mit Kollagen-ähnlicher Struktur, die im engeren Sinne nicht zur Kollagen-Familie gezählt werden [78]. Kollagene sind in ihrem Grundaufbau alle aus einer Tripelhelix aufgebaut, welche aus drei linksgängigen α -Ketten besteht, diese wiederum stellen Polypeptidketten mit einer charakteristischen Aminosäurefolge dar. Die α -Kettengrundstruktur ist eine Folge von $(\text{Gly-X-Y})^n$, wobei X meistens Prolin und Y Hydroxyprolin ist. Glycin, als kleinste Aminosäure, ist wichtig für die Annäherung der Polypeptidketten bei der Bildung der Kollagentripelhelix. Prolin stabilisiert mit seinem ringförmigen Rest die helikale Konformation [6, 11, 78]. Ein weiteres charakteristisches Merkmal von Kollagenen ist die posttranslationale Hydroxylierung von Prolin- und Lysinresten sowie die Glycosylierung mancher Hydroxylysine. Zwischen den Hydroxyprolinresten bilden sich Wasserstoffbrücken, welche für die Stabilität der Helix eine wichtige Rolle spielen [11]. Die 300 nm langen Tripelhelices werden extrazellulär weiter modifiziert und lagern sich

dann zu Fibrillen zusammen, welche durch kovalente Querbrücken zwischen Lysinseitenketten einen stabilen Komplex bilden (siehe Abb. 2) [24]. Kollagenfibrillen haben einen Durchmesser von 10 - 300 nm und eine Länge von mehreren hundert Mikrometern. Sie zeigen im Elektronenmikroskop eine typische Querstreifung, die durch das um 67 nm gegeneinander versetzte Anlagern der einzelnen Moleküle entsteht. Kollagenfibrillen verbinden sich häufig zu kabelähnlichen Bündeln, die sogenannten Kollagenfasern [6].

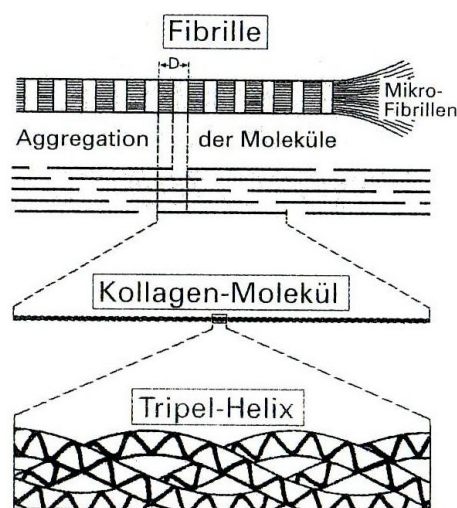


Abb. 2: Aufbau einer Kollagenfibrille [74]

Kollagen Typ II macht den größten Teil der im Knorpel vorkommenden Kollagene aus. Dieses fibrilläre Kollagen ist sehr wichtig für die funktionellen Eigenschaften insbesondere der Zugfestigkeit der extrazellulären Matrix im Knorpel [24, 78]. Weitere im Knorpel vorkommende Kollagene sind Kollagen Typ I, III, V, VI, IX, X, XI, XII, XIV. Sie sind quantitativ nur in geringem Umfang im Knorpel vorhanden, übernehmen dennoch wichtige funktionelle und strukturelle Aufgaben [32, 52]. Sie vermitteln Wechselwirkungen zwischen Kollagenfibrillen untereinander und mit anderen Matrixmolekülen und verankern z.B. die Chondrozyten in der extrazellulären Matrix (siehe Tab. 1) [78].

1.2.3 Proteoglykane

Proteoglykane verleihen dem Knorpel eine besonders druckelastische Komponente, indem sie durch ihr starkes Wasserbindungsvermögen einen Innendruck aufbauen, der den zugfesten Kollagenfasern entgegen wirkt [24]. Proteoglykane sind aus einem zentralen Proteinkern, auch Coreprotein genannt, und daran gebundenen, sulfatierten Glycosaminoglykanen (GAGs) aufgebaut. GAGs sind lineare Polysaccharidketten. Sie bestehen aus repetitiven Disaccharideinheiten, von denen jede mindestens eine anionische Gruppe (Carboxylrest, Sulfatrest) besitzt, welche ihre negative Ladung erhöht [6, 24]. Je nach Proteoglykan variiert die Anzahl an GAG-Ketten zwi-

Typ	Kollagengruppe	knorpel-spezifisch	Funktion
I	Fibrillen bildend	nein	Hauptkollagen Mischfibrille mit Kollagen Typ II Mischfibrille mit Kollagen Typ XI, reguliert Fibrillogenese Mischfibrille mit Kollagen Typ II, reguliert Fibrillogenese assoziiert mit Knorpelkalzifizierungen
II	Fibrillen bildend	ja	
III	Fibrillen bildend	nein	
V	Fibrillen bildend	nein	
XI	Fibrillen bildend	ja	
XXVII	Fibrillen bildend	ja	
IX	Fibrillen-assoziiert	ja	laterale Verbindung mit Typ II Fibrillen (Quervernetzungen)
XII	Fibrillen-assoziiert	ja	laterale Verbindungen mit Typ I Fibrillen
XIV	Fibrillen-assoziiert	ja	laterale Verbindungen mit Typ I Fibrillen, reguliert Fibrillogenese
VI	nicht fibrillär	ja	Mikrofibrillen; Verankerung der Chondrozyten in der Matrix
VIII	nicht fibrillär	nein	hexagonale, filamentäre Geflechte bildend (im hypertrophen Knorpel)
X	nicht fibrillär	nein	hexagonale, filamentäre Geflechte bildend (im hypertrophen Knorpel)

Tab. 1: Im Knorpel vorkommende Kollagene (modifiziert nach [6, 78, 101])

schen 1 und 100 [6]. Die Anzahl und das Verhältnis der Ketten verändert sich im Laufe der Entwicklung, im Alter und bei Krankheiten [38].

Das am häufigsten vorkommende Proteoglykan im Knorpel ist Aggrekan. Kleine leucinreiche Proteoglykane wie Decorin, Biglykan, Fibromodulin und Lubricin spielen ebenfalls eine Rolle bei der Aufrechterhaltung der Knorpelstruktur, sowie bei der Grenzflächengelenkschmierung, da Lubricin in der Synovialflüssigkeit vorkommt [32]. Aggrekan hat ein Molekulargewicht von 2 - 3 x10⁶ Dalton (Da) [6], davon entfallen 90 % auf Glycosaminoglykane [31]. Dessen Hauptteil besteht aus Chondroitinsulfat, aber auch Keratansulfat, die vor allem zwischen der G2- und G3-Domäne gebunden sind. Auch N- und O-verknüpfte Oligosaccharidketten kommen vor [38]. Aggrekan bindet über die G1-Domäne zusammen mit zwei Bindungsproteinen, auch Linkproteine genannt, an Hyaluronsäure, wobei große Aggregate mit bis zu 100 Aggrekanmonomeren entstehen (siehe Abb. 3). Durch den hohen Gehalt an negativ geladenen Gruppen ist Aggrekan für das starke Wasserbindungsvermögen verantwortlich [6].

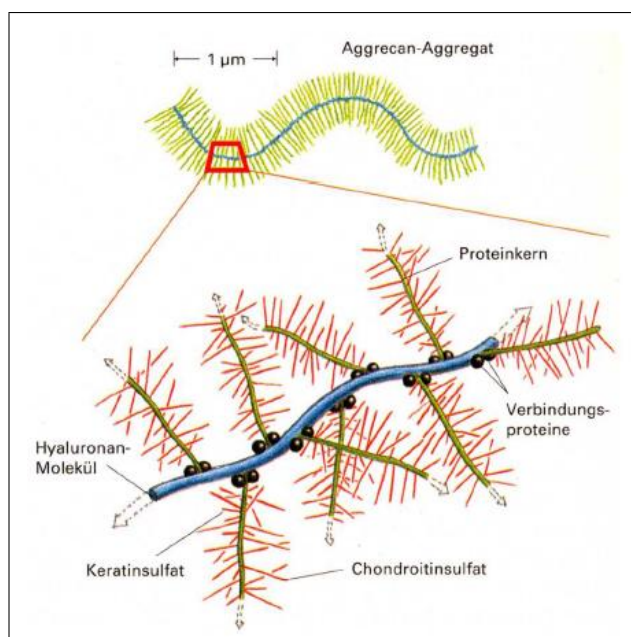


Abb. 3: Aufbau von Aggrekan [6]

1.3 Osteoarthritis

Die Osteoarthritis (OA), auch Arthrose genannt, ist eine progressive Erkrankung des gesamten Gelenkes, welche mit Veränderungen im Gelenkknorpel, dem darunter liegenden Knochen und der Synovialmembran einhergeht. Die OA ist die häufigste Erkrankung des Bewegungsapparates [90] und zeigt eine altersabhängige Steigerung in Inzidenz und Prävalenz [56]. OA-Veränderungen finden sich meist in stark beanspruchten Gelenken wie im Knie, der Hüfte oder im Daumensattelgelenk, können aber auch andere Gelenke betreffen und müssen nicht nur auf ein Gelenk beschränkt sein [82, 90]. Klinisch können Gelenkschmerzen, Bewegungseinschränkungen, morgendliche Gelenksteife, Gelenkfehlstellungen, Funktionsstörungen der Muskulatur, Schwellungen, Gelenkergüsse und lokale Entzündungen auftreten [39, 82]. Die Mehrzahl der Betroffenen sind beschwerdefrei trotz radiologischer Zeichen einer OA. Diese sind Gelenkspaltverschmälerung, subchondrale Sklerosierungen, Osteophytenbildung und subchondrale Zysten [56, 82]. Andere Betroffene klagen wiederum über starke Symptome, obwohl die radiologischen und morphologischen Veränderungen am Gelenk nur geringgradig ausgeprägt sind. Durch diese Problematik – der geringe Zusammenhang von Symptomen und radiologischen Veränderungen – ist die frühzeitige Diagnose sehr schwer. Die Unterscheidung zwischen osteoarthritischen und natürlichen degenerativen Veränderungen mittels molekularer Marker steht noch an ihren Anfängen. Die OA kann in eine primäre bzw. idiopathische und sekundäre Form eingeteilt werden. Die Ursache der primären OA ist unbekannt, jedoch scheint es genetische Risikofaktoren zu geben. Es wurden bereits mehrere Gene gefunden, die einen Beitrag zur Entstehung der OA leisten, indem sie unter anderem

die Knorpeldifferenzierung und die Zellhomöostase regulieren. Zu ihnen zählen das ADAM-12-Gen, Interleukin-1-Gencluster, das Matrilin-3-Gen, das α -Kettengen des IL-4-Rezeptors, das FRZB (frizzled related protein)-3-Gen und das Asporin-Gen [45, 53]. Die Ätiologie der sekundären OA ist multifaktoriell. Sie lässt sich in vier große Risikogruppen einteilen [56]:

- leistungsbezogene Risikofaktoren wie sich ständig wiederholende Tätigkeiten z.B. Fliesenleger, Sport mit starker lokaler Gelenkbeanspruchung wobei vor allem eine Gelenkverletzungen OA-induzierend wirkt.
- lokale mechanische Faktoren wie ein erhöhter BMI, Muskelschwäche oder Gelenkfehlstellungen wie z.B. X-Beine
- Hormonelle Ursachen wie ein Östrogenabfall in der Postmenopause
- lokale knöcherne Ursachen wie Knochenmarksläsionen oder zu hohe Knochen-dichte

Das Risiko steigt ebenfalls durch altersbedingte Veränderungen des Knorpels [50], was sich in der altersabhängigen Prävalenz widerspiegelt [80].

1.3.1 Pathogenese

Die Pathogenese des OA-Prozesses lässt sich in zwei große Ursachengruppen einteilen. Zum einen liegt die Ursache in anormalem Knorpelstress, zum anderen in dem Knorpel selbst. Abnormaler Stress kann ausgelöst werden durch Adipositas, Inkongruenz der Gelenkflächen, Achsenfehlstellungen und Instabilität des Gelenkes oder Muskelschwäche. Ein anormaler Knorpel ist die Folge von Alterungsprozessen, genetischen Faktoren, metabolischen Veränderungen, Entzündungen oder endokriner Faktoren. Beides führt bei erhöhter Beanspruchung zu OA. Die OA zeichnet sich zum einen durch eine Schädigung des Knorpels aus, zum anderen durch eine Reaktion des Knochens und der Synovialmembran. Im Knorpel steht vor allem die Destruktion im Vordergrund, aber auch apoptotische Vorgänge und Kalzifizierungen spielen eine Rolle. Der bei der Knorpeldestruktion freigesetzte Detritus induziert in der Synovia eine Hyperplasie und Fibrose sowie die Bildung von inflammatorischen Zytokinen. Diese Zytokine wiederum bewirken im Knorpelgewebe eine weitere Destruktion. Zusätzlich bilden sich Osteophyten und Knochenzysten. Es wird ebenfalls eine subchondrale Sklerose des Knochengewebes beobachtet, was erneut zu einem verstärkten anormalen Stress im darüberliegenden Knorpel führt (siehe Abb. 4) [51, 66, 74, 100].

Unabhängig von der Ursache der Schädigung des Knorpels resultiert dies meist in der Produktion von Matrixfragmenten (z.B. Fibronectinfragmente, Kollagenfragmente, Hyaluronsäurefragmente) [51]. Im OA-Knorpel liegen $\sim 20\%$ des gesamten Knorpelkollagens als Kollagenfragmente vor [42], was Konzentrationen im Bereich von bis zu 40 mg/g Knorpel entspricht [37]. Die Fragmente stimulieren die Chondrozyten

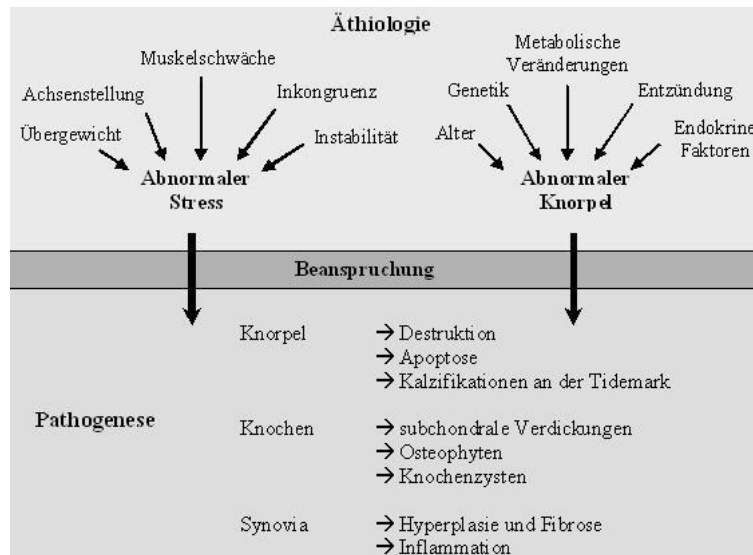


Abb. 4: Ätiologie und Pathogenese der Osteoarthritis (modifiziert nach [74, 66, 100])

zur Produktion von Zytokinen und proteolytischen Enzymen [30, 37, 51]. Die Chondrozyten zeigen jedoch auch eine gesteigerte Synthese von Matrixprodukten und ausgehend von der Knorpeloberfläche eine vorübergehende proliferative Antwort, die sog. Clusterbildung, als Versuch, die degradierten Areale abzubauen und durch neue Matrix zu ersetzen. Trotz der verstärkten Bildung von Matrixkomponenten wie Kollagen Typ II, IX, XI und Aggrecan ist die Reparatur limitiert, da adulte Chondrozyten nicht in der Lage sind, die normale Knorpelmatrixarchitektur vollständig zu regenerieren [32, 79]. Das Fehlen von effektiven Reparaturmechanismen ist wahrscheinlich der Grund für Änderungen im Genexpressionsmuster, welches bei OA-Knorpel beobachtet wurde. So werden bei der OA Moleküle gebildet, die im gesunden Knorpel nicht vorkommen. Dazu zählen Tenascin, Kollagen Typ I, welches normalerweise in Haut und Knochen vorkommt, Kollagen Typ III, das normalerweise im retikulären Bindegewebe vorkommt und Kollagen Typ IIA, eine Splicevariante von Kollagen Typ II [4, 5, 32, 33, 51, 79]. In der tiefen Zone des OA-Knorpels zeigen sich außerdem Kalzifizierungsprozesse durch hypertrophe Chondrozyten, die vermehrt Kollagen Typ X synthetisieren, sowie eine Verdopplung, bis Verdreifachung der Tidemark, die eine Art Grenze zwischen kalzifiziertem und nicht-kalzifiziertem Knorpel darstellt [33, 79]. Diese ineffektive anabole Reaktion führt durch das Ungleichgewicht zwischen Synthese und Degradation letztendlich zu einem weiteren Matrixverlust und daraus resultierend zu einer geringeren Belastbarkeit des Knorpels [32, 51, 66, 74, 100].

1.3.1.1 Katabole Mechanismen

Die Knorpeldestruktion resultiert aus der Wirkung kataboler Enzyme, mechanischem Abrieb und der Aktivität von Zytokinen, Chemokinen und anderen inflammatorischen Mediatoren, die im OA-Knorpel von Chondrozyten und synovialen Fibroblasten synthetisiert werden. Durch die parakrine und autokrine Wirkung der katabolen Zytokine und Mediatoren wird in Chondrozyten die Bildung proteolytischer Enzyme stimuliert und die Matrixsynthese gehemmt [51].

Katabole Zytokine

IL-1 β gilt als zentraler Mediator im OA-Prozess. Seine destruktiven Effekte kommen durch Erhöhung des Knorpelkatabolismus und Suppression des Anabolismus zustande. So bewirkt IL-1 β eine erhöhte Genexpression der Matrix Metalloproteinasen MMP-1, -3 und -13, sowie von a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs (ADAMTS)-4 und -5. Dies sind bedeutende Enzyme beim Abbau der extrazellulären Matrix des Gelenkknorpels. Die Inhibition anaboler Prozesse im Knorpel zeigt sich durch die Hemmung der Kollagen Typ II- und der Aggrecansynthese [21]. IL-1 induziert außerdem die Freisetzung von weiteren proinflammatorischen und destruktiven Mediatoren. Dazu zählen neben Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Interleukin(IL)-6, IL-8, Komplementfaktoren, Stickstoffmonoxid (NO) und vascular endothelial growth factor (VEGF) auch seine eigene Freisetzung [21, 88]. Konzentrationsabhängig kann IL-1 β den prozentualen Anteil an apoptotischen Zellen steigern. Dies wird mit der gesteigerten Synthese von NO in Verbindung gebracht [21], da NO in der Lage ist, die Apoptose in Chondrozyten durch eine mitochondriale Dysfunktion zu induzieren [1]. NO wird durch das Enzym inducible nitric oxide synthetase (iNOS) gebildet. NO sowie dessen Redoxderivate sind in der Lage, die MMP-Freisetzung zu erhöhen [1]. Zusätzlich hemmt NO die Kollagen Typ II- und Proteoglykansynthese. Aufgrund dieser Mechanismen kommt NO eine größere Rolle in der Matrixdegradation während des OA-Prozesses zu als bisher angenommen [58, 79]. Für Peroxynitrit, welches aus der Reaktion von NO mit Superoxidanionen (O_2^-) entsteht, konnte ebenfalls eine Induktion kataboler Prozesse gefunden werden. Peroxynitrit ist in der Lage, apoptotische Effekte hervorzurufen sowie den Gehalt an NF- κ B im Zellkern zu erhöhen. NF- κ B reguliert die Transkription von proinflammatorischen Genen, die z.B. IL-1, TNF- α , iNOS oder MMPs codieren [1]. Interessanterweise wird NO in OA-Knorpel spontan freigesetzt, nicht jedoch in normalem Knorpel [1]. Diese gesteigerte NO-Produktion im OA-Knorpel ist durch Induktion von iNOS durch IL-1 β sowie durch eine erhöhte Konzentration von TNF- α bedingt [1, 91].

IL-1 β aktiviert auch anabole Prozesse, indem es die Genexpression von Insulinlike growth factor binding protein (IGFBP)-4, Tissue inhibitor of metalloproteinase

(TIMP)-1 und -4 sowie von Interleukin-1 receptor type 1 (IL-1R1) steigert. Diese wiederum regulieren Wachstumsfaktoren, Proteasen und Zytokine, die am Gewebumbau beteiligt sind [88]. IL-1 kommt eine große Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im normalen Knorpel zu. Fan et al. [28] konnten in einer Studie eine basale Expression von IL-1 und dessen Signalkaskade in gesundem Knorpel feststellen. Dies steht auch im Einklang mit den abbauenden Effekten von IL-1. Sie haben für die Integrität der Matrix essentielle Bedeutung, da beim Matrixumbau geschädigte Moleküle abgebaut und durch neue ersetzt werden müssen. Bei der OA ist die Konzentration von IL-1 β auch in der Synovialflüssigkeit erhöht [28]. Eine molekulare Erklärung für die gesteigerten katabolischen Effekte von IL-1 β bei der OA ist die Herunterregulierung der IL-1 Antagonisten und die gesteigerte Bildung von IL-1 β und seinem Rezeptor IL-1R1 [21].

TNF- α nimmt einen weiteren wesentlichen Platz in der Pathogenese der OA ein. Die Zellen des OA-Knorpels besitzen besonders an Stellen mit lokalem Proteoglykanverlust und in mechanisch disponierten Bezirken eine vermehrte Expression des p55 TNF-Rezeptors [32, 75]. Zusätzlich kommt Prostaglandin E₂ (PGE₂) eine bedeutende Rolle bei Aufrechterhaltung der OA zu. PGE₂ ist bei der OA im Knorpel und im Synovium erhöht. Es ist an der erhöhten MMP-Produktion und Freisetzung von Proteoglykanen beteiligt. Jedoch konnte in humanen, synovialen Fibroblasten nach Zugabe von PGE₂ eine verringerte IL-1-induzierte MMP-Expression gefunden werden [23]. Interessanterweise zeigt PGE₂ im humanen gesunden Knorpel keine Wirkung auf den Proteoglykanumsatz, was auf die Abwesenheit von IL-1 und TNF- α zurückgeführt wird [58]. Li et al. [49] führten eine Studie zur Wirkungsweise von PGE₂ auf humane, osteoarthritische Chondrozyten durch. Bei Behandlung mit PGE₂ im mikromolaren Bereich zeigte sich eine verringerte Proteoglykansynthese als Folge einer gehemmten Expression des Aggrekangens. In dieser Studie bewirkte PGE₂ keine erhöhte Freisetzung von MMP-1, -3, -13, -14 und ADAMTS-4 und -5. Die Wirkung von PGE₂ auf Chondrozyten wird über den Prostaglandin E₂- (EP₂-) und EP₄-Rezeptor vermittelt. Die Expression dieser Rezeptoren steigt in Abhängigkeit des Krankheitsgrades. So fanden Li et al. [49] eine 10 fach erhöhte Menge an EP₂- und EP₄-Rezeptor auf humanen Chondrozyten in einem Stadium Grad 3 nach Collins (siehe Collins-Score Tab. 7 auf S. 39).

Matrix Metalloproteinasen

Die Mitglieder der MMP-Familie sind Enzyme, die hauptsächlich am Abbau von extrazellulärer Matrix beteiligt sind. Es sind 24 verschiedene MMPs bekannt, wovon 23 beim Menschen vorkommen, die alle ein zentrales Zinkion in ihrem katalytischen Zentrum besitzen. Die meisten werden als Proenzyme (proMMPs) gebildet [39, 41, 46, 93] und über eine Aktivierungskaskade mit Plasmin [75] oder durch

andere MMPs in eine aktive Form überführt. So verdaut MMP-3 nicht nur extrazelluläre Matrixbestandteile sondern aktiviert außerdem proMMP-1, -7, -8, -9 und -13. Bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der OA spielen MMPs eine wichtige Rolle. MMP-1, -8 und -13, die sog. Kollagenasen, und MMP-14 sind in der Lage die Tripelhelix der fibrillären Kollagene zu spalten, was zu einem Entwinden der Kollagenketten führt [39, 93]. Durch die Körpertemperatur denaturieren diese Fragmente zu Gelatine und können nun durch MMP-2 und MMP-9, die sog. Gelatinasen, in kleine Peptide gespalten werden. Kollagen Typ IX und XI werden durch MMP-2 und MMP-3 abgebaut. MMP-1, -2, -3, -7, -8, -9, -13 und -14 sind auch in der Lage Aggrekan zu spalten [93]. Malfait et al. [55] konnten jedoch zeigen, dass die von OA-Knorpelplantaten freigesetzten Aggrekanfragmente durch Aggrekanasen entstanden sind, da diese nicht die MMP-typischen Aggrekan-Neoepitopen aufweisen. In immunhistochemischen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Anzahl von MMP-3, -7 und -14 in Chondrozyten von Mäusen direkt mit dem histologischen Grad der Knorpeldestruktion korreliert [44]. In einem Tiermodell an Mäusen induziert eine Überexpression von MMP-13 OA-typische Veränderungen, weshalb angenommen wird, dass unter den verschiedenen MMPs die MMP-13 die bedeutendste Rolle bei der Knorpeldestruktion spielt [64].

Aggrekanasen

Die ADAMTS-Familie besteht aus 19 verschiedenen Mitgliedern. ADAMTS-4 und -5 werden zu den Aggrekanasen gezählt und sind im Knorpel für den Aggrekanabbau verantwortlich. Sie sind besonders in frühen OA-Stadien aktiv [39]. Dies ist möglicherweise die Ursache für den charakteristischen Verlust von Aggrekan und dessen negativen Ladungen im frühen Stadium der OA. Durch den Abbau von Proteoglykanen findet eine Demaskierung von Kollagenfasern statt, wodurch diese erst durch MMPs angegriffen werden können. Daher ist der Verlust von Kollagen eher in einem späteren Stadium zu finden [79]. ADAMTS-5 wird kontinuierlich im gesunden und OA-Knorpel exprimiert, wohingegen ADAMTS-4 nur in OA-Knorpel gebildet wird [55]. Ursächlich dafür ist die Stimulation der Bildung von ADAMTS-4 durch proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-1 β und TNF- α [16]. Eine Studie von Li et al. [48] durchgeführt an ADAMTS-5-Knockout-Mäusen zeigte, dass die Oberflächen der Kniegelenke dieser Mäuse geringere Knorpelerosionen aufwiesen und es im Gelenk zu einer verminderten Fibrosebildung kam. Im Kniegelenksknorpel der ADAMTS-5-Knockout-Mäuse fand sich ebenfalls ein signifikant erhöhter Chondroitinsulfatgehalt sowie eine Akkumulation von Aggrekan. Interessanterweise konnten trotz der Ausschaltung von ADAMTS-5 weiterhin Aggrekanase-typische Aggrekanfragmente im Gelenkknorpel gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass im OA-Prozess noch weitere ADAMTS wie z.B. ADAMTS-4 eine wichtige Rolle spielen [48].

1.3.1.2 Anabole Mechanismen

Anabole Zytokine

Der anabole Wachstumsfaktor TGF- β kommt in drei Isoformen – TGF- β 1, - β 2 und - β 3 – im menschlichen Körper vor [15]. TGF- β induziert die chondrogene Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen und wirkt regulierend auf das Zellwachstum, die Differenzierung, die Migration und die Synthese von extrazellulären Matrixprodukten [81, 86]. TGF- β ist in der Synovialflüssigkeit von OA-Patienten erhöht. TGF- β wirkt der IL-1 Aktivität entgegen, indem es die Expression und Sekretion von MMP-3 und -13 reduziert und die TIMP-Produktion steigert. Durch diese anabolen Mechanismen kann TGF- β die Knorpelreparatur verbessern, verursacht aber in anderen Geweben des Gelenkes problematische Veränderungen. In einer Studie an Mäusen von Bakker et al. [10] konnte gezeigt werden, dass die lokale Produktion von TGF- β 1 zu Osteophytenwachstum, synovialer Hyperplasie und knorpelähnlicher Gewebekonstruktion zwischen Knochen und den Kollateralbändern führt. Daher ist eine Mitbeteiligung von TGF- β an der Osteophytenbildung und der synovialen Hyperplasie im humanen OA-Prozess anzunehmen. Da die Chondrozyten im OA-Knorpel eine reduzierte TGF- β -Rezeptor Expression aufweisen, wirkt es besonders an dem anliegenden periostealen Gewebe, was die Entstehung von Osteophyten erklärt [15, 86].

Bone morphogenic proteins (BMPs) sind Mitglieder der TGF- β -Superfamilie und spielen ebenfalls eine Rolle in der Aufrechterhaltung der Knorpelhomöostase. BMPs erhöhen die Proteoglykan- und Kollagen Typ II-Synthese [15]. BMP-7 ist im OA-Knorpel vermindert, wohingegen vermehrt BMP-2 gemessen wurde. Eine mögliche Erklärung dafür ist die Stimulation der Synthese von BMP-2 durch IL-1 [84].

Insulin-like growth factor (IGF)-1 ist ein weiterer Wachstumsfaktor mit potenter anaboler Wirkung auf Chondrozyten. Er steigert die Proteoglykan-Synthese und kann durch Inhibierung der Apoptose die Lebensdauer der Chondrozyten verlängern. IGF-1 ist in der Synovialflüssigkeit und im Knorpel bei OA-Patienten erhöht [84]. IGF-1 wird durch IGF-Bindeproteine (IGFBP) gehemmt. Durch ihre erhöhte Zahl im OA-Knorpel sind IGFBPs, besonders IGFBP-3, entscheidend an der geringeren Ansprechbarkeit des Knorpels auf IGF-1 beteiligt. IGFBP-3 wird durch MMP-3, welche bei OA vermehrt vorkommt, gespalten und somit inaktiviert. Dies führt zu einer Freisetzung von IGF-1 in direkter Umgebung von Chondrozyten, was den hochregulierten Metabolismus, wie er bei der OA im Anfangsstadium beobachtet wird, begünstigt [61, 84].

TIMP

Zur Familie der TIMP werden 4 verschiedene Moleküle gezählt. TIMP sind endogene Inhibitoren aller aktiven MMPs und ADAMTS und somit ein wichtiger Bestandteil

bei der Aufrechterhaltung der Homöostase im gesunden Knorpel. Vor allem TIMP-3 scheint eine entscheidende Rolle im OA-Progress einzunehmen, da TIMP-3 in der Lage ist ADAM-12 und -17 sowie ADAMTS-4 und -5 zu hemmen. TIMP-1 inhibiert ADAM-10 [9]. Eine Studie an TIMP-3-Knockout-Mäusen zeigte, dass die Abwesenheit von TIMP-3 im Knorpel eine erhöhte Degradation von Kollagen Typ II nach sich zieht [83]. Das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMP ist im OA-Knorpel zugunsten der MMPs verschoben, da der MMP-Gehalt proportional mehr ansteigt als der TIMP-Gehalt. In einer Studien von Dean et al. [22] wurde in OA-Knorpel ein um ca. 150 % erhöhter MMP-Gehalt und ein um ca. 50 % erhöhter TIMP-Gehalt gemessen. Die Autoren sind jedoch nicht auf einzelne Subtypen der MMPs oder TIMPs eingegangen.

1.3.1.3 Rolle des subchondralen Knochens und des kalzifizierten Knorpels

Veränderungen im subchondralen Knochen spielen eine große Rolle bei der Pathogenese der progressiven Destruktion des Knorpels [39]. Die Verdickung der subchondralen Knochenplatte, Verschiebung der Tidemark und Veränderungen im kalzifizierten Knorpel treten vor mikroskopisch erkennbaren Veränderungen des darüberliegenden Knorpels auf und sind Zeichen für ein frühes OA-Stadium [95]. Die kalzifizierte Knorpelzone bildet eine wichtige Grenzschicht zwischen Knorpel und Knochen. Sie wird bei der OA reaktiviert und kalzifiziert zunehmend den unkalzifizierten darüberliegenden Knorpel [67]. Die Höhe der Zone ist jedoch relativ konstant, da neben der Verschiebung der Tidemark nach oben auch ein Vorrücken und eine Sklerosierung des subchondralen Knochens stattfindet [17]. Dies führt zu einer verminderten Elastizität des Knochens und einer vermehrten Belastung des nun dünneren, unkalzifizierten Knorpels [95]. Die Veränderungen im subchondralen Knochen sind unter anderem auf das phenotypisch geänderte Genexpressionsmuster mancher Osteoblasten im OA-Prozess zurückzuführen. Diese Osteoblasten produzieren vermehrt Alkalische Phosphatase, Osteocalzin, Osteopontin, IL-6, IL-8, TGF- β , IGF-1, Urokinase Plasminogen Aktivator und PGE₂ [40]. Der subchondrale Knochen ist ein aktives Gewebe, welches schneller auf Belastungen reagieren kann als Knorpel. So führt eine stoßartige Beanspruchung des Gelenkes zu einer erhöhten Dichte und Härte des subchondralen Knochens [17]. Die Veränderungen gehen mit einer Knochenaussprossung in die darüber liegende kalzifizierte Knorpelzone einher. Diese Einsprossungen kommen häufig in geschädigten Knorpelregionen vor und bilden ein Havers Kanalähnliches Netzwerk mit einem zentralen Gefäßkanal und darum liegendem neugebildetem wabenartigem Knochen. Dieser verwobene Knochen kann im Gegensatz zu lamellärem Knochen viel mehr Spannungen tolerieren, was auf eine lokal gesteigerte Beanspruchung des geschädigten Knorpels hinweist [95]. Mit den knöchernen Aus-

sprossungen in die darüber liegende kalzifizierte Knorpelzone verlaufen nun auch neue Gefäße, die oft mit Nerven assoziiert sind, welche für die Schmerzen während der OA mitverantwortlich gemacht werden können [57]. Über die Gefäße oder über mikroskopisch kleine Risse an der Knorpel-Knochen-Grenze findet ein Austausch von Mediatoren statt, die sich auf den OA-Prozess auswirken. So konnte von Henrotin et al. [40] in einem Ko-Kultur-Modell mit humanen subchondralen Osteoblasten und humanen OA-Chondrozyten festgestellt werden, dass IL-6, welches in sklerotischen Osteoblasten überexprimiert wird, im darüberliegenden Knorpel eine Herunterregulation der Aggrecansynthese sowie eine Hochregulation der MMP-Expression bewirkte.

1.3.1.4 Rolle der Synovia

Im OA-Gelenk kommen vermehrt aktivierte Synoviozyten vor, die in Kultur spontan pro- und anti-inflammatorische Zytokine sezernieren. Die Synovia zeigt eine Überproduktion von Zytokinen wie IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-8, sowie von MMP-1, -3, -9, -13 und TIMP-1. Durch diese Mechanismen beeinflusst die Synovia die Knorpeldestruktion und trägt zum OA-Prozess bei [16]. Aber auch die Synovia selbst zeigt typische Veränderungen im OA-Prozess, wie eine synoviale Hyperplasie, Kapselverdickung und -fibrose, die zu einer reduzierten Beweglichkeit und letztendlich zu einer Gelenkversteifung führen [79]. Die Veränderungen der Synovia werden als sekundäre Reaktion auf den vom Knorpel freigesetzten mikro- und makromolekularen Detritus angesehen [68]. Bei histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen von Synovialgewebe aus frühen OA-Stadien wurde eine Hyperplasie, bei Synovialgewebe aus späten OA-Stadien wurden vermehrt fibrotische Veränderungen gefunden. In beiden Stadien konnte meist eine Inflammation in der Synovia mit vermehrtem Gehalt an CD20-positiven B-Zellen und CD3-positiven T-Zellen gefunden werden [68]. Bei einer Untersuchung von arthroskopisch gewonnenen Synovialbiopsien von Patienten mit Knie-OA konnte festgestellt werden, dass besonders im frühen Stadium einer OA die Entzündung der Synovia am größten ist [13]. Die Synovitis ist zum Teil asymptomatisch [2], häufig ist sie jedoch für die Schmerzen im OA-Prozess im Wesentlichen verantwortlich.

1.3.2 Therapieoptionen

Die therapeutischen Zielsetzungen der OA-Behandlung sind die Verlangsamung des Krankheitsprozesses, die Behebung von Schmerzen und die Verbesserung der Beweglichkeit. Es gibt drei verschiedene Therapieansätze: 1. nicht-pharmakologische Maßnahmen wie physikalische Therapie, Physiotherapie, Rehabilitation, alternative Medizin z.B. Akupunktur oder psychosomatische Medizin [96], 2. die Behandlung

mit Medikamenten wie Analgetika, nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), Glukokortikoide, slow acting drugs in osteoarthritis (SADOAs) [90] und 3. chirurgische Therapie wie Endoprothesen, Osteotomie, Mosaikplastik, arthroskopische Debridements, Gelenklavage, Arthroplastie oder Arthrodesse [8]. Obwohl jede Therapie entsprechende Vorteile bietet und eine bestimmte Wirksamkeit zeigt, gibt es keine Basistherapie, die das zu Grunde liegende molekulare Problem beheben kann [8]. Medikamente und Substanzen, die die Möglichkeit bieten, modifizierend auf den Krankheitsverlauf einzuwirken, indem sie den OA-Prozess verzögern oder die strukturellen Veränderungen stoppen, sind ein zentrales Anliegen in der aktuellen Forschung. Auch ist in den letzten Jahren das Interesse für Nahrungsergänzungsmittel als eine zusätzliche Behandlungsoption immer weiter gestiegen [62]. Besonders bei chronischen Erkrankungen, die eine Langzeittherapie erfordern, sind sie eine gute Ergänzung zu den oben genannten Therapieansätzen [7]. 2006 wurde eine Gesetzesgrundlage zu Aussagen über Nahrungsmittel inkl. Nahrungsergänzungsmittel vom Europäischen Parlament verabschiedet. Diese sogenannte Health-Claims-Verordnung regelt nährwert- und gesundheitsbezogene Aussagen über Nahrungsergänzungsmittel. Die von der Health-Claims-Verordnung zugelassenen gesundheitsbezogenen Aussagen sind wissenschaftlich belegt. Die wissenschaftliche Prüfung und Bewertung dieser Aussagen wird von der European Food Safety Authority (EFSA) durchgeführt. Ebenfalls dürfen krankheitsbezogene Aussagen, sog. Risk Reduction Claims, über Lebensmittel nur dann gemacht werden, wenn diese wissenschaftlich erwiesen sind [98]. Verschiedene Nahrungsergänzungsmittel, die teilweise auch als Arzneimittel vertrieben werden, wurden bereits für die Behandlung von Patienten mit OA und Gelenkschmerzen untersucht. Zu ihnen zählen Glukosamine, Chondroitinsulfat, S-Adenosylmethionin und Kollagenhydrolysate [12].

Kollagenhydrolysate

Kollagenhydrolysate (KH) werden aus Gelatine durch hydrolytischen oder enzymatischen Verdau gewonnen. Die Gelatine wiederum entsteht aus der Hydrolyse von Kollagen Typ I, welches aus tierischen Knochen oder Haut gewonnen wurde [7]. Das durchschnittliche Molekulargewicht der von uns untersuchten KH variiert zwischen 2000 und 6000 Da. Durch die Hydrolyse verliert die Gelatine ihre typischen Eigenschaften. So zeigen Kollagenhydrolysate keine Gelbildung mehr, dafür sind sie gut wasserlöslich und emulsionsstabilisierend [62]. KH hergestellt aus Knochen von Geflügel und Schwein wurden durch die EFSA, die die Produktion von KH von Gutachtern haben bewerten lassen, als sicher eingestuft [27]. In einer Studie von Benito-Ruiz et al. [14] an 250 Knie-OA Patienten konnte dem eingesetzten KH Colnatur[®], ein aus porkinen Knochen gewonnenes Kollagenhydrolysat, bei täglicher oraler Einnahme von 10 g keine Nebenwirkungen zugeordnet werden. KH sind gut

verdaulich und werden durch den Intestinaltrakt fast vollständig resorbiert. Össer et al. [69] zeigte in einer Studie an Mäusen nach oraler Gabe von ^{14}C -markiertem KH, dass nach sechs Stunden die maximale Plasmakonzentration erreicht wird und zu dieser Zeit bereits mehr als 90 % der KH resorbiert wurden. Durch die intestinale Verdauung wurden die KH in verschieden große Fragmente gespalten. Extraintestinal konnten in den Mäusen Peptide mit einer molekularen Masse zwischen 1 bis ~ 10 kDa nachgewiesen werden, was auf ein gewisses Maß an Resorption von höhermolekularen Peptiden hindeutet [69]. Durch Aufnahme der KH in funktionell fermentierter Milch konnte die gute Resorption von KH noch weiter verbessert werden [99]. Die Studie von Össer et al. [69] zeigt außerdem, dass nach oraler Aufnahme von radioaktiven KH eine erhöhte Radioaktivität im Knorpelgewebe der Mäuse im Vergleich zu Mäusen, die oral nur radioaktives Prolin erhielten, gemessen wurde.

Es wurden mehrere *in vitro*-Studien zur Wirkung von exogenen KH, welche aus Kollagen Typ I gewonnen wurden, sowie endogenen Kollagen Typ II-Fragmenten auf den Metabolismus von Zellen, vor allem von bovinen und humanen Chondrozyten, durchgeführt. Jennings et al. [42] untersuchten die Wirkung von bovinen Kollagen Typ II-Fragmenten auf den Metabolismus von gesundem Knorpel. Die bovinen Kollagen Typ II-Fragmente zeigten einen konzentrationsabhängigen inhibierenden Effekt auf die Kollagensynthese in bovinen und humanen artikulären Chondrozyten. Zusatz von einer geringen Konzentration (0,01 mg/ml) der bovinen Kollagenfragmente bewirkte in gesunden humanen Knorpelimplantaten keine Veränderungen, wobei sich bei dreiwöchiger Kultivierung mit der eingesetzten Höchstkonzentration von 1 mg/ml der Kollagen Typ II-Gehalt und der Proteoglykangehalt im Nährmedium erhöhte, was auf einen erhöhten Matrixverlust aus den Explantaten hindeutet [42]. Eine weitere *in vitro*-Studie mit bovinen Kollagen Typ II-Fragmenten wurde von Fichter et al. [30] durchgeführt. Sie fanden eine erhöhte Gen- und Proteinexpression von MMP-2, -3, -9 und -13 in gesunden humanen und bovinen Knorpelzellen nach Zugabe von bovinen Kollagen Typ II-Fragmenten. Diese knorpelspezifischen bovinen Kollagen Typ II-Fragmente zeigten vermehrt katabole Effekte auf den Knorpelmetabolismus, was auf einen positiver Rückkopplungsmechanismus hindeutet, da diese Fragmente wiederum über die Stimulation von katabolen Enzymen die eigene Freisetzung fördern.

Eine *in vitro*-Studie mit KH führten Raabe et al. [77] durch. Diese Studie wurde mit multipotenten Stromazellen, gewonnen aus dem Fettgewebe von Pferden, durchgeführt. Die drei-wöchige Behandlung mit hydrolysiertem Fischkollagen Typ I bewirkte eine chondrogene Differenzierung der Stammzellen. Die chondrogene Differenzierung zeigte sich durch eine gesteigerte Synthese von Kollagen Typ II und GAG, sowie durch einen erhöhten mRNA-Gehalt von Kollagen Typ II und von Sox9, ein bei der chondrogenen Differenzierung beteiligter Transkriptionsfaktor [77].

In einer *in vitro*-Studie von Össer et al. [72] fand sich in gesunden bovinen Knorpelzellen nach Zugabe von 0,5 - 5 mg/ml bovinem KH eine konzentrationsabhängige, statistisch signifikante Steigerung der Kollagen Typ II-Sekretion. Die Zugabe von 10 mg/ml bovinem KH Fortigel[®] verminderte jedoch die Genexpression und Kollagen Typ II-Sekretion. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass nur gespaltenes Kollagen Typ I und II, jedoch nicht etwa auch intaktes Kollagen, die eigene Biosynthese beeinflusst [72]. Eine Studie von Schunck et al. [87] bestätigte eine signifikante Steigerung der Proteoglykansynthese und -sekretion sowie eine deutliche Anreicherung von Aggrecan in der extrazellulären Matrix von gesunden porcinen und humanen Chondrozyten durch KH. Der zugrundeliegende Abstrakt gibt jedoch keine genauen Angaben zur Herkunft des KH an. Da die Studie zusammen mit Dr. S. Össer im Collagen Research Institute in Kiel durchgeführt wurde, ist anzunehmen, dass es sich bei dem eingesetzten KH um das bovine KH Fortigel[®] handelt [87]. In einer Studie von Ng et al. [65] mit gesundem bovinem Knorpelgewebe konnte nach Zugabe von 0,1 bis 1 mg/ml bovinem KH (Gelita Sol D[®]) eine initiale Steigerung der Kollagen Typ II Synthese nach 4 wöchiger Kultivierung festgestellt werden, bei einer längeren Kulturdauer von 6 Wochen wurde jedoch eine verringerte Kollagen Typ II Synthese festgestellt. Außerdem zeigte sich bei Kultivierung mit 10 mg/ml KH eine erhöhte MMP-Expression und eine verminderte Kollagen Typ II-Expression und -Sekretion [65].

Die Mehrheit der *in vitro*-Studien mit KH stimulierten den Anabolismus der Chondrozyten, jedoch konnten ebenfalls katabole Effekte in Studien aufgezeigt werden. Vor allem exogene, aus Kollagen Typ I gewonnene KH wirken anabol stimulierend, wohingegen endogene, aus Kollagen Typ II entstandene Kollagenfragmente die Knorpeldegradation fördern. Die *in vitro*-Studien zu KH sind in Tab. 2 aufgelistet.

Ein möglicher Wirkmechanismus von KH auf zellulärer Ebene untersuchten Siebert et al. [89]. Sie konnten starke Wechselwirkungen zwischen tripel-helikalen Kollagenfragmenten und der $\alpha 2A$ -Domäne des Integrinrezeptors nachweisen, jedoch nur schwache Interaktionen zwischen dem Rezeptor und kleinen einzelsträngigen Kollagenfragmenten.

Zusätzlich zu *in vitro*-Studien sind bereits einige *in vivo*-Studien veröffentlicht worden. In einem Tiermodell mit Mäusen zeigte sich nach oraler Gabe von 0,15 mg/g KG eines bovinen KH (Fortigel[®]) eine deutlich geringere Knorpeldestruktion [71]. Die Knorpeldestruktion wurde anhand des histologischen Grades der OA-Veränderung bestimmt, in welchem Maße sich die Knorpeldestruktion verbessert hat, wird in dem Abstract nicht erwähnt.

Bereits 1991 wurde eine klinische Studie von Adam et al. [3] durchgeführt. Bei dieser randomisierten, doppelblinden, cross-over Studie mit 81 OA-Patienten wurde die schmerzreduzierende Wirkung von Gelatine- und KH-Präparaten festgestellt. In die-

ser Studie wurde die Wirkung von bovinem KH aus Nahrungskollagenen (Gelita Sol D[®]), KH aus pharmazeutischen Kollagenen, Gelatine, Gelatine/Glycin/CaHPO₄·2H₂O und Eialbumin nach einer Einnahme von 10 g des Präparates pro Tag über 60 Tage miteinander verglichen. Untersucht wurden Veränderungen im Schmerzmittelgebrauch, der Schmerzen, der Laborwerte und radiologische Veränderungen. Die Schmerzen wurden anhand einer dreistufigen qualitativen Skala welche 13 Schmerz-aspekte beinhaltete, beurteilt. Alle Gelatine-beinhaltenen Präparate führten im Gegensatz zu Eialbumin zu einer signifikanten Verbesserung der Schmerzen und einem deutlich geringeren Schmerzmittelgebrauch. Jedoch brachen 29 der 81 Patienten die Studie vorzeitig ab. Sechs Patienten gaben als Grund ein Völlegefühl im Magen an, acht Patienten lehnten eine weitere Einnahme auf Grund subjektiver starker Beschwerdebesserung ab, bei 15 Patienten konnte keine Ursache eruiert werden [3]. Von Clark et al. [18] wurde eine klinische Placebo-kontrollierte Studie an 97 gesunden, körperlich sehr aktiven Personen mit leistungsbezogenen Gelenkschmerzen durchgeführt. Die Athleten nahmen 10 g bovines KH (CH-alpha[®]) oder Placebo über 24 Wochen ein. Die Veränderungen wurden anhand visueller Analogskalen (VAS) bezüglich Entzündung, sowie Schmerzen in Ruhe und bei unterschiedlichsten Bewegungen wie z.B. laufen, joggen, hochheben oder stehen bewertet. Die tägliche Einnahme von KH bewirkte eine signifikante Verbesserung der Ruheschmerzen und der Beschwerden bei Belastungen [18].

Eine klinische Studie mit kleinem Stichprobenumfang wurde von McAlindon et al. [59] im Jahr 2011 veröffentlicht. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, in wie weit OA-Veränderungen und Prozesse mittels Magnetresonanztomographie (MRT) im Knorpel sichtbar gemacht werden können. Es wurden 30 Patienten über einen Zeitraum von 48 Wochen täglich mit 10 g KH (Fortigel[®]) oder Placebo behandelt. Die Veränderungen nach der Behandlung wurden nach 24 und 48 Wochen mittels zwei verschiedener MRT-Verfahren – Gadoliniumanreicherung im Knorpel (dGEMRIC - delayed gadolinium enhanced MRI of cartilage) und T2-Wichtung – beurteilt. Zusätzlich wurden die Symptome der Patienten klinisch anhand der Röntgenbilder, der Schmerzen mittels VAS und WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis index)-Score, des Schmerzmittelgebrauches sowie anhand der Gelenkfunktion bewertet. Das Kontrastmittel Gadolinium-DTPA akkumuliert in hyalinem Knorpel und korreliert invers mit dem Proteoglykangehalt. dGERMIC bietet somit eine gute Möglichkeit Veränderungen im Proteoglykangehalt sichtbar zu machen. In dieser Studie zeigte sich lediglich in der medialen und lateralen Tibiaregion ein Anstieg des Proteoglykangehaltes in der KH-Gruppe nach der Hälfte der Behandlungszeit, nicht jedoch am Ende des Behandlungszeitraumes. Es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen in allen anderen Regionen des Gelenkes, der T2-Wichtung sowie in den klinischen Ergebnissen festgestellt werden [59].

Referenz	Substanz	Hergestellt aus	Konzentration	Dauer der Kultur	Untersuchungsobjekt	Ergebnisse
Össer et al. [72]	Fortigel®, KH	bovines Kollagen Typ I, Kollagen Typ II aus Hühnerknorpel	0,5 mg/ml; 0 - 10 mg/ml	11 Tage	gesunde, bovine Chondrozyten	Kollagen Typ II Synthese ↑, 10 mg/ml: Kollagen Typ II Synthese ↓
Ng et al. [65]	Gelita Sol D®	bovines Kollagen Typ I	0 - 10 mg/ml	42 Tage	gesunde, bovine Chondrozyten	0,5 und 1 mg/ml: Kollagen Typ II Synthese ↑, 10 mg/ml: Kollagen Typ II-Genexpression ↓ und MMP-Genexpression ↑
Schunck et al. [87] "Abstract"	KH	unbekannt	unbekannt	unbekannt	gesunde, porcine & humane Chondrozyten	PG und Kollagen Typ II Synthese ↑
Össer et al. [70] "Abstract"	KH	unbekannt	unbekannt	unbekannt	gesunde, humane Chondrozyten	PG und Kollagen Typ II Synthese ↑, Proteasegehalt unverändert
Jennings et al. [42]	Kollagenfragmente	bovines Kollagen Typ II	0 - 1 mg/ml	24 Std. bei Zellen, 3 Wochen bei Explantaten	gesunde, humane & bovine Chondrozyten; gesunde, humane Knorpel-explantate	Kollagen Synthese ↓, Matrixdegradation ↑
Fichter et al. [30]	Kollagenfragmente	bovines Kollagen Typ II, synthetisch hergestellte N-telopeptide	0 - 10 mg/ml, 0 - 1 mg/ml	4 Tage bei Zellen, 3 Wochen bei Explantaten	gesunde, bovine & humane Chondrozyten und Explantate	MMP Gen- und Proteinexpression ↑

Tab. 2: *in vitro*-Studien mit Kollagenhydrolysaten

Im Jahr 2000 wurde eine große, randomisierte, doppelblinde und Placebo-kontrollierte Studie durchgeführt, die den Effekt von 10 g KH pro Tag bei OA-bedingten Knieschmerzen untersuchte. Das KH wurde durch Hydrolyse aus pharmazeutischer Gelatine gewonnen, eine nähere Bezeichnung der tierischen Herkunft wurde jedoch nicht beschrieben. Die Studie wurde an insgesamt 389 Patienten in den USA, der UK und Deutschland durchgeführt. Während der Einnahmeperiode von 24 Wochen sowie der anschließenden achtwöchigen Periode ohne KH-Einnahme wurden die Teilnehmer zehnmal visitiert. Die Wirkung der KH wurde anhand der Schmerzen mit dem WOMAC pain dimension score, der Gelenkfunktion mit dem WOMAC physical function dimension score, der Gelenkbeweglichkeit mit der WOMAC stiffness dimension scale, der Gehstrecke, der Schmerzen nach 50 m-Gehstrecke sowie anhand des Gebrauches von Paracetamol und des Vorhandenseins von Gelenkergüssen bewertet. In Deutschland konnte eine signifikante Verbesserung der Schmerzen, gemessen mittels WOMAC, und der Gelenkfunktion/-beweglichkeit in der KH-Gruppe festgestellt werden, jedoch nicht in den USA und in der UK. Gemeinsam in allen drei Ländern zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Beschwerden bei Patienten, die bei Studienbeginn ihre Schmerzen als schwer oder extrem beurteilten. Die restlichen Parameter zeigten keine statistisch signifikanten Veränderungen. Die Abbruchquote der Studienteilnehmer lag in den USA bei 42 %, in den UK bei 37 % und in Deutschland bei nur 7 %. Gründe für die hohe Abbruchquote in den USA und der UK wurden nicht angegeben [62].

In wie weit die mit der Nahrung zugeführten Kollagene z.B. in Fleisch einen zusätzlichen Nutzen bei der Behandlung mit KH haben, wurde von Benito-Ruiz et al. [14] in einer großen Placebo-kontrollierten klinischen Studie untersucht. An dieser Studie nahmen 250 OA-Patienten teil, die über einen Zeitraum von 6 Monaten entweder täglich 10 g KH (Colnatur[®]) oder ein Placebopräparat einnahmen. Retrospektiv wurde der Fleischkonsum evaluiert und anhand dessen wurde die Behandlungsgruppe in Subgruppen mit hohem und niedrigem Fleischkonsum eingeteilt. Die Wirkung der KH-Einnahme wurde anhand drei verschiedener Fragebögen quantifiziert. Die visuelle Analogskala wurde zur Bestimmung der Schmerzintensität eingesetzt. Der WOMAC-Score wurde zur Beurteilung der Schmerzen, der Gelenkbeweglichkeit und des Grades der Behinderung eingesetzt. Die gesundheitsbezogene Lebensqualität wurde anhand des SF-36 (Short-Form 36 Health Survey Questionnaire) bewertet. Benito-Ruiz et al. fanden eine signifikant höhere Reduktion des Schmerzes bei der mit KH behandelten Gruppe, wobei Patienten mit überdurchschnittlichem Fleischkonsum keine Verbesserung verzeichneten [14].

Alle klinischen Studien wurden Placebo-kontrolliert durchgeführt und zeigten nicht immer eine Verbesserung der OA-Beschwerden und eine Schmerzreduktion. In Studien mit einem kleinen Stichprobenumfang von weniger als 150 Patienten [3, 18, 59]

wurde durchweg eine Verbesserung der Symptomatik beschrieben. In einer großen Studie mit 250 Studienteilnehmern zeigte sich ebenfalls eine Schmerzreduktion durch KH-Einnahme [14]. Jedoch konnte in einer weiteren großen Studie mit 389 OA-Patienten keine Linderung der Beschwerden beobachtet werden [62]. Eine Verschlechterung der Symptome konnte durch KH-Einnahme in keiner der Studien festgestellt werden, jedoch wurde in manchen Studien von einer hohen drop-out-Rate berichtet. Der EFSA Panel für Diätprodukte, Ernährung und Allergien konnte keine Wirkungsbeziehung zwischen der KH-Einnahme und Aufrechterhaltung der Gelenkfunktion und -gesundheit feststellen [25]. Eine zusammenfassende Auflistung der aktuellen *in vivo*-Studienlage bietet Tab. 3.

Die Wirkungsmechanismen der KH sind weitgehend unbekannt und bedürfen daher noch weiterer Untersuchungen.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die OA zeichnet sich unter anderem durch eine progressive Knorpeldestruktion aus. Ein zentraler Bestandteil des OA-Prozesses ist der Verlust von extrazellulären Matrixkomponenten. Verantwortlich für die Degradation sind Proteoglykan-spaltende Proteinasen z.B. ADAMTS-4 und ADAMTS-5, und Kollagen-spaltende Proteinasen z.B. MMP-1 und MMP-13. Substanzen, die modifizierend auf den Krankheitsverlauf einwirken, würden von großer klinischer Bedeutung sein.

KH werden häufig als Nahrungsergänzungsmittel bei der OA eingesetzt, wobei die aktuelle Forschung ihre Wirkungen und Mechanismen aufklären möchte. So zeigen pharmakokinetische Studien mit Mäusen, dass oral verabreichtes radioaktives KH resorbiert wird, wobei in den Gelenken nicht weiter identifizierte radioaktive Peptide und/oder Aminosäuren gefunden wurden [69]. In-vitro-Untersuchungen mit einem Hydrolysat aus Kollagen Typ I ergaben, daß diese die Synthese von Kollagen und Proteoglykanen durch bovine Chondrozyten stimulieren [72, 87]. Andere Studien mit bovinen Kollagen Typ II-Fragmenten wiederum berichten von einer vermehrten extrazellulären Matrixdestruktion mit erhöhter Gelatinaseaktivität [30, 42].

Ausgehend von den Befunden der pharmakokinetischen und in-vitro Studien war das Ziel der hier vorliegenden Arbeit unter in vitro-Bedingungen erstmalig die molekularen Veränderungen nach KH-Zugabe in humanen Chondrozyten festzustellen. Hierbei sollte die Hypothese, dass KH einen stimulatorischen Effekt auf die Kollagensynthese des humanen Gelenkknorpels ausüben, geprüft werden. Insbesondere sollten folgende Fragen beantwortet werden:

- Wird die Kollagensynthese in humanen osteoarthritischen Knorpelimplantaten durch KH beeinflusst?
- Welche Wirkung haben KH auf degradative Prozesse in humanen osteoarthritischen Knorpelimplantaten?

Referenz	Studiendesign	Substanz	Hergestellt aus	Dosis	Behandlungsdauer	Untersuchungsobjekt	Ergebnisse
Össer et al. [71] "Abstract"	randomisierte, Placebo-kontrollierte Tierstudie	Fortigel®	bovines Kollagen Typ I	oral 0,15 mg/g KG	4 Monate	Mäuse mit Knie-OA	histopathologische Knorpeldestruktion ↓
Moskowitz [62]	multizentrische, randomisierte, Placebo-kontrollierte, doppelblinde Studie	KH	Kollagen Typ I	oral 10 g/Tag	60 Tage	389 Knie-OA Patienten	keine Verbesserung der Beschwerden in der gesamten Gruppe, jedoch bei Deutschen: Schmerzen ↓ und verbesserte Funktion
Benito-Ruiz et al. [14]	multizentrische, randomisierte, Placebo-kontrollierte, doppelblinde Studie	Colnatur®	por kines Kollagen Typ I	oral 10 g/Tag	6 Monate	250 Knie-OA Patienten	Schmerzen ↓, größere Effekte bei Patienten mit fortgeschrittener OA
Clark et al. [18] "Abstract"	randomisierte, Placebo-kontrollierte, doppelblinde Studie	CH-alpha®	bovines Kollagen Typ I	oral 10 g/Tag	24 Wochen	97 Athleten	Gelenkschmerzen ↓, Analgetikaeinnahme ↓
McAlindon et al. [59]	randomisierte, Placebo-kontrollierte, doppelblinde Studie	Fortigel®	bovines Kollagen Typ I	oral 10 g/Tag	48 Wochen	30 Knie-OA Patienten	PG-Gehalt ↑ jedoch nur in medialer und lateraler Tibiaregion, keine klinische Verbesserung
Adam [3]	randomisierte, doppelblinde, cross-over Studie	Gelita Sol D®, Gelatine-Präparate	bovines Kollagen Typ I	oral 10 g/Tag	60 Tage	81 Hüft- oder Knie-OA Patienten	Schmerzen ↓ bei KH und Gelatine-Präparate, hohe drop-out-Rate, keine Veränderung bei Eialbumin-Einnahme

Tab. 3: *in vivo*-Studien mit Kollagenhydrolysaten

- Zeigen unterschiedliche KH die gleiche Wirkung auf den Knorpelmetabolismus?
- Ist die Wirkung konzentrationsabhängig?
- Gibt es Unterschiede in der Wirkung von KH zwischen Knorpeln in frühen oder mittleren OA-Stadien?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial

Für die Versuche wurde hyalines Knorpelgewebe aus den lateralen Femurkondylen von OA-Patienten der orthopädischen Universitätsklinik Gießen verwendet. Das Material wurde aus anfallenden Geweberesten bei totalendoprothetischen Operationen am Kniegelenk gewonnen. Der Verwendung der Gewebeproben zu Forschungszwecken haben die Patienten vorher schriftlich zugestimmt. Das positive Votum der Ethik-Kommission des Fachbereichs Humanmedizin der Justus Liebig Universität Gießen wurde am 18.12.2003 (Antragsnummer 106/03) erteilt.

2.1.2 Gruppeneinteilung

Die Knorpelgewebeproben wurden gemäß dem Collins-Score bewertet (siehe Tab. 7 auf S. 39) und in Gruppen eingeteilt. Knorpelimplantate in einem frühen OA-Stadium (Collins-Score 0 - 1,5) wurden dem Hauptversuch 2, Knorpelgewebe in einem mittleren OA-Stadium (Collins-Score $> 1,5 - 3$) wurde den Hauptversuchen 1, 3, 4 und 5 zugeteilt. Die Knorpel aus Hauptversuch 1, 2 und 3 wurde für die Messung der Kollagensynthese nach KH-Behandlung, die Knorpel aus Hauptversuch 4 und 5 wurde für die Analyse degradativer Prozesse nach KH-Behandlung verwendet. Die Patienten zeigten besonders häufig neben der Gonarthrose eine arterielle Hypertonie, einen Diabetes mellitus, Adipositas und eine Schilddrüsenunterfunktion. Mittels einfaktorieller Varianzanalyse mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ wurden die Gruppen bezüglich der Parameter BMI und Alter miteinander verglichen. Die Gruppen zeigten keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich des BMI. Bezüglich des Alters sind die Patienten aus Hauptversuch 5 signifikant älter, im Durchschnitt 12 Jahre, als die Patienten aus Hauptversuch 3 und 4. Die Gruppenbeschreibung ist in Tab. 4 und 5 zusammengefasst.

	Hauptversuch 1	Hauptversuch 2	Hauptversuch 3
N	6	6	6
Alter (Jahre) $\bar{x} \pm SD$	70,0 \pm 8,3	65,8 \pm 7,2	61,2 \pm 7,7
Geschlecht	♀	3	3
	♂	1	3
BMI $\bar{x} \pm SD$	29,75 \pm 5,43	33,65 \pm 6,46	32,01 \pm 3,24
Knorpelbewertung (Collins-Score)	> 1,5 - 3	0 - 1,5	> 1,5 - 3
Diagnose	Gonarthrose	Gonarthrose	Gonarthrose
besondere Begleiterkrankungen	Hypertonie (3x)	Hypertonie (4x)	Hypertonie (4x)
	Diabetes mellitus (2x)	Diabetes mellitus (2x)	Diabetes mellitus (1x)
	Schilddrüsen- unterfunktion (2x)	Schilddrüsen- unterfunktion (2x)	Schilddrüsen- unterfunktion (1x)

Tab. 4: Patientenbeschreibung von Knorpelgewebespendern. Im Hauptversuch 1, 2 und 3 wurde die Kollagensynthese gemessen.

	Hauptversuch 4	Hauptversuch 5
N	5	6
Alter (Jahre) $\bar{x} \pm SD$	61,0 \pm 13,4	73,3 \pm 5,6
Geschlecht	♀	3
	♂	2
BMI $\bar{x} \pm SD$	30,51 \pm 4,31	30,74 \pm 3,69
Knorpelbewertung (Collins-Score)	> 1,5 - 3	> 1,5 - 3
Diagnose	Gonarthrose	Gonarthrose
besondere Begleiterkrankungen	Hypertonie (4x)	Hypertonie (4x)
	Diabetes mellitus (2x)	Schilddrüsen- unterfunktion (1x)

Tab. 5: Patientenbeschreibung von Knorpelgewebespendern. Im Hauptversuch 4 und 5 wurden degradative Prozesse gemessen.

2.1.3 Geräte

Analysenwaage Typ 770-12	Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Autoklav Typ 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
CO ₂ -Inkubator Typ 3039	Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA
Digitales pH-Meter Typ handylab 1	SI Analytics GmbH, Mainz
β -Flüssigkeitsszintillationszähler LS 6500	Life Science Research, Beckman Coulter GmbH, Unterschleißheim
Kühlzentrifuge Typ 5403 Rotor 16F6-38	Eppendorf GmbH, Hamburg
Magnetrührer MR 3002, 800W	Heidolph Instruments GmbH & Co KG, Schwabach
Multipette®	Eppendorf GmbH, Hamburg
Multiskan Plus MK11 ELISA-Reader	Titertek Instruments, Huntsville, AL, USA
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pipettierhilfe Pipetboy	IBS, Integra, Fernwald
Präzisionswaage Typ EG2200-2NM	Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Schüttler Laboshake	Gerhardt GmbH&Co KG, Königswinter
Sicherheitswerkbank der Klasse II, Mikroflow	Nunc GmbH, Wiesbaden
Spektralphotometer Typ UV-1601	Shimadzu Corporation, Duisburg
Thermomixer comfort	Eppendorf GmbH, Hamburg
Thermoshaker LD-45	Kisker Biotech GmbH&Co KG, Steinfurt
Trockenschrank Typ 700	Memmert GmbH&Co KG, Schwabach
Trockenschrank Typ T12	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Vortex Genie 2T	Scientific Industries Inc., Bohemia NY, USA
Wasserbad Typ 3043	Köttermann GmbH&Co KG, Uetze/Hänigsen
8-Kanalpipette	Eppendorf GmbH, Hamburg
12-Kanalpipette	Eppendorf GmbH, Hamburg

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

Bechergläser, Duran 50 ml, 100 ml, 500 ml	Schott Medica GmbH, Wertheim
Biopsi-Stanze, 4 mm #OL654R	Aesculap, Tuttlingen
Combitips plus [®] , 5 ml, 10 ml	Eppendorf AG, Hamburg
Einmal-Pinzetten, 12,5 cm steril, #AP-0041	Seidel Medizin GmbH, Buchendorf
Einmalpipetten, 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einwegskalpell, Nr. 21, #31602740	Feather Safety Razor Co.Ltd., Osaka, Japan
Filtrationsgerät Stericup [®] , 0,2 μ m	Millipore Corporation, Billerica, MA, USA
Gewebekulturplatten, 12 Vertiefungen, #665180	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Gewebekulturschale, 5 cm, #351016	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Gewinderöhrchen, Glas, #113935	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Gewindeflaschen, 20 ml, Glas #OVG0428	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Glaspipetten, 5 ml, #7079-5N	Corning Inc., Corning, NY, USA
Glasszintillationsgefäß, 20 ml, #OVG0428	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
Glaswolle, extrafein, #1408/3	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
8-Kanal-Pipetten, #BRA 704526	Fisher Scientific GmbH, Schwerte
Kanülen 20G Gr.1, #30404500	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Pasteurpipetten aus Glas, 150 mm	Wilhelm Ulrich GdB, Bamberg
Perfusorspritzen, 50 ml, #30402750	Dispomed Witt oHG, Gelnhausen
Petrischalen, #632181, 94x16 mm	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 10 μ l, 200 μ l, 1000 μ l	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Spritzenfilter Millex GP Filter Unit 0,22 μ m, #SLGPO33RS	Millipore GmbH, Schwalbach
Standzylinder/Messzylinder 100 ml, 250 ml, 1000 ml	Schott Medica GmbH, Wertheim
Szintillationsgefäße aus Polyethylen, 6 ml, 20 ml	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA

Reaktionsgefäße, 0,5 ml, #32411790	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Reaktionsgefäße, 1,5 ml, #32411805	Eppendorf AG, Hamburg
Reagenzröhrchen, 5 ml, #55.525	Sarstedt AG&Co, Nümbrecht
Urinbecher steril	Klinikbestand
V-Vial [®] , 1 ml, #D554,764	Wheaton Industries Inc., Millville, NJ, USA
96-well-ELISA Mikrotiterplatten Nr.3	Greiner Bio-one GmbH, Frickenhausen

2.1.5 Chemikalien

Aceton, reinst, #CP40.1	Merck KGaA, Darmstadt
Ameisensäure, p.a., #1.00264.0100	Merck KGaA, Darmstadt
Amphotericin B, 250 µg/ml, #15290-026	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Aqua dest. 20 ml, 1 l	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Ascorbic acid, cell culture tested, #A4544	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Chondroitinsulfat A sodium salt from bovine trachea, #C9819	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Borsäure 99 %, #B6768	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
CaCl ₂ x 2H ₂ O, 99 %, cell culture tested, #C7902	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
CH-alpha [®] Trinkampulle	Quiris Healthcare, Gütersloh (früher GELITA Health Products GmbH, Eberbach)
Chloramin T, p.a., #0271.1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Collagen from calf skin Typ III, #C3511	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Collagen Typ II ELISA, #M036000	MD Bioproducts, Zürich, Schweiz
C1,2C ELISA, #60-1002	TECO Medical Instruments GmbH, Neufahrn
1,9-Dimethylmethylenblue-chlorid, research grade, #20335	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Ethanol, absolut, #8006	J.T. Baker, Griesheim

FGH (Peptan TM F 5000)	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
FGH-N (Peptan TM F 2000)	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
Gentamycin, 50 mg/ml, #15750-037	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Gey` s Balanced Salt Solution (GBSS), #G9779	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ham` s F-12, #21765-029	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
HEPES-Puffer 1M, #15630-056	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
L-4-Hydroxyprolin 99,0 %(NT), #56250	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
ITS+ TM Premix, #35452	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Kaliumchlorid, ≥ 99 % Ph.Eur., #P017.2	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumhydroxid, p.a., #1050330500	Merck KGaA, Darmstadt
α -Ketoglutarsäure monopotassium salt, cryst., #K2000	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Kieselsäure, #SIL350	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
L-Cystein hydrochlorid, 98 %, #C1276	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
L-[¹⁴ C(U)]-Proline, 250 μ Ci, 1 mCi, #NEC285E001MC	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
L-[2,3- ³ H]-Proline, 1 mCi, 5 mCi, #NET323005MC	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
MMP-1 ELISA Kit, #QIA55	Calbiochem, Merck KGaA, Darmstadt
MMP-13 Biotrak ELISA, Amersham #RPN2621	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
MMP-3 Biotrak ELISA, Amersham #RPN2613	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Mobiforte [®]	Astrid Twardy GmbH, Unterföhring
Natriumacetat, p.a., #1.06268.1000	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid, p.a., #1.06469.1000	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumnitrit, puriss. p.a., #31443	Riedel-de Haën, Seelze
Natriumsulfat, p.a., #1.06649.0500	Merck KGaA, Darmstadt

Natriumthiosulfat-pentahydrat ≥99 % Ph.Eur., #T109.1	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Nitrat-Reduktase 20 U, #981249	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
N-1-Naphtylethylenediamin Dihydrochlorid, #N-5889	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Papain, 10 mg/ml, #10108014001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
p-Dimethylaminobenzaldehyd, puriss. p.a., #39070	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Penicillin/Streptomycin/Glutamin- Lösung [10000U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin, 29,7 mg/ml L-Glutamin], #10378-016	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin-Lösung [10000 U/ml Penicillin, 10 mg/ml Streptomycin], #P0781	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phenolphthalein 1 % Ph.Eur., #34607	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Phosphorsäure, 85 % puriss .p.a., #30417	Riedel-de Haën, Seelze
Prostaglandin E ₂ EIA Kit monoklonal, #514010	Cayman Chemical Company, Ann Arbor, MI, USA
Protease Inhibitor Cocktail Tablets, complete, #04 693 116 001	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
RDH (Peptan™ B 5000)	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
RDH-N (Peptan™ B 2000)	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
Salzsäure, rauchend, > 37 %, #84422	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Schwefelsäure, konzentriert, #25.810-5	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Sulfanilamid 99 %, #S9251	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Szintillationscocktail Emulsifier-Safe®, #6013389	Perkin Elmer Inc., Waltham, MA, USA
TIMP-1 Biotrak ELISA, Amersham #RPN2611	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Toluol, > 99,8 % ultra grade, #KK46.1	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

2.1.6 Lösungen und Puffer

Kultur:

Ascorbinsäure-Lösung (5 mg/ml):

50 mg L-Ascorbinsäure in 10 ml Aqua dest. lösen. Erst kurz vor Gebrauch herstellen.

Calciumchloridlösung:

4,85 g in 100 ml Aqua dest. lösen, sterilfiltrieren (0,22 μm -Filter), bei 4°C lagern. Haltbar für 1 Jahr.

HEPES-Puffer-Lösung:

- 20 ml HEPES-Puffer
- 1 ml Natriumsulfatlösung
- mit 5 N NaOH auf pH 7,2 einstellen

Sterilfiltrieren und bei 4°C lagern. Haltbar für 1 Jahr.

α -Ketoglutarat-Lösung (3 mg/ml):

0,15 g α -Ketoglutarsäure in 50 ml Aqua dest. lösen, sterilfiltrieren (0,22 μm -Filter) und bei -20°C einfrieren. Haltbar für 4 Monate.

Nährmedium:

- 100 ml Ham's F12
- 1 ml Penicillin/Streptomycin/Glutamin-Lösung
- 0,1 ml Gentamycin (50 mg/ml)
- 1 ml Amphotericin B (250 μl /ml)
- 1 ml α -Ketoglutarat-Lösung (3 mg/ml)
- 2,5 ml 1 M HEPES-Puffer-Lösung
- 1 ml L-Ascorbinsäure (5 mg/ml)
- 1 ml Calciumchlorid-Lösung (48,5 mg $\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ pro ml H_2O)

vermischen, sterilfiltrieren (0,22 μm -Filter) und anschließend 1 ml ITS+TMPremix hinzufügen, vor Gebrauch frisch herstellen.

Natriumsulfatlösung:

2,272 g Na_2SO_4 in 20 ml Aqua dest. lösen und mit 0,22 μm -Filter sterilfiltrieren.

Proteinaseinhibitorcocktail:

Eine Tablette „Protease Inhibitor Cocktail“ in 5 ml Wasser lösen.

Kollagen-Nachweis:

Ehrlich's Reagenz:

- 12 g p-Dimethylaminobenzaldehyd in 20 ml absolutem Ethanol lösen
- 2,74 ml konzentrierte Schwefelsäure mit absolutem Ethanol auf 20 ml auffüllen vermischen und im Dunkeln aufbewahren. Erst kurz vor Gebrauch herstellen.

6N HCl:

Zu 50,3 ml Aqua dest. 49,7 ml 37 %ige Salzsäure langsam hinzufügen und gut vermischen.

Hydroxyprolinstandard:

A) Stammlösung (120 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 12 mg L-4-Hydroxyprolin in 100 ml Aqua dest. lösen und bei 4°C lagern.

B) Arbeitslösung (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$): 1 ml der Stammlösung mit Aqua dest. auf 10 ml auffüllen und gut vermischen.

Bei jeder Analyse wurde eine Arbeitslösung frisch hergestellt und eine Standardreihe mit 0, 1.2, 3.0, 6.0, 9.0, 12.0, 18.0 und 24.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ angesetzt. Dazu wurde in Glasszintillationsgefäße 0, 0.10, 0.25, 0.50, 0.75, 1.0, 1.5 und 2.0 μl pipettiert und mit Aqua dest. auf 2,3 μl aufgefüllt.

Kieselsäure-Gel:

1,5 g Kieselsäure in 5 ml Toluol lösen und direkt vor Gebrauch nochmals gut vermischen. Erst kurz vor Gebrauch herstellen.

0,5 M Natriumacetatpuffer pH 5,8:

41,0 g Natriumacetat in 980 ml Aqua dest. lösen, pH-Wert 5,8 mit HCl einstellen, ad 1000 ml mit Aqua dest.

Natriumboratpuffer pH 8,7:

3,09 g Borsäure (MG = 61,83) in 50 ml Aqua dest. lösen, pH 8,7 mit 5 N NaOH-Lösung einstellen. Die Borsäure löst sich erst im alkalischen pH-Bereich.

3,6 N Natriumthiosulfat:

56,89 g Natriumthiosulfat Pentahydrat gelöst in Aqua dest ad 100 ml.

Proteoglykan-Nachweis (DMMB):Chondroitin-4-Sulfat-Standard (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$):

10 mg in 100 ml Aqua dest. lösen, bei 4°C lagern. Haltbar für 1 Monat.

Bei jeder Analyse wurde eine Standardreihe mit 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 und 2.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ frisch angesetzt. Dazu wurde in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5, 15.0, 17.5, 20.0 und 25.0 μl pipettiert und mit Aqua dest. ad 25 μl aufgefüllt.

1,9-Dimethylmethylenblau-Lösung:

- 16 mg 1,9-Dimethylmethylenblue-chlorid
- 2 ml Formiatpuffer
 - 1,54 ml Ameisensäure
 - 2,94 ml 5N NaOH
 - mit Aqua dest. auf 500 ml auffüllen
- 5 ml Ethanol

Mit Aqua dest. auf 1000 ml auffüllen, im Dunkeln bei 4°C aufbewahren. Haltbar für 1 Monat.

Papainhaltiger Verdauungspuffer:

- 0,2 ml 0,5 M Natriumacetatpuffer pH 5,8
- 0,033 ml Papainlösung (10 mg/ml)
- 1,767 ml Aqua dest.
- 2 mg Cystein HCl

vermischen und bei Raumtemperatur aufbewahren. Kurz vor Gebrauch frisch herstellen.

NO-Nachweis (Griess-Reaktion):

Griess-Reagenzlösung:

- 100 mg Sulfanilamide
- 10 mg N-1-Naphtylethylenediamine Dihydrochlorid
- 10 ml 25 %ige Phosphorsäure

vermischen und bei 4°C lagern. Haltbar für 11 Monate.

Nitrat-Reduktase:

20 U in 8 ml Aqua dest. auflösen, anschließend Aliquots á 0,5 ml bei -20°C lagern. Haltbar für 6 Monate.

Nitrit-Standard:

4,14 mg NaNO_2 in 100 ml Aqua dest. lösen. Davon 10 ml entnehmen und mit Aqua dest. auf 100 ml auffüllen und bei 4°C aufbewahren. Haltbar für 1 Monat.

Bei jeder Untersuchung wurde eine Standardreihe mit 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27

und 30 nM/ml frisch angesetzt. Dazu wurde in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 und 50 μ l pipettiert und mit Aqua dest. auf 50 μ l aufgefüllt.

2.1.7 Kollagenhydrolysate

Kurz vor Gebrauch wurden jeweils 1000 mg der Trockensubstanz zu 2,5 ml Nährmedium hinzugefügt und mittels Magnetrührer gut vermischt. Die Konzentration entspricht 10 mg/ml KH. Die gelösten Trockensubstanzen sowie das flüssige CH-alpha[®] wurden mit Nährmedium zu Konzentrationen von 0.1, 0.5, 1.0 und 2.0 verdünnt.

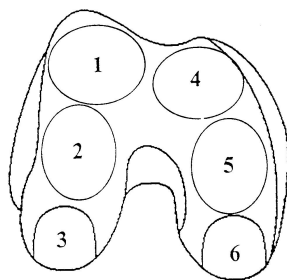
KH (Kollagen Typ I)	Ur- sprung	Mittleres Mo- lekulargewicht (Herstellerausgabe)	Darrei- chungsform	Zusätze
RDH	Rind	5000 Da	Pulver	keine Angabe
RDH-N	Rind	2000 Da	Pulver	keine Angabe
FGH	Fisch	5000 Da	Pulver	keine Angabe
FGH-N	Fisch	2000 Da	Pulver	keine Angabe
Mobiforte [®]	Schwein	keine Angabe	Pulver	ohne Zusätze
CH-alpha [®]	Rind	keine Angabe	Trinkampulle	Fortigel [®] , Fruktose, Zitronensäure, Malzextrakt, Vitamin C, Kaliumsorbat, Acesulfam K, Aroma, Natrium-Cyclamat

Tab. 6: Charakterisierung der eingesetzten Kollagenhydrolysate

2.2 Methoden

2.2.1 Präparation der Knorpelimplantate

Die frisch aus dem Operationssaal kommenden Knorpel-Knochen-Proben wurden bis zu ihrer Weiterverarbeitung für max. 6 Std. in 0,9 % Natriumchlorid-Lösung bei 4 - 20°C gelagert. In einer Sicherheitswerkbank der Klasse II wurden die Regionen 1 - 6 (siehe Abb. 5) und somit die gesamte Kondyle des Knorpels in Krankheitschweregrade eingeteilt (siehe Collins-Score Tab. 7). Anschließend wurden aus der lateralen Femurkondyle Knorpelimplantate der 3 Regionen mit Hilfe eines Skalpell abpräpariert und runde Knorpelimplantate mit 4 mm Durchmesser mit Hilfe einer Hautstanze ausgestanzt. Nach Regionen getrennt wurden die Knorpelimplantate der Regionen 1 - 3 mit GBSS inkl. 1 % Penicillin/Streptomycin-Lösung dreimal gewaschen. Danach wurden in die Vertiefungen der 12-well-Gewebekulturplatte je ein Knorpelimplantat in 2 ml, auf 37°C temperiertes Nährmedium gegeben und im Brutschrank bei 37°C, 5 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 1 - 4 Tagen wurde das Nährmedium gewechselt.



Rechtes Knie
 Region 1 - 3: Laterale Femurkondyle
 Region 4 - 6: Mediale Femurkondyle
 Region 1 + 4: Anterior
 Region 3 + 6: Posterior

Abb. 5: Regionen der Femurkondyle. Aus Region 1 - 3 wurden die Knorpelimplantate jeweils getrennt gesammelt.

2.2.2 Allgemeine Überlegungen zur Kollagensynthese

Um die Kollagensyntheserate der Chondrozyten zu quantifizieren, werden die Knorpelimplantate mit radioaktivem Prolin inkubiert und die Menge an radioaktiv markiertem Hydroxyprolin, das durch Oxidation in den Zellen entstanden ist, bestimmt. Um die Wirkung der KH auf die Kollagensyntheseleistung zu erfassen, werden die Knorpelimplantate zunächst mit ³H-Prolin 24 Std. inkubiert. Abhängig von der Aktivität der Zelle wird mehr oder weniger ³H-Prolin zu ³H-Hydroxyprolin oxidiert und in Kollagen eingebaut, sodass man durch Bestimmung von ³H-Hydroxyprolin die Grundrate der Kollagensynthese eines Knorpelimplantates erfasst. Anschließend wird die Kollagensyntheserate erneut, jedoch diesmal mit ¹⁴C-Prolin und in Anwesenheit eines KH für weitere 24 Std. bestimmt. Änderungen der Kollagensynthese äußern sich somit in einem veränderten Quotient aus ¹⁴C-Hydroxyprolin/³H-

Score	Beschreibung
0	Keine Veränderungen
1	Leichte Veränderungen: <ul style="list-style-type: none"> • oberflächliche, leichte Auffaserung • oberflächliche, leichte Spaltbildung bzw. Einrisse • leichte Furchenbildung
2	Beginnende Zerstörung des Knorpels: <ul style="list-style-type: none"> • tiefe Auffaserung • tiefe Spaltbildung bzw. Einrisse • tiefe Gruben bzw. Furchenbildung (Gratbildung) • kleine Osteophyten möglich
3	Hochgradige Zerstörung des Knorpels: <ul style="list-style-type: none"> • < 30 % des Knorpels bis zur subchondralen Platte erodiert • ausgeprägte Auffaserung • ausgeprägte Spaltbildung bzw. Einrisse • Osteophytenbildung vorhanden
4	Völlige Zerstörung des Knorpels: <ul style="list-style-type: none"> • > 30 % des Knorpels bis zur subchondralen Platte erodiert

Tab. 7: Der Collins-Score: Makroskopische Bewertung des Schweregrades des osteoarthritisch veränderten Gelenkknorpels (modifiziert nach [19] und [63])

Hydroxyprolin. Wird beispielsweise durch ein KH eine Synthesesteigerung erzielt, nimmt der Quotient ^{14}C -Hydroxyprolin/ ^3H -Hydroxyprolin im Vergleich zu dem Quotient des Kontrollknorpels, der nur das Lösungsmittel enthielt, zu. Durch diese Doppelmarkierung der Knorpelimplantate – Markierung jeweils vor (^3H -Prolin) und nach (^{14}C -Prolin) Zugabe von KH – wird die Stoffwechselaktivität eines Implantates vor Zugabe des KH in Form einer internen Kontrolle mitberücksichtigt. Diese neue Methode nach Goodwin et al. [34] wird angewendet, um die Schwankungsbreite der Ergebnisse zu reduzieren, da sie die unterschiedliche Stoffwechselaktivität von Knorpelimplantaten berücksichtigt, obwohl diese bereits von derselben Region einer Kondyle stammen.

2.2.2.1 Kultivierung und radioaktive Markierung der Knorpelimplantate

Für jedes der 6 untersuchten KH wurden jeweils 6 Knorpelimplantate, die aus einer Region der lateralen Femurkondyle eines Patienten stammten, kultiviert. Die Zugabe des ersten radioaktiven Präcursor ^3H -Prolin erfolgte im Zeitraum zwischen dem 1. bis 4. Tag nach Beginn der Kultivierung. Die Knorpelimplantate wurden in 4 ml Nährmedium für 24 Std. mit je $20 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Prolin kultiviert (zur radioaktiven

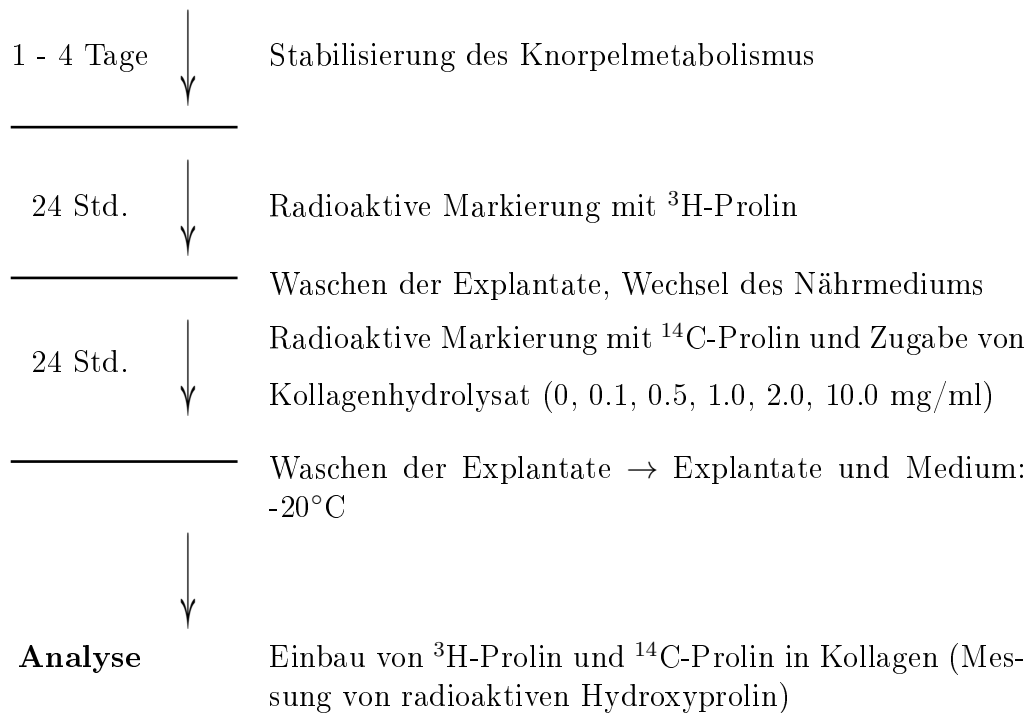


Abb. 6: Versuchsaufbau zum Einfluss von KH auf die Kollagensynthese

Markierung siehe Vorversuch 2.2.3.8). Anschließend wurde die Radioaktivität von jeweils 0,1 ml des Nährmediums im β -Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Das restliche Medium wurde mit 0,4 ml Proteinaseinhibitorcocktail bei -20°C eingefroren. Die Knorpel explantate wurden dreimal mit jeweils 2 ml Nährmedium gewaschen. Von der letzten Waschlösung wurden 0,1 ml im β -Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Die Knorpelproben wurden erneut mit 2 ml Nährmedium bei 37°C kultiviert. Nach 1 Std. wurde das Nährmedium gewechselt und 0,1 ml des alten Mediums im β -Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Dieser Vorgang aus einstündiger Waschung und Messung wurde dreimal wiederholt. Die Schritte dienen dazu, den überschüssigen Präcursor aus den Knorpel explantaten herauszuwaschen (siehe dazu Vorversuch 2.2.3.2). Nach dem letzten Waschschrift wurden die 6 Knorpel explantate auf 6 Vertiefungen einer Gewebekulturplatte aufgeteilt und jeweils mit 0,9 ml Nährmedium ohne Zusatz von Vitamin C bei 37°C kultiviert. Nach einer Std. wurde das jeweilige KH in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt: 0 mg/ml KH, entspricht der Kontrolle, 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 und 10.0 mg/ml KH. Nach einer weiteren Std. bei 37°C wurden die Knorpel explantate erneut radioaktiv markiert. Dabei wurde in jede Vertiefung der Gewebekulturplatte jeweils $10\ \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Prolin und $9\ \mu\text{l}$ frisch hergestelltes Vitamin C (5 mg/ml) dem vorhandenen Medium hinzugefügt. Die Hydroxylierung von Prolin ist Vitamin C-abhängig und auf Grund der kurzen Halbwertszeit von Vitamin C wurde dieses zeitgleich mit dem radioaktiven Präcursor zugesetzt. Nach einer 24-stündigen Inkubation bei 37°C wurde den Medien jeweils 0,1 ml entnommen und die Radioaktivität im β -Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Die Rest-

medien wurden mit 0,08 ml Proteinaseinhibitorcocktail bei -20°C eingefroren. Zur Entfernung des nicht-inkorporierten radioaktiven Präcursors wurden die Knorpel-explantate zunächst dreimal mit jeweils 2 ml Nährmedium gewaschen. Von der letzten Waschlösung wurden 0,1 ml im β -Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Anschließend wurden die Knorpelproben zweimal in jeweils 2 ml Nährmedium für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Jeweils 0,1 ml der für eine Waschung genutzten Medien wurden im β -Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Daraufhin wurden die Knorpel-explantate in 1 ml GBSS inkl. 0,1 ml Proteinaseinhibitorcocktail bei -20°C eingefroren.

2.2.2.2 Analyse der Knorpel-explantate

Hydroxyprolin ist eine Aminosäure, die ausschließlich in Kollagen vorkommt. Durch den Hydroxyprolinnachweis ist es daher möglich, Veränderungen in der Kollagen-synthese unabhängig von der Gesamtproteinsynthese zu bestimmen.

Die quantitative Bestimmung des radioaktiv markierten Hydroxyprolins in Form von radioaktivem Pyrrol beruht auf zwei Reaktionen: 1. Die Trennung des radioaktiven Präcursors Prolin von Pyrrol, einem durch Oxidation der Probe mit Chloramin T aus Hydroxyprolin entstandenem Oxidationsprodukt und 2. der Bindung des nicht-inkorporierten radioaktiven Präcursors Prolin sowie weiterer Prolinoxidationsprodukte an Kieselsäure bei gleichzeitiger Elution von radioaktivem Pyrrol mittels Toluol. Somit wird im β -Flüssigkeitsszintillationszähler ausschließlich die Radioaktivität des Pyrrols bestimmt. Die Grundlage dieser Nachweismethode lieferten K. Juva und D.J. Prockop [43]. Diese Methode, modifiziert durch B.R. Switzer und G.K. Summer [92], wurde zur spezifischen Bestimmung von radioaktiv markiertem Hydroxyprolin eingesetzt.

Durchführung

Nach dem Auftauen wurden die Explantate abgetupft und anschließend sofort ihr Nassgewicht bestimmt. Die Proben wurden 1 Std. mit Aceton behandelt, dabei wurde das Aceton einmalig nach 30 Min. gewechselt. Danach wurden die Knorpel-explantate für 15 Min. im Wärmeschrank bei 30°C getrocknet und daraufhin das Trockengewicht ermittelt. Die Knorpel wurden anschließend über Nacht für 18 - 24 Std. in 0,6 ml 6 N HCl bei 108°C hydrolysiert („Knorpelhydrolysat“). Um Medien zu analysieren, wurden 0,5 ml der Medien in 0,5 ml konzentrierter Salzsäure über Nacht bei 108°C hydrolysiert. Zur Überprüfung der Hydrolyse wurde ein 0,1 mg Kollagenstandard (1 mg in 1 ml 6 N HCl) in einem separaten Gefäß hydrolysiert. Als Standardkurve wurde ein Hydroxyprolin-Standard mit mindestens 6 verschiedenen Konzentrationen angesetzt, deren Konzentration zwischen 0 und $24 \mu\text{g/ml}$ Hydroxyprolin betrug. Die Knorpelhydrolysate wurde in Glasvials mit Wasser auf ein Endvolumen von 2,3 ml verdünnt. Zur Einstellung des pH-Wertes wurde den

Proben jeweils ein Tropfen 1%ige Phenolphthalein-Lösung zugegeben und mittels Kaliumhydroxid und Salzsäure auf eine schwache Rosafärbung eingestellt. Zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes während der darauffolgenden Oxidation wurden jeweils 0,5 ml Natriumboratpuffer pH 8,7 zugesetzt und gut durchmischt. Die Proben oxidierten bei Raumtemperatur nach Zugabe von 2 ml Chloramin-T. Die Oxidation wurde nach genau 25 Min. durch Zugabe von 1,2 ml 3,6 N Natriumthiosulfat und 10 sekündigem Mixen auf dem Vortexer beendet. Die Proben wurden mittels Pipetten jeweils exakt auf zwei Glasröhrchen aufgeteilt und mit 0,75 g Kaliumchlorid gesättigt. Nach gründlicher Durchmischung der Proben wurden 1,25 ml Toluol hinzugegeben. Durch siebenminütiges Schütteln wurde das Prolin-Oxidationsprodukt in die organische Phase, dem Toluol, extrahiert, welches nach zentrifugieren bei 1000 xg für 5 Min. komplett entfernt wurde. Handelte es sich um eine radioaktiv markierte Probe wurde das Toluol mit 15 ml Szintillationsflüssigkeit vermennt und die Radioaktivität im β -Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen („1.Toluolüberstand“). Der nicht-radioaktive Toluolüberstand der Standardproben wurde verworfen. Die Extraktion der Prolin-Oxidationsprodukte war wichtig, da diese ebenso mit Ehrlich's Reagenz, welches bei der photometrischen Bestimmung eingesetzt wurde, reagiert und durch diese unspezifischen Reaktionsprodukte die Farbe abgeschwächt wird. Mit leicht geöffnetem Deckel wurden die Proben nun in einem kochenden Wasserbad für 30 Min. erhitzt, dabei wurde das Hydroxyprolin-Oxidationsprodukt zu Pyrrol überführt. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden die Proben mit 2,5 ml Toluol versetzt, wieder für 7 Min. geschüttelt und bei 1000 xg für 5 Min. zentrifugiert. Das Pyrrol befand sich nun im Toluol, welches anschließend sowohl für die photometrische Analyse als auch für die Radioaktivitätsbestimmung verwendet wurde („2.Toluolüberstand“).

Spektralphotometrische Bestimmung:

Pyrrol reagiert mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich's Reagenz) zu einem farbigen Kondensationsprodukt, welches spektralphotometrisch nachgewiesen werden kann. Dazu wurden 50 μ l des 2. Toluolüberstandes mit 1,95 ml Toluol vermischt (1:40 Verdünnung). Anschließend wurde jeweils 0,8 ml Ehrlich's Reagenz hinzupipettiert und gut vermischt. Für die vollständige Entwicklung der Farbe wurden die Proben im Dunkeln für 30 Min. bei Raumtemperatur geschüttelt und anschließend bei 1000xg für 5 Min. zentrifugiert. Die Extinktion wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm im Spektralphotometer gemessen. Der Hydroxyprolinegehalt der Proben konnte anhand der Standardkurve bestimmt werden.

Radioaktivitätsmessung:

Die toluolhaltigen Proben wurden zunächst mittels einer Kieselsäure-Säule aufge-

reinigt. Hierzu wurde in die Spitze einer 5 ml Glaspipette etwa $0,5\text{ cm}^3$ Glaswolle gepackt, mit 2 ml Kieselsäure-Gel befüllt und mit zweimal 4 ml Toluol äquilibriert. Anschließend wurden 2 ml des Toluols des 2.Toluolüberstandes auf die Säule gegeben und in einem 20 ml Szintillationsgefäß aufgefangen. Weitere 6 ml Toluol wurden auf die Säule gegeben und in dem selben Gefäß aufgefangen („Probe“). Danach wurden zwei Waschungen der Säule mit jeweils 6 ml Toluol durchgeführt, welche in neuen Szintillationsgefäßen aufgefangen wurden („1. und 2. Waschung“). In jedes Gefäß wurden 10 ml Szintillationscocktail gefüllt und auf dem Schüttler für mindestens 1 Std. geschüttelt. Die Radioaktivität wurde anschließend im β -Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

Auswertung

Der Hydroxyprolingehalt pro mg Knorpeltrockengewicht wurde berechnet, indem der photometrisch bestimmte Hydroxyprolingehalt auf den Gesamtgehalt hochgerechnet und dieser durch das Knorpeltrockengewicht dividiert wurde. Die Ergebnisse wurden als Prozent zur unbehandelten Kontrolle (=100 %) berechnet und graphisch dargestellt.

Die gemessene Radioaktivität der Probe und der ersten Waschung wurden addiert und auf 2,5 ml Toluol hochgerechnet. Die Radioaktivität in dpm pro mg Knorpeltrockengewicht wurde berechnet, indem die Radioaktivität eines Knorpelimplantates durch das Knorpeltrockengewicht dividiert wurde. Diese setzte sich zusammen aus der Radioaktivität der beiden zugehörigen 2,5 ml Proben. Das Verhältnis der Radioaktivitäten wurde ebenfalls gebildet (dpm ^{14}C /dpm ^3H) und ist in Prozent zur unbehandelten Kontrolle (=100 %) angegeben.

2.2.3 Vorversuche zur Kollagensynthese

2.2.3.1 Überprüfung des β -Flüssigkeitsszintillationszählers

Die in den Versuchen verwendeten radioaktiven Präcursor ^3H -Prolin und ^{14}C -Prolin sind β -Strahler und werden mittels β -Flüssigkeitsszintillationszählung nachgewiesen. Die beim β -Zerfall frei werdende Energie zeigt ein typisches Energiespektrum, welches für jede verschiedene Atomart eine charakteristische Energieverteilung aufweist. Deshalb ist es bei Proben die mit zwei Tracern markiert sind möglich, die Aktivität der verschiedenen radioaktiven Moleküle nebeneinander zu bestimmen. Die bei dem radioaktiven Zerfall ausgestrahlten β -Teilchen stoßen, sofern ein Szintillationscocktail eingesetzt wird, mit Szintillatoren zusammen. Bei diesem Zusammenstoß wird Licht ausgesendet. Die Intensität des Lichtes ist proportional zur Anfangsenergie des β -Teilchens und wird durch den β -Flüssigkeitsszintillationszähler mit Hilfe von zwei Photoverstärkerröhren in elektrische Impulse übersetzt und in Form von Span-

nungsänderungen gemessen. Im β -Flüssigkeitsszintillationszähler kann man Spannungsbereiche, auch „Fenster“ genannt, zwischen 0 - 10 V auswählen, um nur Impulse bestimmter Energiebereiche, welche z.B. spezifisch für eine Atomart ist, zu messen. Nur ein Teil der Impulse wird tatsächlich gemessen und als cpm (= counts per minute) angegeben, wobei die Zählausbeute abhängig von der Stärke des Quencheffektes ist. Die Zählausbeute liegt bei unserem Versuch für ^3H bei ca. 60 % und für ^{14}C bei ca. 90 %. Anhand dieser Zählausbeute lässt sich die absolute Radioaktivität als Zerfälle pro Min. (dpm = desintegrations per minute) berechnen. Sofern es bei einer radioaktiven Doppelmarkierung ein Spektrum in einem Bereich gibt, in dem nur ein Isotop zum Spektrum beiträgt, können dort die Zerfälle dieses β -Strahlers bestimmt und die restliche Kurve dieses Tracers errechnet werden (siehe Abb. 7). Dieser Anteil wird vom Gesamtspektrum abgezogen und man erhält somit auch für das andere Isotop die entsprechende dpm-Zahl [20, 26].

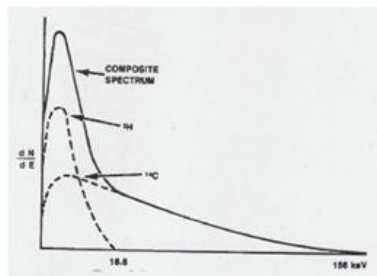


Abb. 7: Doppelmarkiertes Spektrum von ^3H und ^{14}C [26]

Die durchgezogene Linie gibt das gemessene Energiespektrum an, die gestrichelte Linien jeweils die Anteile der einzelnen Tracer.

Ziel unseres Vorversuches war es zu prüfen, inwiefern bei einer Doppelmarkierung die beiden Präcursor ^3H -Prolin und ^{14}C -Prolin durch unseren β -Flüssigkeitsszintillationszähler mit dem gewählten Userprogramm tatsächlich separat erfasst werden. Hierzu wurde eine ^{14}C -Prolin- und eine ^3H -Prolinstammlösung mit definierter Radioaktivität von jeweils ca. 1,1 Mio. dpm/ml hergestellt. Hierzu wurden $10\ \mu\text{l}$ ^{14}C -Prolin (112 mCi/ml) und $1\ \mu\text{l}$ ^3H -Prolin (1 mCi/ml) in jeweils 2 ml Aqua dest. pipettiert. Beide Stammlösungen wurden anschließend gründlich mit dem Vortex gemischt. Dreimal wurden jeweils 0,1 ml dieser Lösungen (ca. 110.000 dpm) mit 4 ml Szintillationscocktail versetzt (Einzelmarkierungen). In weiteren drei Gefäßen wurden 0,1 ml ^{14}C -Prolin-Stammlösung, 0,1 ml ^3H -Prolin-Stammlösung und 4 ml Szintillationscocktail zusammen hergestellt (Doppelmarkierung). Die gemessene Radioaktivität unter Verwendung der Userprogramme für ^{14}C - und ^3H -Einzelmarkierung wurde verglichen mit der gemessenen Radioaktivität unter Verwendung des gewählten Userprogrammes für die Doppelmarkierung. Die Radioaktivität in dpm wurde gemittelt und miteinander verglichen. Der Versuch wurde insgesamt an drei verschiedenen Tagen mit denselben Stammlösungen wiederholt.

2.2.3.2 Entfernen der nicht-inkorporierten radioaktiven Präcursor während der Kultivierung

Um die Messung der Kollagensyntheserate auf einen definierten Zeitraum zu begrenzen und Störungen durch überschüssige radioaktive Präcursor während dem analytischen Hydroxyprolin-Nachweis zu reduzieren, müssen die freien nicht-inkorporierten radioaktiven Präcursor durch Waschung aus dem Knorpelimplantat möglichst vollständig eliminiert werden. Ziel dieses Vorversuches war es zu überprüfen, inwiefern das von uns eingesetzte Waschprocedere beide nicht-inkorporierte Präcursor quantitativ aus den Knorpelproben entfernt. Hierzu wurden die Knorpelimplantate wie unter 2.2.1 beschrieben präpariert und nach Regionen getrennt entweder mit $10\ \mu\text{Ci}$ ^3H -Prolin oder mit $1\ \mu\text{Ci}$ ^{14}C -Prolin pro ml Nährmedium markiert und anschließend im Brutschrank bei 37°C , 5% CO_2 und 95% relativer Luftfeuchtigkeit für 18 Std. kultiviert. Anschließend wurde die Radioaktivität der Nährmedien im β -Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt und die Explantate unter sterilen Bedingungen dreimal mit 2 ml Nährmedium gewaschen. Nach 1 Std. wurden die Knorpel erneut gewaschen. Dieser Vorgang von einstündiger Inkubation in Nährmedium und anschließender Waschung wurde noch weitere zweimal wiederholt. Nach weiteren 24 Std. wurden die Nährmedien entnommen und der Versuch beendet. Jeweils 0,1 ml der Waschlösungen wurden im β -Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Die gemessene Radioaktivität der Nährmedien wurde auf das ursprüngliche Volumen hochgerechnet. Die Entfernung der radioaktiven Präcursor durch die Waschungen wurde graphisch dargestellt, indem die Gesamtradioaktivität in den Nährmedien als dpm/ml gegen die Zeit aufgetragen wurde. Der Versuch wurde dreimal wiederholt.

2.2.3.3 Aufreinigung der Stammlösung der Präcursor mittels der Hydroxyprolin-Nachweismethode

Ziel dieses Vorversuches war es zu überprüfen, ob das Medium durch die Hydroxyprolin-Nachweismethode vollständig von den darin vorkommenden Präcursor gereinigt werden kann und ob die Stammlösungen der Präcursor selbst mit radioaktivem Hydroxyprolin verunreinigt sind. Dazu wurden zwei Nährmedien hergestellt, die den Medien der radioaktiven Markierung im Hauptversuch entsprachen. In 4 ml Nährmedium wurden $20\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^3H -Prolin pipettiert und nach Zugabe von 0,4 ml Proteaseinhibitorcocktail bei -20°C eingefroren. Zu $900\ \mu\text{l}$ Nährmedium wurden $10\ \mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^{14}C -Prolin und 0,08 ml Proteinaseinhibitorcocktail hinzugefügt und anschließend bei -20°C eingefroren. Die Medienproben wurden aufgetaut und jeweils 0,5 ml Medium entsprechend der Hydroxyprolin-Nachweismethode beschrieben unter 2.2.2.2 analysiert. Die Radioaktivität der Medienproben wurde gemessen und tabellarisch dargestellt. Die ^3H -Prolin- und die ^{14}C -Prolin-Nährmedien wurden an sechs verschiedenen Zeitpunkten angesetzt und gemeinsam analysiert.

2.2.3.4 Trocknung der Explantate mit Aceton

Vor der Bestimmung des Hydroxyprolingehaltes der Explantate werden diese getrocknet. Die Trocknung wird durch die Behandlung mit Aceton beschleunigt, da es das Wasser im Knorpel verdrängt und durch seinen Siedepunkt bei 56°C bereits bei niedrigen Temperaturen verdunstet. Daher ist die Trocknung mit Aceton besonders effektiv und knorpelschonend. Ziel dieses Vorversuches war es zu überprüfen, wie lange die mit Aceton behandelten Knorpel-explantate getrocknet werden müssen, bis die gesamte Feuchtigkeit entfernt ist. Dazu wurden drei Knorpel-explantate wie unter 2.2.1 beschrieben präpariert. Für unseren Trocknungsversuch war es nicht zwingend nötig, die Knorpelproben mehrere Tage zu kultivieren, so dass ein Teil der Explantate direkt nach der Präparation getrocknet wurde. Zunächst wurden die Explantate abgetupft und deren Nassgewicht bestimmt. Anschließend wurden diese in 2 ml Aceton gelegt und 1 Std. lang bei Raumtemperatur stehen gelassen. Das Aceton wurde während dieser Stunde einmalig nach 30 Min. gewechselt. Danach wurden die Knorpel-explantate in leere Glasgefäße überführt und im Brutschrank bei 30°C 45 Min. lang getrocknet. In 15 minütigen Abständen wurden die Explantate gewogen und danach weiter im Wärmeschrank getrocknet. Das Trockengewicht der Explantate wurde gemittelt und als Prozent zum Nassgewicht berechnet. Graphisch wurde das mittlere prozentuale Knorpelgewicht gegen die Zeit dargestellt. Der Versuch wurde an 9 Knorpel-explantaten von insgesamt 3 Patienten an drei verschiedenen Tagen durchgeführt.

2.2.3.5 Verdünnung der Knorpelproben

Das Spektralphotometer hat einen begrenzten Bereich, indem die Extinktion der zu messenden Proben liegen müssen. Dieser Extinktionsbereich liegt bei unserem Gerät laut Angabe des Herstellers zwischen 0,00 und 3,99. Daher muss die während der Analyse der Knorpel-explantate gewonnene Toluolschicht („2.Toluolüberstand“) bereits vor der Zugabe des Ehrlich's Reagenzes mit Toluol verdünnt werden. Zur Bestimmung einer geeigneten Knorpelverdünnung wurden die Knorpel-explantate zunächst wie unter 2.2.1 beschrieben präpariert. Bei einer der sechs Wiederholungen des Versuches wurden die Knorpel-explantate nicht kultiviert, sondern direkt nach der Präparation eingefroren. Bei einer anderen Wiederholung wurden die Knorpel-explantate wie unter 2.2.3.2 beschrieben kultiviert. Die Knorpel wurden bis zur Analyse in 1 ml GBSS inkl. 0,1 ml Proteaseinhibitorcocktail bei -20°C gelagert. Der Hydroxyprolingehalt der Knorpel-explantate wurde wie unter 2.2.2.2 beschrieben bestimmt. Mit 2 ml des gewonnenen Toluols („2.Toluolüberstand“), welches das Hydroxyprolin-Oxidationsprodukt Pyrrol enthält, wurde vor der Zugabe des Ehrlich's Reagenzes eine Verdünnungsreihe mit Toluol hergestellt. Hierbei wurde der 2. Toluolüberstand

1:2, 1:4, 1:10, 1:20, 1:40, 1:60, 1:80 und 1:100 verdünnt, wobei das Endvolumen 2 ml betrug. Zu den verdünnten Proben, den Standardproben und dem Kollagenstandard wurden jeweils 0,8 ml Ehrlich's Reagenz zugegeben. Die Farbe entwickelte sich im Dunkeln bei Raumtemperatur auf einem Schüttler für 30 Min. Die Proben wurden anschließend mit 1000xg für 5 Min. zentrifugiert und der Überstand spektralphotometrisch bei 560 nm vermessen. Die anhand der Standardkurve ermittelten Konzentrationen der verdünnten Proben wurden mit dem jeweiligen Verdünnungsfaktor multipliziert, wodurch der Hydroxyprolinegehalt der unverdünnten Probe berechnet wurde. Dieser Gesamthydroxyprolinegehalt wurde gegen die einzelnen Verdünnungen graphisch aufgetragen. Der Versuch wurde an vier unterschiedlichen Tagen mit Knorpelimplantaten von insgesamt 6 verschiedenen Patienten durchgeführt.

2.2.3.6 Zeitfenster für die photometrische Messung

Die spektralphotometrische Vermessung der Proben zur Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes ist zeitaufwendig und setzt voraus, dass die Farbintensität der Proben eine gewisse Zeit lang stabil bleibt. Deshalb sollte überprüft werden, inwiefern sich die Farbe mit der Zeit ändert. Hierzu wurde die bei dem Vorversuch 2.2.3.5 hergestellte 1:40 Verdünnung nochmals nach 0,5, 1,0, 1,5 und 2,0 Std. gemessen. Nach 24 Std. wurde die Extinktion der Probe inklusive der Standardkurve erneut bestimmt. Graphisch dargestellt wurde die prozentuale Veränderung der Extinktion gegen die Zeit. Der Versuch wurde mit drei verschiedenen 1:40 Verdünnungen an drei unterschiedlichen Tagen durchgeführt.

2.2.3.7 Absorptionsspektrum

Für die spektralphotometrische Bestimmung der Hydroxyprolinkonzentration der Knorpelimplantate wird eine Wellenlänge benötigt, die im Absorptionsspektrum von Pyrrol im maximalen Bereich liegt. Dazu wurde eine Probe mit 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Hydroxyprolin wie bei 2.2.2.2 beschrieben für die spektralphotometrische Messung vorbereitet. Anschließend wurde mit dieser Probe im Spektralphotometer ein Absorptionsspektrum in einem Wellenlängnbereich von 200 bis 1000 nm erstellt. Dieses wurde graphisch dargestellt, indem die Absorption gegen die Wellenlänge aufgetragen wurde. Der Versuch wurde mit zwei unterschiedlichen Proben an zwei Tagen wiederholt.

2.2.3.8 Radioaktive Markierung

Bei der radioaktiven Markierung zur Bestimmung der Kollagensynthese treten drei Probleme auf: 1. Man benötigt eine ausreichend hohe Radioaktivität des Hydroxyprolins, damit es sich von dem Hintergrundrauschen, welches durch natürliche Radioaktivität und kosmische Strahlung entsteht, abgrenzt, 2. Zusätzlich muss die

Radioaktivität hoch genug sein, um überhaupt unterschiedlich hohe Effekte der KH detektieren zu können, 3. Die Menge an Radioaktivität muss so gewählt werden, dass gleichzeitig keine radioaktive Zellschädigung auftritt. Ziel dieses Vorversuches war es zu überprüfen, ob die von Goodwin et al. [34] angegebene Menge an Radioaktivität von $10 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Prolin sowie $1 \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Prolin für die Markierung ausreichend ist, damit sich der radioaktive Hydroxyprolinegehalt nach der durchgeführten Aufreinigung während der Hydroxyprolin-Nachweismethode von dem Hintergrundrauschen abgrenzen lässt. Dazu wurden die Knorpelimplantate wie unter 2.2.1 beschrieben präpariert. Drei Implantate der Region 1 wurden mit $10 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Prolin, drei Implantate der Region 2 mit $1 \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Prolin markiert und im Brutschrank bei 37°C , 5 % CO_2 und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit kultiviert. Nach 18 Std. wurden die Knorpelproben, wie unter 2.2.3.2 festgelegt, gewaschen und in 1 ml GBSS inkl. 0,1 ml Proteaseinhibitorcocktail bei -20°C eingefroren. Der Hydroxyprolinegehalt der Implantate wurde wie unter 2.2.2.2 beschrieben analysiert. Die Radioaktivität der gewonnenen Toluolprobe („2.Toluolüberstand“) wurde im β -Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt und tabellarisch dargestellt. Der Versuch wurde mit Knorpel von drei verschiedenen Patienten an drei unterschiedlichen Tagen wiederholt.

2.2.3.9 Aufreinigung von Hydroxyprolin

Zur Analyse der Knorpelimplantate auf ihre Kollagensyntheseleistung wurden die Knorpelimplantate hydrolysiert (Beschreibung der Methode siehe 2.2.2.2). Zur Überprüfung der Aufreinigungsschritte während dieser Hydroxyprolin-Nachweismethode wurde die Radioaktivität im Knorpelhydrolysat von jeweils drei Knorpel (unbehandeltes Knorpelimplantat, Implantat mit Behandlung mit 2 und 10 mg/ml RDH) gemessen. Dazu wurden jeweils $20 \mu\text{l}$ des Knorpelhydrolysates („Knorpelhydrolysat“), die gesamte erste Toluolschicht („1.Toluolüberstand“) und das erste Säuleneluat („Probe“) mit 10 bzw. 15 ml Szintillationscocktail im β -Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt und auf die Gesamtradioaktivität hochgerechnet. Der Versuch wurde mit Knorpel von vier verschiedenen Patienten an vier unterschiedlichen Tagen wiederholt.

2.2.4 Vorversuche zur Degradation

Degradative Prozesse wurden anhand des MMP-, Kollagen Typ II-, Proteoglykan-, NO- und TIMP-1-Gehaltes bewertet, welche durch verschiedene Methoden bestimmt wurden. Vor dem Einsatz der Assays musste zunächst sichergestellt werden, dass die eingesetzten Methoden nicht mit den in den Proben vorkommenden KH interagieren. Dazu wurden mit KH versetzte Nährmedien mittels der einzusetzenden Assays

analysiert, wobei das Nährmedium die höchste Konzentration an KH (10 mg/ml) enthielt. Die KH-Lösungen und ein Nährmedienleerwert wurden zuvor bei -20°C eingefroren. Die Vorversuche wurden pro Assay jeweils einmal durchgeführt.

2.2.4.1 MMP-1-, MMP-3- und MMP-13-ELISA

Untersucht wurden jeweils ein Nährmedium, sowie Nährmedien die 10 mg/ml RDH, RDH-N, CH-alpha[®], FGH, FGH-N und Mobiforte[®] enthielten. Die Enzym-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs) wurden entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.2 Kollagen Typ II- und C1,2C-ELISA

Die in den Hauptversuchen eingesetzten KH bestehen aus Kollagenfragmenten, die möglicherweise von Kollagen-ELISA detektiert werden können. Es wurden zwei verschiedene Assays untersucht:

C1,2C-ELISA:

C1,2C ist ein Neoepitop in Kollagenfragmenten, welches bei der Kollagenspaltung durch MMP-1, MMP-8 und MMP-13 entsteht. Der C1,2C-ELISA detektiert spezifisch Kollagenfragmente die durch enzymatischen Abbau entstanden sind und bietet somit eine gute Nachweismöglichkeit für die Kollagen Degradation. Der ELISA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Kollagen Typ II-ELISA:

Der Kollagen Typ II-ELISA verwendet zwei monoklonale Kollagen Typ II-Antikörper für den quantitativen Kollagennachweis, von denen einer an die Mikrotiterplatte fixiert ist und der andere als freier biotinylierter Antikörper eingesetzt wird. Untersucht wurden die 6 KH bei einer Konzentration von 10 mg/ml und ein Nährmedienleerwert. Der ELISA wurde entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.3 Proteoglykan-Nachweis

Die Proteoglykane wurden mittels des DMMB-Assays nachgewiesen. Um Verunreinigungen der KH mit Proteoglykanfragmenten, sowie Verfälschungen der Ergebnisse durch Wechselwirkungen von 1,9-Dimethylmethyleneblau mit den KH auszuschließen, wurde der DMMB-Assay wie unter 2.2.10.3 beschrieben mit den 6 KH bei einer Konzentration von 10 mg/ml und einem Nährmedienleerwert durchgeführt und ausgewertet.

2.2.4.4 NO-Nachweis

Um Wechselwirkungen der KH mit der Griess-Reagenzlösung auszuschließen, wurde die Griess-Reaktion wie unter 2.2.10.5 beschrieben mit 6 KH bei einer Konzentration von 10 mg/ml und einem Nährmedienleerwert durchgeführt und ausgewertet.

2.2.5 Hauptversuch 1: Wirkung von RDH, RDH-N und CH-alpha[®] auf die Kollagensynthese von humanen Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien

Für diesen Versuch wurden Knorpelproben mit einem Collins-Score zwischen 1,5 und 3 verwendet. Die Bewertung der osteoarthritischen Veränderung erfolgte makroskopisch mit Hilfe des von Collins beschriebenen makroskopischen Auswertesystems, wobei der Schweregrad eine Bewertung zwischen 0 bis 4 erhält und ein Collins-Score von 4 die völlige Zerstörung des Knorpels bedeutet (siehe Tab. 7 auf Seite 39). Das Knorpelgewebe wurde wie unter 2.2.1 beschrieben präpariert und kultiviert. Untersucht wurden drei KH – RDH, RDH-N und CH-alpha[®] – jeweils unter Verwendung einer Region der lateralen Femurkondyle (Einteilung der Regionen siehe Abb. 5 auf Seite 38). Knorpel der Region 1 wurden mit RDH, Knorpel der Region 2 wurden mit RDH-N und die Knorpelimplantate aus der Region 3 wurden mit CH-alpha[®] behandelt. Die KH wurden in den Konzentrationen 0 (Kontrolle), 0,1, 0,5, 1,0, 2,0 und 10,0 mg/ml den Implantaten zugesetzt. Der Versuch wurde wie unter Punkt 2.2.2.1 durchgeführt. Der Versuch wurde fünfmal wiederholt mit Verwendung von Knorpel, der von 6 verschiedenen Patienten stammte.

2.2.6 Hauptversuch 2: Wirkung von RDH, RDH-N und CH-alpha[®] auf die Kollagensynthese von humanen Knorpelimplantaten aus frühen OA-Stadien

Im Unterschied zu Hauptversuch 1 wurden in diesem Versuch Knorpelproben mit einem Collins-Score zwischen 0 und 1,5 verwendet (siehe Tab. 7 auf Seite 39). Ansonsten wurde der Versuch wie im Hauptversuch 1 unter 2.2.5 beschrieben durchgeführt.

2.2.7 Hauptversuch 3: Wirkung von FGH, FGH-N und Mobiforte[®] auf die Kollagensynthese von humanen Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien

In diesem Hauptversuch wurden Knorpelimplantate mit einem Collins-Score zwischen 1,5 und 3 verwendet (siehe Tab. 7 auf Seite 39). Die Knorpelproben wurde wie bei 2.2.1 beschrieben präpariert und kultiviert. Pro Region wurde die Wirkung

eines KH getestet. Im Unterschied zu Hauptversuch 1 wurden die Knorpel der Region 1 mit FGH, die Knorpel der Region 2 mit Mobiforte[®] und die Knorpel der Region 3 mit FGH-N behandelt. Ansonsten wurde der Versuch wie im Hauptversuch 1 unter 2.2.5 beschrieben durchgeführt.

2.2.8 Hauptversuch 4: Wirkung von RDH, RDH-N und CH-alpha[®] auf degradative Prozesse in humanen Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien

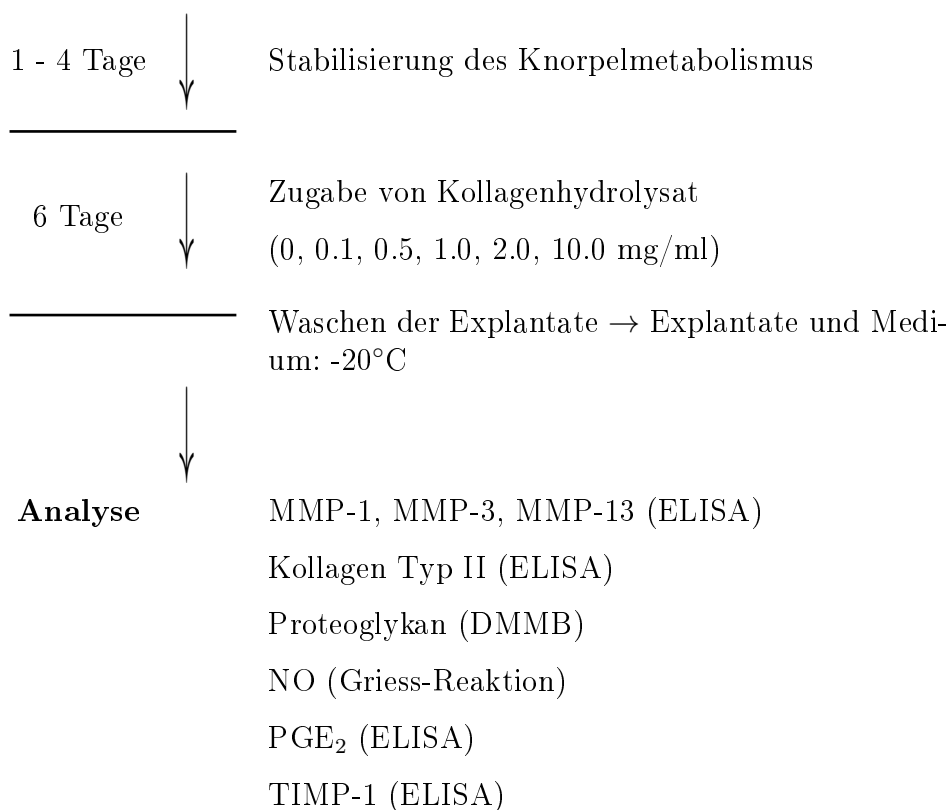


Abb. 8: Versuchsaufbau zum Einfluss von KH auf degradative Prozesse

Die Knorpelimplantate wurden wie unter 2.2.1 beschrieben präpariert und der Metabolismus zunächst in einem Zeitraum von 1 - 4 Tagen stabilisiert. Das Nährmedium wurde gewechselt und zusätzlich in eine Vertiefung 2 ml Nährmedium ohne Explantat und den KH pipettiert, welches als Leerwert bei dem NO_2^- -Nachweis, der sog. Griess-Reaktion, verwendet wurde. RDH wurde zu Knorpelimplantaten der Region 1, RDH-N zu Explantaten der Region 2 und CH-alpha[®] zu Explantaten der Region 3 zugesetzt (Einteilung der Regionen siehe Abb. 5 auf Seite 38). Die KH wurden in den Konzentrationen 0 (Kontrolle), 0.1, 0.5, 1.0, 2.0 und 10.0 mg/ml den Knorpelimplantaten hinzugefügt. Nach 72 Std. wurden die Nährmedien gewechselt und anschließend erneut KH in gleicher Konzentration wie zuvor hinzupipettiert. Die alten Nährmedien wurden mit 0,2 ml Proteaseinhibitorcocktail bei -20°C eingefroren.

Nach weiteren 72 Std. wurde der Versuch beendet. Die Medien der Proben, sowie der Medienleerwert für die Griess-Reaktion, wurden abgehoben, anschließend wurden die Knorpelimplantate mit 0,5 ml Nährmedium gewaschen. Den jeweiligen Nährmedien wurden diese Waschlösungen zusammen mit jeweils 0,2 ml Proteaseinhibitorcocktail hinzugefügt. Nach gründlichem Mischen wurden die Medien bei -20°C eingefroren. Die Knorpelimplantate wurden nach zweimaligem Waschen mit jeweils 1 ml GBSS in 1 ml GBSS inkl. 0,1 ml Proteaseinhibitorcocktail bei -20°C eingefroren. Die Medien wurden aufgetaut und gemäß der Zugehörigkeit zu einem Explantat kombiniert, gründlich gemischt und das Volumen bestimmt. Ein Teil der Medien wurde aliquotiert und zusammen mit dem Restmedium wieder bei -20°C eingefroren.

2.2.9 Hauptversuch 5: Wirkung von FGH, FGH-N und Mobiforte® auf degradative Prozesse in humanen Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien

Im Hauptversuch 5 wurden die Knorpelimplantate der Region 1 im Unterschied zu Hauptversuch 4 mit FGH, die Knorpelimplantate der Region 2 und 3 entweder mit FGH-N oder Mobiforte® behandelt. Ansonsten wurde der Versuch wie unter 2.2.8 beschrieben durchgeführt. Die aliquotierten Medien und die Explantate wurden bis zu ihrer Analyse bei -20°C gelagert.

2.2.10 Analyse der Nährmedien und der Knorpelimplantate

Die Wirkung der KH auf die Kollagensynthese wurde mit den Knorpelimplantaten aus Hauptversuch 1, 2 und 3 bestimmt. Dazu wurde die Menge an radioaktiv markiertem Hydroxyprolin, das intrazellulär durch Oxidation entstanden ist, gemessen. Die Wirkung der KH auf degradative Prozesse wurde mit den Knorpelimplantaten und den Nährmedien aus Hauptversuch 4 und 5 bestimmt. Zum Nachweis von Abbauprozessen und der Kollagenfreisetzung wurden die Medien auf deren Gehalt an MMP-1, MMP-3, MMP-13 und Kollagen Typ II untersucht. Zum Nachweis der Freisetzung von Proteoglykanen wurde dessen Gehalt in den Knorpelimplantaten und den Medien bestimmt und der prozentuale Anteil der in die Medien freigesetzten Proteoglykane berechnet. Als bedeutende Mediatoren im OA-Prozess wurde der Gehalt von NO und PGE₂ im Nährmedium bestimmt. Als bedeutender physiologischer Inhibitors der MMPs wurde der Gehalt an TIMP-1 im Nährmedium bestimmt.

2.2.10.1 Kollagensynthese

Die im Hauptversuch 1, 2 und 3 verwendeten Knorpelimplantate wurden auf ihren Hydroxyprolinegehalt wie unter 2.2.2.2 beschrieben analysiert. Zusätzlich wurden die Medien aus Hauptversuch 1 untersucht. Der photometrisch bestimmte Hy-

droxyprolingehalt wurde in Prozent zur Kontrolle (= 100 %) angegeben. Die im β -Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmte Radioaktivität von ^{14}C -Hydroxyprolin und ^3H -Hydroxyprolin wurde in ein Verhältnis zueinander gesetzt. Die einzelnen Inkorporationsverhältnisse ($^{14}\text{C}/^3\text{H}$) wurden mit dem des unbehandelten Kontrollknorpels (=100 %) verglichen und sind in Prozent angegeben. Die berechneten Mediane wurden graphisch dargestellt.

2.2.10.2 Freisetzung von Kollagen Typ II

Die Freisetzung von Kollagen Typ II wurde durch den Nachweis von Kollagen Typ II in den unverdünnten Nährmedien mit Hilfe eines ELISA gemäß Angaben des Herstellers bestimmt. Der Kollagen Typ II-ELISA wird zu den Sandwich-ELISAs gezählt. Ein monoklonaler Antikörper, welcher spezifisch für Kollagen Typ II ist, bindet an die Oberfläche der 96-well-Mikrotiterplatte. Die Standards und die zu untersuchenden Proben werden in die Vertiefungen pipettiert und das enthaltene Kollagen Typ II an die Antikörper der Platte gebunden. Ungebundenes Material wird herausgewaschen. Anschließend wird ein weiterer Kollagen Typ II-Antikörper, welcher mit Biotin markiert ist, hinzugefügt. An Biotin bindet ein Streptavidin-Peroxidase-Komplex. Streptavidin bildet durch seine hohe Affinität zu Biotin mit diesem eine sehr stabile, selektive Bindung aus. Die Menge der gebundenen Peroxidase – und somit auch die Menge des gebundenen Kollagen Typ II – wird nach erneutem Waschen der 96-well-Mikrotiterplatte durch die Zugabe eines Substrates quantifiziert. Dieses wird durch die Peroxidase in ein farbiges Reaktionsprodukt überführt. Die Reaktion wird mittels Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 450 nm spektralphotometrisch gemessen.

2.2.10.3 Freisetzung von Proteoglykanen

Die in Proteoglykanen enthaltenen sulfatierten Glukosaminoglykane (GAGs), deren Bestandteil wiederum Chondroitinsulfat ist, können in einer spezifischen Reaktion mit 1,9-Dimethylmethylenblau nachgewiesen werden [29]. Der Assay beruht auf einer metachromatischen Verschiebung des Absorptionsmaximums nach der Bindung der sulfatierten GAGs an 1,9-Dimethylmethylenblau. Als Standard dient eine gereinigte Chondroitin-4-sulfat-Lösung.

Vorbereitung

Die aufgetauten Knorpelimplantate wurden dreimal mit 1 ml sterilem 0.5 M Natriumacetatpuffer pH 5.8 gewaschen und anschließend das Nassgewicht bestimmt. Die Knorpelproben wurden daraufhin für 16 Std. bei 60°C mit 0,6 ml papainhaltigem Verdauungspuffer inkubiert. Zusätzlich wurde 0,6 ml Verdauungspuffer, der als Leerwert diente, mit inkubiert. Nach Abkühlen wurde der verdaute Knorpel 10 Min.

bei 11400x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und 1:20 mit Aqua dest. verdünnt.

200 µl der aufgetauten Medien sowie 200 µl Nährmedium, der als Leerwert diente, wurden mit 200 µl papainhaltigem Verdauungspuffer 4 Std. bei 60°C inkubiert. Nach dem Abkühlen wurden die Medien für 10 Min. bei 11400x g und 4°C zentrifugiert und der Überstand für die photometrische Messung verwendet.

Durchführung und Auswertung

25 µl der Proben wurden in triplicate in je eine Vertiefung einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Standardkurve setzte sich aus 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00 und 2.50 µg/ml Chondroitin-4-sulfat-Lösung zusammen. 25 µl dieser Standardlösungen wurden ebenfalls in die Vertiefungen pipettiert. Nach Zugabe von 250 µl 1,9-Dimethylmethylenblau wurde die Extinktion bei 523 nm in dem ELISA-Reader gemessen. Die Standardkonzentrationen wurden gegen die Extinktion aufgetragen. Durch Regressionsanalyse entstand eine Standardkurve. Von den Extinktionen der dreifach bestimmten Proben wurden die Mittelwerte gebildet. Die Eigenextinktion des Verdauungspuffers wurde als Leerwert von den gemittelten Extinktionen der Proben abgezogen. Anhand der Standardkurve konnte die Chondroitinsulfat-Konzentrationen bestimmt werden, welche die Proteoglykankonzentrationen widerspiegelten.

Der Anteil der Proteoglykane, die im gesamten Knorpel vorkamen, errechnete sich aus der Summe der Proteoglykane aus der Knorpel- und der Medienanalyse. Anschließend wurde der prozentuale Anteil der Proteoglykane im Medium vom gesamten Proteoglykan-Gehalt (Explantat + Medium = 100 %) errechnet.

2.2.10.4 Freisetzung von Prostaglandin E₂

PGE₂ wird *in vivo* schnell durch die Prostaglandin-15-Dehydrogenase zu inaktiven Metaboliten abgebaut. Deshalb wurde zur Quantifizierung des PGE₂-Gehaltes ein Assay eingesetzt, der alle PGE₂-Metabolite der Probe (15-keto Prostaglandin E₂, 13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin E₂, 13,14-dihydro-15-keto Prostaglandin A₂) in den stabilen PGE₂-Metabolit Bicycloprostaglandin E₂ überführt, der mittels des Assays nachgewiesen wird. Dieser stabile PGE₂-Metabolit der Probe konkurriert mit einem PGE₂-Acetylcholinesterase-Konjugat um lösliche PGE₂-Antikörper, die den Mikrotiterwells zugesetzt werden. Die Antikörper binden wiederum an Anti-IgG-Antikörper, welche an der Oberfläche der 96-well-Mikrotiterplatte fixiert sind. Nach Waschen und Zugabe eines Substrates, wandelt die Acetylcholinesterase das gebundene Konjugat in ein farbiges Produkt um, welches bei einer Wellenlänge von 412 nm photometrisch gemessen wird. Die Extinktion der Proben sind somit invers proportional zum PGE₂-Gehalt.

Analysiert wurden die Medien, die mit RDH und CH-alpha[®] behandelt wurden. Die Proben wurden 1:2 verdünnt. Die Durchführung erfolgte laut Angaben des Herstellers.

2.2.10.5 Freisetzung von NO

NO ist ein pro-inflammatorischer und destruktiver Mediator im OA-Prozess. Die Halbwertszeit von NO beträgt *in vivo* nur wenige Sekunden, was die methodischen Nachweisbedingungen erschwert. Deshalb wird der Gehalt der etwas stabileren NO-Metabolite – Nitrat und Nitrit – bestimmt und somit indirekt der NO-Gehalt [35, 97]. Die Grundlage der Nachweismethode liefert Griess, der die kolorimetrische Nitritbestimmung bereits 1879 publizierte. Hiernach reagiert Nitrit (NO_2^-) mit Sulfanilsäure zu 4-Diazobenzolsulfonsäure, welches anschließend mit 1-Naphtylamin zu einem violetten Farbstoff kondensiert [36].

Da aus NO probenabhängig unterschiedliche Mengen an Nitrat und Nitrit entstehen können, wird der Gesamtgehalt von Nitrat und Nitrit im Nährmedium bestimmt. Hierzu wurde Nitrat zunächst durch Zugabe einer Nitratreduktase in Nitrit überführt. Dazu wurden zu 100 μl der aufgetauten Medien, welche die Proben und einem Medienleerwert beinhalten, jeweils 10 μl Nitratreduktase hinzupipettiert und für 20 Min. bei 37°C im Thermomixer inkubiert. Anschließend wurden 50 μl der Proben in duplicate, sowie die verschiedenen Standardkonzentrationen in je eine Vertiefung einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Standardkurve setzte sich aus 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 27 und 30 nM/ml NO_2^- -Standard zusammen. Anschließend wurden 50 μl Griess-Reagenzlösung hinzupipettiert und die Proben exakt 5 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Die Extinktion wurde bei 523 nm in dem ELISA-Photometer gemessen. Die Eigenextinktion des Mediums wurde als Leerwert von den Extinktionen der Proben abgezogen. Die Extinktion der doppelt bestimmten Proben wurde gemittelt und anhand der Standardkurve einer Nitritkonzentration zugeordnet.

2.2.10.6 Gehalt an MMPs im Nährmedium

MMPs sind hauptsächlich am Abbau der extrazellulären Matrix des Knorpels beteiligt und liefern somit Informationen über die katabolen Vorgänge im OA-Knorpel. Die Bestimmung des Gehaltes an MMP-1, -3 und -13 im Medium erfolgte mit Hilfe von Enzym-Immuno-Assays gemäß Angaben des Herstellers.

Die Assays werden ebenfalls zu den Sandwich-ELISAs gezählt, bei denen ein MMP-Antikörper an die Platte fixiert ist, an welche die in den Proben vorkommenden MMPs binden. Dort wiederum bindet ein zweiter freier MMP-Antikörper welcher mit Peroxidase markiert ist, welche anschließend das hinzugegebene Substrat in ein farbiges Produkt umwandelt, welches photometrisch bei 450 nm gemessen wird.

	MMP-1-ELISA	MMP-3-ELISA	MMP-13-ELISA
Sensitivität	0,023 ng/ml	2.35 ng/ml	0,032 ng/ml
Kreuzreaktivität	proMMP-1, aktive MMP-1, aktive MMP-1/TIMP-Komplexe	proMMP-3, aktive MMP-3, aktive MMP-3/TIMP-Komplexe	proMMP-13, aktive MMP-13
Proben-Verdünnung	1:20, 1:50, 1:100	1:100, 1:200	unverdünnt, 1:5, 1:10

Tab. 8: MMP-ELISA. Dargestellt ist die Sensitivität und Kreuzreaktivität der eingesetzten ELISA zum Nachweis von MMPs sowie die verwendeten Probenverdünnungen.

2.2.10.7 Gehalt von TIMP-1 im Nährmedium

Die Freisetzung von TIMP-1 in die Nährmedien wurde nur bei den Kontrollknorpel-explantaten und bei Knorpel-explantaten untersucht, die mit 2 und/oder 10 mg/ml KH behandelt wurden. TIMP-1 wurde in den 1:10 verdünnten Zellkulturmedien mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs gemäß Angaben des Herstellers bestimmt. Der Assay arbeitet mit zwei monoklonalen TIMP-1-Antikörpern und entspricht in seinem Aufbau dem Assay der MMP-ELISAs (siehe 2.2.10.6). Detektiert wird freies TIMP-1 sowie TIMP-Komplexe mit MMP-1, -2, -3 oder -9 mit einer Sensitivität von 1,25 ng/ml.

2.3 Statistische Analyse

Die statistische Auswertung der Ergebnisse erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Pabst von dem Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen. Die Darstellung und Auswertung der Daten erfolgte mit den Softwareprogrammen des Instituts sowie mit Microsoft Excel 2003 (Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim), SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA) und GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., San Diego, USA). Insgesamt wurde die Wirkung von 6 KH auf 10 Parameter von Knorpel-explantaten bestimmt, die entweder von Patienten mit osteoarthritischen Gelenken aus frühen oder mittleren OA-Stadien stammten. Der Median, die Mittelwerte und die Standardabweichung für die deskriptive Statistik wurden berechnet. Der Stichprobenumfang betrug jeweils 6 Explantate, die von 4 bis 6 Patienten pro Versuch stammten. Für eine globale Beurteilung, inwiefern die untersuchten KH unterschiedliche Konzentrations-Wirkungs-Beziehungen entfalten, wurde ein Rangtest nach Friedman pro Parameter durchgeführt. Konnte ein Globaleffekt festgestellt werden, wurde zusätzlich pro KH und pro Parameter ein Paarvergleich nach Friedman zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-

Beziehung durchgeführt. Zur Überprüfung inwiefern das OA-Stadium der Explantate zusätzlich die Wirkung der KH beeinflusst, wurde eine dreifaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Veränderungen im Wassergehalt bei frühen und mittleren OA-Stadien wurde mittels ungepaartem t-test untersucht. Als statistisch signifikant wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Überprüfung des β -Flüssigkeitsszintillationszähler

Zum Nachweis der Wirkung von KH auf die Kollagensynthese wurden die Knorpel-explantate zunächst mit ^3H -Prolin und anschließend mit unterschiedlichen Kollagen-hydrolysatkonzentrationen und ^{14}C -Prolin inkubiert. Zur Überprüfung, ob die Iso-tope ^3H und ^{14}C bei dieser Doppelmarkierung von dem β -Flüssigkeitsszintillations-zähler separat erfasst werden, wurde wie unter 2.2.3.1 beschrieben eine Lösung mit 1 mCi/ml ^3H -Prolin, eine mit 112 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ ^{14}C -Prolin und eine Lösung mit beiden Iso-topen derselben radioaktiven Konzentration miteinander verglichen. Bei ^3H -Prolin wurde bei den Doppelmarkierungen durchgehend eine minimal höhere Radioaktivi-tät gemessen. Der Mittelwert der ^3H -Gesamtradioaktivität lag bei der Doppelmar-kierung um 6,5 % höher als bei der Einzelmarkierung. Bei ^{14}C -Prolin wurde nicht bei allen Wiederholungen eine erhöhte Radioaktivität bei der Doppelmarkierung beob-achtet. Der Mittelwert der ^{14}C -Gesamtradioaktivität lag bei der Doppelmarkierung um 0,29 % höher als bei der Einzelmarkierung. (siehe Tab. 9)

3.1.2 Entfernung der nicht-inkorporierten radioaktiven Präcursor wäh-rend der Kultivierung

Um die Inkorporation von ^3H -Prolin auf einen definierten Zeitraum einzugrenzen, wurden die Explantate nach der ^3H -Prolin-Kultivierung mehrmals gewaschen. Die Waschungen verhindern eine weitere ^3H -Prolin-Inkorporation bei Anwesenheit von ^{14}C -Prolin, welches nach den Waschungen zusammen mit den KH hinzupipettiert wurde. Nach weiteren 24 Std. wurden die Knorpel-explantate erneut gewaschen und somit alles überschüssige ^{14}C -Prolin entfernt. Zur Überprüfung wieviele Waschschr-ite nötig sind, um die nicht-inkorporierten Präcursor quantitativ zu entfernen, wur-den die Knorpel-explantate wie unter Punkt 2.2.2.1 beschrieben, insgesamt siebenmal gewaschen und die Radioaktivität in den letzten fünf Waschlösungen bestimmt (sie-he Abb. 9).

Die gemessene Radioaktivität nach Zusatz des Präcursors wurde auf 100 % gesetzt und die Abnahme der Radioaktivität der Waschmedien in Bezug zu dieser Ausgangs-aktivität berechnet. Bereits nach drei Waschschr-itten konnte in der letzten Waschlösung eine Radioaktivität gemessen werden, die unter 0,2 % der Ausgangsaktivität lag. Der geringe Anstieg der Radioaktivität nach dem vierten Waschschr-itt ist auf das Hinausdiffundieren der radioaktiven Präcursors aus der Knorpelmatrix zurückzu-führen. Nach dem fünften Waschschr-itt wurde bei ^3H -Prolin eine Radioaktivität von 4332 dpm/ml gemessen, was 0,058 % der Ausgangsradioaktivität entspricht. Bei ^{14}C -

Probe Nr.	³ H-Radioaktivität [dpm/0,1 ml]		¹⁴ C-Radioaktivität [dpm/0,1 ml]	
	Einzel- markierung	Doppel- markierung	Einzel- markierung	Doppel- markierung
1.1	95.158	98.088	122.891	121.914
1.2	107.521	109.694	126.079	124.983
1.3	123.862	128.548	127.690	127.168
2.1	106.566	110.373	120.060	119.089
2.2	105.586	111.772	119.676	118.429
2.3	108.014	107.843	119.500	120.072
3.1	78.377	89.512	109.006	97.860
3.2	101.088	107.939	121.678	116.322
3.3	85.079	106.989	93.190	116.977
\bar{x}	101.250	107.862 ± 10.523	117.752	118.090 ± 8.391
\bar{x} (%)	100	106,53 ± 10,4	100	100,29 ± 7,1

Tab. 9: Vergleich Einzel- und Doppelmarkierung: Radioaktivität der Lösungen die mit 1 mCi/ml ³H-Prolin oder 112 µCi/ml ¹⁴C-Prolin (= Einzelmartierung) markiert wurden, sowie der Lösung, die gleichzeitig 1 mCi/ml ³H-Prolin und 112 µCi/ml ¹⁴C-Prolin (= Doppelmartierung) enthielt. Die Angabe erfolgt in dpm je 0,1 ml Lösung. Der Mittelwert (= \bar{x}) und die Standardabweichung (± SD) der Doppelmartierung ist prozentual zum Mittelwert der Einzelmartierung (= 100 %) angegeben. (N = 3).

Prolin konnte eine Radioaktivität von 696 dpm/ml gemessen werden, was 0,094 % der Ausgangsradioaktivität entspricht. Nach der 6. Waschung wurde bei ³H-Prolin eine Radioaktivität von 1868 dpm/ml und bei ¹⁴C-Prolin von 251 dpm/ml gemessen. Nach einer weiteren 24 stündigen Inkubation zur Entfernung der in der Knorpelmatrix befindlichen Präcursor wurde das Medium erneut gemessen. Bei dieser siebten Waschung war nur eine geringe Zunahme der Radioaktivität im Medium auf 0,12 % der Ausgangsradioaktivität zu verzeichnen. Dieser letzte Waschschrift zeigt, dass selbst nach einer 24-stündigen Inkubationszeit kaum noch radioaktiver Präcursor im Explantat vorhanden ist. Demnach sind fünf Waschungen ausreichend für die quantitative Entfernung der Präcursor. Daher wurde in den Vor- und Hauptversuchen das Waschprocedere auf mindestens fünf Waschungen begrenzt.

3.1.3 Aufreinigung der Stammlösung der Präcursor mittels der Hydroxyprolin-Nachweismethode

In diesem Vorversuch sollte untersucht werden, ob durch die Aufreinigungsschritte bei der Hydroxyprolin-Nachweismethode die im Medium befindlichen Präcursor

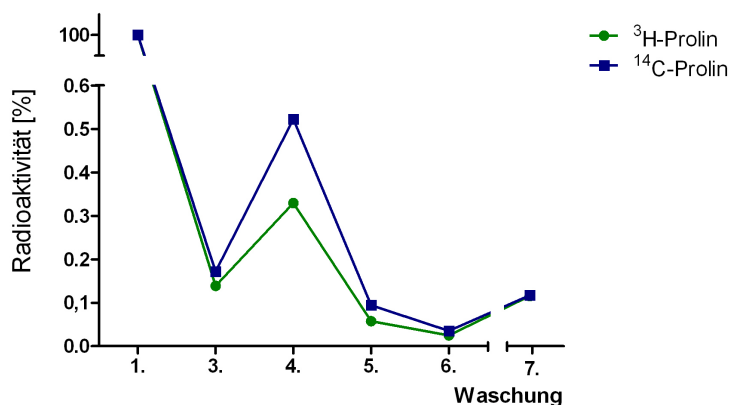


Abb. 9: Waschschritte zur Entfernung des Präcursors. Angegeben ist die prozentuale Abnahme der in den Waschmedien gemessenen Radioaktivität von ³H-Prolin und ¹⁴C-Prolin, wobei die gemessene Radioaktivität nach Zusatz des Präcursors gleich 100 % gesetzt wurde. (N = 3)

komplett aus dem Medium entfernt werden können, so dass ausschließlich neusynthetisiertes radioaktives Hydroxyprolin gemessen wird. Dazu wurden 0,5 ml der Nährmedien analysiert, die nur mit radioaktiven Präcursors (20 μ Ci/ml ³H-Prolin und 10 μ Ci/ml ¹⁴C-Prolin) versetzt waren. Die Radioaktivität der Medien entspricht theoretisch 44 Mio. dpm/ml ³H-Prolin und 22 Mio. dpm/ml ¹⁴C-Prolin. Die Medien wurden wie unter 2.2.3.3 beschrieben analysiert, wobei letztendlich radioaktives Pyrrol, ein Oxidationsprodukt von Hydroxyprolin, in einer Säule eluiert wird. Das von der Säule erhaltene erste Eluat besteht aus 2 ml Probe und 6 ml Toluol und wird „Probe“ genannt. Anschließend wurde die Säule zweimal mit 6 ml Toluol befüllt um das gesamte radioaktive Pyrrol zu eluieren. Diese beiden Eluate werden „1. Waschung“ und „2. Waschung“ genannt. Die Radioaktivität der Eluate wurden im β -Flüssigkeitsszintillationszählers gemessen. Die Ergebnisse sind in Tab. 10 und 11 zusammengefasst. Die Tabellen zeigen die gemessene Radioaktivität der Medien nach der Aufreinigung durch die Hydroxyprolin-Nachweismethode. In dem ersten Säulenuelat („Probe“) wird eine ³H-Radioaktivität von 10.257 ± 2.147 dpm/0,25 ml und eine ¹⁴C-Radioaktivität von 4.336 ± 498 dpm/0,25 ml gemessen. Da das analysierte Medium nur Präcursors enthielt, ist die gemessene Radioaktivität allein durch diese bedingt. Die Tabellen zeigen deutlich, dass in den aufgereinigten Nährmedien noch erhebliche Mengen an radioaktivem Präcursors nachgewiesen werden können. Die Tab. 12 und 13 zeigen die Radioaktivität der Nährmedien und der Knorpel-explantate vor der Aufreinigung mittels der Hydroxyprolin-Nachweismethode, sowie die Absolut- und die Prozentwerte der Radioaktivität nach der Aufreinigung. Die ³H-Prolin-versetzten Nährmedien enthalten vor der Aufreinigung ca. 44 Mio. dpm/ml und die ¹⁴C-Prolin-versetzten Nährmedien enthalten ca. 22 Mio. dpm/ml. Nach Aufreinigung der Medien sinkt die Radioaktivität auf unter 0,0001 % der anfänglichen

³ H-Prolin	Radioaktivität der Probe [dpm/0,25 ml]		
Medium	Probe	1. Waschung	2. Waschung
1	11219	927	1835
	11890	1622	795
2	14247	1127	1856
	13284	1741	1071
3	9198	493	1813
	10143	1184	1209
4	9100	978	1904
	9631	690	1050
5	11020	1635	821
	7851	498	924
6	7422	271	1092
	8074	1087	683

Tab. 10: Gemessene Radioaktivität in mit ³H-Prolin versetzten Medien (0,5 ml) nach Aufreinigung mittels der Hydroxyprolin-Nachweismethode. Die zu vermessenen Proben wurden geteilt, in eine Kieselsäuresäule pipettiert (Probe) und diese anschließend zweimal gewaschen (1. und 2. Waschung). Die Angabe erfolgt in dpm je 0,25 ml Hydrolysat (N = 6).

¹⁴ C	Radioaktivität der Probe [dpm/0,25 ml]		
Medium	Probe	1. Waschung	2. Waschung
1	3573	739	181
	3969	290	637
2	4089	429	606
	4593	431	695
3	4543	372	604
	4417	643	267
4	4536	704	334
	4001	538	329
5	3586	429	372
	4822	509	762
6	5203	658	392
	4699	500	474

Tab. 11: Gemessene Radioaktivität in mit ¹⁴C-Prolin versetzten Medien (0,5 ml) nach Aufreinigung mittels der Hydroxyprolin-Nachweismethode. Die zu vermessenen Proben wurden geteilt, in eine Kieselsäuresäule pipettiert (Probe) und diese anschließend zweimal gewaschen (1. und 2. Waschung). Die Angabe erfolgt in dpm je 0,25 ml Hydrolysat (N = 6).

Radioaktivität. Die Absolutwerte liegen bei ca. 41.000 dpm/ml für mit ^3H -Prolin-versetzte Nährmedien und bei ca. 17.000 dpm/ml für mit ^{14}C -Prolin-versetzte Nährmedien. Die ^3H -Radioaktivität in den Knorpel-explantaten vor der Aufreinigung liegt bei ca. 36.000 dpm/mg Knorpel, die ^{14}C -Radioaktivität liegt bei ca. 19.000 dpm/mg Knorpel und somit in denselben Dimensionen wie die der aufgereinigten Medien. Die Analyse der Nährmedien ist nicht aussagekräftig bezüglich der Freisetzung von radioaktivem Hydroxyprolin, da zusätzlich auch der nicht-inkorporierte Präcursor mitbestimmt wird. Daher wurde auf die Analyse der Nährmedien verzichtet.

Radioaktivität in den Nährmedien			
	im Medium vor Aufreinigung (berechnet) [dpm/ml]	im Medium nach Aufreinigung (N=6) [dpm/ml]	im Medium nach Aufreinigung [%]
^3H	ca. 44 Mio.	41.028 ± 8.588	0,00009
^{14}C	ca. 22 Mio.	17.344 ± 1.992	0,00008

Tab. 12: Aufgeführt ist die Radioaktivität in mit ^3H -Prolin oder ^{14}C -Prolin versetzten Medien vor und nach Aufreinigung mittels der Hydroxyprolin-Nachweismethode.

Radioaktivität in den Knorpel-explantaten			
	im Knorpel-explantat vor Aufreinigung (N=12) [dpm/mg Knorpel]	im Knorpel-explantat nach Aufreinigung (N=12) [dpm/mg Knorpel]	im Knorpel-explantat nach Aufreinigung [%]
^3H	36.384 ± 10.979	797 ± 455	2,25
^{14}C	19.176 ± 4.151	426 ± 343	2,09

Tab. 13: Aufgeführt ist die Radioaktivität der Knorpel-explantate, die mit ^3H -Prolin oder ^{14}C -Prolin inkubiert wurden, vor und nach Aufreinigung mittels der Hydroxyprolin-Nachweismethode.

3.1.4 Trocknung der Explantate mit Aceton

Für die Bestimmung des radioaktiven Hydroxyprolinegehaltes im Knorpel werden die Explantate mit Aceton getrocknet. Zur Überprüfung, wie lange die in Aceton eingelegten Knorpel-explantate im Wärmeschrank bei 30°C getrocknet werden müssen, wurde das Knorpelgewicht wie unter 2.2.3.4 beschrieben nach 15, 30 und 45 Min. bestimmt (siehe Abb. 10).

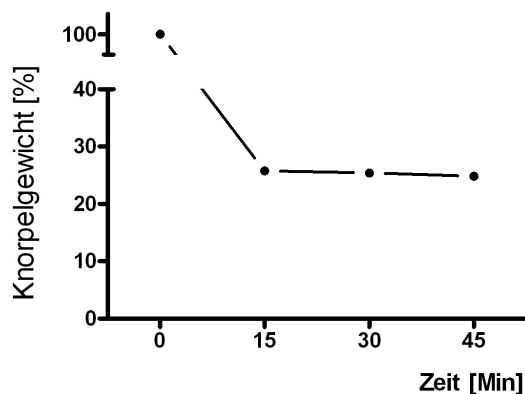


Abb. 10: Trocknung der Explantate mit Aceton. Dargestellt ist die prozentuale Abnahme des Knorpelgewichtes nach 15, 30 und 45 minütiger Trocknung im Wärmeschrank bei 30°C. Das Knorpelnassgewicht entspricht 100 %. (N = 3)

Nach 15 minütiger Trockenzeit im Wärmeschrank bei 30°C verringerte sich im Mittel das Gewicht der Knorpelimplantate auf 25,8 %. Eine Trocknungszeit über insgesamt 45 Min. verringerte das Gewicht auf 24,8 % des Nassgewichtes. Für die weiteren Vor- und Hauptversuche wurde festgelegt, dass die Knorpelimplantate nach der 2x 30 Min. Behandlung mit Aceton im Wärmeschrank für 15 Min. getrocknet werden.

3.1.5 Verdünnung der Knorpelproben

Bei der Bestimmung des Hydroxyprolinegehaltes der HCl-verdauten Knorpelimplantate mit Hilfe der Hydroxyprolin-Nachweismethode wurde das vorhandene Hydroxyprolin in Toluol extrahiert. Da der Hydroxyprolinegehalt im Toluol oberhalb des spektralphotometrischen Messbereiches lag, musste die Probe vor der Messung verdünnt werden. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe der toluolhaltigen Proben vor Zugabe des Ehrlich's Reagenz erstellt und die Proben anschließend bei 560 nm vermessen. Durch die gleichzeitige photometrische Bestimmung einer Standardkurve konnten die Hydroxyprolinkonzentrationen der einzelnen Probenverdünnungen errechnet werden. Sie wurden mit dem jeweiligen Nenner der Verdünnung multipliziert, wodurch der Hydroxyprolinegehalt der unverdünnten Probe berechnet wurde. Diese errechneten Gesamtkonzentrationen wurden gegen die Verdünnungen aufgetragen. Die Kurve ergibt in dem optimalen Verdünnungsbereich idealerweise eine waagrechte Linie, da die errechnete Gesamtkonzentration bei allen Verdünnungsfaktoren theoretisch gleich sein müsste. Da bei einer 1:2 und 1:4 Verdünnung die Konzentrationen oberhalb des Meßbereiches lagen, wurde eine etwas zu niedrige Extinktion gemessen und daher falsch niedrige Gesamthydroxyprolin-Konzentrationen berechnet. In dem Verdünnungsbereich von 1:10 bis 1:80 waren die errechneten Konzentrationen nahezu konstant (siehe Abb. 11). Für die weiteren Vor- und Hauptversuche wur-

de eine Verdünnung von 1:40 für die photometrische Messung festgelegt, da diese in der Mitte des idealen Verdünnungsbereiches lag. Dadurch war es auch möglich, mit der bei der Hydroxyprolin-Nachweismethode gewonnenen 2,5 ml toluolhaltigen Probe (siehe „2.Toluolüberstand“ unter 2.2.2.2) sowohl die spektralphotometrische, bei der 40 μ l des Toluols benötigt werden, als auch die radioaktive Messung, bei der 2 ml des Toluols verwendet werden, durchzuführen.

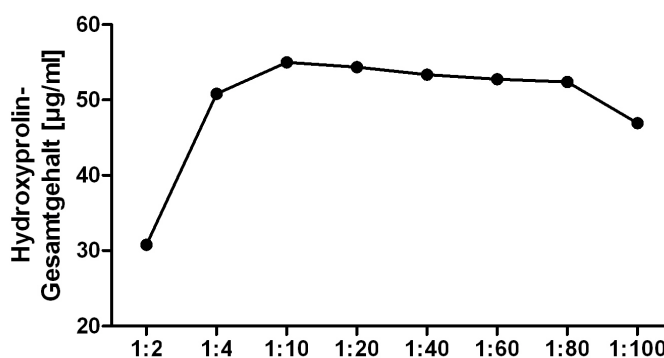


Abb. 11: Der Gesamtgehalt von Hydroxyprolin hier exemplarisch dargestellt von einem Knorpel. Die Gesamthydroxyprolin-Konzentration der verdünnten toluolhaltigen Proben errechnet sich durch Multiplikation mit dem jeweiligen Nenner der auf der x-Achse angegebenen Verdünnung.

3.1.6 Zeitfenster für die photometrische Messung

Während der Hydroxyprolin-Nachweismethode wird Hydroxyprolin spezifisch zu Pyrrol oxidiert, welches mit p-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlich`s Reagenz) zu einem farbigen Kondensationsprodukt reagiert. Zur Überprüfung inwiefern sich die Farbe und die Extinktion dieses Produktes mit der Zeit ändert, wurden 1:40 verdünnte, toluolhaltige Proben wie unter 2.2.3.6 beschrieben nochmals nach 0,5, 1,0, 1,5, 2,0 und 24 Std. photometrisch gemessen. Die zeitliche Veränderung der Extinktion wurde prozentual zur Extinktion der ersten Messung ausgedrückt (siehe Abb. 12). Die Extinktion verändert sich nach längerem Stehen nur minimal. Selbst nach 2 Std. liegt der Wert im Durchschnitt bei 96,4 % der Extinktion von Zeitpunkt $t = 0$. Das Zeitfenster, in dem die Extinktion der Proben nach Messung der Standardkurve bestimmt werden soll, wurde auf 2 Std. festgelegt.

3.1.7 Absorptionsspektrum

Zur Ermittlung des Absorptionsmaximums von Pyrrol wurde von einer Probe mit 60 μ g Hydroxyprolin/ml, die gemäß der Hydroxyprolin-Nachweismethode behandelt wurde, ein Absorptionsspektrum im Bereich von 200 bis 1000 nm, wie unter Punkt 2.2.3.7 beschrieben, erstellt. In der Abb. 13 ist ein Absorptionsmaximum im Bereich

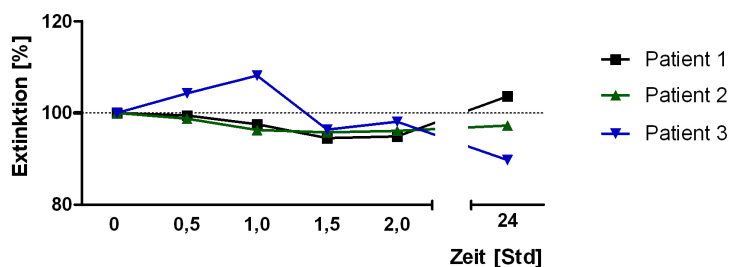


Abb. 12: Zeitliche Veränderung der Extinktion der toluolhaltigen 1:40 verdünnten Knorpelproben. Die Extinktion zum Zeitpunkt $t = 0$ entspricht 100 %. Alle weiteren Messungen wurden in Bezug dazu prozentual angegeben. Die Extinktionswerte der 24-Std-Messung beziehen sich auf die erneut bestimmte Standardkurve ($N = 3$).

zwischen 560 und 570 nm zu entnehmen. Die Wellenlänge von 560 nm wurde von uns als Messwellenlänge festgelegt.

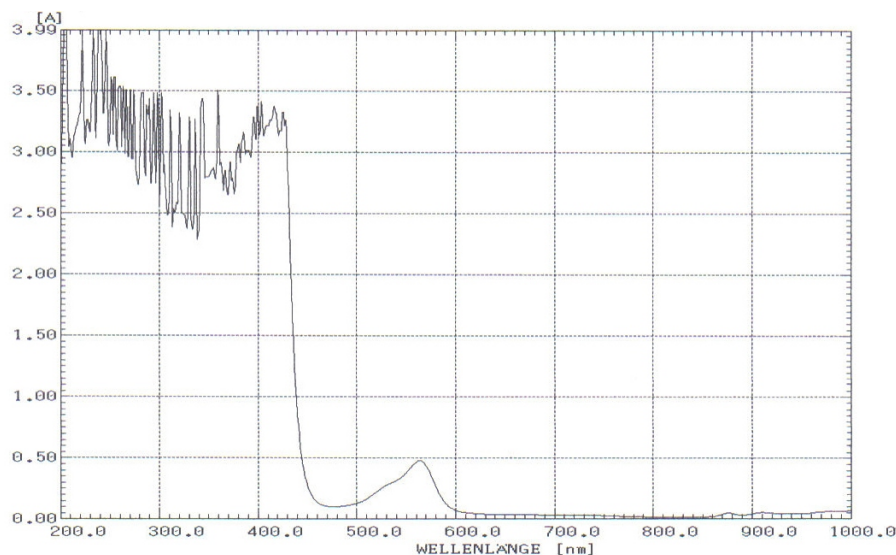


Abb. 13: Das Absorptionsspektrum von Pyrrol, hier exemplarisch dargestellt von einer Messung ($N = 2$).

3.1.8 Radioaktive Markierung

Zur Bestimmung der Kollagensynthese werden die Knorpelimplantate radioaktiv mit ^3H -Prolin und ^{14}C -Prolin markiert und anschließend auf ihren radioaktiven Hydroxyprolinegehalt hin untersucht. In diesem Vorversuch wurde überprüft, inwiefern die von Goodwin et al. [34] verwendete Radioaktivität der Präcursor von $10 \mu\text{Ci}$ ^3H -Prolin und $1 \mu\text{Ci}$ ^{14}C -Prolin für die Markierung humaner Knorpelproben ausreichend ist, damit sich die gemessene Radioaktivität trotz Aufreinigungsverfahren von dem Hintergrundrauschen abgrenzen lässt und zusätzlich hoch genug ist, um überhaupt unterschiedlich hohe Effekte der KH zu detektieren. Hierzu wurden jeweils

drei Knorpelxplantate wie unter Punkt 2.2.3.8 beschrieben zunächst mit ^3H -Prolin und nach Waschung anschließend mit ^{14}C -Prolin kultiviert. Die Knorpelxplantate wurden wie unter 2.2.2.2 beschrieben analysiert und die Radioaktivität der gesamten toluolhaltigen Probe im β -Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt.

^3H -Radioaktivität	Radioaktivität der Probe [dpm/0,1 ml]		
	Patient 1	Patient 2	Patient 3
1	231	885	508
	1247	214	531
2	9	250	72
	368	1	127
3	18	26	30
	27	26	16

Tab. 14: ^3H -Radioaktivität in den Proben nach Aufreinigung mittels Hydroxyprolin-Nachweismethode. Die zwei Radioaktivitäten pro Knorpelxplantat ergaben sich durch Aufteilung der Probe während der Aufreinigung (siehe Abschnitt 2.2.2.2) ($N = 3$).

^{14}C -Hydroxyprolin	Radioaktivität der Probe [dpm/0,1 ml]		
	Patient 1	Patient 2	Patient 3
1	14	14	55
	10	45	91
2	6	19	-3
	-1	7	-1
3	141	183	321
	119	212	336

Tab. 15: ^{14}C -Radioaktivität in der Probe nach Aufreinigung mittels Hydroxyprolin-Nachweismethode. Die zwei Radioaktivitäten pro Knorpelxplantat ergaben sich durch Aufteilung der Probe während der Aufreinigung (siehe Abschnitt 2.2.2.2) ($N = 3$).

Die gemessene Radioaktivität von ^3H -Hydroxyprolin und ^{14}C -Hydroxyprolin ist bei allen Wiederholungen sehr niedrig, wodurch es eine starke Überlagerung mit dem natürlichen Hintergrundrauschen gibt und die Werte nicht interpretiert werden können (siehe Tab. 14 und 15). In dem Doppelmarkierungs-Verfahren, beschrieben von Goodwin et al. [34], wurden die Zellen mit $1\ \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Prolin und $10\ \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Prolin markiert. Goodwin bestimmte anschließend den radioaktiven Prolingehalt im Knorpelxplantat und nicht, wie in dieser Studie, den radioaktiven Hydroxyprolinge-

halt. Auf Grund dessen ist die von uns gemessene Radioaktivität wesentlich geringer als die von Goodwin et al. Deshalb wurde in unseren Hauptversuchen eine doppelt so hohe Radioaktivität an ^3H -Prolin ($20 \mu\text{Ci/ml}$) und eine zehnfach erhöhte Radioaktivität an ^{14}C -Prolin ($10 \mu\text{Ci/ml}$) für die Markierung verwendet, wobei zusätzlich die Inkubationsdauer von 18 auf 24 Std. erhöht wurde.

3.1.9 Aufreinigung von Hydroxyprolin

Die Hydroxyprolin-Nachweismethode, erstmals beschrieben von K. Juva und D.J. Prockop [43] und modifiziert nach B.R. Switzer und G.K. Summer [92], bietet die Möglichkeit, durch aufwendige Aufreinigungsschritte Hydroxyprolin von Prolin und anderen Prolinoxidationsprodukten zu trennen. Zur Überprüfung dieser Aufreinigung, wurde während der Analyse der Knorpelimplantate an mehreren Stellen die Radioaktivität der Proben gemessen. Bestimmt wurde die Radioaktivität der hydrolysierten Knorpelimplantate („Knorpelhydrolysat“, siehe 2.2.2.2), der ersten Toluolschicht („1.Toluolüberstand“, siehe 2.2.2.2) und des Säuleneluates („Probe“, siehe 2.2.2.2). Die Abb. 14 zeigt die Effektivität der Hydroxyprolin-Nachweismethode. Die Radioaktivität des Knorpelhydrolysates wurde 100 % gesetzt. Der 1.Toluolüberstand enthält einen Teil der vorkommenden radioaktiven Prolinverunreinigungen und weitere Prolinoxidationsprodukte. Dieser Toluolüberstand enthält im Durchschnitt $20,9 \pm 5,7\%$ der ursprünglichen ^{14}C -Radioaktivität und $24,8 \pm 7,6\%$ der ursprünglichen ^3H -Radioaktivität. Der 1.Toluolüberstand wird verworfen, so dass ein Teil der Prolinverunreinigungen bei diesem Arbeitsschritt aus der Probe entfernt wird. Durch Auftrennung mittels einer Kieselsäure-Säule ist in den auch „Probe“ genannten Eluaten durchschnittlich nur noch eine ^{14}C -Radioaktivität von $2,1 \pm 1,4\%$ und eine ^3H -Radioaktivität von $2,3 \pm 1,1\%$ nachweisbar. Insgesamt sank durch die Aufreinigungsschritte die Radioaktivität von 100 % im Knorpelhydrolysat um ca. 98 % auf ca. 2 % im Säuleneluat. Die zugehörigen Messdaten befinden sich im tabellarischen Anhang unter Tab 11.1.5 und Tab 11.1.6.

3.1.10 Vorversuche zur Degradation

Die degradative Wirkung von KH wurde anhand von mehreren Parametern bestimmt, welche durch verschiedene ELISAs sowie Assays photometrisch im Medium qualifiziert wurden. Um zu überprüfen, inwiefern die Assays mit den in den Proben vorkommenden KH interagieren, wurde jeweils ein Nährmedium ohne Zusatz sowie Medien mit 10 mg/ml KH (RDH, RDH-N, CH-alpha[®], FGH, FGH-N, Mobiforte[®]) mit den Assays untersucht (siehe 2.2.4). Die Ergebnisse sind in Tab. 16 zusammengestellt. Die MMP-ELISAs detektieren keine KH. Der C1,2C-ELISA detektiert das durch Kollagenasen hervorgerufene Neopepitop C1,2C von Kollagenfragmenten.

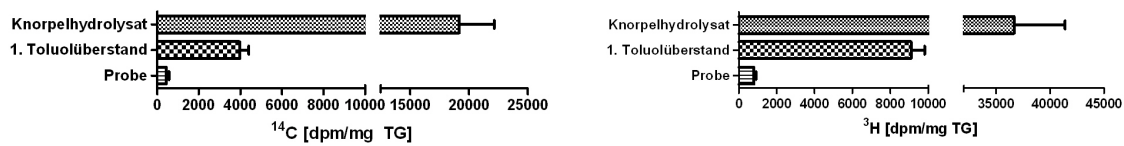


Abb. 14: Aufreinigung der Knorpelproben mit der Hydroxyprolin-Nachweismethode. Dargestellt ist die ^{14}C - und ^3H -Aktivität zu Beginn der Hydroxyprolin-Nachweismethode (= Knorpelhydrolysat), nach dem ersten Aufreinigungsschritt mittels Toluol (= 1.Toluolüberstand) und nach Aufreinigung in der Kieselsäure-Säule (= Probe). Es wurden Knorpelimplantate aus frühen OA-Stadien verwendet, angegeben sind die Mittelwerte und Standardabweichungen ($N = 12$). TG = Knorpeltrockengewicht

Jedoch ist dieser inverse ELISA auch in der Lage, die verwendeten KH nachzuweisen. Deshalb wurde ein weiterer ELISA zum Nachweis von freigesetztem Kollagen untersucht. Dieser Kollagen Typ II-ELISA arbeitet mit einem monoklonalen Antikörper gegen Kollagen Typ II. In dem Assay konnte keine Bindung der KH an diesen Antikörper nachgewiesen werden, weshalb dieser ELISA zur Quantifizierung des Kollagengehaltes in den Medien der Hauptversuche verwendet wurde. Bei der Durchführung des DMMB zum Nachweis von Proteoglykanen konnte keine Wechselwirkung des Assays mit den KH nachgewiesen werden. Auch die Griess-Reaktion zum Nachweis von NO wird durch die KH nicht gestört.

3.2 Hauptversuche

3.2.1 Kollagensynthese

Zur Bestimmung der Kollagensynthese nach Zugabe von RDH, RDH-N und CH-alpha[®] bzw. FGH, FGH-N und Mobiforte[®] zu humanen Knorpelimplantaten wurden die Knorpelproben wie unter 2.2.2.1 kultiviert und die Medien und die getrockneten Knorpel anschließend wie unter 2.2.2.2 beschrieben aufgereinigt. Der Gesamtgehalt von Hydroxyprolin wurde photometrisch gemessen und spiegelt den Gesamtgehalt von Kollagen pro mg Knorpelimplantat wider. Der Gehalt an neusynthetisiertem radioaktivem Hydroxyprolin wurde quantitativ im β -Flüssigkeitsszintillationszähler bestimmt. Die gemessene Radioaktivität von Hydroxyprolin vor (^3H -Prolin) und nach (^{14}C -Prolin) Zugabe der KH wurde in Verhältnis ($\text{dpm } ^{14}\text{C}/\text{dpm } ^3\text{H}$) gesetzt. Die quantitative Entfernung von Präcursorresten in den Knorpelimplantaten durch Waschung ist im tabellarischen Anhang in Tab 11.1.1 - Tab 11.1.4 aufgelistet.

	MMP-1 [ng/ml]	MMP-3 [ng/ml]	MMP-13 [ng/ml]	C1,2C [Abs]	Kollagen Typ II [ng/ml]	Proteo- glykan [μg/ml]	NO [nM/ml]
Medium	< NG	0,579	< NG	1,076	< NG	0,080	< NG
RDH	< NG	0,657	0,001	0,050	< NG	0,088	< NG
RDH-N	< NG	0,579	0,001	0,051	< NG	0,098	< NG
CH-alpha®	< NG	0,500	0,012	0,058	< NG	0,096	< NG
FGH	< NG	0,813	0,007	0,052	< NG	0,080	< NG
FGH-N	< NG	0,422	0,007	0,055	0,110	0,106	< NG
Mobiforte®	< NG	0,579	0,010	0,068	< NG	0,108	< NG

Tab. 16: Überprüfung der Assays auf Wechselwirkung mit den Kollagenhydrolysaten. Untersucht wurden Assays zum Nachweis von MMP-1, MMP-3, MMP-13, Kollagen Typ II, Proteoglykan und NO. Dargestellt ist der Nachweis der KH mit den eingesetzten Assays. < NG = unterhalb der Nachweisgrenze, (N = 1).

3.2.1.1 Analyse der Knorpelimplantate

Bei Knorpel aus frühen und mittleren OA-Stadien wurde die Inkorporation von radioaktivem Prolin in Hydroxyprolin nach Zugabe von RDH, RDH-N und CH-alpha® untersucht. Diese ist in Abhängigkeit von der Konzentration in Abb. 15 dargestellt. Es konnte kein signifikanter Unterschied der Kollagensynthese nach Zugabe von KH zwischen Knorpelimplantaten aus frühen und mittleren OA-Stadien festgestellt werden. Bei der statistischen Berechnung der Konzentrations-Wirkungsbeziehung von KH auf die Kollagensynthese mittels dreifaktorieller Varianzanalyse konnte daher auf die Unterscheidung zwischen frühen und mittleren OA-Stadien verzichtet werden. Somit stieg die Fallzahl bei Behandlung mit RDH, RDH-N und CH-alpha® von 6 auf 12, wodurch die statistische Auswertung an Aussagekraft gewann.

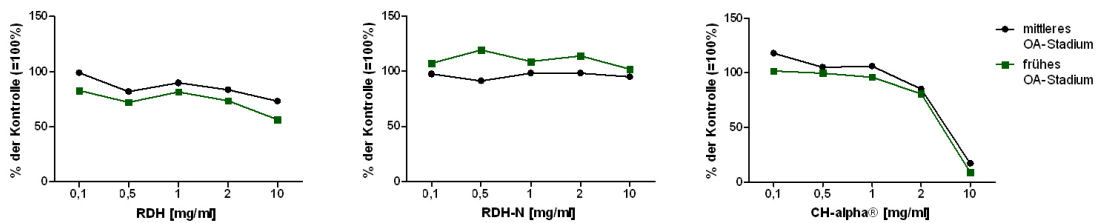


Abb. 15: Radioaktives Hydroxyprolin ($^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Inkorporation) angegeben als Prozent der unbehandelten Kontrolle (= 100 %). Es wurden Knorpelimplantate aus frühen und mittleren OA-Stadien verwendet. Angegeben sind die Mediane, ($N = 6$).

Veränderungen der Kollagensynthese nach KH-Zugabe, angegeben als $^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Verhältnis, ist in Abb. 16 dargestellt. Die Kollagensynthese sank bei einer Konzentration von 10 mg/ml RDH auf 66,1 % im Vergleich zur Kontrolle. Aber auch in geringeren Konzentrationen inhibierte RDH signifikant die Kollagensynthese. Im Gegensatz dazu konnte für RDH-N keine Wirkung bei den untersuchten Konzentrationen nachgewiesen werden. In niedrigen Konzentrationen von CH-alpha[®] wurde eine leichte Synthesesteigerung um bis zu ca. 6 % beobachtet, die jedoch nicht statistisch signifikant war. Eine signifikante Änderung zeigte sich bei Behandlung ab einer Konzentration von 2 mg/ml CH-alpha[®]. Dort reduzierte sich die Kollagensynthese auf 83,6 %, bei 10 mg/ml CH-alpha[®] sogar auf Werte unter 11 %. Für FGH, FGH-N und Mobiforte[®] konnte keine signifikante Wirkung auf die Kollagensynthese nachgewiesen werden. Die Einzelwerte dazu sind in im tabellarischen Anhang in Tab 11.1.7 - Tab 11.1.15 aufgeführt.

Der Gesamthydroxyprolinegehalt der Knorpelimplantate ist in der Abb. 17 dargestellt. Bei allen sechs KH konnte bei keiner Konzentration eine statistisch signifikante Veränderung im Hydroxyprolinegehalt nachgewiesen werden. Die Einzelwerte dazu sind in im tabellarischen Anhang in Tab 11.1.16 - Tab 11.1.18 aufgeführt.

Zu Beginn der Hydroxyprolinbestimmung wurden die Nass- und Trockengewichte der Explantate bestimmt. Anhand dieser Daten war es möglich den Wassergehalt im Knorpel zu berechnen. In Abb. 18 wurde der Wassergehalt der Kontrollknorpel (ohne KH-Behandlung) aus frühen und mittleren OA-Stadien miteinander verglichen. Dabei konnte eine statistisch signifikante Zunahme des Wassergehaltes um 4,1 % ($p = 0,0014$) in Knorpelimplantaten aus fortgeschrittenen Krankheitsstadien im Vergleich zu frühen OA-Stadien beobachtet werden.

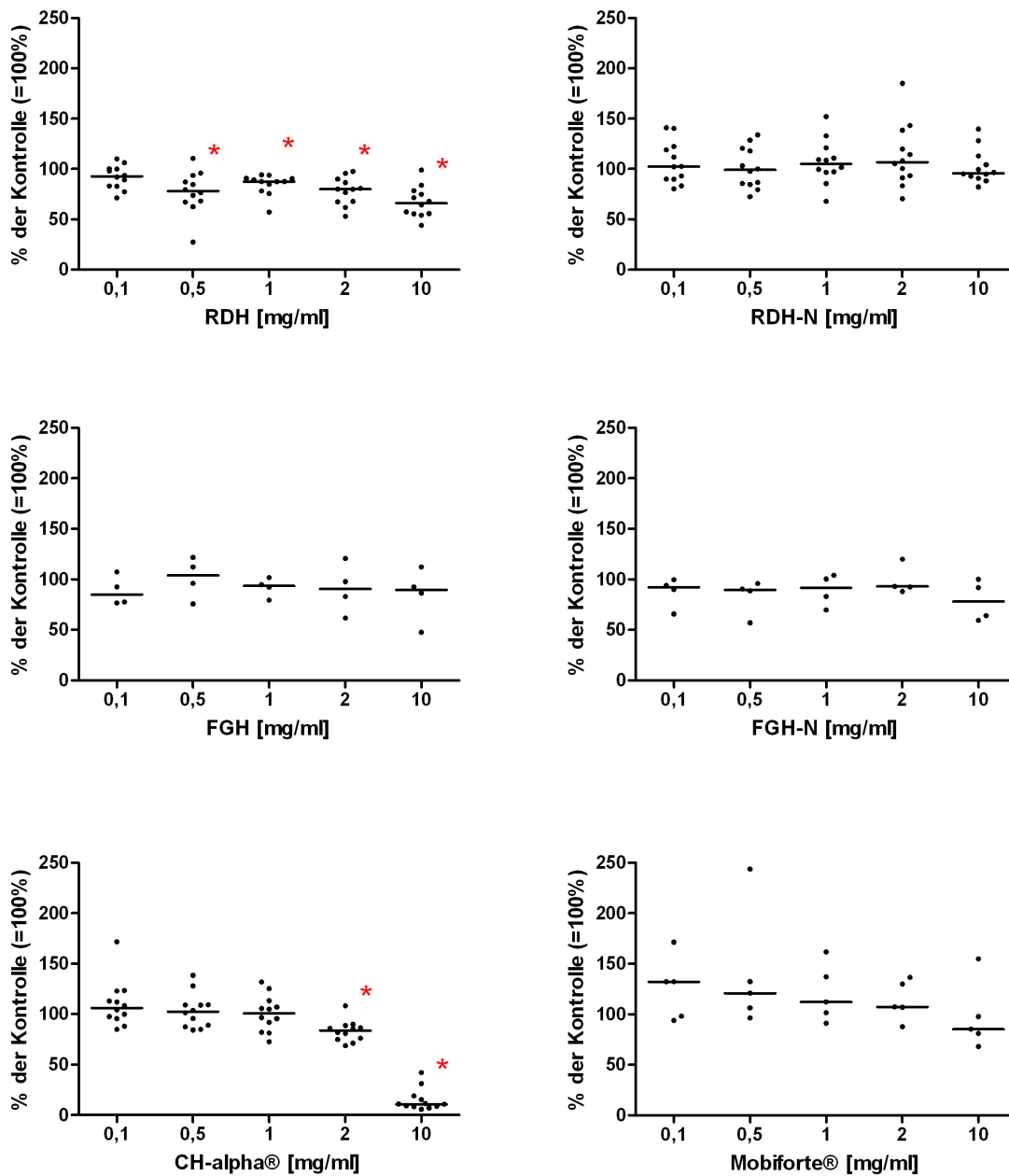


Abb. 16: Radioaktives Hydroxyprolin ($^{14}\text{C}/^3\text{H}$ -Inkorporation) angegeben als Prozent der unbehandelten Kontrolle (= 100 %). Bei RDH, RDH-N und CH-alpha® ist der Gesamt-Median angegeben, welcher sich aus den Einzelwerten der Knorpelimplantate aus frühen und mittleren OA-Stadien berechnet.

* Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle gemäß Paarvergleich nach Friedman mit $p \leq 0,05$. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte ($N = 4 - 12$).

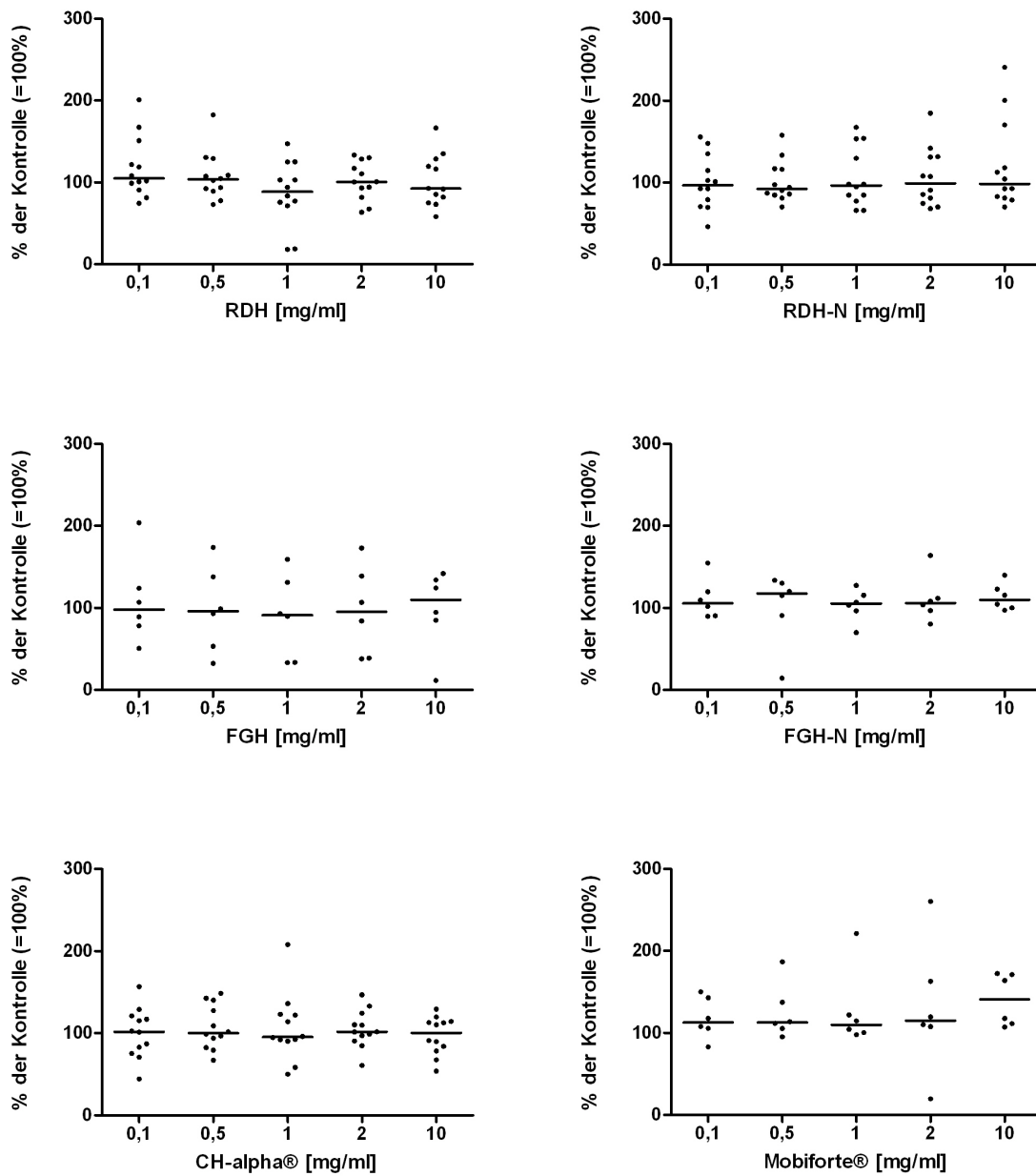


Abb. 17: Photometrisch bestimmter Hydroxyprolingehalt pro mg Knorpeltrockengewicht der Knorpelimplantate angegeben als Prozent der unbehandelten Kontrolle (= 100 %). Bei RDH, RDH-N und CH-alpha[®] ist der Gesamt-Median angegeben, welcher sich aus den Einzelwerten der Knorpelimplantate aus frühen und mittleren OA-Stadien berechnet. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte (N = 6 - 12).

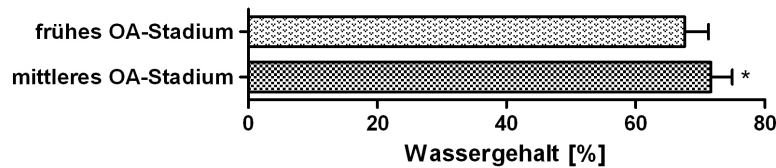


Abb. 18: Wassergehalt von unbehandelten Knorpelimplantaten aus frühen und mittleren OA-Stadien. Angegeben sind Mittelwert und Standardabweichung von 18 Kontrollknorpeln.

* Signifikant unterschiedlich zum frühen OA-Stadium gemäß ungepaartem t-test mit $p \leq 0,05$, ($N = 18$).

3.2.1.2 Analyse der Medien

Neben den Knorpelimplantaten, die mit RDH, RDH-N und CH-alpha[®] behandelt wurden, wurden deren Nährmedien auf ihren Gehalt an Hydroxyprolin untersucht. Die Abb. 19 zeigt den photometrisch bestimmten Gehalt von Hydroxyprolin in den Nährmedien der einzelnen Knorpelimplantate in Abhängigkeit der KH-Konzentration. Der Hydroxyprolingehalt stieg proportional mit der KH-Konzentration an. Dieser stetige Anstieg ist auf den Nachweis der hinzupipettierten KH zurückzuführen. Der Gehalt der vom Knorpel freigesetzten Kollagene konnte somit nicht anhand des Hydroxyprolingehaltes ermittelt werden.

Da die radioaktiven Präcursor im Medium nicht vollständig bei der Durchführung der Hydroxyprolin-Nachweismethode eliminiert werden können, konnten die sezernierten Kollagene auch nicht durch die Bestimmung von radioaktivem Hydroxyprolin erfasst werden (siehe dazu Vorversuch 2.2.3.3).

Daher wurde bei den weiteren Hauptversuchen auf die photometrische und radioaktive Bestimmung vom Hydroxyprolingehalt in den Medien verzichtet.

3.2.2 Freisetzung von Kollagen Typ II

Der Verlust von Kollagen Typ II aus dem Knorpel wurde mit Hilfe eines Assays, der spezifisch Kollagen Typ II mittels eines Antikörpers detektiert, quantifiziert. Die Ergebnisse aus der Bestimmung des Kollagen Typ II Gehaltes sind in Abb. 20 dargestellt. Von allen untersuchten KH verminderte nur FGH in einer Konzentration von 10 mg/ml signifikant die Kollagenfreisetzung um 91 %. Auffällig dabei ist jedoch, dass der Kollagengehalt im Kontrollmedium im Vergleich zu den Kontrollmedien der anderen KH viel höher ist, was eine Signifikanz vortäuschen könnte. Die Einzelwerte dazu sind in im tabellarischen Anhang in Tab 11.2.7 - Tab 11.2.12 aufgeführt.

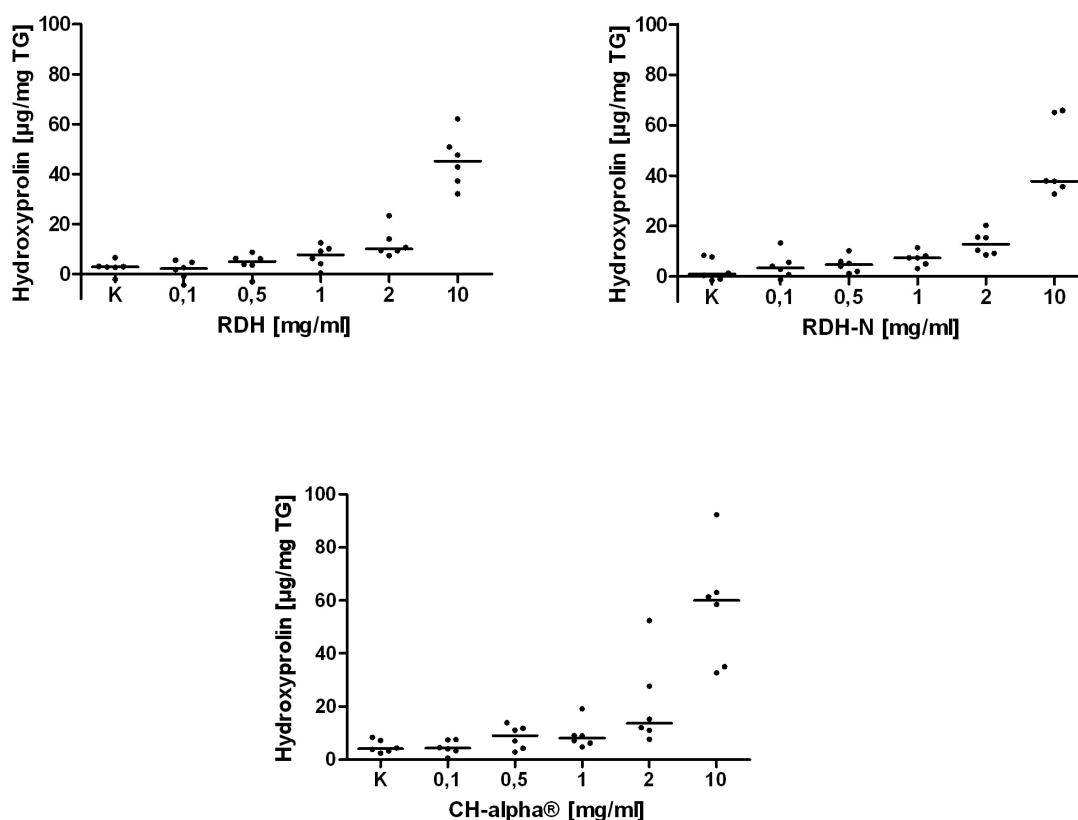


Abb. 19: Photometrisch bestimmter Hydroxyprolinegehalt der einzelnen Nährmedien in Abhängigkeit der KH-Konzentration, angegeben in μg Hydroxyprolin pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Es wurden Knorpelimplantate aus mittleren OA-Stadien verwendet. K = Kontrolle. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte ($N = 6$).

3.2.3 Freisetzung von Proteoglykanen

Die Proteoglykane wurden im Medium mit Hilfe des DMMB-Assays quantifiziert. Der Proteoglykangehalt im Medium ist in Prozent zum Gesamtproteoglykangehalt, welcher sich aus dem Proteoglykangehalt des Nährmediums und des Knorpelimplantates errechnet, angegeben. Unbehandelte Knorpelimplantate geben ca. 15% ihrer Proteoglykane in einem Zeitraum von 6 Tagen an das Medium ab. Die Freisetzung der Proteoglykane ist in Abb. 21 dargestellt. Nur der Zusatz von Mobiforte[®], insbesondere in höheren Konzentrationen, induzierte eine gesteigerte Freisetzung von Proteoglykanen. Ab 1 mg/ml Mobiforte[®] ist der erhöhte Proteoglykangehalt im Nährmedium signifikant. Konzentrationen von 10 mg/ml Mobiforte[®] führten zur Freisetzung von über 50% der ursprünglich im Knorpel vorkommenden Proteoglykane in die Medien. Die Einzelwerte dazu sind in im tabellarischen Anhang in Tab 11.2.1 - Tab 11.2.6 aufgeführt.

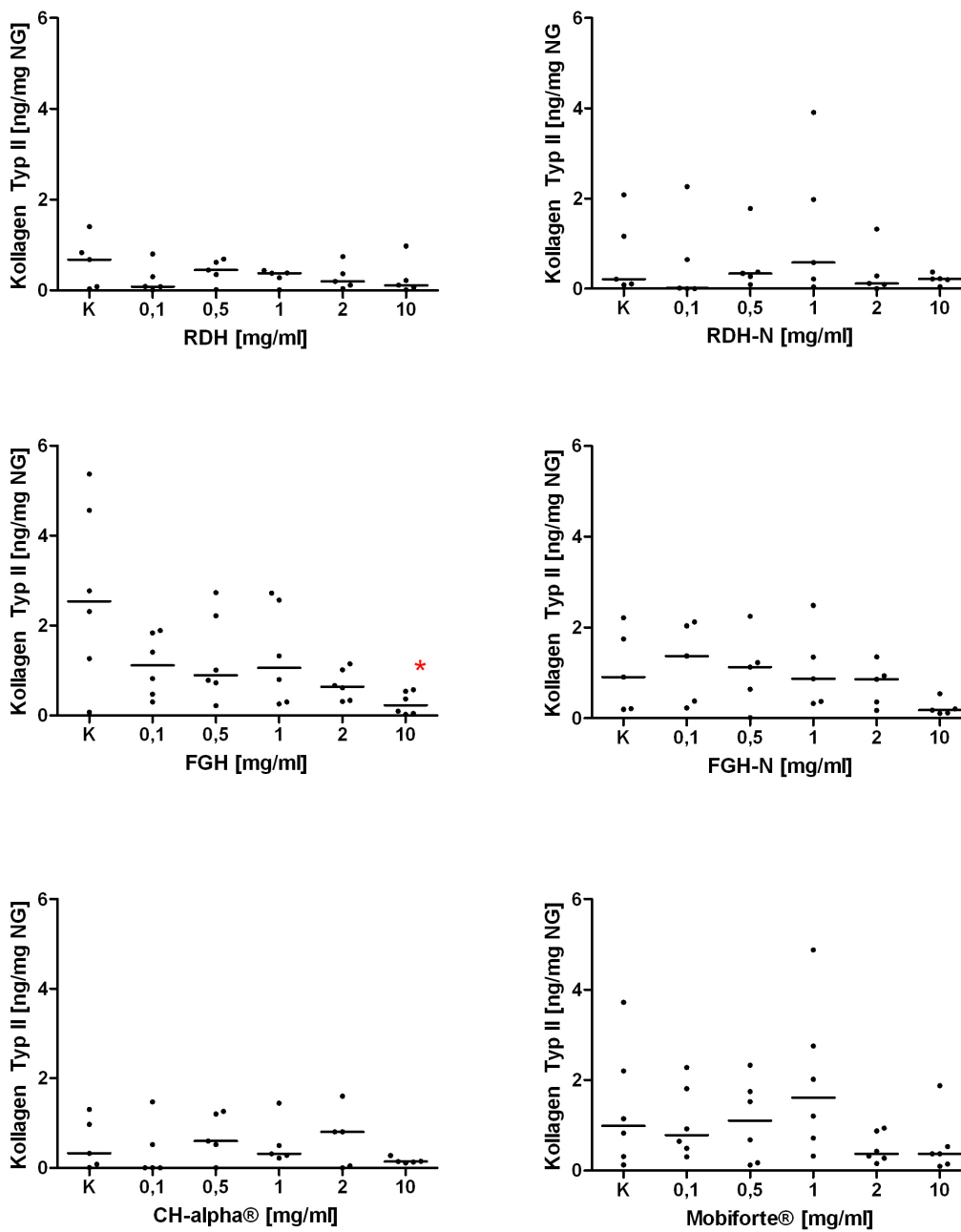


Abb. 20: Gehalt von Kollagen Typ II in den Nährmedien von Knorpelexplantaten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an KH behandelt wurden. Verwendet wurden Knorpelexplantate aus mittleren OA-Stadien. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte. NG = Knorpelnassgewicht, K = Kontrolle.
 * Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle gemäß Paarvergleich nach Friedman mit $p \leq 0,05$ ($N = 5 - 6$).

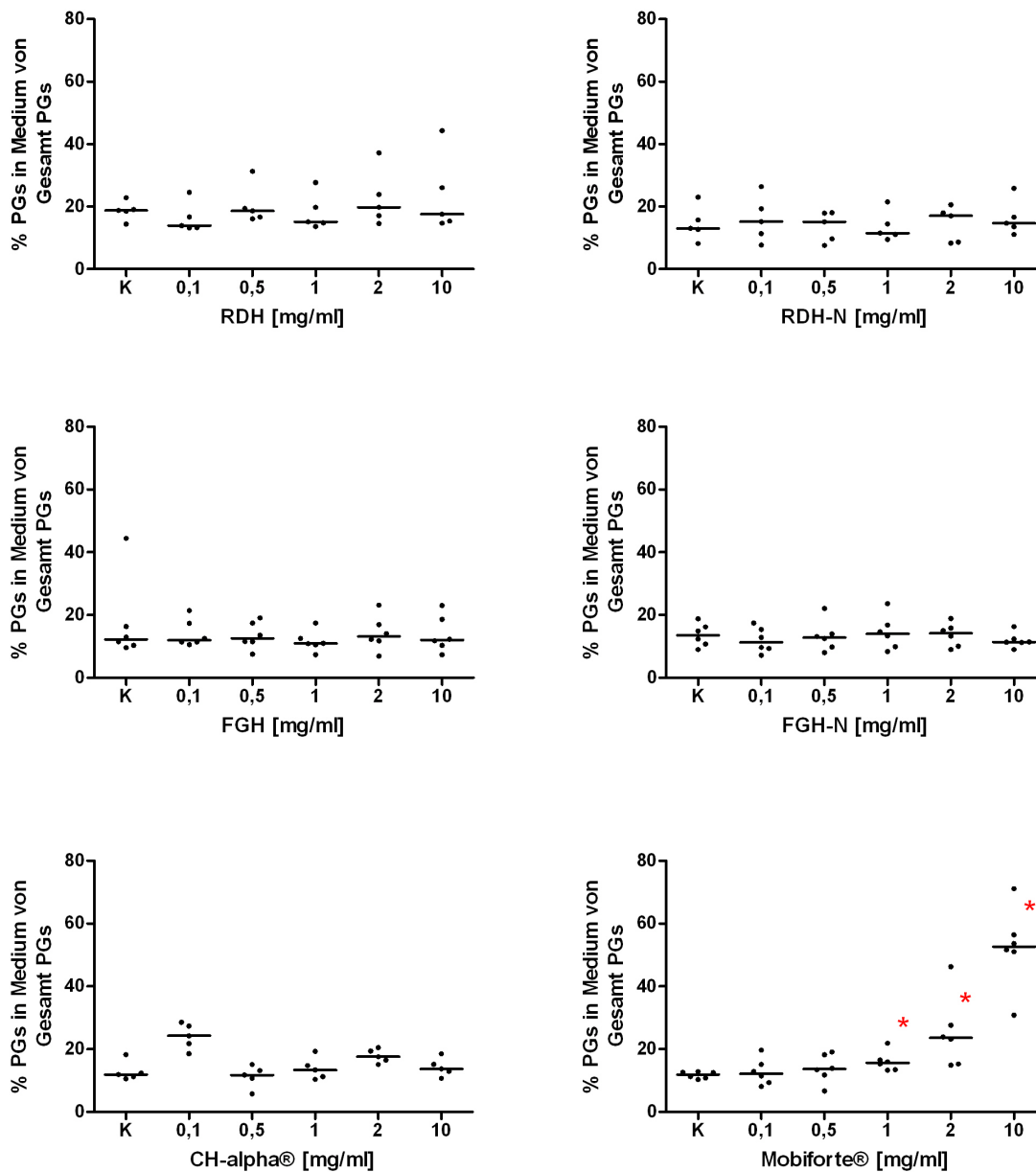


Abb. 21: Prozentualer Anteil der Freisetzung von Proteoglykanen (PG) aus den Knorpel-explantaten in die Nährmedien. Angegeben sind der Gehalt der Proteoglykane in den Nährmedien als Prozent vom Gesamt-Proteoglykangehalt (Explantat + Medium = 100 %). Verwendet wurden Knorpel-explantate aus mittleren OA-Stadien. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte. NG = Knorpel-nassgewicht, K = Kontrolle.

* Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle gemäß Paarvergleich nach Friedman mit $p \leq 0,05$ ($N = 5 - 6$).

3.2.4 Freisetzung von Prostaglandin E₂

Die Freisetzung von PGE₂ in die Nährmedien wurde nur bei Knorpel-explantaten untersucht, die mit RDH und CH-alpha® behandelt wurden. Sie ist in Abhängigkeit

von den KH-Konzentrationen in Abb. 22 dargestellt. Knorpel ohne KH-Behandlung setzten 0 - 6,4 pg PGE₂ pro mg Knorpelnassgewicht frei. RDH zeigte eine konzentrationsabhängige Erhöhung des PGE₂-Gehaltes, die bereits ab 1 mg/ml signifikant wurde. RDH steigerte die Freisetzung in einer Konzentration von 10 mg/ml auf durchschnittlich 132,5 pg/mg Knorpelnassgewicht, während unter dem Einfluss von CH-alpha® in derselben Konzentration die Freisetzung nur auf durchschnittlich 27,4 pg/mg stieg. Niedrigere Konzentrationen von CH-alpha® bewirkten keine Änderung der PGE₂-Freisetzung. Die entsprechenden Einzelwerte sind im tabellarischen Anhang in Tab 11.2.7 und Tab 11.2.9 aufgeführt.

Da die Standardwerte eine sigmoidale Kurve ergaben, sollten zur exakten Bestimmung der PGE₂-Konzentrationen die Extinktion der Proben in dem linearen Abschnitt zwischen 20 % und 80 % der Standardwerte liegen. Liegen die Werte < 20 % oder > 80 % sind die errechneten Konzentrationen nach Angabe des Herstellers ungenau. Obwohl im Versuch die Verdünnung mehrmals geändert wurde, konnte keine ideale Verdünnung bestimmt werden, so dass viele der Werte im Bereich < 20 % und > 80 % lagen. Werte die größer sind als 130 pg/mg Knorpelnassgewicht und kleiner als 17 pg/mg Knorpelnassgewicht sind ungenau und sollten mit entsprechender Vorsicht beurteilt werden. Dies betrifft bei RDH alle Werte der Kontrolle und Werte bei 0,1 mg/ml sowie einen Teil der Werte von 0,5, 2 und 10 mg/ml. Bei CH-alpha® betrifft dies alle Werte der Kontrolle, 0,1, 0,5 und 2 mg/ml sowie einen Teil der Werte von 1 mg/ml.

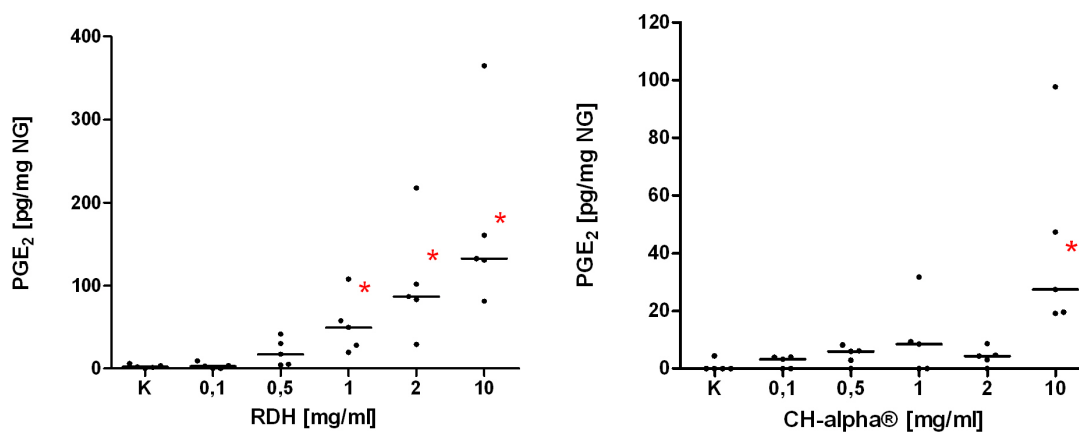


Abb. 22: Gehalt von PGE₂ in den Nährmedien von Knorpel explantaten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an RDH und CH-alpha® behandelt wurden. Verwendet wurden Knorpel explantate aus mittleren OA-Stadien. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte. NG = Knorpelnassgewicht, K = Kontrolle. * Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle gemäß Paarvergleich nach Friedman mit $p \leq 0,05$ ($N = 5$).

3.2.5 Freisetzung von NO

Der Gehalt von NO wird durch den Nachweis seiner Abbauprodukte Nitrit und Nitrat bestimmt. Die Freisetzung von NO ist in Abb. 23 dargestellt. Unbehandelte Knorpelimplantate geben ca. 0,5 nM NO/mg Knorpelnassgewicht an die Nährmedien ab. Die Behandlung mit RDH und Mobiforte[®] verursachte eine konzentrationsabhängige Steigerung der Freisetzung von NO. Unter RDH wird die erhöhte NO-Freisetzung bereits bei 0,5 mg/ml signifikant. Insgesamt bewirkt RDH aber nur einen geringen Anstieg der NO-Freisetzung in die Nährmedien. Unter Behandlung mit Mobiforte[®] zeigte sich insbesondere bei höheren Konzentrationen eine stark erhöhte Freisetzung von NO. Bei Zusatz von 10 mg/ml Mobiforte[®] fand sich ein um das 8,7-fach erhöhter NO-Gehalt. FGH-N zeigte nur bei 10 mg/ml eine signifikant erhöhte Freisetzung von NO. RDH-N, CH-alpha[®] und FGH haben keine Wirkung auf die NO-Freisetzung. Die entsprechenden Einzelwerte sind im tabellarischen Anhang in Tab 11.2.1 - Tab 11.2.6 aufgeführt.

3.2.6 Gehalt an MMPs in den Nährmedien

Die Nährmedien der mit KH behandelten Knorpelimplantate wurden auf deren Gehalt an MMP-1, MMP-3 und MMP-13 untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 24, Abb. 25 und Abb. 26 dargestellt. Es zeigte sich, dass KH mit einem größeren Molekulargewicht, wie RDH, FGH und Mobiforte[®], eine höhere Freisetzung von MMPs bewirkten als kleinere KH. Besonders bei der Behandlung mit RDH konnte eine starke Steigerung der MMP-Freisetzung beobachtet werden. KH mit geringerem Molekulargewicht wie RDH-N und FGH-N zeigten nur bei einer Konzentration von 10 mg/ml einen erhöhten MMP-Gehalt, welcher meist jedoch statistisch nicht signifikant war. CH-alpha[®] hatte keine Wirkung auf die Freisetzung von MMPs. Die entsprechenden Einzelwerte sind im tabellarischen Anhang in Tab 11.2.7 - Tab 11.2.12 aufgeführt.

MMP-1-Gehalt:

Der MMP-1-Gehalt im Medium ist in Abb. 24 dargestellt. Er stieg bei der Behandlung mit RDH stark an. Bereits ab einer Konzentration von 0,5 mg/ml wurde der Effekt signifikant. Bei der Behandlung mit 0,5 - 10 mg/ml RDH erhöhte sich der MMP-1-Gehalt jeweils auf das ca. 40-fache. Die Wirkung von RDH-N hingegen war gering. Nur bei Behandlung mit 10 mg/ml RDH-N konnte ein statistisch signifikant erhöhter MMP-1-Gehalt festgestellt werden. CH-alpha[®] zeigte keine Wirkung auf die MMP-1-Freisetzung. FGH steigerte die MMP-1-Freisetzung konzentrationsabhängig. Ab einer Konzentration von 1 mg/ml wurde dies statistisch signifikant. FGH-N bewirkte eine leichte Steigerung der Freisetzung in höheren Konzentrationen.

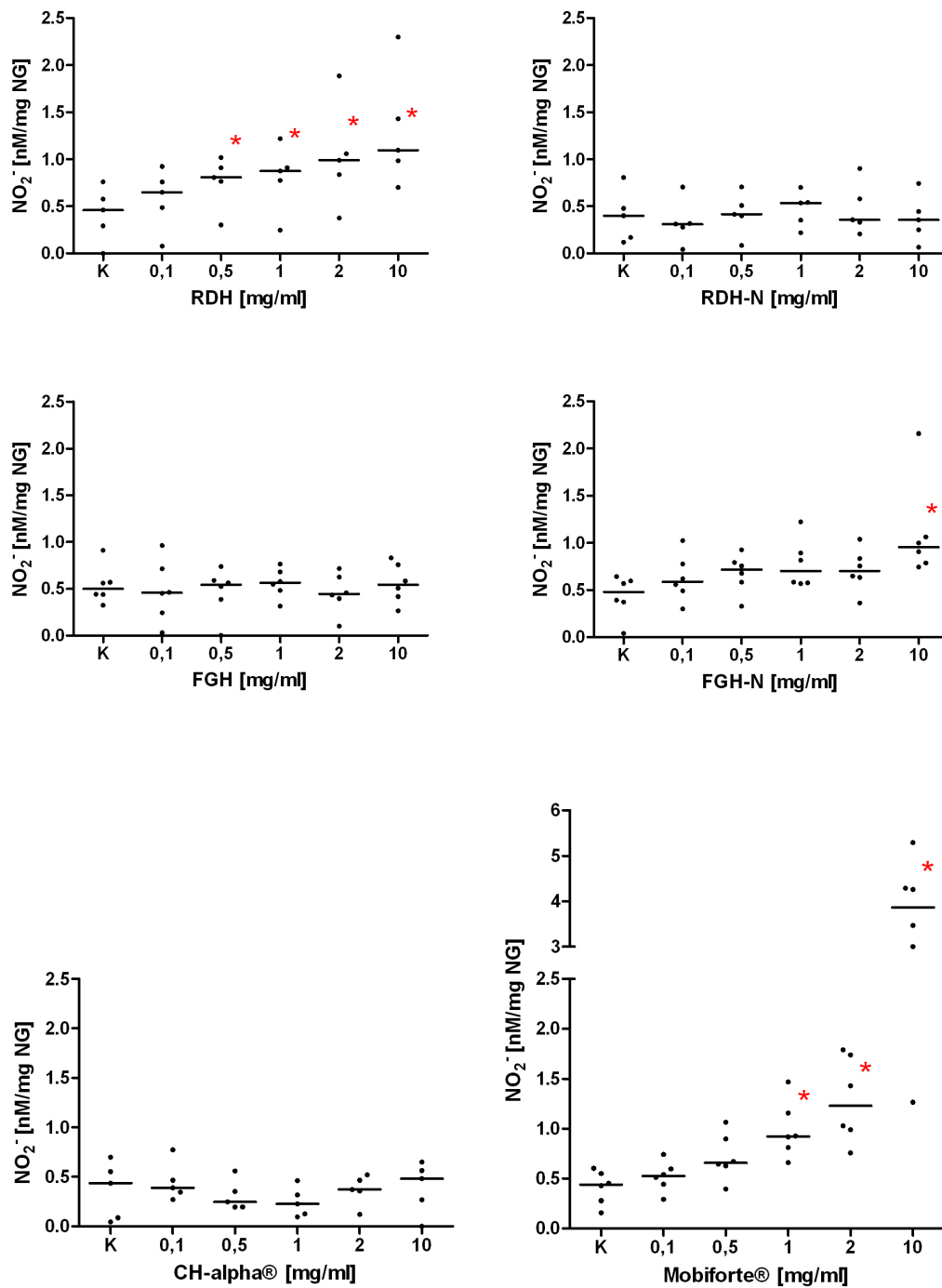


Abb. 23: Gehalt von NO , gemessen als NO_2^- , in den Nährmedien von Knorpel-explantaten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an KH behandelt wurden. Verwendet wurden Knorpel-explantate aus mittleren OA-Stadien. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte. NG = Knorpelnassgewicht, K = Kontrolle.

* Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle gemäß Paarvergleich nach Friedman mit $p \leq 0,05$ ($N = 5 - 6$).

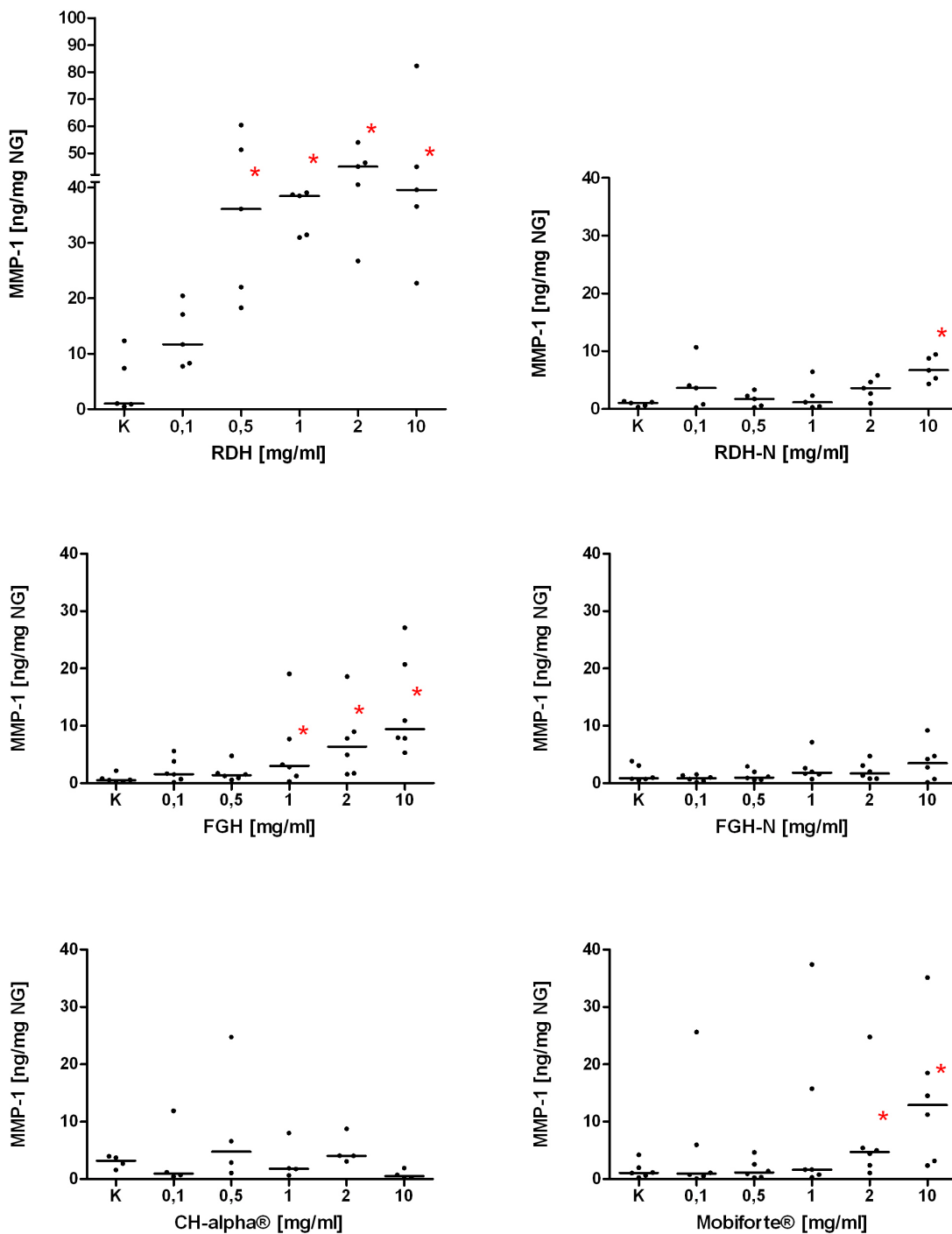


Abb. 24: Gehalt von MMP-1 in den Nährmedien von Knorpel explantaten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an KH behandelt wurden. Verwendet wurden Knorpel explantate aus mittleren OA-Stadien. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte. NG = Knorpelnassgewicht, K = Kontrolle.

* Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle gemäß Paarvergleich nach Friedman mit $p \leq 0,05$ ($N = 5 - 6$).

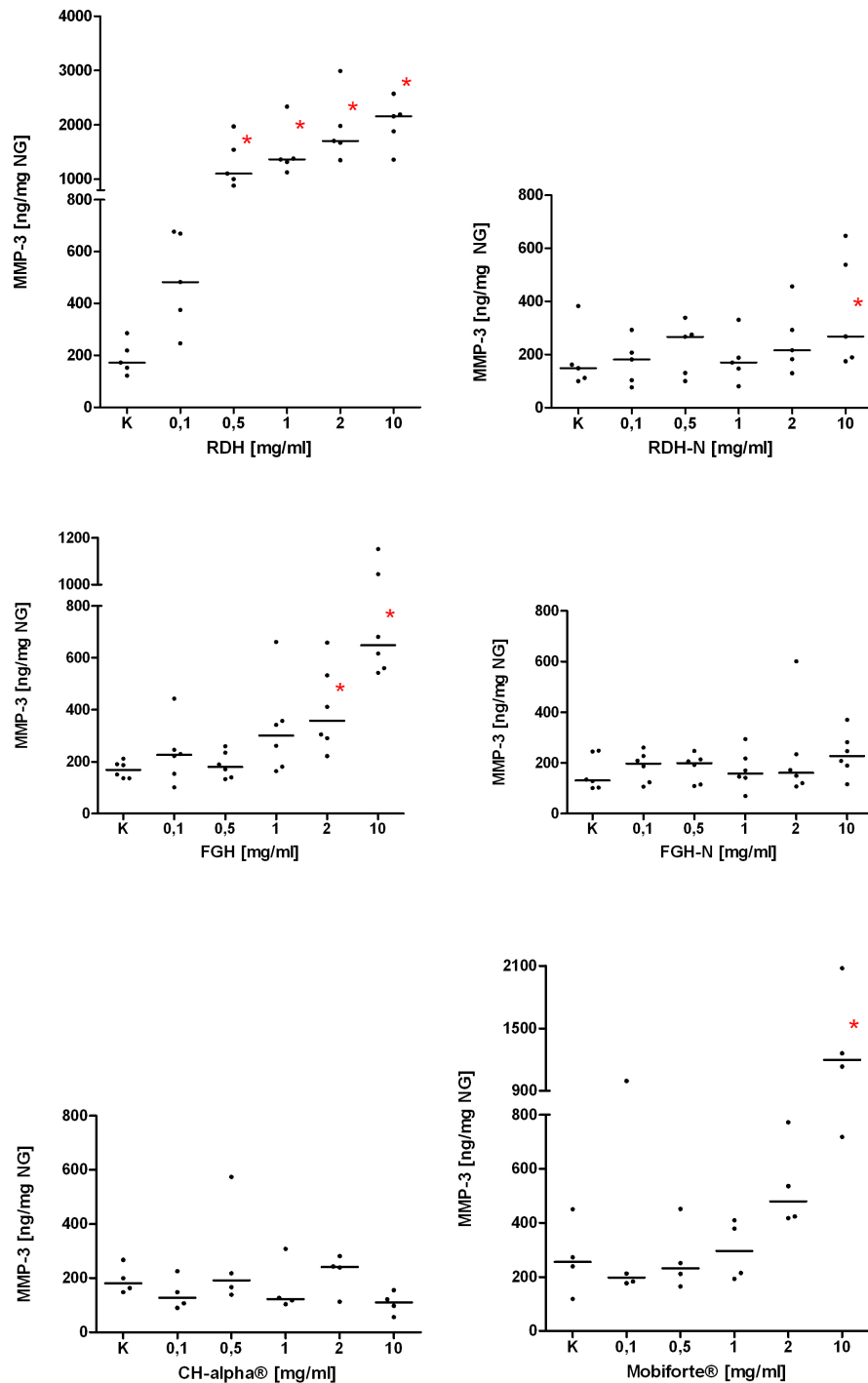


Abb. 25: Gehalt von MMP-3 in den Nährmedien von Knorpelimplantaten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an KH behandelt wurden. Verwendet wurden Knorpelimplantate aus mittleren OA-Stadien. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte. NG = Knorpelnassgewicht, K = Kontrolle.

* Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle gemäß Paarvergleich nach Friedman mit $p \leq 0,05$ ($N = 5 - 6$).

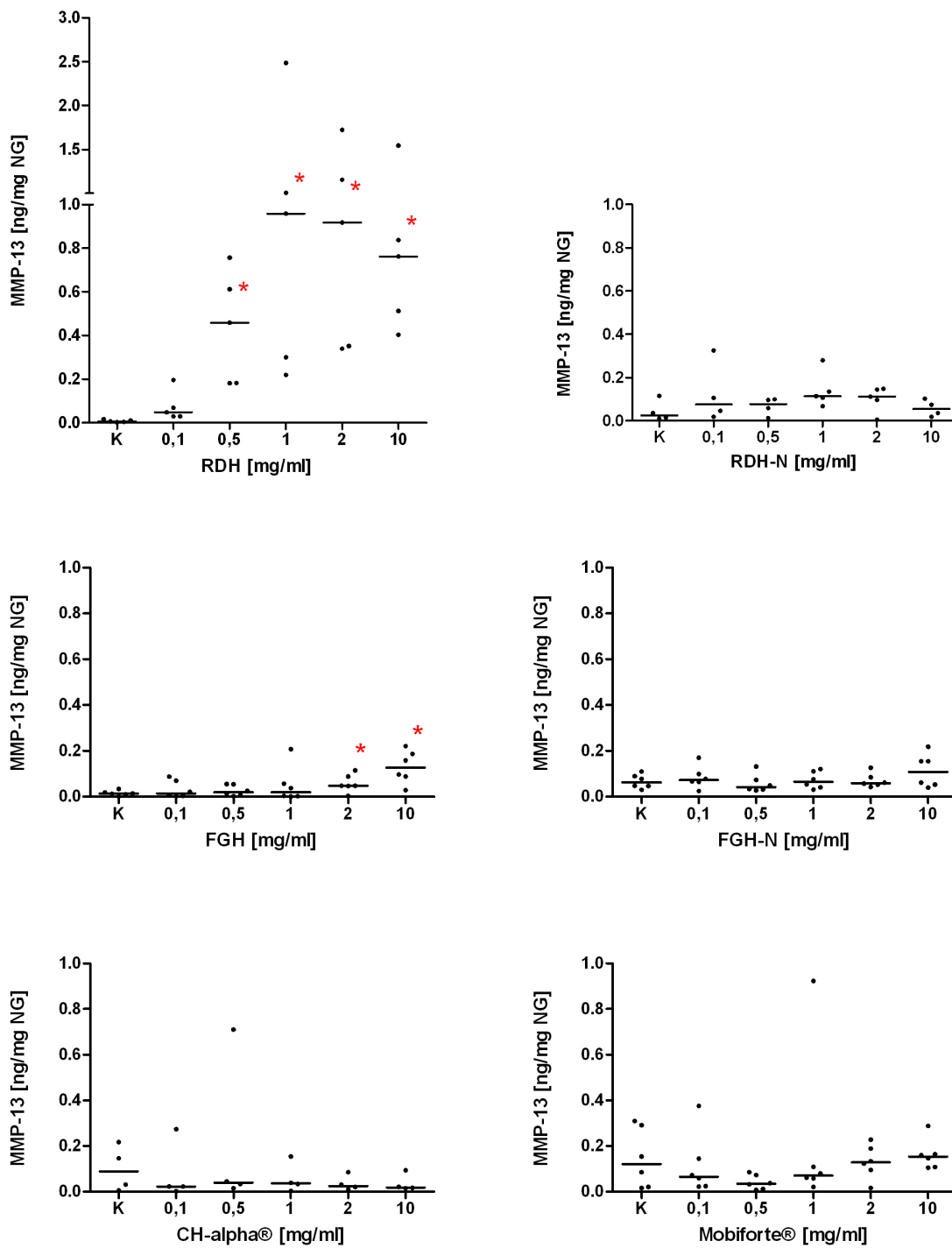


Abb. 26: Gehalt von MMP-13 in den Nährmedien von Knorpelimplantaten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an KH behandelt wurden. Verwendet wurden Knorpelimplantate aus mittleren OA-Stadien. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte. NG = Knorpelnassgewicht, K = Kontrolle.

* Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle gemäß Paarvergleich nach Friedman mit $p \leq 0,05$ ($N = 5 - 6$).

nen, dies konnte statistisch jedoch nicht bestätigt werden. Mobiforte[®] induzierte in hohen Konzentrationen eine signifikant vermehrte MMP-1-Freisetzung.

MMP-3-Gehalt:

Wie in Abb. 25 sichtbar, war der MMP-3-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle in Anwesenheit von RDH konzentrationsabhängig bis zum 12fachen Wert erhöht. Eine signifikante Wirkung zeigte sich bereits bei einer Konzentration von 0,5 mg/ml RDH. Ab einer Behandlung mit 2 mg/ml FGH konnte ebenfalls ein signifikant erhöhter MMP-3-Gehalt gemessen werden. Mobiforte[®] steigerte die Freisetzung von MMP-3 signifikant bei einer Konzentration von 10 mg/ml auf das 5fache. RDH-N, CH-alpha[®] und FGH-N zeigten keine Wirkung auf den MMP-3-Gehalt in den Nährmedien.

MMP-13-Gehalt:

Wie Abb. 26 zeigt, konnte nur für RDH und FGH eine signifikante Wirkung auf den MMP-13-Gehalt ermittelt werden. Bereits bei niedrigen Konzentrationen von RDH war der MMP-13-Gehalt erhöht. Ab einer Konzentration von 1 mg/ml RDH erreichte die Wirkung ein Plateau. Insgesamt lag der MMP-13-Gehalt in den Nährmedien der mit 10 mg/ml RDH behandelten Knorpelimplantate 125fach höher als in den Medien der unbehandelten Kontrollimplantate. FGH war geringer wirksam, jedoch stieg auch dort der MMP-13-Gehalt um das 10fache bei Behandlung mit 10 mg/ml FGH an. Die Behandlung mit RDH-N, CH-alpha[®], FGH-N und Mobiforte[®] induzierte keine erhöhte Freisetzung von MMP-13 aus den Implantaten in die Nährmedien.

3.2.7 Gehalt von TIMP-1 in den Nährmedien

Die Freisetzung von TIMP-1 in die Nährmedien wurde nur bei den Kontrollknorpelimplantaten und bei Knorpelimplantaten untersucht, die mit 2 und/oder 10 mg/ml KH behandelt wurden. Sie ist in Abhängigkeit zur KH-Konzentration in Abb. 27 dargestellt. CH-alpha[®] reduzierte bei einer Konzentration von 10 mg/ml den TIMP-1-Gehalt auf durchschnittlich 3,3 ng/mg Knorpelnassgewicht, wohingegen bei der Kontrolle 18,3 ng/mg Knorpelnassgewicht gemessen wurden.

Eine Wirkung von CH-alpha[®] auf den TIMP-1-Gehalt in niedrigeren Konzentrationen wurde nicht untersucht. RDH, RDH-N, FGH, FGH-N und Mobiforte[®] entfalten keine Wirkung auf die TIMP-1-Freisetzung aus den Implantaten in die Nährmedien bei den untersuchten Konzentrationen von 0, 2 und 10 mg/ml KH. Die entsprechenden Einzelwerte sind im tabellarischen Anhang in Tab 11.2.13 aufgeführt.

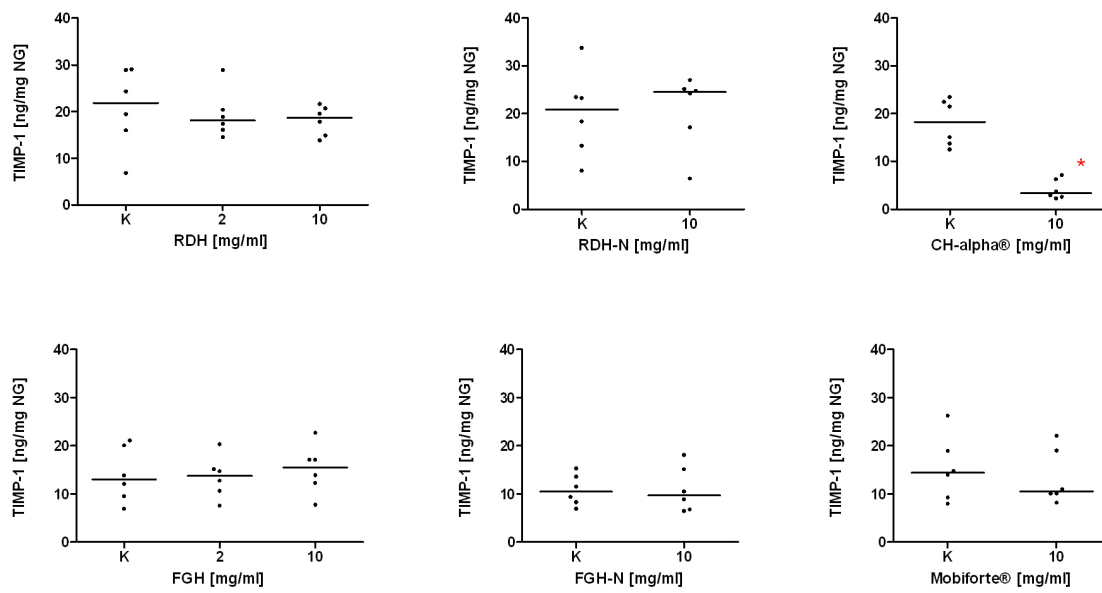


Abb. 27: Gehalt von TIMP-1 in den Nährmedien von Knorpelimplantaten, die mit unterschiedlichen Konzentrationen an KH behandelt wurden. Es wurden Knorpelimplantate aus mittleren OA-Stadien verwendet. NG = Knorpelnassgewicht, K = Kontrolle. Angegeben sind die Mediane und die Einzelwerte. * Signifikant unterschiedlich zur unbehandelten Kontrolle gemäß Paarvergleich nach Friedman mit $p \leq 0,05$ ($N = 6$).

4 Diskussion

Die OA ist eine progressive Gelenkerkrankung, die sich durch Veränderungen im Gelenkknorpel, der Synovialmembran und im subchondralen Knochen auszeichnet. Im Gelenkknorpel ist vor allem die Zerstörung der extrazellulären Matrix charakteristisch, wobei der Verlust von Kollagen Typ II und Proteoglykanen im Vordergrund steht. In gesundem Knorpel sind die Chondrozyten in der Lage, die sensible Homöostase zwischen Synthese und Degradation aufrechtzuerhalten. In osteoarthritischem Knorpel findet eine Verschiebung zugunsten degradativer Prozesse statt. Ursache hierfür ist eine durch katabole Zytokine induzierte vermehrte Expression und Aktivität der am Abbau beteiligten Enzyme wie MMPs und ADAMTS. Stimuliert wird die Bildung vieler dieser Enzyme durch auto- und parakrine Zytokine, wie z.B. IL-1 oder TNF- α .

Therapeutische Stoffe, die modifizierend auf den Krankheitsverlauf einwirken, sind ein zentrales Anliegen der derzeitigen OA-Forschung. In diesem Zusammenhang ist das Interesse für Nahrungsergänzungsmittel als eine alternative oder additive Behandlungsmöglichkeit immer weiter gestiegen. KH, ein Nahrungsergänzungsmittel hergestellt aus Kollagen Typ I, ist besonders aus den Medien als ein dem OA-Prozess entgegenwirkendes Mittel bekannt geworden. Zusätzlich zu dem Einsatz als chondroprotektives Nahrungsergänzungsmittel, werden KH in der Lebensmittelindustrie im Bereich der Süßwaren- und Getränkeherstellung, in der Pharmazie als Füllmittel und Umhüllungsagens, in der Kosmetikindustrie zur Verbesserung der Hautglätte, des Haarglanzes, der Haarkämmbarkeit und der gleichmäßigen Aufnahme von Haarfarbstoffen verwendet.

Die Wirkung von KH auf den Gelenkknorpel und dessen Metabolismus sowie die OA-Symptomatik wurde in mehreren Studien untersucht. Sowohl in Form von Abstracts [18, 70, 71, 87] als auch in Originalpublikationen [14, 59, 62, 65, 72] wurde eine Reihe von *in vivo*- und *in vitro*-Studien über den Effekt von KH veröffentlicht. Einige Untersuchungen mit Kollagen Typ I-Fragmenten (Fortigel[®]) fanden in bovinen Chondrozyten eine erhöhte Kollagen Typ II- oder Proteoglykan-Synthese *in vitro* [65, 72] sowie eine histopathologisch festgestellte Reduktion der Knorpeldestruktion im Tiermodell der OA [71]. *In vitro*-Studien, bei denen die Wirkung von Kollagen Typ II-Fragmente auf bovine und humane Chondrozyten untersucht wurden, zeigen eine reduzierte Kollagen Typ II-Synthese oder eine erhöhte Gen- und Proteinexpression von MMPs [30, 42]. *In vivo*-Studien ergaben konträre Ergebnisse. Einerseits wurde durch die Einnahme von KH eine Reduktion der Schmerzen [3, 18] beobachtet, andererseits konnte in einigen Studien keine Wirkung bzw. keine klinische Verbesserung nachgewiesen werden [59, 62]. Zusammenfassend zeigen die bisherigen Studien, dass Wissenslücken existieren, vor allem in Hinblick auf die

strukturmodifizierende sowie symptomlindernde Wirkung und die Wirkungsmechanismen von KH. Da es bisher keine Untersuchung zur Wirkung von KH auf humane osteoarthritische Knorpelimplantate gibt, bei denen die Chondrozyten in ihrer natürlichen extrazellulären Matrix eingebettet sind, war das Ziel unserer Studie unter *in vitro* Bedingungen erstmalig die molekularen Veränderungen nach KH-Zugabe in humanen OA-Knorpelimplantaten aufzuzeigen.

Eingesetzt wurden sechs kommerziell erhältliche KH, die eine unterschiedliche tierische Herkunft und verschiedene Molekulargewichte besitzen. Um die Wirkung von KH auf den Metabolismus näher zu bestimmen, wurde einerseits die Kollagensynthese als Repräsentant anaboler Effekte und andererseits die Freisetzung von Kollagen Typ II, Proteoglykanen, MMPs, NO, PGE₂ und TIMP-1 zur Quantifizierung von katabolen Effekten der KH analysiert.

4.1 Methodik

In unseren Versuchen wurden Knorpelimplantate verwendet. Implantate bieten im Gegensatz zu isolierten und kultivierten Chondrozyten die Möglichkeit, die Kinetik der KH sowie Zell-Matrix-Wechselwirkungen mit zu berücksichtigen, die im OA-Prozess eine wichtige Rolle einnehmen. Der Nachteil dieser Methode lag an der Gewinnung von vergleichbar großen Knorpelimplantaten. Durch Ausstanzen versuchten wir diese Unterschiede zu minimieren, jedoch konnten durch verschieden dickes Knorpelgewebe keine exakt gleichen Implantate gewonnen werden. Dies wurde berücksichtigt, indem das Knorpelgewicht zur Normalisierung der Messdaten diente. Zur Bestimmung der Kollagensynthese wurden die Knorpelimplantate mit radioaktivem Prolin inkubiert, so dass neusynthetisiertes Kollagen radioaktiv markiert war. Dieses wurde durch die Bestimmung des radioaktiven Hydroxyprolinegehaltes spezifisch nachgewiesen. In Vorversuchen konnte gezeigt werden, dass die eingesetzte Methode ausschließlich das Hydroxyprolin der Knorpelimplantate nachweist und die nicht-incorporierten Präcursor quantitativ entfernt werden. Die Hydroxyprolin-Nachweismethode wurde erstmals 1966 von K. Juva und D.J. Prockop [43] publiziert. Wir verwendeten die modifizierte Methode nach B.R. Switzer und G.K. Summer [92]. Bei humanen Knorpelimplantaten können sehr große Schwankungen in der basalen Syntheseleistung von Kollagen festgestellt werden. Diese Problematik kann mittels radioaktiver Doppelmarkierung gemäß Goodwin et al. [34] minimiert werden. Bei der radioaktiven Doppelmarkierung wird die basale Kollagensynthese anhand der Inkorporation von ³H-Prolin quantifiziert und anschließend die veränderte Synthese nach Zugabe von KH durch die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin bestimmt. Die separate Erfassung von ³H und ¹⁴C durch den β -Flüssigkeitsszintillationszähler in doppelmarkierten Proben wurde in einem Vorversuch bestätigt. Wir

verwendeten im Gegensatz zu Goodwin et al. [34] in den Versuchen bei ^3H -Prolin die doppelte und bei ^{14}C -Prolin die zehnfache Radioaktivität, da sich der radioaktive Hydroxyprolinegehalt nach der von uns durchgeführten Aufreinigung während der Hydroxyprolin-Nachweismethode von dem Hintergrundrauschen ansonsten nicht abgrenzen ließ. Auf die Analyse der Nährmedien wurde verzichtet, da in einem Vorversuch gezeigt werden konnte, dass die hinzugefügten Präcursor nicht vollständig mittels der Hydroxyprolin-Nachweismethode entfernt werden konnten und somit ein Unterscheiden zwischen Präcursor und neusynthetisiertem Hydroxyprolin nicht möglich war. Zusätzlich zu dem radioaktiven Hydroxyprolinegehalt wurde der Gesamthydroxyprolinegehalt in den Knorpelimplantaten photometrisch gemessen und somit der Gesamtkollagengehalt im Knorpel bestimmt. Zur Validierung und Optimierung der photometrischen Messung wurden einige Vorversuche durchgeführt.

Degradative Prozesse wurden anhand des MMP-1, -3, -13, Kollagen Typ II-, Proteoglykan-, NO- und TIMP-1-Gehaltes bewertet, welche anhand verschiedener Assays bestimmt wurden. In Vorversuchen wurde sichergestellt, dass die eingesetzten Assays nicht mit den in den Proben vorkommenden KH interagieren. Das im Nährmedium befindliche endogene Kollagen Typ II wurde mit einem Immuno-Assay nachgewiesen, dessen Nachweismethode auf einem spezifischen Kollagen Typ II Antikörper beruht. Für die Bestimmung der sezernierten MMPs wurden ELISAs eingesetzt, die mittels Antikörper spezifisch den Gehalt an MMP-1, MMP-3 oder MMP-13 detektieren. Diese Assays sind gemäß Herstellerangaben in der Lage, neben den aktiven Enzymen auch die Vorstufe der Enzyme (proMMPs), sowie durch Bindung an TIMP inaktiviert Enzyme nachzuweisen. Da keine Unterscheidung zwischen aktiven und inaktiven MMPs möglich war, schließt der Nachweis eines vermehrten MMP-Gehaltes nicht grundsätzlich auf eine erhöhte MMP-Aktivität. Diese Tatsache könnte eine Erklärung dafür bieten, dass bei unseren Versuchen der gemessene erhöhte MMP-Gehalt nicht zu einer gesteigerten Kollagen Typ II Freisetzung führte. Ein erhöhter MMP-Gehalt resultierte in unserer Studie nicht in einer gesteigerten Proteoglykan-Freisetzung, was in guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kozaci et al. [47] steht, die ebenfalls keine Wirkung von MMPs auf die Proteoglykanfreisetzung fanden. Die Wirkung von KH auf weitere katabole Vorgänge wurde unter anderem anhand des NO- und PGE_2 -Gehaltes bestimmt. Zum Nachweis von PGE_2 wurde ein ELISA herangezogen, der spezifisch PGE_2 und seine Metabolite an einen Antikörper bindet. Die PGE_2 -Standardkurve ergibt eine sigmoidale Kurve, in der laut Hersteller nur der lineare Bereich zur Ermittlung einer unbekanntem Konzentration herangezogen werden sollte. Dies hatte bei unseren Analysen zur Folge, dass die Konzentrationen häufig zu hoch oder zu niedrig lagen. In den Versuchen zur Optimierung der benötigten Verdünnung stellten wir fest, dass nur in Gegenwart von RDH und CH-alpha[®] die PGE_2 -Konzentrationen stark zunahmten. Deshalb wurden

unsere Bemühungen, eine optimale Verdünnung zu finden, letztendlich auf diese zwei KH beschränkt. Obwohl in den Vorversuchen die Verdünnung mehrmals geändert wurde, konnte keine ideale Verdünnung bestimmt werden, in der alle Proben mit ihren Werten in dem linearen Bereich lagen, weshalb die Ergebnisse nur eingeschränkt beurteilbar sind. Der direkte Nachweis von NO im Medium ist nicht möglich, da die Halbwertszeit von NO *in vivo* nur wenige Sekunden beträgt [97]. Auf Grund dessen wurde der Gehalt der stabileren NO-Metabolite – Nitrat und Nitrit – mit Hilfe der Griess-Reaktion bestimmt, wobei Nitrat zunächst zu Nitrit enzymatisch reduziert und dann der Nitritgehalt photometrisch bestimmt wurde.

4.2 Die Wirkung der Kollagenhydrolysate

Untersucht wurden sechs verschiedene KH, die sich in ihrem tierischen Ursprung und ihrem Molekulargewicht unterscheiden. RDH (PeptanTM B 5000) und RDH-N (PeptanTM B 2000) sind beides aus bovinem Kollagen Typ I gewonnene KH. Sie unterscheiden sich nur in ihrem Molekulargewicht. Beide sind Gemische mit einem breiten Molekulargewichts-Bereich, wobei gemäß Herstellerangaben RDH ein mittleres Molekulargewicht von 5000 kDa und RDH-N eines von 2000 kDa hat. Desweiteren wurden FGH (PeptanTM F 5000) und FGH-N (PeptanTM F 2000) eingesetzt, aus Fisch gewonnene KH, die ebenfalls gemäß Herstellerangaben ein mittleres Molekulargewicht von 5000 kDa und 2000 kDa besitzen. Zusätzlich wurde ein porkines KH, Mobiforte[®], mit unbekanntem Molekulargewicht untersucht. In Anlehnung an die Studien von Össer et al. [71, 72] wurde außerdem CH-alpha[®] verwendet. CH-alpha[®] ist ein Gemisch aus dem bovinem KH Fortigel[®], Vitamin C und weiteren Zusatzstoffen. Fortigel[®] selbst stand uns nicht zur Verfügung, sodass wir das im Handel befindliche CH-alpha[®] untersucht haben.

Eingesetzt wurden Konzentrationen bis 1 mg/ml, welche im Bereich der Konzentrationen liegt, die in anderen KH-Studien verwendet wurden (siehe Tab. 2 auf Seite 22), sowie zusätzlich 2 und 10 mg/ml, hohe Konzentrationen, die wahrscheinlich *in vivo* nicht zu erreichende Konzentrationen im Gelenk darstellen. Wir versuchten auch mögliche therapeutische Plasmakonzentrationen einzusetzen. Diese sind im Moment noch unbekannt, liegen aber wahrscheinlich unter 1 mg/ml.

Pharmakokinetische Studien mit Mäusen zeigen, dass oral verabreichtes radioaktives KH resorbiert wird, wobei in den Gelenken nicht weiter identifizierte radioaktive Peptide und Aminosäuren gefunden wurden [69]. Ohara et al. [73] bestätigten in einem Tiermodell mit Meerschweinchen nach oraler Aufnahme von KH, gewonnen aus Fisch- und Schweine-Kollagen Typ I, eine erhöhte Konzentration von Peptiden im Blut, wobei vor allem Prolin-Hydroxyprolin-haltige Peptide gefunden wurden. In diesem Zusammenhang kommt die Frage auf, in wie fern *in vivo*- und *in vitro*-Studien

zur Wirkung von KH miteinander vergleichbar sind, da die Zusammensetzung der Peptide nach direkter Zugabe oder oraler Gabe durch die Digestion möglicherweise stark variieren. In unserer Studie konnte festgestellt werden, dass nicht nur der Ursprung der KH, sondern auch deren Größe und Konzentration unterschiedliche Wirkungen hervorrufen.

Die Tabellen Tab. 2 und Tab. 3 auf Seite 22 und 25 im Einleitungsteil bieten eine Übersicht über Studien mit KH und Kollagen Typ II-Fragmenten. Gründe für die unterschiedlichen Ergebnisse könnte möglicherweise der unterschiedliche Ursprung der KH (Kollagen Typ I oder II), die durch geführte analytische Methode, die eingesetzte Spezies, das Alter der Probanden oder der Gesundheitszustand der eingesetzten Knorpel sein.

Einige *in vitro*- und *in vivo*-Studien berichten, dass hydrolysiertes Kollagen Typ I die Knorpeldestruktion vermindert, die Schmerzen reduziert oder die Gelenkbeweglichkeit verbessert [14, 71]. Kollagen Typ II-Fragmente hingegen hemmten die Kollagensynthese oder erhöhten die MMP-Expression [30, 42]. Die Hypothese, dass Kollagen Typ I-Fragmente anabole und Kollagen Typ II-Fragmente katabole Effekte auf den Knorpelmetabolismus und OA-Beschwerden haben, konnte jedoch nicht immer bestätigt werden. Össer et al. [72] zeigte in einer *in vitro*-Studie mit verschiedenen KH, hergestellt aus bovinem Kollagen Typ I und Kollagen Typ II aus Hühnerknorpel, dass beide KH die Proteinsynthese stimulieren [72]. Bei täglicher Einnahme von 10 g hydrolysiertem Kollagen Typ I in einer Gruppe von OA-Patienten wurde keine klinische Verbesserung der OA-Beschwerden, gemessen an den Schmerzen, dem Schmerzmittelgebrauch und der Gelenkfunktion, festgestellt [59, 62]. Wurden jedoch Patienten mit fortgeschrittener OA mit hydrolysiertem Kollagen Typ I behandelt, konnte eine Verbesserung der Beschwerden z.B. durch Besserung der Beweglichkeit, der Schmerzen oder der Lebensqualität erzielt werden [14, 62].

In unserer Studie wurde erstmals und systematisch die Wirkung von verschiedenen KH auf den Metabolismus von humanen, osteoarthritischen Knorpelimplantaten untersucht und zwar in Abhängigkeit von der Konzentration an KH und dem Schweregrad der osteoarthritischen Schädigung. Insbesondere sollte die Kollagensynthese spezifisch durch den quantitativen Nachweis von radioaktiv markiertem Hydroxyprolin bestimmt werden. Keine der getesteten KH stimulierten die Kollagensynthese. RDH erhöhte signifikant den MMP-, NO- und PGE₂-Gehalt, ohne dabei die Freisetzung von Kollagen Typ II und Proteoglykanen zu fördern. Die Ergebnisse unserer Studie sind in Tab. 17 zusammengefasst.

Auffällig ist, dass besonders häufig in den hohen KH-Konzentrationen von 2 und 10 mg/ml Wirkungen im Knorpelmetabolismus festgestellt werden konnten. 2 und 10 mg/ml KH sind sehr hohe Konzentrationen, die unserer Meinung nach *in vivo* durch orale Einnahme von KH nicht erreicht werden können. Diese Konzentrationen

	RDH	RDH-N	CH-alpha [®]	FGH	FGH-N	Mobiforte [®]
Kollagensynthese	↓	-	2,10↓↓	-	-	-
MMP-1	↑↑↑	10↑	-	↑↑	-	2,10↑
MMP-3	↑↑↑	-	-	2,10↑↑	-	10↑↑
MMP-13	↑↑↑	-	-	2,10↑	-	-
TIMP-1	-	-	10↓	-	-	-
Koll Typ II-Freisetzung	-	-	-	10↓	-	-
PG-Freisetzung	-	-	-	-	-	↑↑
PGE ₂	↑↑	n.b.	10↑	n.b.	n.b.	n.b.
NO	↑	-	-	-	10↑	↑↑

Tab. 17: Wirkung von Kollagenhydrolysat auf den Knorpelmetabolismus
 ↑ = Steigerung, ↓ = Verminderung, - keine Änderung, n.b. = nicht bestimmt.
 Waren Veränderungen nur bei einzelnen Konzentrationen sichtbar, wurden diese als Zahl ohne Angabe der Einheit (mg/ml) vor die Pfeile geschrieben.

wären demnach in Anlehnung an Paracelsus „Allein die Dosis macht das Gift“ [76], als toxische Konzentrationen anzusehen und sind wahrscheinlich klinisch nicht relevant. RDH, FGH und Mobiforte[®] hingegen zeigen bereits in niedrigen Konzentrationen deutliche Veränderungen im Metabolismus und sind somit *in vivo* potentiell wirksam.

Die Kollagensynthese sinkt nach Zusatz von RDH und CH-alpha[®]. Nach Zugabe von RDH konnte eine konzentrationsabhängige signifikante Reduktion der Kollagensynthese gemessen werden. Dies zeigte sich ebenfalls bei der Kultivierung mit 2 und 10 mg/ml CH-alpha[®]. CH-alpha[®] ist ein bovines KH, welches besonders in den Medien als Nahrungsergänzungsmittel bei OA empfohlen wird. Die Herstellerfirma Quiris Healthcare (früher GELITA Health Products GmbH) bezieht sich dabei vor allem auf die positiven Ergebnisse von CH-alpha[®] in Studien von Össer et al. [71, 72]. Das von Össer et al. eingesetzte KH Fortigel[®] ist Bestandteil von CH-alpha[®]. Im Gegensatz zu Fortigel[®], das ausschließlich aus hydrolysiertem bovinem Kollagen Typ I besteht, sind in CH-alpha[®] weitere Zusatzstoffe, wie Vitamin C, Fruktose, Zitronensäure, Malzextrakt, Kaliumsorbat, Acesulfam K, Natrium-Cyclamat und Aroma enthalten. Zur Bestimmung der Kollagensynthese nutzten Össer et al. [72] den immunzytochemischen Nachweis von Kollagen Typ II im Zytoplasma und in den Nährmedien sowie die Höhe der mit radioaktivem Prolin markierten Proteine der lysierten Zellen, so dass die Proteinsynthese und nicht spezifisch die Kollagensynthese gemessen wurde. Die von Össer et al. gemessene Steigerung der Proteinsynthese wird fälschlicherweise als Maß für die Kollagensynthese

herangezogen und konnte in den humanen OA-Knorpelexplantaten unserer Studie nicht festgestellt werden. Es zeigte sich sogar eine reduzierte Kollagensynthese bei Behandlung mit 2 und 10 mg/ml CH-alpha[®]. Das unterschiedliche Ergebnis liegt möglicherweise daran, dass Össer et al. bei seinen KH-Studien die Proteinsynthese von gesunden bovinen Chondrozyten gemessen hat, wohingegen wir spezifisch die Kollagensynthese in humanen osteoarthritischen Knorpelexplantaten bestimmten. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigte sich bei Össer et al. [72] eine Reduktion der Proteinsynthese bei einer Konzentration von 10 mg/ml.

10 mg/ml FGH reduziert die Freisetzung von Kollagen Typ II. Es zeigte sich nur bei Kultivierung mit 10 mg/ml FGH ein reduzierter Kollagen Typ II-Gehalt in den Nährmedien, was auf einen geringeren Verlust von Kollagen Typ II aus dem Knorpel schließen lässt und somit als antikatabole Wirkung interpretiert werden kann.

Össer et al. [72], die ebenfalls die Kollagen Typ II-Freisetzung mittels ELISA bestimmt haben, fanden nach Zugabe von 0,5 mg/ml hydrolysiertem Kollagen Typ II und I (Fortigel[®]) einen erhöhten, nach Zugabe von 10 mg/ml einen reduzierten Kollagen Typ II-Gehalt in den Medien der Zellkultur mit gesunden, bovinen Chondrozyten. Diesen vermehrten Gehalt an Kollagen Typ II bei 0,5 mg/ml führten sie auf eine erhöhte Kollagensynthese zurück. Ng et al. [65], die in einem Agarosegel eingebettete gesunde, bovine Chondrozyten mit einem bovinen KH kultivierten, fanden bei 0,5 und 1,0 mg/ml eine signifikante Steigerung des Kollagen Typ II-Gehaltes in der künstlichen Matrix. Bei 10 mg/ml wurde ein verringerter Kollagen Typ II-Gehalt gemessen, der möglicherweise auf einer Hemmung der Kollagensynthese beruht.

Mobiforte[®] zeigte eine erhöhte Freisetzung von Proteoglykanen. Mobiforte[®] bewirkte in unserer Studie eine erhöhte Proteoglykan-Freisetzung. Ein signifikanter Verlust von Proteoglykanen in die Nährmedien zeigte sich ab einer Konzentration von 1 mg/ml. Bei 10 mg/ml Mobiforte[®] wurden über 50 % der Proteoglykane des Knorpels in die Medien abgegeben.

Die stark erhöhte Freisetzung von Proteoglykanen bei Mobiforte[®] ist möglicherweise auf den hohen NO-Gehalt zurückzuführen, der konzentrationsabhängig anstieg. NO induziert eine vermehrte Bildung und Aktivierung von ADAMTS [1]. Eine *in vitro*-Studie zum Zusammenhang von NO und der Proteoglykan-Freisetzung wurde von Mastbergen et al. [58] veröffentlicht. In dieser Studie wurden gesunde humane Knorpelexplantate 7 Tage mit oder ohne PGE₂ oder mit selektiven COX-2-Inhibitoren kultiviert und Veränderungen im Proteoglykan-, PGE₂- und NO-Gehalt bestimmt. Es zeigte sich eine positive Korrelation zwischen dem NO-Gehalt und der Degradation von Proteoglykanen. Taskiran et al. [94] fanden eine durch NO induzierte

verringerte Proteoglykan-Synthese in Knorpelimplantaten von Kaninchen. In unserer Studie wurde bei RDH ebenfalls ein erhöhter NO-Gehalt gefunden, jedoch keine signifikant vermehrte Freisetzung von Proteoglykanen. Im Gegensatz zu Mobiforte® erhöhte sich der NO-Gehalt in den Medien bei 10 mg/ml RDH auf ca. das Doppelte, wohingegen bei 10 mg/ml Mobiforte® der NO-Gehalt sogar auf ca. das Achtfache anstieg.

Ein erhöhter Gehalt an MMPs führt nicht zu einer gesteigerten Proteoglykan- und Kollagen Typ II-Freisetzung. RDH erhöhte den MMP-1-, MMP-3- und MMP-13-Gehalt der Medien konzentrationsabhängig. Bei FGH und Mobiforte® konnte vor allem in hohen Konzentrationen ein erhöhter Gehalt dieser Enzyme in den Nährmedien gemessen werden. RDH-N induzierte ebenfalls eine vermehrte MMP-1-Freisetzung, dies jedoch nur bei einer Konzentration von 10 mg/ml. Kozaci et al. [47] untersuchten bovine Knorpelimplantate nach 4 Wochen Kultivierung mit IL-1 α auf ihre Kollagen Typ II- und Proteoglykan-Freisetzung, sowie auf den MMP-Gehalt in den Nährmedien. Laut Kozaci et al. korreliert die MMP-Aktivität mit der Degradation von Kollagen Typ II, jedoch nicht mit der Degradation von Proteoglykanen. Trotz der hohen Konzentrationen an MMPs in den Nährmedien konnten wir keine erhöhte Freisetzung von Kollagen Typ II nachweisen. Ursache dafür könnte die Bindung an TIMP oder α_2 -Makroglobulin, oder der Nachweis von inaktiven proMMPs sein. Es gibt vier verschiedene TIMP, bei denen sich vor allem TIMP-3 hemmend auf ADAMTS-4 und -5 auswirkt. Ein erhöhter TIMP-1-Gehalt als mögliche Erklärung für die minimale Kollagen Typ II-Freisetzung trotz hoher MMP-Konzentrationen konnte nicht festgestellt werden. Es zeigte sich sogar bei 10 mg/ml CH-alpha® ein signifikant verminderter TIMP-1-Gehalt in den Medien. Bei allen anderen KH war der gemessene TIMP-1-Gehalt in den Nährmedien unverändert.

In einem Abstract von Össer et al. [70] konnte unter KH-Zugabe keine Veränderung der zymographisch gemessenen Gelatinase-Aktivität im Nährmedium von gesunden, humanen Chondrozyten festgestellt werden. In einer Studie an gesunden, bovinen Chondrozyten von Ng et al. [65] zeigte sich bei Inkubation mit 10 mg/ml bovinem KH eine erhöhte Genexpression von MMP-3 und -13 im Nährmedium.

Jennings et al. [42] beschreiben, dass durch MMP-3 aus Kollagen Typ II Fragmente produziert werden, welche auch unter normalen physiologischen Bedingungen dem Annexin V-Rezeptor auf Chondrozyten ein intaktes Kollagen imitieren, wodurch das Signal zur Stimulation der Kollagensynthese ausbleibt. Da auch in unseren Versuchen RDH trotz Steigerung der MMP-3-Konzentration eine verringerte Kollagensynthese bewirkte, ist ein Rückkopplungsmechanismus über den Annexin V-Rezeptor denkbar.

NO- und PGE₂-Freisetzung korrelieren nicht mit erhöhten MMP-Konzentrationen und Matrixverlusten. Wir konnten eine konzentrationsabhängig erhöhte NO-Freisetzung nach Zusatz von RDH und Mobiforte[®] sowie ein erhöhter NO-Gehalt bei Behandlung mit 10 mg/ml FGH-N feststellen. Die von Mastbergen et al. [58] beschriebene positive Korrelation zwischen dem NO-Gehalt und der Freisetzung von Proteoglykanen konnte nur für Mobiforte[®] bestätigt werden. NO ist in der Lage die Expression von MMPs zu induzieren [79]. Wir konnten jedoch keinen direkten Zusammenhang zwischen einem erhöhten MMP-Gehalt und einem erhöhten NO-Gehalt feststellen.

Der PGE₂-Gehalt wurde nur bei RDH und CH-alpha[®] bestimmt, da in den Vorversuchen zur Bestimmung der optimalen Verdünnung keine Unterschiede im PGE₂-Gehalt nach Kultivierung mit RDH-N, FGH, FGH-N und Mobiforte[®] gesehen wurde. In unserer Studie fanden wir bei RDH eine konzentrationsabhängig erhöhte PGE₂-Freisetzung, welche bei CH-alpha[®] nur bei 10 mg/ml nachgewiesen werden konnte. Dies hatte jedoch keine Auswirkung auf den MMP-Gehalt, die Proteoglykan- oder Kollagen Typ II-Freisetzung.

Li et al. [49] fanden nach Zugabe von 1 μ M PGE₂ zu humanen Chondrozyten eine verringerte Proteoglykansynthese aber keinen Anstieg der MMPs-1, -3, -13 und -14 sowie ADAMTS-4 und -5. Ein μ M PGE₂ entspricht in unserer Explantatkultur etwa 350.000 pg/ml. In unserer Studie konnten wir bei 10 mg/ml RDH 896 pg/ml PGE₂ (ca. 2,56 nM) und bei 10 mg/ml CH-alpha[®] 120 pg/ml PGE₂ (ca. 0,34 nM) messen. Mikromolare Konzentrationen von PGE₂ zeigten *in vitro* negative Wirkungen auf den Knorpelmetabolismus, in *in vivo*-Untersuchungen von Synovialflüssigkeit sowie in unserer Studie wurden hingegen nanomolare Konzentrationen (ca. 0,1 - 2,5 nM) gefunden. Die Ergebnisse der Studie von Li et al. lassen sich somit nur bedingt auf die *in vivo*-Situation übertragen.

Mastbergen et al. [58] fanden nach Zugabe von 3 - 500 pg/ml PGE₂ zu gesunden, humanen Knorpelimplantaten keine Veränderungen der Proteoglykan-Synthese und -Freisetzung. Wurde PGE₂ hingegen zu humanen, osteoarthritischen Chondrozyten hinzugefügt, zeigte sich eine erhöhte Proteoglykan-Freisetzung [49]. Obwohl die PGE₂-Konzentration mit der von Mastbergen et al. [58] vergleichbar waren, zeigte sich in unserer Studie kein erhöhter Proteoglykan-Gehalt in den Nährmedien. Bei Mobiforte[®], welches von den untersuchten KH den Proteoglykan-Gehalt statistisch signifikant erhöhte, wurde bei den Vorversuchen zur Einstellung des Verdünnungsfaktors bei der PGE₂-Bestimmung in Nährmedium kaum Veränderungen durch die KH-Zugabe beobachtet, weshalb der PGE₂-Gehalt letztendlich nicht weiter bestimmt wurde. Daher können wir eine Korrelation zwischen der PGE₂-Konzentration und der Proteoglykan-Freisetzung in unserer Studie nicht herstellen. Der erhöhte PGE₂-Gehalt ist in unserer Studie somit als Hinweis auf eine inflammatorische

OA-Komponente zu werten und kann keiner degradativen Reaktion (erhöhter MMP-Gehalt, Proteoglykan-Freisetzung etc.) zugeordnet werden.

KH zeigen keine unterschiedliche Wirkung auf Knorpelimplantate in frühen oder mittleren OA-Stadien. Um den Effekt von KH auf den Metabolismus von Knorpelimplantaten aus unterschiedlichen Krankheitsstadien zu erfassen, wurde die Wirkung von RDH, RDH-N und CH-alpha[®] auf die Kollagensynthese bei Knorpelimplantaten in frühen oder mittleren OA-Stadien untersucht. Grund für die Begrenzung auf die drei KH und der Untersuchung der Kollagensynthese lag in der geringen Verfügbarkeit von Knorpelimplantaten in frühen OA-Stadien. Wie im Methodenteil erwähnt, wurden die Knorpelproben aus anfallendem Knorpel-Knochen-Gewebe bei Knie-endoprothetischen Operationen gewonnen. Da diese Operationen meist erst in fortgeschrittenen OA-Stadien durchgeführt werden, stellte sich das Sammeln von Knorpelproben mit geringen osteoarthritischen Veränderungen als sehr langwierig dar.

Bei der Behandlung mit RDH, RDH-N und CH-alpha[®] konnte bei Knorpelimplantaten in frühen oder mittleren OA-Stadien statistisch die gleichen Effekte auf die Kollagensynthese festgestellt werden. Die Wirkung ist somit unabhängig vom Krankheitsstadium. Diese Feststellung ist sehr interessant, da 1. in mittleren OA-Stadien ein anderer pathophysiologischer Metabolismus vorliegt als in frühen OA-Stadien und 2. bei schweren osteoarthritischen Veränderungen durch den Verlust von extrazellulären Matrixbestandteilen der Wassergehalt des Knorpels steigt und die zugefügten KH somit leichter in das Innere der Knorpelimplantate diffundieren können. Wir stellten einen signifikanten, um ca. 4% erhöhten Wassergehalt bei Knorpeln in mittleren verglichen mit frühen OA-Stadien fest.

KH mit kleinerem Molekulargewicht zeigen geringere Effekte. Für KH mit einem mittleren Molekulargewicht von 2000 Da, wie RDH-N und FGH-N, konnte nur in hohen Konzentrationen von 10 mg/ml eine Wirkung und insgesamt geringere Effekte auf den Knorpelmetabolismus festgestellt werden. Eine mögliche Erklärung für diese abgeschwächte Wirkung kleinerer KH liefern Siebert et al. [89]. Sie fanden stärkere Wechselwirkungen zwischen tripel-helikalen Kollagenfragmenten und schwache Interaktionen zwischen kleinen einsträngigen Kollagenfragmenten mit dem Integrinrezeptor. Die schwächere Bindung an die $\alpha 2A$ -Domäne des Integrinrezeptors könnte eine Erklärung für die geringere Wirkung kleinerer KH sein.

Die Wirkung der KH ist speziesabhängig. In keinen anderen bisher publizierten Studien wurden mehrere Kollagenhydrolysate miteinander verglichen. Die Wirkung der KH ist jedoch nicht nur abhängig von ihrem Molekulargewicht, sondern

auch von der Herkunft. KH werden aus Haut und/oder Knochen von unterschiedlichen Tieren hergestellt. Zum Beispiel wird Mobiforte[®] aus Schweinen gewonnen, RDH und CH-alpha[®] aus Rindern und FGH aus Fischen.

So zeigen Mobiforte[®] und FGH keine Wirkung auf die Kollagensynthese, wohingegen RDH und CH-alpha[®] die Kollagensynthese bei hohen Konzentrationen hemmen. Eine reduzierte Kollagen-Freisetzung findet sich nur bei FGH. Eine erhöhte Proteoglykan-Freisetzung konnte nur bei Mobiforte[®] nachgewiesen werden. Die gesteigerte Proteoglykan-Freisetzung bei Mobiforte[®] ist möglicherweise auf den ebenfalls erhöhten NO-Gehalt im Nährmedium zurückzuführen. Jedoch konnte ebenfalls bei RDH ein leichter Anstieg des NO-Gehaltes festgestellt werden, aber keine gesteigerte Proteoglykan-Freisetzung. Einen erhöhten Gehalt an MMPs (-1, -3 und -13) konnte bei FGH, Mobiforte[®] und vor allem bei RDH gemessen werden, jedoch nicht bei CH-alpha[®]. Möglicherweise entstehen bei der Hydrolyse nur in einzelnen Spezies pharmakologisch wirksame Peptide, was die Ursache der Speziesabhängigkeit erklären könnte.

Vergleicht man nur die bovinen KH - RDH, RDH-N und CH-alpha[®]- miteinander, können ebenfalls deutliche Unterschiede in der Wirkung gezeigt werden. So führt RDH-N nur bei einer Konzentration von 10 mg/ml zu einem erhöhten MMP-1-Gehalt im Nährmedium. Bei alle anderen gemessenen Parameter, wie z.B. die Kollagensynthese und -Freisetzung, die Proteoglykan-Freisetzung oder der NO-Gehalt, konnte keine Veränderung durch RDH-N festgestellt werden. CH-alpha[®] hemmt wie RDH die Kollagensynthese und erhöht die NO-Freisetzung, jedoch im Gegensatz zu RDH erst in höheren Konzentrationen wie 2 oder 10 mg/ml. Die MMP-Freisetzung wird von RDH stark und von CH-alpha[®]überhaupt nicht beeinflusst. Grund dafür könnte eine unterschiedliche Zusammensetzung des Peptidgemisches der bovinen KH sein, bedingt durch unterschiedliche Extraktions- und Aufreinigungsmethoden [85].

Schlussfolgerung:

Unsere Studie untersucht zum ersten Mal systematisch die Wirkung von verschiedenen KH unterschiedlichen Ursprungs auf die Synthese und Freisetzung von Kollagen Typ II, Proteoglykanen, MMP-1, -3, -13, TIMP-1, PGE₂ und NO aus humanen OA-Knorpelxplantaten mit unterschiedlichem Schweregrad der osteoarthritischen Schädigung. Eingesetzt wurden drei bovine KH (RDH, RDH-N und CH-alpha[®]), zwei KH gewonnen aus Fisch (FGH und FGH-N), sowie einem porkinen KH (Mobiforte[®]) in unterschiedlichen Konzentrationen.

Unsere Studie ist die erste, die *in vitro* keinen stimulatorischen Effekt von KH auf die Kollagensynthese in humanen OA Knorpeln zeigte. Diese Beobachtung war unabhängig vom Ausmaß der osteoarthritischen Schädigung. Die KH unterscheiden sich hinsichtlich ihrer katabolen und pro-inflammatorischen Wirkung auf humanen

OA-Gelenkknorpel. Wirkungsunterschiede zeigten sich auch bei KH mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Für KH mit einem kleineren Molekulargewicht, wie RDH-N und FGH-N, fanden wir nur in hohen Konzentrationen eine Wirkung z.B. auf den MMP-1-Gehalt. Somit konnte gezeigt werden, dass nicht nur der tierische Ursprung der KH, sondern vor allem die Peptidzusammensetzung bzw. Größe der einzelnen Peptide eine Rolle spielen.

Trotz der erhöhten Freisetzung von katabolen Enzymen und pro-inflammatorischen Zytokinen konnte, mit Ausnahme von Mobiforte[®], kein vermehrter Matrixverlust festgestellt werden. Dies deutet drauf hin, dass entweder 1. andere TIMP als TIMP-1 induziert werden, 2. proMMPs nicht zu aktiven MMPs gespalten werden oder 3. KH keinen Effekt auf die Expression von ADAMTS haben. Zusätzlich wurde die erhöhte Freisetzung vor allem bei hohen Konzentrationen gefunden. Jedoch sind auf Grund der Menge, der Digestion und dem Abbau in der Leber 2 oder 10 mg/ml *in vivo* nicht erreichbare Konzentrationen, weshalb Wirkungen in diesem Bereich vermutlich klinisch irrelevant sind. Zudem könnten andere Peptide entstehen, die eine Wirkung zeigen.

Unsere Studie zeigt, dass die KH sich deutlich in ihrer Wirkung voneinander unterscheiden. Bevor KH als sichere Nahrungsergänzungsmittel zur Prophylaxe und Begleittherapie bei OA eingesetzt werden, sollte zuerst jeweils die pharmakologischen Eigenschaften *in vivo* und *in vitro* aufgezeigt werden. Im OA-Prozess spielt die synoviale Reaktion ebenfalls eine bedeutende Rolle und ist somit ein möglicher Angriffspunkt von KH. Die Wirkung von KH auf die synovialen Zellen sollte Inhalt weitere Studien sein.

5 Zusammenfassung

Osteoarthritis (OA) ist eine progressive Erkrankung des gesamten Gelenkes, die mit Verlust des Gelenkknorpels und Veränderungen in dem darunter liegenden Knochen und der Synovialmembran einhergeht. Im Knorpel steht vor allem der Verlust von Proteoglykanen und Kollagen Typ II im Vordergrund. Verantwortlich für diese degradativen Prozesse sind Enzyme der ADAMTS- und MMP-Familie. Stimuliert wird die Bildung dieser Enzyme durch auto- und parakrine Zytokine, wie z.B. IL-1 und TNF- α . Bisher gibt es keine Therapiemöglichkeit, die das zu Grunde liegende molekulare Ungleichgewicht zwischen Matrixaufbau und -degradation beheben kann. Daher sind Stoffe, die die Möglichkeit bieten, modifizierend auf den Krankheitsverlauf einzuwirken, indem sie den OA-Prozess verzögern, stabilisieren oder die strukturellen Veränderungen stoppen derzeit ein zentraler Bestandteil in der OA-Forschung. In diesem Zusammenhang ist vor allem in den Medien das Nahrungsergänzungsmittel Kollagenhydrolysat (KH) als neues Mittel gegen OA der Öffentlichkeit bekannt gemacht worden. In den letzten Jahren wurden mehrere Studien zur Wirkung von KH veröffentlicht.

Eine pharmakokinetische Studie mit Mäusen zeigte, dass oral verabreichtes radioaktives KH resorbiert wird und vor allem in den Gelenken ^{14}C -Radioaktivität akkumuliert [69]. In vitro-Studien mit KH, gewonnen aus Kollagen Typ I, zeigten eine Steigerung der Kollagen Typ II- und Proteoglykan-Synthese in gesunden Chondrozyten [65, 70, 72, 87]. Die Kultivierung mit Kollagen Typ II-Fragmenten hingegen führte zu einer erhöhten Matrixdegradation mit vermehrter MMP-Expression [30, 42]. In *in vivo*-Studien mit OA-Patienten führte die tägliche Einnahme von KH meist zu einer Besserung der OA-Beschwerden, die z.B. anhand der Schmerzen, der Beweglichkeit und der Gelenkfunktion beurteilt wurden [14, 18, 59]. In einer weiteren großen klinischen Studie konnte jedoch keine Verbesserung der Beschwerdesymptomatik festgestellt werden [62].

Das Ziel der hier vorliegenden Arbeit war es daher systematisch die Wirkung von verschiedenen kommerziell erhältlichen KH auf den Knorpelmetabolismus von humanen osteoarthritischen Knorpelimplantaten zu untersuchen und zwar in Abhängigkeit von der Konzentration an KH und dem Schweregrad der osteoarthritischen Schädigung.

Sechs verschiedene KH – RDH (PeptanTM B 5000), RDH-N (PeptanTM B 2000), CH-alpha[®], FGH (PeptanTM F 5000), FGH-N (PeptanTM F 2000), Mobiforte[®] – wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf den Metabolismus von humanen Knorpelimplantaten in mittleren OA-Stadien untersucht. RDH, RDH-N und CH-alpha[®] bestehen aus hydrolysiertem bovinem Kollagen Typ I, FGH und FGH-N aus hydrolysiertem Fisch-Kollagen Typ I und Mobiforte[®] aus hydrolysiertem porkinem Kolla-

gen Typ I. RDH und RDH-N bzw. FGH und FGH-N unterscheiden sich lediglich in der molekularen Größenverteilung der Peptide, wobei die N-Produkte ein deutlich kleineres mittleres Molekulargewicht haben. Die Kollagensynthese der Explantate wurde nach Zugabe von 0 - 10 mg/ml KH mittels Nachweis des radioaktiv markierten Hydroxyprolins bestimmt. In den Nährmedien wurde der Gehalt an MMP-1, -3, -13, TIMP-1, NO und PGE₂ sowie die Freisetzung von Kollagen Typ II- und Proteoglykanfragmenten bestimmt. Zur Beurteilung der Frage, inwiefern Unterschiede in der Wirkung von KH auf Knorpelexplantate in verschiedenen Krankheitsstadien existieren, wurden zusätzlich Knorpelexplantate in frühen OA-Stadien mit RDH, RDH-N und CH-alpha[®] behandelt und anschließend die Kollagensynthese untersucht.

Unsere Studie ist die erste, die *in vitro* keinen stimulatorischen Effekt von KH auf die Kollagensynthese in humanen OA Knorpeln zeigte. Diese Beobachtung war unabhängig vom Ausmaß der osteoarthritischen Schädigung.

CH-alpha[®], das in der Studie von Össer et al. [72] eine erhöhte Inkorporation von radioaktiv markiertem Prolin in Gesamtproteine und somit stellvertretend eine erhöhte Kollagensynthese in gesunden, bovinen Chondrozyten bewirkte, zeigte in unserer Studie bei Konzentrationen von 2 und 10 mg/ml eine reduzierte Kollagensynthese, sowie einen erhöhten PGE₂- und einen reduzierten TIMP-1-Gehalt im Nährmedium. RDH fiel durch eine gesteigerten Freisetzung von degradativen Faktoren (MMPs, NO, PGE₂) auf. Kozaci et al. [47] berichten von einer Korrelation der MMP-Aktivität mit der Degradation von Kollagen Typ II. NO sei in der Lage die Expression von MMPs [79] und die Freisetzung von Proteoglykanen [58] zu induzieren. Wohingegen in unserer Studie eine erhöhte Freisetzung von NO zum Beispiel bei Mobiforte[®] zu keiner vermehrten Bildung von MMPs führte. Ebenfalls führte ein erhöhter MMP- und NO-Gehalt in unserer Studie nicht zu einer gesteigerten Kollagen Typ II- und die Proteoglykan-Freisetzung.

Eine schwächere Wirkung zeigten KH mit kleinerem Molekulargewicht. Siebert et al. [89] berichten über geringe Interaktionen zwischen kleinen Kollagenfragmenten mit der α 2A-Domäne des Integrinrezeptors, was eine mögliche Erklärung für die geringere Wirkung kleinerer KH ist.

Trotz der erhöhten Freisetzung von katabolen Enzymen und pro-inflammatorischen Zytokinen wie NO konnte, mit Ausnahme von Mobiforte[®], kein vermehrter Matrixverlust festgestellt werden. Dies deutet drauf hin, dass durch KH entweder ein anderes TIMP z.B TIMP-3 induziert wird, proMMPs nicht zu aktiven MMPs gespalten werden oder KH keinen Effekt auf die Expression von ADAMTS-4 oder -5 haben.

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, dass die KH sich deutlich in ihrer Wirkung auf den Knorpelmetabolismus voneinander unterscheiden. Bevor KH als sichere

Nahrungsergänzungsmittel zur Prophylaxe und Begleittherapie bei OA eingesetzt werden, sollte zuerst jeweils die pharmakologischen Eigenschaften einschließlich der Wirkung auf den Gelenkknorpel und das gesamte OA-Gelenk *in vivo* und *in vitro* aufgezeigt werden.

6 Summary

Osteoarthritis (OA) is a progressive degenerative disease characterized by loss of articular cartilage, synovial inflammation and structural changes in the subchondral bone. Articular cartilage destruction is mainly caused by loss of proteoglycans and collagen type II, which results from an imbalance between degradation and synthesis of matrix components. Enhanced level of matrix metalloproteinases (MMPs) and a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) stimulated by autocrine and paracrine cytokines are responsible for cartilage destruction in OA [79]. Until now, no treatment has solve the underlying molecular problem. Collagen hydrolysates (CH) are nutraceuticals that contain collagen peptides and can be used for treatment and prophylaxis in OA. Pharmacokinetic studies with mice indicated that orally administered radioactive CH is resorbed and some radioactivity is to be found in articular cartilage [69]. Several *in-vitro* studies with healthy chondrocytes showed an enhancement of collagen type II and proteoglycan synthesis by adding CH made of collagen type I [65, 70, 72, 87]. However, studies with CH made of collagen type II have demonstrated a higher matrix degradation [30, 42]. Clinical investigations with CH indicated symptom relieving effects, such as pain reduction and joint function improvement [14, 18, 59]. However another large clinical trial showed no symptom improvement [62]. The aim of our study was to evaluate whether different CH changes the cartilage metabolism of humans. In our study, osteoarthritic cartilage explants were subject to different CH concentrations and OA changes.

Six different collagen hydrolysates – RDH (Peptan™ B 5000), RDH-N (Peptan™ B 2000), CH-alpha[®], FGH (Peptan™ F 5000), FGH-N (Peptan™ F 2000), Mobiforte[®] – have been tested. RDH, RDH-N and CH-alpha[®] consists of hydrolysed bovine collagen type I and FGH and FGH-N are made of hydrolysed collagen type I from fish whereupon the N-products have a smaller molecular weight. Mobiforte[®] contains hydrolysed porcine collagen type I. Concentrations differed from 0 - 10 mg/ml CH. Collagen synthesis of explants with moderate OA changes were measured by detection of radioactive labeled Hydroxyproline. Furthermore, contents of MMP-1, -3, -13, TIMP-1, NO, PGE₂, collagen type II and proteoglycans were detected in the media. Additionally collagen synthesis of explants with mild OA changes were analysed.

Our research showed for the first time, that CH doesn't have stimulatory effects *in vitro* on collagen synthesis by human osteoarthritic cartilage. This observation was independent of the degree of OA destruction. CH-alpha[®] was reported to stimulate collagen synthesis by young bovine chondrocytes [72]. In contrast, we found a reduced amount of collagen synthesis, a smaller amount of TIMP-1 in media and

elevated PGE₂ concentrations. RDH, another analysed CH originating from bovine animals, induced elevated levels of MMPs, NO and PGE₂, but this did not lead to an increased loss of proteoglycans and collagen type II. Our research showed that CH with smaller molecular weight were less effective than those with a bigger molecular size. Small collagen fragments interact less with integrin domains, which may serve as a molecular mode of action of CH [89]. Mobiforte[®] was the only CH which resulted in an elevated matrix degradation even if all CH our study rose the amount of cathabolic enzymes and some inflammatory cytokines.

In conclusion, our study illustrates that CH differs with respect to its effect on cartilage metabolism. Because of the variety of CH's mechanisms of action, every different CH's pharmacological mechanism should be demonstrated both *in vivo* and *in vitro* experiments before it is used as a preventatic medication in OA.

7 Abkürzungsverzeichnis

ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs
BMP	bone morphogenetic protein
ca.	circa
CH	collagen hydrolysate
COMP	cartilage oligomeric matrix protein
cpm	counts per minute (Impulse pro Minute)
Da	Dalton
dpm	desintegrations per minute (Zerfälle pro Minute)
g	Erdbeschleunigung
GAG	Glycosaminoglykane
IGF	insulin-like growth factor
IGFBP	IGF-binding protein
inkl.	inklusive
iNOS	inducible nitric oxide synthetase
IL-1R1	Interleukin-1 receptor type 1
KG	Körpergewicht
KH	Kollagenhydrolysat
mg	Milligramm
Min.	Minute
ml	Milliliter
MMP	Matrix Metalloproteinase
MRT	Magnetresonanztomographie
MW	Mittelwert
μCi	Mikrocurie
N	Anzahl Versuchswiederholung
n.b.	nicht bestimmt
ng	Nanogramm
NG	Nassgewicht
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSAIDs	nonsteroidal anti-inflammatory drugs
OA	Osteoarthritis

p-Wert	propability (Signifikanzwert)
p.a.	per analysis
Ph.Eur.	Pharmacopoea Europaea
SADOAs	slow acting drugs in osteoarthritis
SD	Standardabweichung
sog.	sogenante
Std.	Stunde
TGF-β	transforming growth faktor- β
TIMP-1	tissue inhibitor of metalloproteinase-1
TNF-α	Tumornekrosefaktor- α
UK	United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
uPAR	urokinase-type plasminogen activator receptor
USA	United States of America
VAS	Visuelle Analogskala
VEGF	vascular endothelial growth factor
WOMAC	Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis index
\bar{x}	Mittelwert
σ	männlich
φ	weiblich

8 Abbildungsverzeichnis

1	Gelenkaufbau	5
2	Aufbau einer Kollagenfibrille	7
3	Aufbau von Aggrekan	9
4	Ätiologie und Pathogenese	11
5	Regionen der Femurkondyle	38
6	Versuchsaufbau zum Einfluss von KH auf die Kollagensynthese	40
7	Energiespektrum von ^3H und ^{14}C -Prolin	44
8	Versuchsaufbau zum Einfluss von KH auf degradative Prozesse	51
9	Entfernung des Präcursors	60
10	Trocknung der Explantate	63
11	Verdünnungsreihe	64
12	Zeitliche Veränderung der Extinktion	65
13	Absorptionsspektrum von Pyrrol	65
14	Aufreinigungsschritte	68
15	Kollagensynthese bei frühen und mittleren OA-Stadien	70
16	Kollagensynthese	71
17	Hydroxyprolinegehalt	72
18	Wassergehalt von Knorpelimplantaten	73
19	Hydroxyprolinegehalt im Medium	74
20	Kollagen Typ II-Freisetzung	75
21	Proteoglykan-Freisetzung	76
22	PGE ₂ -Freisetzung	77
23	NO-Freisetzung	79
24	MMP-1-Freisetzung	80
25	MMP-3-Freisetzung	81
26	MMP-13-Freisetzung	82
27	TIMP-1-Freisetzung	84

9 Tabellenverzeichnis

1	Im Knorpel vorkommende Kollagene	8
2	<i>in vitro</i> -Studien mit Kollagenhydrolysaten	22
3	<i>in vivo</i> -Studien mit Kollagenhydrolysaten	25
4	Patientenbeschreibung von Knorpelgewebespendern	28
5	Patientenbeschreibung von Knorpelgewebespendern	28
6	Charakterisierung der eingesetzten Kollagenhydrolysate	37
7	Collins-Score	39
8	MMP-ELISA	56
9	Vergleich Einzel- und Doppelmarkierung	59
10	^3H -Aktivität im Medium	61
11	^{14}C -Aktivität im Medium	61
12	Aufreinigung der radioaktiven Medien	62
13	Aufreinigung der radioaktiven Knorpellexpantate	62
14	^3H -Aktivität	66
15	^{14}C -Aktivität	66
16	Wechselwirkung der Assays mit den Kollagenhydrolysaten	69
17	Wirkung von Kollagenhydrolysat auf den Knorpelmetabolismus	90

10 Literaturverzeichnis

- [1] Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16(Suppl 2): S15-20.
- [2] Abramson SB, Attur M. Developments in the scientific understanding of osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2009, 11(3):227.
- [3] Adam M. Therapie der Osteoarthrose – Welche Wirkung haben Gelatinepräparate? *Therapiewoche* 1991, 41:2456-61.
- [4] Aigner T, Fundel K, Saas J, Gebhard PM, Haag J, Weiss T, Zien A, Obermayr F, Zimmer R, Bartnik E. Large-scale gene expression profiling reveals major pathogenetic pathways of cartilage degeneration in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2006, 54(11):3533-44
- [5] Aigner T, Zien A, Gehrsitz A, Gebhard PM, McKenna L. Anabolic and catabolic gene expression pattern analysis in normal versus osteoarthritic cartilage using complementary DNA-array technology. *Arthritis Rheum* 2001, 44(12):2777-89.
- [6] Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 19.1. Extrazelluläre Matrix und Bindegewebe. In: *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Alberts B, Hrsg. Weinheim - New York - Chichester - Brisbane - Singapore - Toronto: Wiley-VCH Verlag, 2001:638-50.
- [7] Ameye LG, Chee WSS. Osteoarthritis and nutrition. From nutraceuticals to functional foods: a systematic review of the scientific evidence. *Arthritis Res Ther* 2006, 8(4):R127.
- [8] Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. Degenerative Gelenkerkrankungen - Therapieempfehlungen der Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft. *Arzneiverordnung in der Praxis* 2008, Sonderheft 1:22-4.
- [9] Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002, 115:3719-27.
- [10] Bakker AC, van de Loo FA, van Beuningen HM, Sime P, van Lent PL, van der Kraan PM, Richards CD, van den Berg WB. Overexpression of active TGF-beta-1 in the murine knee joint: evidence for synovial-layer-dependent chondro-osteophyte formation. *Osteoarthritis Cartilage* 2001, 9(2):128-36.
- [11] Bateman JF, Lamandè SR, Ramshaw JAM. Collagen superfamily. In: *Extracellular matrix, Volume 2 – Molecular components and interactions*. Comper WD, Hrsg. Amsterdam Harwood academic publisher, 1996:22-67.

- [12] Bello AE, Oesser S. Collagen hydrolysate for the treatment of osteoarthritis and other joint disorders: a review of the literature. *Cur Med Res Opin* 2006, 22(11):2221-32.
- [13] Benito MJ., Veale DJ, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005, 64(9):1263-7.
- [14] Benito-Ruiz P, Camacho-Zambrano MM, Carrillo-Arcentales JN, Mestanza-Peralta MA, Vallejo-Flores CA, Vargas-López SV, Villacís-Tamayo RA, Zurita-Gavilanes LA. A randomized controlled trial on the efficacy and safety of a food ingredient, collagen hydrolysate, for improving joint comfort. *Int J Food Sci Nutr* 2009, 60(S2):99-113.
- [15] Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB. Review: TGF- β and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007, 15(6):597-604.
- [16] Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE. The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 2006, 8(6):R187.
- [17] Burr DB, Schaffler MB. The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthrosis: Quantitative microscopic evidence. *Microsc Res Tech* 1997, 37(4):343-57.
- [18] Clark KL, Sebastianelli W, Flechsenhar KR, Aukermann DF, Meza F, Millard RL, Deitch JR, Sherbondy PS, Albert A. 24-Week study on the use of collagen hydrolysate as a dietary supplement in athletes with activity-related joint pain. *Curr Med Res Opin* 2008, 24(5):1485-96.
- [19] Collins DH. The pathology of articular and spinal diseases. London: Edward Arnold and Co 1949:76-9.
- [20] Cooper TG. Radiochemie. In: Biochemische Arbeitsmethoden. Cooper TG, Hrsg. Berlin: Walter de Gruyter-Verlag, 1981:61-125.
- [21] Daheshia M, Yao JQ. The interleukin 1 β pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *J Rheumatol* 2008, 35(12):2306-12.
- [22] Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier J-P, Howell DS, Woessner JF. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989, 84:678-85.

- [23] DiBattista JA, Pelletier JP, Zafarullah M, Fujimoto N, Obata K, Martel-Pelletier J. Coordinate regulation of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase expression in human synovial fibroblasts. *J Rheumatol Suppl* 1995, 43:123-8.
- [24] Drenckhahn D, Hunziker E. Knorpelgewebe. In: *Anatomie: makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie und Zellbiologie*. Benninghoff A, Drenckhahn D, Hrsg. München - Jena: Urban&Schwarzenberg Verlag, 2003:128-33.
- [25] EFSA panel on dietetic products, nutrition and allergies: Scientific opinion on the substantiation of a health claim related to collagen hydrolysate and maintenance of joints pursuant to article 13(5) of regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal* 2011, 9(7):2291.
- [26] Ehrhardt L, Schubert D. Radioaktive Tracer-Techniken in der Biophysik; Anwendung des Szintillationszählers. *Biophysikalisches Praktikum, Institut für Biophysik, Johann Wolfgang Goethe-Universität, Frankfurt*. <http://www.biophys.uni-frankfurt.de/hauser/prakt/RadioaktiveTracer.pdf> (Zugriff: 28.06.09)
- [27] European Food Safety Authority. Opinion of the Food Safety Authority on safety of collagen and a processing method for the production of collagen. *EFSA J* 2005, 174:1-9.
- [28] Fan Z, Söder S, Oehler S, Fundel K, Aigner T. Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Am J Pathol* 2007, 171(3):938-46.
- [29] Farndale RW, Sayers CA, Barrett AJ. A direct spectrophotometric microassay for sulfated glucosaminoglycans in cartilage cultures. *Connect Tissue Res* 1982, 9(4):247-8.
- [30] Fichter M, Körner U, Schömburg J, Jennings L, Cole AA, Mollenhauer J. Collagen degradation products modulate matrix metalloproteinase expression in cultured articular chondrocytes. *J Orthop Res* 2006, 24(1):63-70.
- [31] Fosang AJ, Hardingham TE. Matrix proteoglycans. In: *Extracellular matrix, Volume 2 – Molecular components and interactions*. Comper WD, Hrsg. Amsterdam: Harwood academic publisher, 1996:200-29.
- [32] Goldring MB. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000, 43(9):1916-26.

-
- [33] Goldring MB. Update on the chondrocyte lineage and implications for cell therapy in osteoarthritis. In: Osteoarthritis – A companion to rheumatology. Sharma L, Berenbaum F, Hrsg. Mosby Elsevier 2007:53-76.
- [34] Goodwin JL, Farley ML, Swaim B, Goldring SR, Goldring MB, Bierbaum BE, Gray ML. Dual proline labeling protocol for individual “baseline“ and “response“ biosynthesis measurements in human articular cartilage. Osteoarthritis Cartilage 2008, 16(10):1263-6.
- [35] Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wishnok JS, Tannenbaum SR. Analysis of nitrate, nitrite and [^{15}N]nitrate in biological fluids. Anal Biochem 1982, 126:131-8.
- [36] Griess P. Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt ueber einige Azoverbindungen. Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft 1979, 12(1):426-8.
- [37] Guo D, Ding L, Homandberg GA. Telopeptides of type II collagen upregulate proteinases and damage cartilage but are less effective than highly active fibronectin fragments. Inflamm Res 2009, 58:161-9.
- [38] Hardingham TE, Fosang AJ. Proteoglycans: many forms and many functions. FASEB J 1992, 6(3):861-70.
- [39] Hashimoto M, Nakasa T, Hikata T, Asahara H. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. Medicinal Research Reviews 2008, 28(3):464-81.
- [40] Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C. Subchondral bone in osteoarthritis pathophysiology: State-of-the art and perspectives. Biomed Mater Eng 2009, 19(4-5):311-6.
- [41] Jackson BC, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse matrix metalloproteinase families. Hum Genomics 2010, 4(3):194-201.
- [42] Jennings L, Wu L, King KB, Hämmerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J. The effect of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes. Connect Tissue Res 2001, 42(1):71-86.
- [43] Juva K, Prockop DJ. Modified procedure for the assay of H³ - or C¹⁴-labeled hydroxyprolin. Anal Biochem 1966, 15(1):77-83.

- [44] Kamekura S, Hoshi K, Shimoaka T, Chung U, Chikuda H, Yamada T, Uchida M, Ogata N, Seichi A, Nakamura K, Kawaguchi H. Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability. *Osteoarthritis Cartilage* 2005, 13(7):632-41.
- [45] Kerna I, Kisand K, Tamm AE, Lintrop M, Veske K, Tamm AO. Missense single nucleotide polymorphism of the ADAM12 gene is associated with radiographic knee osteoarthritis in middle-aged Estonian cohort. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17(8):1093-8
- [46] Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011, 41(2):271-90.
- [47] Kozaci LD, Buttle DJ, Hollander AP. Degradation of type II collagen, but not proteoglycan, correlates with matrix metalloproteinase activity in cartilage explant cultures. *Arthritis Rheum* 1997, 40(1):164-74.
- [48] Li J, Anemaet W, Diaz MA, Buchanan S, Tortorella M, Malfait AM, Mikecz K, Sandy JD, Plaas A. Knockout of ADAMTS5 does not eliminate cartilage aggrecanase activity but abrogates joint fibrosis and promotes cartilage aggrecan deposition in murine osteoarthritis models. *J Orthop Res* 2011, 29(4):516-22.
- [49] Li X, Ellmann M, Muddasani P, Wang JH-C, Cs-Szabo G, van Wijnen AJ, Im H-J. Prostaglandin E₂ and its cognate EP receptors control human adult articular cartilage homeostasis and are linked to the pathophysiology of osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2009, 60(2):513-23.
- [50] Loeser RF. Aging and osteoarthritis: the role of chondrocyte senescence and aging changes in the cartilage matrix. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17(8):971-9.
- [51] Loeser RF. Molekular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008, 8(4):303-6.
- [52] Lorenz H, Richter W. Osteoarthritis: Cellular and molecular changes in degenerating cartilage. *Prog Histochem Cytochem* 2006, 40(3):135-63.
- [53] Loughlin J. The genetic epidemiology of human primary osteoarthritis: current status. *Expert Rev Mol Med* 2005, 7(9):1-12.
- [54] Madry H, Kohn D. Pathophysiologie des Knorpels. In: Orthopädie und Unfallchirurgie. Scharf H-P, Rüter A, Pohlemann T, Madry H, Kohn D, Günther K-P, Hrsg. München: Urban&Fischer Verlag, 2009:24-5.

-
- [55] Malfait A-M, Liu R-Q, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthric cartilage. *J Biol Chem* 2002, 277(25):22201-8.
- [56] | Mandl LA. Epidemiology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis – A companion to rheumatology*. Sharma L, Berenbaum F, Hrsg. Mosby Elsevier 2007:1-14.
- [57] Martel-Pelletier J, Lajeunesse D, Reboul P, Pelletier J. The role of subchondral bone in osteoarthritis. In: *Osteoarthritis – A companion to rheumatology*. Sharma L, Berenbaum F, Hrsg. Mosby Elsevier 2007:15-32.
- [58] Mastbergen SC, Bijlsma JW, Lafeber FPJG. Synthesis and release of human cartilage matrix proteoglycans are differently regulated by nitric oxide and prostaglandin-E₂. *Ann Rheum Dis* 2008, 67(1):52-8.
- [59] McAlindon TE, Nuite M, Krishnan N, Ruthazer R, Price LL, Burstein D, Griffith J, Flechsenhar K. Change in knee osteoarthritis cartilage detected by delayed gadolinium enhanced magnetic resonance imaging following treatment with collagen hydrolysate: a pilot randomized controlled trial. *Osteoarthritis Cartilage* 2011, 19(4):399-405
- [60] Mielhke RK, Schmidt K. Degenerative rheumatische Erkrankungen. In: *Rheumatologie: Diagnostik – Klinik – Therapie*. Hetttenkofer HJ, Hrsg. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2003:160-85.
- [61] Morales TI. The quantitative and functional relation between insulin-like growth factor-1 (IGF) and IGF-binding proteins during human osteoarthritis. *J Orthop Res* 2008, 26(4):465-74.
- [62] Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin-Arthritis Rheum* 2000, 30(2):87-99.
- [63] Muehleman C, Bareither D, Huch K, Cole AA, Kuettner KE. Prevalence of degenerative morphological changes in the joints of the lower extremity. *Osteoarthritis Cartilage* 1997, 5(1):23-37.
- [64] Neuhold LA, Killar L, Zhao W, Sung ML, Warner L, Kulik J, Turner J, Wu W, Billingham C, Meijers T, Poole AR, Babij P, DeGennaro LJ. Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice. *J Clin Invest* 2001, 107(1):35-44.
- [65] Ng KW, Saliman JD, Lin EY, Statman LY, Kugler LE, Lo SB, Ateshian GA, Hung CT. Culture duration modulates collagen hydrolysate-induced tissue

- remodeling in chondrocyte-seeded agarose hydrogels. *Ann Biomed Eng* 2007, 35(11):1914-23.
- [66] Nuki G, Salter D. The impact of mechanical stress on the pathophysiology of osteoarthritis. In: *Osteoarthritis – A companion to rheumatology*. Sharma L, Berenbaum F, Hrsg. Mosby Elsevier 2007:33-52.
- [67] Oegema TR, Carpenter RJ, Hofmeister F, Thompson RC. The interaction of the zone of calcified cartilage and subchondral bone in osteoarthritis. *Microsc Res Tech* 1997, 37(4):324-332.
- [68] Oehler S, Neureiter D, Meyer-Scholten C, Aigner T. Subtyping of osteoarthritic synoviopathy. *Clin Exp Rheumatol* 2002, 20(5):633-40.
- [69] Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of ¹⁴C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr* 1999, 129(10):1891-5.
- [70] Oesser S, Haggemueller D, Schulze CH. Influence of collagen hydrolysate on the extracellular matrix metabolism of human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2005, 13(Suppl 1):S152.
- [71] Oesser S, Proksch E, Schunck M. Prophylactic treatment with a special collagen hydrolysate decreases cartilage tissue degeneration in the knee joints. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16(Suppl 4):S45.
- [72] Oesser S, Seifert J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res* 2003, 311(3):393-9.
- [73] Ohara H, Iida H, Ito K, Takeuchi Y, Nomura Y. Effects of Pro-Hyp, a collagen hydrolysate-derived peptide, on hyaluronic acid synthesis using in vitro cultured synovium cells and oral ingestion of collagen hydrolysates in a guinea pig model of osteoarthritis. *Biosci Biotechnol Biochem* 2010, 74(10):2096-9.
- [74] Otte P. Struktur des Krankheitsbildes. In: *Der Arthrose-Prozess. Gelenkerhaltung – Gefährdung – Destruktion. Teil 1: Osteochondrale Strukturen*. Otte P, Hrsg. Nürnberg: Novartis Pharma Verlag, 2000:9-11.
- [75] Otte P. Knorpeldestruktion. In: *Der Arthrose-Prozess. Gelenkerhaltung – Gefährdung – Destruktion. Teil 1: Osteochondrale Strukturen*. Otte P, Hrsg. Nürnberg: Novartis Pharma Verlag 2000, 115-90.
- [76] Paracelsus. dritte defensio 1538.

- [77] Raabe O, Reich C, Wenisch S, Hild A, Burg-Roderfeld M, Siebert HC, Arnold S. Hydrolysed fish collagen induced chondrogenic differentiation of equine adipose tissue-derived stromal cells. *Histochem Cell Biol* 2010, 134(6):545-54.
- [78] Ricard-Blum S. The collagen family. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011, 3:a004978.
- [79] Roach HI, Aigner T, Soder S, Haag J, Welkerling H. Pathobiology of osteoarthritis: Pathomechanisms and potential therapeutic targets. *Current Drug Targets* 2007, 8(2):271-82.
- [80] Roach HI. The complex pathology of osteoarthritis: Even mitochondria are involved. *Arthritis Rheum* 2008, 58(8):2217-8.
- [81] Rollín R, Álvarez-Lafuente R, Marco F, García-Asenjo JA, Jover JÁ, Rodríguez L, López-Durán L, Fernández-Gutiérrez B. Abnormal transforming growth factor- β expression in mesenchymal stem cells from patients with osteoarthritis. *J Rheumatol* 2008, 35(5):904-6.
- [82] Roth A, Fuhrmann R, Venbrocks R. Gonarthrose. In: *Interdisziplinäre klinische Rheumatologie: Innere Medizin – Orthopädie – Immunologie*. Zeidler H, Zacher J, Hiepe F, Hrsg. Berlin: Springer-Verlag, 2001:794-802.
- [83] Sahebjam S, Khokha R, Mort JS. Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of TIMP3^{-/-} mice. *Arthritis Rheum* 2007, 56(3):905-9.
- [84] Sandell LJ. Anabolic factors in degenerative joint disease. *Curr Drug Targets* 2007, 8(2):359-65.
- [85] Schadow S, Siebert H-C, Lochnit G, Kordelle J, Rickert M, Steinmeyer J. Collagen metabolism of human osteoarthritic articular cartilage as modulated by bovine collagen hydrolysates. *PLOS ONE* 2013, 8(1):e53955.
- [86] Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB. Inhibition of endogenous TGF- β during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol* 2002, 169(1):507-14.
- [87] Schunck M, Schulze CH, Oesser S. Collagen hydrolysate supplementation stimulates proteoglycan metabolism and gene expression of articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2007, 15(Suppl 2):B136.
- [88] Scott I, Midha A, Rashid U, Ball S, Walding A, Kerry P, Delaney S, Cruwys S. Correlation of gene and mediator expression with clinical endpoints in an

- acute interleukin-1 β -driven model of joint pathology. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17(6):790-7.
- [89] Siebert H-C, Burg-Roderfeld M, Eckert T, Stötzel S, Kirch U, Diercks T, Humphries MJ, Frank M, Wechselberger R, Tajkhorshid E, Oesser S. Interaction of the α 2A domain of integrin with small collagen fragments. *Protein Cell* 2010, 1(4):393-405.
- [90] Steinmeyer J, Konttinen YT. Oral treatment options for degenerative joint disease – presence and future. *Advanced Drug Delivery* 2006, 58:168-211.
- [91] Stevens AL., Wheeler CA, Tannenbaum SR, Grodzinsky AJ. Nitric oxide enhances aggrecan degradation by aggrecanase in response to TNF-alpha but not IL-1beta treatment at a post-transcriptional level in bovine cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 2008, 16(4):489-97.
- [92] Switzer BR, Summer GK. Improved method for hydroxyproline analysis in tissue hydrolysates. *Anal Biochem* 1971, 39(2):487-91.
- [93] Takaishi H, Kimura T, Dalal S, Okada Y, D'Armiento J. Joint disease and matrix metalloproteinases: A role for MMP-13. *Curr Pharm Biotechnol* 2008, 9(1):47-54.
- [94] Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C. Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 1994, 200:142-8.
- [95] Thambyah A, Broom N. On new bone formation in the pre-osteoarthric joint. *Osteoarthritis Cartilage* 2009, 17(4):456-63.
- [96] Tiffany A, Chen LX. Complementary and alternative medicine in osteoarthritis. In: *Osteoarthritis – A companion to rheumatology*. Sharma L, Berenbaum F, Hrsg. Mosby Elsevier 2007, 202-16.
- [97] Tsikas D. Methods of quantitative analysis of the nitric oxide metabolites nitrite and nitrate in human biological fluids. *Free Radic Res* 2005, 39(8):797-815.
- [98] Verordnung EG Nr. 1924/2006, Health-Claims-Verordnung.
<http://www.health-claims-verordnung.de> (Zugriff: 07.06.2011)
- [99] Walrand S, Chiotelli E, Noirt F, Mwewa S, Lassel T. Consumption of a functional fermented milk containing collagen hydrolysate improves the concentration of collagen-specific amino acids in plasma. *J Agric Food Chem* 2008, 56(17):7790-5.

- [100] Wollheim F, Lohmander S. Pathology and animal models of osteoarthritis. In: Osteoarthritis – A companion to rheumatology. Sharma L, Berenbaum F, Hrsg. Mosby Elsevier 2007:104-12.
- [101] Wu JJ, Weis MA, Kim LS, Carter BG, Eyre DR. Differences in chain usage and cross-linking specificities of cartilage type V/XI collagen isoforms with age and tissue. J Biol Chem 2009, 284(9):5539-45.

11 Tabellarischer Anhang

11.1 Einfluss der Kollagenhydrolysate auf die Kollagensynthese

Kollagensynthese Tab 11.1.1 - Tab 11.1.4: Entfernen der nicht-inkorporierten radioaktiven Präcursor

Tab 11.1.1 Radioaktivität von ^3H in den Nährmedien und nach 6 - 7 maligem Waschen der Explantate [dpm/0,1 ml]

Pat.	Hauptversuch 1			Hauptversuch 2			Hauptversuch 3		
	Region 1	Region 2	Region 3	Region 1	Region 2	Region 3	Region 1	Region 2	Region 3
1 M	3.520.686	3.547.176	3.666.599	3.814.994	4.187.866	3.741.038	2.116.480	2.077.315	2.069.456
W	7.507	4.359	2.121	3.249	4.526	3.348	1.752	2.376	1.912
2 M	3.883.280	3.934.314	4.080.806	5.060.176	4.453.154	5.115.248	3.480.244	2.556.099	2.409.449
W	3.289	2.394	2.165	6.159	4.547	3.545	2.516	2.251	1.388
3 M	3.889.426	3.711.031	3.745.703	3.786.561	4.032.252	3.584.708	2.133.517	2.595.886	2.481.854
W	2.574	5.296	2.103	2.797	3.039	3.042	1.714	1.490	1.348
4 M	2.274.136	2.178.290	2.344.295	2.295.092	2.371.399	2.252.615	2.715.018	2.936.315	3.016.162
W	735	594	1.277	1.789	1.971	1.004	1.803	2.744	1.779
5 M	2.461.672	2.344.526	2.255.795	2.401.850	2.364.609	3.356.269	4.969.098	4.754.590	5.765.798
W	1.201	1.237	962	4.565	3.207	3.146	1.618	3.201	3.183
6 M	4.426.682	2.143.007	2.414.358	2.134.948	3.043.488	2.650.185	2.743.622	3.330.617	3.773.998
W	4.677	4.603	3.997	3.760	4.066	4.021	2.636	4.384	3.254

Die Radioaktivität in dpm/0,1 ml von ^3H in den Nährmedien (= M) nach 24 stündiger Inkubation mit $20 \mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Prolin und in der 6. oder 7. Waschlösung (= W) wurde gemäß 2.2.2.1 bestimmt. Bei Patient (Pat.) Nr.1 wurde fälschlicherweise mit $27,6 \mu\text{Ci/ml}$ markiert. Da alle Knorpel dieses Patienten mit dieser Menge behandelt wurden, können die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Tab 11.1.2 Radioaktivität von ^{14}C in den Nährmedien und nach 5 - 7 maligem Waschen der Explantate aus Hauptversuch 1 [dpm / 0,1 ml]

Patient	Kontrolle	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	10 mg/ml	
RDH	1 M	1.962.149	1.864.461	1.873.373	1.935.674	1.908.772	1.899.505
	W	218	70	106	135	78	96
	2 M	1.944.489	1.809.264	1.781.095	1.954.237	1.849.553	1.838.891
	W	1.157	796	343	550	612	627
	3 M	1.896.531	1.831.849	1.833.179	1.889.874	1.848.708	1.846.885
	W	448	283	637	657	539	636
	4 M	1.649.610	1.330.519	1.367.295	1.412.355	1.755.122	1.634.163
	W	382	425	395	538	320	318
	5 M	1.356.318	1.672.883	1.478.864	1.276.498	1.123.154	1.282.328
	W	705	793	778	476	507	577
	6 M	2.011.167	1.965.852	1.985.474	2.036.958	1.981.190	1.969.008
	W	1.269	765	1.805	915	834	999
RDH-N	1 M	2.002.879	1.914.827	1.861.051	2.150.727	2.138.578	2.026.574
	W	219	73	68	148	64	83
	2 M	1.863.756	1.873.406	1.907.198	1.998.010	1.945.373	1.755.618
	W	745	903	658	646	690	604
	3 M	1.853.404	1.829.153	1.882.629	1.937.145	1.867.953	1.854.238
	W	935	447	610	460	358	608
	4 M	1.294.990	1.354.262	1.496.281	1.881.049	1.359.541	1.516.430
	W	225	231	211	223	326	164
	5 M	1.419.997	1.522.387	1.342.554	1.522.229	1.420.433	1.403.996
	W	927	217	1.470	822	625	465
	6 M	2.099.290	1.920.544	1.932.834	2.087.147	2.036.197	2.046.039
	W	1.815	950	500	845	1.184	495
CH-alpha [®]	1 M	1.981.682	2.143.558	1.981.186	2.115.875	2.027.672	1.917.025
	W	19	146	71	62	16	48
	2 M	1.861.331	1.872.875	1.925.217	1.942.243	1.908.963	1.838.176
	W	473	593	350	559	540	338
	3 M	1.858.457	1.813.403	1.872.351	1.886.325	1.851.006	1.820.976
	W	403	529	211	323	386	149
	4 M	1.611.634	1.196.365	1.233.751	1.253.410	1.284.031	1.278.880
	W	323	338	601	324	489	220
	5 M	1.504.076	1.496.747	1.577.534	1.539.436	1.708.030	1.570.384
	W	498	377	325	572	263	605
	6 M	1.948.588	2.049.045	2.006.414	1.938.841	1.852.791	1.894.894
	W	1.681	660	1.254	605	2.605	2.108

Die Radioaktivität in dpm/0,1 ml von ^{14}C in den Nährmedien (= M) nach 24 stündiger Inkubation mit $10\ \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Prolin und der 5. - 7. Waschlösung (= W) wurde gemäß 2.2.2.1 bestimmt. Bei Patient Nr.6 wurde fälschlicherweise mit $9,8\ \mu\text{Ci/ml}$ markiert. Da alle Knorpel dieses Patienten mit dieser Menge behandelt wurden, können die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Tab 11.1.3 Radioaktivität von ^{14}C in den Nährmedien und nach 3 - 5 maligem Waschen der Explantate aus Hauptversuch 2 [dpm/0,1 ml]

Patient	Kontrolle	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	10 mg/ml	
RDH	1 M	2.050.449	1.997.843	2.017.909	2.098.710	1.977.449	1.980.590
	W	1.208	1.160	688	521	1.175	1.009
	2 M	2.051.344	1.957.926	1.940.672	2.032.874	2.072.006	2.024.487
	W	1.321	711	1.102	1.240	1.149	1.143
	3 M	1.671.882	979.815	383.487	1.145.138	1.472.015	1.546.297
	W	1.409	636	274	783	463	994
	4 M	1.408.397	1.687.082	1.542.797	1.822.011	1.683.730	1.554.971
	W	1.036	1.607	802	1.033	743	590
	5 M	1.106.356	1.218.458	1.255.260	1.187.463	1.279.487	1.479.829
	W	646	719	1.084	780	854	531
	6 M	1.323.876	1.039.757	1.162.318	935.448	1.167.796	1.227.809
	W	1.830	1.242	2.002	690	706	1.173
RDH-N	1 M	2.091.216	1.952.802	1.945.969	2.189.034	2.055.272	2.058.818
	W	1.108	1.115	785	1.797	1.003	506
	2 M	2.046.707	1.919.151	1.972.778	2.029.695	1.986.735	1.977.286
	W	885	950	537	924	576	884
	3 M	1.124.503	1.335.353	1.257.555	1.219.519	1.321.474	1.048.171
	W	435	1.142	952	1.801	979	1.319
	4 M	1.792.307	1.413.385	1.167.761	1.411.902	1.860.321	1.840.848
	W	1.839	885	974	1.039	1.446	1.326
	5 M	1.556.986	1.411.229	1.501.290	1.573.445	1.770.748	1.431.621
	W	1.708	1.328	1.444	2.820	1.235	1.679
	6 M	1.142.932	950.983	1.499.941	1.291.433	1.261.059	1.323.310
	W	1.089	1.247	1.441	1.290	1.151	2.178
CH-alpha®	1 M	1.983.268	1.952.061	1.939.638	2.086.161	1.951.843	1.921.706
	W	756	989	524	1.011	1.161	1.023
	2 M	1.965.338	2.002.015	1.973.413	1.978.268	1.960.258	1.900.116
	W	532	1.120	1.108	1.352	359	1.345
	3 M	1.438.888	1.222.810	1.257.890	1.220.726	1.164.150	1.208.472
	W	1.080	1.140	1.029	1.876	882	937
	4 M	1.482.639	1.463.994	1.577.446	1.540.644	1.267.389	1.181.615
	W	859	542	604	2.228	299	773
	5 M	1.489.889	1.508.158	1.291.070	1.701.034	1.603.542	1.273.722
	W	1.266	1.790	1.407	1.702	1.740	1.518
	6 M	1.173.807	1.721.626	1.643.986	1.473.566	1.586.548	1.530.694
	W	1.742	2.238	1.276	1.574	2.059	1.253

Die Radioaktivität in dpm/0,1 ml von ^{14}C in den Nährmedien (= M) nach 24 stündiger Inkubation mit $10\ \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Prolin und der 3. - 5. Waschlösung (= W) wurde gemäß 2.2.2.1 bestimmt. Bei Patient Nr.1 wurde fälschlicherweise mit $9,8\ \mu\text{Ci/ml}$ markiert. Da alle Knorpel dieses Patienten mit dieser Menge behandelt wurden, können die Ergebnisse miteinander verglichen werden.

Tab 11.1.4 Radioaktivität von ^{14}C in den Nährmedien und nach 3 - 5 maligem Waschen der Explantate aus Hauptversuch 3 [dpm/0,1 ml]

	Patient	Kontrolle	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml	2 mg/ml	10 mg/ml	
FGH	1	M	1.411.142	1.738.139	1.331.997	1.397.939	1.850.553	1.806.916
		W	1.110	1.561	971	1.729	1.640	1.080
	2	M	1.297.829	1.675.108	1.730.580	1.642.697	1.348.940	1.235.460
		W	585	398	480	551	572	586
	3	M	1.702.353	1.736.049	1.800.919	1.688.673	1.864.394	1.772.147
		W	454	589	732	842	296	532
	4	M	1.190.415	1.794.085	1.244.373	1.513.665	1.875.263	1.348.288
		W	680	1.614	1.020	968	1.113	535
	5	M	2.038.978	2.135.771	1.708.204	1.897.370	1.685.991	1.666.193
		W	1.962	3.040	1.443	2.148	1.415	1.199
	6	M	2.150.854	1.945.521	1.934.284	1.978.410	1.895.871	2.075.694
		W	462	1.469	976	1.175	700	531
FGH-N	1	M	1.689.501	1.863.580	1.922.776	2.154.804	1.983.452	1.929.220
		W	2.660	2.008	1.367	1.885	1.715	1.339
	2	M	1.682.305	1.668.074	1.652.167	2.123.262	1.506.268	1.937.935
		W	693	317	543	1.128	763	912
	3	M	1.588.366	1.811.184	1.895.990	1.514.511	1.979.528	1.555.443
		W	915	692	402	884	701	786
	4	M	1.448.407	1.121.884	1.313.768	1.507.183	1.414.347	1.548.157
		W	1.810	748	498	954	1.461	1.084
	5	M	1.595.522	1.844.356	1.815.311	1.685.021	1.679.123	1.737.170
		W	1.806	2.466	1.149	2.421	2.703	2.884
	6	M	2.079.331	1.793.676	1.957.714	1.958.755	1.969.120	1.963.562
		W	572	782	551	895	850	541
Mobiforte®	1	M	2.147.491	1.840.533	1.875.957	2.006.775	2.077.220	1.764.735
		W	2.085	2.105	1.947	2.629	3.170	1.333
	2	M	1.906.871	1.828.484	1.604.602	2.153.019	1.899.112	1.914.874
		W	662	590	174	941	348	446
	3	M	1.714.204	1.828.618	1.743.201	1.997.583	1.747.572	1.473.527
		W	646	856	733	625	616	832
	4	M	1.273.740	1.272.394	-1	1.317.179	1.818.356	1.503.575
		W	1.355	1.385	1.031	2.310	2.134	1.839
	5	M	1.645.755	1.992.204	1.712.280	1.847.896	1.657.736	1.612.638
		W	1.541	2.608	3.031	1.866	2.326	2.268
	6	M	2.030.740	2.103.656	1.861.119	2.122.864	1.889.066	1.996.012
		W	1.553	1.463	1.227	1.083	775	930

Die Radioaktivität in dpm/0,1 ml von ^{14}C in den Nährmedien (= M) nach 24 stündiger Inkubation mit $10\ \mu\text{Ci/ml}$ ^{14}C -Prolin und der 3. - 5. Waschlösung (= W) wurde gemäß 2.2.2.1 bestimmt. Pipettierfehler bei Patient Nr.4 bei 0,5 mg/ml Mobiforte®.

Kollagensynthese Tab 11.1.5 - Tab 11.1.6: Aufreinigung von Hydroxyprolin

Tab 11.1.5 ^3H -Radioaktivität der Lösungen einzelner Aufreinigungsschritte bei der Bestimmung von Hydroxyprolin in säurehydrolysierten Knorpelimplantaten

^3H	Knorpelhydrolysat [dpm/mg TG]	1. Toluolschicht [dpm/mg TG]	Probe [dpm/mg TG]
Kontrolle	45421 (100 %)	13927 (30,7 %)	690 (1,52 %)
	51731 (100 %)	6464 (12,5 %)	554 (1,07 %)
	44375 (100 %)	14175 (31,9 %)	2084 (4,70 %)
	17835 (100 %)	3327 (18,7 %)	364 (2,04 %)
10 mg/ml	32738 (100 %)	9815 (30,0 %)	541 (1,65 %)
	40609 (100 %)	11594 (28,6 %)	959 (2,36 %)
	28637 (100 %)	8087 (28,2 %)	906 (3,16 %)
	23164 (100 %)	3706 (16,0 %)	581 (2,51 %)
2 mg/ml	39521 (100 %)	13168 (33,3 %)	634 (1,60 %)
	52133 (100 %)	7918 (15,2 %)	441 (0,85 %)
	36498 (100 %)	11408 (31,3 %)	1040 (2,85 %)
	27544 (100 %)	5682 (20,6 %)	771 (2,80 %)
$\bar{x} \pm \text{SD}$	36684 ± 10979	9106 ± 3827	797 ± 455
$\bar{x} \pm \text{SD in \%}$	$100 \% \pm 0 \%$	$24,8 \% \pm 7,6 \%$	$2,25 \% \pm 1,06 \%$

Die Angaben beziehen sich auf die Schritte der Hydroxyprolin-Nachweismethode gemäß 2.2.2.2. Das „Knorpelhydrolysat“ gibt die Gesamtradioaktivität von ^3H in den säurehydrolysierten Knorpelimplantaten an. Die „1. Toluolschicht“ entspricht der Gesamtradioaktivität von ^3H des Toluolüberstandes nach Oxidation und Toluolextraktion. Die Radioaktivität der „Probe“ setzt sich zusammen aus der ^3H -Radioaktivität der Probe inkl. der 1. Waschung nach Elution von der Kieselsäure-Säule, wobei die Radioaktivität auf den Gesamtoluolüberstand hochgerechnet wurde.

Angegeben sind die dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Die in Klammern angegebenen Werte geben die prozentuale Abnahme der Radioaktivität an. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten und prozentualen Werte (N = 12).

Tab 11.1.6 ^{14}C -Radioaktivität der Lösungen einzelner Aufreinigungsschritte bei der Bestimmung von Hydroxyprolin in säurehydrolysierten Knorpelimplantaten

^{14}C	Knorpelhydrolysat [dpm/mg TG]	1. Toluolschicht [dpm/mg TG]	Probe [dpm/mg TG]
Kontrolle	20453 (100 %)	5113 (25,0 %)	188 (0,92 %)
	24933 (100 %)	3048 (12,2 %)	387 (1,55 %)
	24890 (100 %)	6333 (25,4 %)	1424 (5,72 %)
	13469 (100 %)	2025 (15,0 %)	375 (2,78 %)
10 mg/ml	14047 (100 %)	3655 (26,0 %)	146 (1,04 %)
	18317 (100 %)	4481 (24,5 %)	361 (1,97 %)
	14777 (100 %)	3551 (24,0 %)	419 (2,83 %)
	15941 (100 %)	2189 (13,7 %)	332 (2,08 %)
2 mg/ml	17677 (100 %)	4750 (26,9 %)	169 (0,95 %)
	24198 (100 %)	3648 (15,1 %)	209 (0,86 %)
	20188 (100 %)	5249 (26,0 %)	569 (2,82 %)
	21229 (100 %)	3531 (16,6 %)	534 (2,52 %)
$\bar{x} \pm \text{SD}$	19176 \pm 4151	3964 \pm 1271	426 \pm 343
$\bar{x} \pm \text{SD in \%}$	100 % \pm 0 %	20,9 % \pm 5,7 %	2,09 % \pm 1,40 %

Die Angaben beziehen sich auf die Schritte der Hydroxyprolin-Nachweismethode gemäß 2.2.2.2. Das „Knorpelhydrolysat“ gibt die Gesamtradioaktivität von ^{14}C in den säurehydrolysierten Knorpelimplantaten an. Die „1. Toluolschicht“ entspricht der Gesamtradioaktivität von ^{14}C des Toluolüberstandes nach Oxidation und Toluolextraktion. Die Radioaktivität der „Probe“ setzt sich zusammen aus der ^{14}C -Radioaktivität der Probe inkl. der 1. Waschung nach Elution von der Kieselsäure-Säule, wobei die Radioaktivität auf den Gesamttoluolüberstand hochgerechnet wurde.

Angegeben sind die dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Die in Klammern angegebenen Werte geben die prozentuale Abnahme der Radioaktivität an. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der absoluten und prozentualen Werte (N = 12).

Kollagensynthese Tab 11.1.7 - Tab 11.1.15: Inkorporation von ^{14}C -Prolin und ^3H -Prolin

Tab 11.1.7 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von RDH auf die Inkorporation von ^{14}C -Prolin und ^3H -Prolin von Knorpel-plantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	^{14}C [dpm/mg TG]	^3H [dpm/mg TG]	Verhältnis $^{14}\text{C}/^3\text{H}$	Verhältnis %	
Globaleffekt							
p < 0,001							
0 mg/ml	1	13,1	3,4	1248,4	1353,3	0,922	100,0
	2	21,2	6,5	666,1	878,6	0,758	100,0
	3	7,7	1,9	1543,8	3946,7	0,391	100,0
	4	16,7	4,2	29,7	85,9	0,346	100,0
	5	15,9	4,1	1001,8	2003,7	0,500	100,0
	6	16,8	5,5	1319,3	2586,5	0,510	100,0
$\bar{x} \pm \text{SD}$		15,2 ± 4,5	4,3 ± 1,6	968,2 ± 548,8	1809,1 ± 1360,5	0,571 ± 0,224	100,0 ± 0,0
Median							100,0
Gesamt-Med							100,0
0,1 mg/ml	1	15,2	3,9	726,9	786,2	0,925	100,2
	2	22,2	6,7	540,4	799,2	0,676	89,2
	3	8,3	2,6	1159,8	2961,1	0,392	100,1
	4	13,4	3,5	252,8	778,5	0,325	93,7
	5	17,8	5,2	1040,2	2122,9	0,490	98,0
	6	17,8	6,2	801,1	1425,6	0,562	110,2
$\bar{x} \pm \text{SD}$		15,8 ± 4,7	4,7 ± 1,6	753,5 ± 330,6	1478,9 ± 899,7	0,562 ± 0,217	98,6 ± 7,1
Median							99,1
Gesamt-Med							92,9
p-Wert							0,383
0,5 mg/ml	1	13,4	3,5	1240,0	1817,9	0,682	73,9
	2	15,0	4,1	778,6	1292,0	0,603	79,5
	3	9,6	3,0	2166,6	5011,5	0,432	110,5
	4	10,9	2,7	27,4	126,2	0,217	62,6
	5	16,7	4,3	677,3	1600,5	0,423	84,6
	6	20,4	7,1	598,9	1253,1	0,478	93,7
$\bar{x} \pm \text{SD}$		14,3 ± 4,0	4,1 ± 1,6	914,8 ± 726,0	1850,2 ± 1655,1	0,472 ± 0,161	84,1 ± 16,6
Median							82,1
Gesamt-Med							78,0
p-Wert							< 0,001
1 mg/ml	1	18,3	4,5	972,3	1118,9	0,869	94,2
	2	14,5	4,2	123,9	180,3	0,687	90,7
	3	14,6	4,0	1804,0	5274,8	0,342	87,4
	4	17,7	4,4	60,8	193,9	0,314	90,5
	5	13,4	3,4	806,0	1840,9	0,438	87,6
	6	15,0	5,0	790,6	1736,1	0,455	89,3

Tab 11.1.7: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %
$\bar{x} \pm SD$	15,6 ± 2,0	4,3 ± 0,5	759,6 ± 637,4	1724,1 ± 1882,2	0,518 ± 0,217	90,0 ± 2,5
Median						89,9
Gesamt-Med						87,6
p-Wert						0,009
2 mg/ml 1	11,7	3,0	649,6	916,6	0,709	76,8
2	17,2	5,4	720,5	1178,3	0,611	80,7
3	13,2	3,8	928,7	2479,3	0,375	95,8
4	12,1	3,0	28,7	156,4	0,184	53,0
5	13,8	3,7	782,2	1738,0	0,450	90,0
6	14,5	5,2	606,9	1373,4	0,442	86,6
$\bar{x} \pm SD$	13,8 ± 2,0	4,0 ± 1,1	619,4 ± 310,6	1307,0 ± 782,0	0,462 ± 0,184	80,5 ± 15,0
Median						83,6
Gesamt-Med						80,0
p-Wert						< 0,001
10 mg/ml 1	13,5	3,4	914,3	1322,3	0,691	75,0
2	18,7	5,8	666,8	1365,1	0,488	64,4
3	12,8	3,8	1233,7	4403,6	0,280	71,6
4	14,7	3,5	59,2	307,2	0,193	55,6
5	17,4	5,0	601,9	1437,1	0,419	83,8
6	17,1	5,5	439,7	1098,2	0,400	78,5
$\bar{x} \pm SD$	15,7 ± 2,4	4,5 ± 1,1	652,6 ± 401,6	1655,6 ± 1408,8	0,412 ± 0,173	71,5 ± 10,1
Median						73,3
Gesamt-Med						66,1
p-Wert						< 0,001

Dargestellt ist die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin. Die Radioaktivität wurde gemäß 2.2.2.2 bestimmt. ¹⁴C entspricht dem Gehalt an ¹⁴C-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten, die mit RDH behandelt wurden. ³H spiegelt den Gehalt an ³H-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten vor Behandlung mit RDH wider. Der Gehalt ist jeweils angegeben in dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Das Verhältnis ¹⁴C/³H gibt die Inkorporation nach und vor Zugabe von RDH an. Das Verhältnis ist angegeben als Absolutwert und in Prozent zum unbehandelten Kontrollimplantat (= 100 %). NG entspricht dem Nassgewicht.

Durch eine dreifaktorielle Varianzanalyse konnten keine Unterschiede in der Wirkung zwischen frühen und mittleren OA-Stadien gefunden werden, weshalb die Statistik anhand der Werte aus beiden Stadien berechnet wurde. Ein globaler Effekt von RDH auf das Inkorporations-Verhältnis wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt (p-Wert). Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane der Knorpelimplantate aus mittleren OA-Stadien, sowie der Gesamt-Median (=Gesamt-Med) berechnet aus den Werten aus frühen und mittleren OA-Stadien.

Tab 11.1.8 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von RDH auf die Inkorporation von ^{14}C -Prolin und ^3H -Prolin von Knorpelxplantaten aus frühen OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	^{14}C [dpm/mg TG]	^3H [dpm/mg TG]	Verhältnis $^{14}\text{C}/^3\text{H}$	Verhältnis %	
Globaleffekt siehe Tab 11.1.7							
0 mg/ml	1	25,4	7,6	187,9	689,5	0,273	100,0
	2	19,6	7,1	590,4	899,5	0,656	100,0
	3	23,1	6,5	386,6	554,2	0,698	100,0
	4	18,7	6,1	355,4	572,1	0,621	100,0
	5	24,0	5,8	1423,5	2084,1	0,683	100,0
	6	28,3	9,9	374,8	364,3	1,029	100,0
$\bar{x} \pm \text{SD}$		23,2 \pm 3,6	7,2 \pm 1,5	553,1 \pm 445,2	860,6 \pm 624,7	0,660 \pm 0,241	100,0 \pm 0,0
Median							100,0
0,1 mg/ml	1	19,6	5,6	225,7	778,9	0,290	106,3
	2	15,1	5,1	983,1	1806,9	0,544	82,9
	3	17,9	4,9	601,7	1207,4	0,498	71,4
	4	21,5	7,3	311,0	603,5	0,515	82,9
	5	19,9	5,0	689,2	1096,2	0,629	92,0
	6	24,5	8,2	434,6	545,2	0,797	77,5
$\bar{x} \pm \text{SD}$		19,8 \pm 3,2	6,0 \pm 1,4	540,9 \pm 277,4	1006,4 \pm 472,4	0,546 \pm 0,167	85,5 \pm 12,3
Median							82,9
0,5 mg/ml	1	19,6	5,8	189,8	725,4	0,262	96,0
	2	19,0	6,5	699,6	1222,7	0,572	87,2
	3	26,0	8,1	92,8	487,0	0,191	27,3
	4	17,1	5,5	414,9	979,5	0,424	68,2
	5	22,6	6,0	838,6	1604,4	0,523	76,5
	6	30,5	10,2	218,2	315,8	0,691	67,2
$\bar{x} \pm \text{SD}$		22,5 \pm 5,0	7,0 \pm 1,8	409,0 \pm 301,2	889,1 \pm 479,2	0,444 \pm 0,191	70,4 \pm 23,9
Median							72,4
1 mg/ml	1	16,6	7,0	137,7	538,5	0,256	93,8
	2	17,9	5,7	861,2	1497,2	0,575	87,6
	3	20,8	6,0	20,8	52,1	0,399	57,2
	4	19,8	6,1	425,1	904,0	0,470	75,7
	5	20,8	5,4	1088,0	1874,2	0,581	85,0
	6	24,9	7,1	517,6	642,8	0,805	78,3
$\bar{x} \pm \text{SD}$		20,1 \pm 2,9	6,2 \pm 0,7	508,4 \pm 410,5	918,1 \pm 666,3	0,514 \pm 0,187	79,6 \pm 12,8
Median							81,6
2 mg/ml	1	23,5	7,6	168,7	633,8	0,266	97,6
	2	14,6	5,1	633,0	1208,0	0,524	79,8
	3	20,0	5,7	208,5	440,4	0,473	67,9
	4	22,7	7,7	147,0	383,6	0,383	61,7
	5	26,4	7,6	570,2	1042,4	0,547	80,1
	6	24,6	6,9	534,7	771,8	0,693	67,3
$\bar{x} \pm \text{SD}$		22,0 \pm 4,2	6,8 \pm 1,1	377,0 \pm 224,7	746,7 \pm 328,4	0,481 \pm 0,146	75,7 \pm 13,0
Median							73,9

Tab 11.1.8: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %
10 mg/ml						
1	25,5	8,2	145,9	540,4	0,270	99,0
2	21,0	8,1	496,2	1315,1	0,377	57,5
3	21,2	6,1	361,2	958,8	0,377	54,0
4	23,1	7,9	106,8	389,9	0,274	44,1
5	20,7	6,5	418,6	905,0	0,463	67,7
6	26,1	8,5	331,7	580,6	0,571	55,5
$\bar{x} \pm SD$	22,9 ± 2,4	7,6 ± 1,0	310,1 ± 153,5	781,6 ± 341,5	0,389 ± 0,115	63,0 ± 19,2
Median						56,5

Dargestellt ist die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin. Die Radioaktivität wurde gemäß 2.2.2.2 bestimmt. ¹⁴C entspricht dem Gehalt an ¹⁴C-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten, die mit RDH behandelt wurden. ³H spiegelt den Gehalt an ³H-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten vor Behandlung mit RDH wider. Der Gehalt ist jeweils angegeben in dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Das Verhältnis ¹⁴C/³H gibt die Inkorporation nach und vor Zugabe von RDH an. Das Verhältnis ist angegeben als Absolutwert und in Prozent zum unbehandelten Kontrollimplantat (= 100 %). NG entspricht dem Nassgewicht.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Durch eine dreifaktorielle Varianzanalyse konnten keine Unterschiede in der Wirkung zwischen frühen und mittleren OA-Stadien gefunden werden, weshalb die Statistik anhand der Werte aus beiden Stadien berechnet wurde. Ein globaler Effekt von RDH auf das Inkorporations-Verhältnis wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht und ist in Tab 11.1.7 aufgeführt. Da ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt (p-Wert). Die berechneten p-Werte sind ebenfalls in Tab 11.1.7 aufgeführt.

Tab 11.1.9 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von RDH-N auf die Inkorporation von ^{14}C -Prolin und ^3H -Prolin von Knorpel-plantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	^{14}C [dpm/mg TG]	^3H [dpm/mg TG]	Verhältnis $^{14}\text{C}/^3\text{H}$	Verhältnis %
Globaleffekt p = 0,325						
0 mg/ml 1	15,5	3,9	566,8	463,6	1,223	100,0
2	15,2	4,6	1019,9	1265,5	0,806	100,0
3	17,3	4,7	676,5	1694,9	0,399	100,0
4	8,5	2,2	90,7	381,3	0,238	100,0
5	21,0	5,7	1349,3	2950,8	0,457	100,0
6	21,0	6,7	747,4	1143,9	0,653	100,0
$\bar{x} \pm \text{SD}$	16,4 \pm 4,6	4,6 \pm 1,5	741,8 \pm 425,5	1316,7 \pm 943,2	0,629 \pm 0,352	100,0 \pm 0,0
Median						100,0
Gesamt-Med						100,0
0,1 mg/ml 1	16,5	4,5	438,1	350,9	1,248	102,1
2	11,2	3,8	1014,8	1396,9	0,726	90,1
3	8,0	2,1	1417,0	2981,3	0,475	119,1
4	11,8	2,9	92,8	277,9	0,334	140,4
5	13,7	2,8	632,2	1485,6	0,426	93,1
6	17,4	5,1	642,0	1222,3	0,525	80,4
$\bar{x} \pm \text{SD}$	13,1 \pm 3,5	3,5 \pm 1,1	706,1 \pm 460,0	1285,8 \pm 981,9	0,622 \pm 0,333	104,2 \pm 22,0
Median						97,6
Gesamt-Med						102,4
0,5 mg/ml 1	16,7	5,1	649,2	668,4	0,971	79,4
2	14,5	4,6	816,8	981,6	0,832	103,3
3	11,1	2,9	1457,1	3643,4	0,400	100,2
4	8,2	2,2	139,2	597,8	0,233	97,9
5	11,4	2,8	2356,4	6086,2	0,387	84,7
6	9,0	3,5	360,9	760,1	0,475	72,7
$\bar{x} \pm \text{SD}$	11,8 \pm 3,3	3,5 \pm 1,1	963,3 \pm 818,1	2122,9 \pm 2263,7	0,550 \pm 0,287	89,7 \pm 12,5
Median						91,3
Gesamt-Med						119,3
1 mg/ml 1	17,1	4,4	1110,4	937,9	1,184	96,8
2	15,1	4,6	666,8	829,1	0,804	99,8
3	10,9	3,5	926,4	1915,9	0,484	121,1
4	11,5	2,7	242,9	672,4	0,361	151,9
5	12,5	3,2	1680,7	3781,6	0,444	97,2
6	14,5	4,5	497,4	1117,5	0,445	68,1
$\bar{x} \pm \text{SD}$	13,6 \pm 2,4	3,8 \pm 0,8	854,1 \pm 508,0	1542,4 \pm 1180,3	0,620 \pm 0,316	105,8 \pm 28,2
Median						98,5
Gesamt-Med						105,1

Tab 11.1.9: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %	
2 mg/ml	1	14,7	3,2	606,1	594,7	1,019	83,4
	2	18,0	5,6	502,7	590,9	0,851	105,6
	3	9,9	2,6	1057,7	2314,8	0,457	114,5
	4	15,5	4,0	302,2	686,6	0,440	185,1
	5	11,5	2,9	1228,1	2941,2	0,418	91,3
	6	16,9	5,2	419,9	911,3	0,461	70,5
$\bar{x} \pm SD$	14,4 ± 3,1	3,9 ± 1,2	686,1 ± 371,5	1339,9 ± 1023,9	0,608 ± 0,260	108,4 ± 40,7	
Median						98,4	
Gesamt-Med						106,9	
10 mg/ml	1	10,5	3,2	612,3	552,1	1,109	90,7
	2	18,6	5,8	547,8	716,1	0,765	94,9
	3	11,6	2,8	2241,5	5904,7	0,380	95,1
	4	9,7	2,5	291,5	877,1	0,332	139,8
	5	16,8	3,8	1010,1	2503,2	0,404	88,2
	6	15,9	5,0	669,8	1062,7	0,630	96,5
$\bar{x} \pm SD$	13,9 ± 3,7	3,9 ± 1,3	895,5 ± 698,8	1936,0 ± 2066,9	0,603 ± 0,299	100,9 ± 19,3	
Median						95,0	
Gesamt-Med						95,8	

Dargestellt ist die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin. Die Radioaktivität wurde gemäß 2.2.2.2 bestimmt. ¹⁴C entspricht dem Gehalt an ¹⁴C-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten, die mit RDH-N behandelt wurden. ³H spiegelt den Gehalt an ³H-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten vor Behandlung mit RDH-N wider. Der Gehalt ist jeweils angegeben in dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Das Verhältnis ¹⁴C/³H gibt die Inkorporation nach und vor Zugabe von RDH-N an. Das Verhältnis ist angegeben als Absolutwert und in Prozent zum unbehandelten Kontrollimplantat (= 100%). NG entspricht dem Nassgewicht.

Durch eine dreifaktorielle Varianzanalyse konnten keine Unterschiede in der Wirkung zwischen frühen und mittleren OA-Stadien gefunden werden, weshalb die Statistik anhand der Werte aus beiden Stadien berechnet wurde. Ein globaler Effekt von RDH-N auf das Inkorporations-Verhältnis wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde auf ein zusätzlichen Paarvergleich nach Friedman zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verzichtet. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane der Knorpelimplantate aus mittleren OA-Stadien, sowie der Gesamt-Median (=Gesamt-Med) berechnet aus den Werten aus frühen und mittleren OA-Stadien.

Tab 11.1.10 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von RDH-N auf die Inkorporation von ^{14}C -Prolin und ^3H -Prolin von Knorpel-explantaten aus frühen OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	^{14}C [dpm/mg TG]	^3H [dpm/mg TG]	Verhältnis $^{14}\text{C}/^3\text{H}$	Verhältnis %
Globaleffekt						
siehe Tab 11.1.9						
0 mg/ml 1	26,3	8,8	379,9	648,3	0,586	100,0
2	11,2	3,6	1701,1	2875,2	0,592	100,0
3	18,1	4,9	570,2	1004,6	0,568	100,0
4	17,8	6,6	469,6	991,8	0,473	100,0
5	24,3	8,5	442,0	602,8	0,733	100,0
6	17,8	6,0	795,0	1248,1	0,637	100,0
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$19,3 \pm 5,4$	$6,4 \pm 2,0$	$726,3 \pm 499,2$	$1228,5 \pm 842,2$	$0,598 \pm 0,085$	$100,0 \pm 0,0$
Median						100,0
0,1 mg/ml 1	23,6	8,8	343,1	651,6	0,527	89,9
2	13,7	4,2	980,4	1989,7	0,493	83,3
3	23,4	8,0	390,0	669,1	0,583	102,7
4	13,5	4,6	1027,1	1939,9	0,529	111,8
5	28,3	9,8	153,9	148,9	1,033	140,9
6	20,9	5,8	766,9	983,4	0,780	122,4
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$20,6 \pm 5,9$	$6,9 \pm 2,3$	$610,2 \pm 364,3$	$1063,8 \pm 747,5$	$0,657 \pm 0,211$	$108,5 \pm 21,3$
Median						107,3
0,5 mg/ml 1	21,4	6,7	614,6	1222,3	0,503	85,8
2	11,5	3,8	1177,2	2294,3	0,513	86,7
3	20,9	6,6	457,9	668,9	0,684	120,6
4	19,2	6,0	296,5	530,9	0,558	118,0
5	22,4	7,3	471,3	499,9	0,943	128,6
6	20,3	6,1	1349,0	1582,6	0,852	133,8
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$19,3 \pm 4,0$	$6,1 \pm 1,2$	$727,7 \pm 430,2$	$1133,1 \pm 712,4$	$0,676 \pm 0,186$	$112,3 \pm 20,9$
Median						119,3
1 mg/ml 1	18,6	5,6	501,7	1000,8	0,501	85,6
2	12,7	4,2	855,0	1423,6	0,601	101,5
3	25,7	7,4	437,1	708,4	0,617	108,7
4	11,3	3,3	999,9	1589,6	0,629	132,9
5	27,9	9,9	292,4	365,2	0,801	109,2
6	15,9	5,2	997,2	1413,9	0,705	110,7
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$18,7 \pm 6,8$	$5,9 \pm 2,4$	$680,5 \pm 308,1$	$1083,6 \pm 478,4$	$0,642 \pm 0,101$	$108,1 \pm 15,3$
Median						109,0
2 mg/ml 1	22,5	6,8	461,4	784,0	0,588	100,4
2	13,0	4,4	852,5	1540,9	0,553	93,5
3	20,8	6,5	490,0	720,5	0,680	119,8
4	17,1	5,2	572,2	843,3	0,679	143,3
5	19,1	6,0	616,8	777,9	0,793	108,1
6	20,1	5,3	1287,5	1459,2	0,882	138,5
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$18,8 \pm 3,4$	$5,7 \pm 0,9$	$713,4 \pm 313,5$	$1021,0 \pm 374,0$	$0,696 \pm 0,124$	$117,3 \pm 20,3$
Median						114,0

Tab 11.1.10: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %
10 mg/ml 1	20,8	6,5	460,4	845,7	0,544	92,9
2	15,5	5,0	798,5	1643,7	0,486	82,1
3	23,7	7,2	390,5	610,4	0,640	112,7
4	17,4	6,4	553,3	1120,3	0,494	104,3
5	25,8	9,0	314,8	431,4	0,730	99,5
6	30,1	9,7	422,9	518,4	0,816	128,1
$\bar{x} \pm SD$	22,2 ± 5,4	7,3 ± 1,8	490,1 ± 170,4	861,6 ± 457,1	0,618 ± 0,134	103,3 ± 16,0
Median						101,9

Dargestellt ist die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin. Die Radioaktivität wurde gemäß 2.2.2.2 bestimmt. ¹⁴C entspricht dem Gehalt an ¹⁴C-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten, die mit RDH-N behandelt wurden. ³H spiegelt den Gehalt an ³H-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten vor Behandlung mit RDH-N wider. Der Gehalt ist jeweils angegeben in dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Das Verhältnis ¹⁴C/³H gibt die Inkorporation nach und vor Zugabe von RDH-N an. Das Verhältnis ist angegeben als Absolutwert und in Prozent zum unbehandelten Kontrollimplantat (= 100 %). NG entspricht dem Nassgewicht.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Durch eine dreifaktorielle Varianzanalyse konnten keine Unterschiede in der Wirkung zwischen frühen und mittleren OA-Stadien gefunden werden, weshalb die Statistik anhand der Werte aus beiden Stadien berechnet wurde. Ein globaler Effekt von RDH-N auf das Inkorporations-Verhältnis wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht und ist in Tab 11.1.9 aufgeführt. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde auf ein zusätzlichen Paarvergleich nach Friedman zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verzichtet. Die berechneten p-Werte sind ebenfalls in Tab 11.1.9 aufgeführt.

Tab 11.1.11 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von CH-alpha[®] auf die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin von Knorpel-explantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %	
Globaleffekt							
p < 0,001							
0 mg/ml	1	3,7	1,2	273,3	437,1	0,625	100,0
	2	12,7	3,7	966,5	1456,1	0,664	100,0
	3	8,6	2,6	1004,7	1848,2	0,544	100,0
	4	18,8	5,0	60,0	219,1	0,274	100,0
	5	13,3	3,2	1732,5	3806,9	0,455	100,0
	6	19,0	6,7	447,0	743,5	0,601	100,0
$\bar{x} \pm SD$		12,7 ± 5,9	3,7 ± 1,9	747,3 ± 611,9	1418,5 ± 1322,7	0,527 ± 0,144	100,0 ± 0,0
Median							100,0
Gesamt-Med							100,0
0,1 mg/ml	1	7,8	2,1	1015,9	1323,4	0,768	122,7
	2	8,5	2,6	1867,5	2883,3	0,648	97,6
	3	11,6	3,9	493,1	1031,4	0,478	87,9
	4	14,6	3,9	527,8	1122,9	0,470	171,6
	5	13,7	3,4	585,6	1042,1	0,562	123,5
	6	15,0	4,3	1006,2	1480,8	0,680	113,0
$\bar{x} \pm SD$		11,9 ± 3,1	3,4 ± 0,9	916,0 ± 522,0	1480,6 ± 709,1	0,601 ± 0,118	119,4 ± 29,2
Median							117,9
Gesamt-Med							106,2
p-Wert							0,326
0,5 mg/ml	1	8,7	2,8	392,9	453,6	0,866	138,5
	2	6,8	2,0	952,2	1416,2	0,672	101,3
	3	13,9	4,4	109,7	230,7	0,476	87,5
	4	17,0	4,3	509,2	1451,7	0,351	128,0
	5	11,1	2,6	981,1	1976,0	0,496	109,1
	6	17,6	5,5	752,0	1483,7	0,507	84,3
$\bar{x} \pm SD$		12,5 ± 4,4	3,6 ± 1,3	616,2 ± 341,3	1168,7 ± 675,8	0,561 ± 0,181	108,1 ± 21,7
Median							105,2
Gesamt-Med							102,5
p-Wert							0,585
1 mg/ml	1	7,8	2,1	928,1	1184,5	0,783	125,3
	2	14,7	4,6	585,3	960,6	0,609	91,8
	3	10,8	3,1	771,7	1743,9	0,443	81,4
	4	20,8	5,4	263,4	729,7	0,361	131,8
	5	14,4	3,6	535,6	1115,7	0,480	105,5
	6	19,0	6,0	284,5	442,7	0,643	106,9
$\bar{x} \pm SD$		14,6 ± 4,9	4,1 ± 1,5	561,4 ± 262,8	1029,5 ± 442,9	0,553 ± 0,154	107,1 ± 19,2
Median							106,2
Gesamt-Med							100,7
p-Wert							0,585

Tab 11.1.11: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %	
2 mg/ml	1	5,5	1,3	487,5	879,2	0,554	88,7
	2	14,2	4,3	1041,2	1745,6	0,596	89,9
	3	11,0	3,4	430,0	1151,5	0,373	68,7
	4	19,9	4,9	435,6	1469,5	0,296	108,2
	5	8,8	2,3	882,3	2368,0	0,373	81,9
	6	23,9	7,7	653,9	1347,0	0,485	80,8
$\bar{x} \pm SD$	13,9 ± 6,9	4,0 ± 2,2	655,1 ± 256,0	1493,5 ± 518,6	0,446 ± 0,117	86,3 ± 13,1	
Median						85,3	
Gesamt-Med						83,6	
p-Wert						0,009	
10 mg/ml	1	8,8	2,8	23,2	537,5	0,043	6,9
	2	12,7	3,7	106,1	1502,6	0,071	10,6
	3	11,3	3,7	9,9	43,5	0,228	42,0
	4	16,4	4,0	18,4	216,6	0,085	31,1
	5	19,8	6,0	56,4	806,1	0,070	15,4
	6	23,6	7,8	131,5	1157,6	0,114	18,9
$\bar{x} \pm SD$	15,4 ± 5,6	4,7 ± 1,9	57,6 ± 50,6	710,6 ± 557,7	0,102 ± 0,066	20,8 ± 13,3	
Median						17,1	
Gesamt-Med						10,8	
p-Wert						< 0,001	

Dargestellt ist die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin. Die Radioaktivität wurde gemäß 2.2.2.2 bestimmt. ¹⁴C entspricht dem Gehalt an ¹⁴C-markiertem Hydroxyprolin in Knorpel-explantaten, die mit CH-alpha[®] behandelt wurden. ³H spiegelt den Gehalt an ³H-markiertem Hydroxyprolin in Knorpel-explantaten vor Behandlung mit CH-alpha[®] wider. Der Gehalt ist jeweils angegeben in dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Das Verhältnis ¹⁴C/³H gibt die Inkorporation nach und vor Zugabe von CH-alpha[®] an. Das Verhältnis ist angegeben als Absolutwert und in Prozent zum unbehandelten Kontrollexplantat (= 100 %). NG entspricht dem Nassgewicht. Durch eine dreifaktorielle Varianzanalyse konnten keine Unterschiede in der Wirkung zwischen frühen und mittleren OA-Stadien gefunden werden, weshalb die Statistik anhand der Werte aus beiden Stadien berechnet wurde. Ein globaler Effekt von CH-alpha[®] auf das Inkorporations-Verhältnis wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt (p-Wert). Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane der Knorpel-explantate aus mittleren OA-Stadien, sowie der Gesamt-Median (=Gesamt-Med) berechnet aus den Werten aus frühen und mittleren OA-Stadien.

Tab 11.1.12 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von CH-alpha[®] auf die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin von Knorpel-explantaten aus frühen OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %	
Globaleffekt siehe Tab 11.1.11							
0 mg/ml	1	22,2	7,6	229,7	348,0	0,660	100,0
	2	18,9	6,6	297,3	533,0	0,558	100,0
	3	21,9	6,6	775,1	1059,4	0,732	100,0
	4	17,5	5,1	479,5	873,7	0,549	100,0
	5	23,1	7,5	404,1	544,5	0,742	100,0
	6	27,5	10,4	209,0	217,2	0,962	100,0
$\bar{x} \pm SD$		21,9 ± 3,5	7,3 ± 1,8	399,1 ± 211,2	596,0 ± 317,3	0,700 ± 0,152	100,0 ± 0,0
Median							100,0
0,1 mg/ml	1	19,9	6,2	561,7	1002,5	0,560	84,9
	2	22,7	7,7	510,6	917,2	0,557	99,8
	3	22,1	6,6	540,3	773,2	0,699	95,5
	4	19,7	4,5	604,8	1017,1	0,595	108,4
	5	20,3	6,0	410,7	531,5	0,773	104,1
	6	24,8	8,6	544,2	505,4	1,077	111,9
$\bar{x} \pm SD$		21,6 ± 2,0	6,6 ± 1,4	528,7 ± 65,6	791,2 ± 228,5	0,710 ± 0,199	100,8 ± 9,7
Median							102,0
0,5 mg/ml	1	21,9	5,8	861,6	1466,7	0,587	89,0
	2	19,5	6,4	854,8	1599,6	0,534	95,8
	3	22,8	6,5	536,2	863,4	0,621	84,9
	4	16,1	5,3	372,3	654,2	0,569	103,7
	5	21,2	6,3	452,4	557,3	0,812	109,4
	6	23,0	6,9	878,4	839,2	1,047	108,8
$\bar{x} \pm SD$		20,8 ± 2,6	6,2 ± 0,6	659,3 ± 231,3	996,7 ± 433,0	0,695 ± 0,198	98,6 ± 10,3
Median							99,8
1 mg/ml	1	21,6	6,4	627,4	1311,0	0,479	72,5
	2	19,2	4,6	1210,4	2273,2	0,532	95,5
	3	22,3	7,2	773,2	932,5	0,829	113,3
	4	23,4	6,6	542,7	1206,2	0,450	82,0
	5	26,8	8,1	432,0	555,5	0,778	104,8
	6	21,2	7,7	216,8	233,4	0,929	96,5
$\bar{x} \pm SD$		22,4 ± 2,6	6,8 ± 1,2	633,8 ± 339,1	1085,3 ± 708,0	0,666 ± 0,204	94,1 ± 14,9
Median							96,0
2 mg/ml	1	19,1	5,1	81,1	913,1	0,089	9,2
	2	14,2	6,1	226,9	543,0	0,418	74,9
	3	17,2	4,5	821,7	1580,5	0,520	71,1
	4	12,7	3,2	598,0	1268,5	0,471	85,9
	5	24,3	7,2	429,2	677,2	0,634	85,4
	6	27,3	9,5	277,8	334,3	0,831	86,4
$\bar{x} \pm SD$		19,1 ± 5,7	5,9 ± 2,2	405,8 ± 269,9	886,1 ± 468,0	0,494 ± 0,247	80,0 ± 6,7
Median							80,8

Tab 11.1.12: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %
10 mg/ml						
1	20,7	6,3	60,1	1099,3	0,055	8,3
2	19,3	7,6	36,1	568,1	0,064	11,4
3	18,6	5,1	57,8	1399,8	0,041	5,6
4	17,6	5,3	50,4	1055,5	0,048	8,7
5	20,8	6,5	64,0	791,0	0,081	10,9
6	21,2	6,7	81,1	913,1	0,089	9,2
$\bar{x} \pm SD$	19,7 ± 1,4	6,3 ± 0,9	58,2 ± 14,9	971,1 ± 284,8	0,063 ± 0,019	9,0 ± 2,1
Median						9,0

Dargestellt ist die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin. Die Radioaktivität wurde gemäß 2.2.2.2 bestimmt. ¹⁴C entspricht dem Gehalt an ¹⁴C-markiertem Hydroxyprolin in Knorpel-explantaten, die mit CH-alpha[®] behandelt wurden. ³H spiegelt den Gehalt an ³H-markiertem Hydroxyprolin in Knorpel-explantaten vor Behandlung mit CH-alpha[®] wider. Der Gehalt ist jeweils angegeben in dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Das Verhältnis ¹⁴C/³H gibt die Inkorporation nach und vor Zugabe von CH-alpha[®] an. Das Verhältnis ist angegeben als Absolutwert und in Prozent zum unbehandelten Kontroll-explantat (= 100 %). NG entspricht dem Nassgewicht. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Durch eine dreifaktorielle Varianzanalyse konnten keine Unterschiede in der Wirkung zwischen frühen und mittleren OA-Stadien gefunden werden, weshalb die Statistik anhand der Werte aus beiden Stadien berechnet wurde. Ein globaler Effekt von CH-alpha[®] auf das Inkorporations-Verhältnis wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht und ist in Tab 11.1.11 aufgeführt. Da ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt (p-Wert). Die berechneten p-Werte sind ebenfalls in Tab 11.1.11 aufgeführt.

Tab 11.1.13 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von FGH auf die Inkorporation von ^{14}C -Prolin und ^3H -Prolin von Knorpelplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	^{14}C [dpm/mg TG]	^3H [dpm/mg TG]	Verhältnis $^{14}\text{C}/^3\text{H}$	Verhältnis %	
Globaleffekt p = 0,744							
0 mg/ml	1	23,2	7,5	1459,7	2680,3	0,545	100,0
	2	26,2	8,0	657,9	820,5	0,802	100,0
	3	28,5	8,4	227,1	334,7	0,679	100,0
	4	20,4	6,2	[573,8]	[795,9]	[0,721]	[100,0]
	5	25,2	7,7	104,7	781,8	0,134	100,0
	6	15,6	4,4	[291,0]	[117,3]	[2,480]	[100,0]
$\bar{x} \pm \text{SD}$		23,2 \pm 4,6	7,0 \pm 1,5	552,3 \pm 491,8	921,7 \pm 908,8	0,893 \pm 0,812	100,0 \pm 0,0
Median							100,0
0,1 mg/ml	1	21,1	5,9	1406,5	2403,0	0,585	107,5
	2	22,7	7,2	241,3	325,0	0,743	92,6
	3	22,0	5,5	261,6	503,2	0,520	76,6
	4	21,2	6,6	[615,1]	[884,2]	[0,696]	[96,5]
	5	30,1	9,2	84,9	817,8	0,104	77,6
	6	19,8	6,6	[22,0]	[88,9]	[0,248]	[10,0]
$\bar{x} \pm \text{SD}$		22,8 \pm 3,7	6,8 \pm 1,3	438,6 \pm 517,1	837,0 \pm 823,2	0,482 \pm 0,254	88,6 \pm 14,6
Median							85,1
0,5 mg/ml	1	15,4	4,6	2122,7	4056,4	0,523	96,1
	2	22,5	7,1	79,2	81,1	0,977	121,8
	3	22,5	6,2	554,1	728,1	0,761	112,1
	4	21,4	6,3	[485,6]	[32,7]	[14,832]	[2057,3]
	5	23,6	6,3	143,1	1410,2	0,101	75,8
	6	19,4	5,7	[9,9]	[70,1]	[0,141]	[5,7]
$\bar{x} \pm \text{SD}$		20,8 \pm 3,0	6,0 \pm 0,8	581,8 \pm 887,0	1269,2 \pm 1653,1	0,501 \pm 0,382	101,5 \pm 20,2
Median							104,1
1 mg/ml	1	24,5	7,0	2184,4	3944,3	0,554	101,7
	2	20,5	6,6	267,1	351,9	0,759	94,7
	3	19,9	5,7	244,5	390,8	0,626	92,2
	4	20,4	6,0	[765,5]	[1090,6]	[0,702]	[97,4]
	5	22,5	6,6	96,9	910,1	0,106	79,5
	6	20,6	6,7	[4,8]	[30,2]	[0,160]	[6,4]
$\bar{x} \pm \text{SD}$		21,4 \pm 1,8	6,4 \pm 0,5	593,9 \pm 822,4	1119,6 \pm 1437,4	0,484 \pm 0,281	92,0 \pm 9,3
Median							93,4
2 mg/ml	1	21,7	5,6	1759,1	2674,6	0,658	120,8
	2	25,5	8,1	201,8	257,2	0,785	97,9
	3	18,3	5,2	446,6	793,1	0,563	83,0
	4	22,8	7,2	[390,4]	[583,9]	[0,669]	[92,8]
	5	21,5	5,9	87,1	1054,3	0,083	61,7
	6	16,8	5,2	[0,0]	[27,3]	[0,000]	[0,0]
$\bar{x} \pm \text{SD}$		21,1 \pm 3,1	6,2 \pm 1,2	577,0 \pm 676,4	1072,6 \pm 941,9	0,551 \pm 0,274	90,8 \pm 24,9
Median							90,4

Tab 11.1.13: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %
10 mg/ml						
1	21,8	5,9	2424,4	3965,1	0,611	112,3
2	23,2	7,7	386,0	557,8	0,692	86,3
3	27,0	7,9	228,1	363,1	0,628	92,6
4	17,9	4,6	[45,8]	[59,9]	[0,764]	[105,9]
5	22,5	5,5	116,6	1831,9	0,064	47,5
6	21,4	6,8	[46,2]	[127,8]	[0,362]	[14,6]
$\bar{x} \pm SD$	22,3 ± 3,0	6,4 ± 1,3	541,2 ± 931,6	1150,9 ± 1522,7	0,520 ± 0,262	84,7 ± 27,1
Median						89,5

Dargestellt ist die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin. Die Radioaktivität wurde gemäß 2.2.2.2 bestimmt. ¹⁴C entspricht dem Gehalt an ¹⁴C-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten, die mit FGH behandelt wurden. ³H spiegelt den Gehalt an ³H-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten vor Behandlung mit FGH wider. Der Gehalt ist jeweils angegeben in dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Das Verhältnis ¹⁴C/³H gibt die Inkorporation nach und vor Zugabe von FGH an. Das Verhältnis ist angegeben als Absolutwert und in Prozent zum unbehandelten Kontrollimplantat (= 100 %). NG entspricht dem Nassgewicht.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Die Werte in eckigen Klammern sind Ausreißer gemäß Ausreißertest Dean-Dixon und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen. Ein globaler Effekt von FGH auf das Inkorporations-Verhältnis wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde auf ein zusätzlichen Paarvergleich nach Friedman zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verzichtet.

Tab 11.1.14 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von FGH-N auf die Inkorporation von ^{14}C -Prolin und ^3H -Prolin von Knorpel-explantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	^{14}C [dpm/mg TG]	^3H [dpm/mg TG]	Verhältnis $^{14}\text{C}/^3\text{H}$	Verhältnis %
Globaleffekt p = 0,164						
0 mg/ml	1	34,3	1067,7	1657,9	0,644	100,0
	2	25,5	[78,4]	[77,1]	[1,016]	[100,0]
	3	29,4	438,5	542,0	0,809	100,0
	4	19,3	688,2	940,5	0,732	100,0
	5	39,2	30,2	297,3	0,102	100,0
	6	14,3	[30,0]	[115,3]	[0,260]	[100,0]
$\bar{x} \pm \text{SD}$		27,0 \pm 9,3	388,8 \pm 425,8	605,0 \pm 606,4	0,594 \pm 0,346	100,0 \pm 0,0
Median		8,0 \pm 2,4				100,0
0,1 mg/ml	1	33,4	1357,3	2113,6	0,642	99,7
	2	20,7	[2,7]	[0,0]	[n.b.]	[n.b.]
	3	31,7	294,7	404,0	0,730	90,2
	4	16,5	690,2	1001,8	0,689	94,2
	5	27,8	80,3	1204,6	0,067	65,7
	6	17,1	[14,7]	[59,7]	[0,246]	[94,5]
$\bar{x} \pm \text{SD}$		24,5 \pm 7,4	487,5 \pm 553,2	956,7 \pm 792,5	0,475 \pm 0,299	87,4 \pm 15,0
Median		7,4 \pm 2,0				92,2
0,5 mg/ml	1	28,9	1512,5	2446,7	0,618	96,0
	2	16,9	[334,4]	[297,8]	[1,123]	[110,5]
	3	22,7	462,5	644,2	0,718	88,7
	4	17,5	771,8	1164,1	0,663	90,6
	5	22,2	49,5	853,6	0,058	57,1
	6	16,0	[0,0]	[0,0]	[n.b.]	[n.b.]
$\bar{x} \pm \text{SD}$		20,7 \pm 4,9	626,1 \pm 559,3	1081,3 \pm 825,8	0,636 \pm 0,380	83,1 \pm 17,6
Median		6,2 \pm 1,0				89,7
1 mg/ml	1	27,2	1706,2	2641,6	0,646	100,3
	2	21,8	[1117,5]	[1214,5]	[0,920]	[90,5]
	3	29,2	699,7	831,4	0,842	104,0
	4	24,8	642,4	1057,8	0,607	83,0
	5	32,5	47,3	668,2	0,071	69,7
	6	19,5	[6,2]	[50,8]	[0,122]	[46,8]
$\bar{x} \pm \text{SD}$		25,8 \pm 4,8	703,2 \pm 647,7	1077,4 \pm 865,8	0,535 \pm 0,359	89,3 \pm 15,9
Median		7,8 \pm 1,2				91,7
2 mg/ml	1	27,5	1125,9	1457,5	0,773	120,0
	2	19,9	[726,7]	[675,5]	[1,076]	[105,8]
	3	21,5	994,7	1398,0	0,712	87,9
	4	20,2	630,9	927,3	0,680	93,0
	5	31,4	31,2	332,4	0,094	92,5
	6	21,0	[8,0]	[31,9]	[0,251]	[96,4]
$\bar{x} \pm \text{SD}$		23,6 \pm 4,7	586,3 \pm 473,8	803,8 \pm 571,0	0,598 \pm 0,361	98,4 \pm 14,6
Median		7,0 \pm 1,0				92,8

Tab 11.1.14: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %
10 mg/ml						
1	30,3	8,3	1436,9	2431,4	0,591	91,8
2	25,6	7,9	[1811,3]	[2266,3]	[0,799]	[78,6]
3	26,3	7,8	611,5	755,6	0,809	100,0
4	25,5	7,4	441,2	1013,2	0,436	59,5
5	32,2	9,6	60,7	932,9	0,065	64,1
6	22,3	6,1	[8,3]	[46,1]	[0,179]	[68,9]
$\bar{x} \pm SD$	27,0 ± 3,6	7,9 ± 1,1	728,3 ± 739,6	1240,9 ± 925,0	0,480 ± 0,312	78,9 ± 20,1
Median						78,0

Dargestellt ist die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin. Die Radioaktivität wurde gemäß 2.2.2.2 bestimmt. ¹⁴C entspricht dem Gehalt an ¹⁴C-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten, die mit FGH-N behandelt wurden. ³H spiegelt den Gehalt an ³H-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten vor Behandlung mit FGH-N wider. Der Gehalt ist jeweils angegeben in dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Das Verhältnis ¹⁴C/³H gibt die Inkorporation nach und vor Zugabe von FGH-N an. Das Verhältnis ist angegeben als Absolutwert und in Prozent zum unbehandelten Kontrollimplantat (= 100%). NG entspricht dem Nassgewicht.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Die Werte in eckigen Klammern sind Ausreißer gemäß Ausreißertest Dean-Dixon und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen. Ein globaler Effekt von FGH-N auf das Inkorporations-Verhältnis wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde auf ein zusätzlichen Paarvergleich nach Friedman zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verzichtet.

Tab 11.1.15 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Mobiforte® auf die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin von Knorpelxplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %	
Globaleffekt p = 0,068							
0 mg/ml	1	36,9	10,2	916,4	1742,9	0,526	100,0
	2	20,2	6,1	459,8	593,0	0,775	100,0
	3	22,8	7,0	586,6	738,7	0,794	100,0
	4	23,6	7,6	199,5	256,2	0,779	100,0
	5	32,5	9,0	61,3	565,8	0,108	100,0
	6	26,2	8,4	[12,7]	[54,1]	[0,236]	[100,0]
$\bar{x} \pm SD$		27,0 ± 6,4	8,1 ± 1,5	372,7 ± 348,0	658,4 ± 586,9	0,536 ± 0,302	100,0 ± 0,0
Median							100,0
0,1 mg/ml	1	33,3	10,6	536,9	772,3	0,695	132,2
	2	22,5	6,2	486,8	474,8	1,025	132,2
	3	28,2	8,3	291,9	391,5	0,745	93,9
	4	26,6	9,0	260,2	340,2	0,765	98,2
	5	28,1	8,9	91,5	492,3	0,186	171,4
	6	27,5	8,1	[6,7]	[23,8]	[0,281]	[119,4]
$\bar{x} \pm SD$		27,7 ± 3,5	8,5 ± 1,4	279,0 ± 209,5	415,8 ± 243,5	0,616 ± 0,319	125,6 ± 31,4
Median							132,2
0,5 mg/ml	1	37,3	10,2	990,1	1422,4	0,696	132,4
	2	19,3	5,6	14,3	7,5	1,891	243,9
	3	26,5	8,1	220,6	288,3	0,765	96,4
	4	23,7	7,0	474,8	573,7	0,828	106,3
	5	33,7	10,9	58,3	444,6	0,131	120,9
	6	28,2	9,1	[15,1]	[48,3]	[0,312]	[132,5]
$\bar{x} \pm SD$		28,1 ± 6,6	8,5 ± 2,0	295,5 ± 383,2	464,1 ± 518,3	0,771 ± 0,614	140,0 ± 59,7
Median							120,9
1 mg/ml	1	34,1	9,9	1146,3	1589,0	0,721	137,2
	2	20,1	5,7	1062,0	1221,8	0,869	112,1
	3	23,6	6,3	268,8	371,6	0,723	91,1
	4	30,4	11,4	104,9	132,6	0,791	101,6
	5	32,6	10,5	70,6	402,2	0,175	161,8
	6	27,6	9,0	[4,9]	[43,2]	[0,114]	[48,6]
$\bar{x} \pm SD$		28,1 ± 5,4	8,8 ± 2,3	442,9 ± 520,2	626,7 ± 629,3	0,566 ± 0,331	120,8 ± 28,6
Median							112,1
2 mg/ml	1	37,7	11,3	676,3	990,9	0,683	129,8
	2	14,5	4,0	367,1	442,5	0,830	107,0
	3	22,2	6,5	22,8	21,0	1,085	136,6
	4	30,2	10,4	314,2	459,2	0,684	87,9
	5	33,6	10,2	71,5	613,9	0,116	107,4
	6	24,5	7,7	[15,9]	[58,9]	[0,2699]	[114,2]
$\bar{x} \pm SD$		27,1 ± 8,4	8,4 ± 2,8	244,6 ± 259,9	431,1 ± 361,8	0,611 ± 0,359	113,7 ± 19,6
Median							107,4

Tab 11.1.15: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	TG [mg]	¹⁴ C [dpm/mg TG]	³ H [dpm/mg TG]	Verhältnis ¹⁴ C/ ³ H	Verhältnis %
10 mg/ml						
1	27,3	7,0	1484,7	3306,1	0,449	85,4
2	21,1	6,3	551,9	727,2	0,759	97,9
3	23,0	7,4	357,8	662,2	0,540	68,0
4	28,4	9,6	176,7	279,4	0,632	81,2
5	31,7	9,3	75,8	452,0	0,168	154,8
6	27,7	8,6	[0,0]	[32,0]	[0,000]	[0,0]
$\bar{x} \pm SD$	26,5 ± 3,9	8,0 ± 1,3	529,4 ± 564,0	1085,4 ± 1254,0	0,510 ± 0,223	97,5 ± 33,8
Median						85,4

Dargestellt ist die Inkorporation von ¹⁴C-Prolin und ³H-Prolin. Die Radioaktivität wurde gemäß 2.2.2.2 bestimmt. ¹⁴C entspricht dem Gehalt an ¹⁴C-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten, die mit Mobiforte® behandelt wurden. ³H spiegelt den Gehalt an ³H-markiertem Hydroxyprolin in Knorpelimplantaten vor Behandlung mit Mobiforte® wider. Der Gehalt ist jeweils angegeben in dpm pro mg Knorpeltrockengewicht (= TG). Das Verhältnis ¹⁴C/³H gibt die Inkorporation nach und vor Zugabe von Mobiforte® an. Das Verhältnis ist angegeben als Absolutwert und in Prozent zum unbehandelten Kontrollimplantat (= 100 %). NG entspricht dem Nassgewicht. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Die Werte in eckigen Klammern sind Ausreißer gemäß Ausreißertest Dean-Dixon und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen. Ein globaler Effekt von Mobiforte® auf das Inkorporations-Verhältnis wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde auf ein zusätzlichen Paarvergleich nach Friedman zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verzichtet.

Hydroxyprolingehalt Tab 11.1.16 - Tab 11.1.18

Tab 11.1.16 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von RDH, RDH-N und CH-alpha[®] auf den Gehalt an Hydroxyprolin in Knorpel-explantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient	RDH		RDH-N		CH-alpha [®]	
	HO-Prolin		HO-Prolin		HO-Prolin	
	[µg/mg TG]	[%]	[µg/mg TG]	[%]	[µg/mg TG]	[%]
Globaleffekt	p = 0,627		p = 0,955		p = 0,905	
0 mg/ml 1	27,3	100,0	17,7	100,0	29,7	100,0
2	22,3	100,0	28,4	100,0	26,6	100,0
3	23,0	100,0	23,8	100,0	41,4	100,0
4	22,9	100,0	44,8	100,0	31,1	100,0
5	18,7	100,0	28,5	100,0	46,3	100,0
6	30,1	100,0	31,5	100,0	23,6	100,0
$\bar{x} \pm SD$	24,0 ± 4,0	100,0 ± 0,0	29,1 ± 9,1	100,0 ± 0,0	33,1 ± 8,8	100,0 ± 0,0
Median		100,0		100,0		100,0
Gesamt-Med		100,0		100,0		100,0
0,1 mg/ml 1	33,2	121,5	26,1	147,6	34,8	117,0
2	22,7	101,9	20,1	70,6	30,6	115,0
3	27,3	118,9	32,1	135,1	34,3	82,8
4	45,9	200,8	41,5	92,6	48,7	156,7
5	28,2	150,8	28,8	101,1	20,4	44,1
6	24,5	81,1	22,0	69,7	17,7	75,0
$\bar{x} \pm SD$	30,3 ± 8,4	129,2 ± 42,0	28,4 ± 7,8	102,8 ± 32,5	31,1 ± 11,2	98,4 ± 39,4
Median		120,2		96,8		98,9
Gesamt-Med		105,0		96,8		101,7
0,5 mg/ml 1	29,3	107,3	14,4	81,2	28,7	96,5
2	40,6	182,4	19,9	70,0	37,9	142,3
3	29,6	129,0	31,7	133,5	34,1	82,3
4	24,8	108,5	42,2	94,1	33,8	108,8
5	13,6	72,8	33,0	116,2	30,9	66,8
6	26,9	89,1	26,7	84,6	23,9	101,3
$\bar{x} \pm SD$	27,5 ± 8,7	114,9 ± 38,2	28,0 ± 9,9	96,6 ± 23,8	31,5 ± 4,9	99,7 ± 25,7
Median		107,9		89,4		98,9
Gesamt-Med		103,5		92,2		100,0

Tab 11.1.16: Fortsetzung

Patient	HO-Prolin		HO-Prolin		HO-Prolin		
	[$\mu\text{g}/\text{mg}$ TG]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{mg}$ TG]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{mg}$ TG]	[%]	
1 mg/ml	1	34,1	124,9	27,1	153,4	28,1	94,5
	2	4,2	18,7	18,8	66,0	30,3	113,8
	3	28,7	125,1	30,8	129,6	39,7	95,8
	4	23,5	102,9	43,9	97,8	42,2	135,8
	5	15,6	83,3	24,1	84,6	23,0	49,8
	6	28,3	93,8	20,7	65,8	21,3	90,1
$\bar{x} \pm \text{SD}$	22,4 \pm 10,9	91,5 \pm 39,4	27,6 \pm 9,1	99,5 \pm 35,5	30,8 \pm 8,6	96,6 \pm 28,6	
Median		98,3		91,2		95,2	
Gesamt-Med		88,6		96,4		95,2	
2 mg/ml	1	32,0	117,1	32,6	184,6	43,6	146,7
	2	21,0	94,2	21,1	74,3	29,3	110,1
	3	30,6	133,3	25,5	107,3	41,9	101,3
	4	29,7	130,1	30,5	68,0	38,6	124,2
	5	15,3	81,6	30,7	108,1	28,0	60,5
	6	28,0	93,0	22,1	70,1	21,4	90,5
$\bar{x} \pm \text{SD}$	26,1 \pm 6,6	108,2 \pm 21,5	27,1 \pm 4,9	102,1 \pm 44,3	33,8 \pm 8,9	105,5 \pm 29,4	
Median		105,7		90,8		105,7	
Gesamt-Med		100,5		98,9		101,5	
10 mg/ml	1	32,7	119,7	35,4	200,3	20,1	67,5
	2	30,1	135,0	23,1	81,2	29,3	110,1
	3	19,6	85,4	57,2	240,6	37,1	89,7
	4	38,0	166,5	41,5	92,6	40,1	129,1
	5	13,7	73,1	48,5	170,4	24,9	53,7
	6	27,7	91,9	26,1	82,8	18,5	78,2
$\bar{x} \pm \text{SD}$	27,0 \pm 8,9	111,9 \pm 35,2	38,6 \pm 13,1	144,6 \pm 68,6	28,3 \pm 8,9	88,1 \pm 27,8	
Median		105,8		131,5		84,0	
Gesamt-Med		92,3		98,5		100,5	

Dargestellt ist der Hydroxyprolinegehalt, bestimmt gemäß 2.2.2.2, von Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien, die mit RDH, RDH-N oder CH-alpha[®] behandelt wurden. Der Gehalt ist angegeben in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpeltrockengewicht (= TG) und in Prozent zum unbehandelten Kontrollknorpel (= 100 %). Die zugehörigen Knorpelnass- und Knorpeltrockengewichte sind für RDH in Tab 11.1.7, für RDH-N in Tab 11.1.9 und für CH-alpha[®] in Tab 11.1.11 aufgeführt.

Durch eine dreifaktorielle Varianzanalyse konnten keine Unterschiede in der Wirkung zwischen frühen und mittleren OA-Stadien gefunden werden, weshalb die Statistik anhand der Werte aus beiden Krankheitsstadien berechnet wurde. Ein globaler Effekt von RDH, RDH-N und CH-alpha[®] auf den Hydroxyprolinegehalt wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde keine weitere Statistik zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt. Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane der Knorpelimplantate in mittleren OA-Stadien, sowie der Gesamt-Median (=Gesamt-Med) berechnet aus den Werten aus frühen und mittleren OA-Stadien.

Tab 11.1.17 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von RDH, RDH-N und CH-alpha[®] auf den Gehalt an Hydroxyprolin in Knorpel-explantaten aus frühen OA-Stadien

Patient	RDH		RDH-N		CH-alpha [®]		
	HO-Prolin		HO-Prolin		HO-Prolin		
	[$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	[%]	
Globaleffekt	siehe Tab 11.1.16						
0 mg/ml	1	24,6	100,0	17,7	100,0	26,1	100,0
	2	21,4	100,0	40,0	100,0	21,2	100,0
	3	22,5	100,0	17,7	100,0	17,3	100,0
	4	24,3	100,0	17,1	100,0	25,7	100,0
	5	22,4	100,0	12,5	100,0	8,7	100,0
	6	11,7	100,0	22,8	100,0	19,4	100,0
$\bar{x} \pm \text{SD}$		21,2 \pm 4,8	100,0 \pm 0,0	21,3 \pm 9,7	100,0 \pm 0,0	19,7 \pm 6,4	100,0 \pm 0,0
Median			100,0	100,0		100,0	
0,1 mg/ml	1	26,6	108,0	20,2	114,6	33,7	129,0
	2	35,8	167,3	37,0	92,5	25,7	120,9
	3	22,7	100,8	14,0	79,2	17,5	101,0
	4	18,1	74,4	26,6	155,6	18,1	70,6
	5	20,3	90,6	5,8	46,1	8,9	102,4
	6	11,5	98,8	23,4	102,6	16,8	86,9
$\bar{x} \pm \text{SD}$		22,5 \pm 8,2	106,6 \pm 31,9	21,2 \pm 10,7	98,4 \pm 36,6	20,1 \pm 8,5	101,8 \pm 21,5
Median			99,8	97,5		101,7	
0,5 mg/ml	1	25,8	104,7	27,9	157,7	33,2	127,3
	2	27,9	130,5	36,2	90,3	29,8	140,1
	3	21,1	93,7	15,2	85,8	17,1	98,7
	4	22,4	92,3	20,0	116,9	20,3	79,2
	5	17,4	77,7	12,2	97,3	12,9	148,4
	6	12,0	102,3	19,8	87,0	18,1	93,6
$\bar{x} \pm \text{SD}$		21,1 \pm 5,8	100,2 \pm 17,6	21,9 \pm 8,8	105,9 \pm 27,9	21,9 \pm 7,9	114,5 \pm 27,9
Median			98,0	93,8		113,0	
1 mg/ml	1	19,0	77,1	29,6	167,5	32,0	122,8
	2	31,5	147,1	31,0	77,3	44,1	207,7
	3	4,1	18,0	15,0	84,7	16,0	92,3
	4	18,4	75,7	26,3	154,0	14,9	58,1
	5	16,0	71,3	12,2	97,9	10,6	121,9
	6	12,0	102,9	21,6	95,0	17,8	91,9
$\bar{x} \pm \text{SD}$		16,8 \pm 9,0	82,0 \pm 42,3	22,6 \pm 7,7	112,7 \pm 38,1	22,6 \pm 12,8	115,8 \pm 51,0
Median			76,4	96,4		107,1	

Tab 11.1.17: Fortsetzung

Patient	HO-Prolin		HO-Prolin		HO-Prolin		
	[$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	[%]	
2 mg/ml	1	24,7	100,4	23,2	131,1	34,7	133,0
	2	27,5	128,3	32,4	81,0	23,3	109,6
	3	22,6	100,5	15,1	85,3	16,8	97,0
	4	15,4	63,5	24,2	141,8	25,4	98,8
	5	15,1	67,3	16,4	131,6	8,8	101,7
	6	12,9	110,4	20,6	90,5	16,4	84,7
$\bar{x} \pm \text{SD}$	19,7 \pm 6,0	95,1 \pm 25,2	22,0 \pm 6,3	110,2 \pm 27,4	20,9 \pm 8,9	104,7 \pm 16,3	
Median		100,5		110,8		100,3	
10 mg/ml	1	20,1	81,8	19,9	112,7	31,2	119,6
	2	27,5	128,6	41,8	104,3	19,3	90,8
	3	26,2	116,5	12,4	70,1	19,5	112,7
	4	14,1	58,1	20,2	118,0	29,0	113,0
	5	16,8	74,8	11,5	92,5	7,3	83,9
	6	10,8	92,6	17,9	78,7	22,1	114,0
$\bar{x} \pm \text{SD}$	19,3 \pm 6,7	92,1 \pm 26,4	20,6 \pm 11,0	96,1 \pm 19,1	21,4 \pm 8,5	105,7 \pm 14,6	
Median		87,2		98,4		112,8	

Dargestellt ist der Hydroxyprolinegehalt, bestimmt gemäß 2.2.2.2, von Knorpelimplantaten aus frühen OA-Stadien, die mit RDH, RDH-N oder CH-alpha[®] behandelt wurden. Der Gehalt ist angegeben in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpeltrockengewicht (= TG) und in Prozent zum unbehandelten Kontrollknorpel (= 100 %). Die zugehörigen Knorpelnass- und Knorpeltrockengewichte sind für RDH in Tab 11.1.8, für RDH-N in Tab 11.1.10 und für CH-alpha[®] in Tab 11.1.12 aufgeführt.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Durch eine dreifaktorielle Varianzanalyse konnten keine Unterschiede in der Wirkung zwischen frühen und mittleren OA-Stadien gefunden werden, weshalb die Statistik anhand der Werte aus beiden Stadien berechnet wurde. Ein globaler Effekt von RDH, RDH-N und CH-alpha[®] auf den Hydroxyprolinegehalt wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht und ist in Tab 11.1.16 aufgeführt. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde keine weitere Statistik zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

Tab 11.1.18 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von FGH, FGH-N und Mobiforte® auf den Gehalt an Hydroxyprolin in Knorpel-explantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient	FGH		FGH-N		Mobiforte®		
	HO-Prolin		HO-Prolin		HO-Prolin		
	[$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{mg TG}$]	[%]	
Globaleffekt	p = 0,707		p = 0,808		p = 0,058		
0 mg/ml	1	25,4	100,0	18,8	100,0	15,5	100,0
	2	22,6	100,0	19,1	100,0	16,7	100,0
	3	25,1	100,0	21,6	100,0	17,6	100,0
	4	22,8	100,0	23,9	100,0	18,9	100,0
	5	27,1	100,0	21,0	100,0	17,1	100,0
	6	36,1	100,0	21,7	100,0	26,8	100,0
$\bar{x} \pm \text{SD}$		26,5 \pm 5,0	100,0 \pm 0,0	21,0 \pm 1,9	100,0 \pm 0,0	18,8 \pm 4,1	100,0 \pm 0,0
Median			100,0	100,0		100,0	
0,1 mg/ml	1	22,8	89,0	12,1	101,6	7,2	107,8
	2	11,6	50,7	13,3	109,4	10,8	150,1
	3	7,4	203,6	11,0	89,7	13,5	82,9
	4	7,7	107,0	11,7	154,5	16,0	117,7
	5	8,6	123,9	13,1	119,7	18,8	105,7
	6	19,3	78,2	17,0	90,5	12,4	142,9
$\bar{x} \pm \text{SD}$		12,9 \pm 6,6	108,7 \pm 52,8	13,0 \pm 2,1	110,9 \pm 24,2	13,1 \pm 4,0	117,8 \pm 25,1
Median			98,0	105,5		112,7	
0,5 mg/ml	1	15,2	98,5	31,6	115,1	23,6	113,6
	2	31,0	32,4	28,3	90,6	19,5	186,6
	3	26,4	173,7	37,9	120,0	24,8	105,5
	4	24,2	93,2	33,7	130,1	24,6	137,4
	5	26,3	137,9	30,5	133,6	4,6	95,1
	6	18,9	53,2	30,7	14,5	27,7	111,7
$\bar{x} \pm \text{SD}$		23,7 \pm 5,7	98,2 \pm 52,3	32,1 \pm 3,3	100,7 \pm 44,9	20,8 \pm 8,4	125,0 \pm 33,3
Median			95,9	117,6		112,6	
1 mg/ml	1	36,5	89,6	16,1	127,3	10,6	121,9
	2	39,0	33,6	24,9	96,5	12,5	221,0
	3	34,0	159,1	21,0	106,6	14,6	104,4
	4	33,9	92,8	18,6	115,3	12,2	114,7
	5	30,7	131,1	26,4	103,4	12,7	97,8
	6	4,3	33,2	16,8	69,9	17,4	100,5
$\bar{x} \pm \text{SD}$		29,7 \pm 12,8	89,9 \pm 50,7	20,6 \pm 4,3	103,2 \pm 19,5	13,4 \pm 2,4	126,7 \pm 47,1
Median			91,2	105,0		109,6	

Tab 11.1.18: Fortsetzung

Patient	HO-Prolin		HO-Prolin		HO-Prolin		
	[$\mu\text{g}/\text{mg}$ TG]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{mg}$ TG]	[%]	[$\mu\text{g}/\text{mg}$ TG]	[%]	
2 mg/ml	1	16,7	106,6	20,9	111,7	17,4	110,1
	2	20,7	37,9	25,0	108,1	18,4	260,2
	3	23,1	172,8	27,9	96,7	16,6	19,6
	4	21,9	84,0	21,6	163,8	17,0	119,7
	5	23,2	138,8	21,6	103,7	18,7	107,5
	6	22,4	38,5	20,9	80,3	18,7	162,8
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$21,3 \pm 2,4$	$96,4 \pm 54,2$	$23,0 \pm 2,8$	$110,7 \pm 28,3$	$17,8 \pm 0,9$	$130,0 \pm 79,0$	
Median		95,3		105,9		114,9	
10 mg/ml	1	26,2	142,0	15,1	115,5	9,8	172,5
	2	20,5	84,8	13,7	140,0	14,0	171,1
	3	13,9	124,5	2,2	97,1	10,9	117,6
	4	8,7	11,7	10,6	104,4	9,8	163,9
	5	10,1	133,9	12,1	100,2	16,0	107,1
	6	24,8	94,7	18,6	122,9	10,9	111,3
$\bar{x} \pm \text{SD}$	$17,4 \pm 7,5$	$98,6 \pm 48,1$	$12,0 \pm 5,5$	$113,3 \pm 16,3$	$11,9 \pm 2,5$	$140,6 \pm 31,6$	
Median		109,6		110,0		140,8	

Dargestellt ist der Hydroxyprolinegehalt, bestimmt gemäß 2.2.2.2, von Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien, die mit FGH, FGH-N oder Mobiforte[®] behandelt wurden. Der Gehalt ist angegeben in $\mu\text{g}/\text{mg}$ Knorpeltrockengewicht (= TG) und in Prozent zum unbehandelten Kontrollknorpel (= 100%). Die zugehörigen Knorpelnass- und Knorpeltrockengewichte sind für FGH in Tab 11.1.13, für FGH-N in Tab 11.1.14 und für Mobiforte[®] in Tab 11.1.15 aufgeführt.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von FGH, FGH-N und Mobiforte[®] auf den Hydroxyprolinegehalt wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde keine weitere Statistik zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

11.2 Wirkung von Kollagenhydrolysat auf den Kollagen Typ II, Proteoglykan-, PGE₂-, NO-, MMP- und TIMP-1-Gehalt

Tab 11.2.1 - Tab 11.2.13

Tab 11.2.1 Konzentrations-Wirkung-Beziehung von RDH auf den Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt in den Medien und Knorpelxplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien)an Gesamt-PGs
Globaleffekt			p = 0,674	p = 0,621		p = 0,303
0 mg/ml						
1	27,5	4,20	0,834	42,7	6,1	14,4
2	22,8	4,30	0,677	23,2	5,3	22,9
3	14,4	4,00	1,405	29,9	5,5	18,5
4	14,7	4,15	0,083	20,9	3,9	18,7
5	17,3	4,20	0,033	16,8	3,2	19,0
$\bar{x} \pm SD$	19,3 \pm 5,7	4,17 \pm 0,11	0,61 \pm 0,57	26,7 \pm 10,1	4,8 \pm 1,2	18,7 \pm 3,0
Median			0,677	23,2		18,7
0,1 mg/ml						
1	28,9	4,40	0,304	41,6	5,5	13,3
2	27,4	4,30	0,800	31,4	4,1	13,2
3	15,8	4,25	0,087	40,7	5,6	13,9
4	19,0	4,30	0,009	25,1	6,2	24,6
5	19,3	4,45	0,082	27,5	4,6	16,7
$\bar{x} \pm SD$	22,1 \pm 5,7	4,34 \pm 0,08	0,26 \pm 0,32	33,3 \pm 7,6	5,2 \pm 0,8	16,3 \pm 4,8
Median			0,087	31,4		13,9
0,5 mg/ml						
1	27,1	4,30	0,349	35,4	5,9	16,6
2	25,5	4,30	0,453	30,9	6,0	19,3
3	21,8	4,20	0,018	33,1	6,2	18,6
4	15,4	4,20	0,689	20,8	6,5	31,3
5	21,6	4,45	0,616	30,5	4,9	16,1
$\bar{x} \pm SD$	22,3 \pm 4,5	4,29 \pm 0,10	0,43 \pm 0,26	30,1 \pm 5,6	5,9 \pm 0,6	20,4 \pm 6,2
Median			0,453	30,9		18,6
1 mg/ml						
1	28,1	4,10	0,381	41,9	6,2	14,9
2	31,7	3,90	0,375	30,1	4,5	15,1
3	24,5	4,35	0,010	31,7	6,3	19,8
4	19,2	4,10	0,438	24,1	6,7	27,7
5	16,5	4,00	0,280	36,6	5,0	13,7
$\bar{x} \pm SD$	24,0 \pm 6,2	4,09 \pm 0,17	0,30 \pm 0,17	32,9 \pm 6,7	5,7 \pm 0,9	18,2 \pm 5,8
Median			0,375	31,7		15,1

Tab 11.2.1: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien)an Gesamt-PGs
2 mg/ml 1	20,7	4,20	0,367	39,8	6,8	17,1
2	24,6	4,20	0,198	29,2	7,0	23,9
3	13,2	4,20	0,746	28,1	5,5	19,7
4	16,2	4,30	0,112	27,6	10,3	37,1
5	19,7	4,35	0,041	33,4	4,9	14,6
$\bar{x} \pm SD$	18,9 \pm 4,4	4,25 \pm 0,07	0,29 \pm 0,28	31,6 \pm 5,1	6,9 \pm 2,1	22,5 \pm 8,9
Median			0,198	29,2		19,7
10 mg/ml 1	30,9	4,30	0,217	35,1	9,1	26,0
2	28,4	4,20	0,073	35,7	6,3	17,6
3	17,8	4,20	0,979	32,5	5,0	15,3
4	16,0	4,10	0,010	25,3	11,2	44,3
5	18,8	4,30	0,112	33,3	4,9	14,7
$\bar{x} \pm SD$	22,38 \pm 6,8	4,22 \pm 0,08	0,28 \pm 0,40	32,4 \pm 4,1	7,3 \pm 2,8	23,6 \pm 12,4
Median			0,112	33,3		17,6

Der Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt wurde gemäß 2.2.10.2 und 2.2.10.3 bestimmt. Dargestellt ist der Gehalt von Kollagen Typ II in den Medien sowie der Gesamt-PG-Gehalt und der PG-Gehalt im Medium, angegeben als Absolutwert und in Prozent zum Gesamt-PG-Gehalt (= 100%). Der Gesamt-PG-Gehalt errechnete sich aus dem PG-Gehalt der Knorpelimplantate und dem PG-Gehalt in den Medien. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von RDH auf den Kollagen Typ II-Gehalt, den Gesamt-PG-Gehalt und den prozentualen PG-Anteil im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde auf ein zusätzlichen Paarvergleich nach Friedman zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verzichtet.

Tab 11.2.2 Konzentrations-Wirkung-Beziehung von RDH-N auf den Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt in den Medien und Knorpelxplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien)an Gesamt-PGs	
Globaleffekt			p = 0,459	p = 0,416	p = 0,796		
0 mg/ml	1	30,1	4,10	2,081	42,0	6,6	15,7
	2	26,2	4,30	1,161	46,1	3,8	8,2
	3	16,9	4,10	0,110	37,8	4,9	13,1
	4	14,2	4,15	0,209	12,7	2,9	23,0
	5	24,3	4,20	0,085	29,3	3,7	12,7
$\bar{x} \pm SD$		22,3 \pm 6,6	4,17 \pm 0,08	0,73 \pm 0,88	33,6 \pm 13,2	4,4 \pm 1,4	14,5 \pm 5,5
Median			0,209	37,8			13,1
0,1 mg/ml	1	26,0	4,30	0,646	42,3	6,4	15,2
	2	21,4	4,30	2,263	26,6	5,1	19,3
	3	23,6	4,00	0,009	44,1	3,4	7,7
	4	17,3	4,30	0,000	14,7	3,9	26,4
	5	23,5	4,45	0,000	34,2	3,9	11,3
$\bar{x} \pm SD$		22,4 \pm 3,3	4,27 \pm 0,16	0,58 \pm 0,98	32,4 \pm 12,1	4,5 \pm 1,2	16,0 \pm 7,2
Median			0,009	34,2			15,2
0,5 mg/ml	1	35,5	4,40	0,342	68,5	5,2	7,6
	2	25,3	4,30	1,778	40,2	6,1	15,1
	3	15,6	4,05	0,092	26,9	4,8	17,9
	4	16,5	4,30	0,270	21,5	3,9	18,0
	5	23,4	4,40	0,375	37,9	3,7	9,7
$\bar{x} \pm SD$		23,3 \pm 8,0	4,3 \pm 0,14	0,57 \pm 0,68	39,0 \pm 18,2	4,7 \pm 1,0	13,7 \pm 4,8
Median			0,342	37,9			15,1
1 mg/ml	1	27,2	3,90	0,584	45,1	5,0	11,1
	2	28,1	4,00	3,912	38,5	5,6	14,5
	3	20,9	4,20	1,978	38,6	4,4	11,5
	4	18,1	4,00	0,041	24,4	5,2	21,5
	5	26,9	4,00	0,216	38,7	3,7	9,5
$\bar{x} \pm SD$		24,2 \pm 4,5	4,02 \pm 0,11	1,35 \pm 1,62	37,1 \pm 7,6	4,8 \pm 0,7	13,6 \pm 4,8
Median			0,584	38,6			11,5
2 mg/ml	1	26,2	4,30	1,327	37,7	6,8	18,0
	2	28,6	4,20	0,284	26,0	4,4	17,0
	3	20,0	4,30	0,001	29,3	2,5	8,6
	4	17,9	4,25	0,116	24,4	5,0	20,6
	5	24,2	4,40	0,095	50,9	4,2	8,3
$\bar{x} \pm SD$		23,4 \pm 4,4	4,29 \pm 0,07	0,37 \pm 0,55	33,7 \pm 10,9	4,6 \pm 1,5	14,5 \pm 5,7
Median			0,116	29,3			17,0

Tab 11.2.2: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien)an Gesamt-PGs	
10 mg/ml	1	31,9	4,30	0,202	40,2	6,7	16,6
	2	24,2	4,10	0,372	37,9	5,1	13,6
	3	18,3	4,15	0,048	41,4	4,6	11,1
	4	16,0	4,30	0,215	11,4	2,9	25,8
	5	22,3	4,30	0,223	27,3	4,0	14,7
$\bar{x} \pm SD$	22,54 \pm 6,1	4,23 \pm 0,10	0,21 \pm 0,12	31,6 \pm 12,6	4,7 \pm 1,4	16,4 \pm 5,7	
Median			0,215	37,9		14,7	

Der Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt wurde gemäß 2.2.10.2 und 2.2.10.3 bestimmt. Dargestellt ist der Gehalt von Kollagen Typ II in den Medien sowie der Gesamt-PG-Gehalt und der PG-Gehalt im Medium, angegeben als Absolutwert und in Prozent zum Gesamt-PG-Gehalt (= 100 %). Der Gesamt-PG-Gehalt errechnete sich aus dem PG-Gehalt der Knorpelimplantate und dem PG-Gehalt in den Medien. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von RDH-N auf den Kollagen Typ II-Gehalt, den Gesamt-PG-Gehalt und den prozentualen PG-Anteil im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde auf ein zusätzlichen Paarvergleich nach Friedman zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verzichtet.

Tab 11.2.3 Konzentrations-Wirkung-Beziehung von CH-alpha[®] auf den Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt in den Medien und Knorpelxplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien) an Gesamt-PGs	
Globaleffekt			p = 0,502	p = 0,587	p = 0,006		
0 mg/ml	1	24,9	4,30	1,308	36,2	6,6	18,3
	2	22,3	4,40	0,971	14,4	3,1	21,8
	3	15,5	4,40	0,007	20,0	3,0	14,8
	4	16,4	4,10	0,325	28,8	4,3	15,1
	5	22,3	4,40	0,076	22,6	3,4	15,2
$\bar{x} \pm$ SD		20,3 \pm 4,1	4,32 \pm 0,13	0,54 \pm 0,58	24,4 \pm 8,4	4,1 \pm 1,5	17,0 \pm 3,0
Median			0,325	22,6			11,9
0,1 mg/ml	1	24,5	4,40	0,521	34,2	4,2	12,4
	2	20,3	4,30	1,477	21,7	5,9	27,4
	3	17,0	4,30	0,000	33,3	4,4	13,3
	4	14,2	4,20	0,000	21,8	3,6	16,5
	5	20,9	4,50	0,000	27,8	3,6	13,0
$\bar{x} \pm$ SD		19,4 \pm 3,9	4,34 \pm 0,11	0,40 \pm 0,64	27,8 \pm 6,0	4,4 \pm 1,0	16,5 \pm 6,2
Median			0,000	27,8			24,2
p-Wert							0,043
0,5 mg/ml	1	22,6	4,20	1,260	39,8	4,9	12,4
	2	17,5	3,90	0,598	30,7	4,1	13,3
	3	16,5	4,20	0,522	17,1	1,5	8,5
	4	17,0	4,30	1,201	28,2	3,7	13,0
	5	23,3	4,50	0,000	30,2	3,2	10,6
$\bar{x} \pm$ SD		19,4 \pm 3,3	4,22 \pm 0,22	0,72 \pm 0,52	29,2 \pm 8,1	3,5 \pm 1,3	11,6 \pm 2,0
Median			0,598	30,2			11,8
p-Wert							0,686
1 mg/ml	1	24,6	4,20	0,495	37,4	4,0	10,6
	2	14,8	4,20	1,447	19,9	4,8	24,2
	3	18,9	4,22	0,313	31,1	3,5	11,2
	4	15,2	4,20	0,281	19,5	4,0	20,5
	5	19,3	4,00	0,220	27,5	3,8	13,7
$\bar{x} \pm$ SD		18,6 \pm 4,0	4,16 \pm 0,09	0,55 \pm 0,51	27,1 \pm 7,6	4,0 \pm 0,5	16,0 \pm 6,0
Median			0,313	27,5			13,3
p-Wert							0,686
2 mg/ml	1	24,1	4,30	0,801	35,3	4,0	11,2
	2	21,0	4,40	0,802	24,5	4,6	18,6
	3	19,7	4,30	0,000	28,0	2,9	10,4
	4	19,4	4,30	0,046	24,3	4,3	17,5
	5	20,7	4,45	1,600	37,4	4,0	10,7
$\bar{x} \pm$ SD		21,0 \pm 1,9	4,35 \pm 0,07	0,65 \pm 0,66	29,9 \pm 6,1	3,9 \pm 0,6	13,7 \pm 4,0
Median			0,801	28,0			17,5
p-Wert							0,08

Tab 11.2.3: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien) an Gesamt-PGs	
10 mg/ml	1	26,1	4,40	0,127	41,0	4,9	11,9
	2	17,8	4,30	0,139	9,3	2,7	28,6
	3	13,0	4,45	0,273	26,0	5,0	19,3
	4	19,6	4,50	0,146	17,6	3,4	19,3
	5	15,0	4,40	0,104	22,6	4,2	18,5
$\bar{x} \pm SD$		18,3 \pm 5,0	4,41 \pm 0,07	0,16 \pm 0, 07	23,3 \pm 11,7	4,0 \pm 1,0	19,5 \pm 5,9
Median				0,139	22,6		13,7
p-Wert							0,345

Der Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt wurde gemäß 2.2.10.2 und 2.2.10.3 bestimmt. Dargestellt ist der Gehalt von Kollagen Typ II in den Medien sowie der Gesamt-PG-Gehalt und der PG-Gehalt im Medium, angegeben als Absolutwert und in Prozent zum Gesamt-PG-Gehalt (= 100%). Der Gesamt-PG-Gehalt errechnete sich aus dem PG-Gehalt der Knorpelimplantate und dem PG-Gehalt in den Medien. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von CH-alpha[®] auf den Kollagen Typ II-Gehalt, den Gesamt-PG-Gehalt und den prozentualen PG-Anteil im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da für den prozentualen PG-Anteil vom Gesamt-PG-Gehalt ein Global-effekt festgestellt werden konnte, wurde zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

Tab 11.2.4 Konzentrations-Wirkung-Beziehung von FGH auf den Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt in den Medien und Knorpelxplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien) an Gesamt-PGs	
Globaleffekt			p = 0,005	p = 0,325	p = 0,822		
0 mg/ml	1	23,3	4,10	5,372	36,6	3,5	9,6
	2	21,5	4,00	2,311	38,6	5,0	12,9
	3	27,2	4,00	2,772	46,7	4,8	10,3
	4	23,8	3,90	0,073	29,8	3,4	11,5
	5	23,7	3,80	4,563	10,7	4,8	44,4
	6	30,7	4,50	1,262	34,2	5,6	16,4
$\bar{x} \pm$ SD		25,0 \pm 3,3	4,05 \pm 0,24	2,72 \pm 1,99	32,8 \pm 12,2	4,5 \pm 0,9	17,5 \pm 13,4
Median				2,542	35,4		12,2
0,1 mg/ml	1	19,6	4,20	0,821	35,0	3,7	10,6
	2	19,4	3,80	1,833	31,1	3,6	11,5
	3	24,9	4,10	1,890	47,1	5,9	12,6
	4	14,6	3,90	0,469	50,5	5,8	11,4
	5	20,7	4,00	0,297	28,8	6,2	21,4
	6	30,3	4,50	1,406	27,1	4,7	17,3
$\bar{x} \pm$ SD		21,6 \pm 5,4	4,08 \pm 0,25	1,12 \pm 0,69	36,6 \pm 9,9	5,0 \pm 1,2	14,1 \pm 4,3
Median				1,113	33,0		12,0
p-Wert				0,643			
0,5 mg/ml	1	17,1	4,10	0,724	23,5	4,5	19,1
	2	17,6	4,10	2,732	50,1	3,8	7,6
	3	27,1	4,00	2,219	44,8	5,2	11,6
	4	26,2	3,80	0,780	38,7	5,3	13,6
	5	25,8	3,10	0,211	31,5	3,6	11,5
	6	23,7	4,60	1,007	30,2	5,3	17,4
$\bar{x} \pm$ SD		22,9 \pm 4,5	3,95 \pm 0,49	1,28 \pm 0,98	36,5 \pm 9,9	4,6 \pm 0,8	13,5 \pm 4,2
Median				0,894	35,1		12,6
p-Wert				0,643			
1 mg/ml	1	17,6	3,80	2,725	39,2	4,3	10,9
	2	16,8	3,90	2,565	45,6	5,7	12,6
	3	25,9	3,50	1,321	47,1	5,2	11,1
	4	22,9	3,90	0,299	46,7	3,4	7,3
	5	32,1	3,10	0,255	30,8	3,2	10,5
	6	29,7	4,20	0,798	34,5	6,0	17,4
$\bar{x} \pm$ SD		24,2 \pm 6,3	3,73 \pm 0,38	1,33 \pm 1,09	40,6 \pm 6,9	4,7 \pm 1,2	11,6 \pm 3,3
Median				1,060	42,4		11,0
p-Wert				0,280			

Tab 11.2.4: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien) an Gesamt-PGs	
2 mg/ml	1	17,2	4,20	0,614	35,9	5,1	14,1
	2	23,0	4,10	1,143	47,4	3,3	6,9
	3	22,4	3,80	1,015	53,0	6,3	11,8
	4	20,9	4,00	0,336	40,1	4,9	12,2
	5	32,0	3,80	0,313	17,6	4,1	23,2
	6	28,7	4,40	0,663	34,3	5,8	17,0
$\bar{x} \pm$ SD		24,0 \pm 5,4	4,05 \pm 0,23	0,68 \pm 0,34	38,0 \pm 12,3	4,9 \pm 1,1	14,2 \pm 5,5
Median				0,638	38,0		13,2
p-Wert				0,064			
10 mg/ml	1	23,6	4,10	0,043	38,3	4,0	10,4
	2	21,3	4,10	0,569	56,2	4,1	7,4
	3	24,1	3,80	0,361	46,5	5,7	12,3
	4	26,5	3,90	0,020	29,4	3,5	11,8
	5	34,8	3,90	0,091	17,4	4,0	23,0
	6	31,4	4,60	0,537	33,2	6,2	18,7
$\bar{x} \pm$ SD		27,0 \pm 5,2	4,07 \pm 0,29	0,27 \pm 0,25	36,8 \pm 13,5	4,6 \pm 1,1	13,9 \pm 5,8
Median				0,226	35,7		12,1
p-Wert				< 0,001			

Der Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt wurde gemäß 2.2.10.2 und 2.2.10.3 bestimmt. Dargestellt ist der Gehalt von Kollagen Typ II in den Medien sowie der Gesamt-PG-Gehalt und der PG-Gehalt im Medium, angegeben als Absolutwert und in Prozent zum Gesamt-PG-Gehalt (= 100%). Der Gesamt-PG-Gehalt errechnete sich aus dem PG-Gehalt der Knorpelimplantate und dem PG-Gehalt in den Medien. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von FGH auf den Kollagen Typ II-Gehalt, den Gesamt-PG-Gehalt und den prozentualen PG-Anteil im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da für Kollagen Typ II ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

Tab 11.2.5 Konzentrations-Wirkung-Beziehung von FGH-N auf den Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt in den Medien und Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien) an Gesamt-PGs	
Globaleffekt			p = 0,092	p = 0,345	p = 0,794		
0 mg/ml	1	25,6	4,00	2,211	26,4	3,9	14,9
	2	22,1	4,10	[26,6]	29,1	5,5	18,8
	3	30,6	4,10	1,746	39,7	4,9	12,3
	4	24,5	3,50	0,212	42,6	3,8	9,0
	5	31,7	4,10	0,199	26,9	4,4	16,2
	6	35,3	4,40	0,906	34,5	3,7	10,8
$\bar{x} \pm$ SD		28,3 \pm 5,0	4,03 \pm 0,29	1,055 \pm 0,91	33,2 \pm 6,8	4,4 \pm 0,7	13,7 \pm 3,6
Median			0,906	31,8			13,6
0,1 mg/ml	1	28,7	3,90	2,123	39,6	2,9	7,2
	2	19,3	3,60	[3,981]	41,4	6,4	15,4
	3	26,0	4,10	2,035	40,9	5,3	12,9
	4	19,9	3,90	0,228	38,4	3,6	9,4
	5	26,9	3,90	1,372	22,8	4,0	17,4
	6	27,6	4,50	0,380	35,1	3,4	9,7
$\bar{x} \pm$ SD		24,7 \pm 4,1	3,98 \pm 0,27	1,23 \pm 0,89	36,4 \pm 7,0	4,2 \pm 1,3	12,0 \pm 3,9
Median				1,372	39,0		11,3
0,5 mg/ml	1	27,6	4,00	1,124	37,6	4,7	12,6
	2	19,4	3,70	[4,548]	33,9	4,5	13,2
	3	26,5	4,00	2,247	42,5	6,0	14,0
	4	22,6	3,90	0,012	33,1	2,7	8,0
	5	22,3	3,80	0,639	17,8	3,9	22,1
	6	29,8	4,30	1,227	37,7	3,7	9,8
$\bar{x} \pm$ SD		24,7 \pm 3,9	3,95 \pm 0,21	1,05 \pm 0,82	33,8 \pm 8,4	4,2 \pm 1,1	13,3 \pm 4,9
Median				1,124	35,8		12,9
1 mg/ml	1	28,3	3,60	0,868	36,0	3,0	8,3
	2	21,7	3,70	[14,5]	32,5	7,7	23,7
	3	29,8	3,50	1,348	36,1	4,8	13,4
	4	25,5	3,50	0,369	36,2	3,6	9,9
	5	28,9	3,60	0,325	23,6	3,4	14,6
	6	24,1	4,20	2,486	33,0	5,6	16,8
$\bar{x} \pm$ SD		26,4 \pm 3,1	3,68 \pm 0,26	1,08 \pm 0,89	32,9 \pm 4,8	4,7 \pm 1,8	14,5 \pm 5,5
Median				0,868	34,5		14,0

Tab 11.2.5: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien) an Gesamt-PGs	
2 mg/ml	1	21,4	4,00	0,359	29,7	4,0	13,3
	2	17,5	3,90	[12,1]	38,0	5,7	15,0
	3	30,4	3,70	1,352	35,0	3,5	10,1
	4	23,0	3,60	0,176	36,4	3,3	9,0
	5	28,1	4,00	0,937	20,1	3,8	18,9
	6	28,2	4,50	0,857	29,8	4,7	15,8
$\bar{x} \pm$ SD	24,8 \pm 4,9	3,95 \pm 0,31	0,74 \pm 0,47	31,5 \pm 6,6	4,2 \pm 0,9	13,7 \pm 3,7	
Median			0,857	32,4		14,2	
10 mg/ml	1	24,6	4,10	0,121	29,4	4,8	16,3
	2	18,8	3,90	[4,114]	44,2	5,5	12,4
	3	29,7	4,20	0,542	44,5	5,1	11,4
	4	29,1	3,90	0,206	35,9	3,3	9,1
	5	30,9	4,10	0,176	35,8	4,0	11,3
	6	30,7	4,60	0,106	34,1	3,9	11,5
$\bar{x} \pm$ SD	27,3 \pm 4,8	4,13 \pm 0,26	0,23 \pm 0,18	37,3 \pm 5,9	4,4 \pm 0,8	12,0 \pm 2,4	
Median			0,176	35,9		11,4	

Der Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt wurde gemäß 2.2.10.2 und 2.2.10.3 bestimmt. Dargestellt ist der Gehalt von Kollagen Typ II in den Medien sowie der Gesamt-PG-Gehalt und der PG-Gehalt im Medium, angegeben als Absolutwert und in Prozent zum Gesamt-PG-Gehalt (= 100 %). Der Gesamt-PG-Gehalt errechnete sich aus dem PG-Gehalt der Knorpelimplantate und dem PG-Gehalt in den Medien. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von FGH-N auf den Kollagen Typ II-Gehalt, den Gesamt-PG-Gehalt und den prozentualen PG-Anteil im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da kein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde auf ein zusätzlichen Paarvergleich nach Friedman zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung verzichtet.

Tab 11.2.6 Konzentrations-Wirkung-Beziehung von Mobiforte® auf den Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt in den Medien und Knorpelxplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien)an Gesamt-PGs
Globaleffekt			p = 0,185	p = 0,119		p < 0,001
0 mg/ml						
1	21,0	3,90	1,146	32,7	4,1	12,6
2	15,1	4,10	2,201	52,1	6,7	12,8
3	28,6	3,90	3,718	39,0	4,4	11,3
4	20,0	4,10	0,122	20,8	2,6	12,6
5	26,0	3,90	0,310	20,6	2,1	10,4
6	35,8	4,50	0,828	31,4	3,4	10,9
$\bar{x} \pm$ SD	24,4 \pm 7,3	4,07 \pm 0,23	1,39 \pm 1,36	32,8 \pm 11,9	3,9 \pm 1,6	11,8 \pm 1,1
Median			0,987	32,0		11,9
0,1 mg/ml						
1	28,6	3,90	2,277	40,2	3,8	9,3
2	23,6	3,90	1,810	64,3	5,2	8,2
3	19,6	3,80	0,919	32,5	4,2	12,9
4	24,5	3,90	0,301	34,9	5,3	15,2
5	22,7	3,90	0,644	17,6	3,5	19,7
6	32,7	4,50	0,494	33,8	3,9	11,5
$\bar{x} \pm$ SD	25,3 \pm 4,7	3,98 \pm 0,26	1,07 \pm 0,79	37,2 \pm 15,3	4,3 \pm 0,8	12,8 \pm 4,2
Median			0,781	34,4		12,2
p-Wert						0,440
0,5 mg/ml						
1	28,8	3,80	1,522	42,2	2,8	6,7
2	17,2	4,10	1,747	50,0	9,1	18,2
3	21,8	4,00	2,329	49,2	5,8	11,7
4	21,5	4,00	0,171	39,2	5,5	13,9
5	20,9	4,00	0,118	36,9	7,0	19,1
6	25,2	4,20	0,679	38,1	5,1	13,4
$\bar{x} \pm$ SD	22,6 \pm 4,0	4,02 \pm 0,13	1,09 \pm 0,91	42,6 \pm 5,7	5,9 \pm 2,1	13,9 \pm 4,5
Median			1,100	40,7		13,7
p-Wert						0,355
1 mg/ml						
1	26,3	3,90	1,202	43,9	6,7	15,3
2	19,4	3,80	2,751	45,7	7,3	16,0
3	24,4	3,50	2,016	48,0	6,5	13,5
4	18,2	3,60	0,320	44,4	7,3	16,5
5	29,6	3,70	0,717	25,9	5,7	21,9
6	29,5	4,00	4,880	45,0	6,0	13,3
$\bar{x} \pm$ SD	24,6 \pm 4,9	3,75 \pm 0,19	1,98 \pm 1,67	42,1 \pm 8,1	6,6 \pm 0,7	16,1 \pm 3,1
Median			1,609	44,7		15,6
p-Wert						0,031

Tab 11.2.6: Fortsetzung

Patient Nr.	NG [mg]	Volumen [ml]	Kollagen Typ II [ng/mg NG]	Gesamt-PG [μ g/mg NG]	PG der Medien [μ g/mg NG]	% PGs (Medien) an Gesamt-PGs	
2 mg/ml	1	23,3	4,10	0,421	44,2	6,8	15,3
	2	16,7	4,10	0,873	36,0	9,9	27,6
	3	26,5	4,10	0,939	44,5	6,6	14,9
	4	25,2	4,10	0,319	29,7	6,9	23,2
	5	34,1	3,90	0,275	18,9	8,8	46,3
	6	30,9	4,40	0,158	34,9	8,3	23,9
$\bar{x} \pm$ SD		26,1 \pm 6,1	4,12 \pm 0,16	0,50 \pm 0,33	34,7 \pm 9,6	7,9 \pm 1,3	25,2 \pm 11,5
Median				0,370	35,4		23,5
p-Wert							0,002
10 mg/ml	1	23,3	4,10	1,877	28,6	16,1	56,4
	2	18,4	3,90	0,144	49,1	25,1	51,0
	3	20,9	4,10	0,092	34,9	18,7	53,6
	4	20,5	3,90	0,370	49,3	15,2	30,8
	5	23,7	4,10	0,528	23,0	16,4	71,1
	6	22,1	4,70	0,371	36,8	19,0	51,7
$\bar{x} \pm$ SD		21,5 \pm 2,0	4,13 \pm 0,29	0,56 \pm 0,66	36,9 \pm 10,7	18,4 \pm 3,6	52,4 \pm 12,9
Median				0,371	35,8		52,6
p-Wert							< 0,001

Der Kollagen Typ II- und Proteoglykangehalt wurde gemäß 2.2.10.2 und 2.2.10.3 bestimmt. Dargestellt ist der Gehalt von Kollagen Typ II in den Medien sowie der Gesamt-PG-Gehalt und der PG-Gehalt im Medium, angegeben als Absolutwert und in Prozent zum Gesamt-PG-Gehalt (= 100%). Der Gesamt-PG-Gehalt errechnete sich aus dem PG-Gehalt der Knorpelimplantate und dem PG-Gehalt in den Medien. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von Mobiforte® auf den Kollagen Typ II-Gehalt, den Gesamt-PG-Gehalt und den prozentualen PG-Anteil im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da für den prozentualen PG-Anteil vom Gesamt-PG-Gehalt ein Global-effekt festgestellt werden konnte, wurde zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

Tab 11.2.7 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von RDH auf den Gehalt von PGE₂, NO, MMP-1, MMP-3 und MMP-13 in den Nährmedien von Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stationen

Patient Nr.	PGE ₂ [pg/mg NG]	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg Kn]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]
Globaleffekt	p = 0,001	p < 0,001	p = 0,002	p = 0,001	p = 0,001
0 mg/ml 1	0,00	0,762	12,36	122,2	0,011
2	1,31	0,293	0,92	152,4	0,002
3	6,40	0,579	7,41	172,4	0,004
4	3,54	0,461	0,46	286,2	0,017
5	2,10	[0,000]	1,03	219,5	0,006
$\bar{x} \pm SD$	2,67 ± 2,45	0,419 ± 0,290	4,4 ± 5,3	190,6 ± 64,1	0,008 ± 0,006
Median	2,10	0,461	1,03	172,4	0,006
0,1 mg/ml 1	2,89	0,759	17,12	246,8	0,068
2	0,00	0,487	11,68	482,5	0,030
3	0,00	0,649	8,31	375,1	0,029
4	3,82	0,923	20,45	676,4	0,048
5	9,32	0,079	7,76	668,9	0,196
$\bar{x} \pm SD$	3,21 ± 3,82	0,579 ± 0,322	13,1 ± 5,6	489,9 ± 186,5	0,074 ± 0,070
Median	2,89	0,649	11,68	482,5	0,048
p-Wert	1,000	0,612	0,398	0,398	0,398
0,5 mg/ml 1	41,68	0,808	51,37	1104,2	0,612
2	30,23	0,766	36,12	1542,5	0,757
3	5,33	0,909	22,05	1003,4	0,181
4	4,61	1,017	60,46	1973,0	0,183
5	17,32	0,304	18,29	882,1	0,458
$\bar{x} \pm SD$	19,83 ± 16,08	0,761 ± 0,273	37,7 ± 18,2	1301,0 ± 450,8	0,438 ± 0,257
Median	17,32	0,808	36,12	1104,2	0,458
p-Wert	0,237	0,043	0,007	0,043	0,043
1 mg/ml 1	57,69	0,909	38,70	1380,3	2,485
2	49,58	0,777	30,99	1317,6	1,006
3	19,85	0,876	38,49	1127,3	0,219
4	28,27	1,220	39,06	2336,7	0,299
5	107,82	0,248	31,48	1362,8	0,958
$\bar{x} \pm SD$	52,64 ± 34,46	0,806 ± 0,353	35,7 ± 4,1	1505,0 ± 475,7	0,993 ± 0,909
Median	49,58	0,876	38,49	1362,8	0,958
p-Wert	0,028	0,028	0,011	0,011	0,001

Tab 11.2.7: Fortsetzung

Patient Nr.	PGE ₂ [pg/mg NG]	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg Kn]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]	
2 mg/ml	1	29,28	0,991	54,08	1706,9	1,157
	2	101,85	1,059	40,51	1669,8	0,351
	3	83,12	0,838	45,10	1983,0	0,918
	4	86,8	1,887	46,56	2993,1	0,339
	5	217,42	0,376	26,77	1352,8	1,722
$\bar{x} \pm SD$	103,7 ± 69,25	1,030 ± 0,548	42,6 ± 10,1	1941,1 ± 629,1	0,897 ± 0,582	
Median	86,80	0,991	45,10	1706,9	0,918	
p-Wert	0,007	0,004	< 0,001	< 0,001	0,001	
10 mg/ml	1	130,57	1,431	45,05	2194,8	0,837
	2	132,50	1,098	22,74	1359,7	0,403
	3	81,42	0,983	36,59	1881,7	0,512
	4	160,62	2,300	82,38	2573,1	0,762
	5	364,83	0,701	39,59	2156,5	1,544
$\bar{x} \pm SD$	174,28 ± 110,4	1,303 ± 0,616	45,3 ± 22,3	2033,2 ± 449,8	0,812 ± 0,446	
Median	132,50	1,098	39,59	2156,5	0,762	
p-Wert	< 0,001	< 0,001	0,002	< 0,001	0,001	

Der PGE₂-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.4, der NO-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.5 und der MMP-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.6 bestimmt. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben. Die zugehörigen Knorpelnassgewichte sowie das Volumen sind in Tab 11.2.1 aufgeführt.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von RDH auf den PGE₂-Gehalt, den NO-Gehalt, den MMP-1-Gehalt, den MMP-3-Gehalt und den MMP-13-Gehalt im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da für PGE₂, NO, MMP-1, MMP-3 und MMP-13 ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde dort zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

Tab 11.2.8 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von RDH-N auf den Gehalt von NO, MMP-1, MMP-3 und MMP-13 in den Nährmedien von Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg NG]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]
Globaleffekt	p = 0,164	p = 0,037	p = 0,050	p = 0,570
0 mg/ml 1	0,807	1,35	100,5	0,016
2	0,400	1,03	162,1	0,036
3	0,479	1,20	112,6	0,011
4	0,170	0,34	382,9	0,115
5	0,118	0,61	148,7	[0,113]
$\bar{x} \pm SD$	0,395 ± 0,276	0,9 ± 0,4	181,4 ± 115,4	0,044 ± 0,049
Median	0,400	1,03	148,7	0,026
0,1 mg/ml 1	0,704	3,64	76,8	0,325
2	0,312	4,06	207,9	0,106
3	0,279	0,82	103,9	0,018
4	0,319	0,26	292,9	0,046
5	0,043	10,70	181,6	[0,090]
$\bar{x} \pm SD$	0,331 ± 0,237	3,9 ± 4,2	172,6 ± 86,2	0,124 ± 0,139
Median	0,312	3,64	181,6	0,076
p-Wert		0,398	0,735	
0,5 mg/ml 1	0,708	2,25	100,2	0,097
2	0,508	0,58	130,7	0,059
3	0,399	3,33	274,7	0,013
4	0,415	0,30	339,1	0,099
5	0,085	1,74	267,0	[0,231]
$\bar{x} \pm SD$	0,423 ± 0,225	1,6 ± 1,2	222,3 ± 102,1	0,067 ± 0,041
Median	0,415	1,74	267,0	0,078
p-Wert		0,866	0,612	
1 mg/ml 1	0,700	6,44	81,1	0,114
2	0,536	1,19	188,5	0,280
3	0,353	2,32	170,3	0,107
4	0,541	0,33	330,7	0,068
5	0,219	0,44	147,5	[0,135]
$\bar{x} \pm SD$	0,470 ± 0,186	2,1 ± 2,5	183,6 ± 91,7	0,142 ± 0,094
Median	0,536	1,19	170,3	0,110
p-Wert		0,398	0,735	
2 mg/ml 1	0,904	4,70	130,1	0,006
2	0,358	3,62	183,0	0,145
3	0,330	5,81	293,1	0,148
4	0,581	0,97	456,9	0,097
5	0,206	2,68	216,3	[0,112]
$\bar{x} \pm SD$	0,476 ± 0,275	3,6 ± 1,9	255,9 ± 127,0	0,099 ± 0,066
Median	0,358	3,62	216,3	0,121
p-Wert		0,063	0,128	

Tab 11.2.8: Fortsetzung

Patient Nr.	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg NG]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]	
10 mg/ml	1	0,742	5,33	175,3	0,102
	2	0,357	4,33	189,9	0,074
	3	0,448	6,72	268,3	0,019
	4	0,251	8,79	646,9	0,036
	5	0,066	9,44	538,2	[n. b.]
$\bar{x} \pm SD$	$0,373 \pm 0,251$	$6,9 \pm 2,2$	$363,7 \pm 215,3$	$0,058 \pm 0,038$	
Median	0,357	6,72	268,3	0,055	
p-Wert		0,004	0,028		

Der NO-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.5 und der MMP-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.6 bestimmt. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben. Die zugehörigen Knorpelnassgewichte sowie das Volumen sind in Tab 11.2.2 aufgeführt.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von RDH-N auf den NO-Gehalt, den MMP-1-Gehalt, den MMP-3-Gehalt und den MMP-13-Gehalt im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da für MMP-1 und MMP-3 ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde dort zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

n.b. bedeutet nicht bestimmt. Die Werte in eckigen Klammern sind Ausreißer gemäß Ausreißertest nach Dean-Dixon und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen.

Tab 11.2.9 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von CH-alpha[®] auf den Gehalt von PGE₂, NO, MMP-1, MMP-3 und MMP-13 in den Nährmedien von Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	PGE ₂ [pg/mg NG]	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg Kn]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]
Globaleffekt	p = 0,009	p = 0,326	p = 0,029	p = 0,134	p = 0,722
0 mg/ml 1	0,00	0,700	3,74	147,7	0,147
2	0,00	0,087	2,72	199,5	0,217
3	4,39	0,436	3,99	162,9	0,006
4	0,00	0,554	1,59	267,2	0,032
5	0,00	0,045	[1,27]	[223,9]	[0,082]
$\bar{x} \pm SD$	0,88 ± 1,96	0,364 ± 0,288	3,01 ± 1,09	194,3 ± 53,2	0,100 ± 0,099
Median	0,00	0,436	3,23	181,2	0,089
0,1 mg/ml 1	0,00	0,466	11,89	147,9	0,274
2	4,02	0,774	1,17	106,6	0,023
3	0,00	0,388	0,72	89,8	0,002
4	3,26	0,345	0,46	225,2	0,023
5	3,94	0,269	[1,58]	[270,3]	[0,214]
$\bar{x} \pm SD$	2,24 ± 2,07	0,449 ± 0,196	3,56 ± 5,56	142,4 ± 60,4	0,080 ± 0,129
Median	3,26	0,388	0,95	127,3	0,023
p-Wert	0,499		0,850		
0,5 mg/ml 1	0,00	0,560	6,63	138,6	0,034
2	2,96	0,247	2,87	166,2	0,045
3	8,19	0,195	24,74	573,8	0,710
4	6,17	0,354	1,04	217,6	0,016
5	5,96	0,197	[2,99]	[346,3]	[0,399]
$\bar{x} \pm SD$	4,66 ± 3,20	0,311 ± 0,153	8,82 ± 10,87	274,0 ± 202,5	0,201 ± 0,340
Median	5,96	0,247	4,75	191,9	0,039
p-Wert	0,151		0,571		
1 mg/ml 1	0,00	0,461	8,00	118,0	0,155
2	9,31	0,126	0,66	127,3	0,034
3	0,00	0,318	1,75	103,7	0,003
4	8,53	0,225	1,87	307,4	0,039
5	31,76	0,094	[17,14]	[1410,7]	[n.d.]
$\bar{x} \pm SD$	9,92 ± 13,00	0,245 ± 0,150	3,07 ± 3,33	164,1 ± 96,1	0,058 ± 0,067
Median	8,53	0,225	1,81	122,6	0,036
p-Wert	0,091		1,000		
2 mg/ml 1	4,35	0,519	8,75	280,9	0,085
2	0,00	0,371	4,04	112,0	0,020
3	8,68	0,359	4,09	242,9	0,011
4	3,11	0,465	3,08	239,3	0,030
5	4,67	0,122	[86,36]	[715,6]	[0,626]
$\bar{x} \pm SD$	4,16 ± 3,13	0,367 ± 0,152	4,99 ± 2,55	218,8 ± 73,6	0,037 ± 0,033
Median	4,35	0,371	4,07	241,1	0,025
p-Wert	0,205		0,131		

Tab 11.2.9: Fortsetzung

Patient Nr.	PGE ₂ [pg/mg NG]	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg Kn]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]
10 mg/ml 1	19,10	0,648	1,92	121,7	0,094
2	19,58	0,268	0,33	55,5	0,015
3	47,34	0,563	0,71	97,4	0,017
4	27,44	0,482	0,30	154,7	0,021
5	97,65	0,000	[1,32]	[287,8]	[0,347]
$\bar{x} \pm SD$	42,22 ± 33,03	0,392 ± 0,261	0,81 ± 0,76	107,3 ± 41,8	0,037 ± 0,038
Median	27,44	0,482	0,52	109,6	0,019
p-Wert	< 0,001		0,059		

Der PGE₂-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.4, der NO-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.5 und der MMP-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.6 bestimmt. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben. Die zugehörigen Knorpelnassgewichte sowie das Volumen sind in Tab 11.2.3 aufgeführt.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von CH-alpha[®] auf den PGE₂-Gehalt, den NO-Gehalt, den MMP-1-Gehalt, den MMP-3-Gehalt und den MMP-13-Gehalt im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da für PGE₂ und MMP-1 ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde dort zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

Die Werte in eckigen Klammern sind Ausreißer gemäß Ausreißertest nach Dean-Dixon und wurden daher von der Auswertung ausgeschlossen.

Tab 11.2.10 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von FGH auf den Gehalt von NO, MMP-1, MMP-3 und MMP-13 in den Nährmedien von Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg NG]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]
Globaleffekt	p = 0,649	p = 0,01	p = 0,002	p = 0,009
0 mg/ml 1	0,441	0,57	190,0	0,014
2	0,438	0,22	186,6	0,000
3	0,571	2,18	151,0	0,018
4	0,324	0,56	136,2	0,034
5	0,913	0,15	136,2	0,010
6	0,562	0,81	211,8	0,012
$\bar{x} \pm SD$	0,541 \pm 0,203	0,75 \pm 0,74	168,6 \pm 31,8	0,015 \pm 0,011
Median	0,501	0,57	168,8	0,013
0,1 mg/ml 1	0,030	1,67	229,0	0,007
2	0,244	1,56	222,2	0,002
3	0,714	3,83	246,2	0,087
4	0,453	0,20	101,5	0,003
5	0,962	5,62	443,2	0,069
6	0,464	0,72	153,0	0,020
$\bar{x} \pm SD$	0,478 \pm 0,331	2,3 \pm 2,1	232,5 \pm 116,8	0,032 \pm 0,037
Median	0,458	1,61	225,6	0,014
p-Wert		0,355	0,758	0,280
0,5 mg/ml 1	0,000	1,56	235,2	0,014
2	0,388	0,94	259,2	0,002
3	0,590	4,80	170,3	0,026
4	0,738	1,76	138,9	0,054
5	0,564	0,59	132,4	0,006
6	0,523	1,27	189,4	0,054
$\bar{x} \pm SD$	0,467 \pm 0,255	1,8 \pm 1,5	187,6 \pm 51,2	0,026 \pm 0,023
Median	0,544	1,41	179,8	0,020
p-Wert		0,217	0,537	0,440
1 mg/ml 1	0,481	0,33	181,0	0,002
2	0,579	1,29	260,8	0,001
3	0,679	7,71	341,4	0,037
4	0,313	2,84	356,8	0,003
5	0,550	19,06	660,7	0,207
6	0,763	3,21	163,5	0,056
$\bar{x} \pm SD$	0,561 \pm 0,157	5,7 \pm 7,0	327,4 \pm 181,6	0,051 \pm 0,080
Median	0,565	3,03	301,1	0,020
p-Wert		0,021	0,123	0,440

Tab 11.2.10: Fortsetzung

Patient Nr.	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg NG]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]	
2 mg/ml	1	0,102	4,95	411,0	0,088
	2	0,395	8,99	657,9	0,003
	3	0,716	18,58	532,2	0,047
	4	0,433	1,57	221,3	0,047
	5	0,625	7,81	304,5	0,047
	6	0,457	1,74	290,7	0,115
$\bar{x} \pm SD$	0,455 \pm 0,213	7,2 \pm 6,3	402,9 \pm 165,6	0,058 \pm 0,039	
Median	0,445	6,38	357,7	0,047	
p-Wert		0,009	0,021	0,021	
10 mg/ml	1	0,266	10,92	616,4	0,186
	2	0,507	27,13	1151,8	0,028
	3	0,756	20,71	680,2	0,220
	4	0,416	5,30	542,0	0,158
	5	0,829	7,95	560,4	0,088
	6	0,582	7,84	1044,6	0,097
$\bar{x} \pm SD$	0,559 \pm 0,210	13,3 \pm 8,7	765,9 \pm 264,1	0,130 \pm 0,071	
Median	0,545	9,43	648,3	0,127	
p-Wert		< 0,001	< 0,001	0,001	

Der NO-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.5 und der MMP-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.6 bestimmt. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben. Die zugehörigen Knorpelnassgewichte sowie das Volumen sind in Tab 11.2.4 aufgeführt.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von FGH auf den NO-Gehalt, den MMP-1-Gehalt, den MMP-3-Gehalt und den MMP-13-Gehalt im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da für MMP-1, MMP-3 und MMP-13 ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde dort zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

Tab 11.2.11 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von FGH-N auf den Gehalt von NO, MMP-1, MMP-3 und MMP-13 in den Nährmedien von Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg NG]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]
Globaleffekt	p = 0,039	p = 0,044	p = 0,335	p = 0,973
0 mg/ml 1	0,392	0,98	249,3	0,090
2	0,643	0,75	245,1	0,029
3	0,596	3,83	103,3	0,078
4	0,040	3,09	100,7	0,110
5	0,571	0,53	128,5	0,046
6	0,372	0,78	135,1	0,047
$\bar{x} \pm SD$	0,436 \pm 0,223	1,7 \pm 1,4	160,3 \pm 68,6	0,067 \pm 0,031
Median	0,481	0,88	131,8	0,062
0,1 mg/ml 1	0,776	0,23	187,0	0,025
2	0,491	0,73	260,7	0,170
3	0,558	1,33	124,0	0,066
4	1,025	0,41	106,3	0,064
5	0,619	1,03	227,8	0,078
6	0,301	1,51	209,1	0,099
$\bar{x} \pm SD$	0,628 \pm 0,249	0,87 \pm 0,51	185,8 \pm 60,1	0,084 \pm 0,049
Median	0,588	0,88	198,0	0,072
p-Wert	0,758	0,123		
0,5 mg/ml 1	0,585	0,60	193,1	0,048
2	0,925	0,92	214,3	0,031
3	0,792	1,99	109,2	0,073
4	0,756	0,62	115,4	0,131
5	0,679	1,14	206,2	0,027
6	0,328	2,96	247,6	0,033
$\bar{x} \pm SD$	0,678 \pm 0,206	1,4 \pm 0,9	181,0 \pm 56,2	0,057 \pm 0,040
Median	0,717	1,03	199,7	0,041
p-Wert	0,165	1,000		
1 mg/ml 1	1,222	0,72	170,8	0,041
2	0,567	2,62	294,5	0,054
3	0,576	7,16	146,3	0,111
4	0,892	1,70	69,5	0,075
5	0,585	1,60	218,2	0,120
6	0,816	2,01	141,7	0,031
$\bar{x} \pm SD$	0,777 \pm 0,259	2,6 \pm 2,3	173,5 \pm 76,4	0,072 \pm 0,037
Median	0,701	1,86	158,6	0,064
p-Wert	0,165	0,217		

Tab 11.2.11: Fortsetzung

Patient Nr.	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg NG]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]	
2 mg/ml	1	0,755	0,83	234,6	0,126
	2	0,834	0,81	601,4	0,057
	3	0,361	4,75	107,5	0,052
	4	1,040	3,09	149,9	0,085
	5	0,648	1,36	172,3	0,061
	6	0,634	2,05	121,1	0,042
$\bar{x} \pm SD$	$0,712 \pm 0,227$	$2,1 \pm 1,5$	$231,1 \pm 186,8$	$0,071 \pm 0,031$	
Median	0,702	1,70	161,1	0,059	
p-Wert	0,217	0,355			
10 mg/ml	1	0,998	4,22	282,3	0,154
	2	1,064	0,18	189,8	0,040
	3	0,742	4,76	116,3	0,061
	4	2,159	0,73	208,2	0,053
	5	0,906	2,78	246,8	0,155
	6	0,787	9,21	370,7	0,218
$\bar{x} \pm SD$	$1,109 \pm 0,528$	$3,6 \pm 3,3$	$235,7 \pm 86,8$	$0,113 \pm 0,072$	
Median	0,952	3,50	227,5	0,108	
p-Wert	0,002	0,217			

Der NO-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.5 und der MMP-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.6 bestimmt. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben. Die zugehörigen Knorpelnassgewichte sowie das Volumen sind in Tab 11.2.5 aufgeführt.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von FGH-N auf den NO-Gehalt, den MMP-1-Gehalt, den MMP-3-Gehalt und den MMP-13-Gehalt im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da für NO und MMP-1 ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde dort zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

Tab 11.2.12 Konzentrations-Wirkungs-Beziehung von Mobiforte® auf den Gehalt von NO, MMP-1, MMP-3 und MMP-13 in den Nährmedien von Knorpelimplantaten aus mittleren OA-Stadien

Patient Nr.	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg NG]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]
Globaleffekt	p < 0,001	p = 0,005	p = 0,037	p = 0,073
0 mg/ml 1	0,155	1,04	239,2	0,086
2	0,602	0,28	272,3	0,021
3	0,451	0,64	118,6	0,016
4	0,550	1,14	[196,3]	0,310
5	0,277	4,24	449,6	0,155
6	0,428	2,00	[220,2]	0,291
$\bar{x} \pm SD$	0,411 ± 0,168	1,6 ± 1,4	269,9 ± 136,8	0,146 ± 0,130
Median	0,440	1,09	255,8	0,120
0,1 mg/ml 1	0,513	0,80	183,1	0,058
2	0,596	0,13	176,6	0,025
3	0,443	5,99	212,8	0,022
4	0,292	0,55	[135,2]	0,145
5	0,538	25,61	995,6	0,376
6	0,742	1,11	[211,3]	0,072
$\bar{x} \pm SD$	0,521 ± 0,151	5,7 ± 10,0	392,0 ± 402,7	0,116 ± 0,135
Median	0,525	0,95	198,0	0,065
p-Wert	0,877	0,877	1,000	
0,5 mg/ml 1	0,643	1,43	251,0	0,037
2	0,628	0,34	450,9	0,007
3	0,670	4,65	164,7	0,032
4	0,394	0,92	[2891,5]	0,073
5	0,899	0,29	210,9	0,011
6	1,065	2,58	[228,8]	0,085
$\bar{x} \pm SD$	0,716 ± 0,234	1,7 ± 1,7	269,4 ± 126,0	0,041 ± 0,032
Median	0,657	1,18	231,0	0,035
p-Wert	0,280	0,758	0,850	
1 mg/ml 1	0,661	1,66	192,6	0,021
2	1,466	0,33	409,2	0,058
3	0,917	15,74	378,7	0,079
4	0,811	0,79	[178,7]	0,109
5	0,925	1,64	214,5	0,061
6	1,155	37,38	[2369,8]	0,923
$\bar{x} \pm SD$	0,989 ± 0,284	9,6 ± 14,8	298,7 ± 111,0	0,208 ± 0,351
Median	0,921	1,65	296,6	0,070
p-Wert	0,014	0,280	0,850	

Tab 11.2.12: Fortsetzung

Patient Nr.	NO [nM/mg NG]	MMP-1 [ng/mg NG]	MMP-3 [ng/mg NG]	MMP-13 [ng/mg NG]	
2 mg/ml	1	1,029	4,46	535,6	0,228
	2	1,430	1,10	771,5	0,017
	3	0,989	24,77	417,2	0,096
	4	0,759	2,41	[176,4]	0,123
	5	1,790	5,03	423,3	0,134
	6	1,738	5,46	[550,2]	0,189
$\bar{x} \pm SD$	$1,289 \pm 0,427$	$7,2 \pm 8,8$	$536,9 \pm 165,6$	$0,131 \pm 0,074$	
Median	1,229	4,74	479,4	0,128	
p-Wert	0,005	0,031	0,131		
10 mg/ml	1	5,294	11,26	1261,4	0,160
	2	4,261	2,39	2077,5	0,147
	3	3,000	35,10	717,9	0,105
	4	1,264	3,18	[542,7]	0,288
	5	3,471	18,49	1133,6	0,164
	6	4,287	14,53	[1593,2]	0,108
$\bar{x} \pm SD$	$3,596 \pm 1,387$	$14,1 \pm 12,0$	$1297,6 \pm 569,4$	$0,162 \pm 0,067$	
Median	3,866	12,89	1197,5	0,153	
p-Wert	< 0,001	0,002	0,008		

Der NO-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.5 und der MMP-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.6 bestimmt. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben. Die zugehörigen Knorpelnassgewichte sowie das Volumen sind in Tab 11.2.6 aufgeführt.

Angegeben sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. Ein globaler Effekt von Mobiforte® auf den NO-Gehalt, den MMP-1-Gehalt, den MMP-3-Gehalt und den MMP-13-Gehalt im Medium wurde mittels Rangtest nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ untersucht. Da für NO, MMP-1 und MMP-3 ein Globaleffekt festgestellt werden konnte, wurde dort zusätzlich ein Paarvergleich nach Friedman bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $\alpha \leq 0,05$ zur Bestimmung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung durchgeführt.

Die Werte in Klammern sind Ausreißer gemäß Ausreißertest nach Dean-Dixon und wurden deshalb von der Auswertung ausgeschlossen.

Tab 11.2.13 TIMP-1-Gehalt

Patient Nr.	TIMP-1 [ng/mg NG]						
	RDH	RDH-N	CH-alpha [®]	FGH	FGH-N	Mobiforte [®]	
Globaleffekt	0,311	0,414	0,014	0,223	1,0	0,414	
0 mg/ml	1	16,0	8,1	13,8	9,6	8,3	9,3
	2	19,4	33,8	12,5	13,9	11,6	26,3
	3	29,0	18,4	22,5	21,1	9,4	14,0
	4	6,8	23,5	23,5	20,1	15,3	19,0
	5	28,9	23,3	15,1	12,1	13,6	14,8
	6	24,3	13,3	21,5	6,9	6,9	8,0
\bar{x}		20,74	20,05	18,13	13,95	10,85	15,22
\pm SD		8,56	8,962	4,871	5,691	3,229	6,698
Median		21,8	20,8	18,3	13,0	10,5	14,4
2 mg/ml	1	16,1	n.b.	n.b.	12,8	n.b.	n.b.
	2	20,4	n.b.	n.b.	14,7	n.b.	n.b.
	3	17,4	n.b.	n.b.	20,3	n.b.	n.b.
	4	14,5	n.b.	n.b.	10,7	n.b.	n.b.
	5	28,9	n.b.	n.b.	15,2	n.b.	n.b.
	6	18,8	n.b.	n.b.	7,6	n.b.	n.b.
\bar{x}		19,34			13,56		
\pm SD		5,106			4,33		
Median		18,1			13,8		
10 mg/ml	1	14,9	6,4	2,6	12,3	8,9	8,2
	2	13,8	24,2	3,0	14,0	6,5	22,1
	3	21,6	24,8	3,7	22,7	10,5	19,0
	4	20,7	25,2	7,2	17,1	15,1	11,0
	5	19,5	27,0	2,3	17,2	18,1	10,1
	6	17,8	17,1	6,3	7,8	6,8	10,1
\bar{x}		18,05	20,78	4,165	15,17	10,99	13,43
\pm SD		3,163	7,826	2,058	5,07	4,702	5,69
Median		18,7	24,5	3,3	15,5	9,7	10,6
p-Wert				0,014			

Der TIMP-1-Gehalt wurde gemäß 2.2.10.7 bestimmt. Die Werte sind auf das Knorpelnassgewicht (= NG) bezogen angegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte, die Standardabweichungen und die Mediane. n.b. = nicht bestimmt. Die zugehörigen Knorpelnassgewichte sowie das Volumen der Nährmedien sind in Tab 11.2.1 - Tab 11.2.6 aufgeführt.

12 Publikationsverzeichnis

Publikationen

Schadow S, Siebert H-C, Lochnit G, Kordelle J, Rickert M, Steinmeyer J.
Collagen metabolism of human osteoarthritic articular cartilage as modulated by bovine collagen hydrolysates.
PLOS ONE 2013, 8(1):e53955.

Poster Präsentationen

Schadow S, Lochnit G, Kordelle J, Steinmeyer J.
Die Wirkung von verschiedenen Kollagenhydrolysaten auf humane arthrotische Gelenkknorpelimplantate.
Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2012 (DKOU), Berlin, 23. - 26.10.2012
Posterpreis der Sektion für Grundlagenforschung der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Unfallchirurgie e.V.

Vorträge

Schadow S, Steinmeyer J.
Effect of collagen hydrolysates on cartilage metabolism.
Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie, Giessen, 06.05.2011.

Schadow S, Kordelle J, Lochnit G, Steinmeyer J.
Human articular cartilage metabolism as modulated by collagen hydrolysates. 10th World Congress of the International Cartilage Repair Society, Montreal (Canada), 12. - 15.5.2012.

13 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, und dass die vorgelegte Arbeit weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt wurde. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.

14 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. J. Steinmeyer für die Überlassung des Themas sowie für die Möglichkeit im Labor für experimentelle Orthopädie wissenschaftlich tätig zu sein. Vor allem bedanke ich mich für die sehr gute fachliche Betreuung und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Des weiteren möchte ich mich bei den medizinisch-technischen Assistenten Frau Magdalena Singer und Frau Christiane Hild für ihre gute Einarbeitung und Hilfsbereitschaft bedanken, womit sie einen wichtigen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit geleistet haben. Dem gesamten Team im Labor für experimentelle Orthopädie, vor allem Frau Manuela Döller, danke ich für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Arbeitsatmosphäre.

Ebenfalls danke ich Herrn Prof. Dr. H. Stürz und dem OP-Team für die hervorragende Zusammenarbeit bei der Gewinnung der Knorpelproben.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Wolfgang Pabst und Frau Ines Wawerla für ihre Hilfe bei statistischen Fragestellungen.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. W. Parmentier für die Bereitstellung von RDH, RDH-N, FGH und FGH-N.

Für die zahlreichen Anregungen und Hilfestellungen bei allen fachlichen Fragen bezüglich LaTeX danke ich Herrn Michael Mecking und meinem Mann Matthias Schadow.