

**Expression von arthrose-assoziierten Entzündungsmediatoren und
Enzymen durch synoviale Fibroblasten unter dem Einfluss von
Kollagenhydrolysaten**

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

vorgelegt von Nübling, Lukas Mathis
aus Lübeck

Gießen 2018

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie
(Labor für experimentelle Orthopädie),
unter der Leitung von Prof. Dr. med. Markus Rickert,
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Steinmeyer
2. Gutachter: Prof. Dr. Tilman Borggrefe

Tag der Disputation: 13.05.2019

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
1.1 Makroskopische Gelenkanatomie	1
1.2 Mikroskopische Gelenkanatomie	1
1.2.1 Synovialflüssigkeit und synoviale Fibroblasten	1
1.2.2 Chondrozyten	2
1.2.3 Extrazellulärmatrix	2
1.3 Arthrose des Gelenkknorpels	3
1.3.1 Pathomechanismus	4
1.3.1.1 Rolle des Knorpels	5
1.3.1.2 Rolle der Synovialmembran und der Synovialflüssigkeit	6
1.3.1.3 Rolle des subchondralen Knochens	8
1.3.2 Beteiligte Enzyme und Entzündungsmediatoren	9
1.3.2.1 ADAM17 und ADAMTS5.....	9
1.3.2.2 Caspase-1	10
1.3.2.3 COX-2	11
1.3.2.4 IL-1 β	11
1.3.2.5 IL-6 und IL-8	12
1.3.2.6 MMP-3 und MMP-13.....	13
1.3.2.7 PRG4/Lubricin	14
1.3.2.8 TIMP-1 und TIMP-3	15
1.3.3 Behandlungsoptionen.....	16
1.3.3.1 Kollagenhydrolysate	17
1.4 Zielsetzung der Arbeit	26
2 Material und Methoden.....	28
2.1 Material.....	28
2.1.1 Probenmaterial	28
2.1.1.1 Herkunft.....	28
2.1.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien	28
2.1.2 Geräte	29
2.1.3 Verbrauchsmaterialien	30
2.1.4 Chemikalien	31
2.1.5 Eigene Lösungen	34
2.1.6 Interleukin-1 β	34
2.1.7 Kollagenhydrolysate	34
2.2 Methoden	36
2.2.1 Grundlegende Methoden.....	36
2.2.1.1 Zellisolierung	36
2.2.1.2 Zellkultivierung, Passage und Aussaat der Zellen in eine 6-Well Platte.....	36
2.2.1.3 Versuchsvorbereitung	37
2.2.1.4 Zellzahl und Viabilitätsbestimmung.....	38
2.2.1.5 RNA-Extraktion mit TriFast™.....	38
2.2.1.6 Analyse der RNA	39
2.2.1.7 Herstellung von cDNA	39
2.2.1.8 Quantitative RT-PCR.....	40
2.2.1.9 Schmelzkurvenanalyse.....	42
2.2.1.10 Agarosegele und Gelelektrophorese	43
2.2.1.11 Mycoplasmentest.....	44
2.2.1.12 Durchflusszytometrie.....	46
2.2.1.13 Auswertung der Fotografien.....	47
2.2.2 Vorversuche	48
2.2.2.1 Bestimmung der optimalen FCS-Menge im Nährmedium.....	48
2.2.2.2 Vergleich zweier Methoden zur RNA-Extraktion	49
2.2.2.3 Effizienzbestimmung der Primer	50

2.2.2.4 Wahl des Referenzgens.....	51
2.2.3 Hauptversuch.....	53
2.2.3.1 Versuchsdesign	53
2.2.3.2 Durchführung.....	53
2.2.3.3 qRT-PCR	54
2.2.3.4 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode.....	55
2.2.3.5 Qualitätskontrolle	56
2.2.3.6 Ausgewertete Parameter	57
2.2.4 Statistik	57
3 Ergebnisse	58
3.1 Vorversuche	58
3.1.1 Bestimmung der optimalen FCS-Menge im Nährmedium	58
3.1.2 Vergleich zweier Methoden zur RNA-Extraktion	60
3.1.3 Effizienzbestimmung der Primer	61
3.1.4 Wahl des Referenzgens.....	62
3.1.5 Qualitätskontrolle der Vorversuche	62
3.1.5.1 Schmelzkurvenanalyse der Vorversuche	62
3.1.5.2 Agarosegele der Primerprodukte	63
3.1.5.3 Mycoplasmentests der Zellkulturen	64
3.2 Hauptversuch	64
3.2.1 Ausgewertete Parameter	64
3.2.1.1 Zellzahl und Viabilität der synovialen Fibroblasten	64
3.2.1.2 mRNA-Expression	66
3.2.1.3 Morphologische Veränderungen der synovialen Fibroblasten	78
3.2.2 Qualitätskontrolle	79
3.2.2.1 A260/A280-Quotient.....	79
3.2.2.2 RNA-Gehalt	80
3.2.2.3 Durchflusszytometrie.....	80
3.2.2.4 Mycoplasmentest.....	81
3.2.2.5 Schmelzkurvenanalyse der qRT-PCR des Hauptversuchs	81
4 Diskussion	82
4.1 Statistik	82
4.2 Vorversuche	83
4.3 Qualitätskontrolle und Methodik des Hauptversuchs	85
4.4 Ergebnisse des Hauptversuchs	89
4.5 Schlussfolgerung und Ausblick	98
5 Zusammenfassung	101
6 Summary	104
7 Abkürzungsverzeichnis	107
8 Abbildungsverzeichnis.....	110
9 Tabellenverzeichnis	113
10 Literaturverzeichnis	114
11 Tabellarischer Anhang	125
11.1 Material.....	125
11.2 Vorversuche	126
11.2.1 Wahl des Referenzgens.....	126
11.3 Hauptversuch	129

11.3.1 Ausgewertete Parameter.....	130
11.3.2 Qualitätskontrolle	156
11.3.2.1 RNA A260/A280-Quotient	156
11.3.2.2 RNA-Gehalt	158
12 Ehrenwörtliche Erklärung	160
13 Danksagung.....	161

1 Einleitung

1.1 Makroskopische Gelenkanatomie

Das diarthroide Gelenk verbindet zwei Knochen und ermöglicht deren Bewegung gegeneinander. Es besteht aus der Gelenkkapsel, dem mit Synovia gefüllten Gelenkspalt und dem Gelenkknorpel (1). Der Knorpel dient der gleichmäßigen Aufnahme des Drucks, der auf das Gelenk wirkt. In der Gelenkhöhle führt die Synovialflüssigkeit dazu, dass die Knorpelflächen zueinander gleiten können und die Knorpelzellen ernährt werden. Die Gelenkkapsel sorgt für die Bildung und Speicherung der Synovialflüssigkeit in der Gelenkhöhle sowie für die Stabilität des Gelenks (1–3). Für die vorliegende Dissertation relevant ist das Kniegelenk, welches auch als Kondylengelenk oder *Articulatio femorotibialis* bezeichnet wird (1). Das Kniegelenk verbindet die drei Knochen Femur, Tibia und Patella miteinander. Der distale Femur endet dabei in zwei konvex geformten Knochenbögen, den Kondylen. Das entsprechende Korrelat der Tibia sind zwei leicht konkav geformte Furchen. Dabei sind die Gelenkflächen nicht absolut kongruent zueinander. Weiterhin sind die Gelenkflächen mit Knorpel überzogen. Auch die Patella ist auf ihrer Rückseite mit Knorpel bedeckt. Das Kniegelenk besitzt zusätzlich zwei Menisken, die zwischen Femur und Tibia im Gelenkspalt liegen. Diese haben in etwa die Form eines Halbmondes und gleichen die vorherrschende Inkongruenz der Kondylen aus. Weiterhin umgibt das Kniegelenk eine Reihe an Bändern. Diese sorgen neben den Muskeln des Beines und der Gelenkkapsel für die mechanische Stabilität des Gelenks (1).

1.2 Mikroskopische Gelenkanatomie

1.2.1 Synovialflüssigkeit und synoviale Fibroblasten

Die Synovialflüssigkeit ist eine visköse Flüssigkeit und wird von den synovialen Fibroblasten gebildet. Zum einen wirkt sie als natürliches Schmiermittel und ermöglicht durch Reduktion der Reibungskräfte das Gleiten der Gelenkflächen zueinander. Außerdem fungiert sie als Stoßdämpfer. Zum anderen stellt sie Nährstoffe bereit, die in den gefäßlosen hyalinen Knorpel diffundieren und ihn ernähren (1,4). Durch diese Funktionen hat die Synovialflüssigkeit einen erheblichen Einfluss auf die Aktivität und

strukturelle Integrität des Gelenkknorpels. Veränderungen in der Menge oder Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit können eine Erkrankung des Gelenks begünstigen oder verursachen. Die Synovialflüssigkeit besteht zum größten Teil aus Wasser und entspricht einem Dialysat des Blutes (3). Der Glukosegehalt ist dabei etwas niedriger als im Blut. Circa (ca.) 50% der Proteine in der Synovialflüssigkeit sind Serumalbumine, 10-20% sind Immunglobuline. Daneben kommen PRG4 beziehungsweise (bzw.) Lubricin, Hyaluronsäure, Phospholipide, verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren sowie Zellen, vor allem Deckzellen und Leukozyten, in der Synovialflüssigkeit vor (1). PRG4, Hyaluronsäure sowie Phospholipide gelten als die Komponenten in der Synovialflüssigkeit, die eine Reduktion der Reibungskräfte ermöglichen (5). Man unterscheidet zwei Typen von synovialen Fibroblasten. Beide Zelltypen befinden sich an der Innenseite der Gelenkkapsel. Der Zelltyp A liegt an der Grenzschicht zur Gelenkhöhle, der Typ B liegt distal hiervon. Der Typ A ähnelt in der Funktion den Gewebsmakrophagen und phagozytiert Bakterien und Zelltrümmer. Er ist zur Antigenpräsentation befähigt. Der Typ B bildet die Synovialflüssigkeit. Er besitzt lange Fortsätze, die zwischen den Zellen des Typs A an die Grenzschicht reichen, und so mit der Gelenkhöhle kommunizieren (1,3).

1.2.2 Chondrozyten

Der hyaline Knorpel besteht bis zu 2% aus Chondrozyten. Sie entwickeln sich aus Chondroblasten und sind mit ihrer Ausdifferenzierung ortsständig und nicht mehr teilungsfähig. Sie bilden die Extrazellulärmatrix (EZM) in ihrer Umgebung. Aus einem Chondroblasten hervorgegangene Chondrozyten liegen sehr dicht beieinander. Durch die Bildung der EZM ummauern sich diese Zellen. Auf Grund fehlender Chondroblasten sowie Blutgefäßen, ist die Regenerationsfähigkeit des Knorpels daher eingeschränkt. Daher erfolgt die Anpassung an veränderte Belastungen an den Knorpel, zum Beispiel (z.B.) bei Verletzung, über eine veränderte Syntheseleistung (6).

1.2.3 Extrazellulärmatrix

Die EZM des hyalinen Knorpels besteht zu ca. 80% aus Wasser und 20% aus organischen Bestandteilen. Davon sind ca. 60% Kollagene, 30% Proteoglykane und ca. 10% Proteine und Glykoproteine. Dabei sind die Kollagene und Proteoglykane besonders wichtig für die Funktion des Knorpels. Bei den Kollagenen handelt es sich

mit einem Anteil von 90% um das Kollagen Typ II. In weniger großem Umfang kommen die Kollagene der Typen I, III, V, VI, IX, X, XI und XIV vor (6). Die Kollagene sind entweder fibrillär oder nichtfibrillär organisiert (7). Kollagen Typ II zum Beispiel besitzt eine fibrilläre Struktur. Die Fibrillen entstehen dabei aus Zusammenlagerung vieler einzelner Tropokollagenmoleküle. Diese bestehen jeweils aus drei ineinander gewundenen Aminosäurenketten, was als Tripelhelix bezeichnet wird. In dieser Konformation sind die Aminosäuren weitestgehend vor enzymatischem Abbau geschützt (7). Kollagen Typ II organisiert mit seinen Fibrillen maßgeblich die Struktur der EZM und ist vor allem für die Zugfestigkeit des Knorpels verantwortlich. Die weniger häufig vorkommenden Kollagene verbinden die Kollagenfibrillen untereinander oder mit den Chondrozyten (6).

Das häufigste Proteoglykan im Knorpel ist das Aggrekan. Es besteht aus einem Hyaluronsäuremolekül, an das über Linkproteine mehrere Coreproteine gebunden sind. An diese Coreproteine lagern sich jeweils Glykosaminoglykane an. Die Glykosaminoglykane besitzen viele Sulfatgruppen, die durch ihre negative Ladung eine hohe Wasserbindekapazität des Aggrekans ermöglichen. Weitere Proteoglykane sind Biglykan, Decorin, Fibromodulin und PRG4 bzw. Lubricin (6). Das Aggrekan bewirkt durch die Wasserbindekapazität einen positiven Innendruck im Knorpel, dem die Retraktionskräfte des Kollagens Typ II entgegenwirken. Dieser Zustand bewirkt die Druckelastizität und damit einhergehende stoßdämpfende Funktion des Knorpels, die für das Gelenk unabdingbar ist (6).

1.3 Arthrose des Gelenkknorpels

Die Arthrose, im Englischen als Osteoarthritis (OA) bezeichnet, ist eine chronisch degenerative Erkrankung des Gelenks, insbesondere des Gelenkknorpels. Sie gilt als Volkskrankheit, ca. 33% der erwachsenen Bevölkerung besitzen eine radiologisch nachweisbare OA, ca. 10% eine rein klinisch diagnostizierbare OA (8). Prävalenz und Inzidenz steigen mit dem Alter (8,9). Im Jahr 2008 betrugen in Deutschland die direkten Ausgaben für die Behandlung der OA 7,62 Milliarden Euro. Im Jahr 2011 verursachte die OA in Deutschland 10.702.166 Arbeitsunfähigkeitstage (10). Die Krankheit wird je nach Auslöser in die primäre bzw. idiopathische und die sekundäre OA eingeteilt. Bei der primären OA findet sich keine eindeutig identifizierbare Ursache. Die sekundäre OA kann verschiedene Gründe haben, diese sind in Abbildung (Abb.) 1 dargestellt:

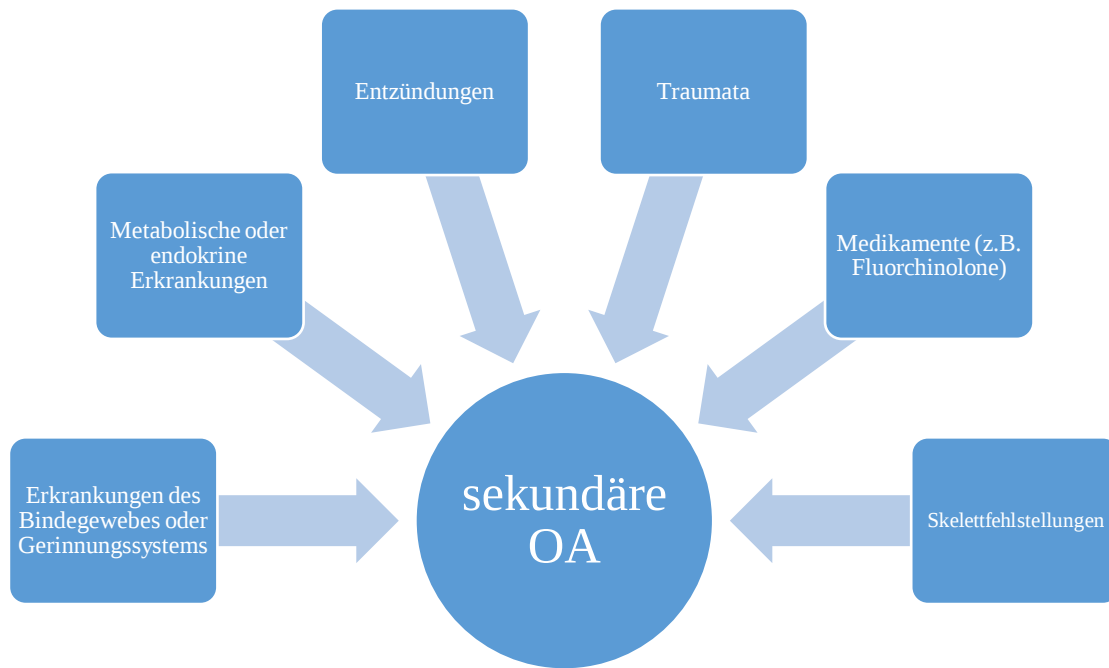


Abb. 1 Übersicht über mögliche Ursachen einer sekundären Arthrose (9,11).

Zwillingsstudien lassen hereditäre Faktoren vermuten (12). Als Risikofaktoren gelten unter anderem: hohes Alter, weibliches Geschlecht in der Postmenopause, Übergewicht sowie gelenkbelastende Hobbys und Erwerbstätigkeiten (8,10). Klinisch kann sich die OA sehr unterschiedlich darstellen. Je nach Schwere kann es zu Schmerzen, Bewegungseinschränkungen, Deformierungen, Ergüssen, Schwellungen oder Entzündungen im betroffenen Gelenk oder der Umgebung kommen. Diagnostiziert wird die OA durch eine gezielte Erhebung der Krankheitsgeschichte sowie die klinische Untersuchung. Je nach Bedarf schließen sich danach apparative und invasive Methoden wie die Röntgenbildgebung, die Computer- oder Magnetresonanztomografie, oder die Arthroskopie an. Die OA lässt sich nach dem Ausmaß der radiologisch sichtbaren Veränderungen in vier Schweregrade nach Kellgren-Lawrence einteilen. Radiologisch-röntgenologische Zeichen sind die Gelenkspaltverschmälerung, Geröllzysten, Osteophyten und eine subchondrale Sklerosierung. Klinisches Beschwerdebild und radiologische Einteilung korrelieren dabei nicht regelhaft miteinander. Eine Diagnose im Frühstadium ist auf Grund einer unspezifischen Symptomatik erschwert (9,10).

1.3.1 Pathomechanismus

Die Pathophysiologie der OA ist sehr komplex und ein mehrfaktorielles Geschehen wird angenommen. Auf molekularer Ebene konnten wichtige die OA initiiierende und

erhaltende Mechanismen gefunden werden. Es kommt zu pathologischen Veränderungen im Gelenkknorpel, in der Synovialmembran sowie im subchondralen Knochen. Auch die Gelenkbänder, die Gelenkkapsel und die Menisken können betroffen sein. Im Folgenden ist eine Übersicht der wesentlichen Veränderungen im Gewebe während der OA dargestellt:

Pathogenese

Folgende Veränderungen finden während der OA im Gelenk statt:

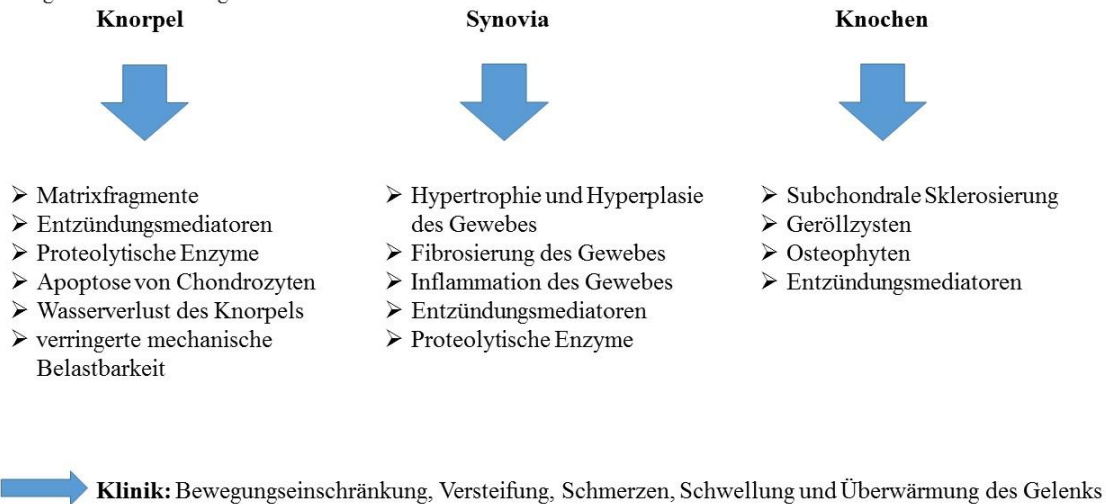


Abb. 2 Übersicht über die Pathogenese der OA. Während der OA kommt es zu charakteristischen Veränderungen in den einzelnen beteiligten Geweben. Die daraus resultierenden klinischen Symptome können sich sehr verschieden darstellen.

1.3.1.1 Rolle des Knorpels

Die bereits genannten Ursachen einer OA führen entweder zu abnormen Stress und mechanischer Schädigung des Knorpels bzw. zu einem veränderten Metabolismus im Knorpel (13). Gemeinsame Endstrecke ist die Störung der Matrixintegrität mit Entstehung von Matrixfragmenten, welche die Chondrozyten zur Bildung von Entzündungsmediatoren anregen. Dabei handelt es sich vor allem um die Zytokine IL-1 β und den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), Chemokine, Prostaglandine und Leukotriene. Diese regen in auto- und parakriner Funktion die Chondrozyten zur Sekretion von proteolytischen Enzymen, besonders Aggrekanasen und Matrixmetalloproteinasen (MMPs) sowie weiteren Enzymen wie z.B. die Nitric Oxide Synthase (iNOS) an. Die katabolen Faktoren führen zu einem weiteren Abbau von Kollagen Typ II und Proteoglykanen in der Knorpelmatrix (4,14). Das Enzym iNOS induziert den Metaboliten NO. Dieser führt wiederum zu einer Aktivierung von

Entzündungsmediatoren sowie zu einer weiteren Freisetzung von katabolen Enzymen (15). Gleichzeitig kann eine unphysiologische Belastung des Knorpels direkt zur Apoptose von Chondrozyten führen (4,14). Andere Substanzen wie Caspase-8, Prostaglandine (z.B. PGE_2) oder NO können ebenfalls eine Apoptose der Chondrozyten verursachen (16). Neben IL-1 β wird aktuell IL-17 eine ähnlich bedeutende Rolle in der Progression der OA zugeschrieben (17).

Zu Beginn der OA kommt es dabei auch zu einer gesteigerten Synthese von Matrixproteinen und zu einer klonalen Chondrozytenproliferation im Knorpelgewebe. Dies geschieht durch anabole Stoffwechselprodukte, unter anderem IL-4, IL-10 und IL-13, Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1RA) sowie Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) und Transforming growth factor β (TGF β). Vor allem IGF-1 und TGF β wirken hemmend auf die IL-1 β -Aktivität und stimulieren die Bildung von Matrixbestandteilen. Weiterhin kann TGF β die Aktivierung und Wirkung von MMPs vermindern (18–21). Langfristig kommt es allerdings zu einem Ungleichgewicht zwischen Knorpelreparatur und Knorpeldestruktion. Am Ende überwiegen die knorpeldegradierenden Mechanismen (4,22,23).

Durch den Verlust der Proteoglykane werden die Kollagenfibrillen demaskiert, welche nun leichter durch die proteolytischen Enzyme, vor allem den MMPs, abgebaut werden können. Auf Grund des Strukturverlustes der Matrix können die verbliebenen Aggrekanmoleküle vermehrt Wasser binden. Dieses Aufquellen des Knorpels führt zu einem Verlust an Härte und Elastizität und somit zu einer Zunahme des Reibungswiderstandes im Gelenk mit konsekutiv verminderter mechanischer Belastbarkeit (7). Zusätzlich hemmen Entzündungsfaktoren die Freisetzung von PRG4, was daher den Reibungswiderstand weiter erhöht. Es entstehen Fissuren, die sich im Verlauf bis auf den subchondralen Knochen ausbreiten können. Dringt Synovialflüssigkeit in diese tiefen Fissuren, kann sie Knorpel- und auch Knochenfragmente herauslösen, die sich als Fremdkörper frei in der Gelenkhöhle bewegen. Im Knochen können sich daraus Geröllzysten bilden (2). Die Endstrecke der verschiedenen Prozesse ist die progrediente Knorpeldestruktion.

1.3.1.2 Rolle der Synovialmembran und der Synovialflüssigkeit

Die OA führt zu signifikanten Änderungen in der Funktion und Morphologie der Synovialmembran. So kommt es zu einer Hypertrophie und Hyperplasie der

Fibroblasten mit konsekutiv verstärkter Zellaktivität sowie zu einer Verdickung und Fibrose der Kapsel (2). Benito et al. (24) konnten 2005 zeigen, dass in frühen Stadien der OA signifikant mehr Lymphozyten, Makrophagen, Gefäße und Wachstumsfaktoren in der Synovialmembran zu finden sind, als in späteren Stadien. Dies deutet auf eine initial stärkere Entzündung hin (24). So bewirken Fragmente des Knorpels oder Knochens bei Kontakt mit der Synovialmembran eine Fremdkörper-Synovitis (3,4,25). Von Chondrozyten gebildete Prostaglandine, besonders Cyclooxygenase-2 (COX-2), unterhalten diese Entzündung (4,25). Während bei der rheumatoiden Arthritis eine ubiquitäre Inflammation der Synovialmembran im Gelenk nachzuweisen ist, findet sich die Entzündung bei der OA eher lokal in der Nähe des degradierten Knorpels und mit geringerer Aktivität (25). Ob die Synovitis eine Folgeerscheinung der Knorpelveränderungen ist oder eine kausale Rolle spielt, bleibt weiterhin unklar (25). Unstrittig ist die zentrale Stellung in der Pathogenese der OA. So werden in dem entzündeten Gewebe eine Vielzahl an modulierenden Metaboliten gebildet und in die Synovialflüssigkeit abgegeben. Zu den proinflammatorischen und chondrodestruktiven Substanzen gehören unter anderem (u.a.) TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8, PGE₂, NO und Proteasen wie MMPs und ADAMTS. Als gegensteuernde Maßnahme werden aber auch antiinflammatorische, chondroprotektive Substanzen wie TIMPs, IL-4 und IL-13, oder IL-1RA sezerniert. Dabei ist das Äquilibrium zu Gunsten der Progression der OA verschoben (25,26).

Die sezernierten Substanzen diffundieren durch die Synovialflüssigkeit an den Knorpel und beeinflussen dort die Chondrozyten sowie die EZM-Homöostase, z.B. durch Stimulation des Matrixabbaus durch die MMPs. Laut Blom et al. (27) können synoviale Makrophagen besonders durch TGF β das Osteoblastenwachstum im subchondralen Knochen stimulieren (27). Ebenso verändert sich das Verhältnis von den für die Reduktion der Reibungskräfte zwischen den Gelenkbestandteilen wichtigen Molekülen. Kosinska et al. (5) konnten 2015 zeigen, dass der Anteil von Hyaluronsäuren und PRG4 abnimmt, wohingegen die Menge an Phospholipiden in der Synovialflüssigkeit steigt (5). Eine Reihe von wichtigen klinischen Symptomen sind auf die Synovitis zurückzuführen, z.B. Schmerzen, Gelenkschwellung und -rötung sowie Morgensteifigkeit (2,25).

1.3.1.3 Rolle des subchondralen Knochens

Obwohl die Beteiligung des subchondralen Knochens im Rahmen der OA unstrittig ist, bleibt die genaue Rolle weiterhin unklar (19,28). Im subchondralen Knochen kommt es während der OA zu einem Strukturumbau mit einhergehenden Funktionsminderungen. Dabei zeigen sich, wie in Kapitel 1.3.1.1 beschrieben, die Veränderungen makroskopisch und radiologisch vor allem als subchondrale Sklerosierung, Geröllzysten und Osteophyten. Der subchondralen Sklerosierung entspricht die Verdickung der kortikalen Knochenplatte. Die entstehende geringere Belastungsresistenz kann den Knorpel und den Knochen weiter schädigen (28). Die Geröllzysten entstehen einer Theorie nach durch das Eindringen von Synovialflüssigkeit in den Knochen, was ein Herauslösen von Fragmenten verursachen soll (2–4). Dabei unterhält Zelldetritus im Gelenkspalt die Inflammation der Synovialmembran (3). Einer anderen Theorie zufolge entstehen die Geröllzysten aus nekrotischen Läsionen im Knochen (28). Unabhängig von der Ursache verstehen Li et al. (28) die Geröllzysten als wichtigen Faktor in der Progression der OA. Sie schreiben in einem Beitrag, dass die Geröllzysten vor allem an Orten des größten Knorpelverlustes und hohen Knochenumsatzes mit Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität gefunden wurden. Sie vermuten, dass die entstehenden Freiräume den Transport kataboler Metaboliten erleichtern könnten. Außerdem würde eine gestörte Knochenstruktur seine Interaktion mit dem Knorpel verändern, was zu abnormen Druckverteilungen über dem Knorpel führen würde. Das wiederum würde dann in Form eines Circulus vitiosus den pathologischen Umbau des Knochens weiter fördern (28). Die Osteophyten entstehen im Randbereich der Synovialmembran als Folge von metaplastischer Knorpel- und Knochenbildung im proliferativ aktiven Bindegewebe (3,4). Der subchondrale Knochen übt auch über die von den Osteoblasten produzierten Metaboliten IL-6, IL-8, TGF β und IGF-1 einen Einfluss auf die OA aus (29). Die morphologischen und metabolischen Veränderungen im subchondralen Knochen gelten u.a. als eine Ursache der Schmerzen bei der OA (2).

1.3.2 Beteiligte Enzyme und Entzündungsmediatoren

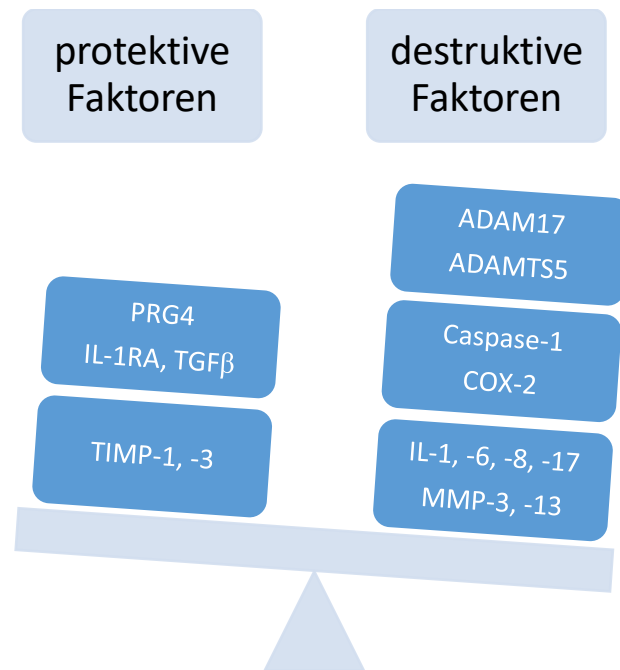


Abb. 3 Darstellung einer fehlenden Homöostase zwischen den einzelnen Faktoren während der OA. Im Rahmen der OA ist die Homöostase zwischen anabolen und katabolen Faktoren gestört. Es kommt zu einem Überwiegen der katabolen Faktoren, die innerhalb der komplexen Pathophysiologie die OA fördern bzw. mitverursachen.

1.3.2.1 ADAM17 und ADAMTS5

ADAM steht für „A disintegrin and metalloproteinase“. Davon abzugrenzen ist ADAMTS, was für „A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs“ steht. Beide Familien gehören zu der Superfamilie der Metalloproteinasen. Diese Enzyme zeichnen sich dadurch aus, dass sie Peptidbindungen von Proteinen mit Hilfe einer Katalyse durch Metallionen spalten können (30,31).

Für die Pathogenese der OA besonders relevant ist das Enzym ADAM17. Ein Synonym ist TACE oder auch „tumor necrosis factor- α -converting enzyme“. In OA-Knorpelmatrix und OA-Chondrozyten konnte vermehrt ADAM17 nachgewiesen werden (32,33). Unter anderem wird ADAM17 durch TIMP-3 durch Blockierung des katalytischen Zentrums inhibiert (34). ADAM17 ist wesentlich an der abschließenden Bildung des Zytokins TNF- α beteiligt. TNF- α wiederum wird als ein zentrales Zytokin für das Entzündungsgeschehen während der OA verantwortlich gemacht (34,35). Es regt die Chondrozyten an, matrixdegradierende Enzyme, besonders MMP-3 und MMP-13, zu produzieren. Als Entzündungsmediator führt TNF- α zur Bildung proinflammatorischer Substrate, z.B. PGE₂, und Enzyme, vor allem iNOS und COX-2,

und zu verstärktem Wachstum der synovialen Fibroblasten (14,36–38). López-Armada et al. konnten 2006 (16) zeigen, dass TNF- α in kultivierten humanen Chondrozyten die Expression von Caspase-1 auf mRNA-Ebene erhöht (16). Über PGE₂, iNOS und Caspase-8 soll TNF- α an der Apoptose von Chondrozyten beteiligt sein (16). TNF- α wird in OA-Knorpel und entzündeter Synovialmembran gefunden (37). Es gibt Hinweise, dass erhöhte ADAM17-Spiegel die Expression von TGF β über die Spaltung des Transmembranproteins Vascularin verringern können (39). Eine hohe Konzentration von TGF β gilt als günstig für die OA (20).

Ein weiteres für die Progression der OA wichtiges Enzym ist die Protease ADAMTS5. Es wird in gesunden wie auch in OA-Chondrozyten und synovialen Fibroblasten gebildet (26,40–42). Im Gegensatz zu anderen Enzymen der Familie wird die mRNA-Expression von ADAMTS5 nicht durch IL-1 β oder TNF- α stimuliert. Unter anderem wird ADAMTS5 durch TIMP-3 inhibiert (41). ADAMTS5 spaltet unter anderem mit hoher Affinität das Molekül Aggrecan (40). Das Enzym ist in frühen Stadien der OA besonders aktiv. Die durch den Verlust von Aggrecan bewirkte verminderte Bindungsfähigkeit von Wasser im Knorpel führt zu einer Demaskierung der Kollagenfibrillen, sodass diese erreichbar für den Abbau durch MMPs werden (2,19).

1.3.2.2 Caspase-1

Der Name Caspase ist ein Akronym. Das „C“ steht für Cysteinproteinase und „aspase“ für die Fähigkeit, hinter der Aminosäure Aspartat ein Peptid zu schneiden (CASP1). Ein Synonym ist „Interleukin 1-beta-converting enzyme“ oder ICE (43). In der Erstbeschreibung wurde Caspase-1 als das Enzym beschrieben, welches für die Bildung von aktivem IL-1 β aus einem Vorläufermolekül verantwortlich sei (44,45). In einer Veröffentlichung von Saha et al. aus dem Jahr 1999 (46) wird gezeigt, dass Caspase-1 in OA-Knorpel und OA-Synovialmembran vorkommt. Die Autoren diskutieren eine Beteiligung des Enzyms an der Progredienz der OA über die Aktivierung von IL-1 β in den entsprechenden Geweben (46). Weiterhin gilt Caspase-1 als wichtiger proapoptotischer Faktor (16). Nach López-Armada et al. von 2006 wird die mRNA-Expression von Caspase-1 in Chondrozyten von TNF- α stimuliert (16). Caspase-1 wird über Bildung eines Proteinkomplexes aktiviert. Auslösende Faktoren können pathogen- oder gewebsschaden-assoziierte Faktoren wie Fremd-Desoxyribonucleinsäure (DNA) oder Harnsäurekristalle sein (43).

1.3.2.3 COX-2

COX-2 steht für „Cyclooxygenase-2“. Ein Synonym ist PTGS2, was für „Prostaglandin-endoperoxide synthase 2“ steht. Während das Schwestermolekül COX-1 in den meisten Geweben permanent exprimiert wird, findet sich COX-2 vor allem nach inflammatorischen oder proliferativen Stimuli (47). Dies kann im Rahmen einer Vielzahl verschiedenster physiologischer oder pathologischer Zustände geschehen. Einige Beispiele sind eine akute Entzündung und Schmerzmediation, Angiogenese, Knochenabbau, Ulcera des Magen-Darm-Traktes oder Tumorerkrankungen (48). Unter anderem induzieren TNF- α , IL-1 β , IL-2 und IL-8 die Bildung von COX-2. Hemmend auf dessen Bildung wirken IL-4, IL-10 und IL-13 (49,50). Erhöhte Werte von COX-2 konnten in entzündetem Gelenksgewebe mit Chondrozyten und synovialen Fibroblasten nachgewiesen werden (51). Wie in Kapitel 1.3.2.1 beschrieben, führt ADAM17 über die Aktivierung von TNF- α indirekt zu einer Induktion von COX-2. COX-2 katalysiert die Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin H₂. Aus Prostaglandin H₂ können PGD₂, PGE₂, PGI₂ und TXA₂ entstehen (47,49). Für die OA ist insbesondere die Bildung von PGE₂ relevant. Dieses stimuliert u.a. eine Apoptose von Chondrozyten (16,51) und scheint bei der Regulation von MMPs in synovialen Fibroblasten und Knorpelzellen eine Rolle zu besitzen (51–53). Weiterhin hat es Einfluss auf die Angiogenese bei der OA und der rheumatoiden Arthritis (51). PGE₂ ist außerdem ein bedeutender Schmerzmediator (49). Es werden aber auch protektive Einflüsse durch PGE₂ diskutiert, wie z.B. die Inhibierung von IL-1 β -induzierter erhöhter mRNA-Expression sowie Proteinsynthese von Matrixmetalloproteinasen (51,54).

1.3.2.4 IL-1 β

IL-1 β steht für „Interleukin-1 β “ und gehört zu der Familie der Zytokine. Zytokine sind lokal gebildete Botenstoffe, die ihre Zielzellen vor allem durch Diffusion in das umgebende Gewebe erreichen und dort verschiedene Wirkungen entfalten. Dabei ist IL-1 β an der Fieberregulation und Induktion lokal entzündlicher Prozesse beteiligt (55). Es konnte gezeigt werden, dass IL-1 β in osteoarthritischem synovialen Gewebe, Synovialflüssigkeit sowie dem Knorpel vorkommt (36,46,56). Neben TNF- α ist IL-1 β ein weiteres wichtiges Zytokin in der Pathogenese der OA (14). Die IL-1 β -Produktion im Knorpel wird, wie in Kapitel 1.3.1.1 beschrieben, vor allem durch Matrixfragmente

induziert (22). Aktiviert wird es durch Caspase-1 (s. 1.3.2.2) (44,45). Laut López-Armada et al. kann TNF- α die mRNA-Expression von Caspase-1 in Chondrozyten erhöhen (s.1.3.2.1) (16). Die Aktivität von IL-1 β wird von TGF β gemindert. Antiinflammatorische Zytokine wie IL-4 und IL-10 supprimieren u.a. die mRNA-Expression von IL-1 β (18). IL-1 β besitzt eine zentrale Rolle bei der Aufrechterhaltung der Knorpelhomöostase. So konnte eine basale Freisetzung auch in gesundem Knorpel nachgewiesen werden, welche dort zu einem Gleichgewicht von katabolen und anabolen Prozessen führt (57). Bei der OA kommt es zu einer verstärkten Sekretion von IL-1 β mit Überwiegen der katabolen Prozesse. Durch IL-1 β induzierte Enzyme und Zytokine sind u.a. Matrixmetalloproteinasen wie z.B. MMP-3 und MMP-13, COX-2 und konsekutiv PGE₂, IL-6, IL-8, ADAMTS4 (41) sowie iNOS (16,37,51,58). NO ist in der Lage, eine Apoptose in Chondrozyten sowie die Freisetzung von Matrixmetalloproteinasen zu induzieren (15,22). IL-1 β hemmt weiterhin die Kollagen- und Proteoglykansynthese im Knorpel (59). Im Jahr 2015 diskutierten Sandy et al. auf Grund einer Analyse umfangreicher Daten eine Neuinterpretation der Position von IL-1 β innerhalb der Pathogenese der OA. Die Autoren stellten insbesondere die Eignung, zu Forschungszwecken *in vitro* eine künstliche Inflammation zu erzeugen, in Frage (17).

1.3.2.5 IL-6 und IL-8

Wie die meisten Interleukine wirken IL-6 und IL-8 vor allem auf das Immunsystem. So ist IL-6 u.a. an der Entzündungs- und Fieberreaktion beteiligt. IL-8 ist ein bedeutender Faktor in der Chemotaxis von Leukozyten (55). Schlaak et al. haben 1996 erhöhte Werte von IL-6 und IL-8 in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit OA nachgewiesen (60). Sie werden sowohl von synovialen Fibroblasten als auch von Chondrozyten produziert (18). Die Bildung des Zytokins IL-6 wird vor allem von TNF- α und IL-1 β stimuliert (16,61). Antiinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-4 und IL-10 können die mRNA-Expression supprimieren (18,62). IL-6 gilt als Modulator der Erkrankung, führt jedoch nicht eigenständig zu einer Knorpeldestruktion. Vielmehr wirkt es synergistisch zu IL-1 β und verstärkt dessen Wirkung. So ist es essentiell für die IL-1 β vermittelte Inhibierung der Proteoglykansynthese (18,19,62). Larsson et al. konnten 2015 eine direkte Assoziation von steigenden IL-6-Konzentrationen und röntgenologisch sowie klinisch darstellbaren Progressionen der OA zeigen (63). Es werden auch anabole

Effekte diskutiert. So kann IL-6 die Produktion von TIMPs induzieren (18). Brenn et al. konnten 2007 eine Assoziation mit Hyperalgesie und Hypersensitivität bei mechanischem Stress auf das Gelenk nachweisen (64).

Ähnlich wie IL-6 wird die Bildung von IL-8 auch von TNF- α und IL-1 β stimuliert (16,61). Ebenso scheinen IL-4 und IL-10 die Wirkung von IL-8 zu begrenzen (61,62). Wie IL-6 wird IL-8 eine modulatorische Wirkung zugeschrieben (62). So konnten Alaaeddine et al. zeigen, dass IL-8 die Aktivität von TNF- α erhöht (50). Auch konnten sie eine gesteigerte Synthese von COX-2 durch IL-8 in Verbindung mit TNF- α nachweisen (50). Als Chemotaxin regt es außerdem die neutrophilen Granulozyten zur Produktion von Superoxid-Anionen an, welche zu einer zusätzlichen Progression der Erkrankung beitragen (18,22,61).

1.3.2.6 MMP-3 und MMP-13

Die Enzyme MMP-3 und MMP-13 gehören zu der Familie der Matrixmetalloproteinasen. Sie werden im Rahmen physiologischer Prozesse wie z.B. Knochenwachstum benötigt, spielen aber auch bei anderen Erkrankungen wie z.B. der OA, eine wichtige Rolle (65,66). MMP-3 und MMP-13 werden als Proenzyme sezerniert und durch Proteasen, z.B. Trypsin oder Plasmin, in die aktive Form gespalten. MMP-3 kann dabei proMMP-13 aktivieren (65,67). Das Enzym MMP-3 wird in gesundem Knorpel regelhaft exprimiert. Bei der OA hingegen zeigt sich eine ausgeprägte Hemmung von MMP-3 (2). MMP-13 kommt nur in OA-Knorpel vor und ist in gesundem Knorpel nicht vorhanden (2,66). DiBattista et al. haben 1994 gezeigt, dass synoviale Fibroblasten nach Stimulation mit dem Entzündungsmediator IL-1 β MMP-3 und MMP-13 produzieren können (54).

Ein Synonym für MMP-3 ist Stromelysin 1. Die Bildung von MMP-3 wird unter anderem durch TNF- α , IL-1 β und verschiedene Wachstumsfaktoren stimuliert. TGF β , IGF-1 und IL-4 hemmen die Synthese von MMP-3. TIMP-1 bis -4 hemmen die Aktivität vom MMP-3 (37,67). Laut Abramson et al. sollen NO und iNOS bei der Hochregulation von Matrixmetalloproteinasen beteiligt sein (15). Im Gegensatz zu MMP-13 ist MMP-3 nicht in der Lage, tripelhelikale Kollagene zu spalten. Es besitzt aber dennoch eine hohe Substratbreite und kann im Verlauf der OA die entwundenen Kollagene und andere Proteine, wie z.B. Laminin und Proteoglykane, degradieren.

MMP-3 ist an der Aktivierungskaskade von anderen Matrixmetalloproteinasen, wie z.B. MMP-1, -7, -8, -9 und -13 beteiligt (65,67).

Das Akronym MMP-13 steht für Matrixmetallopeptidase 13, ein Synonym ist Kollagenase 3. Die Expression von MMP-13 wird durch eine Vielzahl von Substanzen beeinflusst, die je nach Gewebe auch gegensätzliche Wirkung haben können (65). Im Rahmen der OA wird die Bildung vor allem durch $\text{TNF-}\alpha$ und $\text{IL-1}\beta$ stimuliert (62). TIMP-1 bis -3 führen zu einer verringerten Aktivität von MMP-13 (20,37,66). Wie eingangs beschrieben, kann proMMP-13 durch MMP-3 in seine aktive Form gespalten werden. MMP-13 wird als eines der wichtigsten Enzyme im Rahmen der Progression der OA angesehen. Unter allen matrixdegradierenden Enzymen besitzt es nämlich die höchste Affinität auf das strukturegebende Kollagen Typ II (13,19,65,66).

1.3.2.7 PRG4/Lubricin

PRG4 ist eine Abkürzung und steht für „Proteoglykan 4“. Ein anderer Name ist Lubricin. Es wurde erstmals 1981 von Swann et al. beschrieben (68). PRG4 besteht aus einer zentralen Mucin-Domäne, mit angrenzenden globulären N- und C-Termini. An der Mucin-Domäne ist PRG4 äußerst flexibel, gleichzeitig sind beide Termini in der Lage, in Interaktion mit Oberflächen zu treten, an denen es sich haarnadelförmig ausbreiten kann (69). Das Proteoglykan kommt vor allem in der Synovialflüssigkeit vor und wird hauptsächlich von den synovialen Fibroblasten sowie von den direkt unter der Knorpeloberfläche liegenden Chondrozyten produziert. Daneben ist es auch in Menisken, Sehnen und periartikulären Stromazellen zu finden (69,70). Unter anderem führen $\text{TGF}\beta$, IGF-1, Wachstumsfaktoren und mechanische Belastung zu einer vermehrten Bildung von PRG4. $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , $\text{TNF-}\alpha$ hingegen wirken hemmend auf die Bildung des Proteoglykans (70).

Zusammen mit den ebenfalls in der Synovialflüssigkeit vorkommenden Hyaluronsäure sowie Phospholipiden bewirkt das PRG4 die Reduktion der Reibungskräfte zwischen den Gelenkbestandteilen (5). Jahn et al. (71) veröffentlichten 2016 eine Modellvorstellung, in der PRG4, peripher an der jeweiligen Gelenkfläche gelegen, die Hyaluronsäuren immobilisieren würde, damit diese wiederum den Phospholipiden ermöglichen können, sich mit ihren hydrophoben Enden gegeneinander auszurichten, was zu einer sterischen Abstoßung und konsekutiv zur Reibungsverminderung führen würde (71). Es werden auch andere Funktionen wie Zellschutz durch Verhinderung der

Adhäsion und Einfluss auf Wachstumsprozesse durch PRG4 diskutiert (70). Im Rahmen der OA kommt es mittelfristig zu einer verringerten Bildung von PRG4 und damit zu einer Erhöhung der Reibung im Gelenk, was die Knorpeldestruktion durch Mikrotraumata fördert (5,69,70). 2016 wiesen Reesink et al. in einem equinen Tiermodell nach, dass initial im Prozess der OA die PRG4-Konzentration in der Synovialflüssigkeit steigt und deren Genexpression in den synovialen Fibroblasten erhöht wird (72).

1.3.2.8 TIMP-1 und TIMP-3

TIMP ist ein Akronym und bedeutet „tissue inhibitor of metalloproteinases“ (73). Die Funktionen von TIMPs sind vor allem die Aufrechterhaltung der EZM-Homöostase, die Förderung des Zellwachstums sowie die Induktion oder Hemmung der Apoptose. Dies geschieht unter anderem über die Inhibierung von Proteasen (73,74). Im Jahr 1984 haben Dean et al. TIMPs, ohne genauere Spezifikation der Klasse, in humanem Knorpelgewebe nachgewiesen (75). Lohmander et al. konnten 1993 TIMP-1 in synovialer Flüssigkeit aus osteoarthrotischen Gelenken nachweisen (76). 2014 wiesen Wen et al. TIMP-3 in osteoarthritischem Knorpel nach (42). Die Bildung von TIMP-1 und -3 kann unter anderem durch IL-6 induziert werden (18). Über die Stimulation von IL-6 kann IL-1 β ebenfalls einen Einfluss auf diese TIMPs ausüben. In der Pathophysiologie der OA ist die Funktion von TIMP-1 die Aktivitätshemmung der meisten katabolen MMPs, wobei diese in einigen Fällen weniger stark ausgeprägt ist als bei TIMP-3. Zusätzlich kann TIMP-1 noch ADAM10 hemmen (73).

TIMP-3 hingegen kann die Aktivität aller bekannten MMPs hemmen. Weiterhin inhibiert TIMP-3 die Wirkung der Enzyme ADAMTS4 und -5, sowie einiger weiterer Vertreter der ADAM-Familie, z.B. ADAM17 (34,41,73). Da es als einziges TIMP das Enzym ADAMTS5 hemmen kann, besitzt es eine besondere Rolle im Rahmen der EZM-Homöostase. Während der OA kommt es zu einem Ungleichgewicht der anabolen TIMPs und katabolen MMPs sowie ADAMs (62,77).

1.3.3 Behandlungsoptionen

Die OA ist eine chronisch-degenerative Erkrankung, die nicht heilbar ist. Demzufolge stehen in der Behandlung die Symptomlinderung mit einer Schmerzreduktion und Verbesserung der Beweglichkeit sowie eine Erhöhung der Lebensqualität im Vordergrund (8). Nach den aktuellen Richtlinien der Osteoarthritis Research Society International (78) von 2014 wird allen Patienten zunächst als Allgemeinmaßnahme empfohlen das Gewicht zu regulieren, moderates Kraft- und Ausdauertraining zu betreiben sowie an Edukationsprogrammen über die Erkrankung teilzunehmen. In frühen Stadien werden Maßnahmen, wie z.B. Physiotherapie, Balneotherapie oder Elektrotherapie sowie bestimmte Medikamente empfohlen. Zu den verwendeten Medikamenten zählen Paracetamol, Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAIDs), Capsaicin, intraartikulär verabreichte Glukokortikoide sowie SADOAs. Letztgenanntes Akronym steht für „Slow Acting Drugs in Osteoarthritis“. Hierzu zählen z.B. Hyaluronsäure oder Glucosaminsulfat. Auch wird das Antidepressivum Duloxetine für die Analgesie empfohlen. In fortgeschrittenen Stadien können arthroskopische Interventionen, wie z.B. das Débridement oder Microfracturing nötig werden. Chirurgische Alternativen sind Umstellungsosteotomien, der Einsatz eines künstlichen Gelenks oder die nur noch selten durchgeführte Arthrodesse (8,10,78,79).

Unter den betroffenen Patienten existiert ein hohes Interesse an zusätzlichen Möglichkeiten zur Unterstützung der klassischen Therapieoptionen. Dabei sind vor allem Nahrungsergänzungsmittel beliebt (80,81). Auf Grund der immer größeren Verbreitung von Nahrungsergänzungsmitteln mit dem Ziel die Gesundheit zu fördern, wurde im Jahr 2006 vom Europäischen Parlament eine „Verordnung über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel“ verabschiedet. Sie wird auch „Health-Claims-Verordnung“ genannt. Sie schreibt vor, dass mit gesundheitsfördernden Wirkungen von Lebensmitteln und Nahrungsergänzungsmitteln nur geworben werden darf, wenn diese wissenschaftlich belegt sind (82). Ein Beispiel für Nahrungsergänzungsmittel, die aktuell wissenschaftlich untersucht werden, sind die Kollagenhydrolysate (KH).

1.3.3.1 Kollagenhydrolysate

Kollagenhydrolysate sind degradierte Kollagenmoleküle, die durch enzymatischen Verdau oder via Säurebehandlung aus Gelatine gewonnen werden. Die Gelatine wird aus Tierhaut und -knochen hergestellt (81,83). Die Kollagenhydrolysate bestehen im Wesentlichen aus degradiertem Kollagen Typ I und können zusätzlich niedermolekulare Glykosaminoglykane, z.B. Hyaluronat, enthalten. Sie sollen sich in ihrer Wirkung im Rahmen der OA von intaktem Kollagen unterscheiden (80). Die Kollagenhydrolysate wurden von der europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit als für den Verzehr geeignet eingestuft (84). Bereits seit vielen Jahren werden Kollagenhydrolysate, auch in Bezug auf die OA, wissenschaftlich untersucht.

In vitro-Untersuchungen

Im Jahr 2001 wurde eine *in vitro*-Studie von Jennings et al. veröffentlicht (85). Darin untersuchten die Autoren die Wirkung von bovinen Kollagen Typ II-Fragmenten auf gesunde bovine und humane Chondrozytenkulturen sowie gesunde humane Knorpelimplantate. Sie zeigten, dass die Fragmente konzentrationsabhängig inhibierend auf die Kollagensynthese in den jeweiligen Chondrozytenkulturen wirkten. Einen Einfluss der Fragmente auf die humanen Knorpelimplantate war bei der niedrigsten Konzentration von 0,01 Milligramm (mg)/Milliliter (ml) nicht zu finden. Ab einer Konzentration von 1 mg/ml zeigte sich ein Anstieg von Kollagen Typ II und Proteoglykanen im Nährmedium. Die Autoren werteten dies als Destruktion des Knorpelimplantats (85).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Fichter et al. 2006 (86). Sie zeigten, dass Kollagen Typ II-Fragmente aus bovinem Gelenkknorpel die mRNA-Expression und Proteinmenge von katabolen Enzymen wie MMP-2, -3, -9 und -13 konzentrationsabhängig erhöhen können (86).

Zu einem anderen Ergebnis kamen Oesser et al. 2003 (87). Die Autoren zeigten, dass sowohl degradiertes bovines Kollagen Typ I als auch degradiertes Kollagen Typ II aus Hühnerknorpeln eine signifikante Steigerung der Kollagen Typ II-Synthese in gesunden bovinen Chondrozytenkulturen bewirken können. Die Kollagenhydrolysat-Wirkung war dabei von 0,5-5 mg/ml konzentrationsabhängig. Ab einer Konzentration von 10 mg/ml zeigte sich ein Absinken der Synthese. Die Inkubationszeit betrug je 8 Tage (87).

Zu einem ähnlich interpretierbaren Ergebnis kamen im Jahr 2007 Schunck et al. (88). Sie zeigten, dass sich nach Behandlung mit Kollagenhydrolysaten, diese wurden nicht genauer spezifiziert, signifikant mehr Proteoglykane und Aggrekan im Nährmedium von gesunden bovinen und humanen Chondrozytenkulturen nachweisen ließen. Auch konnten sie eine erhöhte mRNA-Expression von Aggrekan feststellen (88).

Im Jahr 2010 führten Raabe et al. (89) eine Studie durch, in der die Autoren Hinweise auf eine chondrogene Differenzierung von equinen multipotenten Stromazellen nach Inkubation mit pascinem Hydrolysat aus Kollagen Typ I fanden. Dabei kam es zu einem Anstieg des an der Chondrozytenentwicklung beteiligten Transkriptionsfaktors Sox9. Ferner wiesen die Autoren einen Anstieg der Genexpression von Kollagen Typ II sowie eine gesteigerte Synthese von Kollagen Typ II und Glykosaminoglykanen nach (89).

Die Autoren Ng et al. (90) zeigten 2007, dass nicht nur die Konzentration, sondern auch die Dauer der Kollagenhydrolysat-Exposition eine Rolle spielen könnte. Sie inkubierten bovine Chondrozytenkulturen für 14, 28 bzw. 42 Tage mit bovinem Hydrolysat aus Kollagen Typ I. Bis zum Tag 28 zeigten sich bei der Konzentration von 1 mg/ml Kollagenhydrolysat eine Zunahme des Gesamtkollagengehalts, des Anteils von Kollagen Typ II, sowie verbesserte mechanische Eigenschaften. Bei längerer Exposition bis Tag 42 nahmen diese positiven Effekte jedoch wieder ab. Eine Konzentration von 10 mg/ml Kollagenhydrolysat zeigte eine verminderte Expression von Kollagen Typ II, dafür aber den höchsten Anstieg der Genexpression von MMP-3 und -13 (90).

Einen möglichen Wirkmechanismus der Kollagenhydrolysate untersuchten Siebert et al. im Jahr 2010 (91). Sie fanden heraus, dass tripelhelikale Kollagenhydrolysate stark mit der $\alpha 2A$ -Domäne der transmembranösen Integrinmoleküle interagieren. Kleinere, einzelsträngige Kollagenhydrolysate würden eine schwächere Interaktion ausüben. Integrine ermöglichen u.a. eine Kommunikation der Zellen mit der Umgebung (91).

In vitro-Studien von Schadow et al. (83,92) aus unserer Arbeitsgruppe, in der osteoarthritische humane Knorpelimplantate mit den bovinen Kollagenhydrolysaten RDH, RDH-N und CH-Alpha® (92) bzw. den pascinen Kollagenhydrolysaten FGH, FGH-N sowie dem porkinen Kollagenhydrolysat Mobiforte® (83) inkubiert wurden, konnten keine vermehrte Kollagensynthese zeigen. Einige der Kollagenhydrolysate führten hingegen dosisabhängig zu einer vermehrten Bildung von MMP-1, -3, -13, NO bzw. PGE₂. Die Aktivität der Aggrekanasen ADAMTS4 und ADAMTS5 zeigte eine dosisabhängige Simulation bzw. Inhibition durch die Kollagenhydrolysate FGH und FGH-N. Die Freisetzung von TIMP-1 in das Nährmedium wurde durch

Studie	Kollagenhydrolysat	Dosis	Dauer	Untersuchtes Objekt
Jennings et al. 2001 (85)	bovines Kollagen Typ II: col2f	0,01-1 mg/ml	Zellkulturen 24 Stunden, Explantate 3 Wochen	gesunde bovine und humane Chondrozytenkultur, gesunde humane Knorpelimplantate
Oesser et al. 2003 (87)	bovines Kollagen Typ I, Kollagen Typ II vom Huhn	0,5-10 mg/ml	8 Tage	gesunde bovine Chondrozytenkultur
Fichter et al. 2006 (86)	bovines Kollagen Typ II: colf und col2f, synthetisches Peptid Ntelo	colf: 0,1-5 mg/ml col2f: 0,1-1,0 mg/ml Ntelo: 0,1-0,5 mg/ml	Zellkulturen 4 Tage, Explantate 3 Wochen	gesunde humane und bovine Chondrozytenkultur, gesunde humane und bovine Knorpelimplantate
Ng et al. 2007 (90)	Gelita Sol D® (bovines Kollagen Typ I)	0-10 mg/ml	14, 28 und 42 Tage	gesunde bovine Chondrozytenkultur
Schunck et al. 2007 (88)	nicht angegeben	nicht angegeben	nicht angegeben	gesunde porcine und humane Chondrozytenkultur
Raabe et al. 2010 (89)	pescines Kollagen Typ I (Norland-Hydrolyzed Fish Collagen (N-HFC))	0,5 mg/ml	3 Wochen	equine Stromazellen
Siebert et al. 2010 (91)	nicht angegeben	nicht angegeben	Auswertung erfolgte unmittelbar	alpha2A-Domäne des Integrins
Schadow et al. 2013 (92)	bovines RDH und RDH-N, bovines CH-Alpha® jeweils Kollagen Typ I	0-10 mg/ml	4-6 Tage	osteoarthritische humane Knorpelimplantate
Schadow et al. 2017 (83)	pescines FGH und FGH-N, porcines Mobiforte® jeweils Kollagen Typ I	0-10 mg/ml	4-6 Tage	osteoarthritische humane Knorpelimplantate

Tab. 1 Übersicht über die *in vitro*-Studien in chronologischer Reihenfolge. „colf“ bezeichnet KH aus einer gesamten Kollagenmatrix, „col2f“ KH aus reinem Kollagen Typ II. „Ntelo“ ist ein synthetisches Peptid, was das amino-terminale Ende von Kollagen Typ II darstellt.

Konzentrationen von 10 mg/ml CH-Alpha® inhibiert. Trotz dieser pleiotropen Wirkungen konnte lediglich bei Mobiforte® ein verstärkter Verlust von Proteoglykanen festgestellt werden. Die verschiedenen biologischen Effekte der Kollagenhydrolysate führten die Autoren 2013 auf die massenspektroskopisch gemessene unterschiedliche Zusammensetzung und strukturelle Organisation der biologisch aktiven kollagenen Peptide zurück (92). Eine Übersicht ist in der eingefügten Tabelle (Tab.) dargestellt.

Tierexperimentelle Untersuchungen

Eine tierexperimentelle Studie wurde von Oesser et al. im Jahr 1999 publiziert (93). Die Autoren bestimmten dabei die Verteilung von Kollagenhydrolysaten in verschiedenen Geweben über einen festgesetzten Zeitraum. Dazu bekamen Mäuse ¹⁴C-markierte Kollagenhydrolysate aus verarbeitetem Rattenintegument zu fressen. Die Kollagenhydrolysate wurden dabei nicht genauer spezifiziert. Nach 6 Stunden (h) zeigte sich ein Maximum der Radioaktivität im Plasma und weniger als 10% der ursprünglichen Radioaktivität im Gastrointestinaltrakt. Weiterhin konnten die Autoren einen Anstieg der Radioaktivität im Gelenkknorpel mit einem Maximum nach 48 h feststellen. Da die Kollagenhydrolysate während der Verdauung gespalten werden, wurde zusätzlich die Größe der aufgenommenen Fragmente bestimmt. Die Fragmentgröße lag zwischen 1 und 10 Kilodalton (kDa), somit wurden auch höhermolekulare Bestandteile aufgenommen oder Aggregate aus kleineren Fragmenten gebildet (93).

Eine weitere Studie von Oesser et al. ist von 2008 (94). Die Autoren gaben STR/ort-Mäusen, welche spontan eine OA entwickeln, über 4 Monate 0,15 mg/Gramm (g) Körpergewicht (KG) bovines Hydrolysat aus Kollagen Typ I zu fressen. Nach Versuchsende wurden histologische Bilder des Kniegelenkknorpels angefertigt und durch mehrere Pathologen den Arthrosegraden zugeteilt. Es konnte eine signifikant geringer ausgeprägte OA-Progression im Vergleich zur Placebogruppe festgestellt werden (94).

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Nakatani et al. (95) im Jahr 2009. Die Autoren zeigten in einer tierexperimentellen sowie *in vitro*-Studie, dass aus Kollagenhydrolysat entstehende Peptide, hier das Dipeptid Prolin-Hydroxyprolin (Pro-Hyp), eine bioaktive Wirkung besitzen. C57BL/6J-Mäuse bekamen eine stark mit Phosphat angereicherte Nahrung zu fressen, wobei diese normalerweise schnell zu einer Destabilisierung der

Studie	Kollagenhydrolysat	Dosis	Dauer	Untersuchtes Objekt
Oesser et al. 1999 (93)	verarbeitetes Rattenintegument	oral, 10 mg/g KG/d	3, 6, 12, 24, 48, 96, und 192 Stunden	Gewebeverteilung der KH in OA-Mäusen
Oesser et al. 2008 (94)	Fortigel® (bovines Kollagen Typ I)	oral, 0,15 mg/g KG/d	4 Monate	Kniegelenkknorpel von OA-Mäusen
Nakatani et al. 2009 (95)	verarbeitetes porkines Integument Pro-Hyp Peptide	Mäuse: KH: oral, 5 g/100 g KG/d Peptid: oral, 0,3 g/100 g KG/d Zellkultur: KH: 1 mg/ml Peptid: 2,5 mM	Mäuse: 3 Wochen Zellkultur: 5 Wochen	24 gesunde Mäuse sowie gesunde murine Chondrozytenkultur
van de Water et al. 2016 (96)	Hydro-P® (nicht genauer spezifiziert)	oral, 90 g/d	60 Tage	24 gesunde Pferde mit experimentell erzeugter Synovitis
Chen et al. 2016 (97)	verarbeitetes Integument vom Kabeljau	100 mg/kg KG/d 500 mg/kg KG/d	10 Wochen	65 gesunde Mäuse, mit UV-Licht bestrahlt

Tab. 2 Übersicht über die tierexperimentellen Studien in chronologischer Reihenfolge. „Pro-Hyp“ steht für die Aminosäuren Prolin und Hydroxyprolin. „d“ steht für Tag. „kg“ steht für Kilogramm. „mM“ steht für mmol/Liter.

Knorpel- und Knochenhomöostase führen würde (95). In den Interventionsgruppen mit Pro-Hyp zeigten sich signifikant weniger Chondrozyten- und Knorpelschwund sowie weniger Erosion des subchondroalen Knochens. *In vitro* zeigten die Kollagenhydrolysate und Pro-Hyp unabhängig voneinander eine Inhibierung der Kalzifizierung von murinen Chondrozytenkulturen sowie einen Anstieg der mRNA-Expression von Aggrekan unter Pro-Hyp (95).

Im Jahr 2016 zeigten van de Water et al. (96) in einer tierexperimentellen Studie, dass Kollagenhydrolysate im Rahmen einer Synovitis den Gesamtproteingehalt, die Gesamtzellzahl sowie die Konzentration des Entzündungsmediators PGE₂ in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu einem Placebopräparat signifikant verringern können. Für den gleichzeitig untersuchten Gehalt an IL-6, Glykosaminoglykanen, MMPs, der Kollagen Typ II-Synthese sowie das klinische Outcome ergaben sich keine statistischen Unterschiede. Auch konnten die Autoren keine Nebenwirkungen durch die Kollagenhydrolysate beobachten (96).

Ebenfalls im Jahr 2016 untersuchten Chen et al. (97) in einem Tiermodell den Einfluss von pescinem Kollagenhydrolysat, der genaue Kollagen Typ wird nicht genannt, auf die Regulation von MMPs und TIMPs. Dazu bekamen Mäuse entweder 100 mg oder 500 mg Kollagenhydrolysat pro kg KG pro Tag zu fressen. Gleichzeitig wurde deren Haut mit UV-Licht bestrahlt. Die Autoren konnten eine dosisabhängige signifikante Minderung der durch die UV-Strahlung verursachten Hochregulation der mRNA sowie Proteinexpression von MMP-1, -3 und -9 in den Zellen nachweisen. Gleichzeitig verhinderten die Kollagenhydrolysate signifikant dosisabhängig eine durch das UV-Licht bedingte Inhibition von TIMP-1 (97).

Klinische Studien

Neben diesen *in vitro*- und tierexperimentellen Studien gibt es eine Reihe an *in vivo*-Studien, die sich mit dem Einfluss von Kollagenhydrolysaten auf die OA beschäftigen. So hat Adam bereits 1991 (98) eine große randomisierte, doppelblinde Studie mit 81 OA-Patienten mit der Frage nach einer schmerzlindernden Wirkung von 10 g/d oral eingenommenen Kollagenhydrolysat Gelita Sol D®, hergestellt aus bovinem Kollagen Typ I, durchgeführt. Die Einnahmedauer betrug 60 Tage. Der Autor konnte darstellen, dass die Interventionsgruppen eine klinische Besserung der Schmerzen auf einer qualitativen, 13 Aspekte umfassenden Schmerzskala zeigten und weniger

Schmerzmittel konsumierten, als die Kontrollgruppe (98). Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Clark et al. im Jahr 2008, die bei 147 Sportlern für 24 Wochen 10 g/d bovines Kollagenhydrolysat aus Kollagen Typ I gegen ein Placebo verglichen (99) sowie Benito-Ruiz et al. 2009, die ebenfalls für 24 Wochen 10 g/d porkines Kollagenhydrolysat aus Kollagen Typ I gegen ein Placebo bei 250 an OA erkrankten Probanden untersuchten (100). Clark et al. zeigten, dass die Einnahme von Kollagenhydrolysaten zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Schmerzstärke auf einer visuellen Analogskala führte. Die genutzte Skala reichte dabei von 1 bis 10, wobei 1 die Abwesenheit von Symptomen bedeutete und 10 der größte anzunehmende Schmerz war. Von größtem Interesse war für die Autoren die Differenz der Schmerzstärke vom Tag der Aufnahmeuntersuchung und dem Tag des Versuchsendes. Die Autoren zeigten eine Abnahme der Schmerzen unter anderem beim einfachen Gehen (Kollagenhydrolysat versus (vs.) Placebo: $-1,11 \pm 1,98$ vs. $-0,46 \pm 1,63$, $p = 0,007$) sowie bei Schmerzen im Stand ($-0,97 \pm 1,92$ vs. $-0,43 \pm 1,74$, $p = 0,011$). Allerdings vermuteten die Autoren vor dem Hintergrund der relativ geringen Schmerzabnahme, dass eine klinische Relevanz erst nach längerer Kollagenhydrolysateinnahme auftreten würde. Nach Benito-Ruiz et al. führt die Einnahme von Kollagenhydrolysaten zu signifikanten Verbesserungen der Schmerzen auf einer 0-100 mm umspannenden visuellen Analogskala. 100 mm zeigten dabei den größten anzunehmenden Schmerz an. Die Schmerzen nahmen um $32,6 \pm 14,3$ mm in der Interventionsgruppe und $28,0 \pm 16,8$ mm in der Kontrollgruppe ab ($p = 0,024$). Gleichzeitig bewirkten die Kollagenhydrolysate eine Reduktion der Gesamtpunktzahl im WOMAC-Index, Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index, von $27,1 \pm 18,1$ Punkten in der Interventionsgruppe gegen $18,9 \pm 16,1$ Punkte in der Kontrollgruppe. Allerdings war hier der Unterschied statistisch nicht signifikant. Der WOMAC-Index besteht aus den Einzelgruppen Schmerz, Steifigkeit und funktionelle Einschränkung, deren Punkte für die Gesamtpunktzahl addiert werden. Die maximal erreichbare Punktzahl ist 96.

Etwas weniger eindeutig ist das Ergebnis von Moskowitz et al. aus dem Jahr 2000 (81). Die Autoren untersuchten die Wirkungen von Kollagenhydrolysaten aus Kollagen Typ I, einer nicht genauer beschriebenen Spezies, u.a. auf die Schmerzen von 389 OA-Patienten mit Hilfe einer analog-visuellen Version des WOMAC-Index für Schmerz, deren Gesamtwert maximal 500 mm beträgt. Verzehrt wurden 10 g/d für 60 Tage. Es handelte sich um eine multizentrische, randomisierte und doppelblinde Studie. Die

Studie	Kollagenhydrolysat	Dosis	Dauer	Untersuchtes Objekt
Adam 1991 (98)	Gelita Sol D® (bovines Kollagen Typ I)	oral, 10 g/d	60 Tage	81 OA-Patienten
Moskowitz et al. 2000 (81)	Kollagen Typ I (nicht genauer spezifiziert)	oral, 10 g/d	60 Tage	389 OA-Patienten
Clark et al. 2008 (99)	CH-Alpha® (bovines Kollagen Typ I)	oral, 10 g/d	24 Wochen	147 gesunde Sportler
Walrand et al. 2008 (101)	porkines Kollagen (nicht genauer spezifiziert)	oral, jeweils einmal 10 g KH in Wasser bzw. fermentierter Milch gelöst	Auswertung erfolgte unmittelbar	15 gesunde Probanden
Benito-Ruiz et al. 2009 (100)	Colnatur® (porkines Kollagen Typ I)	oral, 10 g/d	24 Wochen	250 OA-Patienten
McAlindon et al. 2011 (102)	Fortigel® (bovines Kollagen Typ I)	oral, 10 g/d	48 Wochen	30 OA-Patienten
Bruyère et al. 2012 (103)	GENACOL® (nicht genauer spezifiziert)	oral, 1,2 g/d	24 Wochen	200 Patienten mit Gelenkschmerzen

Tab. 3 Übersicht über die *in vivo*-Studien in chronologischer Reihenfolge.

Autoren konnten hierbei keine signifikante Besserung der Schmerzen innerhalb der Gesamtgruppe nachweisen. Nach Betrachtung der Einzelgruppen zeigte sich eine signifikante Minderung der Schmerzen für die Gruppe aus Deutschland mit $-68,2 \pm 76$ mm in der Interventionsgruppe gegen $-32,2 \pm 64$ mm in der Kontrollgruppe ($p = 0,016$). Klinisch hätten die Patienten, die initial ihre Schmerzen als schwer oder extrem einstufen, am meisten profitiert (81).

Eine im Jahr 2012 veröffentlichte randomisierte doppelblinde Studie von Bruyère et al. (103) zeigte ebenfalls weniger einheitliche Ergebnisse. Die Autoren verwendeten das Kollagenhydrolysat GENACOL®, ohne die Spezies oder den Kollagentyp genauer darzustellen. Die Dosierung betrug 1,2 g/d und wurde für 24 Wochen oral eingenommen. Es wurden 200 Patienten mit Gelenkschmerzen untersucht. Hierbei wurde die Schmerzintensität der Probanden mittels einer 0-100 mm umfassenden visuellen Analogskala bestimmt. Zusätzlich wurde ein Fragebogen zur Lebensqualität ausgegeben. Die Autoren konnten eine statistisch signifikante Besserung der Schmerzen auf der Analogskala mit einer Abnahme des Schmerzes um -51,6% in der Interventionsgruppe gegenüber -36,5% in der Kontrollgruppe feststellen ($p = 0,036$). Ausgangswert war jeweils eine Schmerzintensität von mehr als 30 mm auf der Skala. Jedoch zeigte sich kein Unterschied bezüglich der Lebensqualität und allgemeinen Zufriedenheit (103).

Dass die Wirkungen der Kollagenhydrolysate *in vivo* sehr differenziert betrachtet werden müssen, legt auch eine Studie von McAlindon et al. (102) von 2011 nahe. Die Autoren untersuchten eine mögliche magnetresonanztomografische Darstellbarkeit von Veränderungen im Kniegelenksknorpel bei 30 OA-Patienten, die bovines Kollagenhydrolysat aus Kollagen Typ I für 48 Wochen zum Verzehr einnahmen. Getestet wurden die T2-Wichtung sowie die Anreicherung des Kontrastmittels Gadolinium (Gd-DTPA^{2-}) im Knorpel unter T1-Wichtung, welche negativ mit dem Proteoglykangehalt korreliert. In der Interventionsgruppe zeigte sich nach der Hälfte des Betrachtungszeitraumes in den medialen und lateralen tibialen Knorpelanteilen ein höherer Proteoglykangehalt gegenüber der Placebogruppe, nicht jedoch am Ende des Versuchs. Es konnten keine weiteren Unterschiede zwischen den Versuchsarmen festgestellt werden (102).

Walrand et al. haben im Jahr 2008 (101) in Anlehnung an den bereits vorgestellten Artikel von Oesser et al. aus dem Jahr 1999 *in vivo* gezeigt, dass die Aufnahme von porkinem Kollagenhydrolysat über fermentierte Milch die Konzentration von

kollagenspezifischen Aminosäuren im Plasma im Vergleich zu in reinem Wasser gelösten Kollagenhydrolysaten weiter erhöht ($1000,2 \pm 52,8$ zu $865,6 \pm 25,1$ mM, $p = 0,038$) (101).

Im Jahr 2011 kam die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit zu dem Ergebnis, dass auf Grundlage der aktuellen Studienlage keine Kausalitätsbeziehung zwischen Kollagenhydrolysat-Einnahme und dem Einfluss auf die OA-Progression oder -Symptomatik gegeben sei (104).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Die OA gilt als Volkserkrankung, die erhebliche Leiden bei den Patienten und hohe Kosten für das Gesundheitssystem verursacht. Zu Grunde liegt ein komplexes pathophysiologisches Geschehen, bei dem das Gleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Faktoren in Richtung einer progredienten Knorpeldestruktion verschoben ist. Die Behandlung erfolgt rein symptomatisch, da eine Heilung nicht möglich ist. Nahrungsergänzungsmittel, z.B. in Form von Kollagenhydrolysaten, werden häufig zur Unterstützung der klassischen Therapieschemata genutzt. Die Hersteller der Kollagenhydrolysate werben dabei mit günstigen Auswirkungen auf den Krankheitsverlauf der OA. Auf Grund der „Verordnung über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel“ darf nur mit gesundheitsfördernden Wirkungen von Produkten geworben werden, wenn diese auch wissenschaftlich belegt sind (82). Zu den Kollagenhydrolysaten lässt sich eine breite aber uneinheitliche Studienlage feststellen. Weiterhin fällt auf, dass sich der weitaus größte Teil der Literatur mit dem Einfluss der Kollagenhydrolysate auf den Knorpel beschäftigt. Da aber die Arthrose eine Erkrankung des gesamten Gelenks ist, besitzt ebenso die Synovialmembran mit ihren Fibroblasten eine enorme Bedeutung für die Pathogenese der OA. Derzeit gibt es keine Studie, die den Einfluss von Kollagenhydrolysaten auf die mRNA-Expression von Enzymen oder Entzündungsparametern durch synoviale Fibroblasten Typ B beschreibt.

Daher sollen durch die vorliegende explorative Arbeit erstmals folgende Fragen beantwortet werden:

- 1) Verändern Kollagenhydrolysate die mRNA-Expression von protektiv oder katabol wirkenden Enzymen bzw. Entzündungsmediatoren in synovialen Fibroblasten Typ B?
- 2) Besitzen Kollagenhydrolysate einen Einfluss auf die Proliferation, Viabilität oder Morphologie von synovialen Fibroblasten Typ B?
- 3) Wie wirken Kollagenhydrolysate auf die mRNA-Expression von Enzymen und Entzündungsmediatoren in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten Typ B?
- 4) Gibt es Unterschiede in den Wirkungen verschiedener Kollagenhydrolysate auf die synovialen Fibroblasten Typ B?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Probenmaterial

2.1.1.1 Herkunft

Für die Experimente wurde humanes Synovialgewebe verwendet. Dieses wurde aus Kniegelenken von Osteoarthritis-Patienten gewonnen, welche in der Orthopädischen Klinik, Standort Gießen des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH, eine totalendoprothetische Versorgung des Kniegelenks (TEP) erhielten. Das Synovialgewebe wird routinemäßig während der Implantation entfernt und klinisch nicht weiter benötigt. Die Patienten wurden über dessen Verwendung aufgeklärt und haben der wissenschaftlichen Nutzung schriftlich zugestimmt. Eine Genehmigung der Ethik-Kommission des Fachbereichs 11-Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen erfolgte am 21.07.2009 (Aktenzeichen: Amendment zu 106/03).

2.1.1.2 Ein- und Ausschlusskriterien

In die Studie wurden Patientinnen und Patienten im Alter von 50 bis 85 Jahren aufgenommen. Der BMI sollte zwischen 20 und 35 liegen. Die Patienten erhielten eine totalendoprothetische Versorgung des Knies auf Grund einer Osteoarthritis.

Patient Nr.	Geschlecht	Alter (Jahre)	BMI	Operation	Begleit-erkrankungen
1	Weiblich	76	29,0	Knie-TEP links	-
2	Weiblich	81	23,7	Knie-TEP rechts	art. Hypertonie
3	Weiblich	85	25,7	Knie-TEP rechts	-
4	Weiblich	72	28,2	Knie-TEP rechts	Osteoporose
5	Weiblich	71	26,3	Knie-TEP links	-
6	Weiblich	83	27,6	Knie-TEP rechts	art. Hypertonie
$\bar{x} \pm SD$		$78 \pm 5,4$	$26,8 \pm 1,8$		

Tab. 4 Beschreibung der Gewebespende. „Nr.“ steht für Nummer. „ $\bar{x}$ “ steht für arithmetisches Mittel. „SD“ steht für Standardabweichung. „art.“ steht für arteriell. Eine Übersicht über die Ein- und Ausschlusskriterien findet sich im tabellarischen Anhang in der Tabelle 11.1.1.

Folgende Kriterien führten zum Ausschluss aus der Studie: Operationen jeglicher Art in den letzten drei Monaten (Knieoperationen in den letzten 6 Monaten), eine Fraktur des

Knies in den letzten 24 Monaten, inflammatorische Arthritiden oder Kollagenosen in anderen Gelenken, akute Kniegelenksinfektionen oder andere Gelenkserkrankungen (Gicht oder einfaches Trauma in den letzten 3 Monaten), Diabetes mellitus, HIV-Infektion, schwere Nieren- oder Lebererkrankungen, Tumoren in der Nähe des Knies, Drogenmissbrauch, die Einnahme von Immunsuppressiva oder Kortikosteroiden oder die intraartikuläre Injektion von Hyaluronsäure in das Kniegelenk. Eine Übersicht der Ein- und Ausschlusskriterien findet sich im tabellarischen Anhang in der Tabelle 11.1.1. In der Tab. 4 sind die Patientendaten des Hauptversuchs zusammengefasst.

2.1.2 Geräte

Analysewaage, Typ 770-12	Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Analysewaage, Typ EG2200-2NM	Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern
Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems™ 7900HT	Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Autoklav, Typ 3850 EL	Tuttnauer Europe B.V., Breda, Niederlande
Flow Cytometer, BD FACSCanto™ II	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
BD FACSDiva™ Software	Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ, USA
BioPhotometer®	Eppendorf AG, Hamburg
CO ₂ -Inkubator, Typ 3039	Forma Scientific Inc., Marietta, OH, USA
CO ₂ -Inkubator, „Cellstar“	Nunc GmbH, Wiesbaden
Gefrierschrank -20°C, Typ KGE34422	Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Gefrierschrank -80°C, Typ HFU 486 Top	Thermo Electron GmbH, Langenselbold
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel Imager INTAS	Intas Science GmbH, Göttingen
GraphPad Prism® 5	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
Kühlschrank 4°C, Typ KGU66920	Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Kühlzentrifuge, Typ 5403, Rotoren 16F6-38/16A4-44	Eppendorf AG, Hamburg
Laborvakuumpumpe, Typ 16612	Sartorius AG, Göttingen
Lichtmikroskop, Axiovert® 40CFL	Carl Zeiss, Göttingen
Microflow Biological Safety Cabinet	Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA
Mikroplattenrüttler, Typ LD-45	Kisker Biotech GmbH, Steinfurt

Multipette®	Eppendorf AG, Hamburg
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corp., Redmond, WA, USA
Spektrophotometer, NanoDrop™ 1000	Thermo Scientific Inc., Rockford, IL, USA
PCR-Mastercycler®, Personal	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetboy, Easypet®	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten	Eppendorf AG, Hamburg
Power Supply, PowerPac™ HC	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Präzisionswaage, Typ EG2200-2NM	Kern&Sohn GmbH, Balingen-Frommern
SAS 9.3	SAS Institute, Cary, NC, USA
Sicherheitswerkbank Klasse II, Mikroflow	Nunc GmbH, Wiesbaden
Thermomixer, comfort	Eppendorf AG, Hamburg
Vortexer, Vortex-Genie® 2	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Wasserbad, AQUAline AL5	Lauda Dr. R. Wobser GmbH, Lauda-Königshofen
Zentrifuge, Universal 320 R	Hettich GmbH, Tuttlingen

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Bechergläser, Duran®, 50 ml, 100 ml, 500 ml	Schott Medica GmbH, Wertheim
Einmalpinzette, 12,5 cm steril, #AP-0041	Seidel Medizin GmbH, Buchendorf
Einmalpipette 2 ml, 5 ml, 10 ml, 25 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Einwegskalpell Nr. 21, #31602740	Feather Safety Razor Co. Ltd., Osaka, Japan
Konische Gefäße, 15 ml, 50 ml	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Küvetten, UVette®, 50-2000 µl, #0030 106.300	Eppendorf AG, Hamburg
Millex®-HA 0,45 µm Filter Unit, #SLHA033SS	Merck Millipore, Billerica, MA, USA
Neubauerkammer, #631F1130	LO-Laboroptik GmbH, Bad Homburg
Petrischale, 94 x 16 mm, #632171	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen, 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktions-Gefäße, 0,5 ml, 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

Zellkulturflasche T-75, #658175	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen
Zellsieb, 70 µm, #352350	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
6-Well Multiplate, Nunclon™, #10469282	Nalge Nunc Int., Roskilde, Dänemark
96-Well-ELISA Mikrotiterplatten Nr. 3	Greiner bio-one GmbH, Frickenhausen

2.1.4 Chemikalien

Accutase®, 100 ml, #L11-007	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Agarose, Le, Analytical Grade, 100 g, #V3121	Promega Corp., Madison, WI, USA
Antikörper, Mouse anti Human Fibroblasts/Epithelial Cells D7-FIB, monoklonal, 0.1 mg, #SM1214PS	Acris Antibodies GmbH, Herford
Antikörper, Phycoerythrin markiert, Rabbit F(ab') ₂ anti Mouse, polyklonal, 1 ml, #R0439	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Bromphenolblau Natriumsalz, 10 g, #B 5525-10G	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
CH-Alpha® Trinkampulle, Lot-Nr.: L46/1031	Quiris Healthcare, Gütersloh (ehemals GELITA Health Products GmbH, Eberbach)
Chloroform, 1000 ml, #1024441000	Merck KGaA, Darmstadt
Dispase II, 10 x, #P10032100	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
D-MEM Medium, 500 ml, #P04-01550	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Dulbecco's phosphate buffered saline 1 x (PBS), 500 ml, #H15-002	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Ethanol absolut, reag. ISO, reag. Ph. Eur., ≥ 99,8%, 2500 ml, #32205	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Ethidumbromid Lösung 1%, 10 ml, #2218.1	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Fetal Calf Serum (FCS), 500 ml, Chargennr. 029K3398, #F7524	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
FGH (Peptan™ F 5000), Lot-Nr.: 1011372	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
FGH-N (Peptan™ F 2000), Lot-Nr.: 1010903	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
Gamunex® 10% humanes IgG „Octagam“, 100 mg/ml	Grifols SA, Barcelona, Spanien

Gelatine, EIA Grade Reagent, 200 g #170-6537	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Gel-Red™ Nucleic Acid Gel Prestaining Kit with “200 bp” and “1500-2000 bp” Tracking Dyes, #31010	Biotium Inc., Hayward, CA, USA
Glycerin Rotipuran® ≥ 99,5%, wasserfrei Glycerol, 1 l, #3783.1	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Glykogen pegGold, 1 ml, #37-1810	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
HEPES Pufferlösung (1 M), 100 ml, #S11-001	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Hs_ACTB_2_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT01680476	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_ADAMTS5_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00011088	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_ADAM17_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00055580	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_B2M_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00088935	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_CASP1_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00001568	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_GAPDH_2_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT01192646	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_IL-6_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00083720	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_IL-8_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00000322	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_MMP-13_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00001764	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_MMP-3_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00060025	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_PRG4_2_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT01673826	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_PTGS2_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00040586	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_TIMP-1_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00084168	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Hs_TIMP-3_1_SG, QuantiTect® Primer Assay, #QT00046382	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande

Hydrolyzed fish collagen (HFC), Lot-Nr.: 7219H-FC	Norland Inc., Cranbury, NJ, USA
Interleukin-1 β , recombinant Human, #201-LB-005	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA
2-Mercaptoethanol, 25 ml, #63689	Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, USA
Mobiforte®, 300 g, Lot-Nr.: 0722909 229-1419	Astrid Twardy GmbH, Unterföhring
Mycoplasmen Test Kit I/C, 24 Tests, #PK-CA91-1024	PromoKine, PromoCell GmbH, Heidelberg
NaCl-Lösung, 0,9%, steril, #2350748	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Penicillin/Streptomycin, 100 x, 100 ml, #P11-010	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
PCH (Peptan™ P 5000)	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
PCH-N (Peptan™ P 2000)	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
2-Propanol, ROTISOLV®, $\geq 99,9\%$, UV/IR-Grade, 2500 ml, #T910.1	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
QuantiTect® Reverse Transcription Kit, #205311	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
QuantiFast® SYBR® Green PCR Kit, #204054	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
RDH (Peptan™ B 5000), Lot-Nr.: 1013446	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
RDH-N (Peptan™ B 2000), Lot-Nr.: 1014116	Rousselot SAS, Puteaux, Frankreich
RNeasy® Micro Kit, #74004	Qiagen N.V., Venlo, Niederlande
Rotiphorese 10 x TAE Puffer, 1000 ml, #T845.1	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
„SmartLadder SF“-100 to 1000 bp, #MW-1800-04	Eurogentec, Seraing, Belgien
Synergel™, 1 x, #0184.1	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
20 bp DNA Leiter, 500 μ l, #2805.1	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
TriFast™ pegGold, 100 ml, #30-2010	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
TRIS Pufferan® $\geq 99,9\%$, Ultra Qualität, 1 kg, #5429.3	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Trypan Blau, 25 g, #1117320025	Merck KGaA, Darmstadt
Trypsin/EDTA, 10 x, 100 ml, #L11-003	PAA Laboratories, Pasching, Österreich

Wasser, DEPC behandelt, 5 x 20 ml, #T143.5	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
Wasser, doppelt destilliert, 1000 ml, #3478.1	Carl Roth GmbH+Co.KG, Karlsruhe
100 bp DNA Leiter, 250 µl, #G2101	Promega Corp., Madison, WI, USA

2.1.5 Eigene Lösungen

- Dispase II, Aliquot

2 ml Dispase II gelöst in 20 ml PBS

- Nährmedium 500 ml, 10% Fetales Kälberserum (FCS):

D-MEM 440 ml

HEPES (1 M) 5 ml

Penicillin/Streptomycin (100 x) 5 ml

FCS 50 ml

Bei 4 Grad Celsius (°C) für 14 Tage verwendbar

- Trypsin/EDTA, Aliquot

1 ml Trypsin/EDTA gelöst in 9 ml PBS

2.1.6 Interleukin-1 β

Zunächst wurden 20 mg Gelatine in 20 ml PBS bei 50°C gelöst. Die Lösung wurde auf Raumtemperatur abgekühlt und über einen 0,45 Mikrometer (μ m) Filter sterilfiltriert. 5 Mikrogramm (μ g) Interleukin-1 β wurden in 10 ml dieser Lösung aufgenommen und für 10 Minuten (min) vorsichtig gemischt. Danach konnte die IL-1 β -Lösung aliquotiert und bei -20°C eingefroren werden.

2.1.7 Kollagenhydrolysate

Die Kollagenhydrolysate wurden jeweils direkt vom Hersteller bezogen. Die Lösungen mit den Kollagenhydrolysaten wurden immer frisch hergestellt. Die Endkonzentration sollte jeweils 2,0 mg/ml Nährmedium betragen. Dazu wurden 80 mg des entsprechenden Kollagenhydrolysats in 1 ml Nährmedium in einem 1,5 ml Reaktions-Gefäß gelöst. Anschließend wurde die Lösung über einen 0,45 μ m Filter in ein neues 1,5 ml Reaktions-Gefäß sterilfiltriert. Die Lösungen wurden bis zum Versuchsstart bei Raumtemperatur, Norland-HFC bei 4°C, gelagert.

Name des KH (Kollagen Typ I)	Hersteller	Herkunft	Mittleres Molekulargewicht in Da	Zusätze	Darreichungsform	Lot-Nr.
CH-Alpha®	Quiris Healthcare	Rind	Keine Angabe	Fortigel R, Fruktose, Zitronensäure, Malzextrakt, Vitamin C, Kaliumsorbat, Acesulfam K, Aroma, Natrium-Cyclamat	Trinkampulle	L46/1031
FGH	Rousselot SAS	Fisch	5000	Keine Angabe	Pulver, lyophilisiert	1011372
FGH-N	Rousselot SAS	Fisch	2000	Keine Angabe	Pulver, lyophilisiert	1010903
Mobiforte®	Astrid Twardy	Schwein	Keine Angabe	Ohne Zusätze	Pulver, lyophilisiert	0722909 229-1419
Norland-HFC	Norland Inc.	Fisch	Keine Angabe	Ohne Zusätze	Pulver, lyophilisiert	7219H-FC
PCH	Rousselot SAS	Schwein	5000	Keine Angabe	Pulver, lyophilisiert	-
PCH-N	Rousselot SAS	Schwein	2000	Keine Angabe	Pulver, lyophilisiert	-
RDH	Rousselot SAS	Rind	5000	Keine Angabe	Pulver, lyophilisiert	1013446
RDH-N	Rousselot SAS	Rind	2000	Keine Angabe	Pulver, lyophilisiert	1014116

Tab. 5 Übersicht über die Kollagenhydrolysate gemäß den Herstellerangaben. Die Lot-Nummern für PCH und PCH-N sind nicht bekannt. Andere Bezeichnungen für die KH von Rousselot SAS sind Peptan™ F 5000 und 2000 für FGH und FGH-N, Peptan™ P 5000 und 2000 für PCH und PCH-N sowie Peptan™ B 5000 und 2000 für RDH und RDH-N.

Das Produkt CH-Alpha® war eine verkaufsfertig gelöste Mischung an Kollagenhydrolysaten. Die Konzentration betrug 400 mg/ml. Es wurden 0,2 ml des CH-Alpha® mit 0,8 ml Nährmedium in einem 1,5 ml Reaktions-Gefäß vermischt. Die weitere Vorbereitung erfolgte analog zu den anderen Kollagenhydrolysaten. Für eine Übersicht über die verwendeten Kollagenhydrolysate siehe Tabelle 5.

2.2 Methoden

2.2.1 Grundlegende Methoden

2.2.1.1 Zellisolierung

Das Gewebe der Innenseite der Gelenkkapsel wurde in einer Petrischale erst mit 20 ml PBS, dann mit 20 ml 0,9% NaCl-Lösung gewaschen. Die Synovialmembran wurde herausgeschnitten, von anhängendem Gewebe befreit, und in eine neue Petrischale gegeben. Dort wurde es in ca. 1 Kubikmillimeter (mm^3) große Fragmente zerkleinert. Danach wurde es mit 2 ml Dispase II in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei Raumtemperatur für 60 min auf einem Mikroplattenrüttler inkubiert. Anschließend wurde die Lösung über ein Zellsieb ($70 \mu\text{m}$) in ein frisches 50 ml Zentrifugenröhrchen gefiltert und in einer Zentrifuge bei 37°C und 300-facher Erdbeschleunigung ($\times g$) für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Zellpellet in 15 ml Nährmedium gelöst und wieder bei 37°C und $300 \times g$ für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet in 15 ml Nährmedium gelöst und zum Kultivieren in eine T-75 Zellkulturflasche gegeben.

2.2.1.2 Zellkultivierung, Passage und Aussaat der Zellen in eine 6-Well Platte

Die Kultivierung der Zellen fand bei 37°C und 5% Kohlenstoffdioxid (CO_2) statt. Jeden Montag, Mittwoch und Freitag wurde das Nährmedium abgesaugt und durch frisches Nährmedium (15 ml) ersetzt. Sobald die Zellen unter dem Mikroskop eine Konfluenz von ca. 90% zeigten, wurden sie passagiert. Dazu wurde das Nährmedium entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Das PBS wurde abgesaugt und 5 ml Accutase® hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation für 3 min bei 37°C und 5% CO_2 , sodass sich die Zellen vom Boden ablösten. Daraufhin wurde die Lösung vorsichtig angesaugt und zusammen mit 25 ml Nährmedium in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben. Die Lösung mit den synovialen Fibroblasten wurde auf zwei Zellkulturflaschen aufgeteilt

und wie bereits beschrieben inkubiert. Für die Experimente wurden Zellen zwischen den Passagen 2 und 5 verwendet. Sollten die Zellen in 6-Well Platten ausgesät werden, wurde das Nährmedium entfernt und die Kultur mit 10 ml PBS gewaschen. Die Zellen wurden nun mit 3 ml Trypsin/EDTA für 4 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, sodass sie sich vom Boden lösen. Die Reaktion wurde mit 5 ml Nährmedium gestoppt, die Lösung in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 37°C und 300 x g für 10 min zentrifugiert. Das Zellpellet wurde nun in 1 ml Nährmedium gelöst und die Zellzahl nach Kapitel 2.2.1.4 bestimmt. Die gewünschte Menge an Zellen konnte dann in die Wells der 6-Well Platten aufgeteilt werden. Bei diesem Schritt wurden bei Bedarf Zellen für die Durchflusszytometrie nach Kapitel 2.2.1.12 entnommen. Die genaue verwendete Zellzahl wird in den einzelnen Kapiteln der Vorversuche und des Hauptversuchs genannt.

2.2.1.3 Versuchsvorbereitung

Die einzelnen Vorversuche und der Hauptversuch wurden nach folgendem Schema vorbereitet:

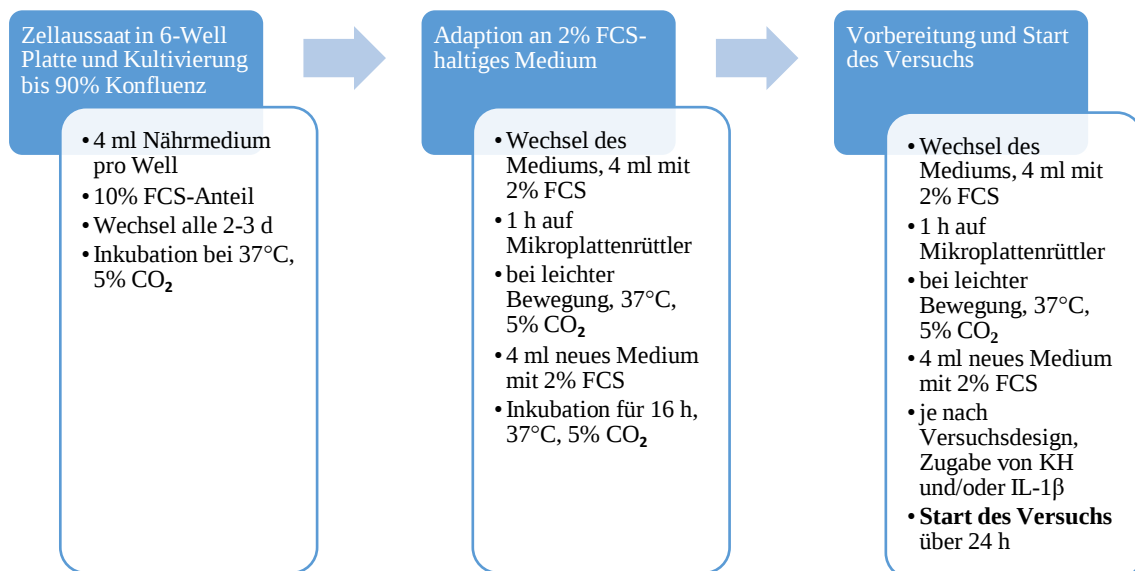


Abb. 4 Übersicht über die Vorbereitung der Versuche. Während der Aussaat der Zellen in die 6-Well Platten konnte ein überschüssiger Teil für eine spätere Durchflusszytometrie verwendet werden. Ein Test auf Mycoplasmenkontamination wurde nach Versuchsende am Nährmedium durchgeführt. Pro Patientenprobe sollte dies möglichst einmal geschehen. Sollte die Zellmorphologie betrachtet werden, erfolgte nach jedem Teilschritt eine fotografische Dokumentation der entsprechenden Wells.

2.2.1.4 Zellzahl und Viabilitätsbestimmung

Die Zellzahl und die -viabilität waren einerseits Voraussetzung für die Aussaat der gewünschten Menge an Zellen in die 6-Well Platten, andererseits wurden sie nach dem Hauptversuch mitausgewertet.

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 100 Mikroliter (μl) der zellhaltigen Lösung in ein 1,5 ml Reaktions-Gefäß gegeben. Es wurden 100 μl Trypanblau (auf 0,8 mM in PBS gelöst) hinzugefügt, die Lösungen durchmischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Beide Seiten einer Neubauerkammer wurden mit 10 μl der Lösung beladen. Jedes 1 x 1 mm große Quadrat wurde ausgezählt. Auf Grund der 1:1-Verdünnung wurde der errechnete Durchschnitt der Zellzahlen anschließend verdoppelt. Diese Zahl wurde daraufhin mit 10^4 multipliziert um auf die Konzentration pro ml zu kommen. Mittels Dreisatz konnte die absolute Zellzahl in der Lösung berechnet werden. Die Zellviabilität ergab sich aus dem Anteil der ungefärbten und somit lebenden Zellen an der Gesamtmenge der Zellen. Tote Zellen lassen sich durch Trypanblau anfärben. Die Zellviabilität in % in der Neubauerkammer entsprach der Zellviabilität in der Lösung.

2.2.1.5 RNA-Extraktion mit TriFast™

Im Hauptversuch wurden Ergebnisse der qRT-PCR ausgewertet. Um die qRT-PCR durchführen zu können, musste zuerst die mRNA der Zellen extrahiert und in cDNA umgeschrieben werden. Weiterhin war die Konzentration an RNA in den Zellen ein Untersuchungsparameter des Hauptversuchs.

Die RNA wurde mit der Methode nach TriFast™ gemäß Herstellerangaben extrahiert. Dazu wurde nach Versuchsende jedes Well einmal mit 2 ml PBS gewaschen und in jedes Well 1 ml der Lösung peqGOLD TriFast™, bestehend aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, gegeben. Waren mehr als eine 6-Well Platte in einem Versuch vorhanden, wurde eine Platte zur Zeit weiter behandelt, der Rest mit der peqGOLD TriFast™-Lösung bei -80°C bis zur Verwendung in den nachfolgenden Tagen eingefroren. Die Zellen konnten direkt, oder nach dem Auftauen bei Raumtemperatur, durch das mehrmalige Aufziehen mit der Pipette lysiert werden. Nun wurde die Lösung in ein 2 ml Reaktions-Gefäß umgefüllt und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Daraufhin wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben und das Reaktions-Gefäß für 15 Sekunden (s) kräftig geschüttelt. Danach wurde es für 10 min bei Raumtemperatur

inkubiert und anschließend für 5 min bei 12.000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Es entstanden drei Phasen, wobei die RNA in der obersten, wässrigen Phase enthalten war. Diese wurde in ein neues 2 ml Reaktions-Gefäß umgefüllt. Die anderen beiden Phasen enthielten DNA und Proteine und konnten für eine spätere Extraktion gelagert werden. Zu der wässrigen Phase wurden nun 70 µg Glykogen und 0,5 ml Isopropanol gegeben. Das Reaktions-Gefäß wurde daraufhin für 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend für 10 min bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Sediment zweimal mit 1 ml 75% Ethanol für 10 min, bei 12.000 x g und 4°C zentrifugiert. Nach dem Waschen wurde das Sediment kurz an der Luft getrocknet und dann in 20 µl RNase-freiem Wasser gelöst. Die Lösung mit der RNA konnte nun bei -80°C gelagert werden. Die Analyse und die reverse Transkription der mRNA erfolgten innerhalb des nächsten Monats.

2.2.1.6 Analyse der RNA

Für die weitere Verwendung der RNA musste die genaue Konzentration bekannt sein. Außerdem wurde die Reinheit der gewonnenen RNA bestimmt. Dabei wurde das Absorptionsverhalten der RNA bei den Wellenlängen 260 und 280 Nanometern (nm) gemessen. DNA und RNA haben ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Proteine haben ein Maximum bei 280 nm. Ein Verhältnis der absorbierten Wellenlängen 260 zu 280 nm, das gegen 2 geht, spricht für hoch aufgereinigte RNA (105).

Die RNA wurde mit dem BioPhotometer® bzw. dem NanoDrop® 1000 Spectrophotometer analysiert. Für das BioPhotometer® wurden 3 µl RNA mit 72 µl RNase-freiem Wasser in einer Küvette (UVette®, 50-2000 µl) vermischt. In den NanoDrop® 1000 wurde direkt 1 µl RNA gegeben. Die Messung erfolgte für jede RNA-Lösung einmal.

2.2.1.7 Herstellung von cDNA

Für die qRT-PCR wurde zunächst cDNA benötigt. Dazu wurde die mRNA mit dem Enzym „reverse Transkriptase“ amplifiziert. Als Substrat dienten Desoxyribonukleotide anstatt Ribonukleotide.

Es wurde das Kit „QuantiTect® Reverse Transcription“ von Qiagen benutzt. Die Herstellung verlief in zwei Schritten, wobei der erste Schritt aus der Entfernung der genomischen DNA bestand. Dazu wurde die gefrorene RNA-Lösung auf Eis, und das

restliche Material bei Raumtemperatur aufgetaut. Es wurde immer 1 µg RNA eingesetzt. Die RNA wurde mit 2 µl „gDNA Wipeout Buffer 7 x“ vermischt und die Lösung mit RNase-freiem Wasser auf 14 µl aufgefüllt. Nun wurde die Lösung für 2 min bei 42°C inkubiert und anschließend sofort bei 4°C gelagert. Für den zweiten Schritt, der reversen Transkription, wurde eine Lösung mit 1 µl Quantiscript® Reverse Transcriptase, 4 µl Quantiscript® RT Puffer 5 x und 1 µl RT Primer Mix angesetzt. Die 14 µl aus Schritt 1 wurden hinzugegeben und die Lösung nun für 15 min bei 42°C und anschließend für 3 min bei 95°C inkubiert. Nach einer Verdünnung von 1:4 mit RNase-freiem Wasser konnte die Lösung bei 4°C gelagert werden. Es wurde für jede RNA-Lösung eine noRT-Variante, die keine reverse Transkriptase enthielt, hergestellt. Diese Kontrolle weist auf Kontamination der Lösung mit genomischer DNA hin, sollten hier Ct-Werte gemessen werden. Für diesen Ansatz wurden 1 µg RNA aus den Vorversuchen und 1 µl RNase-freies Wasser als Ersatz für die reverse Transkriptase eingesetzt. Die cDNA und die noRT-Varianten wurden innerhalb des folgenden Monats für die qRT-PCR verwendet.

2.2.1.8 Quantitative RT-PCR

Die quantitative Real-Time-PCR oder qRT-PCR wurde 1992 von Higuchi et al. (106) als Modifizierung der ursprünglichen Polymerasekettenreaktion (PCR) (107) entwickelt. Im Reaktionsgemisch ist ein Fluoreszenzfarbstoff vorhanden, der an Doppelstrang-DNA binden und daraufhin detektiert werden kann. Mit steigender Menge an amplifizierter DNA nimmt somit auch die Signalintensität zu. Zu Beginn wird während der ersten Durchläufe (Englisch: cycles) eine konstante Intensität gemessen. Ab einem bestimmten Durchlauf, dem Schwellenwert (Englisch: threshold), steigt die Signalintensität signifikant an. Die qRT-PCR geht nun in die exponentielle Phase. Es herrschen optimale Amplifizierungsbedingungen, sodass die Primer bei voller Effizienz arbeiten können. Wird eine entsprechend hohe Effizienz (ca. 80-100%) vorausgesetzt, kann man von einer Verdopplung der DNA-Menge pro Durchlauf ausgehen und so die Ausgangsmenge bestimmen. Der Schwellenwert muss manuell festgelegt werden. Er soll in der exponentiellen Phase, über der Grundlinie (diffuse Signalschwankungen zu Beginn) und unter der Plateauphase der qRT-PCR liegen. Am Schwellenwert wird der Ct-Wert („Ct“ für cycle threshold) gemessen. Dieser Ct-Wert wird für die relative Quantifizierung benötigt (s. Kapitel 2.2.3.4). Für alle Werte, die

über 35 lagen, wurde pauschal der Wert 35 verwendet. In diesem Bereich ist auf Grund der geringen cDNA-Konzentration eine irrtümliche Signaldetektierung nicht mehr sicher von einer korrekten Messung zu unterscheiden (105,106,108).

Für die quantitative RT-PCR wurde das Kit „QuantiFast® SYBR® Green PCR“ von Qiagen verwendet. Der Fluoreszenzfarbstoff SYBR® Green zeigt ein Maximum von Lichtabsorption bei 494 nm und der Lichtemission bei 521 nm Wellenlänge. Das benutzte Gerät war das Real-Time-PCR System „Applied Biosystems™ 7900HT“. Es misst mittels eines Spektrometers zwischen 500 und 650 nm Wellenlänge. Das Gerät benötigte 96-Well-ELISA Mikrotiterplatten. Für jedes Well wurden 25 µl Lösung hergestellt. Diese bestand aus 12,5 µl 2 x QuantiFast® SYBR Green PCR Master Mix, 2,5 µl QuantiTect® Primer Assay (die Primer Assays mussten vorher von 10 x auf 1 x mit TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) verdünnt werden), 8 µl RNase-freies Wasser und 2 µl der entsprechenden cDNA (ca. 20 Nanogramm (ng)).

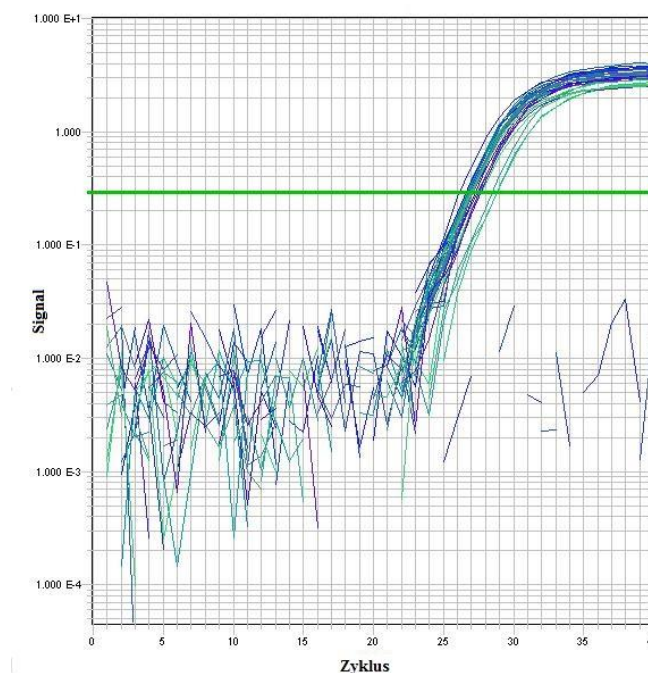


Abb. 5 Amplifikationskurve des Primers CASP1. Die qRT-PCR beginnt mit diffusen Signalschwankungen (Grundlinie) und geht dann in die exponentielle Phase über. Grün eingezeichnet ist der Schwellenwert, an dem der Ct-Wert gemessen wird. Die qRT-PCR endet mit der Plateauphase, bei der es zu keiner signifikanten Signaländerung mehr kommt.

Die qRT-PCR startete mit einem schnellen Temperaturanstieg auf 95°C und wurde dort für 5 min gehalten. Danach folgten 30 Durchläufe mit folgendem Schema: 1 min bei 95°C, dann 1 min bei 60°C, nun 1 min bei 72°C. Zum Schluss wurde die Temperatur für 5 min bei 72°C gehalten. Danach wurde auf 4°C heruntergekühlt. Die Platte konnte

nun entnommen und die Daten ausgewertet werden. In Abb. 5 ist exemplarisch eine Amplifikationskurve dargestellt.

Bei den Vorversuchen 2.2.2.2 und 2.2.2.4 wurden auf den ELISA-Platten noRT- und NTC-Kontrollen mitgeführt, bei dem Hauptversuch nur NTC-Kontrollen. „noRT“ steht für „minus Reverse Transkriptase“ und bedeutet, dass diese während der reversen Transkription von mRNA in cDNA nicht vorhanden war. Der Ansatz wird in Kapitel 2.2.1.7 beschrieben. Diese Kontrolle würde auf Kontamination der RNA mit genomischer DNA hinweisen, sofern sie Ct-Werte unter 35 in der qRT-PCR geliefert hätte. In diesem Fall wären die RNA-Proben des Versuchs nicht auswertbar gewesen. „NTC“ steht für „No Template Control“ und bedeutet, dass dem Ansatz für die qRT-PCR keine cDNA hinzugefügt wurde. Ein Ct-Wert unter 35 hätte hier auf Kontamination mit Fremdmaterial oder Primer-Dimere hingewiesen. Die qRT-PCR hätte wiederholt werden müssen.

2.2.1.9 Schmelzkurvenanalyse

Wie in Kapitel 2.2.1.8 beschrieben, bindet der Fluoreszenzfarbstoff an Doppelstrang-DNA. Somit wird das Signal nicht nur vom erwünschten Produkt, sondern auch durch eventuelle Primer-Dimere, Kontamination mit vorhandener Doppelstrang-DNA oder unspezifischen Amplifikaten beeinflusst (105,108). Um herauszufinden, ob solche Störfaktoren vorlagen, wurde nach jeder qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wird kontinuierlich die Temperatur erhöht, bis das Amplifikat an einer für ihn spezifischen Stelle denaturiert und den verwendeten Farbstoff, in diesem Fall SYBR® Green, freigibt. Die folgende Fluoreszenzänderung kann detektiert werden. Zur Darstellung wird die erste Ableitung, auch Derivat genannt, der Schmelzkurve gegen die Temperatur genommen. Dadurch entsteht ein einzelner, gut bestimmbarer Punkt. Es wurden die Höhe, die Lage und die Anzahl der Scheitelpunkte untersucht. Eine Schmelzkurve mit einem einzigen Scheitelpunkt weist auf eine regelhaft abgelaufene qRT-PCR hin. In den Abb. 6 und 7 werden exemplarisch für den Primer ADAMTS5 zwei Schmelzkurven gezeigt. Der exakte Schmelzpunkt des Amplifikates ist u.a. abhängig von der Anzahl seiner Basenpaare, der Lösungsmittelzusammensetzung und der Konzentration des Farbstoffs (108,109). Die Schmelzpunkte der Amplifikate der hier genutzten Primer von Qiagen liegen zwischen 72 und 86°C.

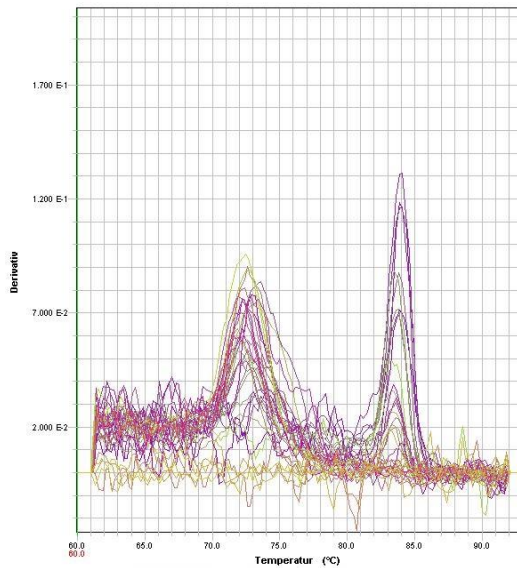


Abb. 6 Schmelzkurve des Primers ADAMTS5. Es sind zwei Scheitelpunkte zu erkennen, was darauf hindeutet, dass die Messung nicht einwandfrei verlief. Diese Schmelzkurve wurde abgelehnt und die qRT-PCR wiederholt.

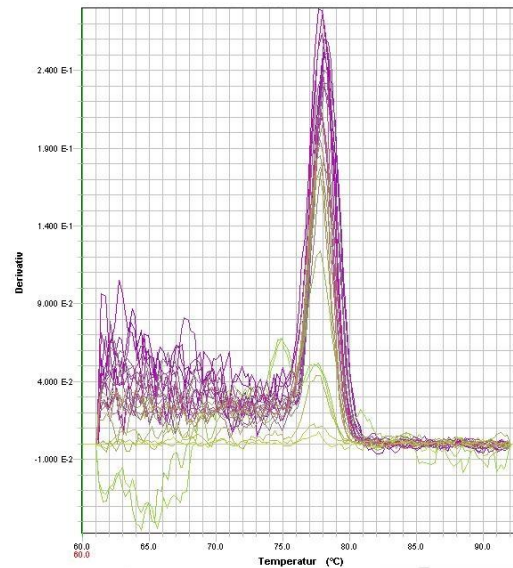


Abb. 7 Schmelzkurve des Primers ADAMTS5. Bei 78°C befindet sich das Produkt des Primers, links davon sind unspezifische Nebenprodukte auf einem nicht signifikanten Niveau zu erkennen. Diese Schmelzkurve wurde als gut bewertet und akzeptiert.

Bei den Vorversuchen 2.2.2.2, 2.2.2.3 und 2.2.2.4 sowie bei dem Hauptversuch wurde eine Schmelzkurvenanalyse nach jedem qRT-PCR-Durchlauf durchgeführt. War mehr als ein Scheitelpunkt zu sehen, wurde die Messung wiederholt.

2.2.1.10 Agarosegele und Gelelektrophorese

Für die Analyse der Mycoplasmentests (Kapitel 2.2.1.11), sowie für eine Kontrolle der Primerprodukte der qRT-PCR wurden Agarosegele benötigt. Mit der Gelelektrophorese können verschiedene DNA-Stränge aufgetrennt und deren Größe durch den Vergleich mit bekannten Proben bestimmt werden. Dazu wird eine Spannung an die Gelelektrophoresekommer gelegt, sodass die negativ geladenen DNA-Stränge zum Pluspol wandern. DNA-Stränge verschiedener Größe wandern dabei unterschiedlich schnell. Mit den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen Gel-Red™ RB und Ethidiumbromid können die Proben unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Dabei nimmt nach Bindung an DNA-Stränge deren Lichtemission stark zu.

Für die Gelelektrophorese wurde ein 15 x 10 x 1 cm großes 1%iges Agarosegel gegossen. Zuerst mussten 50 x Gel-Red™ RB mit entionisiertem Wasser auf 1 x Gel-Red™ RB verdünnt werden. Nun wurden 1 g Agarose ad 100 ml 1 x Gel-Red™ RB

solange erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hatte. Die Lösung wurde in die Gelelektrophoresekammer gefüllt. Nach dessen Erkalten konnte 1 x Gel-Red™ RB als Laufpuffer hinzugefügt werden. 10 µl der Leiter bzw. Proben wurden anschließend mit 3 µl (bzw. 2 µl) 6 x Gel-Red™ Ladepuffer vermischt und in die Kammern geladen. Eine weitere Variante war die Herstellung eines Gels, bestehend aus: 0,84 g Agarose (0,7%) + 1,98 g Synergel™ (1,65%) + 120 ml TAE Puffer + 8 µl Ethidiumbromid. Hierbei wurden 10 µl der Probe mit 2 µl eines angesetzten Ladepuffers vermischt. Für 100 ml dieses Puffers wurden zunächst 250 mg Bromphenolblau in 33 ml Tris gelöst (auf 150 mM und pH 7,6). Anschließend wurden 60 ml Glycerol und 7 ml Wasser hinzugefügt. Um die Gelelektrophorese zu starten, wurde nun die jeweils genannte Spannung an die Gelelektrophoresekammer angelegt und über die angegebene Zeit gehalten. Nach dem Lauf konnten dann unter UV-Licht die Proben sichtbar gemacht werden.

Die Gelelektrophorese der Mycoplasmentests lief über 25 min bei 100 V.

Zur Qualitätskontrolle sollte außerdem festgestellt werden, ob die Basenpaarlängen der Primerprodukte, also der cDNA-Amplifikate, aus der qRT-PCR mit den Herstellerangaben übereinstimmen. Dazu wurden drei Agarosegele gegossen. Pro Gel wurden die Amplifikate eines Patienten genommen. Es wurden eine 20 Basenpaare (bp) Leiter bzw. eine 100 bp Leiter verwendet. Folgende Primer wurden untersucht: ADAMTS5, ADAM17, CASP1, COX-2, Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-13, PRG4, TIMP-1 und TIMP-3. Pro Gel wurde jeder Primer einmal untersucht. Die Gele liefen jeweils für 1 h bei 80 Volt (V) und Raumtemperatur.

2.2.1.11 Mycoplasmentest

Zur Qualitätskontrolle wurde mit diesem Test das Nährmedium der Zellkulturen auf das Vorliegen von verschiedenen Mycoplasmen-Spezies geprüft. Eine Kontamination kann, je nach Art der Mycoplasmen und der Kulturbedingungen, verschiedene Auswirkungen auf die Zellen haben. Die Mycoplasmen können z.B. zytotoxisch wirken, oder die Enzymexpression der Zellen verändern (110).

Für die Mycoplasmentests wurde das „Mycoplasmen Test Kit I/C“ von PromoKine verwendet. 100 µl Nährmedium einer Zellkultur wurden in ein 0,5 ml Reaktions-Gefäß überführt, anschließend für 10 min bei 95°C inkubiert und daraufhin für 5 s

zentrifugiert. Dadurch waren die DNA-Stränge in der Lösung bei 2-8°C für eine Woche stabil. Für jeden Test wurden 22 µl „Rehydration Buffer“, 1 µl Taq DNA Polymerase und 2 µl Probe benötigt. Die Negativkontrolle enthielt statt der Probe 2 µl RNase-freies Wasser. Für die Positivkontrolle, ein Lösungsansatz mit einer Probe, die ein positives Ergebnis hervorruft, wurde ein spezielles Test-Röhrchen von PromoKine verwendet, welchem wiederum 2 µl RNase-freies Wasser hinzugefügt wurden. Die Ansätze wurden für 5 min unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde mit der PCR begonnen. Der erste Durchlauf verlief bei 94°C für 2 min. Danach folgten 38 Durchläufe mit folgendem Schema: 30 s bei 94°C, dann 30 s bei 55°C, dann 40 s bei 72°C. Nach dem letzten Durchlauf wurden die Ansätze auf 4°C heruntergekühlt. Die PCR-Produkte wurden nun auf ein Agarosegel nach Kapitel 2.2.1.10 aufgetragen. Es wurde eine 100 zu 1000 bp Leiter verwendet und die Gelelektrophorese für 25 min bei 100 V laufen gelassen. Die Negativkontrolle, die Positivkontrolle und die Proben besaßen eine Bande bei 479 bp. Diese zeigte an, dass eine korrekte Auftrennung der DNA-Stränge stattfand. Die Positivkontrolle sowie die kontaminierten Proben besaßen zusätzlich eine Bande zwischen 265-278 bp. Die Abbildung 8 zeigt einen unauffälligen Mycoplasmentest.

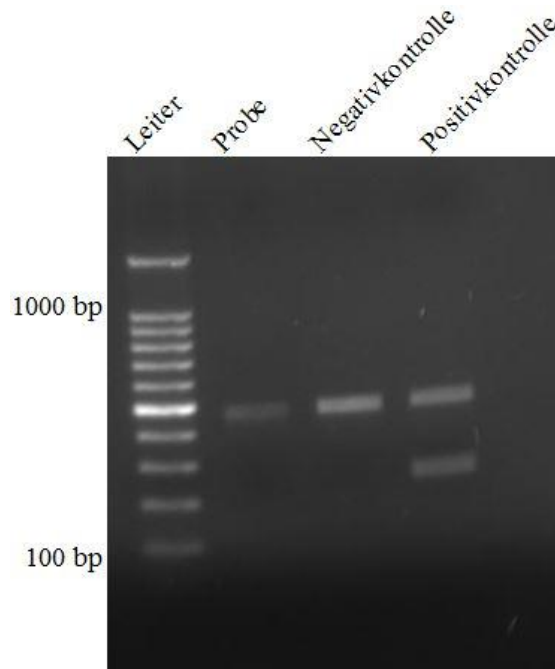


Abb. 8 Exemplarische Abbildung eines Mycoplasmentests, der bei einer Probe des Hauptversuchs durchgeführt wurde.

Es wurden an den Zellkulturen der Vorversuche 2.2.2.1, 2.2.2.2 und 2.2.2.4 und des Hauptversuchs Mycoplasmentests durchgeführt.

2.2.1.12 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie diente der Überprüfung, ob es sich bei den kultivierten Zellen auch um die gewünschten synovialen Fibroblasten handelte. Dafür wurde das Flow Cytometer BD FACSCanto™ II benutzt. Die Analyse wurde von Frau Lohmeyer aus dem Infektionslabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH durchgeführt.

Eine alternative Bezeichnung ist die FACS®-Analyse. Dies ist eine Abkürzung und steht für „Fluorescence Activated Cell Sorting“. Bei der Untersuchung werden die Zellen auf Größe und Aufbau hin untersucht. Dies geschieht mittels eines Laserstrahls, an dem die Zellen einzeln vorbeifließen. Sie befinden sich dabei in einem flüssigkeitsgefüllten Kanal. Dazu werden die Zellen mit farbstoffmarkierten Antikörpern versehen, die an zellspezifische Oberflächenmoleküle binden, und bei Anregung durch den Laserstrahl Licht emittieren, welches gemessen wird. Anhand der Beugung und Streuung des Lichts, kann auf die Zellbeschaffenheit geschlossen werden (111).

Die Proben wurden im Labor für Experimentelle Orthopädie vorbereitet. Dazu wurden die Zellen in 400 µl PBS aufgenommen und 100 µl dieser Lösung in das Well einer 96-Well-ELISA Mikrotiterplatte pipettiert. Zusätzlich kamen 10 µl Octagam, eine aus humanem Blutplasma hergestellte Immunglobulin G-Lösung in einer Konzentration von 10 mg/ml, und 10 µl eines monoklonalen Antikörpers (Mouse anti Human Fibroblasts/Epithelial Cells D7-FIB) hinzu. Das Octagam sollte unspezifische Bindungen des Antikörpers verhindern. Nach der Vorbereitung wurden die Proben in das genannte Labor zu Frau Lohmeyer überführt und weiter behandelt. Zuerst wurden sie bei 4°C für 15 min inkubiert, und anschließend 3 x mit einem Waschpuffer (PBS, bovines Serumalbumin (BSA), Natriumazid) gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Zuletzt wurde die Probe mit 20 µl des sekundären Antikörpers Rabbit F(ab')₂ anti Mouse, ein Phycoerythrin markiertes Fab-Fragment, verdünnt, nochmal für 15 min inkubiert, und abschließend 2 x gewaschen. Nun konnte die Durchflusszytometrie gestartet werden. Die Datenverarbeitung erfolgte mit der BD FACSDiva™ Software. Eine Durchflusszytometrie fand bei den Zellen von 5 Patienten des Hauptversuchs statt. Ein Anteil von > 90% synovialer Fibroblasten an der Gesamtpopulation der untersuchten Zellen wurde als hinreichend hoch angesehen.

2.2.1.13 Auswertung der Fotografien

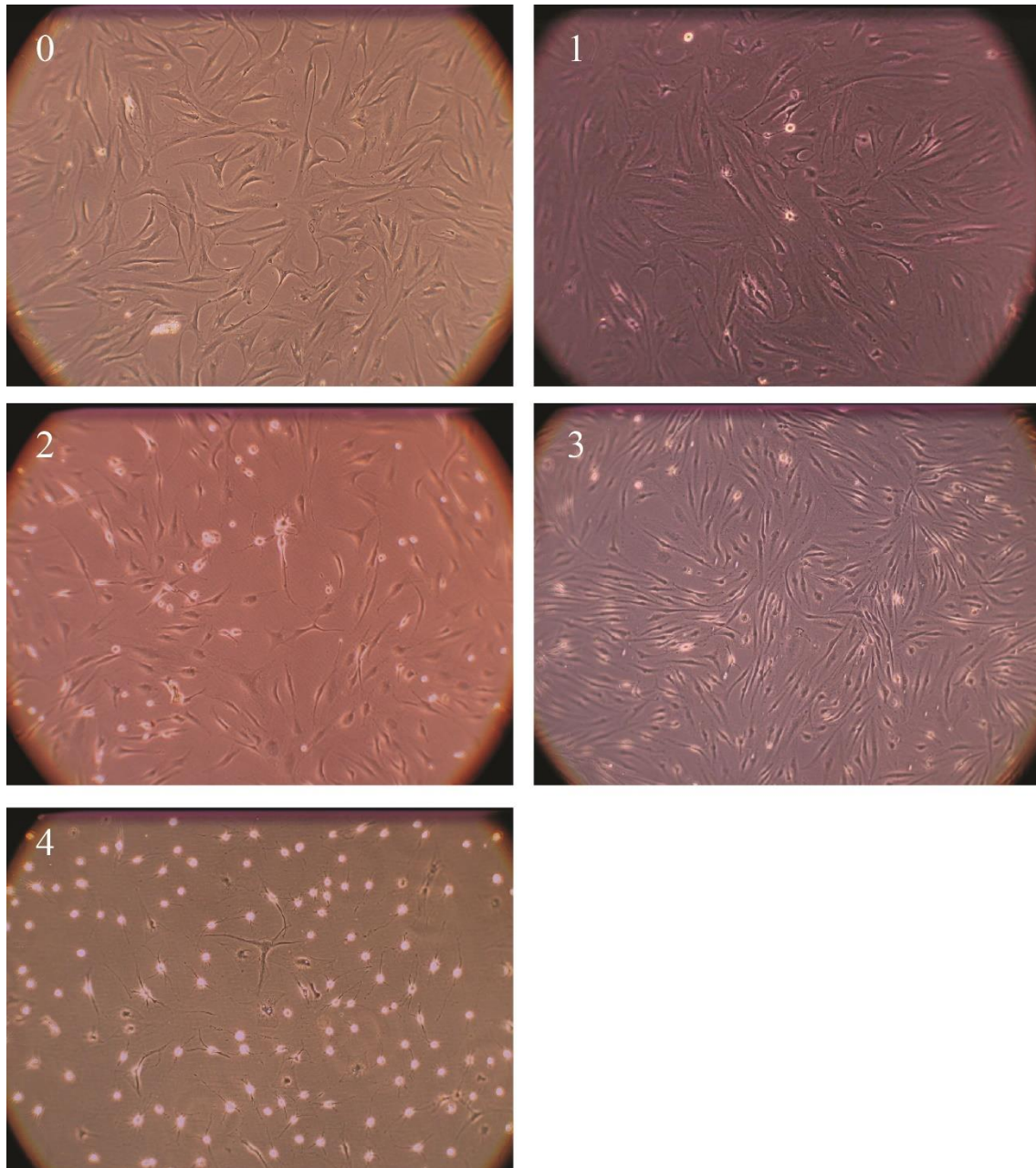


Abb. 9 Einteilung des Zellstresses an Hand der Morphologie. Zur übersichtlicheren Darstellung ist nur die 100-fache Vergrößerung abgebildet. Die Zahlen in den Bildern entsprechen der jeweiligen zugeordneten Werten nach Santangelo et al. 2007 (112).

Um einen möglichen Zellstress und somit eine Beeinträchtigung der Versuche aufzudecken, wurde die Zellmorphologie betrachtet. Den Zellen wurde an Hand ihrer Morphologie ein Wert nach einem Bewertungsschema zugeteilt. Diese Werte und die darin enthaltenden Informationen über den Zellstress wurden im Hauptversuch und im Versuch 2.2.2.1 ausgewertet. Dazu wurden vor und nach der Adaption an 2% FCS-

haltiges Medium sowie direkt nach Ende des Experiments zwei Fotografien pro Well, in 50- sowie 100-facher Vergrößerung der Zellen, gemacht. Die Auswertung der Fotografien und Werteverteilung erfolgte nach einem Schema von Santangelo et al. 2007 (112), eine Übersicht ist in Tab. 6 dargestellt. In Abb. 9 sind zu den einzelnen Werten entsprechende Aufnahmen zugeordnet.

Wert	Kriterien
0	> 95% der Zellen liegen am Boden, verzweigte Fibroblastenstruktur, keine Abrundung
1	5-25% abgerundet und abgelöst
2	26-50% abgerundet und abgelöst
3	51-75% abgerundet und abgelöst
4	> 76% abgerundet und abgelöst

Tab. 6 Kriterien für die morphologische Auswertung der synovialen Fibroblasten (112).

2.2.2 Vorversuche

2.2.2.1 Bestimmung der optimalen FCS-Menge im Nährmedium

Das Ziel war es, die optimale Konzentration von FCS als Bestandteil des Nährmediums während der 24-stündigen Durchführung des Versuchs in Gegenwart der Kollagenhydrolysate zu finden. Die Konzentration sollte möglichst gering gehalten werden, da dies zu einer Wachstumshemmung der synovialen Fibroblasten führt. So sollte ein *in vivo* ähnelnder Zustand erreicht werden. Nach mehreren Vorversuchen zeigte sich jedoch, dass ein zu geringer FCS-Gehalt zu einer veränderten Zellmorphologie mit erhöhtem Abrunden der Zellen sowie Zellsterben führt.

Für den Versuch „Bestimmung der optimalen FCS-Menge im Nährmedium“ erfolgte die Zellkultivierung nach Kapitel 2.2.1.2. Es wurden die Zellen eines Patienten genutzt. Die Versuchsvorbereitung erfolgte nach Kapitel 2.2.1.3. Es wurden auf zwei 6-Well Platten 40.000 synoviale Fibroblasten pro Well ausgesät. Nach jedem Teilschritt (s. Abb. 4 in Kapitel 2.2.1.3) erfolgte eine fotografische Dokumentation. Für den Arbeitsschritt „Adaption an einen verringerten FCS-Gehalt im Medium“ nach Kapitel 2.2.1.3 wurde der FCS-Gehalt im neu hinzugefügten Medium wie folgt variiert: vier Wells mit 1% FCS und zwei Wells mit 2% FCS. Für den nächsten Arbeitsschritt nach Kapitel 2.2.1.3 veränderte sich abermals der FCS-Gehalt: zwei Wells mit vorher 1%

FCS, bekamen jetzt 0% FCS; für die übrigen Wells blieb es bei der alten Konzentration. Der Versuch wurde über 24 h durchgeführt. Nach Inkubationsende wurden 100 µl Nährmedium aus einem Well für den Mycoplasmentest nach Kapitel 2.2.1.11 entnommen. Danach wurden die Zellen aus drei Wells beider Platten mit PBS gewaschen und mit 430 µl Trypsin pro Well für 5 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, sodass sie sich vom Boden lösten. Zusammen mit 1 ml Nährmedium erfolgte die Zentrifugation der Lösung bei 800 x g für 10 min und 37°C. In 100 µl Nährmedium gelöst, konnte das Zellpellet nach 2.2.1.4 ausgezählt, und die Zellviabilität bestimmt werden. Die Zellen in den restlichen Wells beider Platten wurden lysiert und die RNA extrahiert (Kapitel 2.2.1.5 und 2.2.1.6). Als Parameter wurden die Zellzahl, die Viabilität, der RNA-Gehalt, die Reinheit der RNA als A260/A280-Quotient und die Morphologie der fotografierten Zellen ausgewertet.

2.2.2.2 Vergleich zweier Methoden zur RNA-Extraktion

Das Ziel dieses Versuches war es, die Methoden zur RNA-Extraktion mit peqGOLD TriFast™ und mit Qiagen RNeasy® zu vergleichen. PeqGOLD TriFast™ war im Labor bereits bekannt, Qiagen RNeasy® war eine neue Methode.

Es wurden synoviale Fibroblasten von drei Patienten benutzt. Diese wurden in getrennten T-75 Zellkulturflaschen kultiviert (Kapitel 2.2.1.2). Ab einer Konfluenz von 90% wurden 80.000 Zellen pro Well in jeweils eine eigene 6-Well Platte ausgesät, und der Versuch nach Kapitel 2.2.1.3 vorbereitet. Zum Start dieses Versuches wurden zusätzlich 80 µl IL-1β mit der Endkonzentration von 10 ng/ml Nährmedium in jedes Well gegeben, und die Zellen für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Versuchsende wurde Nährmedium aus einem Well für den Mycoplasmentest nach Kapitel 2.2.1.11 entnommen, das restliche Medium entfernt und die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen. Auf jeder Platte wurde die RNA in drei Wells nach TriFast™ und in drei Wells nach RNeasy® extrahiert. Für den Ablauf der RNA-Extraktion mit TriFast™ siehe Kapitel 2.2.1.5. Die Extraktion mit RNeasy® erfolgte nach Herstellerangabe.

Nach Abschluss der Extraktion erfolgte jeweils eine Bestimmung der RNA-Reinheit und -Konzentration (Kapitel 2.2.1.6). Danach wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und eine quantitative RT-PCR durchgeführt (Kapitel 2.2.1.7 und 2.2.1.8). Es wurden Primer für COX-2, PRG4 und Beta-Aktin (ACTB) verwendet. In

der qRT-PCR wurde anschließend eine Effizienzbestimmung dieser Primer mittels einer Verdünnungsreihe durchgeführt (Kapitel 2.2.2.3). Je zwei Verdünnungsreihen wurden mit demselben Primer, extrahiert nach TriFast™ oder RNeasy®, aufgetragen. Zusätzlich wurden noRT- und NTC-Kontrollen aufgetragen. „noRT“ steht für minus Reverse Transkriptase und bedeutet, dass diese während der reversen Transkription von mRNA in cDNA nicht vorhanden war. Diese Kontrolle würde auf Kontamination der Probe mit genomischer DNA hinweisen, hätte sie Ct-Werte geliefert. „NTC“ steht für No Template Control und bedeutet, dass keine cDNA hinzugefügt wurde, ein Ct-Wert hätte hier auf Fremdmaterial oder Primer-Dimere hingewiesen. Die ausgewerteten Parameter waren die Reinheit der RNA ausgedrückt als A260/A280-Quotient, der RNA-Gehalt in µg/ml RNase-freiem Wasser, und die Ergebnisse der Effizienzbestimmung. Die letzten beiden Parameter wurden zudem statistisch nach Kapitel 2.2.4 analysiert. Dabei wurde RNeasy® gegen TriFast™ auf einen statistisch auffälligen Unterschied geprüft. Die Ergebnisse der Effizienzbestimmung wurden in Kapitel 2.2.2.3 weitergenutzt.

2.2.2.3 Effizienzbestimmung der Primer

Das Ziel dieses Versuches war es, die Amplifizierungs-Effizienzen der Primer der potentiellen Referenzgene sowie der Zielgene zu bestimmen. Für die spätere Verwendung in der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode mussten die Effizienzen mindestens 80-90% betragen und untereinander ähnlich hoch sein. Eine Mindesteffizienz von 90% wurde für die vorliegende Arbeit festgelegt (105,113).

Die Zellen von sieben Patienten wurden separat in T-75 Flaschen kultiviert (Kapitel 2.2.1.2). Ab einer Konfluenz von 90% wurden daraufhin 80.000 Zellen in die Wells einer 6-Well Platte pro Patient ausgesät und der Versuch nach Kapitel 2.2.1.3 vorbereitet. Für diesen Versuch wurden nun zusätzlich 80 µl IL-1β in einer Endkonzentration von 10 ng/ml Nährmedium in jedes Well gegeben, und die Zellen für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Versuchsende wurde das Medium entfernt, die Zellen einmal mit 2 ml PBS gewaschen und mit TriFast™ lysiert. Die RNA wurde extrahiert (Kapitel 2.2.1.5), der RNA-Gehalt bestimmt (Kapitel 2.2.1.6) und anschließend die cDNA hergestellt (Kapitel 2.2.1.7). Daraufhin erfolgte die qRT-PCR (Kapitel 2.2.1.8). Die cDNA wurde nach folgendem Verdünnungsschema auf die ELISA-Platten aufgetragen: entweder 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 und 1:128, oder

1:0, 1:5, 1:10, 1:50 und 1:100. Jede Verdünnungsstufe wurde im Triplikat gemessen. Folgende Primer wurden untersucht: ACTB, ADAMTS5, ADAM17, Beta-2 Mikroglobulin (B2M), CASP1, COX-2, GAPDH, IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-13, PRG4, TIMP-1 und TIMP-3. Zusätzlich wurden jeweils noRT- und NTC-Kontrollen aufgetragen. Die gemessenen Ct-Werte einer Verdünnungsreihe wurden nun nach Ausreißern hin manuell geprüft. Mit dem Programm GraphPad Prism® 5 wurden die Ct-Werte dann gegen den Logarithmus der Verdünnung aufgetragen. Daraus wurde die Steigung „s“ der Geraden errechnet und in die Formel:

$$E = 10^{(-\frac{1}{s})} - 1$$

eingesetzt (105). „E“ steht für die Effizienz der Amplifikation in %. Primer mit Effizienzen über 90% waren für den Hauptversuch geeignet. Werte über 100%, wurden als 100% gewertet (114). Ausschlaggebend für die Entscheidung war am Ende das arithmetische Mittel der Effizienzen der Versuchswiederholungen. Es gab jeweils mindestens zwei Versuche pro Primer. Ein Teil der Daten stammt aus dem Kapitel 2.2.2.2. Im Folgenden ist exemplarisch eine Steigungsgerade dargestellt:

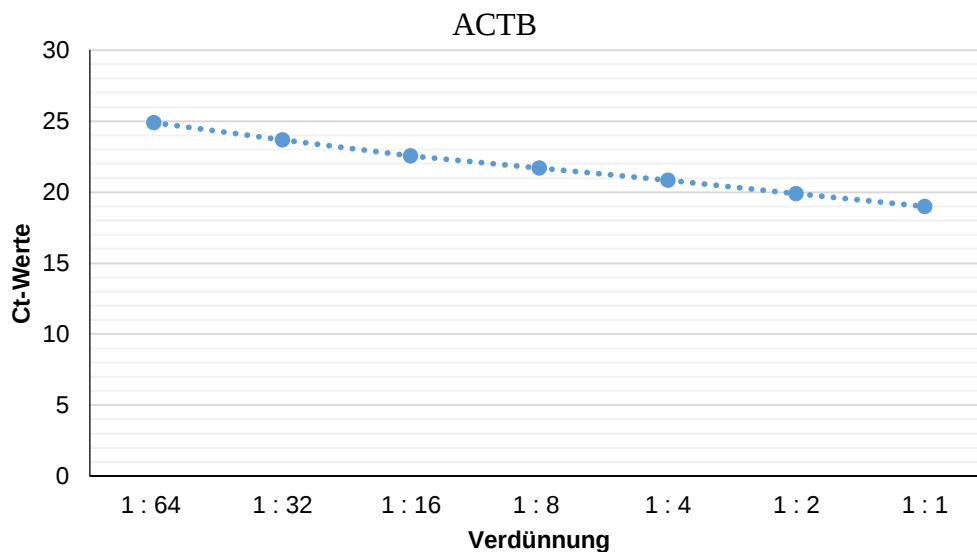


Abb. 10 Bestimmung der Steigung für die Effizienzberechnung. Dargestellt sind die Ct-Werte der Verdünnungsreihe des Primers ACTB. Die Verdünnung 1:128 wurde nicht für die Auswertung verwendet, da hier regelmäßig sehr hohe Ct-Werte über 35 festgestellt wurden und somit nicht mehr von einer exakten Messung auszugehen war. Die Steigung beträgt hier -3,2.

2.2.2.4 Wahl des Referenzgens

Das Ziel des Versuches war es, einen möglichen Einfluss der Kollagenhydrolysate auf die mRNA-Expression der ausgewählten Referenzgene aufzudecken. Für den späteren

Hauptversuch war es wichtig, ein Gen zu benutzen, welches nicht von den Kollagenhydrolysaten beeinflusst wird. Mit Hilfe dieses Referenzgens wurden Unterschiede in der initialen Zellzahl zwischen Kontrolle und Variante herausgerechnet. Die Zellen von drei Patienten wurden separat in T-75 Flaschen kultiviert (Kapitel 2.2.1.2). Ab einer Konfluenz von 90% wurden 80.000 Zellen in jedes Well zweier 6-Well Platten pro Patient ausplattiert und der Versuch nach Kapitel 2.2.1.3 vorbereitet. Für den Versuch erhielt jedes Well einen eigenen Zusatz: 100 µl Nährmedium als Kontrolle, 100 µl der Kollagenhydrolysate RDH, RDH-N, FGH, FGH-N, PCH, PCH-N, Mobiforte®, Norland-HFC, oder CH-Alpha®, oder 80 µl IL-1β. Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug 2,0 mg/ml Nährmedium, von IL-1β 10 ng/ml Nährmedium. Die zwei 6-Well Platten wurden für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Es wurden nun 100 µl Nährmedium aus einem Well für den Mycoplasmentest nach Kapitel 2.2.1.11 entnommen. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und die RNA extrahiert (Kapitel 2.2.1.5) sowie deren Konzentration und Qualität bestimmt (Kapitel 2.2.1.6). Daraufhin wurde die cDNA hergestellt (Kapitel 2.2.1.7). Dann folgte die qRT-PCR mit Primern für die Gene *ACTB*, *B2M* und *GAPDH*. Die Messung erfolgte jeweils im Triplikat. Zusätzlich wurden noRT- und NTC-Kontrollen aufgetragen.

Aus den Triplikaten wurde jeweils das arithmetische Mittel gebildet. Mit diesen Werten erfolgte die statistische Auswertung (Kapitel 2.2.4). Dabei wurden die Varianten (Kollagenhydrolysate) gegen die Kontrolle (Nährmedium) getestet. Weiterhin wurden die Ergebnisse gemäß Silver et al. 2006 (115) ausgewertet. Der Hintergrund für die Verwendung der zweiten Methode war folgender: Eine qRT-PCR liefert nur valide Ergebnisse, wenn man Mengenunterschiede in der Ausgangs-cDNA zwischen Variante und Kontrolle mittels eines Referenzgens adjustieren kann. Bei der Wahl des Referenzgens ist diese Adjustierung nicht möglich. Eine mögliche Fehlerquelle besteht hier, bei unterschiedlichen Ct-Werten zwischen Kontrolle und Variante auf einen Effekt in der Interventionsgruppe zu schließen, wobei lediglich die cDNA-Menge unterschiedlich sein könnte. Werden jedoch zwischen zwei Referenzgenen die Differenzen der Kontrollen und Varianten betrachtet, so sind diese bei stabiler Expression beider Parameter auch bei verschiedenen cDNA-Mengen gleich. Eine gleichmäßige Regulation beider Gene würde ebenfalls zu stabilen Differenzen führen. Fallen jedoch unterschiedliche Differenzen zwischen Kontrolle und Variante auf, ist von einer Regulation eines der Gene auszugehen. Durch den Vergleich mit den anderen

Referenzgenen, kann man das regulierte Ziel herausfinden (115). Nach dieser Methode wurden zuerst die Differenzen zwischen den korrespondierenden Ct-Werten von jeweils zwei Referenzgenen gebildet. Aus den entstehenden Δ Ct-Werten wurde das arithmetische Mittel gebildet, und damit die statistische Analyse nach Kapitel 2.2.4 durchgeführt. Für die Auswertung wurden folgende Parameter betrachtet: GAPDH, B2M, ACTB, Δ CT GAPDH-B2M, Δ CT GAPDH-ACTB, Δ CT ACTB-B2M.

2.2.3 Hauptversuch

2.2.3.1 Versuchsdesign

Um die in Kapitel 1.4 formulierten Fragen zu beantworten, wurden synoviale Fibroblasten mit Kollagenhydrolysaten behandelt. Nach 24 h wurde ein Teil der Kulturen für die Analyse der Zellproliferation und -viabilität verwendet. Aus den restlichen Zellen wurde die RNA extrahiert und die mRNA in cDNA umgeschrieben. Mittels qRT-PCR wurde die relative Veränderung der mRNA-Expression für ausgesuchte Enzyme und Entzündungsmediatoren bestimmt. Eine Übersicht über den Versuchsaufbau findet sich im tabellarischen Anhang in der Tabelle 11.3.1.

2.2.3.2 Durchführung

Es wurden die Zellen von 6 Patienten isoliert (siehe 2.2.1.1). Die Zellkultivierung erfolgte nach 2.2.1.2. Für das Experiment geschah die Aussaat in sechs 6-Well Platten pro Patient. Zuerst wurden die Zellen aller Zellkulturflaschen eines Patienten gemischt. Anschließend wurden 50.000 Zellen für die Durchflusszytometrie entnommen und 80.000 Zellen pro Well ausgesät. Die Zellzahl und die Zellviabilität wurden nach 2.2.1.4 bestimmt. Die Versuchsvorbereitung erfolgte nach Kapitel 2.2.1.3. Nach jedem Zwischenschritt wurden die Wells von zwei Platten fotografiert. Für den Versuch wurden zu den 4 ml Nährmedium einzelne Zusätze in je ein eigenes Well gegeben. Eine Übersicht findet sich hierzu im tabellarischen Anhang in der Tabelle 11.3.1. In drei 6-Well Platten wurden je 100 μ l der Kollagenhydrolysate RDH, RDH-N, FGH oder FGH-N, oder 100 μ l Nährmedium als Kontrolle gegeben. Ein Well blieb dabei komplett ungenutzt. Bei einer dieser 6-Well Platten wurden zusätzlich 80 μ l IL-1 β pro Well hinzugefügt. In weitere drei 6-Well Platten wurden 100 μ l der Kollagenhydrolysate CH-Alpha®, Mobiforte®, PCH, PCH-N oder Norland-HFC, bzw. 100 μ l Nährmedium gegeben. Auch hier wurden bei einer 6-Well Platte zusätzlich 80 μ l IL-1 β pro Well

hinzugefügt. Die Endkonzentration für die Kollagenhydrolysate betrug 2,0 mg/ml Nährmedium und für das IL-1 β 10 ng/ml Nährmedium. Das IL-1 β sollte die Zellen vorstimulieren, wie es in einem Entzündungsgeschehen vorkommt (36,46,56). Die sechs 6-Well Platten wurden nun für 24 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Versuchsende erfolgte pro Patient eine Entnahme von 100 μ l Nährmedium aus einem zufällig ausgewählten Well für den Mycoplasmentest (2.2.1.11) aus einer der Platten. Von den Wells einer der ersten drei und einer der zweiten drei 6-Well Platten, die während der Versuchsvorbereitung schon abfotografiert wurden, erfolgte nun eine erneute fotografische Dokumentation. Die Zellen wurden anschließend einmal mit 2 ml PBS gewaschen und mit 430 μ l Trypsin pro Well für 5 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert, sodass sie sich vom Boden lösten. Zusammen mit 1 ml Nährmedium erfolgte die Zentrifugation der Lösung bei 800 x g für 10 min und 37°C. Das Zellpellet wurde in 500 μ l Nährmedium überführt und gemäß 2.2.1.4 ausgezählt und die Viabilität bestimmt. Gleichzeitig wurden die Wells der restlichen vier Platten einmal mit 2 ml PBS gewaschen und die RNA aus den Zellen nach Kapitel 2.2.1.5 extrahiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.2.3.3 qRT-PCR

Die Analyse RNA-Konzentration und Reinheit erfolgte gemäß Kapitel 2.2.1.6. Danach wurde die cDNA gemäß Kapitel 2.2.1.7 hergestellt. Nun konnte die qRT-PCR, wie in Kapitel 2.2.1.8 beschrieben, durchgeführt werden. Hierfür wurden Primer Assays der Firma Qiagen genutzt. Diese Assays enthielten bereits beide Primer, die benötigt wurden, um den gewünschten Genabschnitt in beide Leserichtungen zu vervielfältigen. Sie mussten vor der erstmaligen Nutzung von 10 x auf 1 x mit TRIS-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) verdünnt werden (116). Eine Übersicht über die verwendeten Primer gibt Tab. 7. Pro ELISA-Platte wurden zwei Primer durchgetestet. Dabei wurden entweder die Kollagenhydrolysate mit oder ohne IL-1 β -Zusatz geprüft. Jede Messung erfolgte im Triplikat.

Um messtechnisch verursachte Abweichungen (z.B. ein Defekt des Spektrometers mit systematischen Messfehlern) zwischen den Experimenten zu kontrollieren, wurden unabhängig von der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode die Referenzgene *GAPDH*, *B2M* und *ACTB* bei jeder qRT-PCR gemessen. Die dafür verwendete cDNA entstammte aus einer von drei großen cDNA-Proben, welche nacheinander angelegt und genutzt wurden.

QuantiTect® Primer Assay	Name	
Hs_ACTB_2_SG	ACTB	Beta-Aktin (nur Versuch 2.2.2.4)
Hs_ADAMTS5_1_SG	ADAMTS5	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5
Hs_ADAM17_1_SG	ADAM17 = TACE	A disintegrin and metalloproteinase 17 = tumor necrosis factor- α -converting enzyme
Hs_B2M_1_SG	B2M	Beta-2 Mikroglobulin (nur Versuch 2.2.2.4)
Hs_CASP1_1_SG	CASP1	Caspase-1
Hs_PTGS2_1_SG	COX-2	Cyclooxygenase-2
Hs_GAPDH_2_SG	GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Hs_IL-6_1_SG	IL-6	Interleukin-6
Hs_IL-8_1_SG	IL-8	Interleukin-8
Hs_MMP-3_1_SG	MMP-3	Matrixmetalloproteinase-3
Hs_MMP-13_1_SG	MMP-13	Matrixmetalloproteinase 13
Hs_PRG4_2_SG	PRG4	Proteoglykan 4/Lubricin
Hs_TIMP-1_1_SG	TIMP-1	Tissue inhibitor of metalloproteinases-1
Hs_TIMP-3_1_SG	TIMP-3	Tissue inhibitor of metalloproteinases-3

Tab. 7 Übersicht über die verwendeten Primer. Die drei Gene *ACTB*, *B2M* und *GAPDH* wurden in dem Versuch „Wahl des Referenzgens“ (Kapitel 2.2.2.4) auf ihre mögliche Verwendung als Referenzgen untersucht. Es wurde *GAPDH* als Referenzgen für den Hauptversuch ausgewählt. Im Hauptversuch wurden somit *ACTB* und *B2M* nicht mehr genutzt.

Eine Abweichung von ± 2 von den jeweiligen Ct-Mittelwerten dieser Proben auf den einzelnen ELISA-Platten wurde dabei toleriert. Gab es bei allen drei Primern eine größere Abweichung, wurde nach einer möglichen Ursache gesucht und der Versuch wiederholt, da von einem systematisch vorhandenen Störfaktor während der Amplifizierung auszugehen war. Weiterhin wurden auf jeder ELISA-Platte zusätzlich NTC-Kontrollen angelegt. Die Abkürzung steht für „No Template Control“ und bedeutet, dass keine cDNA in dem ansonsten gleichen Ansatz vorhanden war. Ein Ct-Wert hätte hier auf Verunreinigung mit Fremdmaterial oder Primer-Dimere hingewiesen. Wurde ein geringerer Ct-Wert als 35 festgestellt, wurde auch hier der Versuch wiederholt.

2.2.3.4 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode

Die Ergebnisse der qRT-PCR wurden mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet. Dazu wurden eine unbehandelte Kontrolle und eine behandelte Variante verglichen. Den Kontrollen entsprachen die Wells, die nur Nährmedium oder je nach Schema zusätzlich IL-1 β

enthielten. Die Behandlung bestand aus je einem Kollagenhydrolysat. Die Varianten einer 6-Well Platte wurden gegen die Kontrolle derselben Platte gemessen. Für die Auswertung wurden das Zielgen sowie das Referenzgen benötigt. Im ersten Schritt wurde bei der Kontrolle und der Variante jeweils der Ct-Wert des Referenzgenes von dem Ct-Wert des betrachteten Zielgenes subtrahiert. Es entstand der ΔCt -Wert. Bei den Ct-Werten handelte es sich jeweils um das arithmetische Mittel der Triplikate. Im zweiten Schritt wurde der ΔCt -Wert der Kontrolle von dem ΔCt -Wert der Variante subtrahiert. Es entstand der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert. Durch diese Vorgehensweise wurden die Ergebnisse untereinander vergleichbar. Dies war nötig, um eventuelle Unterschiede in der cDNA-Menge nicht die Auswertung beeinflussen zu lassen. Im letzten Schritt wurden die Werte in die Formel $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ eingesetzt. Das Ziel war die relative n-fache Expression der behandelten Probe zur unbehandelten Kontrolle zu bestimmen. Werte größer 1 zeigten eine Stimulation an, Werte zwischen 0 und kleiner 1 entsprachen einer Hemmung (113). Die entstandenen Werte wurden nun für die statistische Auswertung verwendet.

2.2.3.5 Qualitätskontrolle

Der RNA A260/A280-Quotient als Maß der Reinheit wurde bei jeder RNA-Messung begutachtet. Er sollte mindestens zwischen 1,4 und 2 liegen (s. auch 2.2.1.6). Der RNA-Gehalt wurde mit dem Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon und anschließender Adjustierung mit der False Discovery Rate (FDR) ausgewertet. Es wurde untersucht, ob die Kollagenhydrolysate die Menge der extrahierten RNA beeinflussen. Damit konnte kontrolliert werden, ob bei auffälligen $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Werten im Hauptversuch auffällige RNA-Mengen im Vorfeld vorhanden waren. Vor der Aussaat in die 6-Well Platten fand bei den Zellen von fünf Patienten eine Durchflusszytometrie zur Überprüfung der Zellart und der Reinheit der Zellpopulation statt (s. 2.2.1.12). Bei allen Patientenproben wurde ein Mycoplasmentest nach Kapitel 2.2.1.11 zur Kontrolle auf Kontamination durch Mycoplasmaspezies durchgeführt. Die Probenentnahme erfolgte nach Versuchsende. Bei jeder qRT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse nach Kapitel 2.2.1.9 zur Prüfung auf vorliegende Störfaktoren durchgeführt.

2.2.3.6 Ausgewertete Parameter

Statistisch ausgewertet wurden die Zellzahl, die Viabilität der Zellen und die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte der qRT-PCR. Dies geschah mit dem Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon und anschließender Adjustierung mit der FDR (False Discovery Rate). Rein deskriptiv ausgewertet wurde die Morphologie der Zellen auf den Fotos zu den verschiedenen Zeitpunkten.

2.2.4 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte in Zusammenarbeit mit Herrn Dr. Pons-Kühnemann vom Institut für Medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität Gießen. Es wurden die Programme GraphPad Prism® 5, SAS 9.3 und Microsoft Excel 2010 für die Auswertung und Darstellung der Daten genutzt. Es wurden 9 Kollagenhydrolysate auf ihren Einfluss auf 11 verschiedene Gene untersucht. Die Stichprobe enthielt insgesamt 6 Patienten. Das arithmetische Mittel, die Standardabweichung und der Median wurden jeweils berechnet. Die statistische Auswertung und Interpretation der Daten erfolgte rein explorativ. Für die Analyse der Vorversuche 2.2.2.2 und 2.2.2.4 und des Hauptversuchs wurde der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verwendet. Er wurde gewählt, da eine Normalverteilung bei der geringen Stichprobe nicht anzunehmen war. Der letzte Schritt bestand aus einer Adjustierung der p-Werte mittels der Methode der False Discovery Rate (FDR) von Benjamini und Hochberg (117). Dies war notwendig, da sehr viele Untersuchungen an den gleichen Proben vorgenommen wurden. Die nach dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test errechneten p-Werte $\leq 0,05$ wurden als auffällig interpretiert. Auf Grund der Adjustierung mittels der FDR ist dabei aber nicht von einer Signifikanz zu sprechen.

3 Ergebnisse

3.1 Vorversuche

3.1.1 Bestimmung der optimalen FCS-Menge im Nährmedium

In diesem Versuch wurde untersucht, wie hoch die optimale Konzentration von FCS als Bestandteil des Nährmediums für die synovialen Fibroblasten für die Zeit der Versuchsdurchführung sein sollte (s. dazu auch Kapitel 2.2.1.3). Die Konzentration sollte möglichst gering sein, um eine Hemmung der Proliferation der synovialen Fibroblasten zu erreichen und so einen *in vivo* ähnelnden Zustand zu simulieren. Ein zu geringer FCS-Gehalt führte zu einer vermehrt abgerundeten Zellmorphologie und erhöhtem Zellsterben. Für den Versuch wurden Konzentrationen von 0%, 1% und 2% FCS im Nährmedium miteinander verglichen. Dabei wurden die Zellen eines Patienten genutzt. Als Parameter wurden die Zellzahl, die Viabilität, der RNA-Gehalt, die Reinheit der RNA und die fotografisch dokumentierte Morphologie der Zellen ausgewertet. In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht über die Ergebnisse dargestellt.

Parameter	FCS-Gehalt	6-Well Platte 1	6-Well Platte 2
Zellzahl	0%	25.000	55.000
	1%	56.250	95.000
	2%	70.000	75.000
Zellviabilität [%]	0%	100	81,82
	1%	97,78	96,05
	2%	98,21	81,67
RNA-Konzentration [µg/ml]	0%	106	79
	1%	166	34
	2%	134	151
Reinheit der RNA [A260/A280-Quotient]	0%	1,71	1,7
	1%	1,73	2,08
	2%	1,71	1,71

Tab. 8 Zelluläre Parameter bei verschiedenen Konzentrationen an FCS. Es wurden die Zellen von einem Patienten verwendet. Diese wurden auf zwei verschiedenen 6-Well Platten unabhängig voneinander untersucht. Es wurden 40.000 synoviale Fibroblasten ausgesät. Die RNA-Konzentration bezieht sich auf µg pro ml RNase-freiem Wasser.

In der Tabelle 8 zeigt sich, dass bei den Konzentrationen von 1% und 2% FCS die Zellzahlen jeweils zunahmen. Dabei ist die Schwankung der beiden Werte bei 1% FCS größer als bei 2% FCS. Bei 0% FCS lässt sich keine Aussage treffen, ob die Zellzahl ansteigt oder nicht.

Bezüglich der Viabilität wurde bei allen FCS-Konzentrationen eine hohe Rate mit Werten zwischen 80 und 100% bestimmt. Der RNA-Gehalt sollte so hoch wie möglich sein, um mehr Ausgangsmaterial für die cDNA-Synthese zu besitzen. Es sind große Unterschiede zwischen den beiden Werten von 0% bzw. 1% FCS festzustellen. Bei 2% FCS zeigen sich beide Werte ähnlich hoch. Der A260/A280-Quotient sollte gegen 2 gehen und möglichst hoch sein. Dabei gilt: je höher der Wert, desto reiner ist die RNA-Lösung. Eine verunreinigte Probe kann bei der weiteren Verwendung, z.B. als Substrat für die Reverse Transkriptase, den Versuchsablauf beeinträchtigen (105). Bei allen Konzentrationen zeigen sich ähnliche Werte. Ein Wert bei 1% FCS liegt sogar über 2. In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der morphologischen Auswertung der fotografierten synovialen Fibroblasten dargestellt. Die Auswertung erfolgte nach Santangelo et al. (112) in die Werte 0, wenn über 95% der Zellen am Boden liegend eine verzweigte Fibroblastenstruktur zeigten, bis 4, bei mehr als 75% vom Boden gelösten und abgerundeten Zellen.

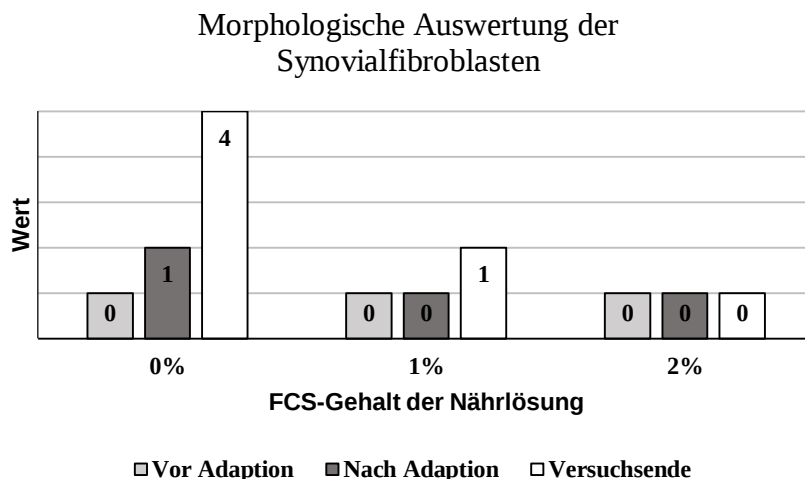


Abb. 11 Bewertung der Zellmorphologie vor und nach der Adaption an einen verringerten FCS-Gehalt im Medium sowie nach Versuchsende. Zu sehen sind die Werte zu jedem Arbeitsschritt bei jeder FCS-Konzentration. Die Einteilung der morphologischen Auswertung der fotografierten synovialen Fibroblasten erfolgte in die Werte 0-4. Ein höherer Wert steht dabei für eine größere morphologische Veränderung und deutet auf einen höheren Zellstress hin.

Die Abbildung 11 zeigt die Auswertung der fotografierten synovialen Fibroblasten. Bei 2% FCS wurde keine morphologische Veränderung beobachtet, bei 1% FCS traten zum Versuchsende hin leichte morphologische Änderungen auf, die bei 0% FCS bereits schon nach der Adaption stattfanden.

3.1.2 Vergleich zweier Methoden zur RNA-Extraktion

In diesem Versuch wurden zwei Methoden zur RNA-Extraktion, peqGOLD TriFast™ und Qiagen RNeasy®, miteinander verglichen. PeqGOLD TriFast™ war im Labor bereits etabliert, Qiagen RNeasy® war eine neue Methode. Die RNA-Extraktion erfolgte jeweils nach Herstellervorgabe. Es wurden die Zellen von drei Patienten genutzt. Als Parameter wurden die RNA-Konzentration nach Extraktion, die Reinheit der RNA und die Ergebnisse der durchgeführten Effizienzbestimmung ausgewählter Primer ausgewertet. Die genutzten Primer waren COX-2, PRG4 und ACTB. Die Werte des RNA-Gehalts und die Ergebnisse der Effizienzbestimmung wurden mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und anschließender FDR-Adjustierung statistisch ausgewertet. Dabei wurde $p \leq 0,05$ als auffällig gewertet. Die Auswertung der Reinheit der RNA erfolgte deskriptiv. Die noRT- und NTC-Kontrollen der qRT-PCR ergaben keinen Ct-Wert unter 35. Die Schmelzkurven zeigten an, dass die Durchführung der qRT-PCR jeweils einwandfrei funktionierte.

Die statistische Auswertung der RNA-Konzentration nach dem Vorzeichen-Rang-Test zeigte vor und nach Adjustierung mittels der FDR keinen signifikanten Unterschied zwischen beiden Verfahren. Auch bei den Effizienzbestimmungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Extraktionsmethoden. Im Folgenden ist in einer Abbildung die Reinheit der RNA dargestellt.

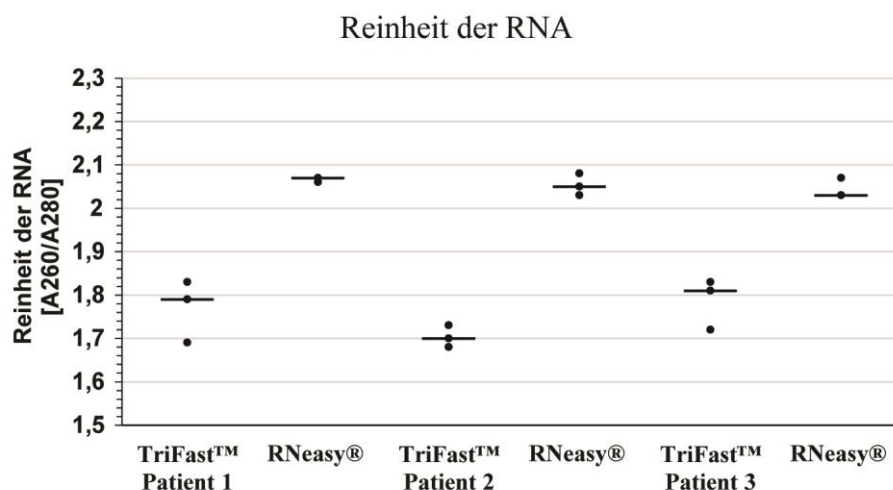


Abb. 12 Reinheit der RNA, dargestellt als A260/A280-Quotient. DNA und RNA haben ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm, Proteine bei 280 nm. Dargestellt sind die Einzelwerte und der Median. Die Auswertung erfolgte deskriptiv.

Es wurde die Reinheit der RNA, dargestellt als Quotient der Absorption bei 260 nm zu 280 nm, ausgewertet. Dazu wurden drei Patientenproben verwendet. In Abbildung 12 ist zu sehen, dass mit TriFast™ die Medianwerte der jeweiligen A260/A280-Quotienten ca. zwischen 1,7 und 1,8 lagen. Mit RNeasy® hingegen lagen die Medianwerte jedes Mal über 2,0.

3.1.3 Effizienzbestimmung der Primer

Ziel des Versuchs war es, die ausgewählten Primer auf ihre Amplifizierungseffizienzen zu untersuchen. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu erreichen, wurden Effizienzen von über 90% akzeptiert. Werte über 100%, wurden als 100% gewertet (105,113,114). Ausschlaggebend für die Entscheidung war am Ende das arithmetische Mittel der Effizienzen der Versuchswiederholungen. Die Zellen von sieben Patienten wurden kultiviert. Die RNA wurde mit TriFast™ isoliert und anschließend aus der mRNA die cDNA hergestellt. Für die qRT-PCR wurde die cDNA gemäß einem Verdünnungsschema auf die ELISA-Platten aufgetragen. Der genaue Ablauf ist in Kapitel 2.2.2.3 beschrieben. Die noRT- und NTC-Kontrollen der qRT-PCR dieses Versuches zeigten keinen Ct-Wert unter 35.

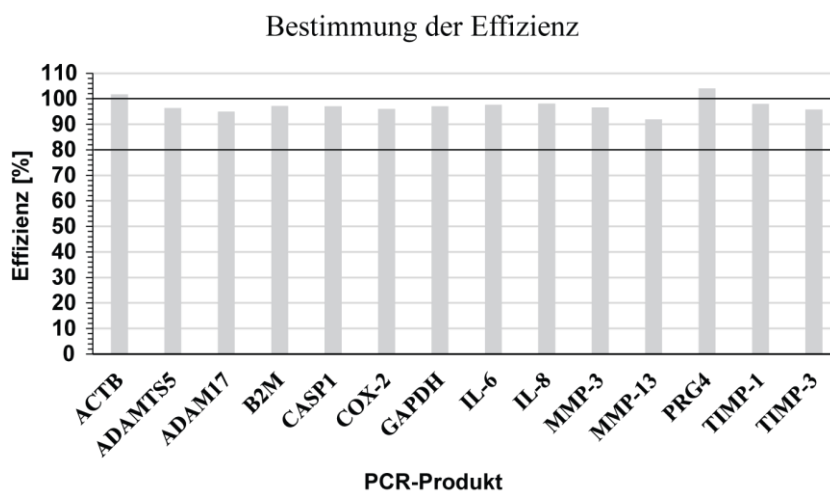


Abb. 13 Die Amplifizierungseffizienzen der untersuchten Primerpaare. Die eingezeichneten horizontalen schwarzen Balken markieren das benötigte Minimum an Effizienz bzw. das Maximum, über dem die Werte pauschal als 100% gewertet wurden. Das Minimum beträgt laut Literatur 80%, wobei wir uns für einen strengerer Wert von 90% entschieden haben. Alle Primerpaare wurden dreimal im Triplikat gemessen. Lediglich CASP1 und GAPDH wurden zweimal im Triplikat gemessen.

In Abbildung 13 ist zu sehen, dass die Effizienzen aller Primerpaare in einem Bereich zwischen 90-100% lagen. Somit waren die ausgewählten Primer geeignet, um mit ihnen eine Auswertung der qRT-PCR nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode durchzuführen.

3.1.4 Wahl des Referenzgens

In diesem Versuch wurde ein möglicher Einfluss der Kollagenhydrolysate auf die mRNA-Expression der ausgewählten Gene untersucht. Für den späteren Hauptversuch war es wichtig, ein Gen zu benutzen, welches nicht von den Kollagenhydrolysaten beeinflusst wird. Dieses sogenannte (sog.) Referenzgen wurde benötigt, um Unterschiede in den Zellzahlen bzw. RNA-Gehalt zwischen Kontrolle und Variante mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode herauszurechnen. Es wurde dabei auf statistische Unterschiede in den Ct-Werten zwischen den mit Kollagenhydrolysaten behandelten Proben und den unbehandelten Kontrollen geachtet. Die untersuchten Primer waren GAPDH, B2M und ACTB. Außerdem wurden die jeweiligen Differenzen ausgewertet: ΔC_t GAPDH-B2M, ΔC_t GAPDH-ACTB, ΔC_t ACTB-B2M. Die statistische Analyse erfolgte mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test mit anschließender Adjustierung mit der False Discovery Rate (FDR). Dabei wurde $p \leq 0,05$ als auffällig gewertet. Die noRT- und NTC-Kontrollen der qRT-PCR zeigten keinen Ct-Wert unter 35. In der Auswertung mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test sowie nach der Adjustierung mit der FDR zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Somit zeigt sich, dass keines der untersuchten Kollagenhydrolysate eine relevante Wirkung auf die mRNA-Expression der Gene *GAPDH*, *B2M* oder *ACTB* besitzt. Damit waren prinzipiell alle drei Gene für die Verwendung als Referenzgen geeignet. Eine Übersicht der Ct-Werte der einzelnen Messungen findet sich im tabellarischen Anhang in den Tabellen 11.2.1.1-11.2.1.3.

3.1.5 Qualitätskontrolle der Vorversuche

3.1.5.1 Schmelzkurvenanalyse der Vorversuche

Nach jeder qRT-PCR der Vorversuche 2.2.2.2, 2.2.2.3 und 2.2.2.4 wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Qualitätskontrolle durchgeführt, da das Signal der qRT-PCR nicht nur vom erwünschten Produkt, sondern auch durch eventuelle Primer-Dimere, Kontamination mit vorhandener Doppelstrang-DNA oder unspezifischen Amplifikaten beeinflusst wird (105,108). Um diese eventuell vorhandenen Störfaktoren

auszuschließen und ein valides Signal zu bekommen, wurden die Höhe, die Lage und die Anzahl der Scheitelpunkte untersucht. Eine Schmelzkurve mit einem einzigen Scheitelpunkt weist auf eine regelhaft gelaufene qRT-PCR hin. Nur die Ergebnisse wurden verwendet, bei denen die Analyse keine Anzeichen auf Nebenprodukte lieferte und von einer korrekten Durchführung ausgegangen werden konnte. War mehr als ein Scheitelpunkt zu sehen, wurde die Messung wiederholt. So wurden letztlich nur Ergebnisse von qRT-PCR-Durchläufen für die Vorversuche verwendet, bei denen die zugehörige Schmelzkurve keine Auffälligkeiten zeigte.

3.1.5.2 Agarosegele der Primerprodukte

Zur Qualitätskontrolle der Versuche sollte festgestellt werden, ob die Basenpaarlängen der Primerprodukte aus der qRT-PCR mit den Herstellerangaben übereinstimmen. Es sollte so sichergestellt werden, dass die Primer das korrekte Produkt, die cDNA des gewünschten Gens, amplifizieren, um einen systematischen Fehler in der Studie auszuschließen. Dazu wurden drei Agarosegele gemäß Kapitel 2.2.1.10 gegossen. Als Fluoreszenzfarbstoffe wurden Gel-Red™ RB bzw. Ethidiumbromid verwendet. Pro Gel wurden die cDNA-Amplifikate einer Patientenprobe aufgetragen. Folgende Primer wurden untersucht: ADAMTS5, ADAM17, CASP1, COX-2, GAPDH, IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-13, PRG4, TIMP-1 und TIMP-3. Abbildung 14 zeigt exemplarisch ein solches Agarosegel mit den Primerprodukten.

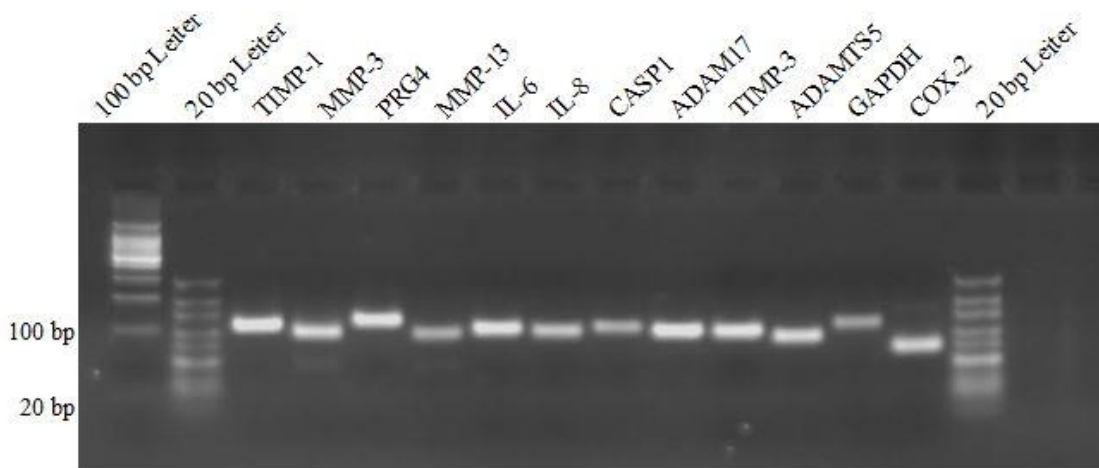


Abb. 14 Exemplarisches Agarosegel der untersuchten Primerprodukte. Ganz links sind zwei Leitern dargestellt. Dabei sind ausgewählte Banden mit der Basenpaarlänge versehen. Es folgen die untersuchten Primer. Als letztes folgt wieder eine Leiter. Die für die einzelnen Agarosegele verwendeten Primerprodukte stammen von einer Zellkultur eines jeweils anderen Patienten. „bp“: Basenpaare.

Tabelle 9 gibt die Basenpaare der Banden laut Hersteller an. Danach entsprechen die Banden im Agarosegel den Angaben des Herstellers hinsichtlich der Basenpaarlänge.

Name	QuantiTect® Primer Assay	Basenpaare des Produktes
ADAMTS5	Hs_ADAMTS5_1_SG	92 bp
ADAM17	Hs_ADAM17_1_SG	109 bp
CASP1	Hs_CASP1_1_SG	111 bp
COX-2	Hs_PTGS2_1_SG	68 bp
GAPDH	Hs_GAPDH_2_SG	119 bp
IL-6	Hs_IL-6_1_SG	107 bp
IL-8	Hs_IL-8_1_SG	102 bp
MMP-3	Hs_MMP-3_1_SG	84 bp
MMP-13	Hs_MMP-13_1_SG	97 bp
PRG4	Hs_PRG4_2_SG	127 bp
TIMP-1	Hs_TIMP-1_1_SG	115 bp
TIMP-3	Hs_TIMP-3_1_SG	105 bp

Tab. 9 Übersicht über die Primer und die Zahl der Basenpaare der Primerprodukte gemäß Herstellerangaben (Qiagen N.V.). „bp“: Basenpaare.

3.1.5.3 Mycoplasmentests der Zellkulturen

Zur Qualitätskontrolle der Vorversuche wurde das Nährmedium von zufällig ausgewählten Zellkulturen auf das Vorliegen von verschiedenen Mycoplasmen-Spezies geprüft (s. Kapitel 2.2.1.11). Es wurden insgesamt 8 Stichproben in den Vorversuchen entnommen. Bei keiner Probe wurde eine Kontamination mit Mycoplasmen nachgewiesen.

3.2 Hauptversuch

3.2.1 Ausgewertete Parameter

3.2.1.1 Zellzahl und Viabilität der synovialen Fibroblasten

Um zu prüfen, inwiefern Kollagenhydrolysate einen zytotoxischen oder proliferativen Einfluss auf synoviale Fibroblasten haben, wurden deren Zellzahl und Viabilität untersucht. Hierzu wurden 80.000 Zellen pro Well ausgesät und kultiviert. Der Versuch wurde nach Kapitel 2.2.3.2 in Gegenwart von jeweils 2,0 mg/ml Kollagenhydrolysat durchgeführt. Nach Versuchsende wurden die Zellen gemäß Kapitel 2.2.1.4 in einer Neubauerkammer in Gegenwart von Trypanblau ausgezählt und die Viabilität bestimmt.

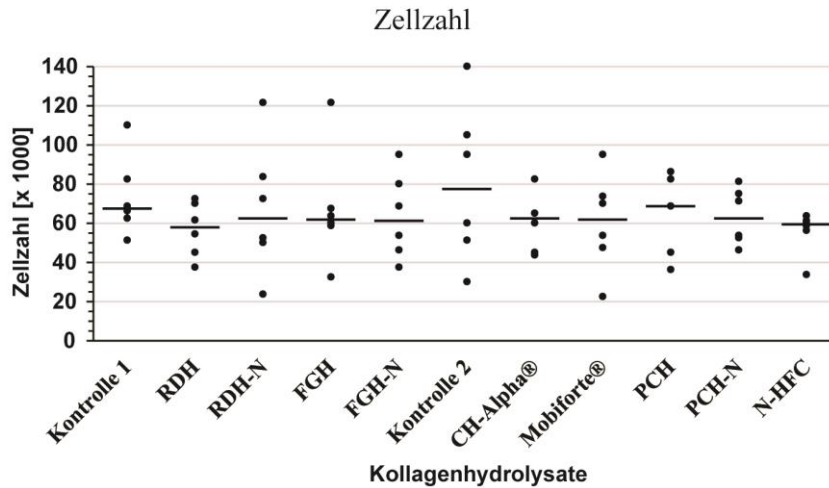


Abb. 15 Die Anzahl synovialer Fibroblasten nach Behandlung mit 2,0 mg/ml KH. Dargestellt sind die 6 Einzelwerte zu jedem Kollagenhydrolysat und den beiden Kontrollen sowie der zugehörige Median. Die Kollagenhydrolysate RDH, RDH-N, FGH und FGH-N wurden mit der Kontrolle 1, CH-Alpha®, Mobiforte®, PCH, PCH-N und N-HFC mit Kontrolle 2 verglichen.

Die Auswertung der Zellzählungen ist in Abbildung 15 dargestellt. Mit dem Wilcoxon-Test und anschließender Adjustierung mittels der False Discovery Rate wurden keine statistischen Auffälligkeiten zwischen den Kontrollen und den Kollagenhydrolysaten gefunden. Eine genaue Darstellung der Daten findet sich im tabellarischen Anhang.

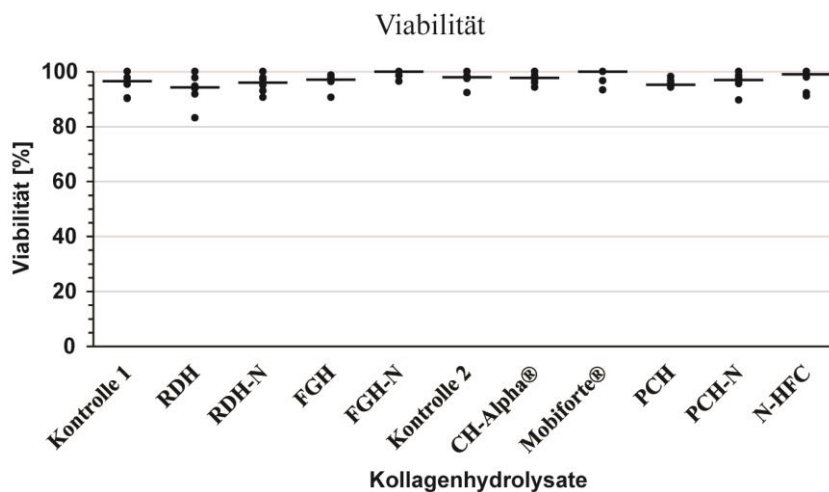


Abb. 16 Die Viabilität synovialer Fibroblasten nach Behandlung mit 2,0 mg/ml KH. Dargestellt sind jeweils die 6 Einzelwerte zu jedem Kollagenhydrolysat und den beiden Kontrollen sowie der zugehörige Median. Die Kollagenhydrolysate RDH, RDH-N, FGH und FGH-N wurden mit der Kontrolle 1, CH-Alpha®, Mobiforte®, PCH, PCH-N und N-HFC mit Kontrolle 2 verglichen.

Die Auswertung der Zellviabilität ist in Abbildung 16 dargestellt. Mit dem Wilcoxon-Test und anschließender Adjustierung mittels der False Discovery Rate wurden keine

statistischen Auffälligkeiten zwischen den Kontrollen und den Varianten mit den Kollagenhydrolysaten gefunden. Die Viabilität schwankte zwischen 94,3% und 100%. Eine genaue Darstellung der Daten findet sich im tabellarischen Anhang.

3.2.1.2 mRNA-Expression

Da Kollagenhydrolysate als Nahrungsergänzungsmittel zur unterstützenden Behandlung einer OA vertrieben werden, sollte deren Wirkung auf molekularer Ebene untersucht werden.

Primer	Zusatz	KH	Richtung der Regulation	Relative Änderung der mRNA-Expression ($2^{-\Delta\Delta C_t}$)	SD
ADAM17		Mobiforte®	↓	0,52	0,26
ADAM17		PCH	↓	0,35	0,31
ADAMTS5		PCH	↓	0,38	0,27
COX-2		RDH	↑	2,99	0,78
COX-2		CH-Alpha®	↓	0,6	0,26
COX-2		Mobiforte®	↓	0,65	0,24
IL-6		RDH	↑	17,4	36,2
IL-6		Mobiforte®	↑	2,18	1,4
IL-6		PCH-N	↑	12,3	8,47
IL-8		RDH	↑	214,15	424
IL-8		RDH-N	↑	22,25	29,2
IL-8		FGH-N	↑	14,1	16,1
IL-8		Mobiforte®	↑	5,45	4,14
IL-8		PCH-N	↑	23,52	21,1
MMP-3		RDH	↑	30,73	212
MMP-3		PCH-N	↑	3,56	5,07
MMP-13		Mobiforte®	↓	0,56	0,19
PRG4		Mobiforte®	↓	0,56	0,24
PRG4	IL-1β	CH-Alpha®	↑	2,56	93,5
TIMP-1	IL-1β	PCH-N	↑	1,19	0,58
TIMP-1	IL-1β	N-HFC	↑	1,31	0,15
TIMP-3		Mobiforte®	↓	0,4	0,19
TIMP-3		PCH	↓	0,45	0,34
TIMP-3		PCH-N	↓	0,56	0,19
TIMP-3		N-HFC	↓	0,36	0,29
TIMP-3	IL-1β	CH-Alpha®	↑	2,5	27,6

Tab. 10 Zusammenfassende Darstellung der auffälligen Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen den behandelten und unbehandelten Proben. Gemäß der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wird die relative n-fache Expression der behandelten Probe zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Werte größer 1 zeigen eine Stimulation an, Werte zwischen 0 und 1 entsprechen einer Hemmung (113). Der Hauptversuch wurde mit dem Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$ durchgeführt. Der p-Wert lag hier für alle Primer bei 0,0313. Nach dieser Testdurchführung erfolgte eine Adjustierung der Werte mittels der False Discovery Rate (FDR) von Benjamini und Hochberg (117). „KH“, Kollagenhydrolysat; „SD“, Standardabweichung; „↑“, Stimulation; „↓“, Hemmung.

Gefragt wurde nach dem Einfluss auf die Expression der mRNA von protektiv bzw. katabol wirkenden Enzymen und Entzündungsmediatoren in synovialen Fibroblasten. Ebenso sollte untersucht werden, ob Kollagenhydrolysate auch auf IL-1 β stimulierte synoviale Fibroblasten wirken. Hierzu wurden die Zellen zunächst an ein Nährmedium mit einem geringeren FCS-Anteil von 2% adaptiert und anschließend mit Kollagenhydrolysaten behandelt (s. Kapitel 2.2.3.2). Nach Extraktion und Analyse der RNA sowie der Herstellung der cDNA folgte die qRT-PCR gemäß Kapitel 2.2.1.7, 2.2.1.8 und 2.2.3.3. Die statistische Auswertung der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte erfolgte mit dem Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon und anschließender Adjustierung mittels der False Discovery Rate, wobei p-Werte $\leq 0,05$ als auffällig interpretiert wurden. Die NTC-Kontrollen zeigten keinen Ct-Wert unter 35. Tabelle 10 gibt eine Übersicht über auffällige Unterschiede in der mRNA-Expression zwischen behandelten und als Kontrolle dienenden unbehandelten synovialen Fibroblasten.

Im Folgenden sind jeweils die relativen mRNA-Expressionen der einzelnen Entzündungsmediatoren und Enzyme nach Behandlung mit den Kollagenhydrolysaten dargestellt. Eine Übersicht der Daten aus den Abbildungen findet sich im tabellarischen Anhang.

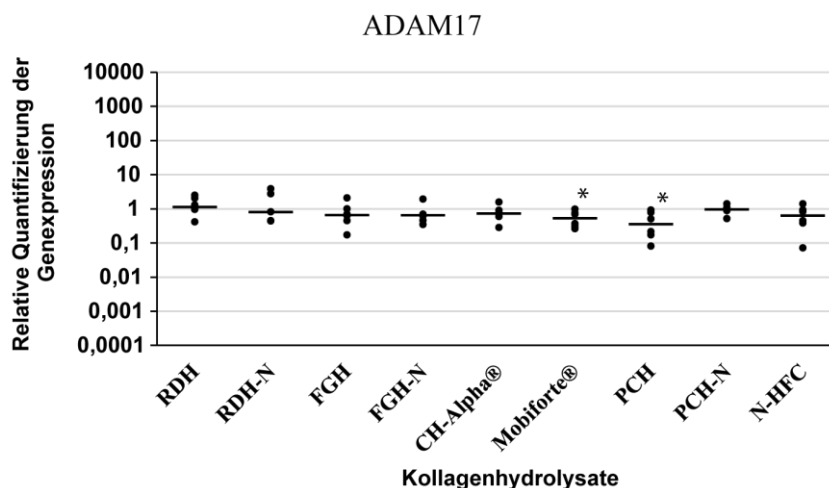


Abb. 17 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von ADAM17. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

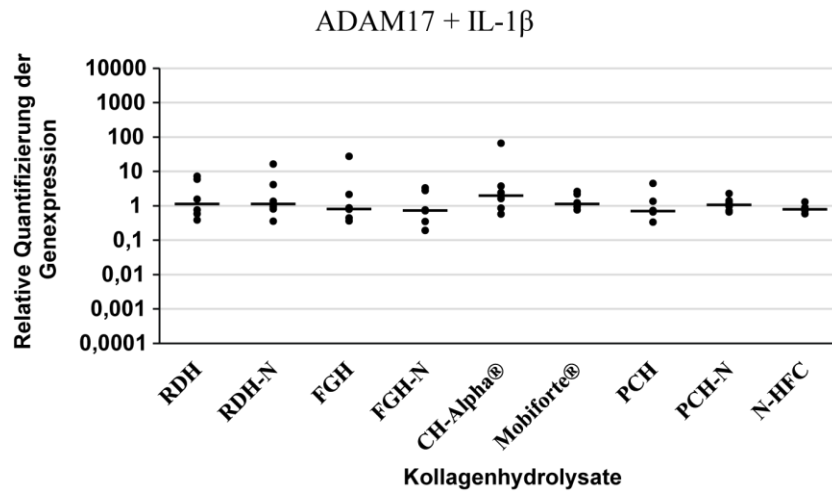


Abb. 18 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von ADAM17 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml.

Die Abbildungen 17 und 18 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von ADAM17. Diese Protease ist wesentlich an der Bildung des Zytokins TNF- α beteiligt, welches wiederum als ein zentraler Bestandteil für die Entzündung während einer OA verantwortlich gemacht wird (34,35). So zeigt sich bei Mobiforte® (Median: 0,52; SD: 0,26; p: 0,0313) und PCH (Median: 0,35; SD: 0,31; p: 0,0313) jeweils eine auffällige Hemmung der Expression von ADAM17. In Abbildung 18 ist zu erkennen, dass kein Kollagenhydrolysat eine auffällige Änderung der Expression von ADAM17 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten entfaltet.

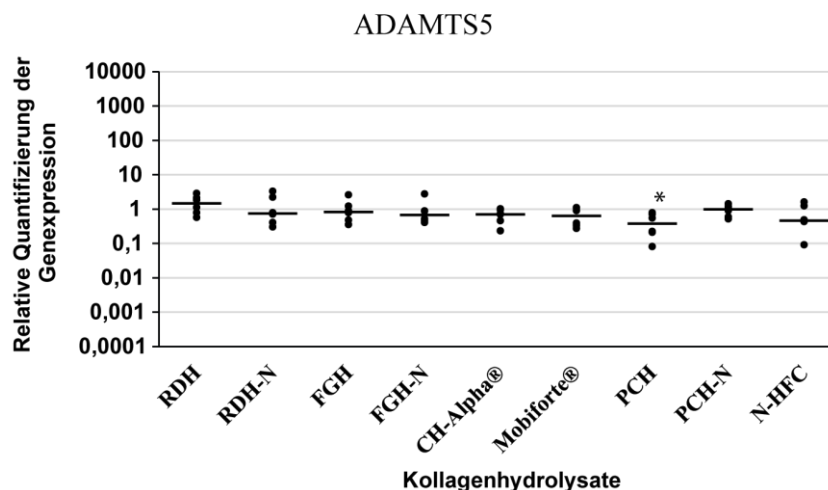


Abb. 19 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von ADAMTS5. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

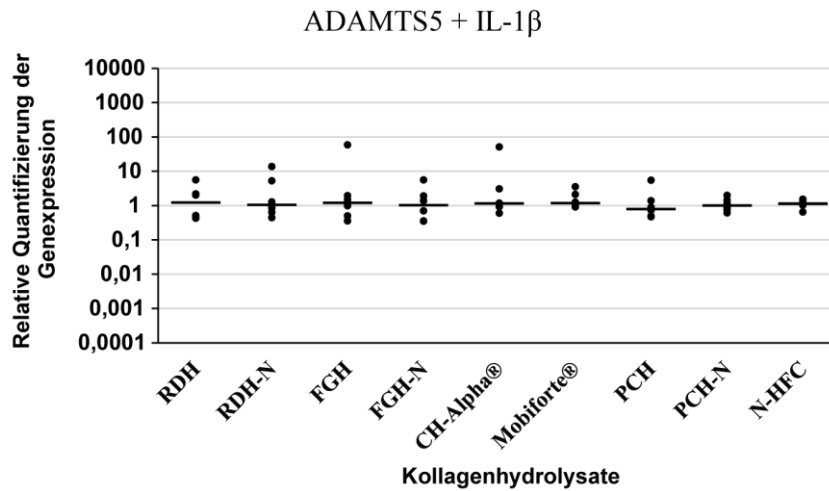


Abb. 20 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von ADAMTS5 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml.

Die Abbildungen 19 und 20 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression der Aggrekanase ADAMTS5. Das Enzym spaltet das für die Knorpelfunktion wichtige Molekül Aggrekan. In Abbildung 19 zeigt sich eine auffällige Hemmung von ADAMTS5 durch PCH (Median: 0,38; SD: 0,27; p: 0,0313). In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass kein Kollagenhydrolysat eine auffällige Änderung der Expression von ADAMTS5 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten bewirkt.

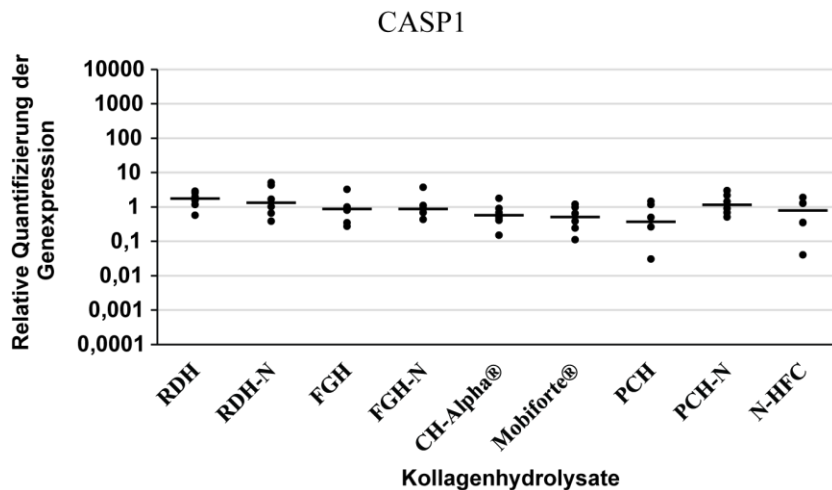


Abb. 21 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von CASP1. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml.

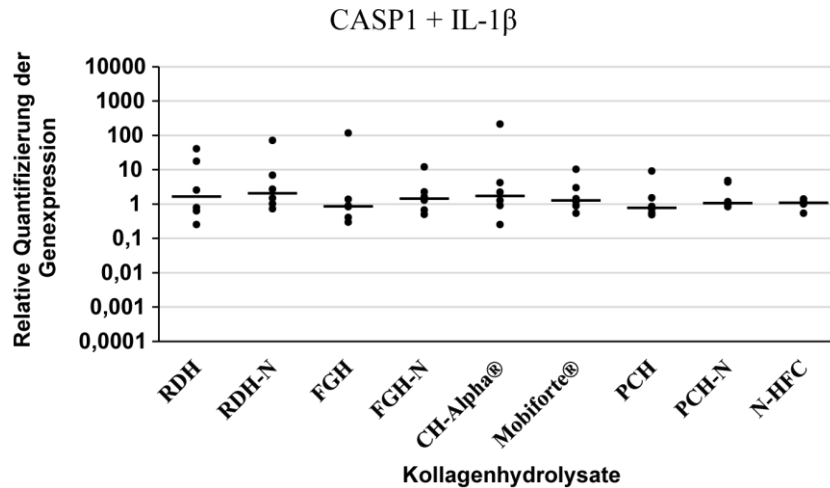


Abb. 22 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von CASP1 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml.

Die Abbildungen 21 und 22 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression des Enzyms Caspase-1. Dieses gilt als wichtiger Faktor in der Progredienz der OA, da es das proinflammatorische Zytokin IL-1 β in einem wichtigen Zwischenschritt prozessiert. In Abbildung 21 zeigt sich bei keinem Kollagenhydrolysat eine auffällige Wirkung auf die Änderung der Expression von CASP1. In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass kein Kollagenhydrolysat eine auffällige Änderung der Expression von CASP1 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten bewirkt.

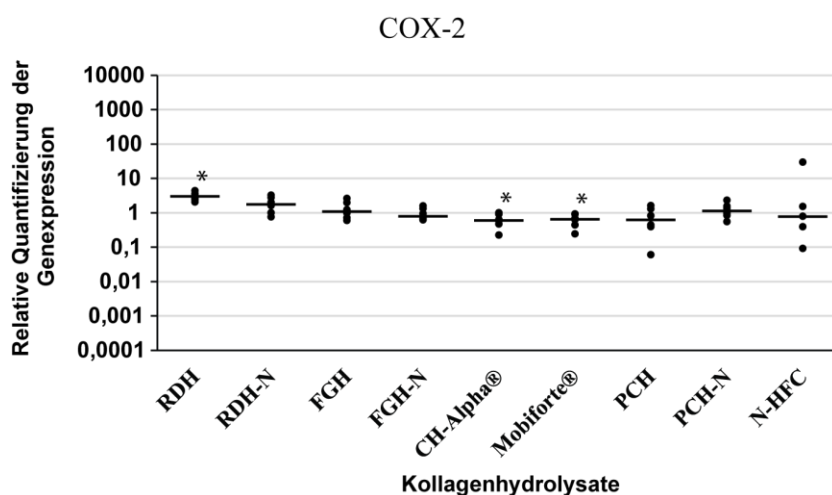


Abb. 23 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von COX-2. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

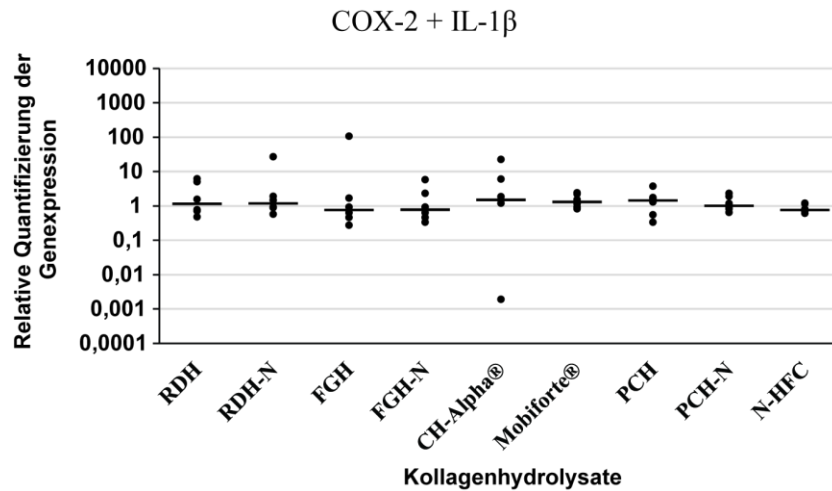


Abb. 24 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von COX-2 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml.

Die Abbildungen 23 und 24 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression des Enzyms COX-2, welches an der Bildung von PGE₂ beteiligt ist. In Abbildung 23 zeigt sich eine auffällige Stimulation von COX-2 durch RDH (Median: 2,99; SD: 0,78; p: 0,0313) sowie eine auffällige Hemmung durch CH-Alpha® (Median: 0,6; SD: 0,26; p: 0,0313) und Mobiforte® (Median: 0,65; SD: 0,24; p: 0,0313). In Abbildung 24 ist zu erkennen, dass kein Kollagenhydrolysat eine auffällige Änderung der Expression von COX-2 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten bewirkt.

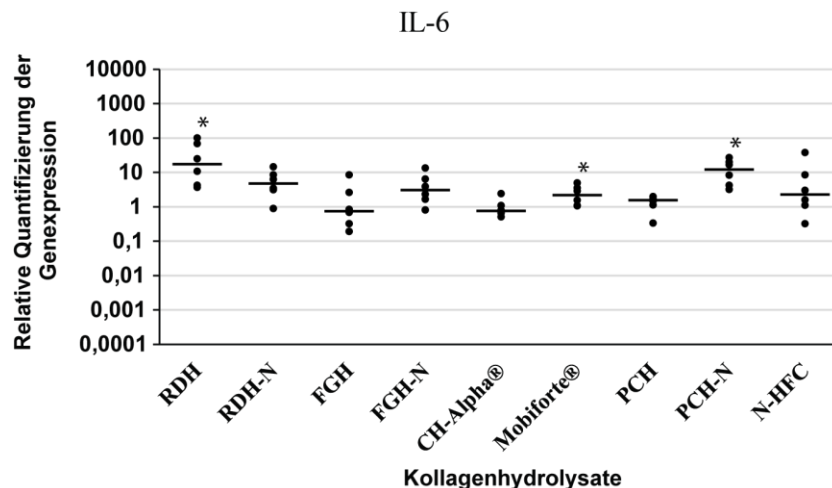


Abb. 25 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von IL-6. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

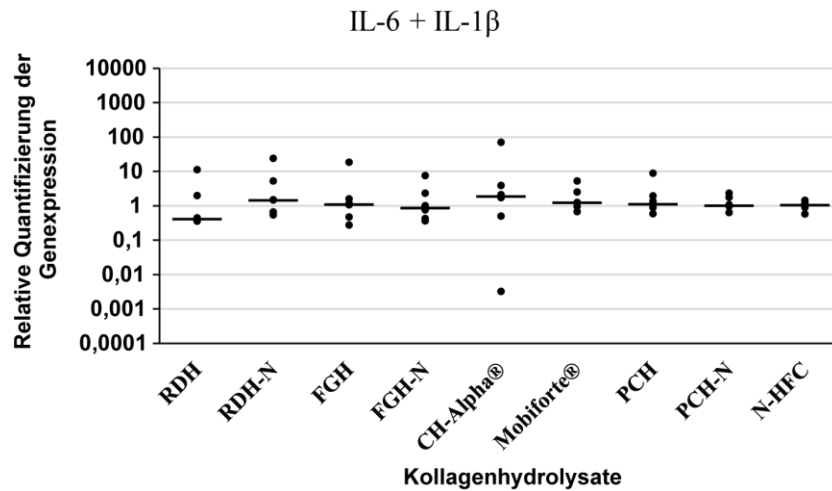


Abb. 26 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von IL-6 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml.

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von IL-6. Dieses gilt als Modulator der OA und besitzt eine dem IL-1 β ähnliche Wirkung (18). In Abbildung 25 zeigt sich eine auffällige Stimulation von IL-6 durch RDH (Median: 17,4; SD: 36,2; p: 0,0313), Mobiforte® (Median: 2,18; SD: 1,4; p: 0,0313) und PCH-N (Median: 12,3; SD: 8,47; p: 0,0313). In Abbildung 26 ist zu erkennen, dass kein Kollagenhydrolysat eine auffällige Änderung der Expression von IL-6 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten bewirkt.

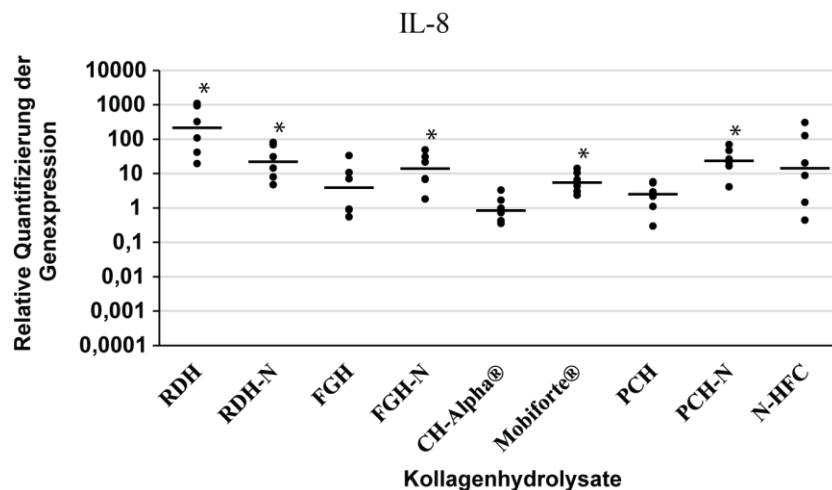


Abb. 27 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von IL-8. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

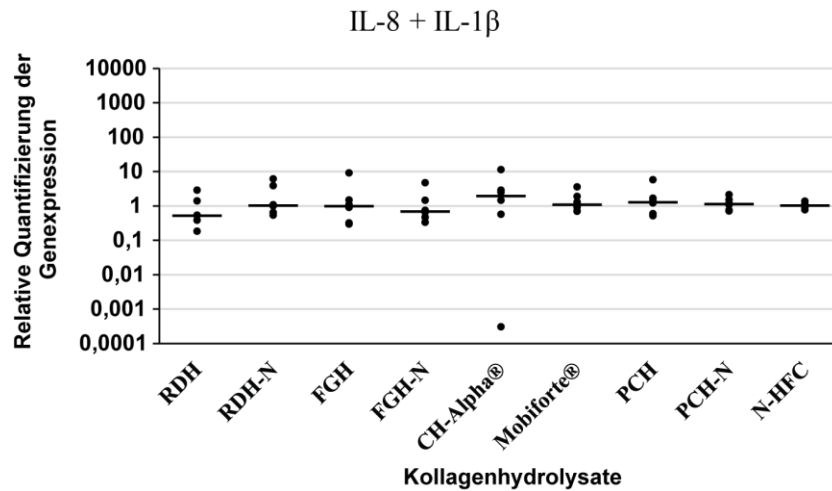


Abb. 28 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von IL-8 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml.

Die Abbildungen 27 und 28 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression des IL-8. Als wichtiger Modulator der OA kann es z.B. die Aktivität von TNF- α erhöhen (50). In Abbildung 27 zeigt sich eine auffällige Stimulation von IL-8 durch RDH (Median: 214,15; SD: 424; p: 0,0313), RDH-N (Median: 22,25; SD: 29,2; p: 0,0313), FGH-N (Median: 14,1; SD: 16,1; p: 0,0313), Mobiforte® (Median: 5,45; SD: 4,14; p: 0,0313) und PCH-N (Median: 23,52; SD: 21,1; p: 0,0313). In Abbildung 28 ist zu erkennen, dass kein Kollagenhydrolysat eine auffällige Änderung der Expression von IL-8 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten bewirkt.

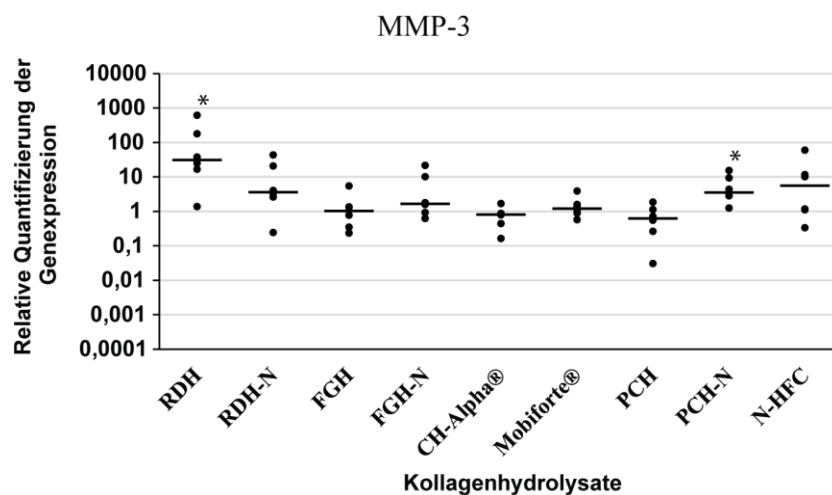


Abb. 29 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von MMP-3. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

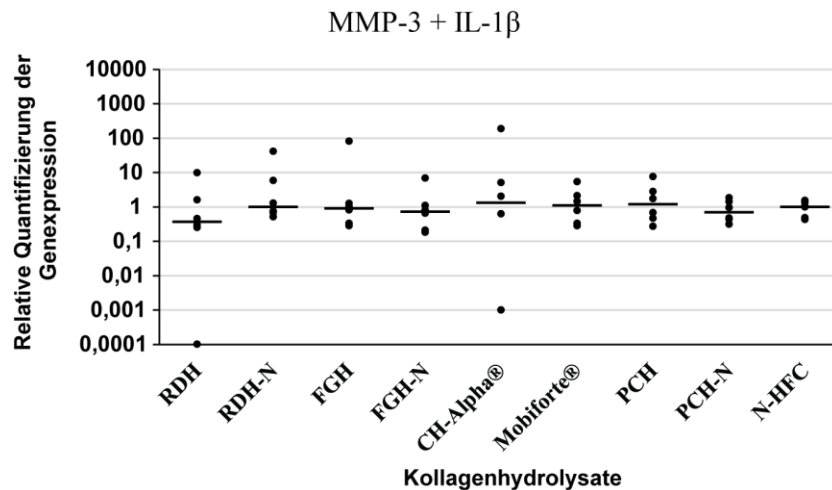


Abb. 30 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von MMP-3 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml.

Die Abbildungen 29 und 30 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression der Proteinase MMP-3. Dieses Enzym kann Proteine im Knorpel (z.B. Laminin, Proteoglykane oder entwundene Kollagene) spalten (67). In Abbildung 29 zeigt sich eine auffällige Stimulation von MMP-3 durch RDH (Median: 30,73; SD: 212; p: 0,0313) und PCH-N (Median: 3,56; SD: 5,07; p: 0,0313). In Abbildung 30 ist zu erkennen, dass kein Kollagenhydrolysat eine auffällige Änderung der Expression von MMP-3 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten bewirkt.

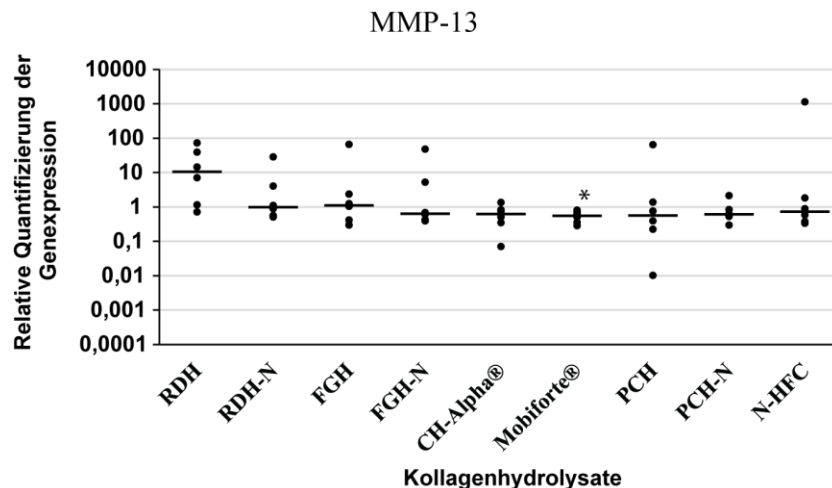


Abb. 31 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von MMP-13. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

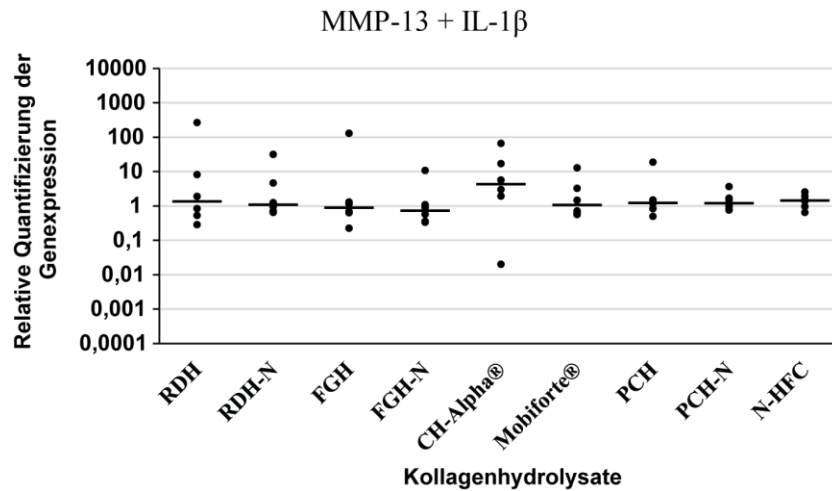


Abb. 32 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von MMP-13 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml.

Die Abbildungen 31 und 32 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression der Protease MMP-13. Unter allen matrixdegradierenden Enzymen besitzt es die höchste Affinität auf das strukturegebende Kollagen Typ II im Knorpel und ist damit wesentlich an dessen Um- bzw. Abbau beteiligt (66). In Abbildung 31 zeigt sich eine auffällige Hemmung durch Mobiforte® (Median: 0,56; SD: 0,19; p: 0,0313). Bei den weiteren Kollagenhydrolysaten wurde keine Auswirkung beobachtet. In Abbildung 32 ist zu erkennen, dass kein Kollagenhydrolysat eine auffällige Änderung der Expression von MMP-13 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten bewirkt.

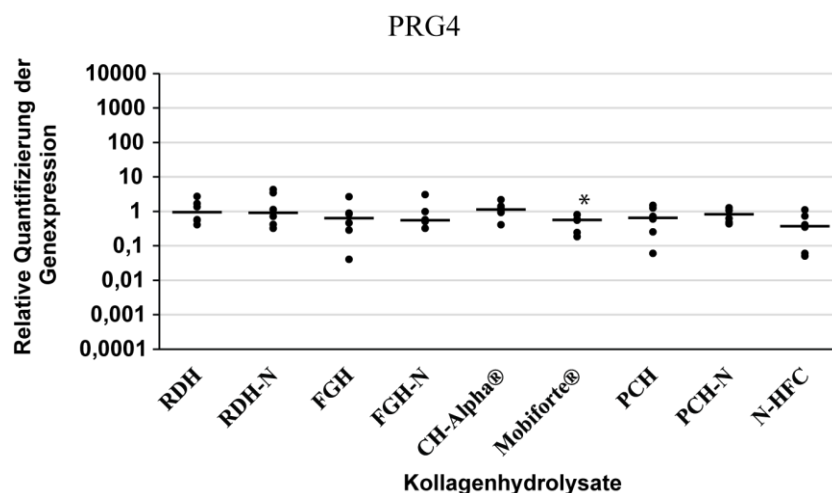


Abb. 33 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von PRG4. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

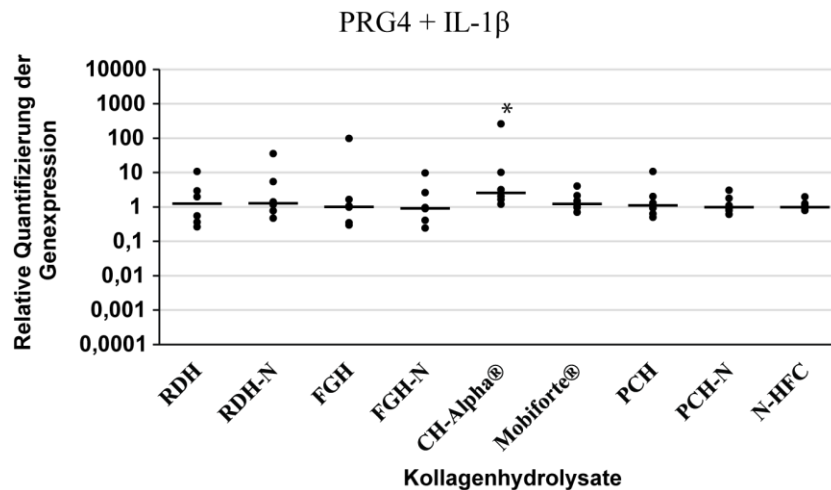


Abb. 34 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von PRG4 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

Die Abbildungen 33 und 34 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression des Proteoglykans PRG4. Es kommt in der Synovialflüssigkeit vor und trägt zur wesentlichen Minderung der Reibungskräfte zwischen den Gelenkbestandteilen bei (69). In Abbildung 33 zeigt sich eine auffällige Hemmung durch Mobiforte® (Median: 0,56; SD: 0,24; p: 0,0313). Die restlichen Kollagenhydrolysate zeigen dabei keine Auffälligkeit. In Abbildung 34 ist zu erkennen, dass CH-Alpha® zu einer auffälligen Stimulation von PRG4 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten führt (Median: 2,56; SD: 93,5; p: 0,0313).

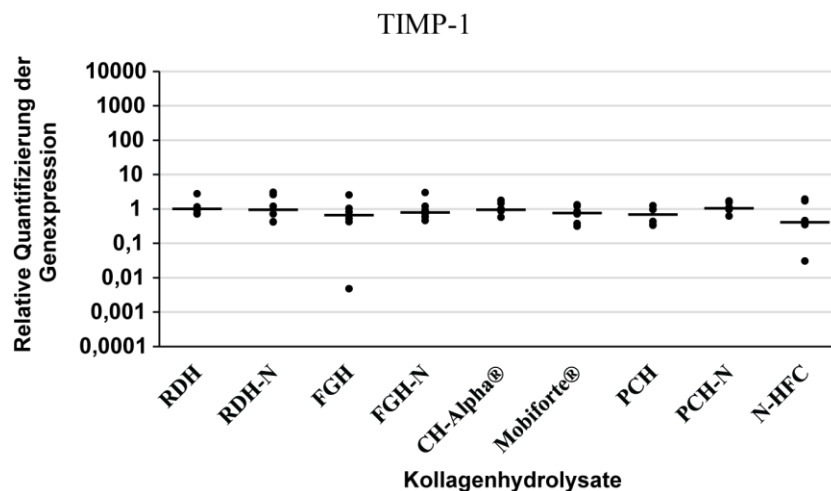


Abb. 35 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von TIMP-1. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml.

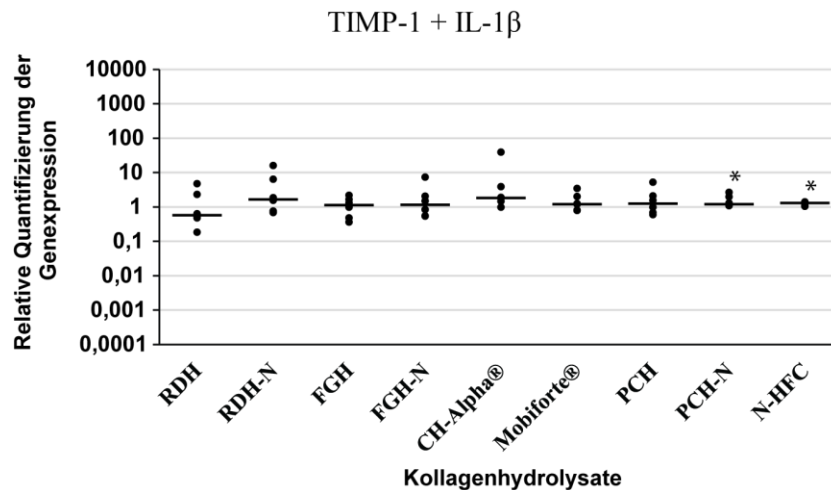


Abb. 36 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von TIMP-1 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

Die Abbildung 35 und 36 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression des Proteins TIMP-1. Dieses Protein inhibiert MMPs (73). In Abbildung 35 zeigt sich keine auffällige Regulation für TIMP-1 durch eines der verwendeten Kollagenhydrolysate. In Abbildung 36 ist zu erkennen, dass PCH-N (Median: 1,19; SD: 0,58; p: 0,0313) und N-HFC (Median: 1,13; SD: 0,15; p: 0,0313) zu einer auffälligen Stimulation von TIMP-1 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten führen.

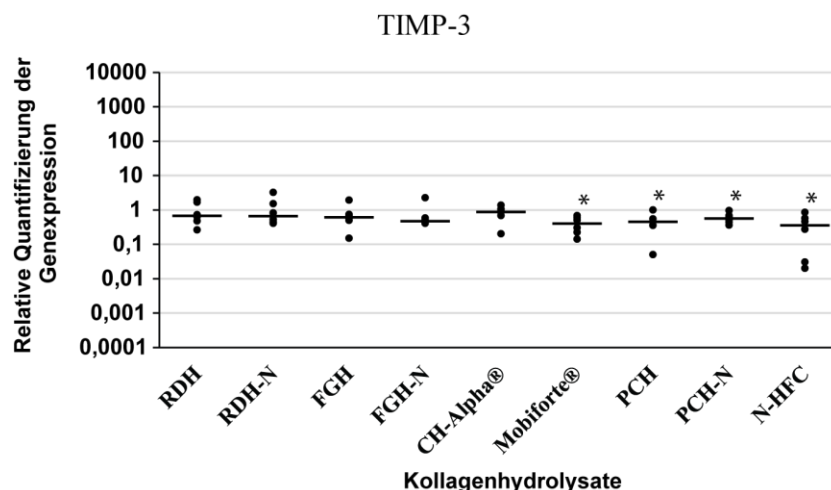


Abb. 37 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von TIMP-3. Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0 mg/ml. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

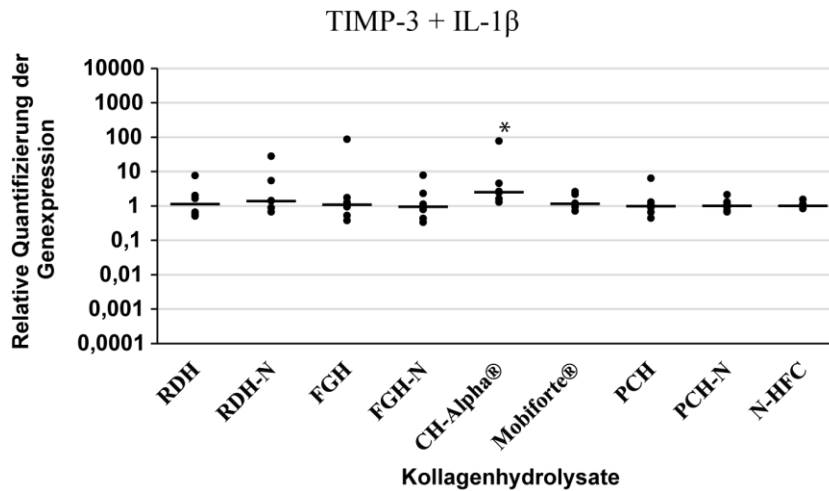


Abb. 38 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von TIMP-3 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β . Angegeben sind der Median und die einzelnen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte (n = 6). Die Konzentration der Kollagenhydrolysate betrug jeweils 2,0. „*“ auffälliger Unterschied zur unbehandelten Kontrolle gemäß Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon mit $p \leq 0,05$.

Die Abbildungen 37 und 38 zeigen die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression des Proteins TIMP-3. Dieses Protein inhibiert MMPs, ADAMs und ADAMTS (73). In Abbildung 37 zeigt sich eine auffällige Hemmung von TIMP-3 durch Mobiforte® (Median: 0,4; SD: 0,19; p: 0,0313), PCH (Median: 0,45; SD: 0,34; p: 0,0313), PCH-N (Median: 0,56; SD: 0,19; p: 0,0313) und N-HFC (Median: 0,36; SD: 0,29; p: 0,0313). In Abbildung 38 ist zu erkennen, dass CH-Alpha® zu einer auffälligen Stimulation von TIMP-3 in IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten führt (Median: 2,5; SD: 27,6; p: 0,0313).

3.2.1.3 Morphologische Veränderungen der synovialen Fibroblasten

Eine mögliche Wirkung von Kollagenhydrolysaten auf die Morphologie der synovialen Fibroblasten erfolgte deskriptiv an Hand von Kriterien gemäß Santangelo et al. Dazu wurden vor und nach der Adaption der synovialen Fibroblasten an 2% FCS-haltiges Medium sowie direkt nach Ende des Experiments die Zellen in 50- und 100-facher Vergrößerung fotografiert. Danach erfolgte die morphologische Auswertung der synovialen Fibroblasten (112), wobei die Werte von 0-4 reichten. Dem Wert 0 wurden demnach die Zellkulturen zugeordnet, wenn > 95% der Zellen am Boden liegend eine verzweigte Fibroblastenstruktur zeigten. Waren 5-25% der Zellen abgerundet oder vom Boden gelöst, wurde der Wert 1 zugeordnet. Der Wert 2 wurde bei 26-50% abgelösten Zellen, der Wert 3 bei 51-75% abgelösten Zellen und der Wert 4 bei mehr als 75% vom

Boden gelösten Zellen zugeordnet. Vor und nach Adaptation an ein verändertes Nährmedium konnte jeder behandelten und unbehandelten Probe eine Bewertung von 0 zugewiesen werden. In der folgenden Abbildung sind die morphologischen Bewertungen der Zellen der 5 Patientenproben nach Versuchsende abgebildet. Eine genaue Übersicht der Daten findet sich im tabellarischen Anhang.

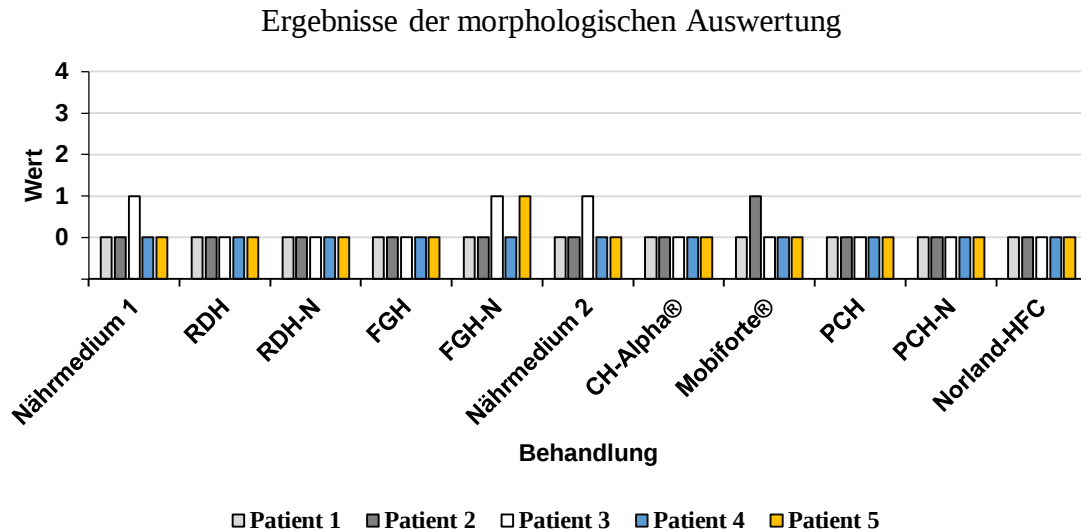


Abb. 39 Morphologische Bewertung der synovialen Fibroblasten von fünf Patienten nach Behandlung mit Kollagenhydrolysaten. Die Auswertung erfolgte nach Santangelo et al. 2007 (112). Die Einteilung der Morphologie erfolgte in die Werte 0-4. Ein höherer Wert steht dabei für eine größere morphologische Veränderung und deutet auf einen höheren Zellstress hin. Nährmedium 1 und Nährmedium 2 sind in der Zusammensetzung identisch.

Die morphologische Bewertung ergab, dass die synovialen Fibroblasten nach Versuchsende mehrheitlich keine morphologischen Veränderungen aufwiesen (Abbildung 39).

3.2.2 Qualitätskontrolle

3.2.2.1 A260/A280-Quotient

Der A260/A280-Quotient ist ein Maß für die Reinheit der RNA, wobei jede RNA-Lösung vor dem Umschreiben der mRNA in cDNA auf ihre Reinheit hin analysiert wurde (s. Kapitel 2.2.1.6). Hierzu wurde das Absorptionsverhalten der RNA-Lösung bei den Wellenlängen 260 und 280 nm gemessen. Abbildung 40 zeigt eine hohe Schwankungsbreite in der Reinheit der RNA. Es wurden alle Proben für die qRT-PCR verwendet. Die einzelnen Messergebnisse sind im tabellarischen Anhang in den Tabellen 11.3.2.1.1-11.3.2.1.4 dargestellt.

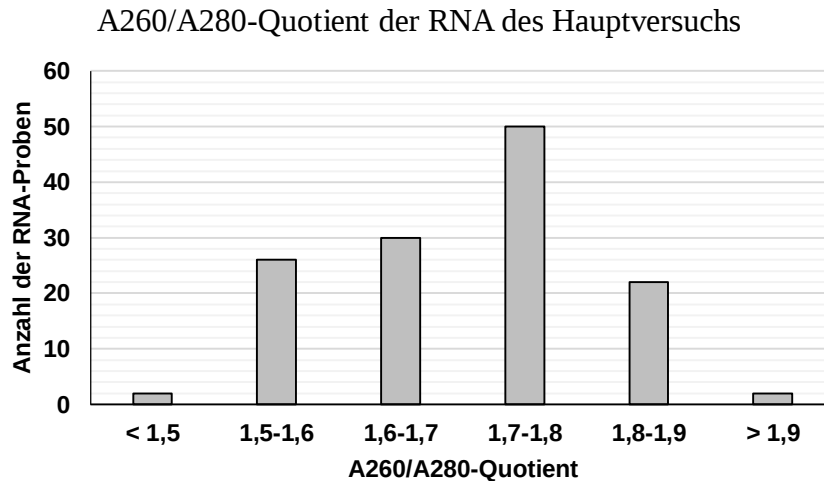


Abb. 40 Der A260/A280-Quotient der RNA-Proben aus dem Hauptversuch. Die Messung erfolgte für jede Probe einmal. Insgesamt erfolgten 132 Einzelmessungen.

3.2.2.2 RNA-Gehalt

Der RNA-Gehalt wurde bestimmt, um die benötigte Menge RNA bzw. mRNA für die cDNA-Synthese zu errechnen und um auffällige $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte im Hauptversuch auf ungewöhnliche RNA-Mengen im Vorfeld zu überprüfen. Der RNA-Gehalt wurde nach Kapitel 2.2.1.6 pro Probe einmal mit dem BioPhotometer® oder dem NanoDrop® 1000 Spectrophotometer analysiert. Die gemessenen Werte wurden mit dem Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon und anschließender Adjustierung mit der FDR ausgewertet. Es wurden dabei die behandelten Varianten gegen die unbehandelten Kontrollen getestet. Es zeigten sich jedoch keine auffälligen Unterschiede im RNA-Gehalt zwischen den Proben und den Kontrollen. Die einzelnen Messergebnisse sind im tabellarischen Anhang in den Tabellen 11.3.2.2.1-11.3.2.2.4 dargestellt.

3.2.2.3 Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie, bzw. FACS®-Analyse, wurde geprüft, inwiefern es sich bei den genutzten Zellen um synoviale Fibroblasten handelte und ob noch andere Zellen in den Kulturen vorhanden waren. Es wurden die Zellen von 5 verschiedenen Patienten aus dem Hauptversuch untersucht. Die Analyse erfolgte nach Kapitel 2.2.1.12. Der Anteil der synovialen Fibroblasten an der Gesamtpopulation der Zellen lag immer bei $> 90\%$. Somit war sichergestellt, dass die Kollagenhydrolysate auf synoviale Fibroblasten und nicht auf andere Zellen getestet wurden.

3.2.2.4 Mycoplasmentest

Zur Qualitätskontrolle des Hauptversuchs wurde das Nährmedium der Zellkulturen auf das Vorliegen von Mycoplasmen, wie in Kapitel 2.2.1.11 beschrieben, geprüft. Pro Patient des Hauptversuchs wurde eine Probe aus einer zufällig ausgewählten Zellkultur genommen und der Mycoplasmentest durchgeführt. Wir konnten bei keiner Probe eine Kontamination mit Mycoplasmen nachweisen.

3.2.2.5 Schmelzkurvenanalyse der qRT-PCR des Hauptversuchs

Nach jeder qRT-PCR wurde eine Schmelzkurvenanalyse zur Qualitätskontrolle durchgeführt. Das detektierte Signal der qRT-PCR wird nicht nur vom erwünschten Produkt, sondern auch durch eventuelle Primer-Dimere, Kontamination mit vorhandener Doppelstrang-DNA oder unspezifische Amplifikate beeinflusst (105,108). Die Ergebnisse konnten verwendet werden, wenn die Analyse keine Anzeichen auf Nebenprodukte lieferte und so von einer korrekten Versuchsdurchführung ausgegangen werden durfte. War das nicht der Fall, musste der Versuch wiederholt werden. Dies wurde allerdings nicht notwendig. So wurden letztlich nur Ergebnisse von qRT-PCR-Durchläufen für den Hauptversuch verwendet, bei denen die zugehörige Schmelzkurve keine Auffälligkeiten zeigte.

4 Diskussion

Da die OA als unheilbare Erkrankung gilt, sind die Behandlungsziele nach den aktuellen Richtlinien der Osteoarthritis Research Society International (78) von 2014 die Symptumlinderung mit einer Schmerzreduktion und Verbesserung der allgemeinen Beweglichkeit sowie eine Erhöhung der Lebensqualität (8,78). Dazu werden präventionsmedizinische Maßnahmen, z.B. Gewichtsabnahme oder gelenkschonendes Arbeiten, Medikamente wie z.B. NSAIDs und SADOAs oder in fortgeschrittenen Stadien chirurgische Interventionen wie z.B. eine Knie-TEP eingesetzt. Auch supplementäre Behandlungsmethoden, z.B. Nahrungsergänzungsmittel, die u.a. chondroprotektiv wirken sollen, werden immer häufiger genutzt (80,81). Für Nahrungsergänzungsmittel gibt es eine EU-Verordnung, die wissenschaftliche Wirksamkeitsnachweise vorschreibt, wenn mit medizinischen Wirkungen von Lebensmitteln geworben werden soll (s. 1.3.3) (82). Ein Beispiel für solche Produkte sind die Kollagenhydrolysate. In diversen *in vitro*- (83,85–92), tierexperimentellen- (93–97) und humanen *in vivo*-Studien (81,98–103) wurde deren Wirkung untersucht (s. Kapitel 1.3.3.1). Auf Grund uneinheitlicher Studienlage gestaltet sich jedoch die Bewertung der Kollagenhydrolysate im Hinblick auf den medizinischen Nutzen als schwierig.

So existiert bislang keine Studie, die den Einfluss von Kollagenhydrolysaten auf die Expression von Enzymen und Metaboliten in synovialen Fibroblasten ausführlich untersucht. Diese explorative Arbeit prüft daher auf der mRNA-Ebene die Wirkung von 9 ausgewählten Kollagenhydrolysaten auf die synoviale Expression von 11 für die Pathogenese der OA wichtigen Enzymen und Metaboliten. Die relative mRNA-Expression der Enzyme und Metaboliten wurde mittels der qRT-PCR bestimmt. Weitere ausgewertete Parameter waren die Zellzahl, die Zellviabilität sowie eine mögliche morphologische Veränderung der synovialen Fibroblasten.

4.1 Statistik

Der Vorzeichen-Rang-Test nach Wilcoxon wurde für die statistische Auswertung gewählt, da eine Normalverteilung bei der geringen Stichprobe nicht anzunehmen war. Auf Grund der hohen Zahl an Messuntersuchungen, die an einer einzelnen Probe vorgenommen wurde und der daraus resultierenden Alphafehler-Kumulierung, mussten

die Ergebnisse nach der Auswertung mit dem Vorzeichen-Rang-Tests noch adjustiert werden. Dies geschah mittels der False Discovery Rate (FDR) nach Benjamini und Hochberg (117). Durch die FDR wird die Irrtumswahrscheinlichkeit herabgesetzt, indem die p-Werte erhöht werden (117). Das Problem der Alphafehler-Kumulierung bleibt trotz der Adjustierung weiterhin bestehen. Wir bezeichnen die Daten aus dem Hauptversuch deswegen auf einem Niveau von $p \leq 0,05$ im Wilcoxon-Test in einem explorativen Setting als auffällig und nicht als signifikant. Da wir auf Grund der geringen Stichprobe die Normalverteilung nicht annehmen konnten, ist möglicherweise auch die Verallgemeinerung der Ergebnisse nur eingeschränkt möglich.

4.2 Vorversuche

Zur Minimierung interindividueller Unterschiede erfolgte die Auswahl von Patientenproben nach strengen Ein- und Ausschlusskriterien (s. Tabellarischer Anhang). So waren Operationen, Traumata oder andere Faktoren, die einen direkten physischen Einfluss auf das Gelenk ausüben könnten, generell ausgeschlossen, da physische Irritationen den lokalen Metabolismus beeinflussen können (10). Patienten mit schweren Funktionsstörungen der Leber oder Niere sowie mit immunmodulatorischen oder chronisch systemischen Erkrankungen wie z.B. HIV-Infektionen, Diabetes Mellitus oder auch Drogenabusus oder mit bestimmten Medikamenten, haben wir aus demselben Grund ausgeschlossen (9–11). Lokale Prozesse wie akute Entzündungen oder die Applikation von Hyaluronsäure in das Gelenk waren ebenfalls auf Grund dieser Überlegungen ein Ausschlusskriterium.

Der Versuch „Bestimmung der optimalen FCS-Menge im Nährmedium“ konnte ein Optimum von 2% FCS im Nährmedium zeigen. Für den Versuch sollten die Zellen in einen *in vivo* ähnelnden Proliferationsstopp übergehen. Dabei haben wir festgestellt, dass ein FCS-Gehalt von 0% im Medium nicht für ein Äquilibrium der Zellhomöostase ausreicht. Die Parameter Zellzahl, Viabilität, RNA-Gehalt und Reinheit der RNA ließen zunächst keine Entscheidung zwischen den Varianten 1% und 2% FCS-Gehalt zu. Wohl aber konnten wir an Hand der Daten die Variante mit 0% FCS-Gehalt ausschließen, da deren Werte deutlich unter denen bei 1% und 2% FCS-Gehalt lagen. Ausschlaggebend für die Entscheidung für die Variante mit 2% FCS war zuletzt die morphologische Auswertung der Zellen in den Fotografien. In der Behandlungsreihe mit 2% FCS-Gehalt

wurde immer der Wert 0, was nach Santangelo et al. (112) einer gesunden Zellpopulation entspricht, zugeordnet. Der 1%-FCS-Reihe musste der Wert 1 zugeordnet werden.

Der Versuch „Vergleich zweier Methoden zur RNA-Extraktion“ zeigte keine eindeutigen Vorteile für eine der beiden Methoden. Im Labor war bereits die RNA-Extraktionsmethode nach TriFast™ etabliert. Mit ihr ist es möglich, RNA, Proteine und DNA aus den Zellen zu extrahieren. Eine alternative Variante war RNeasy®, die nur mRNA extrahiert. Die rein deskriptive Auswertung der RNA-Reinheit zeigte für RNeasy® höhere Werte. Die niedrigeren Werte von TriFast™ erklären wir mit dessen explizit beworbenen Wirkprinzip der dreifachen Auftrennung, bei dem durch die zusätzlichen Pipettierungsschritte DNA oder Proteine in der Phase mit der RNA zurückbleiben könnten. Wir konnten keine statistischen Unterschiede zwischen beiden Methoden während der Effizienzbestimmung der Primer mittels der qRT-PCR feststellen. Die Schmelzkurven zeigten an, dass die Durchführung der qRT-PCR jeweils einwandfrei funktionierte. Auch zeigte die Analyse des RNA-Gehalts keine Unterschiede. Da ein Vorteil von TriFast™ die mögliche zusätzliche Extraktion von Proteinen und DNA ist, und diese in weiterführenden Studien genutzt werden können, es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Extraktionsmethoden gab und die Schmelzkurven zeigten, dass auch die Methode nach TriFast™ einen für die qRT-PCR ausreichenden Reinheitsgrad der RNA erzeugt, entschieden wir uns für TriFast™.

Der Versuch „Effizienzbestimmung der Primer“ zeigte, dass alle ausgewählten Primer eine ausreichende Amplifizierungseffizienz von mehr als 90% besaßen. Damit eine relative Quantifizierung der mRNA-Expression mit den Messergebnissen aus der qRT-PCR stattfinden konnte, mussten die genutzten Primer dieses genannte Kriterium erfüllen (105,113). Dabei betrachteten wir in Anlehnung an Wang et al. 2006 (114) das arithmetische Mittel der Triplikate um statistische und messtechnische Schwankungen zu berücksichtigen. Effizienzen über 100% konnten ungünstige Milieubedingungen anzeigen. Trat dieser Fall ein, wurde der Versuchsansatz kritisch überarbeitet, wobei Abweichungen bis ca. 110%, je nach Literaturquelle, noch akzeptiert und in diesem Fall pauschal als 100% gewertet wurden (105,113,114).

In dem Versuch „Wahl des Referenzgens“ entschieden wir uns für den Primer GAPDH. Für die Auswertung der qRT-PCR war ein Referenzgen notwendig, um die Ergebnisse mit Hilfe der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode vergleichbar zu machen (s. Kapitel 2.2.3.4) (105). Wir untersuchten die Primer GAPDH, ACTB und B2M für die entsprechenden Gene. Die Daten wurden mit dem Wilcoxon-Test und anschließender Adjustierung mittels FDR geprüft. Wir konnten keine statistisch auffälligen Unterschiede feststellen. Wir wählten daraufhin das im Labor bereits bekannte *GAPDH* als Referenzgen aus. *GAPDH* ist eines der am häufigsten genutzten Referenzgene und zeigt eine ausgeprägte Expressionsstabilität in den Geweben (105,118).

Wir führten an den Vorversuchen intensive Qualitätskontrollen durch. Mit der „Schmelzkurvenanalyse der Vorversuche“ konnte ausgeschlossen werden, dass Störfaktoren während der qRT-PCR vorlagen. Zeigte eine Schmelzkurve Auffälligkeiten, z.B. in Form von mehreren Scheitelpunkten, wurde die qRT-PCR wiederholt. Der exakte Schmelzpunkt des Amplifikates ist dabei u.a. abhängig von der Anzahl seiner Basenpaare, der Lösungsmittelzusammensetzung und der Konzentration des Farbstoffs. Eine genaue Ursachenzuordnung von etwaigen weiteren Scheitelpunkten, z.B. Primer-Dimere, Verunreinigungen oder genomische DNA, ist dabei an Hand der Schmelzkurve nicht möglich (108,109). Die „Agarosegele der Primerprodukte“ zeigten jeweils die Basenpaarlängen der Amplifikate an, die den Herstellerangaben entsprachen. Somit konnten wir sicher sein, dass durch die qRT-PCR die erwarteten Produkte entstanden sind und sich die Interpretationen und Schlussfolgerungen des Hauptversuchs auf die richtigen Gene beziehen (116). Die „Mycoplasmentests der Zellkulturen“ zeigten keine Verunreinigung mit Mycoplasmaspezies an. Daher konnte ein Einfluss auf die mRNA-Expression der synovialen Fibroblasten durch eine derartige Kontamination ausgeschlossen werden (110).

4.3 Qualitätskontrolle und Methodik des Hauptversuchs

Im Hauptversuch wurden ebenfalls intensive Qualitätskontrollen durchgeführt. In Kapitel 3.2.2. werden diese Ergebnisse dargestellt.

Der RNA A260/A280-Quotient ist ein Maß für die Reinheit des Substrats. Optimalerweise sollte der Wert gegen 2 gehen (105,116). Wir akzeptierten für unsere

Versuche Werte von mindestens 1,4 oder größer (s. „Vergleich zweier Methoden zur RNA-Extraktion“). Die Messergebnisse sind im tabellarischen Anhang dargestellt. Die hohe Zahl an vergleichsweise niedrigen Werten zwischen 1,4 und 1,7 erklären wir mit dem Wirkprinzip von TriFast™, welches RNA, DNA und Proteine aus den Zellen extrahiert. Dabei könnten, wie bereits diskutiert, durch die zusätzlichen Pipettierungsschritte DNA oder Proteine in der Phase mit der RNA zurückbleiben (s. dazu auch Kapitel 4.2). Eine verunreinigte Probe kann bei der weiteren Verwendung für die reverse Transkription unpräzise qRT-PCR-Ergebnisse liefern (105). An Hand der gründlichen Prüfung des jeweiligen Versuchsablaufs mittels der Schmelzkurvenanalyse konnten wir aber zeigen, dass sich ein niedrigerer A260/A280-Quotient nicht auf die Qualität unserer qRT-PCR-Messungen ausgewirkt hat.

Der RNA-Gehalt wurde einerseits untersucht, um daraus die benötigte Menge RNA für die cDNA-Synthese zu bestimmen. Andererseits konnten wir kontrollieren, ob bei auffälligen $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werten bzw. p-Werten im Hauptversuch auffällige RNA-Mengen im Vorfeld vorhanden waren. Geringere RNA-Konzentrationen könnten z.B. zu Ungenauigkeiten beim Pipettieren geführt haben. Wir konnten keine statistisch auffälligen Unterschiede in den RNA-Konzentrationen zwischen den Varianten und den Kontrollen feststellen.

Es wurden 5 Patientenproben mittels der Durchflusszytometrie bzw. der FACS®-Untersuchung analysiert. Alle Tests konnten zeigen, dass es sich bei den genutzten Zellen um Fibroblasten handelte. Eine Probe wurde nicht untersucht. Hier ist demnach nicht auszuschließen, dass es sich auch um andere Zellen handeln könnte. Die bildmorphologische Auswertung nach Santangelo et al. (112) legt aber nahe, dass auch hier Fibroblasten verwendet wurden. Die Durchflusszytometrie ist ein sehr etabliertes und weit verbreitetes Verfahren (111). Zu den möglichen Fehlerquellen gehören der manuell festzulegende Auswahlbereich der zu messenden Zellen, und dass häufig die Versuchs-Assays nicht standardisiert sind (111). Beide Fehlerquellen können dazu führen, dass sich die Aussagekraft der Messungen verringert. Die Durchführung der Durchflusszytometrie und das Vermeiden der genannten Fehler sind daher sehr erfahrungs- und prozessabhängig. Mit dem Infektionslabor der Medizinischen Klinik und Poliklinik II des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH wurden die Versuche von einem sehr erfahrenen Team durchgeführt, welches regelmäßig

Durchflusszytometrien mit genau unserer Fragestellung bearbeitet und dazu standardisierte Abläufe benutzt.

Weiterhin wurden Mycoplasmentests bei allen 6 Patientenproben durchgeführt. Diese zeigten keine Kontamination an (110). Ebenso wurde nach jeder qRT-PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Der Versuch wurde nur akzeptiert, wenn ein klarer Scheitelpunkt in der Schmelzkurve zu sehen war, ansonsten wurde er wiederholt (108,109).

Der Hauptversuch wurde in Kapitel 3.2.1. ausgewertet. Insgesamt wurden 9 verschiedene Kollagenhydrolysate untersucht. Deren Auswahl erfolgte unter anderem in Anlehnung an zwei Studien von Schadow et al. aus unserem Labor (83,92). Darin wurden die Kollagenhydrolysate RDH, RDH-N und CH-Alpha® (92) bzw. FGH, FGH-N und Mobiforte® (83) verwendet. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Studie die Kollagenhydrolysate PCH, PCH-N und Norland-HFC ausgewählt. Bei PCH und PCH-N handelt es sich um porkine Kollagenhydrolysate, die wie RDH, RDH-N, FGH und FGH-N von der Firma Rousselot SAS hergestellt werden. Neuere Bezeichnungen für die Kollagenhydrolysate von Rousselot SAS sind Peptan™ F 5000 und 2000 für FGH und FGH-N, Peptan™ P 5000 und 2000 für PCH und PCH-N sowie Peptan™ B 5000 und 2000 für RDH und RDH-N. Norland-HFC wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Siebert et al. gewählt (89,91). Eine Übersicht über die genutzten Kollagenhydrolysate findet sich in Tabelle 5 in Kapitel 2.1.7. Alle Substanzen unterscheiden sich in der tierischen Herkunft und der mittleren Größe der Moleküle. Die Endkonzentration der Kollagenhydrolysate betrug dabei 2,0 mg/ml Nährmedium. In den eingangs zitierten Studien wurden vor allem Konzentrationen im Bereich von 0-10 mg/ml verwendet. Wir wählten in Anlehnung an die Arbeit von Schadow et al. (92) von 2013 eine Konzentration von 2,0 mg/ml. Weiterhin fügten wir in einer zweiten Versuchsreihe den Kollagenhydrolysaten jeweils IL-1 β in einer Konzentration von 10 ng/ml Nährmedium hinzu, um eine Inflammation der Zellen, wie sie im Rahmen der OA vorkommt, zu simulieren (36,46,56). Wir erwarteten hier eine global erhöhte Expression der Enzyme und Metaboliten, die durch die Kollagenhydrolysate nur wenig verändert werden würde. Die Zahl und Viabilität der synovialen Fibroblasten wurden nach Kapitel 2.2.1.4 ausgewertet. Eine mögliche Fehlerquelle liegt hier in der Verarbeitung der Zellen und deren Überführung in die Neubauerkammer. Bei relativ geringer Zellzahl könnten

bereits geringe Abweichungen die Ergebnisse verzerren. Wie alle Pipettierungsschritte sind diese Punkte erfahrungs- und übungsabhängig.

Die relative mRNA-Expression der Enzyme und Metaboliten wurde mittels der qRT-PCR bestimmt (105,116). Bei der qRT-PCR handelt es sich um ein etabliertes und sensibles Verfahren, welches bei korrekter Durchführung valide und zuverlässige Daten liefert. Sie wurde 1992 von Higuchi et al. (106) als Modifizierung der ursprünglichen PCR (107) entwickelt. Der Messerfolg ergibt sich aus allgemeinen messtechnischen Faktoren, kontrolliert durch eine regelmäßige Wartung des qRT-PCR-Systems, aus dem genauen und gleichmäßigen Pipettieren der cDNA in die 96-Well-ELISA Mikrotiterplatten, aus dem korrekten Festlegen des Schwellenwerts, wozu einige Erfahrung notwendig ist und der für jede Probe neu gesetzt werden muss sowie aus den Schmelzkurvenanalysen zur Evaluation des Durchlaufs (105). Durch die Verwendung von NTC-Kontrollen konnten wir zusätzlich erkennen, ob Kontaminationen unsere Messungen beeinflussten. Die Abkürzung steht dabei für „No Template Control“ und bedeutet, dass keine cDNA in einem ansonsten identischen Ansatz vorhanden war. Ein gemessener Ct-Wert hätte hier auf Verunreinigungen mit z.B. Fremd-DNA oder Primer-Dimeren hingewiesen.

Rein deskriptiv wurde die Zellmorphologie nach einem Schema der Autoren Santangelo et al. 2007 (112) ausgewertet. Darin werden den Fibroblasten je nach Erscheinungsbild verschiedene Werte zugeteilt. Ein höherer Wert entspricht einem vermehrten Abweichen der Zellstruktur von der ursprünglichen synovialen Fibroblastenmorphologie und weist damit auf einen erhöhten Zellstress hin (s. 2.2.1.13). Die Autoren wählten willkürlich verschiedene Punkte in den Zellkulturen, vergaben die Werte und führten daraufhin eine statistische Analyse durch. Um das bereits diskutierte Problem der Alphafehler-Kumulierung in der statistischen Auswertung des Hauptversuchs zu minimieren, entschieden wir uns, die Analyse der Zellmorphologie aus der statistischen Auswertung herauszunehmen und lediglich deskriptiv zu bewerten.

4.4 Ergebnisse des Hauptversuchs

Die Kollagenhydrolysate haben keinen Einfluss auf die Zahl oder die Viabilität der synovialen Fibroblasten. Es wurden keine statistisch auffälligen Unterschiede zwischen den behandelten Proben und den unbehandelten Kontrollen gefunden. Bislang existieren keine weiteren Studien, die zytotoxische oder proliferative Effekte dieser Kollagenhydrolysate auf synoviale Fibroblasten untersuchten. Hingegen wurde bereits erforscht, inwiefern Kollagenhydrolysate die Zahl bzw. die Viabilität von Knorpelzellen beeinflussen. So konnten Oesser et al. 2008 in einem STR/ort Mausmodell, welches natürlicherweise eine OA in den Knien entwickelt, eine signifikante Abnahme der Knorpeldestruktion zeigen. Dazu wurden 0,15 mg/g KG Fortigel®, hergestellt aus bovinem Kollagen Typ I, über eine Dauer von 4 Monaten verfüttert (94). Sowohl 2013 als auch 2017 konnten Schadow et al. in unserem Labor keinen Einfluss der Kollagenhydrolysate auf die Zahl oder Viabilität von humanen Chondrozyten feststellen (83,92).

Die Kollagenhydrolysate haben keinen Einfluss auf die Morphologie der synovialen Fibroblasten. Diese Beobachtung deckt sich mit der vorangegangenen Erläuterung, dass die Kollagenhydrolysate auch keinen Einfluss auf die Zellzahl oder -viabilität haben. Santangelo et al. (112) setzten am Boden mit verzweigter Fibroblastenstruktur liegende Zellen mit einem normalen Zellzustand gleich. Abgerundete und vom Boden gelöste Zellen hingegen würden einen pathologischen Zustand anzeigen. Sie ordneten je nach Morphologie einen Wert nach einem Bewertungsschema zu. Je höher der zugeordnete Wert, desto höher sei der pathologische Zustand. Für uns bedeutet dies eine erhöhte Gefahr des Absterbens der Zellen, was sich dann in einer verringerten Zellzahl und -viabilität äußern würde. Da wir in ca. 91% der Fälle nach der Behandlung den Wert 0 zuordnen konnten, in ca. 9% der Fälle den Wert 1 zugeordnet haben und höhere Werte nicht zugeteilt wurden, lässt sich für uns an Hand dieser Daten keine relevante Auswirkung der Kollagenhydrolysate auf die Zellmorphologie erkennen. Aus diesen Beobachtungen und den vorab diskutierten fehlenden Effekten auf die Zellzahlen und die -viabilitäten schlussfolgern wir, dass unsere untersuchten Kollagenhydrolysate *in vitro* keinen zytotoxischen oder proliferationsfördernden Effekt besitzen.

Diskussion der Kollagenhydrolysatwirkungen auf die n-fache Expression der mRNA. Für die Interpretation der Daten aus den qRT-PCR-Versuchen haben wir die Wirkungen der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression der Enzyme und Metaboliten in einen pathophysiologischen Kontext gesetzt und anschließend auf Plausibilität überprüft. Wir diskutieren somit, ob die Effekte direkt von den Peptiden aus den Kollagenhydrolysaten oder von einem komplexen pathophysiologischen Geschehen ausgehen könnten. Von den IL-1 β vorstimulierten synovialen Fibroblasten Typ B erwarteten wir eine global erhöhte Expression der Enzyme und Metaboliten, die durch die Kollagenhydrolysate nur wenig verändert werden würde. Im Folgenden ist eine Übersicht der Effekte der Kollagenhydrolysate dargestellt:

Primer	KH	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
ADAM17		-	-	-	-	-	↓	↓	-	-
+ IL-1 β		-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADAMTS5		-	-	-	-	-	-	↓	-	-
+ IL-1 β		-	-	-	-	-	-	-	-	-
CASP1		-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ IL-1 β		-	-	-	-	-	-	-	-	-
COX-2		↑	-	-	-	↓	↓	-	-	-
+ IL-1 β		-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-6		↑	-	-	-	-	↑	-	↑	-
+ IL-1 β		-	-	-	-	-	-	-	-	-
IL-8		↑	↑	-	↑	-	↑	-	↑	-
+ IL-1 β		-	-	-	-	-	-	-	-	-
MMP-3		↑	-	-	-	-	-	-	↑	-
+ IL-1 β		-	-	-	-	-	-	-	-	-
MMP-13		-	-	-	-	-	↓	-	-	-
+ IL-1 β		-	-	-	-	-	-	-	-	-
PRG4		-	-	-	-	-	↓	-	-	-
+ IL-1 β		-	-	-	-	↑	-	-	-	-
TIMP-1		-	-	-	-	-	-	-	-	-
+ IL-1 β		-	-	-	-	-	-	-	↑	↑
TIMP-3		-	-	-	-	-	↓	↓	↓	↓
+ IL-1 β		-	-	-	-	↑	-	-	-	-

Tab. 11 Darstellung der Kollagenhydrolysatwirkungen auf die n-fache Expression der mRNA in den behandelten Proben relativ zur unbehandelten Kontrolle. Abgebildet sind die Werte nach der Auswertung mit dem Wilcoxon-Test. Als auffällig wurden Werte mit $p \leq 0,05$ gewertet. „-“ bedeutet, dass keine Auffälligkeit gesehen wurde. „↑“ bedeutet eine auffällige Stimulation. „↓“ steht für eine auffällige Hemmung. Im Ergebnisteil Kapitel 3.2.1.2 in Tabelle 10 ist jeweils das Ausmaß der auffälligen Regulation dargestellt.

RDH erhöht die relative Expression von COX-2 ($2,9 \pm 0,7$), IL-6 ($17,4 \pm 36,2$), IL-8 ($214,1 \pm 424$) und MMP-3 ($30,7 \pm 212$). COX-2 ist eines der zentralen Enzyme im Rahmen der Pathogenese der OA. Es katalysiert unter anderem die Bildung von PGE_2 , welches die Apoptose von Chondrozyten (16,51) fördert sowie einen Einfluss auf die Regulation von MMPs in synovialen Fibroblasten (51,52) und Knorpelzellen (51,53) besitzt. Die Bildung von COX-2 wird unter anderem durch $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β und IL-8 stimuliert (49,50). Der gleichzeitig beobachtete Anstieg des IL-8 ist daher pathophysiologisch durchaus nachvollziehbar. Shadow et al. (92) konnten 2013 in RDH behandelten Chondrozytenkulturen eine erhöhte Konzentration von PGE_2 finden. Wir vermuten, dass dies auch auf die Wirkung von RDH auf die Expression von COX-2 zurückzuführen sein könnte. Demgegenüber zeigten van de Water et al. im Jahr 2016 (96) in einer tierexperimentellen Studie mit dem nicht genauer spezifizierten Kollagenhydrolysat Hydro-P®, dass dieses im Rahmen einer Synovitis die Konzentration von PGE_2 signifikant verringern kann.

Die Bildung des Gewebehormons IL-6, welches unter anderem die Wirkung von IL-1 β verstärkt, aber auch die Bildung von Mitgliedern der TIMP-Familie induzieren kann (18), wird durch $\text{TNF-}\alpha$ und IL-1 β stimuliert (16,61). Demzufolge ist der ausbleibende Anstieg von IL-6 in IL-1 β vorstimulierten Zellen unter RDH-Inkubation erklärbar, wenn eine bereits maximale Stimulation der IL-6-Expression durch IL-1 β anzunehmen ist. Diese Schlussfolgerung gilt auch für die Primer COX-2, IL-8 und MMP-3 sowie für alle weiteren entsprechenden IL-1 β -abhängigen Primer bzw. Gene in den nachfolgend vorgestellten Ergebnissen. Wie bereits beschrieben, stimuliert das Gewebehormon IL-8 zusammen mit $\text{TNF-}\alpha$ die Bildung von COX-2. Weiterhin erhöht es die Aktivität von $\text{TNF-}\alpha$. Über dieses kann das IL-8 an der Stimulation des IL-6 sowie MMP-3 beteiligt gewesen sein (50,67). Außerdem wird die Produktion von IL-8 selbst durch $\text{TNF-}\alpha$, aber auch IL-1 β , welches durch IL-6 stimuliert wird, angeregt (16,61). Die Stimulation von MMP-3 lässt sich in unserem Fall möglicherweise durch IL-6 vermittelte IL-1 β -Bildung oder über $\text{TNF-}\alpha$ erklären (18,67). Generell ist für die beschriebenen möglichen Interaktionsmuster aus unserer Sicht einschränkend zu sagen, dass die kurze Behandlungszeit der Zellen die hier beschriebenen komplexen mehrschrittigen Wechselwirkungen eher unwahrscheinlich machen.

Auf Grund der komplexen Wirkmechanismen, insbesondere der Interleukine, ist es schwer festzustellen, wovon die Hauptwirkungen bei unseren Ergebnissen ausgegangen sind. Allerdings wurde in einer Studie von Shadow et al. (92) aus 2013 eine vermehrte

Freisetzung von MMP-3 in RDH-inkubierten Chondrozytenkulturen festgestellt. Dazu passt die Beobachtung der Autoren Ng et al. (90), die zeigten, dass das bovine Kollagenhydrolysat Gelita Sol D® die Konzentration von MMP-3 in Chondrozytenkulturen erhöhen kann. Diese Ergebnisse unterstützen die Möglichkeit einer direkten Stimulation von MMP-3 durch das bovine RDH. Letztlich wurden in unseren Zellkulturen nur destruktive Faktoren durch RDH stimuliert, was auf einen ungünstigen Verlauf auf eine OA *in vivo* hindeuten könnte.

RDH-N und FGH-N erhöhen die relative Expression von IL-8 ($22,2 \pm 29,2$; $14,1 \pm 16,1$). In der aktuellen Studie von Schadow et al. aus 2017 (83) konnte gezeigt werden, dass FGH-N in hohen Konzentrationen zu einer vermehrten NO-Freisetzung durch Chondrozyten führt. Ein bekannter Mechanismus ist die IL-1 β vermittelte Induktion von NO. IL-1 β induziert ebenfalls IL-8, dessen Stimulation wir beobachten konnten (37,80). Eine mögliche Erklärung ist, dass FGH-N somit einen gemeinsamen Regulationsweg von NO und IL-8 über IL-1 β stimuliert. Wie bereits erwähnt, ist die kurze Behandlungsdauer ein gewichtiges Argument gegen diese Hypothese. Die Alternative wäre eine direkte Regulation durch ein Peptid aus dem Kollagenhydrolysat FGH-N, bzw. RDH-N, wie es eingangs schon beschrieben wurde. Die Regulation dieses für die Progression der OA ungünstigen Faktors könnte auf ungünstige Auswirkungen von RDH-N und FGH-N *in vivo* auf die Erkrankung hindeuten.

CH-Alpha® reduziert die relative Expression von COX-2 ($0,6 \pm 0,2$) und erhöht die relative Expression von PRG4 ($2,5 \pm 93,5$) und TIMP-3 ($2,5 \pm 27,6$) in IL-1 β vorstimulierten synovialen Fibroblasten. In Anlehnung an die Studien von Oesser et al. und McAlindon et al. (87,94,102), welche Fortigel® aus bovinem Kollagen Typ I als Kollagenhydrolysat benutzten, wurde CH-Alpha®, dessen Hauptbestandteil Fortigel® ist, für diese Studie ausgewählt. Schadow et al. konnten 2013 zeigen, dass CH-Alpha® die Freisetzung von PGE₂ aus Chondrozyten fördert (92). COX-2 ist einer der wichtigsten Katalysatoren in der Bildung von PGE₂ (49). Wenn wir annehmen, dass dieses bei einer Induktion von PGE₂ auch vermehrt vorhanden ist, ergibt sich eine scheinbar widersprüchliche Beobachtung. Diese Beobachtung der Reduktion von COX-2 lässt sich mit einer möglichen unterschiedlichen Wirkweise des CH-Alpha® oder eines seiner deklarierten Zusatzstoffe auf die beiden Zelltypen erklären. Alternativ könnten unterschiedliche Peptidzusammensetzungen der einzelnen Produktchargen von

CH-Alpha® eine unterschiedliche Wirkweise verursachen. Eine weitere Alternative wäre ein COX-2 unabhängiger Regulationsweg von PGE₂ in den Chondrozyten in der dargestellten Beobachtung.

Wir zeigten, dass die Expression von PRG4 nur bei Zugabe von CH-Alpha® zu IL-1β behandelten synovialen Fibroblasten stimuliert wird, nicht aber bei alleiniger Zugabe von CH-Alpha®. Hingegen zeigten Jay et al. im Jahr 2014 in Chondrozytenkulturen, dass PRG4 durch IL-1β gehemmt wird (70). Eine mögliche Erklärung ist eine divergierende Wirkung von IL-1β auf synoviale Fibroblasten im Vergleich zu Chondrozyten. Denkbar wäre auch eine veränderte Wirkung von IL-1β bei Kombination mit CH-Alpha®. So könnte das veränderte Milieu im Rahmen der simulierten Inflammation eine Rolle spielen.

Unsere Daten zeigen ebenfalls, dass auch TIMP-3 nur bei Vorhandensein von IL-1β durch CH-Alpha® stimuliert wird. IL-1β selbst könnte über die Stimulation von IL-6, welches wiederum die Bildung von TIMPs induzieren kann (18), indirekt eine vermehrte Expression von TIMP-3 bewirken. Zu beachten ist wieder die mit 24 h relativ kurze Inkubationszeit unserer Versuche, sodass direkte Peptidwirkungen der Kollagenhydrolysate eine wichtige Alternativerklärung darstellen. Zusammengefasst reguliert CH-Alpha® in der Zellkultur eine Kombination an Genen, die *in vivo* einen protektiven Effekt auf die OA ausüben könnte. Ähnlich günstige Auswirkungen konnten Oesser et al. 2008 (94) mit Fortigel® in einem STR/ort Mausmodell nachweisen. In dieser Studie verringerte sich unter Fortigel® signifikant die Knorpeldestruktion.

Mobiforte® reduziert die relative Expression von ADAM17 ($0,5 \pm 0,2$), COX-2 ($0,6 \pm 0,2$), MMP-13 ($0,5 \pm 0,1$), PRG4 ($0,5 \pm 0,2$) und TIMP-3 ($0,4 \pm 0,1$) und erhöht die relative Expression von IL-6 ($2,1 \pm 1,4$) und IL-8 ($5,4 \pm 4,1$). ADAM17 ist ein Enzym, das wesentlich an der Bildung des TNF-α beteiligt ist, welches als eines der zentralen Komponenten im Rahmen der Entzündungsreaktion während einer OA gilt (34,35). TNF-α wiederum stimuliert unter anderem die Bildung von COX-2 und MMP-13 (49,66). Eine verringerte Expression von COX-2 und MMP-13 durch eine verringerte Bildung von ADAM17 und konsekutive TNF-α ist daher durchaus möglich. Auffällig ist die Inhibition von PRG4, da es normalerweise u.a. durch TNF-α gehemmt wird und man daher bei einem verringertem TNF-α-Gehalt durchaus mit einem vermehrten Vorhandensein rechnen könnte (70). Auch werden IL-6 und IL-8 durch

TNF- α stimuliert. Demnach hätten wir eine Inhibition statt eine Stimulation dieser Zytokine in unseren Beobachtungen erwartet (16). Zusätzlich sollte man bei einem erhöhten Gehalt von IL-8 wiederum eine vermehrte Expression von COX-2 erwarten, da dieses die Bildung von COX-2 stimulieren kann (50). Da IL-6 die Bildung von Mitgliedern der TIMP-Familie bewirken kann, hätten wir zusätzlich mit einer vermehrten Expression von TIMP-3 gerechnet. Dass sich diese Beobachtungen nicht einfach mit gängigen pathophysiologischen Abläufen erklären lassen, könnte ein Hinweis auf die eingangs beschriebene These einer direkten Wirkung von Peptiden aus den Kollagenhydrolysaten, in diesem Fall Mobiforte®, sein. Andere als die beschriebenen Regulationswege könnten auch ursächlich für die Beobachtungen sein. Zusammenfassend reguliert Mobiforte® in der Zellkultur verschiedene Faktoren in einer Art, aus der an Hand der vorliegenden Daten keine potentielle Prognose auf den Verlauf auf eine OA *in vivo* gelesen werden kann.

PCH reduziert die relative Expression von ADAM17 ($0,3 \pm 0,3$), ADAMTS5 ($0,3 \pm 0,2$) und TIMP-3 ($0,4 \pm 0,3$). ADAM17 und ADAMTS5 sind sich strukturell sehr ähnlich (31) und beide Enzyme werden von TIMP-3 in ihrer Wirkung gehemmt (34,41). Wenn man von direkten Wirkungen der in dem PCH enthaltenen Peptide ausgeht, erscheint zumindest die gleichzeitige Regulation von ADAM17 und ADAMTS5 naheliegend. Dagegen ist einzuwenden, dass das Kollagenhydrolysat Mobiforte® nur ADAM17 reguliert hat. Die genaue Ursache bleibt unklar, könnte aber auch hier an einer unterschiedlichen Peptidzusammensetzung liegen. Beide Kollagenhydrolysate sind porkinen Ursprungs, unterscheiden sich aber im mittleren Molekulargewicht mit 5000 Da für PCH und 3120 Da für Mobiforte® (83).

Die Autoren Schunck et al. zeigten 2007 (88), dass Kollagenhydrolysate, welche nicht genauer spezifiziert wurden, in gesunden bovinen und humanen Chondrozytenkulturen die Konzentration von Aggrekan im Nährmedium erhöhen können. Es ist möglich, dass die Wirkung über eine Inhibition des Aggrekan-spaltenden Enzyms ADAMTS5 stattgefunden hat. Mit dem porkinen PCH konnten wir nun ein Kollagenhydrolysat identifizieren, was diesen möglichen Einfluss ausüben kann. Allerdings zeigt PCH durch die zusätzliche Inhibition des protektiven Faktors TIMP-3 sowie des destruktiven Faktors ADAM17 ein Regulationsverhalten, aus dem sich keine Prognose auf den Verlauf auf die OA *in vivo* ableiten lässt.

PCH-N erhöht die relative Expression von IL-6 ($12,3 \pm 8,4$), IL-8 ($23,5 \pm 21,1$) und MMP-3 ($3,5 \pm 5,0$) in nicht vorstimulierten Zellen und von TIMP-1 ($1,1 \pm 0,5$) in IL-1 β vorstimulierten synovialen Fibroblasten und reduziert die relative Expression von TIMP-3 ($0,5 \pm 0,1$) in nicht vorstimulierten Zellen. Wie schon bei dem Kollagenhydrolysat RDH beschrieben, lässt sich die gleichzeitige Stimulation von IL-8, IL-6 und MMP-3 pathophysiologisch nachvollziehen. Fichter et al. haben 2006 (86) eine Stimulation von MMP-3 durch Kollagen Typ II-Fragmente aus bovinem Gelenkknorpel festgestellt. Wir konnten dies nun bei einem porkinen Kollagen Typ I-Hydrolysat feststellen. Allerdings führten Fichter et al. ihre Untersuchungen an humanen Knorpelimplantaten und nicht an humanen synovialen Fibroblasten durch.

Die Ergebnisse deuten an, dass PCH-N nur bei Vorhandensein von IL-1 β bzw. in einem entzündeten Milieu direkt die Expression von TIMP-1 stimulieren kann, da sich das Gen bei alleiniger Zugabe von PCH-N nicht reguliert zeigt. So könnte eine Wechselwirkung mit zusätzlichen, in unserer Studie nicht berücksichtigten, Parametern entstehen. Z.B. könnten nicht gemessene Metaboliten in der erzeugten Inflammation von den synovialen Fibroblasten sezerniert werden. Unabhängig von PCH-N könnte TIMP-1 indirekt durch IL-1 β , über den starken TIMP-Induktor IL-6 (18), stimuliert werden. Dafür spricht die gleichzeitige Stimulation von IL-6. Ein Argument gegen diesen komplexen Mechanismus ist allerdings das bereits beschriebene kurze Zeitintervall. Einen direkten Vergleich von IL-1 β vorstimulierten Zellen zu nicht stimulierten Kontrollen, ohne weitere Kollagenhydrolysate, haben wir aus statistischen Gründen nicht durchgeführt.

Neben PCH-N hemmen noch drei weitere Kollagenhydrolysate TIMP-3. Interessanterweise sind hierunter die beiden anderen porkinen Kollagenhydrolysate Mobiforte® und PCH. Allerdings reguliert das pescine Kollagenhydrolysat N-HFC das TIMP3 ebenfalls. Vermutlich besitzen diese Kollagenhydrolysate bestimmte bioaktive Peptide oder Aggregate, die sich ähneln und so eine ähnliche Wirkung erzielen (83,92). Zusammenfassend zeigt PCH-N in der Zellkultur ein Regulationsverhalten, aus dem sich keine Prognose auf den Verlauf auf die OA *in vivo* ableiten lässt.

N-HFC erhöht die relative Expression von TIMP-1 ($1,3 \pm 0,1$) in IL-1 β vorstimulierten synovialen Fibroblasten und reduziert die relative Expression von TIMP-3 ($0,3 \pm 0,2$). Wie schon eingangs sowie bei CH-Alpha® und PCH-N beschrieben, fällt die beobachtete Stimulation von Parametern durch

Kollagenhydrolysate in IL-1 β vorstimulierten Zellen auf, da sie von unserer Grundannahme einer bereits global erhöhten und durch die zusätzliche Gabe von Kollagenhydrolysaten nur wenig weiter stimulierbaren Expression abweicht. Dies ist umso interessanter, da N-HFC, CH-Alpha® und PCH-N keine Wirkung auf die entsprechenden Gene in nicht vorstimulierten Zellen besitzen. Im vorliegenden Fall könnte IL-1 β über die Stimulation von IL-6, welches ein starker Induktor von TIMPs ist, eine vermehrte Expression bzw. Bildung von TIMP-1 bewirken (18). Dann hätte man allerdings eine gleichzeitige Regulation von IL-6 erwartet, die so nicht gemessen wurde. Andererseits könnte das pescine N-HFC auch eine direkte IL-1 β - bzw. milieuabhängige Wirkung auf TIMP-1 besitzen, wie es bereits bei CH-Alpha® und PCH-N diskutiert wurde. Chen et al. zeigten 2016 (97) mit pescinen Kollagenhydrolysaten, dass diese eine UV-Licht bedingte Inhibition von TIMP-1 in der Haut verhindern. Durch die gegensätzliche Regulation von TIMP-1 und TIMP-3 lässt sich keine potentielle Prognose auf den Verlauf auf eine OA *in vivo* ableiten.

Die Wirkung der einzelnen Kollagenhydrolysate auf synoviale Fibroblasten zeigt eine große Varianz. Wir untersuchten insgesamt 9 verschiedene Kollagenhydrolysate. Die bovinen Kollagenhydrolysate RDH, RDH-N und CH-Alpha® unterschieden sich in der mittleren molekularen Größe der Peptide voneinander, wobei diese nach Herstellerangaben für RDH 5000 Da und für RDH-N 2000 Da betrug. Für CH-Alpha® wurde vom Hersteller keine Größenangabe angegeben. Schadow et al. haben in unserem Labor 2013 (92) für CH-Alpha® ein mittleres Molekulargewicht von 3300 Da bestimmt. Zusätzlich handelte es sich bei CH-Alpha® um ein Gemisch aus dem Kollagenhydrolysat Fortigel® und Zusatzstoffen. Die mittlere molekulare Größe der aus Fisch hergestellten Kollagenhydrolysate betrug nach Herstellerangaben für FGH 5000 Da und für FGH-N 2000 Da. Für N-HFC wurde keine Angabe gefunden. Weder FGH noch FGH-N enthielten deklarierte Zusatzstoffe. Analog dazu waren nach Herstellerangaben die Peptide für die porkinen Kollagenhydrolysate PCH im Durchschnitt 5000 Da und für PCH-N 2000 Da groß. Für Mobiforte® lagen keine Angaben seitens des Herstellers vor. Schadow et al. haben in unserem Labor 2017 (83) für Mobiforte® ein mittleres Molekulargewicht von 3120 Da bestimmt. Keines der porkinen Kollagenhydrolysate enthielt deklarierte Zusatzstoffe. Wir konnten bei den Kollagenhydrolysaten gleicher tierischer Herkunft keine einheitliche Regulation derselben Gene feststellen. Ebenso gab es bei den Kollagenhydrolysaten mit ähnlichem

mittlerem Molekulargewicht Unterschiede in der Regulation der Gene. Schadow et al. (83,92) haben in unserem Labor mittels biochemischer Analysen bereits festgestellt, dass sich die Kollagenhydrolysate RDH, RDH-N, FGH, FGH-N, CH-Alpha® und Mobiforte® in ihrer Peptidzusammensetzung erheblich unterscheiden. Dabei würden die Molekulargewichte der Peptide bzw. Peptidfragmente über einen sehr großen Messbereich streuen. Dies treffe auch auf Kollagenhydrolysate gleicher tierischer Herkunft zu (83,92). Zumindest für die von uns verwendeten Kollagenhydrolysate RDH, RDH-N, FGH, FGH-N, CH-Alpha® und Mobiforte® können wir die Varianz der Effekte zwischen den einzelnen Kollagenhydrolysaten durch die nachgewiesenen unterschiedlichen Peptidzusammensetzungen erklären. Da wir diese Varianz auch für die Kollagenhydrolysate PCH, PCH-N und N-HFC gemessen haben, liegt auch hier für uns die Ursache in einer unterschiedlichen Peptidzusammensetzung. Die Beobachtungen von unterschiedlichen Wirkungen der Kollagenhydrolysate auf Grund unterschiedlicher Peptidzusammensetzungen würden auch begründen, dass sich die einzelnen *in vitro* und tierexperimentellen Studien in ihren Ergebnissen und Implikationen teils deutlich voneinander unterscheiden. So stellten u.a. Oesser et al. 2003 und 2008 (87,94) sowie Nakatani et al. 2009 (95) chondroprotektive Effekte, z.B. eine Inhibierung der Kalzifizierung von Chondrozytenkulturen oder den Anstieg der mRNA-Expression von Aggrekan, durch Kollagenhydrolysate dar, die u.a. Schadow et al. 2013 und 2017 (83,92) und van de Water et al. 2016 (96) nicht feststellen konnten. Weiterhin konnten wir z.B. eine Stimulation von MMP-3 bei dem bovinen Kollagenhydrolysat RDH feststellen, nicht aber bei RDH-N oder CH-Alpha®. Fichter et al. stellten 2006 (86) dar, dass Kollagen Typ II-Fragmente aus bovinem Gelenkknorpel die mRNA-Expression von MMP-3 und -13 erhöhen kann. Van de Water et al. konnten in ihrer Studie 2016 (96) mit dem nicht genauer spezifizierten Kollagenhydrolysat Hydro-P® keine signifikanten Auswirkungen auf die Expression von IL-6 zeigen, wobei dieses sich bei uns häufig reguliert zeigte. Die unterschiedlichen Untersuchungsobjekte z.B. Chondrozyten oder synoviale Fibroblasten sowie Untersuchungsbedingungen besitzen dabei vermutlich auch einen Einfluss auf die Wirkung der Kollagenhydrolysate. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass wir den Kollagenhydrolysaten bezüglich ihres Einflusses auf synoviale Fibroblasten keine einheitliche Wirkung zuschreiben konnten. Eine allgemeine Aussage über die Wirkweise der Kollagenhydrolysate, insbesondere auf die OA, lässt sich somit nicht treffen.

4.5 Schlussfolgerung und Ausblick

Unsere Studie ist die erste, die explorativ die Wirkung verschiedener Kollagenhydrolysate auf die Zellzahl, Viabilität und Morphologie sowie die relative mRNA-Expression von protektiv oder katabol wirkenden Enzymen und Entzündungsmediatoren in synovialen Fibroblasten Typ B *in vitro* untersucht hat.

Aus den Ergebnissen lassen sich folgende Schlussfolgerungen und Antworten auf die in der Einleitung gestellten Fragen stellen:

- 1) Es zeigte sich häufig eine Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression der untersuchten Parameter. Interessanterweise unterscheiden sich dabei die Kollagenhydrolysate hinsichtlich ihrer Wirkung auf die synovialen Fibroblasten Typ B deutlich voneinander. So reguliert lediglich CH-Alpha® bestimmte Gene so, dass dies einen positiven Effekt auf die OA haben könnte. Die anderen Kollagenhydrolysate stimulieren entweder nur destruktive Faktoren, oder regulieren eine Kombination aus protektiven und destruktiven Faktoren. Wir begründen diese Varianz unter anderem mit verschiedenen Peptidzusammensetzungen der einzelnen Kollagenhydrolysate (83,92). Diese Beobachtungen erschweren die wissenschaftliche Bewertung der Kollagenhydrolysate in Hinblick auf einen möglichen Einsatz als evidenzbasierte Zusatztherapie bei einer OA. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit, die eine Kausalitätsbeziehung zwischen Einnahme und dem Einfluss auf eine OA-Progression oder -Symptomatik mit der ihr vorliegenden Datenlage nicht feststellen konnte (84,104).
- 2) Wir konnten zeigen, dass die Kollagenhydrolysate keinen Einfluss auf die Proliferation, Viabilität oder Morphologie von synovialen Fibroblasten haben. Wir schlussfolgern daraus, dass die Kollagenhydrolysate *in vitro* keinen zytotoxischen oder proliferationsfördernden Effekt besitzen. Dies unterstützt die Einschätzung der Europäischen Behörde für Lebensmittelsicherheit, die in zwei Beiträgen die Kollagenhydrolysate prinzipiell als sicher und als für den Verzehr geeignet einstuft (84,104).

- 3) Der Einfluss der Kollagenhydrolysate auf die Expression von Enzymen und Entzündungsmediatoren in bereits IL-1 β stimulierten synovialen Fibroblasten Typ B stellte sich als gering dar. Die Kollagenhydrolysate CH-Alpha®, PCH-N sowie N-HFC stimulierten allerdings einige Gene nur in Anwesenheit von IL-1 β , was auf eine Milieuabhängigkeit der Wirkweise der Kollagenhydrolysate hindeuten könnte.
- 4) Wir beobachteten sehr heterogene Wirkungen bei den verschiedenen Kollagenhydrolysaten. Die Hersteller von Kollagenhydrolysaten empfehlen diese als Nahrungsergänzungsmittel, als wichtigen Baustein der multimodalen Therapie bei einer OA, einzunehmen. Bevor eine allgemeine Empfehlung zu der Nutzung gegeben werden kann, sind daher ausreichend fundierte, wissenschaftliche Erkenntnisse über die genauen Effekte der jeweiligen Kollagenhydrolysate notwendig.

Es ist zu bedenken, dass das Synovialgewebe nur ein Bestandteil eines Gelenks ist und in der Pathophysiologie der OA alle vorhandenen Gewebe und Faktoren zusammenwirken. Diese Umgebungsfaktoren haben wir in der vorliegenden Arbeit nur wenig kontrolliert, sodass hier weitere Untersuchungen, z.B. auch die postulierte Milieuabhängigkeit im Rahmen der Stimulation mit IL-1 β , notwendig sein werden. Weitere funktionelle Studien, z.B. auch mit 3D-Gewebemodellen, könnten hier ebenfalls ein sinnvoller nächster Schritt sein. Diese Umgebungsfaktoren könnten *in vivo* die Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die OA relevant beeinflussen und verändern. Außerdem ist die Bioverfügbarkeit der Kollagenhydrolysate zu beachten, da wir Konzentrationen nutzten, die *in vivo* wahrscheinlich nur als Spitzenkonzentrationen erreichbar sein werden. Als nächster Schritt sollten daher ebenfalls weitere Studien folgen, die die einzelnen Kollagenhydrolysate individuell *in vitro* und *in vivo* in Konzentrations-Wirkungsbeziehungen mit den synovialen Fibroblasten setzen. Auch eine Analyse der Auswirkungen auf der DNA- und Proteinebene ist notwendig, um einen umfassenden wissenschaftlichen Einblick in die Wirkungen der einzelnen Kollagenhydrolysate zu erhalten und um kausale Rückschlüsse durchführen zu können. Insbesondere auf der Proteinebene ist zu beachten, dass die Menge an Proteinen nicht linear mit der mRNA-Menge korreliert, sondern mitunter erheblich davon abweichen kann (119). Somit lässt sich aus der mRNA-Menge nicht direkt die biologische

Aktivität ableiten. Auch haben weitere, in dieser Studie nicht kontrollierte Faktoren, wie z.B. Proteinmodifikationen, Proteinabbau oder andere, nicht bedachte Signalwege, einen Einfluss auf die biologische Aktivität. Weiterhin sollten die Kollagenhydrolysate PCH, PCH-N und N-HFC auf ihre Peptidzusammensetzungen hin überprüft werden. Nur durch diese vorgestellten weiteren Untersuchungsschritte lässt sich eine evidenzbasierte und umfassende Einschätzung zum Nutzen der Kollagenhydrolysate als Nahrungsergänzungsmittel bei einer OA geben.

5 Zusammenfassung

Die Arthrose (OA) ist eine chronisch degenerative Erkrankung des Gelenks. Dabei kommt es im Rahmen eines komplexen pathophysiologischen Geschehens zu einem Ungleichgewicht zwischen Knorpelreparatur und Knorpeldestruktion. Eine Heilung der OA ist nicht möglich (23,25,37,120). Medizinische Behandlungen haben daher das Ziel, die Progression der OA zu verzögern, Schmerzen zu lindern und die Beweglichkeit des Gelenks so lange wie möglich zu erhalten. Als Therapie können unter anderem Kollagenhydrolysate als Nahrungsergänzungsmittel eingenommen werden (8,78). Die europäische „Verordnung über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel“, die sog. „Health-Claims-Verordnung“, schreibt dabei vor, dass mit gesundheitsfördernden Wirkungen von Nahrungsergänzungsmitteln nur geworben werden darf, wenn diese wissenschaftlich belegt sind (82). Eine Vielzahl an Studien untersuchte bereits die Wirkungen von Kollagenhydrolysaten sowohl *in vitro* (83,85–92), tierexperimentell (93–97), als auch *in vivo* (81,98–103). So zeigten Oesser et al. 2003 (87), dass Kollagenhydrolysate die Kollagen Typ II-Produktion von Chondrozyten in einer Zellkultur konzentrationsabhängig erhöhen können. In den Jahren 2013 und 2017 konnten Schadow et al. (83,92) in unserem Labor hingegen in humanen Knorpelimplantaten nach Inkubation mit Kollagenhydrolysaten keine vermehrte Kollagensynthese feststellen.

Wenig untersucht wurde bisher der Einfluss von Kollagenhydrolysaten auf das für die Pathogenese der OA wichtige synoviale Gewebe in den Gelenken (25). Diese Studie ist die Erste, die den Einfluss von Kollagenhydrolysaten auf die relative mRNA-Expression von 11 protektiv oder katabol wirkenden Enzymen und Entzündungsmediatoren sowie auf die Proliferation, Viabilität und Morphologie von synovialen Fibroblasten Typ B untersucht. Darin wurden die Kollagenhydrolysate RDH (Peptan™ B 5000), RDH-N (Peptan™ B 2000), FGH (Peptan™ F 5000), FGH-N (Peptan™ F 2000), CH-Alpha®, Mobiforte®, PCH (Peptan™ P 5000), PCH-N (Peptan™ P 2000) und N-HFC untersucht. Bei den Enzymen und Mediatoren handelte es sich um ADAM17, ADAMTS5, Caspase-1, COX-2, IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-13, PRG4, TIMP-1 und TIMP-3. Für die Untersuchung wurden synoviale Fibroblasten verwendet, die aus Kniegelenken von sechs Osteoarthritis-Patienten stammten. Nach der Kultivierung der Zellen wurden jeweils 2,0 mg/ml Kollagenhydrolysat, und

zusätzlich zu einem Teil der Proben 10 ng/ml IL-1 β , für 24 Stunden hinzugefügt. Das IL-1 β sollte die Zellen vorstimulieren, wie es in einem Entzündungsgeschehen vorkommt (36,46,56). Anschließend wurde die RNA extrahiert, die Reinheit und Menge der RNA bestimmt und in cDNA umgeschrieben. Zusätzlich wurden die Zellzahl und die Zellviabilität sowie die Zellmorphologie bestimmt. Die cDNA wurde in der qRT-PCR amplifiziert und die Ergebnisse mit der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und anschließender Adjustierung der Daten mittels der False Discovery Rate (117).

Bei der Auswertung des Einflusses der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression der untersuchten Gene zeigte sich, dass die einzelnen Substanzen sehr unterschiedliche Wirkungen besitzen. Wir konnten bei den verschiedenen Kollagenhydrolysaten keine einheitliche Regulation derselben Gene durch die synovialen Fibroblasten feststellen. Dabei stellte sich der Einfluss der Kollagenhydrolysate auf die Expression von Enzymen und Entzündungsmediatoren in bereits IL-1 β vorstimulierten synovialen Fibroblasten Typ B als gering dar. Lediglich die beobachteten Wirkungen von CH-Alpha® deuteten darauf hin, dass dieses einen positiven Effekt auf den Verlauf einer OA haben könnte. Dabei handelte es sich um die Inhibition von COX-2 und die Stimulation von PRG4 und TIMP-3. Die anderen Kollagenhydrolysate stimulierten entweder nur destruktive Faktoren, so z.B. COX-2, IL-6, IL-8 und MMP-3 durch RDH (Peptan™ B 5000). Oder sie regulierten die protektiven und destruktiven Faktoren in einer Kombination, die keine klaren prognostischen Rückschlüsse zuließen, so z.B. die Inhibition von ADAM17, COX-2, MMP-13, PRG4 und TIMP-3 und die gleichzeitige Stimulation von IL-6 und IL-8 durch Mobiforte®. Einige Effekte, z.B. die Stimulation von PRG4 und TIMP-3 durch CH-Alpha®, zeigten sich abhängig von der Vorstimulation mit IL-1 β . Weiterhin konnten wir zeigen, dass die Kollagenhydrolysate keinen Einfluss auf die Proliferation, Viabilität oder Morphologie von synovialen Fibroblasten Typ B besitzen.

Unsere Beobachtungen decken sich mit den Erkenntnissen von Schadow et al. (83,92) aus unserem Labor, die mit Chondrozyten darstellten, dass die Kollagenhydrolysate auch hier sehr heterogene Wirkungen auf die Zellen besitzen. Die Autoren begründen diese Heterogenität mit gemessenen unterschiedlichen Peptidzusammensetzungen der einzelnen Kollagenhydrolysate (83,92). Für die von uns verwendeten Kollagenhydrolysate RDH (Peptan™ B 5000), RDH-N (Peptan™ B 2000), FGH (Peptan™ F 5000), FGH-N (Peptan™ F 2000), CH-Alpha® und Mobiforte®, können

wir so die Wirkunterschiede ebenfalls durch die nachgewiesenen unterschiedlichen Peptidzusammensetzungen erklären. Für die Kollagenhydrolysate PCH (Peptan™ P 5000), PCH-N (Peptan™ P 2000) und N-HFC fehlen genaue Messungen der Peptidzusammensetzungen. Diese sind für uns aber auch hier anzunehmen. Für die Kollagenhydrolysate CH-Alpha®, PCH-N sowie N-HFC scheint zusätzlich eine milieuhabhängige Wirkweise von Bedeutung zu sein, da diese Kollagenhydrolysate einige Gene nur in Anwesenheit von IL-1 β regulierten. Unsere heterogenen Beobachtungen erschweren die Bewertung der Kollagenhydrolysate in Hinblick auf eine sinnvolle Zusatztherapie bei einer OA. Zu einem ähnlichen Ergebnis kommt die Europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit, die eine Kausalitätsbeziehung zwischen Einnahme und dem Einfluss auf eine OA-Progression oder -Symptomatik nicht feststellen konnte (84,104). In Zukunft sollten daher weitere Studien folgen, in denen jedes einzelne Kollagenhydrolysat individuell *in vitro* und *in vivo* analysiert wird. Nur so lässt sich ein umfassender wissenschaftlicher Einblick in die Wirkungen der Kollagenhydrolysate erhalten, um eine evidenzbasierte Empfehlung zur Nutzung der Kollagenhydrolysate als Nahrungsergänzungsmittel bei der OA geben zu können.

6 Summary

Osteoarthritis (OA) is a chronic degenerative disease of the joint. During a complex pathophysiological progress, an imbalance between cartilage repair and cartilage destruction evolves. The cure of OA is not possible (23,25,37,120). Medical treatments therefore aim to delay the progression of the OA, to reduce the pain and to maintain the mobility of the joint as long as possible. As an additional therapeutic option, collagen hydrolysates are sometimes used as a dietary supplement (8,78). The European "Regulation on Nutrition and Health Claims on Food", the so-called "Health Claims Regulation", stipulates that the health-promoting effects of food supplements may only be promoted if they have been scientifically proven (82). A variety of studies have already investigated the effects of collagen hydrolysates both *in vitro* (83,85–92), in animal experiments (93–97), and *in vivo* (81,98–103). For example Oesser et al. demonstrated in 2003 (87) that collagen hydrolysates could increase the collagen type II production of chondrocytes in a cell culture in a concentration-dependent manner. In the years 2013 and 2017, Schadow et al. (83,92) from our laboratory, however did not show any increased collagen synthesis in human cartilage, incubated with collagen hydrolysates.

The influence of collagen hydrolysates on the synovial tissue in the joints, which like the cartilage itself plays an important role in the pathogenesis of OA, has not been investigated so far. This study is the first to investigate the influence of collagen hydrolysates on the relative mRNA expression of 11 protective or catabolic enzymes and inflammatory mediators, as well as on the proliferation, viability and morphology of synovial fibroblasts type B. The collagen hydrolysates RDH (Peptan™ B 5000), RDH-N (Peptan™ B 2000), FGH (Peptan™ F 5000), FGH-N (Peptan™ F 2000), CH-Alpha®, Mobiforte®, PCH (Peptan™ P 5000), PCH-N (Peptan™ P 2000) and N-HFC were analyzed. The enzymes and mediators of interest were ADAM17, ADAMTS5, Caspase-1, COX-2, IL-6, IL-8, MMP-3, MMP-13, PRG4, TIMP-1 and TIMP-3. The study used synovial fibroblasts derived from knee joints of six osteoarthritis patients. After culturing, the cells were treated with 2.0 mg/ml collagen hydrolysate, some samples were treated additionally with 10 ng/ml IL-1 β , for 24 hours. The IL-1 β should pre-stimulate the cells as occurs in an inflammatory process (36,46,56). Subsequently, the RNA was extracted, the purity and amount of the RNA were determined and then

transcribed into cDNA. In addition, cell count and cell viability as well as cell morphology were determined. The cDNA was amplified in the qRT-PCR and the results were evaluated using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -method. The statistical evaluation was carried out with the Wilcoxon sign-rank test and subsequent adjustment of the data using the False Discovery Rate (117).

The evaluation of the influence of the collagen hydrolysates on the relative mRNA expression of the target parameters revealed that the individual substances have very different effects. We could not show any uniform regulations of the target parameters by the different collagen hydrolysates used. The influence of collagen hydrolysates on the expression of enzymes and inflammatory mediators in IL-1 β -stimulated type B synovial fibroblasts was low. Only CH-Alpha® regulated certain parameters in a way that could have a positive effect on OA. Those were the suppression of COX-2 and the stimulation of PRG4 and TIMP-3. The other collagen hydrolysates either stimulated only destructive factors, e.g. COX-2, IL-6, IL-8 and MMP-3 by RDH (Peptan™ B 5000). Or they regulated the protective and destructive factors in a combination that did not allow any clear prognostic conclusions, e.g. the suppression of ADAM17, COX-2, MMP-13, PRG4 and TIMP-3 as well as the stimulation of IL-6 and IL-8 by Mobiforte®. Some effects, e.g. the stimulation of PRG4 and TIMP-3 by CH-Alpha® were dependent on the pre-stimulation with IL-1 β . Furthermore, we were able to show that the collagen hydrolysates have no influence on the proliferation, viability and morphology of type B synovial fibroblasts.

Our observations coincide with the findings of Schadow et al. (83,92) from our laboratory, who demonstrated that the collagen hydrolysates also have very heterogeneous effects on chondrocytes. The authors justify this variance with a different peptide composition of the individual collagen hydrolysates. For the collagen hydrolysates we used RDH (Peptan™ B 5000), RDH-N (Peptan™ B 2000), FGH (Peptan™ F 5000), FGH-N (Peptan™ F 2000), CH-Alpha® and Mobiforte®, we also could explain the different effects by the different peptide compositions. Due to insufficient data, this is not possible for the collagen hydrolysates PCH (Peptan™ P 5000), PCH-N (Peptan™ P 2000) and N-HFC. For the collagen hydrolysates CH-Alpha®, PCH-N and N-HFC additionally a milieu-dependent mode of action seems to be of importance since these collagen hydrolysates regulated some target parameters only in the presence of IL-1 β . Our heterogeneous observations complicate the evaluation of collagen hydrolysates in terms of a useful adjunctive therapy in OA. A

similar conclusion was made by the European Food Safety Authority, which was unable to establish a causal relationship between ingestion of collagen hydrolysates and the influence on OA progression or symptoms (84,104). In future, further studies should follow, in which each collagen hydrolysate is analyzed individually *in vitro* and *in vivo*. Only in this way a comprehensive scientific insight into the effects of collagen hydrolysates can be obtained in order to provide an evidence-based recommendation for the use of collagen hydrolysates as dietary supplements in OA.

7 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACTB	Beta-Aktin
ADAM17	A disintegrin and metalloproteinase 17
ADAMTS5	A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5
art.	arteriell
B2M	Beta-2 Mikroglobulin
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CASP1	Caspase-1
°C	Grad Celsius
COX-2	Cyclooxygenase-2
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
d	Tag
DNA	Desoxyribonucleinsäure
EZM	Extrazellulärmatrix
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FCS	Fetales Kälberserum (Englisch: Fetal Calf Serum)
FDR	False Discovery Rate
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
h	Stunden
IGF-1	Insulin-like growth factor 1
IL	Interleukin
IL-1RA	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
iNOS	Nitric Oxide Synthase
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm

KG	Körpergewicht
KH	Kollagenhydrolysat
min	Minuten
mg	Milligramm
ml	Milliliter
mM	mmol/Liter
MMP	Matrixmetalloproteinase
mm ³	Kubikmillimeter
noRT	minus Reverse Transkriptase
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
Nr.	Nummer
NSAID	Nichtsteroidales Antirheumatikum (Englisch: Non-Steroidal Antiinflammatory Drug)
NTC	No Template Control
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
N(orland)-HFC	Norland-Hydrolyzed Fish Collagen
OA	Osteoarthritis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PG	Prostaglandin
PRG4	Proteoglykan 4
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
qRT-PCR	Real-Time-quantitative-PCR
s	Sekunde
s.	siehe
SADOA	Slow Acting Drug in Osteoarthritis
SD	Standardabweichung
sog.	sogenannt
Tab.	Tabelle
TACE	Tumor necrosis factor- α -converting enzyme

TEP	Totalendoprothese
TGF β	Transforming growth factor β
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
u.a.	unter anderem
V	Volt
vs.	versus
$\bar{x}$	arithmetisches Mittel
x g	Vielfache der Erdbeschleunigung
z.B.	zum Beispiel

8 **Abbildungsverzeichnis**

Abb. 1 Übersicht über mögliche Ursachen einer sekundären Arthrose	4
Abb. 2 Übersicht über die Pathogenese der OA	5
Abb. 3 Darstellung einer fehlenden Homöostase	9
Abb. 4 Übersicht über die Vorbereitung der Versuche	37
Abb. 5 Amplifikationskurve des Primers CASP1	41
Abb. 6 Schmelzkurve des Primers ADAMTS5	43
Abb. 7 Schmelzkurve des Primers ADAMTS5 (2)	43
Abb. 8 Exemplarische Abbildung eines Mycoplasmentests	45
Abb. 9 Einteilung des Zellstresses an Hand der Morphologie	47
Abb. 10 Bestimmung der Steigung für die Effizienzberechnung	51
Abb. 11 Bewertung der Zellmorphologie	59
Abb. 12 Reinheit der RNA, dargestellt als A260/A280-Quotient	60
Abb. 13 Die Amplifizierungseffizienzen der untersuchten Primerpaare	61
Abb. 14 Exemplarisches Agarosegel der untersuchten Primerprodukte	63
Abb. 15 Die Anzahl synovialer Fibroblasten nach Behandlung	65
Abb. 16 Die Viabilität synovialer Fibroblasten nach Behandlung	65
Abb. 17 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von ADAM17	67
Abb. 18 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von ADAM17 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	68
Abb. 19 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von ADAMTS5	68
Abb. 20 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von ADAMTS5 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	69

Abb. 21 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von CASP1	69
Abb. 22 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von CASP1 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	70
Abb. 23 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von COX-2	70
Abb. 24 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von COX-2 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	71
Abb. 25 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von IL-6	71
Abb. 26 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von IL-6 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	72
Abb. 27 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von IL-8	72
Abb. 28 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von IL-8 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	73
Abb. 29 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von MMP-3	73
Abb. 30 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von MMP-3 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	74
Abb. 31 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von MMP-13	74
Abb. 32 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von MMP-13 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	75
Abb. 33 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von PRG4	75
Abb. 34 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von PRG4 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	76
Abb. 35 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von TIMP-1	76

Abb. 36 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von TIMP-1 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	77
Abb. 37 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von TIMP-3	77
Abb. 38 Wirkung der Kollagenhydrolysate auf die relative mRNA-Expression von TIMP-3 nach zusätzlicher Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β	78
Abb. 39 Morphologische Bewertung der synovialen Fibroblasten	79
Abb. 40 Der A260/A280-Quotient der RNA-Proben aus dem Hauptversuch	80

9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Übersicht über die <i>in vitro</i> -Studien	19
Tab. 2 Übersicht über die tierexperimentellen Studien	21
Tab. 3 Übersicht über die <i>in vivo</i> -Studien	24
Tab. 4 Beschreibung der Gewebespender	28
Tab. 5 Übersicht über die Kollagenhydrolysate	35
Tab. 6 Kriterien für die morphologische Auswertung	48
Tab. 7 Übersicht über die verwendeten Primer	55
Tab. 8 Zelluläre Parameter bei verschiedenen Konzentrationen an FCS	58
Tab. 9 Übersicht über die Primer und die Zahl der Basenpaare der Primerprodukte	64
Tab. 10 Zusammenfassende Darstellung der auffälligen Unterschiede in der mRNA-Expression	66
Tab. 11 Darstellung der Kollagenhydrolysatwirkungen auf die n-fache Expression der m-RNA	90

10 Literaturverzeichnis

1. Drenckhahn D. Allgemeine Gelenk- und Knochenlehre. In: Drenckhahn D, editor. Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem, 17th ed. Anatomie 1. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2008. p. 254–277.
2. Roach HI, Aigner T, Soder S, Haag J, Welkerling H. Pathobiology of Osteoarthritis: Pathomechanisms and Potential Therapeutic Targets. *Curr Drug Targets* 2007;8:271–82.
3. Bruder E, Denk H, Heitz PU. Gelenke. In: Böcker W, Denk H, Heitz PU, editors. Pathologie: Mit 164 Tabellen, 3rd ed. München [u.a.]: Urban & Fischer; 2004. p. 1061–1076.
4. Riede UN. Lokomotorisches System: Gelenke. In: Riede UN, editor. Allgemeine und spezielle Pathologie: 168 Tabellen, 5th ed. Stuttgart: Thieme; 2004. p. 1115–1176.
5. Kosinska MK, Ludwig TE, Liebisch G, Zhang R, Siebert HC, Wilhelm J, Kaesser U, Dettmeyer RB, Klein H, Ishaque B, Rickert M, Schmitz G, Schmidt TA, Steinmeyer J. Articular Joint Lubricants during Osteoarthritis and Rheumatoid Arthritis Display Altered Levels and Molecular Species. *PLoS One* 2015;10(5):e0125192.
6. Drenckhahn D, Hunziker E. Allgemeine Gewebelehre: Knorpelgewebe. In: Drenckhahn D, editor. Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem, 17th ed. Anatomie 1. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2008. p. 128–133.
7. Müller-Ladner U, Gay S. Bindegewebe. In: Siegenthaler W, editor. Klinische Pathophysiologie: 239 Tabellen, 9th ed. Stuttgart, New York: Thieme; 2006. p. 981–1021.
8. Michael JWP, Schlüter-Brust KU, Eysel P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int* 2010;107:152–62.
9. Mandl LA. Epidemiology of osteoarthritis. In: Berenbaum F, Sharma L, editors. Osteoarthritis: A companion to Rheumatology. Philadelphia: Mosby; 2007. p. 1–14.
10. Rabenberg M. Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes, 54. Berlin: Robert-Koch-Institut; 2013.

11. Egerbacher M, Seiberl G, Wolfesberger B, Walter I. Ciprofloxacin causes cytoskeletal changes and detachment of human and rat chondrocytes in vitro. *Arch Toxicol* 2000;73:557–63.
12. Valdes A, Spector T. The contribution of genes to osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2008;34:581–603.
13. Nuki G, Salter D. The impact of mechanical stress on the pathophysiology of osteoarthritis. In: Berenbaum F, Sharma L, editors. *Osteoarthritis: A companion to Rheumatology*. Philadelphia: Mosby; 2007. p. 33–52.
14. Calich AL, Domiciano DS, Fuller R. Osteoarthritis: can anti-cytokine therapy play a role in treatment? *Clin Rheumatol* 2010;29:451–55.
15. Abramson SB. Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage* 2008;16:S15–S20.
16. López-Armada MJ, Caramés B, Lires-Deán M, Cillero-Pastor B, Ruiz-Romero C, Galdo F, Blanco FJ. Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:660–69.
17. Sandy JD, Chan DD, Trevino RL, Wimmer MA, Plaas A. Human genome-wide expression analysis reorients the study of inflammatory mediators and biomechanics in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23:1939–45.
18. Westacott CI, Sharif M. Cytokines in osteoarthritis: Mediators or markers of joint destruction? *Semin Arthritis Rheum* 1996;25:254–72.
19. Hashimoto M, Nakasa T, Hikata T, Asahara H. Molecular network of cartilage homeostasis and osteoarthritis. *Med Res Rev* 2008;28:464–81.
20. Blaney Davidson E, van der Kraan P, van den Berg W. TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:597–604.
21. Steinmeyer J. Cytokines in osteoarthritis-current status on the pharmacological intervention. *Front Biosci* 2004;9:575–80.
22. Loeser RF. Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2008;8:303–06.
23. Goldring M. The role of the chondrocyte in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:1916–26.
24. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B. Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 2005;64:1263–67.

25. Sellam J, Berenbaum F. The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 2010;6:625–35.
26. Pérez-García S, Gutiérrez-Canas I, Seoane, Fernández J, Mellado M, Leceta J, Tío L, Villanueva-Romero R, Juarranz Y, Gomariz R. Healthy and osteoarthritic synovial fibroblasts produce a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 4, 5, 7, and 12. *Am J Pathol* 2016;186:2449–61.
27. Blom AB, van Lent P, Holthuysen A, van der Kraan P, Roth J, van Rooijen N, van den Berg W. Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12:627–35.
28. Li G, Yin J, Gao J, Cheng TS, Pavlos NJ, Zhang C, Zheng MH. Subchondral bone in osteoarthritis: insight into risk factors and microstructural changes. *Arthritis Res Ther* 2013;15:223.
29. Henrotin Y, Pesesse L, Sanchez C. Subchondral bone in osteoarthritis physiopathology: state-of-the art and perspectives. *Biomed Mater Eng* 2009;19:311–16.
30. Barrett AJ, Rawlings ND. Introduction: Metallopeptidases and Their Clans. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes* Bd. 1: Elsevier Science; 2012. p. 325–370.
31. Brocker CN, Vasiliou V, Nebert DW. Evolutionary divergence and functions of the ADAM and ADAMTS gene families. *Hum Genomics* 2009;4:43–55.
32. Patel IR, Attur MG, Patel RN, Stuchin SA, Abagyan RA, Abramson SB, Amin AR. TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha. *J Immunol* 1998;160:4570–79.
33. Amin AR. Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 1999;7:392–94.
34. Gooz M. ADAM-17: The enzyme that does it all. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 2010;45:146–69.
35. Murphy G. ADAM17, Tumor Necrosis Factor α -Convertase. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes* Bd. 1: Elsevier Science; 2012. p. 1126–1130.
36. Loyau G, Pujol JP. The role of cytokines in the development of osteoarthritis. *Scand J Rheumatol Suppl* 1990;81:8–12.

37. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 2002;39:237–46.
38. Liacini A, Sylvester J, Li WQ, Huang W, Dehnade F, Ahmad M, Zafarullah M. Induction of matrix metalloproteinase-13 gene expression by TNF-alpha is mediated by MAP kinases, AP-1, and NF-kappaB transcription factors in articular chondrocytes. *Exp Cell Res* 2003;288:208–17.
39. Malapeira J, Esselens C, Bech-Serra JJ, Canals F, Arribas J. ADAM17 (TACE) regulates TGF β signaling through the cleavage of vaserin. *Oncogene* 2011;30:1912–22.
40. Malfait AM, Liu RQ, Ijiri K, Komiya S, Tortorella MD. Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage. *J Biol Chem* 2002;277:22201–08.
41. Bondeson J, Wainwright S, Caterson B, Hughes C. ADAMTS5. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes Bd. 1: Elsevier Science*; 2012. p. 1174–1179.
42. Wen L, Mengjie W, Shijie J, Wanghui D, Qiaojie L, Jiejun S. Expression of ADAMTS-5 and TIMP-3 in the condylar cartilage of rats induced by experimentally created osteoarthritis. *Arch Oral Biol* 2014;59:524–29.
43. Scheer JM. Caspase-1. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes Bd. 1: Elsevier Science*; 2012. p. 2237–2243.
44. Black RA, Kronheim, Merriam JE, March CJ, Hopp TP. A pre-aspartate-specific protease from human leukocytes that cleaves pro-interleukin-1 beta. *J Biol Chem* 1989;264:5323–26.
45. Kostura MJ, Tocci MJ, Limjuco G, Chin J, Cameron P, Hillman AG, Chartrain NA, Schmidt JA. Identification of a monocyte specific pre-interleukin 1 beta convertase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86:5227–31.
46. Saha N, Moldovan F, Tardif G, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Interleukin-1beta-converting enzyme/caspase-1 in human osteoarthritic tissues: localization and role in the maturation of interleukin-1beta and interleukin-18. *Arthritis Rheum* 1999;42:1577–87.
47. Rouzer CA, Marnett LJ. Cyclooxygenases: structural and functional insights. *J Lipid Res* 2009;50:S29–S34.
48. Katori M, Majima M. Cyclooxygenase-2: its rich diversity of roles and possible application of its selective inhibitors. *Inflamm Res* 2000;49:367–92.

49. Vane JR, Bakhle YS, Botting RM. Cyclooxygenases 1 and 2. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1998;38:97–120.
50. Alaaeddine N, Di Battista JA, Pelletier JP, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J. Differential effects of IL-8, LIF (pro-inflammatory) and IL-11 (anti-inflammatory) on TNF-alpha-induced PGE(2) release and on signalling pathways in human OA synovial fibroblasts. *Cytokine* 1999;11:1020–30.
51. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 2003;33:155–67.
52. Mehindate K, al-Daccak R, Dayer JM, Kennedy BP, Kris C, Borgeat P, Poubelle PE, Mourad W. Superantigen-induced collagenase gene expression in human IFN-gamma-treated fibroblast-like synoviocytes involves prostaglandin E2. Evidence for a role of cyclooxygenase-2 and cytosolic phospholipase A2. *J Immunol* 1995;155:3570–77.
53. Bunning RA, Russell RG. The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. *Arthritis Rheum* 1989;32:780–84.
54. DiBattista JA, Martel-Pelletier J, Fujimoto N, Obata K, Zafarullah M, Pelletier J. Prostaglandins E2 and E1 inhibit cytokine-induced metalloprotease expression in human synovial fibroblasts. Mediation by cyclic-AMP signalling pathway. *Lab Invest* 1994;71:270–78.
55. Drenckhahn D. Zellenlehre. In: Drenckhahn D, editor. *Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem*, 17th ed. *Anatomie 1*. München: Elsevier, Urban & Fischer; 2008. p. 9–92.
56. Wood DD, Ihrle EJ, Hamerman D. Release of interleukin-1 from human synovial tissue in vitro. *Arthritis Rheum* 1985;28:853–62.
57. Fan Z, Soder S, Oehler S, Fundel K, Aigner T. Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. *Am J Pathol* 2007;171:938–46.
58. Jacques C, Gosset M, Berenbaum F, Gabay C. The role of IL-1 and IL-1Ra in joint inflammation and cartilage degradation. *Vitam Horm* 2006;74:371–403.
59. Daheshia M, Yao JQ. The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *J Rheumatol* 2008;35:2306–12.

60. Schlaak JF, Pfers I, Zum Meyer Buschenfelde KH, Marker-Hermann E. Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* 1996;14:155–62.
61. Goldring MB. The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res* 1999;40:1–11.
62. Goldring MB. Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2000;2:459–65.
63. Larsson S, Englund M, Struglics A, Lohmander LS. Interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha in synovial fluid are associated with progression of radiographic knee osteoarthritis in subjects with previous meniscectomy. *Osteoarthritis Cartilage* 2015;23:1906–14.
64. Brenn D, Richter F, Schaible HG. Sensitization of unmyelinated sensory fibers of the joint nerve to mechanical stimuli by interleukin-6 in the rat: an inflammatory mechanism of joint pain. *Arthritis Rheum* 2007;56:351–59.
65. Klein T, Bischoff R. Physiology and pathophysiology of matrix metalloproteases. *Amino Acids* 2011;41:271–90.
66. Henriët P, Eeckhout Y. Matrix Metalloproteinase-13/Collagenase 3. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes* Bd. 1: Elsevier Science; 2012. p. 734–743.
67. Nagase H. Matrix Metalloproteinase 3/Stromelysin 1. In: Barrett AJ, Rawlings ND, Woessner JF, editors. *Handbook of Proteolytic Enzymes* Bd. 1: Elsevier Science; 2012. p. 763–773.
68. Swann DA, Slayter HS, Silver FH. The molecular structure of lubricating glycoprotein-I, the boundary lubricant for articular cartilage. *J Biol Chem* 1981;256:5921–25.
69. Jay GD, Waller KA. The biology of lubricin: near frictionless joint motion. *Matrix Biol* 2014;39:17–24.
70. Bao JP, Chen WP, Wu LD. Lubricin: a novel potential biotherapeutic approaches for the treatment of osteoarthritis. *Mol Biol Rep* 2011;38:2879–85.
71. Jahn S, Seror J, Klein J. Lubrication of Articular Cartilage. *Annu Rev Biomed Eng* 2016;18:235–58.

72. Reesink HL, Watts AE, Mohammed HO, Jay GD, Nixon AJ. Lubricin/proteoglycan 4 increases in both experimental and naturally occurring equine osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2017;25:128–37.
73. Baker AH, Edwards DR, Murphy G. Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 2002;115:3719–27.
74. Brew K, Nagase H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta* 2010;1803:55–71.
75. Dean DD, Woessner JF. Extracts of human articular cartilage contain an inhibitor of tissue metalloproteinases. *Biochem J* 1984;218:277–80.
76. Lohmander LS, Hoerner LA, Lark MW. Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 1993;36:181–89.
77. Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF. Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage. *J Clin Invest* 1989;84:678–85.
78. McAlindon TE, Bannuru RR, Sullivan MC, Arden NK, Berenbaum F, Bierma-Zeinstra SM, Hawker GA, Henrotin Y, Hunter DJ, Kawaguchi H, Kwoh K, Lohmander S, Rannou F, Roos E, Underwood M. OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2014;22:363–88.
79. Steinmeyer J, Konttinen YT. Oral treatment options for degenerative joint disease--presence and future. *Adv Drug Deliv Rev* 2006;58:168–211.
80. Lopez HL. Nutritional interventions to prevent and treat osteoarthritis. Part II: focus on micronutrients and supportive nutraceuticals. *PM R* 2012;4:S155-68.
81. Moskowitz RW. Role of collagen hydrolysate in bone and joint disease. *Semin Arthritis Rheum* 2000;30:87–99.
82. European Food Safety Authority. Verordnung (EG) Nr. 1924/2006 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 20. Dezember 2006 über nährwert- und gesundheitsbezogene Angaben über Lebensmittel. 2006. URL: <http://data.europa.eu/eli/reg/2006/1924/oj>. Zugriff: 10.08.2015.
83. Schadow S, Simons VS, Lochnit G, Kordelle J, Gazova Z, Siebert HC, Steinmeyer J. Metabolic Response of Human Osteoarthritic Cartilage to Biochemically Characterized Collagen Hydrolysates. *Int J Mol Sci* 2017;18.

84. 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.
85. Jennings L, Wu L, King KB, Hämmerle H, Cs-Szabo G, Mollenhauer J. The effects of collagen fragments on the extracellular matrix metabolism of bovine and human chondrocytes. *Connect Tissue Res* 2001;42:71–86.
86. 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;24:63–70.
87. Oesser S, Seifert J. Stimulation of type II collagen biosynthesis and secretion in bovine chondrocytes cultured with degraded collagen. *Cell Tissue Res* 2003;311:393–99.
88. Schunck M, Schulze CH, Oesser S. P189 Collagen hydrolysate supplementation stimulates proteoglycan metabolism and gene expression of articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2007;15:B136.
89. Raabe O, Reich C, Wenisch S, Hild A, Burg-Roderfeld M, Siebert HC, Arnhold S. Hydrolyzed fish collagen induced chondrogenic differentiation of equine adipose tissue-derived stromal cells. *Histochem Cell Biol* 2010;134:545–54.
90. 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;35:1914–23.
91. Siebert HC, Burg-Roderfeld M, Eckert T, Stotzel S, Kirch U, Diercks T, Humphries MJ, Frank M, Wechselberger R, Tajkhorshid E, Oesser S. Interaction of the alpha2A domain of integrin with small collagen fragments. *Protein Cell* 2010;1:393–405.
92. Schadow S, Siebert HC, 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.
93. Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr* 1999;129:1891–95.
94. 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:S45.

95. Nakatani S, Mano H, Sampei C, Shimizu J, Wada M. Chondroprotective effect of the bioactive peptide prolyl-hydroxyproline in mouse articular cartilage in vitro and in vivo. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17:1620–27.
96. van de Water E, Oosterlinck M, Dumoulin M, Korthagen NM, van Weeren PR, van den Broek J, Everts H, Pille F, van Doorn DA. The preventive effects of two nutraceuticals on experimentally induced acute synovitis. *Equine Vet J* 2016.
97. Chen T, Hou H, Fan Y, Wang S, Chen Q, Si L, Li B. Protective effect of gelatin peptides from pacific cod skin against photoaging by inhibiting the expression of MMPs via MAPK signaling pathway. *J Photochem Photobiol B* 2016;165:34–41.
98. Adam M. What Effects Do Gelatin Preparations Have? Therapy of Osteoarthritis. *Therapiewoche* 1991;41:2456–61.
99. Clark KL, Sebastianelli W, Flechsenhar KR, Aukermann DF, Meza F, Millard RL, Deitch, 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;24:1485–96.
100. 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;60:99–113.
101. 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;56:7790–95.
102. 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;19:399–405.
103. Bruyère O, Zegels B, Leonori L, Rabenda V, Janssen A, Bourges C, Reginster JY. Effect of collagen hydrolysate in articular pain: A 6-month randomized, double-blind, placebo controlled study. *Complement Ther Med* 2012;20:124–30.

104. European Food Safety Authority. 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 J 2011;9:2291.
105. Qiagen. Critical Factors for Successful Real-Time PCR. Qiagen N.V., Venlo, Niederlande 2010.
106. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 1992;10:413–17.
107. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 1985;230:1350–54.
108. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jonák J, Lind K, Sindelka R, Sjöback R, Sjögreen B, Strömbom L, Stahlberg A, Zoric N. The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 2006;27:95–125.
109. Ririe KM, Rasmussen RP, Wittwer CT. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. *Anal Biochem* 1997;245:154–60.
110. Drexler HG, Uphoff CC. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology* 2002;39:75–90.
111. Jahan-Tigh RR, Ryan C, Obermoser G, Schwarzenberger K. Flow Cytometry. *J Invest Dermatol* 2012;132:e1.
112. Santangelo KS, Johnson AL, Ruppert AS, Bertone AL. Effects of hyaluronan treatment on lipopolysaccharide-challenged fibroblast-like synovial cells. *Arthritis Res Ther* 2007;9:R1.
113. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001;25:402–08.
114. Wang CT, Lin YT, Chiang BL, Lin YH, Hou SM. High molecular weight hyaluronic acid down-regulates the gene expression of osteoarthritis-associated cytokines and enzymes in fibroblast-like synoviocytes from patients with early osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14:1237–47.
115. Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL. Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Mol Biol* 2006;7:33.

116. Qiagen. QuantiTect® Primer Assay Handbook. Qiagen N.V., Venlo, Niederlande 2011.
117. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. J R Stat Soc Series B Stat Methodol 1995;57:289–300.
118. Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ. GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. Physiol Genomics 2005;21:389–95.
119. Maier T, Guell M, Serrano L. Correlation of mRNA and protein in complex biological samples. FEBS Lett 2009;583:3966–73.
120. Riede UN, editor. Allgemeine und spezielle Pathologie: 168 Tabellen, 5th ed. Stuttgart: Thieme; 2004.

11 Tabellarischer Anhang

11.1 Material

Tab. 11.1.1 Tabellarische Übersicht der Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
Alter ($50 \geq \& \leq 85$) BMI ($20 \geq \& \leq 35$) Knie-TEP auf Grund von Osteoarthritis	Knieoperation innerhalb der letzten 6 Monate Andere Operation innerhalb der letzten 3 Monate Fraktur eines Gelenkes innerhalb der letzten 24 Monate Inflammatorische Arthritis in anderen Gelenken Kollagenosen in anderen Gelenken Infektion eines Gelenkes Gicht Schwere Lebererkrankung Schwere Nierenerkrankung Diabetes mellitus Tumor in der Nähe des Knies HIV-Infektion Drogenabusus Einnahme von Immunsuppressiva oder Kortikosteroiden intraartikuläre Injektion von Hyaluronsäure

Dargestellt sind die Ein- und Ausschlusskriterien der Patienten für die Studie.

11.2 Vorversuche

11.2.1 Wahl des Referenzgens

Tab. 11.2.1.1 Ct-Werte für den Primer GAPDH des Versuchs 2.2.2.4

Kontrolle	Variante	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Nährmedium		17,62	19,44	20,93
		17,77	19,49	20,42
		17,75	19,70	21,20
$\bar{x}$		17,71	19,54	20,85
	IL-1 β	18,66	19,93	20,11
		18,68	20,13	19,15
		18,59	20,15	20,14
$\bar{x}$		18,64	20,07	19,80
	RDH	17,90	18,75	18,00
		17,56	19,05	17,31
		17,81	18,94	18,47
$\bar{x}$		17,76	18,91	17,92
	RDH-N	18,10	17,08	21,03
		18,62	16,95	20,58
		18,11	17,48	21,59
$\bar{x}$		18,28	17,17	21,07
	FGH	20,50	17,78	18,14
		20,61	17,77	17,97
		20,47	18,24	18,43
$\bar{x}$		20,53	17,93	18,18
	FGH-N	19,51	18,43	19,23
		19,53	18,40	18,99
		19,32	18,76	19,62
$\bar{x}$		19,45	18,53	19,28
	PCH	19,80	17,39	18,63
		19,88	17,66	19,26
		19,87	17,78	19,33
$\bar{x}$		19,85	17,61	19,07
	PCH-N	17,59	17,53	18,95
		17,62	17,62	19,10
		17,82	17,56	19,47
$\bar{x}$		17,68	17,57	19,17
	Mobiforte®	18,09	19,31	18,43
		18,05	19,11	18,37
		18,36	19,33	18,82
$\bar{x}$		18,16	19,25	18,54
	Norland-HFC	17,77	18,45	18,93
		18,21	18,41	17,88
		18,40	18,65	19,50
$\bar{x}$		18,13	18,50	18,77
	CH-Alpha®	18,57	18,55	18,73
		18,24	18,72	18,52
		18,33	18,89	19,26
$\bar{x}$		18,38	18,72	18,84

Dargestellt sind die Ct-Werte des Primers GAPDH für die Kontrolle und die verschiedenen Kollagenhydrolysate. Es wurden die Zellen von drei verschiedenen Patienten genutzt. Die Messung erfolgte jeweils im Triplikat. Zusätzlich wurden noRT- und NTC-Kontrollen aufgetragen, die sich jeweils als unauffällig darstellten. Die arithmetischen Mittelwerte wurden für die statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Test und die anschließende Adjustierung mit der False Discovery Rate verwendet.

Tab. 11.2.1.2 Ct-Werte für den Primer B2M des Versuchs 2.2.2.4

Kontrolle	Variante	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Nährmedium		17,86	18,84	18,07
		17,61	18,95	18,02
		17,71	19,09	18,60
		17,72	18,96	18,23
$\bar{x}$	IL-1 β	17,70	19,44	15,11
		17,59	19,52	15,50
		18,30	19,35	15,60
		17,86	19,44	15,41
	RDH	17,95	18,18	15,30
		17,98	17,93	15,42
		17,89	18,38	15,72
		17,94	18,16	15,48
$\bar{x}$	RDH-N	18,10	17,74	15,33
		18,56	17,56	16,20
		18,17	17,90	16,32
		18,28	17,73	15,95
	FGH	18,98	18,34	16,02
		19,11	18,43	15,86
		19,00	18,70	16,49
		19,03	18,49	16,12
$\bar{x}$	FGH-N	18,14	17,92	16,24
		17,96	18,14	16,86
		18,31	18,22	16,38
		18,14	18,09	16,49
	PCH	19,18	17,84	16,33
		19,13	18,38	16,59
		19,63	18,39	17,02
		19,31	18,20	16,65
$\bar{x}$	PCH-N	17,91	17,78	15,82
		17,96	18,13	15,96
		17,70	18,21	16,35
		17,86	18,04	16,04
	Mobiforte®	18,76	19,22	15,90
		19,01	19,53	16,66
		18,97	19,49	16,50
		18,92	19,42	16,35
$\bar{x}$	Norland-HFC	18,68	17,82	17,44
		18,64	18,41	17,18
		18,61	18,33	17,90
		18,64	18,18	17,50
	CH-Alpha®	18,80	19,09	16,57
		19,09	19,38	17,12
		19,07	19,60	17,16
		18,99	19,36	16,95

Dargestellt sind die Ct-Werte des Primers B2M für die Kontrolle und die verschiedenen Kollagenhydrolysate. Es wurden die Zellen von drei verschiedenen Patienten genutzt. Die Messung erfolgte jeweils im Triplikat. Zusätzlich wurden noRT- und NTC-Kontrollen aufgetragen, die sich jeweils als unauffällig darstellten. Die arithmetischen Mittelwerte wurden für die statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Test und die anschließende Adjustierung mit der False Discovery Rate verwendet.

Tab. 11.2.1.3 Ct-Werte für den Primer ACTB des Versuchs 2.2.2.4

Kontrolle	Variante	Patient 1	Patient 2	Patient 3
Nährmedium		14,90	16,40	17,45
		14,79	16,48	17,98
		14,45	16,61	17,99
		14,71	16,50	17,81
$\bar{x}$	IL-1 β	16,27	17,97	15,07
		16,63	18,12	15,50
		16,26	17,92	16,02
		16,39	18,00	15,53
RDH		15,38	15,89	15,57
		15,13	15,71	15,72
		15,43	16,54	16,00
		15,32	16,04	15,76
$\bar{x}$	RDH-N	15,41	15,36	14,86
		15,33	15,42	15,08
		15,24	15,43	15,54
		15,33	15,40	15,16
FGH		15,48	16,06	15,65
		15,33	15,78	16,22
		15,33	15,58	16,43
		15,38	15,81	16,10
$\bar{x}$	FGH-N	14,68	15,54	16,32
		14,72	15,76	15,85
		14,96	15,86	15,99
		14,79	15,72	16,05
PCH		15,88	15,63	15,61
		16,06	15,67	15,63
		15,93	16,36	16,49
		15,95	15,89	15,91
$\bar{x}$	PCH-N	15,77	15,93	15,23
		15,48	16,13	15,62
		15,33	16,23	15,98
		15,53	16,09	15,61
Mobiforte®		16,38	16,50	15,55
		16,27	16,61	15,58
		16,36	16,42	15,85
		16,34	16,51	15,66
$\bar{x}$	Norland-HFC	16,01	15,82	16,92
		16,30	15,97	17,08
		16,00	16,22	17,58
		16,10	16,00	17,19
CH-Alpha®		16,69	16,60	16,35
		17,25	16,43	16,36
		17,06	16,95	17,04
		17,00	16,66	16,58
$\bar{x}$				

Dargestellt sind die Ct-Werte des Primers ACTB für die Kontrolle und die verschiedenen Kollagenhydrolysate. Es wurden die Zellen von drei verschiedenen Patienten genutzt. Die Messung erfolgte jeweils im Triplikat. Zusätzlich wurden noRT- und NTC-Kontrollen aufgetragen, die sich jeweils als unauffällig darstellten. Die arithmetischen Mittelwerte wurden für die statistische Auswertung mit dem Wilcoxon-Test und die anschließende Adjustierung mit der False Discovery Rate verwendet.

11.3 Hauptversuch

Tab. 11.3.1 Belegungsplan der 6-Well Platten im Hauptversuch

Nr. der Platte	Nr. des Wells	Variante
1	1	80 µl IL-1β, 100 µl Nährmedium
	3	80 µl IL-1β, 100 µl RDH
	4	80 µl IL-1β, 100 µl RDH-N
	5	80 µl IL-1β, 100 µl FGH
	6	80 µl IL-1β, 100 µl FGH-N
2	1	100 µl Nährmedium
	3	100 µl RDH
	4	100 µl RDH-N
	5	100 µl FGH
	6	100 µl FGH-N
3	1	100 µl Nährmedium
	3	100 µl RDH
	4	100 µl RDH-N
	5	100 µl FGH
	6	100 µl FGH-N
4	1	80 µl IL-1β, 100 µl Nährmedium
	2	80 µl IL-1β, 100 µl CH-Alpha®
	3	80 µl IL-1β, 100 µl Mobiforte®
	4	80 µl IL-1β, 100 µl PCH
	5	80 µl IL-1β, 100 µl PCH-N
	6	80 µl IL-1β, 100 µl Norland-HFC
5	1	100 µl Nährmedium
	2	100 µl CH-Alpha®
	3	100 µl Mobiforte®
	4	100 µl PCH
	5	100 µl PCH-N
	6	100 µl Norland-HFC
6	1	100 µl Nährmedium
	2	100 µl CH-Alpha®
	3	100 µl Mobiforte®
	4	100 µl PCH
	5	100 µl PCH-N
	6	100 µl Norland-HFC

Dargestellt sind sechs 6-Well Platten und die Zusätze in den entsprechenden Wells. Jedes Well enthielt außerdem 4 ml Nährmedium. 100 µl Kollagenhydrolysat entsprachen einer Endkonzentration im Well von 2,0 mg/ml Nährmedium, 80 µl IL-1β entsprachen einer Endkonzentration im Well von 10 ng/ml Nährmedium. Well 2 von den Platten 1-3 blieb ungenutzt.

11.3.1 Ausgewertete Parameter

Auf den folgenden Seiten sind die einzelnen Ergebnisse der Messungen der Zellzahlen und -viabilitäten im Hauptversuch dargestellt. Weiterhin finden sich die Ct-Werte als arithmetisches Mittel sowie mit Standardabweichung der Triplikate, d.h. der dreifachen Messung der Zielgene sowie des Referenzgens bzw. der entsprechenden Primer auf der Elisa-Platte pro Kollagenhydrolysat bzw. Kontrolle, mit den daraus errechneten $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werten, die Zusammenfassung der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte als arithmetischer Mittelwert $\bar{x}$ mit Standardabweichung SD sowie der Median, die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Das statistische Verfahren prüfte bei der Bestimmung der Zellzahlen und -viabilitäten die Variante gegen die Kontrolle, bei den Ergebnissen nach der $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode die Werte der Variante gegen den Wert 1. Werte größer 1 zeigten eine Stimulation an, Werte zwischen 0 und kleiner 1 entsprachen einer Hemmung. Die $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Methode wurde für die Kollagenhydrolysate RDH, RDH-N, FGH sowie FGH-N gegen Kontrolle 1 angewendet und für die Kollagenhydrolysate CH-Alpha®, Mobiforte®, PCH, PCH-N sowie N-HFC gegen Kontrolle 2 berechnet.

Tab. 11.3.1.1 Die Zellzahl in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Nr.	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1	62500	45000	52500	58750	46250	51250	45000	53750	36250	53750	56250
2	66250	72500	83750	63750	80000	140000	43750	47500	68750	46250	60000
3	51300	37500	23750	32500	37500	30000	60000	22500	45000	52500	33750
4	68750	70000	50000	67500	53750	95000	82500	73750	82500	75000	63750
5	110000	54400	121600	121600	95000	105000	82500	95000	86250	81250	61250
6	82500	61600	72500	60000	68750	60000	65000	70000	68750	71250	58750
$\bar{x} + SD$	73550 +	56833 +	67350 +	67350 +	63542 +	80208 +	63125 +	60417 +	64583 +	63333 +	55625 +
Median	18718	12657	30717	26766	19835	36915	15642	22784	18310	13044	10045
p-Wert	67500	58000	62500	61875	61250	77500	62500	61875	68750	62500	59375
p-Wert nach FDR		0,1563	0,5313	0,2188	0,0938		0,4375	0,2500	0,2500	0,5625	0,3125
		0,76651	0,93153	0,81250	0,69643		0,93153	0,87366	0,87366	0,93153	0,87366

Dargestellt sind die Zellzahlen nach dem Versuch für die einzelnen Varianten sowie für die Kontrollen; deren Zusammenfassung als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.2 Die Viabilität der Zellen in % in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Nr.	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1	100	94,7	97,7	97,9	100	97,6	97,3	100	96,7	95,6	100
2	100	100	97,1	98,1	98,5	98,3	100	100	98,2	97,4	100
3	95,4	93,8	95	96,3	100	100	96	100	94,7	100	100
4	90,2	91,8	93	96,4	100	97,4	94,3	96,7	94,3	89,6	91,1
5	97,8	97,8	100	98,7	100	100	98,5	100	95,8	98,5	98
6	90,4	83,1	90,6	90,6	96,5	92,3	98,1	93,3	94,3	96,6	92,2
$\bar{x} + SD$	95,61 + 4,09	93,53 + 5,36	95,57 + 3,1	96,33 + 2,72	99,16 + 1,32	97,6 + 2,58	97,37 + 1,83	98,34 + 2,54	95,76 + 1,35	96,26 + 3,31	96,87 + 3,8
Median	96,57	94,25	96,05	97,18	100	97,94	97,71	100	95,33	96,99	99
p-Wert		0,3125	0,8438	0,8438	0,1250		0,8438	0,2500	0,1563	0,4375	0,8125
p-Wert nach FDR		0,87366	0,99265	0,99265	0,76651		0,99265	0,87366	0,76651	0,93153	0,99265

Dargestellt ist die Viabilität der Zellen nach dem Versuch für die einzelnen Varianten sowie für die Kontrollen; die Zusammenfassung als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.3 Die mRNA-Expression von ADAMTS5 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
ADAMTS5	25,5 ± 0,1	24,6 ± 0,2	25,9 ± 0,2	24,9 ± 0,1	25,5 ± 0,1	25,7 ± 0,1	24,5 ± 0,1	25,1 ± 0,1	24,8 ± 0,1	24,9 ± 0,1	25,2 ± 0,1
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		2,11	0,4	0,47	0,4		0,69	0,89	0,54	1,07	1,22
2											
ADAMTS5	23,7 ± 0,0	23,1 ± 0,2	24 ± 0,2	22,6 ± 0,0	22,5 ± 0,2	23,7 ± 0,0	24,2 ± 0,0	23,3 ± 0,1	24,2 ± 0,0	23,2 ± 0,1	35 ± 0,0
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		1,11	0,71	0,88	0,88		0,95	1,08	0,7	1,18	0,45
3											
ADAMTS5	22 ± 0,0	22,5 ± 0,2	23,9 ± 0,2	22,7 ± 0,0	22,6 ± 0,1	23 ± 0,0	23 ± 0,0	22,5 ± 0,1	31,2 ± 0,2	23 ± 0,1	22,6 ± 0,1
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		0,77	0,3	0,78	0,45		0,73	0,39	0,21	0,9	0,48
4											
ADAMTS5	24,1 ± 0,1	24,1 ± 0,2	24,9 ± 0,4	32,2 ± 0,2	25,2 ± 0,1	27,2 ± 0,1	25,2 ± 0,0	24,2 ± 0,1	24,4 ± 0,1	25,2 ± 0,1	25,1 ± 0,0
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		0,56	2,19	0,35	0,51		0,23	0,33	0,08	0,59	0,09
5											
ADAMTS5	23,4 ± 0,0	22,8 ± 0,2	23 ± 0,6	22,4 ± 0,0	23,3 ± 0,0	23 ± 0,1	23,2 ± 0,0	22 ± 0,1	23 ± 0,1	23 ± 0,1	22,3 ± 0,1
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		2,82	3,25	2,56	2,71		0,45	0,27	0,22	0,51	0,43
6											
ADAMTS5	23,7 ± 0,1	23 ± 0,2	23,2 ± 0,3	23,4 ± 0,1	23,2 ± 0,1	24,2 ± 0,1	23,9 ± 0,1	23,1 ± 0,1	23,2 ± 0,1	23 ± 0,1	23,2 ± 0,1
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		1,84	0,77	1,21	0,85		1	1,1	0,78	1,4	1,58
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		1,53 ± 0,8	1,27 ± 1,08	1,04 ± 0,73	0,97 ± 0,8		0,68 ± 0,27	0,68 ± 0,36	0,42 ± 0,27	0,94 ± 0,32	0,71 ± 0,52
Median		1,48	0,74	0,83	0,68		0,71	0,64	0,38	0,98	0,47
p-Wert		0,3125	0,6875	0,5625	0,4375		0,0625	0,1563	0,0313	0,6875	0,1563
p-Wert nach FDR		0,87366	0,98214	0,93153	0,93153		0,52419	0,76651	0,31250	0,98214	0,76651

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers ADAMTS5 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.4 Die mRNA-Expression von ADAMTS5 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1 ADAMTS5 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}	25,6 $\pm$ 0,2 19,8 $\pm$ 0,2	31,2 $\pm$ 0,2 24,4 $\pm$ 0,2 0,5	25,4 $\pm$ 0,2 19,9 $\pm$ 0,3 1,26	24,7 $\pm$ 0,1 19,9 $\pm$ 0,1 1,89	24,7 $\pm$ 0,1 19,8 $\pm$ 0,2 1,88	25,8 $\pm$ 0,2 19,6 $\pm$ 0,2	25,4 $\pm$ 0,1 18,5 0,59	24,8 $\pm$ 0,1 18,4 $\pm$ 0,2 0,89	25 $\pm$ 0,1 17,7 $\pm$ 0,4 0,46	25 $\pm$ 0,1 18,4 $\pm$ 0,2 0,74	25 $\pm$ 0,1 18,8 $\pm$ 0,3 1,01
2 ADAMTS5 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}	22,7 $\pm$ 0,0 19,4 $\pm$ 0,3	22,8 $\pm$ 0,2 18,3 $\pm$ 0,1 0,44	22,6 $\pm$ 0,3 18 $\pm$ 0,2 0,44	21,5 $\pm$ 0,3 17,2 $\pm$ 0,1 0,49	22 $\pm$ 0,0 17,1 $\pm$ 0,2 0,34	22,7 $\pm$ 0,0 17,5 $\pm$ 0,2	23 $\pm$ 0,0 17,6 $\pm$ 0,2 0,91	22,3 $\pm$ 0,1 17,4 $\pm$ 0,0 1,24	22,3 $\pm$ 0,1 16,8 $\pm$ 0,1 0,88	23,8 $\pm$ 0,0 18,3 $\pm$ 0,1 0,86	22,8 $\pm$ 0,0 17,7 $\pm$ 0,1 1,15
3 ADAMTS5 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}	20,5 $\pm$ 0,3 16,7 $\pm$ 0,1	21,8 $\pm$ 0,2 20,5 $\pm$ 0,1 5,52	21,3 $\pm$ 0,2 17,3 $\pm$ 0,2 0,84	20,3 $\pm$ 0,1 16,5 $\pm$ 0,1 0,97	21,6 $\pm$ 0,1 16,3 $\pm$ 0,5 0,35	21,5 $\pm$ 0,1 16,6 $\pm$ 0,0	23,9 $\pm$ 0,1 24,7 $\pm$ 0,2 49,92	21,6 $\pm$ 0,1 16,8 $\pm$ 0,1 1,10	21,2 $\pm$ 0,2 16,8 $\pm$ 0,1 1,37	21,7 $\pm$ 0,1 17,7 $\pm$ 0,3 1,94	21 $\pm$ 0,1 16,7 $\pm$ 0,3 1,49
4 ADAMTS5 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}	22,5 $\pm$ 0,1 18,9 $\pm$ 0,0	35 $\pm$ 0,0 32,5 $\pm$ 0,4 1,97	23,4 $\pm$ 0,2 23,7 $\pm$ 0,2 13,48	23,8 $\pm$ 0,1 26,1 $\pm$ 0,0 57,58	23,1 $\pm$ 0,1 22,1 $\pm$ 0,1 5,49	23 $\pm$ 0,0 22,3 $\pm$ 0,1	24 $\pm$ 0,2 23,4 $\pm$ 0,2 1,16	23,4 $\pm$ 0,1 23,7 $\pm$ 0,1 2,05	23 $\pm$ 0,0 21,2 $\pm$ 0,1 0,48	23,4 $\pm$ 0,0 22 $\pm$ 0,1 0,6	23,1 $\pm$ 0,2 21,7 $\pm$ 0,9 0,64
5 ADAMTS5 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}	21,8 $\pm$ 0,2 19,9 $\pm$ 0,1	21,3 $\pm$ 0,1 18,1 $\pm$ 0,0 0,42	21,7 $\pm$ 0,2 19,1 $\pm$ 0,2 0,63	21,9 $\pm$ 0,1 18,5 $\pm$ 0,1 0,35	22,1 $\pm$ 0,1 19,6 $\pm$ 0,3 0,69	26,2 $\pm$ 0,1 21,8 $\pm$ 0,2	22,3 $\pm$ 0,0 19,4 $\pm$ 0,2 3,02	22,5 $\pm$ 0,1 19,8 $\pm$ 0,2 3,47	21,7 $\pm$ 0,1 19,6 $\pm$ 0,3 5,37	21,9 $\pm$ 0,1 17,9 $\pm$ 0,0 1,4	21,8 $\pm$ 0,1 17,5 $\pm$ 0,4 1,12
6 ADAMTS5 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}	21,8 $\pm$ 0,1 19 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,2 20,1 $\pm$ 0,2 2,16	21,3 $\pm$ 0,2 21 $\pm$ 0,5 5,14	21,6 $\pm$ 0,1 19,4 $\pm$ 0,2 1,44	21,7 $\pm$ 0,2 19,4 $\pm$ 0,2 1,36	22,2 $\pm$ 0,2 19,5 $\pm$ 0,1	22,5 $\pm$ 0,0 20,1 $\pm$ 0,3 1,16	21,7 $\pm$ 0,1 19,1 $\pm$ 0,1 1,05	21,9 $\pm$ 0,2 18,8 $\pm$ 0,0 0,72	21,9 $\pm$ 0,1 19,4 $\pm$ 0,2 1,15	22,2 $\pm$ 0,2 20 $\pm$ 0,0 1,38
2 ^{-$\Delta\Delta C_t$} $\bar{x} \pm SD$		1,83 $\pm$ 1,8 1,24	3,63 $\pm$ 4,69 1,05	10,5 $\pm$ 21,1 1,21	1,68 $\pm$ 1,79 1,02		9,46 $\pm$ 18,1 1,16	1,63 $\pm$ 0,9 1,17	1,55 $\pm$ 1,74 0,8	1,12 $\pm$ 0,45 1	1,13 $\pm$ 0,27 1,14
Median		1	0,6875	1	1		0,3125	0,1563	0,6875	1	0,4375
p-Wert		1	0,98214	1	1		0,87366	0,76651	0,98214	1	0,93153
p-Wert nach FDR		1	0,98214	1	1		0,87366	0,76651	0,98214	1	0,93153

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers ADAMTS5 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{- $\Delta\Delta C_t$} -Werte; die Zusammenfassung der 2^{- $\Delta\Delta C_t$} -Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für GAPDH bei CH-Alpha® bei Patient Nr. 1 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.5 Die mRNA-Expression von ADAM17 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
ADAM17	25,4 ± 0,2	24,6 ± 0,2	25,6 ± 0,1	24,8 ± 0,1	25,6 ± 0,1	25,5 ± 0,1	24,2 ± 0,0	25,3 ± 0,2	24,1 ± 0,0	24,7 ± 0,0	25,5 ± 0,2
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		2	0,44	0,44	0,34		0,74	0,69	0,77	1,03	0,82
2											
ADAM17	25,1 ± 0,1	24,2 ± 0,0	25,2 ± 0,1	24,5 ± 0,2	24,1 ± 0,1	25,3 ± 0,0	25,9 ± 0,0	25 ± 0,1	25,5 ± 0,3	24,5 ± 0,1	35 ± 0,0
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		1,26	0,8	0,62	0,68		0,88	0,97	0,91	1,39	1,37
3											
ADAM17	25 ± 0,0	25,1 ± 0,1	26,4 ± 0,1	25,8 ± 0,0	25,6 ± 0,1	25,5 ± 0,1	25,6 ± 0,1	25,1 ± 0,1	34 ± 0,3	25,3 ± 0,1	25,4 ± 0,2
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		1	0,43	0,69	0,45		0,72	0,36	0,17	1,06	0,38
4											
ADAM17	25,6 ± 0,1	26,1 ± 0,2	26,2 ± 0,1	34,8 ± 0,3	26,4 ± 0,3	28,8 ± 0,2	26,5 ± 0,1	26,1 ± 0,2	26 ± 0,3	26,3 ± 0,1	27 ± 0,1
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		0,41	2,72	0,17	0,68		0,28	0,26	0,08	0,89	0,07
5											
ADAM17	26,4 ± 0,3	26 ± 0,1	25,7 ± 0,2	25,7 ± 0,1	26,8 ± 0,3	26,3 ± 0,1	26,1 ± 0,2	25,1 ± 0,1	26,4 ± 0,1	26,3 ± 0,2	25,5 ± 0,2
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		2,46	3,82	2,04	1,91		0,59	0,3	0,21	0,51	0,44
6											
ADAM17	25,6 ± 0,1	25,9 ± 0,0	25 ± 0,1	25,6 ± 0,1	25,5 ± 0,1	25,9 ± 0,0	25 ± 0,1	25,3 ± 0,1	25,5 ± 0,1	25,4 ± 0,0	25,7 ± 0,1
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		0,94	0,81	0,99	0,61		1,56	0,74	0,5	0,87	0,91
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		1,35 ± 0,69	1,5 ± 1,3	0,82 ± 0,6	0,78 ± 0,52		0,79 ± 0,39	0,55 ± 0,26	0,44 ± 0,31	0,96 ± 0,26	0,67 ± 0,42
Median		1,13	0,8	0,66	0,64		0,73	0,52	0,35	0,96	0,63
p-Wert		0,5625	1	0,2188	0,2188		0,2188	0,0313	0,0313	0,6875	0,1563
p-Wert nach FDR		0,93153	1	0,81250	0,81250		0,81250	0,31250	0,31250	0,98214	0,76651

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers ADAM17 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.6 Die mRNA-Expression von ADAM17 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1											
ADAM17	23,7 $\pm$ 0,2	29,1 $\pm$ 0,1	23,5 $\pm$ 0,1	22,7 $\pm$ 0,2	22,3 $\pm$ 0,1	23,8 $\pm$ 0,2	23,6 $\pm$ 0,4	22,8 $\pm$ 0,1	22,6 $\pm$ 0,4	22,8 $\pm$ 0,0	23,2 $\pm$ 0,1
GAPDH	19,8 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,2	18,5	18,4 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,58	1,32	2,1	2,73		0,56	0,93	0,65	0,94	0,87
2											
ADAM17	22,9 $\pm$ 0,2	23,2 $\pm$ 0,2	23 $\pm$ 0,2	22,1 $\pm$ 0,2	23 $\pm$ 0,1	23,2 $\pm$ 0,1	23,5 $\pm$ 0,2	23,5 $\pm$ 0,1	23,1 $\pm$ 0,2	24,5 $\pm$ 0,1	23,9 $\pm$ 0,2
GAPDH	19,4 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,1
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,38	0,35	0,36	0,19		0,84	0,74	0,69	0,7	0,75
3											
ADAM17	22,6 $\pm$ 0,1	23,6 $\pm$ 0,0	23,3 $\pm$ 0,2	22,8 $\pm$ 0,1	23,7 $\pm$ 0,1	23,7 $\pm$ 0,2	25,7 $\pm$ 0,2	23,8 $\pm$ 0,1	23,5 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,1
GAPDH	16,7 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		7,09	0,93	0,78	0,34		64,72	1,06	1,32	2,22	1,28
4											
ADAM17	24 $\pm$ 0,2	35 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,2	26,4 $\pm$ 0,2	25,4 $\pm$ 0,5	24,6 $\pm$ 0,0	25,1 $\pm$ 0,3	24,9 $\pm$ 0,1	25,2 $\pm$ 0,1	25 $\pm$ 0,1	24,9 $\pm$ 0,1
GAPDH	18,9 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,4	23,7 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,0	22,1 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,9
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		5,76	15,93	27,08	3,23		1,58	2,15	0,33	0,65	0,58
5											
ADAM17	23,2 $\pm$ 0,1	21,8 $\pm$ 0,2	22,7 $\pm$ 0,2	22,9 $\pm$ 0,0	23,4 $\pm$ 0,1	26,9 $\pm$ 0,1	22,6 $\pm$ 0,3	23,6 $\pm$ 0,1	22,6 $\pm$ 0,1	22,8 $\pm$ 0,1	23,1 $\pm$ 0,2
GAPDH	19,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,4
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,74	0,79	0,44	0,71		3,67	2,58	4,42	1,2	0,72
6											
ADAM17	22,9 $\pm$ 0,2	23,3 $\pm$ 0,1	22,8 $\pm$ 0,4	23,4 $\pm$ 0,1	23,7 $\pm$ 0,1	24 $\pm$ 0,1	23,3 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	23,5 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,7
GAPDH	19 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,0	19,4 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,0
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		1,53	4,03	0,85	0,74		2,35	1,2	0,72	1,38	0,84
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}											
$\bar{x} \pm SD$		2,68 $\pm$ 2,7	3,89 $\pm$ 5,52	5,27 $\pm$ 9,77	1,32 $\pm$ 1,19		12,3 $\pm$ 23,5	1,44 $\pm$ 0,68	1,36 $\pm$ 1,4	1,18 $\pm$ 0,53	0,84 $\pm$ 0,22
Median		1,13	1,13	0,82	0,72		1,96	1,13	0,7	1,07	0,79
p-Wert		0,6875	0,5625	0,8438	0,6875		0,2188	0,4375	0,5625	1	0,1563
p-Wert nach FDR		0,98214	0,93153	0,99265	0,98214		0,81250	0,93153	0,93153	1	0,76651

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers ADAM17 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für GAPDH bei CH-Alpha® bei Patient Nr. 1 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.7 Die mRNA-Expression von CASP1 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
CASP1	28,6 ± 0,1	27,8 ± 0,1	29 ± 0,2	28,7 ± 0,1	28,4 ± 0,1	29,4 ± 0,2	27,9 ± 0,2	28,4 ± 0,2	27,1 ± 0,1	27,6 ± 0,1	28,8 ± 0,2
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		1,95	0,38	0,27	0,43		0,89	1,19	1,45	2,16	1,27
2											
CASP1	27,2 ± 0,5	26,5 ± 0,1	26,3 ± 0,2	26,3 ± 0,1	26 ± 0,1	25,8 ± 0,4	27,5 ± 0,1	26,1 ± 0,2	26,8 ± 0,1	25,6 ± 0,2	35 ± 0,0
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		1,15	1,66	0,8	0,87		0,4	0,64	0,49	0,9	1,88
3											
CASP1	26,6 ± 0,0	25,4 ± 0,1	26,8 ± 0,3	26,9 ± 0,1	26,2 ± 0,1	26,6 ± 0,2	26,8 ± 0,1	26,2 ± 0,2	34,6 ± 0,4	25 ± 0,1	26,7 ± 0,1
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		2,56	1	0,99	0,89		0,67	0,38	0,26	2,94	0,35
4											
CASP1	26,8 ± 0,1	26,9 ± 0,2	26,5 ± 0,2	35 ± 0,0	26,9 ± 0,1	28,6 ± 0,1	27,3 ± 0,1	27,1 ± 0,2	27 ± 0,0	26,9 ± 0,1	27,6 ± 0,1
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		0,56	5,1	0,34	1,09		0,15	0,11	0,03	0,5	0,04
5											
CASP1	27,5 ± 0,2	26,8 ± 0,3	26,6 ± 0,2	26,1 ± 0,1	26,9 ± 0,0	27,2 ± 0,2	27,2 ± 0,2	26,3 ± 0,1	26,9 ± 0,1	26,8 ± 0,2	26,8 ± 0,3
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		2,85	4,25	3,21	3,68		0,48	0,24	0,26	0,67	0,34
6											
CASP1	27 ± 0,3	26,6 ± 0,1	26,7 ± 0,2	27,1 ± 0,1	26,8 ± 0,1	28 ± 0,3	26,9 ± 0,3	27 ± 0,3	26,4 ± 0,1	26,7 ± 0,0	27,3 ± 0,4
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		1,54	0,65	0,94	0,68		1,75	0,97	1,16	1,41	1,25
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		1,77 ± 0,79	2,17 ± 1,83	1,09 ± 0,99	1,27 ± 1,09		0,72 ± 0,51	0,59 ± 0,39	0,61 ± 0,52	1,43 ± 0,87	0,85 ± 0,65
Median		1,74	1,33	0,87	0,88		0,58	0,51	0,38	1,15	0,8
p-Wert		0,1563	0,5625	0,3125	0,5625		0,1563	0,0938	0,1563	0,6875	0,4375
p-Wert nach FDR		0,76651	0,93153	0,87366	0,93153		0,76651	0,69643	0,76651	0,98214	0,93153

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers CASP1 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.8 Die mRNA-Expression von CASP1 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1											
CASP1	28,1 $\pm$ 0,1	34,7 $\pm$ 0,2	27,7 $\pm$ 0,3	27,7 $\pm$ 0,0	26,9 $\pm$ 0,1	27,7 $\pm$ 0,3	28,6 $\pm$ 0,2	27,5 $\pm$ 0,2	26,7 $\pm$ 0,1	26,8 $\pm$ 0,1	27,8 $\pm$ 0,3
GAPDH	19,8 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,2	18,5	18,4 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,25	1,48	1,36	2,22		0,25	0,53	0,54	0,82	0,53
2											
CASP1	27 $\pm$ 0,2	26,6 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,1	25,8 $\pm$ 0,1	26,8 $\pm$ 0,1	25,8 $\pm$ 0,2	26,5 $\pm$ 0,1	27,2 $\pm$ 0,0	27,7 $\pm$ 0,2	27,1 $\pm$ 0,2
GAPDH	19,4 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,1
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,62	0,72	0,4	0,49		2,20	1,15	0,48	1	0,98
3											
CASP1	24,3 $\pm$ 0,2	24 $\pm$ 0,2	23,4 $\pm$ 0,3	24,4 $\pm$ 0,1	24,5 $\pm$ 0,2	25,1 $\pm$ 0,2	25,4 $\pm$ 0,2	24,8 $\pm$ 0,1	24,6 $\pm$ 0,0	24,1 $\pm$ 0,1	24,9 $\pm$ 0,4
GAPDH	16,7 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		17,56	2,65	0,82	0,66		208,28	1,4	1,5	4,35	1,2
4											
CASP1	26,8 $\pm$ 0,1	35 $\pm$ 0,0	25,4 $\pm$ 0,2	27,2 $\pm$ 0,1	26,4 $\pm$ 0,2	26,3 $\pm$ 0,1	27,1 $\pm$ 0,3	26,1 $\pm$ 0,1	25,5 $\pm$ 0,1	26,2 $\pm$ 0,1	25,3 $\pm$ 0,1
GAPDH	18,9 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,4	23,7 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,0	22,1 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,9
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		40,49	69,87	115,38	11,87		1,25	2,94	0,84	0,88	1,38
5											
CASP1	25,6 $\pm$ 0,1	24,1 $\pm$ 0,1	24,8 $\pm$ 0,2	25,9 $\pm$ 0,3	24,6 $\pm$ 0,1	29,8 $\pm$ 0,1	25,4 $\pm$ 0,2	24,5 $\pm$ 0,1	24,5 $\pm$ 0,1	23,7 $\pm$ 0,1	25,4 $\pm$ 0,2
GAPDH	19,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,4
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,77	1	0,29	1,6		4,13	10,18	8,94	4,81	1,14
6											
CASP1	26,2 $\pm$ 0,2	25,8 $\pm$ 0,0	25,3 $\pm$ 0,2	26,7 $\pm$ 0,1	26,2 $\pm$ 0,1	26,5 $\pm$ 0,1	27	26,3 $\pm$ 0,2	26,2 $\pm$ 0,1	26,2 $\pm$ 0,1	26,9 $\pm$ 0,2
GAPDH	19 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,0	19,4 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,0
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		2,54	6,86	0,88	1,28		0,9	0,88	0,71	1,15	1,05
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}											
$\bar{x} \pm SD$		10,4 $\pm$ 14,8	13,8 $\pm$ 25,2	18,9 $\pm$ 42,7	3,02 $\pm$ 4		36,2 $\pm$ 77	2,85 $\pm$ 3,37	2,17 $\pm$ 3,05	2,17 $\pm$ 1,72	1,05 $\pm$ 0,26
Median		1,65	2,07	0,85	1,44		1,72	1,28	0,77	1,07	1,10
p-Wert		0,5625	0,1563	0,8438	0,4375		0,3125	0,3125	0,8438	0,5625	0,5625
p-Wert nach FDR		0,93153	0,76651	0,99265	0,93153		0,87366	0,87366	0,99265	0,93153	0,93153

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers CASP1 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für CH-Alpha® bei GAPDH für Patient 1, bzw. CASP1 bei Patient 6 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.9 Die mRNA-Expression von COX-2 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
COX-2	28,7 ± 0,1	27,7 ± 0,2	28,1 ± 0,3	27,7 ± 0,2	28,1 ± 0,1	28,1 ± 0,2	26,5 ± 0,2	27,5 ± 0,0	25,7 ± 0,2	27 ± 0,1	28,3 ± 0,1
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		2,36	0,75	0,59	0,61		0,99	0,92	1,58	1,32	0,78
2											
COX-2	30,2 ± 0,2	28,4 ± 0,1	29,1 ± 0,2	29,5 ± 0,2	28,9 ± 0,2	29,7 ± 0,1	30,9 ± 0,2	29,6 ± 0,1	30 ± 0,1	28,8 ± 0,1	35 ± 0,0
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		2,55	1,97	0,7	0,93		0,58	0,9	0,81	1,54	29,06
3											
COX-2	29,6 ± 0,9	27,6 ± 0,2	29,1 ± 0,2	29,6 ± 0,2	28,7 ± 0,1	29,4 ± 0,2	30,1 ± 0,0	28,2 ± 0,0	35 ± 0,0	28,1 ± 0,2	29,3 ± 0,1
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		4,29	1,58	1,2	1,3		0,46	0,63	1,27	2,26	0,39
4											
COX-2	29,8 ± 0,1	28 ± 0,1	30,4 ± 0,2	35 ± 0,0	30,7 ± 0,0	32,6 ± 0,2	30,7 ± 0,1	30 ± 0,2	30,1 ± 0,2	30,8 ± 0,1	30,5 ± 0,2
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		2,02	2,71	2,59	0,62		0,22	0,24	0,06	0,54	0,09
5											
COX-2	29,7 ± 0,0	28,8 ± 0,2	29,3 ± 0,1	29,1 ± 0,0	30,4 ± 0,1	30,1 ± 0,1	29,8 ± 0,1	28,3 ± 0,1	29,2 ± 0,3	29,4 ± 0,1	28,5 ± 0,2
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		3,43	3,18	1,95	1,55		0,62	0,44	0,39	0,83	0,77
6											
COX-2	30,7 ± 0,2	29,1 ± 0,2	29,8 ± 0,1	30,8 ± 0,2	30,6 ± 0,1	31 ± 0,3	30,8 ± 0,1	30,5 ± 0,2	30,8 ± 0,1	30,3 ± 0,1	30 ± 0,1
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		3,5	0,99	0,96	0,66		0,89	0,67	0,44	0,94	1,49
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		3,02 ± 0,78	1,86 ± 0,87	1,33 ± 0,72	0,94 ± 0,36		0,63 ± 0,26	0,63 ± 0,24	0,76 ± 0,53	1,24 ± 0,56	5,43 ± 10,6
Median		2,99	1,78	1,08	0,79		0,6	0,65	0,63	1,13	0,77
p-Wert		0,0313	0,1563	0,6875	0,4375		0,0313	0,0313	0,3125	0,6875	0,8438
p-Wert nach FDR		0,31250	0,76651	0,98214	0,93153		0,31250	0,31250	0,87366	0,98214	0,99265

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers COX-2 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.10 Die mRNA-Expression von COX-2 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1 COX-2 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}	21,6 $\pm$ 0,1 19,8 $\pm$ 0,2	26,8 $\pm$ 0,1 24,4 $\pm$ 0,2 0,7	21,2 $\pm$ 0,2 19,9 $\pm$ 0,3 1,45	21 $\pm$ 0,2 19,9 $\pm$ 0,1 1,66	20,4 $\pm$ 0,1 19,8 $\pm$ 0,2 2,26	21,7 $\pm$ 0,2 19,6 $\pm$ 0,2	20,4 $\pm$ 0,2 18,5 1,18	20 $\pm$ 0,1 18,4 $\pm$ 0,2 1,5	19 $\pm$ 0,1 17,7 $\pm$ 0,4 1,71	19,6 $\pm$ 0,1 18,4 $\pm$ 0,2 1,87	20,7 $\pm$ 0,1 18,8 $\pm$ 0,3 1,19
2 COX-2 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}	19,9 $\pm$ 0,1 19,4 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1 18,3 $\pm$ 0,1 0,47	19,4 $\pm$ 0,2 18 $\pm$ 0,2 0,57	19,6 $\pm$ 0,1 17,2 $\pm$ 0,1 0,27	19,2 $\pm$ 0,2 17,1 $\pm$ 0,2 0,33	19,9 $\pm$ 0,2 17,5 $\pm$ 0,2	29 $\pm$ 0,4 17,6 $\pm$ 0,2 0,0	20 $\pm$ 0,1 17,4 $\pm$ 0,0 0,91	18,9 $\pm$ 0,1 16,8 $\pm$ 0,1 1,28	21 $\pm$ 0,0 18,3 $\pm$ 0,1 0,85	20,7 $\pm$ 0,0 17,7 $\pm$ 0,1 0,73
3 COX-2 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}	17,8 $\pm$ 0,1 16,7 $\pm$ 0,1	19,3 $\pm$ 0,1 20,5 $\pm$ 0,1 4,94	18,5 $\pm$ 0,1 17,3 $\pm$ 0,2 0,92	18,3 $\pm$ 0,1 16,5 $\pm$ 0,1 0,62	18,6 $\pm$ 0,1 16,3 $\pm$ 0,5 0,45	18,7 $\pm$ 0,1 16,6 $\pm$ 0,0	22,3 $\pm$ 0,3 24,7 $\pm$ 0,2 22,15	18,8 $\pm$ 0,2 16,8 $\pm$ 0,1 1,13	18,2 $\pm$ 0,1 16,8 $\pm$ 0,1 1,59	18,6 $\pm$ 0,1 17,7 $\pm$ 0,3 2,3	18,6 $\pm$ 0,1 16,7 $\pm$ 0,3 1,14
4 COX-2 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}	23,8 $\pm$ 0,3 18,9 $\pm$ 0,0	34,7 $\pm$ 0,4 32,5 $\pm$ 0,4 6,06	23,8 $\pm$ 0,0 23,7 $\pm$ 0,2 26,65	24,3 $\pm$ 0,5 26,1 $\pm$ 0,0 104,93	24,4 $\pm$ 0,1 22,1 $\pm$ 0,1 5,72	24,4 $\pm$ 0,2 22,3 $\pm$ 0,1	24,7 $\pm$ 0,3 23,4 $\pm$ 0,2 1,84	24,5 $\pm$ 0,1 23,7 $\pm$ 0,1 2,39	24,9 $\pm$ 0,2 21,2 $\pm$ 0,1 0,33	24,7 $\pm$ 0,1 22 $\pm$ 0,1 0,64	24,4 $\pm$ 0,3 21,7 $\pm$ 0,9 0,69
5 COX-2 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}	22,3 $\pm$ 0,3 19,9 $\pm$ 0,1	20,8 $\pm$ 0,1 18,1 $\pm$ 0,0 0,76	21,7 $\pm$ 0,2 19,1 $\pm$ 0,2 0,87	22 $\pm$ 0,1 18,5 $\pm$ 0,1 0,45	22,7 $\pm$ 0,1 19,6 $\pm$ 0,3 0,63	26 $\pm$ 0,2 21,8 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 1,8 19,4 $\pm$ 0,2 5,95	22,9 $\pm$ 0,1 19,8 $\pm$ 0,2 2,18	22 $\pm$ 0,1 19,6 $\pm$ 0,3 3,65	21,9 $\pm$ 0,1 17,9 $\pm$ 0,0 1,15	22,1 $\pm$ 0,2 17,5 $\pm$ 0,4 0,79
6 COX-2 GAPDH 2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}	22,8 $\pm$ 0,1 19 $\pm$ 0,1	23,2 $\pm$ 0,2 20,1 $\pm$ 0,2 1,54	23,8 $\pm$ 0,1 21 $\pm$ 0,5 1,86	23,2 $\pm$ 0,1 19,4 $\pm$ 0,2 0,91	23,3 $\pm$ 0,2 19,4 $\pm$ 0,2 0,91	23,2 $\pm$ 0,1 19,5 $\pm$ 0,1	23,5 $\pm$ 0,3 20,1 $\pm$ 0,3 1,18	23,1 $\pm$ 0,1 19,1 $\pm$ 0,1 0,81	23,3 $\pm$ 0,2 18,8 $\pm$ 0,0 0,54	23,4 $\pm$ 0,1 19,4 $\pm$ 0,2 0,81	24,4 $\pm$ 0,1 20 $\pm$ 0,0 0,6
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct} $\bar{x}$ $\pm$ SD Median		2,41 $\pm$ 2,23 1,15	5,22 $\pm$ 9,15 1,18	18,1 $\pm$ 38,8 0,76	1,72 $\pm$ 1,9 0,77		5,38 $\pm$ 7,73 1,51	1,48 $\pm$ 0,61 1,31	1,52 $\pm$ 1,08 1,44	1,27 $\pm$ 0,61 1	0,86 $\pm$ 0,23 0,76
p-Wert		0,5625	0,5625	0,8438	1		0,4375	0,2188	0,8438	0,99265	0,1563
p-Wert nach FDR		0,93153	0,93153	0,99265	1		0,93153	0,81250	0,99265	0,99265	0,76651

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers COX-2 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für GAPDH bei CH-Alpha® bei Patient Nr. 1 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.11 Die mRNA-Expression von IL-6 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
IL-6	25,6 ± 0,0	23,8 ± 0,2	24,8 ± 0,4	25,5 ± 0,1	24,6 ± 0,2	26,3 ± 0,2	24,9 ± 0,2	24 ± 0,3	23,8 ± 0,1	22,5 ± 0,1	25,4 ± 0,2
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		4,11	0,88	0,32	0,8		0,78	2,82	1,64	8,12	1,57
2											
IL-6	26,8 ± 0,0	22,9 ± 0,1	24 ± 0,4	26,1 ± 0,2	23,4 ± 0,1	26,4 ± 0,3	27,8 ± 0,3	24,3 ± 0,2	25,9 ± 0,0	21,8 ± 0,1	35 ± 0,0
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		10,51	6,16	0,67	3,83		0,5	3,45	1,45	19,65	2,98
3											
IL-6	29,5 ± 0,1	25 ± 0,2	28 ± 0,2	30 ± 0,0	27,7 ± 0,1	29,8 ± 0,2	30 ± 0,0	27,8 ± 0,4	35 ± 0,0	25,6 ± 0,1	29,9 ± 0,3
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		24,28	3,05	0,83	2,3		0,65	1,06	1,66	16,4	0,32
4											
IL-6	26 ± 0,1	23,3 ± 0,1	24,9 ± 0,5	35 ± 0,0	25,4 ± 0,1	30,1 ± 0,2	26,5 ± 0,3	24,9 ± 0,3	25,2 ± 0,1	25,8 ± 0,2	24,4 ± 0,3
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		3,59	8,31	0,19	1,64		0,73	1,53	0,33	3,11	1,09
5											
IL-6	28,7 ± 0,1	22,9 ± 0,1	26,1 ± 0,4	26 ± 0,1	26,3 ± 0,0	28,3 ± 0,1	27,2 ± 0,2	25,3 ± 0,4	25,9 ± 0,1	25,3 ± 0,1	23,3 ± 0,2
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		99,23	14,3	8,31	13,04		1,06	1,04	1,11	4,16	8,25
6											
IL-6	31,5 ± 0,1	25,6 ± 0,2	28,8 ± 0,2	30,1 ± 1,2	28,1 ± 0,1	32,1 ± 0,2	30,6 ± 0,0	28,9 ± 0,3	29,8 ± 0,2	26,7 ± 0,2	26,6 ± 0,2
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		67,61	3,39	2,56	6,34		2,36	4,87	1,96	26,21	36,74
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		34,9 ± 36,2	6,01 ± 4,4	2,15 ± 2,86	4,66 ± 4,15		1,01 ± 0,63	2,46 ± 1,4	1,36 ± 0,52	12,9 ± 8,47	8,49 ± 12,9
Median		17,4	4,77	0,75	3,06		0,75	2,18	1,54	12,3	2,27
p-Wert		0,0313	0,0625	0,8438	0,0625		0,5625	0,0313	0,4375	0,0313	0,2188
p-Wert nach FDR		0,31250	0,52419	0,99265	0,52419		0,93153	0,31250	0,93153	0,31250	0,81250

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers IL-6 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.12 Die mRNA-Expression von IL-6 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1											
IL-6	17,5 $\pm$ 0,2	23,5 $\pm$ 0,2	17,1 $\pm$ 0,3	16,9 $\pm$ 0,2	16,3 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,2	16,7 $\pm$ 0,1	16,1 $\pm$ 0,1	16,7 $\pm$ 0,5	17,2 $\pm$ 0,1
GAPDH	19,8 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,2	18,5	18,4 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}		0,38	1,46	1,57	2,27		0,49	0,66	0,58	0,63	0,57
2											
IL-6	16,4 $\pm$ 0,1	16,5 $\pm$ 0,1	15,9 $\pm$ 0,1	15,3 $\pm$ 0,2	15,6 $\pm$ 0,1	16,4 $\pm$ 0,2	24,8 $\pm$ 0,4	16 $\pm$ 0,2	15,3 $\pm$ 0,0	17,2 $\pm$ 0,1	16,5 $\pm$ 0,1
GAPDH	19,4 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,1
2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}		0,44	0,53	0,46	0,36		0,00	1,21	1,34	1,04	1,13
3											
IL-6	16,1 $\pm$ 0,1	16,4 $\pm$ 0,1	16,1 $\pm$ 0,2	15,8 $\pm$ 0,1	16,9 $\pm$ 0,1	16,9 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,1	16,1 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 0,1	16,5 $\pm$ 0,2
GAPDH	16,7 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}		10,94	1,43	1,05	0,42		69,43	1,23	1,9	2,3	1,4
4											
IL-6	17,8 $\pm$ 0,0	32,8 $\pm$ 0,5	18 $\pm$ 0,2	20,8 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,0	17,8 $\pm$ 0,1	17,9 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,1	17 $\pm$ 0,1	17,6 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,1
GAPDH	18,9 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,4	23,7 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,0	22,1 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,9
2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}		0,35	23,48	17,98	7,34		2,08	2,49	0,87	0,95	1,19
5											
IL-6	15,4 $\pm$ 0,4	15 $\pm$ 0,2	15,3 $\pm$ 0,2	15,8 $\pm$ 0,1	15,6 $\pm$ 0,1	20,4 $\pm$ 0,3	16,1 $\pm$ 0,3	16,1 $\pm$ 0,2	15,1 $\pm$ 0,1	15,7 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,2
GAPDH	19,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,4
2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}		0,37	0,65	0,27	0,75		3,84	5,16	8,61	1,72	0,87
6											
IL-6	18,1 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,1	18,2 $\pm$ 0,1	18,5 $\pm$ 0,2	18,3 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,0	17,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,2
GAPDH	19 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,0	19,4 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,0
2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}		1,96	5,11	1,13	0,98		1,68	0,94	0,87	0,98	0,97
2 ^{-$\Delta\Delta C_t$}											
$\bar{x} \pm SD$		2,41 $\pm$ 3,86	5,44 $\pm$ 8,21	3,74 $\pm$ 6,38	2,02 $\pm$ 2,46		12,9 $\pm$ 25,3	1,95 $\pm$ 1,55	2,36 $\pm$ 2,83	1,27 $\pm$ 0,56	1,02 $\pm$ 0,26
Median		0,41	1,45	1,09	0,87		1,88	1,22	1,1	1,01	1,05
p-Wert		0,5625	0,5625	0,8438	0,8438		0,6875	0,3125	0,5625	0,6875	1
p-Wert nach FDR		0,93153	0,93153	0,99265	0,99265		0,98214	0,87366	0,93153	0,98214	1

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers IL-6 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{- $\Delta\Delta C_t$} -Werte; die Zusammenfassung der 2^{- $\Delta\Delta C_t$} -Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für GAPDH bei CH-Alpha® bei Patient Nr. 1 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.13 Die mRNA-Expression von IL-8 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
IL-8	29 ± 0,1	25 ± 0,2	25,8 ± 0,2	28,2 ± 0,0	26,9 ± 0,1	28,3 ± 0,0	25,9 ± 0,0	26 ± 0,2	25 ± 0,1	23,6 ± 0,0	27,6 ± 0,2
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		19,13	4,69	0,54	1,79		1,65	2,99	2,89	16,27	1,44
2											
IL-8	29,4 ± 0,0	22,1 ± 0,3	25,3 ± 0,2	28,2 ± 0,1	25,1 ± 0,1	29,2 ± 0,1	29,6 ± 0,0	26,2 ± 0,1	28,1 ± 0,1	23,4 ± 0,0	35 ± 0,0
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		106,21	14,22	0,91	6,94		0,97	6,61	2,15	45,87	20,07
3											
IL-8	21,7 ± 0,2	21,9 ± 0,2	24,2 ± 0,2	27,6 ± 0,2	23,8 ± 0,1	27,3 ± 0,2	28,2 ± 0,0	23,4 ± 0,2	33,2 ± 0,2	22,5 ± 0,2	27,1 ± 0,2
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		41,3	7,88	0,87	6,72		0,42	4,3	1,08	25,86	0,44
4											
IL-8	33,5 ± 0,1	24,3 ± 0,3	29,4 ± 0,2	35 ± 0,0	29,2 ± 0,2	29,2 ± 0,2	34,8 ± 0,3	32,2 ± 0,1	29 ± 0,1	30,1 ± 0,1	30,1 ± 0,2
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		322,09	68,07	33,1	21,26		0,35	2,31	0,29	4,09	8,62
5											
IL-8	30,9 ± 0,2	21,7 ± 0,2	25,9 ± 0,2	27,8 ± 0,3	26,7 ± 0,1	30,7 ± 0,1	30,1 ± 0,0	24,4 ± 0,1	26,1 ± 0,1	25,3 ± 0,2	21,8 ± 0,2
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		1071,66	78,9	10,61	47,75		0,72	10,28	5,25	21,18	123,91
6											
IL-8	34,2 ± 0,3	24,7 ± 0,3	28,4 ± 0,2	31,5 ± 0,1	28,6 ± 0,1	33,8 ± 0,8	31,8 ± 0,1	29 ± 0,1	29,9 ± 0,1	27 ± 0,1	25,2 ± 0,1
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		913,79	30,28	6,94	30,2		3,28	13,85	5,7	68,16	301,19
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		412 ± 424	34 ± 29,2	8,83 ± 11,5	19,1 ± 16,1		1,23 ± 1,01	6,72 ± 4,14	2,89 ± 2	30,2 ± 21,2	75,9 ± 109
Median		214,15	22,25	3,93	14,1		0,84	5,45	2,52	23,52	14,35
p-Wert		0,0313	0,0313	0,4375	0,0313		0,8438	0,0313	0,2188	0,0313	0,0938
p-Wert nach FDR		0,31250	0,31250	0,93153	0,31250		0,99265	0,31250	0,81250	0,31250	0,69643

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers IL-8 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.14 Die mRNA-Expression von IL-8 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1											
IL-8	16,5 $\pm$ 0,1	22,5 $\pm$ 0,2	16,7 $\pm$ 0,1	16,1 $\pm$ 0,2	16 $\pm$ 0,1	16,5 $\pm$ 0,0	16,2 $\pm$ 0,1	15,9 $\pm$ 0,2	15,6 $\pm$ 0,1	15,7 $\pm$ 0,1	16,1 $\pm$ 0,0
GAPDH	19,8 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,2	18,5	18,4 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,38	0,98	1,48	1,45		0,57	0,69	0,51	0,75	0,76
2											
IL-8	15,6 $\pm$ 0,1	15,4 $\pm$ 0,1	15,1 $\pm$ 0,2	15,1 $\pm$ 0,1	14,9 $\pm$ 0,2	15,8 $\pm$ 0,3	27,8 $\pm$ 0,1	15,4 $\pm$ 0,1	14,5 $\pm$ 0,1	16,4 $\pm$ 0,1	15,9 $\pm$ 0,0
GAPDH	19,4 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,1
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,52	0,53	0,29	0,33		0,00	1,27	1,65	1,18	1,11
3											
IL-8	14,8 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,1	15,2 $\pm$ 0,1	14,8 $\pm$ 0,1	15,5 $\pm$ 0,1	15,4 $\pm$ 0,0	20 $\pm$ 0,1	15,7 $\pm$ 0,1	15,1 $\pm$ 0,2	15,5 $\pm$ 0,1	15,4 $\pm$ 0,1
GAPDH	16,7 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		2,81	1,06	0,89	0,46		11,33	0,92	1,38	2,09	1,09
4											
IL-8	18,5 $\pm$ 0,3	34,5 $\pm$ 0,4	20,6 $\pm$ 0,1	22,5 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,4	19,9 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 0,1	20,4 $\pm$ 0,1	18,5 $\pm$ 0,0	19,4 $\pm$ 0,1	18,9 $\pm$ 0,2
GAPDH	18,9 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,4	23,7 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,0	22,1 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,9
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,18	6,04	8,97	4,68		2,82	1,88	1,2	1,07	1,36
5											
IL-8	15,8 $\pm$ 0,2	14,9 $\pm$ 0,0	15,7 $\pm$ 0,2	16 $\pm$ 0,3	16 $\pm$ 0,1	19,9 $\pm$ 0,2	16,2 $\pm$ 0,2	16,1 $\pm$ 0,1	15,3 $\pm$ 0,1	15,5 $\pm$ 0,1	15,7 $\pm$ 0,1
GAPDH	19,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,4
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,53	0,64	0,32	0,73		2,47	3,52	5,65	1,51	0,95
6											
IL-8	17 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,1	17 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,5	17,4 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,1	17,6 $\pm$ 0,1	17,5 $\pm$ 0,2	17,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,1
GAPDH	19 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,0	19,4 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,0
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		1,39	3,79	1,07	0,65		1,43	0,7	0,59	0,7	0,9
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}											
$\bar{x} \pm SD$		0,97 $\pm$ 0,91	2,17 $\pm$ 2,06	2,17 $\pm$ 3,07	1,38 $\pm$ 1,52		3,1 $\pm$ 3,81	1,5 $\pm$ 0,99	1,83 $\pm$ 1,76	1,22 $\pm$ 0,47	1,03 $\pm$ 0,19
Median		0,52	1,02	0,98	0,69		1,95	1,09	1,29	1,13	1,02
p-Wert		0,4375	0,6875	1	0,6875		0,6875	0,6875	0,8438	0,5625	0,8438
p-Wert nach FDR		0,93153	0,98214	1	0,98214		0,98214	0,98214	0,99265	0,93153	0,99265

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers IL-8 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für GAPDH bei CH-Alpha® bei Patient Nr. 1 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.15 Die mRNA-Expression von MMP-3 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
MMP-3	25,9 ± 0,1	25,6 ± 0,6	26,9 ± 0,2	25,7 ± 0,1	25,3 ± 0,6	26,2 ± 0,0	24,7 ± 0,2	25,3 ± 0,1	24,9 ± 0,1	25,2 ± 0,1	25,8 ± 0,2
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		1,36	0,24	0,34	0,61		0,86	1,09	0,71	1,24	1,1
2											
MMP-3	28,2 ± 0,0	23,6 ± 0,2	26,3 ± 0,2	27,3 ± 0,0	26,8 ± 0,1	28,4 ± 0,1	29,1 ± 0,0	27,4 ± 0,1	28,2 ± 0,1	26 ± 0,1	35 ± 0,0
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		16,37	3,25	0,76	0,91		0,83	1,55	1,12	4,35	11,4
3											
MMP-3	28,1 ± 0,2	23,7 ± 0,2	26,9 ± 0,2	28,1 ± 0,1	27 ± 0,0	27,8 ± 0,0	27,8 ± 0,0	26,2 ± 0,1	34,7 ± 0,2	24,5 ± 0,0	28 ± 0,0
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		24,64	2,57	1,29	1,55		0,78	0,88	0,54	9,17	0,33
4											
MMP-3	26,3 ± 0,1	20,3 ± 0,3	24 ± 0,2	35 ± 0,0	23,2 ± 0,1	28,1 ± 0,1	26,6 ± 0,0	24,2 ± 0,1	26,7 ± 0,3	25,1 ± 0,1	22,2 ± 0,1
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		36,83	20,25	0,23	9,95		0,16	0,57	0,03	1,23	1,15
5											
MMP-3	28,5 ± 0,1	20,2 ± 0,3	24,4 ± 0,2	26,4 ± 0,1	25,5 ± 0,1	27,5 ± 0,1	27,7 ± 0,1	24,2 ± 0,1	27,3 ± 0,9	25,1 ± 0,1	22,3 ± 0,1
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		599,4	42,72	5,36	21,04		0,44	1,31	0,26	2,77	9,92
6											
MMP-3	28,8 ± 0,1	21,6 ± 0,3	25,9 ± 0,2	28,4 ± 0,0	27,3 ± 0,1	29,5 ± 0,1	28,5 ± 0,2	26,6 ± 0,1	27,3 ± 0,2	24,8 ± 0,1	23,3 ± 0,1
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		174,93	3,99	1,34	1,75		1,67	3,81	1,82	15,27	59,15
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		142 ± 212	12,2 ± 15,2	1,55 ± 1,76	5,97 ± 7,47		0,79 ± 0,46	1,54 ± 1,06	0,75 ± 0,59	5,67 ± 5,07	13,8 ± 20,7
Median		30,73	3,62	1,03	1,65		0,8	1,2	0,62	3,56	5,54
p-Wert		0,0313	0,2188	1	0,2188		0,2188	0,5625	0,2188	0,0313	0,1563
p-Wert nach FDR		0,31250	0,81250	1	0,81250		0,81250	0,93153	0,81250	0,31250	0,76651

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers MMP-3 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.16 Die mRNA-Expression von MMP-3 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1											
MMP-3	20,1 $\pm$ 0,0	26,5 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,3	20 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 0,4	19,1 $\pm$ 0,0	20 $\pm$ 0,0	18,2 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,2
GAPDH	19,8 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,2	18,5	18,4 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,29	1,28	1,25	1,08		0,62	0,33	0,68	0,47	0,48
2											
MMP-3	18,1 $\pm$ 0,1	19 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,2	18,7 $\pm$ 0,2	28,8 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,1	16,6 $\pm$ 0,1	19,7 $\pm$ 0,0	18,4 $\pm$ 0,1
GAPDH	19,4 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,1
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,25	0,51	0,33	0,21		0,00	1,44	2,78	0,94	1,53
3											
MMP-3	15,4 $\pm$ 0,1	15,8 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,2	15,5 $\pm$ 0,1	17,4 $\pm$ 0,0	16,2 $\pm$ 0,2	16,7 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	15,6 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,0	15,8 $\pm$ 0,1
GAPDH	16,7 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		9,78	0,75	0,81	0,18		186,93	0,77	1,73	1,4	1,36
4											
MMP-3	18,5 $\pm$ 0,2	31,4 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,3	18,9 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,1	17,4 $\pm$ 0,1	17,6 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,1	18,2 $\pm$ 0,1	16,7 $\pm$ 0,1
GAPDH	18,9 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,4	23,7 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,0	22,1 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,9
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		1,58	41,15	80,3	6,82		2,02	2,09	0,46	0,44	0,98
5											
MMP-3	17 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,2	16,7 $\pm$ 0,1	17,4 $\pm$ 0,1	17 $\pm$ 0,2	21,4 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,2	17,1 $\pm$ 0,2	16,4 $\pm$ 0,2	16,7 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,1
GAPDH	19,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,4
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,45	0,67	0,28	0,8		5,01	5,41	7,47	1,82	1,05
6											
MMP-3	16,8 $\pm$ 0,2	35 $\pm$ 0,0	16,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,1	17,8 $\pm$ 0,1	15,4 $\pm$ 0,0	16,6 $\pm$ 0,3	16,9 $\pm$ 0,0	16,5 $\pm$ 0,2	17 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,6
GAPDH	19 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,0	19,4 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,0
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,00	5,81	1	0,65		0,63	0,28	0,27	0,31	0,43
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}											
$\bar{x} \pm$ SD		2,06 $\pm$ 3,49	8,36 $\pm$ 14,8	14 $\pm$ 30	1,62 $\pm$ 2,35		32,5 $\pm$ 69,1	1,72 $\pm$ 1,77	2,23 $\pm$ 2,49	0,89 $\pm$ 0,56	0,97 $\pm$ 0,41
Median		0,37	1,01	0,9	0,72		1,33	1,11	1,2	0,7	1,02
p-Wert		0,4375	0,8438	1	0,5625		0,8438	1	0,8438	0,3125	0,8438
p-Wert nach FDR		0,93153	0,99265	1	0,93153		0,99265	1	0,99265	0,87366	0,99265

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers MMP-3 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für GAPDH bei CH-Alpha® bei Patient Nr. 1 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.17 Die mRNA-Expression von MMP-13 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
MMP-13	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	34,9 ± 0,1	35 ± 0,0	33,7 ± 0,6	35 ± 0,0	35 ± 0,0
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		1,14	0,5	0,29	0,39		0,34	0,61	0,74	0,62	0,87
2											
MMP-13	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	34,8 ± 0,3	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	34,6 ± 0,6	35 ± 0,0
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		0,71	0,87	0,41	0,42		1,34	0,8	1,36	0,82	1126,84
3											
MMP-13	35 ± 0,0	31,3 ± 0,8	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	33,8 ± 0,5	35 ± 0,0
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		14,29	1,1	1,22	0,68		0,75	0,28	63,08	2,12	0,37
4											
MMP-13	34,4 ± 0,4	28,4 ± 0,2	31,6 ± 0,2	35 ± 0,0	29 ± 0,1	35 ± 0,0	34,7 ± 0,2	30,9 ± 0,2	35 ± 0,0	34 ± 0,3	30,9 ± 0,0
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		38,93	28,04	64,99	47,47		0,07	0,7	0,01	0,29	0,33
5											
MMP-13	35 ± 0,0	29,7 ± 0,2	34,3 ± 0,6	34,1 ± 0,3	34 ± 0,2	35 ± 0,0	35 ± 0,0	33,6 ± 0,4	35 ± 0,0	35 ± 0,0	33,8 ± 0,2
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		71,37	3,99	2,32	5,15		0,5	0,35	0,22	0,52	0,58
6											
MMP-13	35 ± 0,0	32,5 ± 0,3	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	35 ± 0,0	33,8 ± 0,3
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		6,9	0,55	1,02	0,6		0,81	0,5	0,39	0,61	1,81
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		22,2 ± 25,5	5,84 ± 10	11,7 ± 23,8	9,12 ± 17,2		0,63 ± 0,4	0,54 ± 0,19	11 ± 23,31	0,83 ± 0,6	188 ± 420
Median		10,59	0,99	1,12	0,64		0,63	0,56	0,57	0,61	0,73
p-Wert		0,0938	0,8438	0,8438	1		0,1563	0,0313	0,5625	0,3125	0,8438
p-Wert nach FDR		0,69643	0,99265	0,99265	1		0,76651	0,31250	0,93153	0,87366	0,99265

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers MMP-13 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.18 Die mRNA-Expression von MMP-13 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1											
MMP-13	28,5 $\pm$ 0,1	34,9 $\pm$ 0,1	28,3 $\pm$ 0,1	28,4 $\pm$ 0,2	28,4 $\pm$ 0,2	28,1 $\pm$ 0,2	25,4 $\pm$ 0,1	27,8 $\pm$ 0,0	26 $\pm$ 0,1	27,3 $\pm$ 0,1	27,9 $\pm$ 0,0
GAPDH	19,8 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,2	18,5	18,4 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 0,3
2- $\Delta\Delta C_t$		0,28	1,24	1,13	1,07		2,96	0,55	1,16	0,75	0,64
2											
MMP-13	28,9 $\pm$ 0,1	28,7 $\pm$ 0,1	28,1 $\pm$ 0,1	27,3 $\pm$ 0,2	28,1 $\pm$ 0,2	28,6 $\pm$ 0,3	34,7 $\pm$ 0,0	28 $\pm$ 0,0	27,6 $\pm$ 0,2	28,9 $\pm$ 0,0	28,3 $\pm$ 0,1
GAPDH	19,4 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,1
2- $\Delta\Delta C_t$		0,52	0,64	0,62	0,35		0,02	1,43	1,29	1,46	1,51
3											
MMP-13	21,7 $\pm$ 0,1	22,5 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,2	22,1 $\pm$ 0,2	22,9 $\pm$ 0,7	22,7 $\pm$ 0,3	24,7 $\pm$ 0,2	23,4 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	23,1 $\pm$ 0,1	22,4 $\pm$ 0,2
GAPDH	16,7 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,3
2- $\Delta\Delta C_t$		8,01	0,94	0,67	0,33		65,21	0,7	1,46	1,66	1,35
4											
MMP-13	29,5 $\pm$ 0,4	35 $\pm$ 0,0	29,3 $\pm$ 0,0	29,7 $\pm$ 0,1	29,2 $\pm$ 0,2	28,6 $\pm$ 0,1	27,2 $\pm$ 0,0	28,3 $\pm$ 0,1	27,8 $\pm$ 0,2	28,3 $\pm$ 0,1	27,1 $\pm$ 0,0
GAPDH	18,9 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,4	23,7 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,0	22,1 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,9
2- $\Delta\Delta C_t$		263,44	31,06	127,73	10,47		5,58	3,2	0,83	0,96	1,92
5											
MMP-13	26,2 $\pm$ 0,1	24,7 $\pm$ 0,2	26 $\pm$ 0,2	27 $\pm$ 0,0	26,8 $\pm$ 0,0	31,5 $\pm$ 0,2	25,1 $\pm$ 0,1	25,9 $\pm$ 0,1	25,2 $\pm$ 0,1	25,8 $\pm$ 0,0	26 $\pm$ 0,0
GAPDH	19,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,4
2- $\Delta\Delta C_t$		0,83	0,7	0,22	0,56		16,6	12,59	18,39	3,57	2,54
6											
MMP-13	26 $\pm$ 0,0	26,2 $\pm$ 0,1	25,8 $\pm$ 0,1	26 $\pm$ 0,1	26,6 $\pm$ 0,0	25,9 $\pm$ 0,2	25,5 $\pm$ 0,0	26,2 $\pm$ 0,1	26,2 $\pm$ 0,0	26,1 $\pm$ 0,0	26,4 $\pm$ 0,0
GAPDH	19 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,0	19,4 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,0
2- $\Delta\Delta C_t$		1,88	4,55	1,29	0,89		1,89	0,63	0,49	0,79	0,95
2- $\Delta\Delta C_t$											
$\bar{x} \pm SD$		45,8 $\pm$ 97,4	6,52 $\pm$ 11,1	21,9 $\pm$ 47,3	2,28 $\pm$ 3,67		15,4 $\pm$ 22,9	3,18 $\pm$ 4,31	3,94 $\pm$ 6,47	1,53 $\pm$ 0,97	1,48 $\pm$ 0,62
Median		1,36	1,09	0,9	0,73		4,27	1,06	1,22	1,21	1,43
p-Wert		0,6875	0,6875	0,8438	0,5625		0,3125	0,8438	0,5625	0,4375	0,3125
p-Wert nach FDR		0,98214	0,98214	0,99265	0,93153		0,87366	0,99265	0,93153	0,93153	0,87366

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers MMP-13 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2- $\Delta\Delta C_t$ -Werte; die Zusammenfassung der 2- $\Delta\Delta C_t$ -Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median ($n = 6$); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für GAPDH bei CH-Alpha® bei Patient Nr. 1 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.19 Die mRNA-Expression von PRG4 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
PRG4	21,4 ± 0,0	20,9 ± 0,4	21,7 ± 0,2	21,4 ± 0,1	21,7 ± 0,0	22 ± 0,1	20,1 ± 0,2	21,7 ± 0,3	19,7 ± 0,0	21,1 ± 0,1	21,7 ± 0,1
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		1,66	0,41	0,28	0,32		1,21	0,79	1,47	1,22	1,1
2											
PRG4	20,5 ± 0,0	20,9 ± 0,1	20,1 ± 0,1	20,3 ± 0,1	19,8 ± 0,1	20,6 ± 0,0	21,2 ± 0,0	20,7 ± 0,3	20,4 ± 0,1	20 ± 0,0	35 ± 0,0
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		0,54	1,12	0,45	0,57		0,91	0,78	1,23	1,26	0,05
3											
PRG4	19,7 ± 0,1	20,6 ± 0,3	21,5 ± 0,9	20,2 ± 0,1	20 ± 0,1	20,2 ± 0,4	19,4 ± 0,9	19,3 ± 0,1	26,7 ± 0,2	20 ± 0,2	20,1 ± 0,7
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		0,56	0,32	0,83	0,54		1,38	0,54	0,7	1,05	0,4
4											
PRG4	20,7 ± 0,0	21,3 ± 0,1	21 ± 0,2	31,9 ± 0,5	21 ± 0,1	23,7 ± 0,0	20,9 ± 0,1	21,6 ± 0,3	21,2 ± 0,1	22,1 ± 0,1	22,1 ± 0,3
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		0,4	3,42	0,04	0,96		0,4	0,18	0,06	0,47	0,06
5											
PRG4	21,8 ± 0,1	21,2 ± 0,1	21 ± 0,2	20,7 ± 0,0	21,5 ± 0,1	21,8 ± 0,1	20,7 ± 0,1	21 ± 0,2	21,6 ± 0,1	22,1 ± 0,1	21,4 ± 0,0
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		2,68	4,22	2,63	3,04		1,05	0,24	0,25	0,43	0,34
6											
PRG4	22,6 ± 0,1	22,5 ± 0,3	22,2 ± 0,2	22,8 ± 0,1	22,9 ± 0,0	23,3 ± 0,1	21,8 ± 0,0	23 ± 0,3	22,6 ± 0,1	23,2 ± 0,1	23,4 ± 0,2
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		1,32	0,7	0,88	0,5		2,15	0,58	0,59	0,61	0,72
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		1,19 ± 0,81	1,7 ± 1,54	0,85 ± 0,85	0,99 ± 0,94		1,18 ± 0,53	0,52 ± 0,24	0,72 ± 0,5	0,84 ± 0,35	0,44 ± 0,37
Median		0,94	0,91	0,64	0,55		1,13	0,56	0,65	0,83	0,37
p-Wert		0,8438	0,8438	0,2188	0,3125		0,6875	0,0313	0,2188	0,4375	0,0625
p-Wert nach FDR		0,99265	0,99265	0,81250	0,87366		0,98214	0,31250	0,81250	0,93153	0,52419

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers PRG4 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.20 Die mRNA-Expression von PRG4 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1											
PRG4	22,3 $\pm$ 0,1	28,8 $\pm$ 0,3	22,2 $\pm$ 0,0	21,7 $\pm$ 0,1	20,9 $\pm$ 0,2	22,6 $\pm$ 0,0	21,3 $\pm$ 0,0	21,5 $\pm$ 0,3	20,8 $\pm$ 0,1	21,3 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,1
GAPDH	19,8 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,2	18,5	18,4 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,26	1,16	1,62	2,58		1,17	0,95	0,92	1,09	1,08
2											
PRG4	20,3 $\pm$ 0,1	20,6 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,0	20 $\pm$ 0,1	20,9 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,0	20,7 $\pm$ 0,1	19,9 $\pm$ 0,1	21,9 $\pm$ 0,2	20,8 $\pm$ 0,2
GAPDH	19,4 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,1
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,36	0,46	0,29	0,24		2,02	1	1,29	0,88	1,23
3											
PRG4	18,5 $\pm$ 0,2	18,9 $\pm$ 0,1	18,5 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	19,4 $\pm$ 0,1	19,7 $\pm$ 0,0	19,7 $\pm$ 0,6	19,3 $\pm$ 0,3	18,8 $\pm$ 0,1	19,2 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,1
GAPDH	16,7 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		10,59	1,38	0,97	0,4		254,43	1,48	2	2,99	1,95
4											
PRG4	22,3 $\pm$ 0,0	34,3 $\pm$ 0,2	21,9 $\pm$ 0,1	22,9 $\pm$ 0,0	22,2 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,1	22,1 $\pm$ 0,0	21,5 $\pm$ 0,1
GAPDH	18,9 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,4	23,7 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,0	22,1 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,9
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		2,87	35,27	97,51	9,49		3,11	2,12	0,49	0,6	0,77
5											
PRG4	21 $\pm$ 0,1	20 $\pm$ 0,0	20,5 $\pm$ 0,1	21,1 $\pm$ 0,1	20,8 $\pm$ 0,2	25,5 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,1	21,5 $\pm$ 0,1	19,9 $\pm$ 0,1	20,8 $\pm$ 0,1	21,4 $\pm$ 0,2
GAPDH	19,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,4
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,54	0,76	0,34	0,95		9,94	3,95	10,54	1,77	0,91
6											
PRG4	22 $\pm$ 0,0	22,1 $\pm$ 0,0	21,5 $\pm$ 0,2	22,3 $\pm$ 0,1	22,6 $\pm$ 0,1	22,5 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	22,7 $\pm$ 0,1	22,4 $\pm$ 0,0	22,8 $\pm$ 0,1	23,1 $\pm$ 0,2
GAPDH	19 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,0	19,4 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,0
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		1,95	5,33	1,04	0,87		1,61	0,69	0,62	0,78	0,91
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}											
$\bar{x} \pm SD$		2,76 $\pm$ 3,62	7,4 $\pm$ 12,57	17 $\pm$ 36,03	2,42 $\pm$ 3,25		45,4 $\pm$ 93,5	1,7 $\pm$ 1,11	2,64 $\pm$ 3,56	1,35 $\pm$ 0,82	1,14 $\pm$ 0,39
Median		1,24	1,27	1,01	0,91		2,56	1,24	1,1	0,99	1
p-Wert		0,8438	0,4375	1	1		0,0313	0,4375	0,8438	0,8438	1
p-Wert nach FDR		0,99265	0,93153	1	1		0,31250	0,93153	0,99265	0,99265	1

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers PRG4 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für GAPDH bei CH-Alpha® bei Patient Nr. 1 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.21 Die mRNA-Expression von TIMP-1 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
TIMP-1	18,6 ± 0,1	18,6 ± 0,1	18,8 ± 0,4	18 ± 0,1	18,3 ± 0,2	19 ± 0,2	16,8 ± 0,4	17,9 ± 0,2	17 ± 0,3	17,7 ± 0,0	18,1 ± 0,4
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		1,13	0,41	0,42	0,45		1,45	1,30	1,22	1,54	1,68
2											
TIMP-1	18,4 ± 0,1	18,3 ± 0,2	17,9 ± 0,1	18 ± 0,1	17,4 ± 0,1	18 ± 0,0	18,6 ± 0,1	18 ± 0,3	18,1 ± 0,1	17,7 ± 0,1	33,3 ± 0,8
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		0,72	1,18	0,52	0,7		0,89	0,83	0,95	1	0,03
3											
TIMP-1	18,3 ± 0,0	18,6 ± 0,1	19,7 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,6 ± 0,1	18,7 ± 0,1	18,3 ± 0,1	18,2 ± 0,3	25,9 ± 0,1	18,4 ± 0,1	18,7 ± 0,1
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		0,89	0,42	0,81	0,58		0,99	0,37	0,43	1,08	0,37
4											
TIMP-1	19,5 ± 0,0	19,2 ± 0,1	20,1 ± 0,3	33,8 ± 0,5	19,4 ± 0,1	24 ± 0,1	20,1 ± 0,1	19,9 ± 0,2	19,1 ± 0,1	21,4 ± 0,1	19,5 ± 0,1
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		0,7	2,57	0,0	1,18		0,85	0,7	0,35	0,95	0,45
5											
TIMP-1	20,6 ± 0,1	20 ± 0,2	20,3 ± 0,4	19,6 ± 0,2	20,4 ± 0,1	20 ± 0,1	19,8 ± 0,1	18,7 ± 0,3	19,4 ± 0,0	19,7 ± 0,2	19,6 ± 0,2
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		2,73	3,03	2,5	2,94		0,56	0,31	0,33	0,61	0,34
6											
TIMP-1	20 ± 0,0	20 ± 0,1	19,6 ± 0,3	20 ± 0,1	19,4 ± 0,1	20,8 ± 0,2	19,7 ± 0,2	19,5 ± 0,4	19,1 ± 0,3	19,3 ± 0,2	19,5 ± 0,2
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		1,14	0,7	1,02	0,89		1,76	1,21	1,23	1,69	1,91
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		1,22 ± 0,7	1,39 ± 1,04	0,88 ± 0,79	1,12 ± 0,84		1,08 ± 0,4	0,79 ± 0,38	0,75 ± 0,39	1,15 ± 0,36	0,79 ± 0,72
Median		1,01	0,94	0,67	0,8		0,94	0,77	0,69	1,04	0,41
p-Wert		1	0,8438	0,4375	0,6875		0,8438	0,3125	0,3125	0,6875	0,1563
p-Wert nach FDR		1	0,99265	0,93153	0,98214		0,99265	0,87366	0,87366	0,98214	0,76651

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers TIMP-1 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.22 Die mRNA-Expression von TIMP-1 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1											
TIMP-1	18,4 $\pm$ 0,1	24,1 $\pm$ 0,0	17,9 $\pm$ 0,2	17,8 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,0	16,9 $\pm$ 0,1	17,2 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,1	16,7 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,1
GAPDH	19,8 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,2	18,5	18,4 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,47	1,52	1,61	2,04		0,97	0,79	0,67	1,07	1,06
2											
TIMP-1	18,7 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,9 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,9 $\pm$ 0,1	17,9 $\pm$ 0,2	17 $\pm$ 0,1	19,1 $\pm$ 0,3	18,1 $\pm$ 0,2
GAPDH	19,4 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,1
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,63	0,68	0,47	0,54		1,44	1,19	1,54	1,06	1,39
3											
TIMP-1	17,5 $\pm$ 0,2	19,1 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,0	18 $\pm$ 0,1	18,2 $\pm$ 0,1	20,9 $\pm$ 0,0	18 $\pm$ 0,1	17,2 $\pm$ 0,1	17,9 $\pm$ 0,0	17,9 $\pm$ 0,1
GAPDH	16,7 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		4,7	1,82	0,97	0,53		38,78	1,23	2,05	2,6	1,28
4											
TIMP-1	19 $\pm$ 0,1	35 $\pm$ 0,0	19,8 $\pm$ 0,1	25,1 $\pm$ 0,5	19,3 $\pm$ 0,1	19,2 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,1	18,9 $\pm$ 0,0	18,8 $\pm$ 0,1	18,6 $\pm$ 0,1
GAPDH	18,9 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,4	23,7 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,0	22,1 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,9
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,18	15,85	2,16	7,2		1,78	2	0,59	1,1	1,02
5											
TIMP-1	19,7 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,1	19,3 $\pm$ 0,1	19,7 $\pm$ 0,1	19,7 $\pm$ 0,0	23,6 $\pm$ 0,1	19,3 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,1	19,1 $\pm$ 0,0	18,8 $\pm$ 0,1	18,9 $\pm$ 0,2
GAPDH	19,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,4
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,52	0,74	0,36	0,83		3,85	3,42	5,16	1,94	1,37
6											
TIMP-1	19 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,1	18,2 $\pm$ 0,2	18,9 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,1	18,5 $\pm$ 0,4	18,8 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,2	18,4 $\pm$ 0,2	18,9 $\pm$ 0,2
GAPDH	19 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,0	19,4 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,0
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		2,3	6,3	1,3	1,47		1,87	0,78	0,96	1,29	1,33
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}											
$\bar{x} \pm SD$		1,47 $\pm$ 1,6	4,49 $\pm$ 5,43	1,15 $\pm$ 0,63	2,1 $\pm$ 2,34		8,12 $\pm$ 13,7	1,57 $\pm$ 0,92	1,83 $\pm$ 1,57	1,51 $\pm$ 0,58	1,24 $\pm$ 0,15
Median		0,57	1,67	1,14	1,15		1,82	1,21	1,25	1,19	1,31
p-Wert		0,8438	0,1563	1	0,6875		0,0625	0,5625	0,5625	0,0313	0,0313
p-Wert nach FDR		0,99265	0,76651	1	0,98214		0,52419	0,93153	0,93153	0,31250	0,31250

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers TIMP-1 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für GAPDH bei CH-Alpha® bei Patient Nr. 1 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.23 Die mRNA-Expression von TIMP-3 in Gegenwart von verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N	Kontrolle 2	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1											
TIMP-3	19,8 ± 0,3	19,1 ± 0,1	19,8 ± 0,4	19,1 ± 0,1	19,7 ± 0,0	19,5 ± 0,2	17,8 ± 0,1	19,4 ± 0,3	17,8 ± 0,1	18,9 ± 0,1	19,6 ± 0,1
GAPDH	20,4 ± 0,1	20,6 ± 0,1	19,4 ± 0,5	18,6 ± 0,1	19 ± 0,2	19,2 ± 0,2	17,5 ± 0,4	18,4 ± 0,1	17,4 ± 0,2	18,5 ± 0,1	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		1,95	0,52	0,49	0,44		1,05	0,67	0,98	0,94	0,84
2											
TIMP-3	19,2 ± 0,1	19,8 ± 0,0	19,3 ± 0,3	18,8 ± 0,1	18,5 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,9 ± 0,0	19,7 ± 0,3	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,1	35 ± 0,0
GAPDH	19,8 ± 0,1	19,3 ± 0,1	19,6 ± 0,5	18,5 ± 0,0	18,3 ± 0,2	19,2 ± 0,2	19,6 ± 0,4	18,9 ± 0,3	19,2 ± 0,1	18,9 ± 0,1	29,3 ± 0,6
2 ^{-ΔΔCt}		0,47	0,81	0,56	0,58		0,85	0,59	0,98	0,67	0,02
3											
TIMP-3	18,1 ± 0,0	18,9 ± 0,1	19,5 ± 0,3	18,8 ± 0,1	18,7 ± 0,1	18,2 ± 0,1	18,3 ± 0,0	18,5 ± 0,2	25,6 ± 0,0	19 ± 0,1	18,6 ± 0,1
GAPDH	18,8 ± 0,3	18,9 ± 0,1	18,9 ± 0,4	19,1 ± 0,1	18,2 ± 0,2	20,4 ± 0,3	20 ± 0,5	18,5 ± 0,0	26,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	18,9 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		0,62	0,4	0,73	0,45		0,67	0,22	0,35	0,51	0,27
4											
TIMP-3	18,8 ± 0,0	19,9 ± 0,1	20,2 ± 0,4	28,1 ± 0,1	19,9 ± 0,0	21,6 ± 0,2	19,8 ± 0,1	19,7 ± 0,4	19,3 ± 0,1	20,3 ± 0,1	20,8 ± 0,2
GAPDH	24,2 ± 0,1	23,4 ± 0,4	26,2 ± 0,5	30,8 ± 0,1	24,4 ± 0,1	29,1 ± 0,4	24,9 ± 0,3	24,4 ± 0,1	22,6 ± 0,1	26,4 ± 0,2	23,4 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		0,26	1,51	0,15	0,5		0,2	0,14	0,05	0,36	0,03
5											
TIMP-3	20,2 ± 0,0	20,4 ± 0,1	19,8 ± 0,4	19,6 ± 0,0	20,4 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,4 ± 0,2	19 ± 0,2	19,5 ± 0,1	20 ± 0,1	19,4 ± 0,3
GAPDH	20,7 ± 0,1	21,6 ± 0,2	21,9 ± 0,5	21 ± 0,2	22 ± 0,1	21,4 ± 0,4	20,5 ± 0,4	18,5 ± 0,2	19,3 ± 0,1	20,5 ± 0,3	19,5 ± 0,4
2 ^{-ΔΔCt}		1,66	3,2	1,92	2,23		0,89	0,3	0,36	0,61	0,45
6											
TIMP-3	19,4 ± 0,1	20,1 ± 0,1	19,7 ± 0,5	20 ± 0,0	20 ± 0,0	20,1 ± 0,1	19,4 ± 0,3	20,1 ± 0,3	19,7 ± 0,1	20,6 ± 0,0	20,6 ± 0,3
GAPDH	20 ± 0,4	20,3 ± 0,2	19,2 ± 0,4	20,1 ± 0,1	19,3 ± 0,1	20,2 ± 0,2	19,9 ± 0,4	19,2 ± 0,1	18,8 ± 0,1	19,4 ± 0,2	19,8 ± 0,3
2 ^{-ΔΔCt}		0,72	0,44	0,67	0,4		1,36	0,5	0,54	0,44	0,57
2 ^{-ΔΔCt}											
$\bar{x} \pm SD$		0,95 ± 0,63	1,15 ± 0,99	0,75 ± 0,55	0,77 ± 0,66		0,84 ± 0,36	0,4 ± 0,19	0,55 ± 0,34	0,59 ± 0,19	0,36 ± 0,29
Median		0,67	0,67	0,62	0,48		0,87	0,4	0,45	0,56	0,36
p-Wert		0,5625	0,6875	0,2188	0,2188		0,3125	0,0313	0,0313	0,0313	0,0313
p-Wert nach FDR		0,93153	0,98214	0,81250	0,81250		0,87366	0,31250	0,31250	0,31250	0,31250

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers TIMP-3 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{-ΔΔCt}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{-ΔΔCt}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR).

Tab. 11.3.1.24 Die mRNA-Expression von TIMP-3 in Gegenwart von 10 ng/ml IL-1 β und verschiedenen Kollagenhydrolysaten (2,0 mg/ml)

Patient Primer	Kontrolle 1 + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β	Kontrolle 2 + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1											
TIMP-3	20,9 $\pm$ 0,1	26,5 $\pm$ 0,2	20,6 $\pm$ 0,2	20,2 $\pm$ 0,1	19,7 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,2	19,3 $\pm$ 0,0	19,7 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,0
GAPDH	19,8 $\pm$ 0,2	24,4 $\pm$ 0,2	19,9 $\pm$ 0,3	19,9 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,2	18,5	18,4 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,4	18,4 $\pm$ 0,2	18,8 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,5	1,38	1,71	2,26		1,27	1,18	0,9	1,11	1,12
2											
TIMP-3	19,8 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,0	19 $\pm$ 0,3	19 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,0	19,8 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,3	19,8 $\pm$ 0,2	19,1 $\pm$ 0,1	20,8 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,1
GAPDH	19,4 $\pm$ 0,3	18,3 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,2	17,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,2	17,5 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,2	17,4 $\pm$ 0,0	16,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,1
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,56	0,66	0,37	0,33		2,61	0,93	1,07	0,91	1,01
3											
TIMP-3	16,3 $\pm$ 0,1	17,2 $\pm$ 0,0	16,3 $\pm$ 0,2	16,2 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,0	17,1 $\pm$ 0,1	18,9 $\pm$ 0,2	17,1 $\pm$ 0,0	16,9 $\pm$ 0,1	17,1 $\pm$ 0,1	16,6 $\pm$ 0,2
GAPDH	16,7 $\pm$ 0,1	20,5 $\pm$ 0,1	17,3 $\pm$ 0,2	16,5 $\pm$ 0,1	16,3 $\pm$ 0,5	16,6 $\pm$ 0,0	24,7 $\pm$ 0,2	16,8 $\pm$ 0,1	16,8 $\pm$ 0,1	17,7 $\pm$ 0,3	16,7 $\pm$ 0,3
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		7,49	1,4	0,93	0,43		76,36	1,14	1,28	2,11	1,52
4											
TIMP-3	18,6 $\pm$ 0,1	31,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	19,3 $\pm$ 0,1	18,7 $\pm$ 0,1	18,6 $\pm$ 0,2	18,4 $\pm$ 0,1	18,6 $\pm$ 0,1	18,7 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,1	18,3 $\pm$ 0,1
GAPDH	18,9 $\pm$ 0,0	32,5 $\pm$ 0,4	23,7 $\pm$ 0,2	26,1 $\pm$ 0,0	22,1 $\pm$ 0,1	22,3 $\pm$ 0,1	23,4 $\pm$ 0,2	23,7 $\pm$ 0,1	21,2 $\pm$ 0,1	22 $\pm$ 0,1	21,7 $\pm$ 0,9
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		1,99	27,61	86,2	7,76		2,4	2,56	0,44	0,66	0,84
5											
TIMP-3	18,8 $\pm$ 0,2	17,6 $\pm$ 0,1	18,2 $\pm$ 0,2	18,3 $\pm$ 0,1	18,9 $\pm$ 0,0	22,5 $\pm$ 0,1	18 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 0,2	17,7 $\pm$ 0,0	18,3 $\pm$ 0,1	18,6 $\pm$ 0,0
GAPDH	19,9 $\pm$ 0,1	18,1 $\pm$ 0,0	19,1 $\pm$ 0,2	18,5 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,3	21,8 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,8 $\pm$ 0,2	19,6 $\pm$ 0,3	17,9 $\pm$ 0,0	17,5 $\pm$ 0,4
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		0,65	0,88	0,52	0,77		4,5	2,16	6,3	1,28	0,82
6											
TIMP-3	19,2 $\pm$ 0,1	19,5 $\pm$ 0,1	18,7 $\pm$ 0,1	19,2 $\pm$ 0,1	19,4 $\pm$ 0,1	19,7 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,1	19,8 $\pm$ 0,1	19,6 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,2
GAPDH	19 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,2	21 $\pm$ 0,5	19,4 $\pm$ 0,2	19,4 $\pm$ 0,2	19,5 $\pm$ 0,1	20,1 $\pm$ 0,3	19,1 $\pm$ 0,1	18,8 $\pm$ 0,0	19,4 $\pm$ 0,2	20 $\pm$ 0,0
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}		1,63	5,42	1,26	1,11		1,59	0,7	0,65	0,72	1,02
2 ^{-$\Delta\Delta$Ct}											
$\bar{x} \pm SD$		2,14 $\pm$ 2,46	6,23 $\pm$ 9,7	15,2 $\pm$ 31,8	2,11 $\pm$ 2,6		14,8 $\pm$ 27,6	1,45 $\pm$ 0,68	1,77 $\pm$ 2,04	1,13 $\pm$ 0,49	1,05 $\pm$ 0,23
Median		1,14	1,39	1,1	0,94		2,5	1,16	0,98	1,01	1,01
p-Wert		0,8438	0,3125	1	1		0,0313	0,3125	1	1	0,8438
p-Wert nach FDR		0,99265	0,87366	1	1		0,31250	0,87366	1	1	0,99265

Dargestellt sind die Ct-Werte als arithmetisches Mittel mit Standardabweichung der Triplikate des Primers TIMP-3 und des Primers GAPDH sowie die daraus errechneten 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte; die Zusammenfassung der 2^{- $\Delta\Delta$ Ct}-Werte als arithmetischer Mittelwert ($\bar{x}$) mit Standardabweichung (SD) sowie der Median (n = 6); die p-Werte des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests und die p-Werte nach der Adjustierung mittels der False Discovery Rate (FDR). Für GAPDH bei CH-Alpha® bei Patient Nr. 1 gab es nur einen Wert.

Tab. 11.3.1.25 Übersicht über die Auswertung der Morphologie der Zellen im Hauptversuch

Zeitpunkt	Variante	Ergebnis				
		Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5
Vor Adaption		Wert 0 in allen KH-Varianten und Kontrollen				
Nach Adaption		Wert 0 in allen KH-Varianten und Kontrollen				
Versuchsende	Nährmedium 1	0	0	1	0	0
	RDH	0	0	0	0	0
	RDH-N	0	0	0	0	0
	FGH	0	0	0	0	0
	FGH-N	0	0	1	0	1
	Nährmedium 2	0	0	1	0	0
	CH-Alpha®	0	0	0	0	0
	Mobiforte®	0	1	0	0	0
	PCH	0	0	0	0	0
	PCH-N	0	0	0	0	0
	Norland-HFC	0	0	0	0	0

Übersicht über die morphologische Auswertung der Zellen aus dem Hauptversuch. Es wurden die Zellkulturen von 5 Patienten ausgewertet. Jede KH-Variante bzw. Kontrolle entstammte dabei einem eigenem Well (s. Tab. 11.3.1 Belegungsplan der 6-Well Platten im Hauptversuch). Es gab bei keiner Zellkultur morphologische Veränderungen vor oder nach der Adaption an das veränderte Nährmedium mit verringertem FCS-Gehalt. Bei drei Zellkulturen zeigten sich nach dem Versuch in insgesamt 5 Fällen leichte Veränderungen, die die Zuordnung des Wertes 1 rechtfertigten. Diese leicht veränderte Morphologie trat bei verschiedenen Kollagenhydrolysaten und den Kontrollen auf.

11.3.2 Qualitätskontrolle

11.3.2.1 RNA A260/A280-Quotient

Tab. 11.3.2.1.1 Die Reinheit der RNA von synovialen Fibroblasten nach der Behandlung mit Kollagenhydrolysaten

Patient	Kontrolle + IL-1 β	RDH + IL-1 β	RDH-N + IL-1 β	FGH + IL-1 β	FGH-N + IL-1 β
1	1,76	2,05	1,76	1,68	1,69
2	1,89	1,8	1,88	1,86	1,88
3	1,8	1,72	1,71	1,78	1,73
4	1,61	1,62	1,6	1,62	1,61
5	1,75	1,75	1,71	1,77	1,72
6	1,57	1,55	1,41	1,58	1,5

Dargestellt ist der A260/A280-Quotient der RNA der synovialen Fibroblasten, die nach der Belegung der 6-Well Platten auf Platte 1 lagen. Die Analyse der RNA erfolgte nach Kapitel 2.2.1.6 mit dem BioPhotometer® bzw. dem NanoDrop® 1000 Spectrophotometer.

Tab. 11.3.2.1.2 Die Reinheit der RNA von synovialen Fibroblasten nach der Behandlung mit Kollagenhydrolysaten

Patient	Kontrolle	RDH	RDH-N	FGH	FGH-N
1	1,75	1,65	1,7	1,7	1,68
2	1,87	1,82	1,79	1,82	1,8
3	1,75	1,76	1,7	1,68	1,71
4	1,7	1,59	1,56	1,64	1,59
5	1,76	1,75	1,74	1,74	1,67
6	1,56	1,55	1,52	1,53	1,49

Dargestellt ist der A260/A280-Quotient der RNA der synovialen Fibroblasten, die nach der Belegung der 6-Well Platten auf Platte 2 lagen. Die Analyse der RNA erfolgte nach Kapitel 2.2.1.6 mit dem BioPhotometer® bzw. dem NanoDrop® 1000 Spectrophotometer.

Tab. 11.3.2.1.3 Die Reinheit der RNA von synovialen Fibroblasten nach der Behandlung mit Kollagenhydrolysaten

Patient	Kontrolle + IL-1 β	CH-Alpha® + IL-1 β	Mobiforte® + IL-1 β	PCH + IL-1 β	PCH-N + IL-1 β	N-HFC + IL-1 β
1	1,74	1,83	1,69	1,72	1,77	1,71
2	1,89	1,85	1,84	1,89	1,83	1,86
3	1,71	1,73	1,69	1,74	1,77	1,78
4	1,6	1,59	1,62	1,56	1,68	1,61
5	1,63	1,75	1,74	1,77	1,76	1,72
6	1,52	1,55	1,63	1,55	1,56	1,56

Dargestellt ist der A260/A280-Quotient der RNA der synovialen Fibroblasten, die nach der Belegung der 6-Well Platten auf Platte 4 lagen. Die Analyse der RNA erfolgte nach Kapitel 2.2.1.6 mit dem BioPhotometer® bzw. dem NanoDrop® 1000 Spectrophotometer.

Tab. 11.3.2.1.4 Die Reinheit der RNA von synovialen Fibroblasten nach der Behandlung mit Kollagenhydrolysaten

Patient	Kontrolle	CH-Alpha®	Mobiforte®	PCH	PCH-N	N-HFC
1	1,74	1,74	1,66	1,65	1,74	1,72
2	1,83	1,98	1,82	1,88	1,87	1,86
3	1,73	1,72	1,78	1,64	1,7	1,69
4	1,63	1,64	1,67	1,51	1,59	1,63
5	1,69	1,72	1,73	1,68	1,72	1,74
6	1,55	1,56	1,58	1,5	1,57	1,54

Dargestellt ist der A260/A280-Quotient der RNA der synovialen Fibroblasten, die nach der Belegung der 6-Well Platten auf Platte 5 lagen. Die Analyse der RNA erfolgte nach Kapitel 2.2.1.6 mit dem BioPhotometer® bzw. dem NanoDrop® 1000 Spectrophotometer.

11.3.2.2 RNA-Gehalt

Tab. 11.3.2.2.1 Die RNA-Konzentration von synovialen Fibroblasten nach der Behandlung mit Kollagenhydrolysaten

Patient	Kontrolle + IL-1 β [μ g/ml]	RDH + IL-1 β [μ g/ml]	RDH-N + IL-1 β [μ g/ml]	FGH + IL-1 β [μ g/ml]	FGH-N + IL-1 β [μ g/ml]
1	291	8,8	173,6	202	94,8
2	357,3	412	332	254,5	253,5
3	132,9	88,7	112	131,1	187,9
4	167	183	162	148	186
5	163,7	144,9	189,4	345,4	199,7
6	144	163	31	202	156

Dargestellt ist die RNA-Konzentration der synovialen Fibroblasten, die nach der Belegung der 6-Well Platten auf Platte 1 lagen, in μ g RNA pro ml RNase-freiem Wasser. Die Analyse der RNA erfolgte nach Kapitel 2.2.1.6 mit dem BioPhotometer® bzw. dem NanoDrop® 1000 Spectrophotometer.

Tab. 11.3.2.2.2 Die RNA-Konzentration von synovialen Fibroblasten nach der Behandlung mit Kollagenhydrolysaten

Patient	Kontrolle [μ g/ml]	RDH [μ g/ml]	RDH-N [μ g/ml]	FGH [μ g/ml]	FGH-N [μ g/ml]
1	188,1	50,3	66,4	32,5	248,2
2	346,1	283,4	273	324,7	260,6
3	112,6	211,1	320,4	199,4	204,2
4	116	126	157	166	201
5	257,8	170	118,7	147,3	162,1
6	189	149	167	111	206

Dargestellt ist die RNA-Konzentration der synovialen Fibroblasten, die nach der Belegung der 6-Well Platten auf Platte 2 lagen, in μ g RNA pro ml RNase-freiem Wasser. Die Analyse der RNA erfolgte nach Kapitel 2.2.1.6 mit dem BioPhotometer® bzw. dem NanoDrop® 1000 Spectrophotometer.

Tab. 11.3.2.2.3 Die RNA-Konzentration von synovialen Fibroblasten nach der Behandlung mit Kollagenhydrolysaten

Patient	Kontrolle + IL-1 β [μ g/ml]	CH-Alpha® + IL-1 β [μ g/ml]	Mobiforte® + IL-1 β [μ g/ml]	PCH + IL-1 β [μ g/ml]	PCH-N + IL-1 β [μ g/ml]	N-HFC + IL-1 β [μ g/ml]
1	155,7	120,5	147,8	69	146,5	139,3
2	454,3	323	328,8	381,7	394,4	407,8
3	135,2	148	215,5	99,8	119,4	106,2
4	124	114	169	133	170	129
5	54	260,9	192,7	230,8	186,7	179,8
6	96	149	128	175	98	137

Dargestellt ist die RNA-Konzentration der synovialen Fibroblasten, die nach der Belegung der 6-Well Platten auf Platte 4 lagen, in μ g RNA pro ml RNase-freiem Wasser. Die Analyse der RNA erfolgte nach Kapitel 2.2.1.6 mit dem BioPhotometer® bzw. dem NanoDrop® 1000 Spectrophotometer.

Tab. 11.3.2.2.4 Die RNA-Konzentration von synovialen Fibroblasten nach der Behandlung mit Kollagenhydrolysaten

Patient	Kontrolle [μ g/ml]	CH-Alpha® [μ g/ml]	Mobiforte® [μ g/ml]	PCH [μ g/ml]	PCH-N [μ g/ml]	N-HFC [μ g/ml]
1	98,6	79,2	177,1	39,7	160,4	186,3
2	270,1	438,2	253	269	244,8	266,1
3	148,1	140,3	128,7	30	163,1	204,9
4	147	113	106	131	117	179
5	148,8	175,5	171,2	171,8	153,9	152,3
6	112	114	137	134	110	105

Dargestellt ist die RNA-Konzentration der synovialen Fibroblasten, die nach der Belegung der 6-Well Platten auf Platte 5 lagen, in μ g RNA pro ml RNase-freiem Wasser. Die Analyse der RNA erfolgte nach Kapitel 2.2.1.6 mit dem BioPhotometer® bzw. dem NanoDrop® 1000 Spectrophotometer.

12 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, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. 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.“

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Ich möchte mich ganz besonders bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. J. Steinmeyer bedanken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, diese Dissertation zu verfassen. Weiterhin bedanke ich mich für seine stetige intensive Unterstützung und dafür, dass er immer bei allen Fragen und Problemen rasch erreichbar war.

Mein weiterer besonderer Dank gilt Frau A. Staubitz, die mich in die Labortechniken eingearbeitet und mich bei meinen Experimenten unterstützt hat und stets eine zuverlässige Ansprechpartnerin war.

Des Weiteren bedanke ich mich bei meinen Kollegen aus dem Labor Frau C. Hild, Frau M. Kosinska und Frau K. Sluzalska für deren Hilfestellungen und Anregungen.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. M. Rickert und seinem Team für die unkomplizierte und wohlwollende Zusammenarbeit im Rahmen der Probengewinnung.

Ich bedanke mich bei Herrn Dr. J. Wilhelm, für seine Unterstützung in Fragen der qRT-PCR.

Ich bedanke mich bei Frau M. Lohmeyer aus dem Infektionslabor des Universitätsklinikums Gießen und Marburg GmbH dafür, dass sie für uns die Durchflusszytometrien durchgeführt hat.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Dr. J. Pons-Kühnemann und Frau C. Scheibelhut aus dem Institut für Medizinische Informatik für die statistische Beratung bedanken.

Abschließend möchte ich mich bei meiner Familie bedanken, die mich in dieser langen und intensiven Zeit stets unterstützt hat.