

**Zur Knorpelprotektion von *Harpagophytum procumbens* DC**  
Histologische, zellbiologische und molekularbiologische Untersuchungen

**INAUGURAL – DISSERTATION**

zur

Erlangung des Zahnmedizinischen Doktorgrades  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Vorgelegt von Chrubasik Julia  
aus Offenbach am Main

Gießen 2006

**Aus dem Lehrstuhl für Innere Medizin mit Schwerpunkt Rheumatologie  
der Justus-Liebig Universität Giessen  
Abteilungsdirektor: Prof. Dr. U. Müller-Ladner**

**Gutachter: Prof. Dr. U. Müller-Ladner**

**Gutachter: Prof. Dr. S. Pollak**

**Tag der Disputation: 20 Juni 2006**

Im Zusammenhang mit dieser Arbeit stehende Publikationen und Abstrakts:

Chrubasik JE, Lindhorst E, Neumann E, Gerlach U, Faller-Marquardt M, Torda T, Müller-Ladner U, Chrubasik S. Potential molecular basis of the chondroprotective effect of *Harpagophytum procumbens*. *Phytomedicine* 2006;13:598-600

Chrubasik JE, Müller-Ladner U. Behandlungsstrategie bei Arthrose unter Berücksichtigung der pflanzlichen Entzündungshemmer. *Ars Medici* 2006;19:293-26

Chrubasik JE, Roufogalis BD, Chrubasik S. Evidence of effectiveness of herbal anti-inflammatory drugs in the treatment of painful osteoarthritis including low back pain. *Zur Publikation eingereicht*

Chrubasik JE. Wirksamkeit pflanzlicher Schmerzmittel bei Gelenk- und Rückenschmerzen. *6. Davoser Tag, 2006, Davos, Schweiz*

Chrubasik JE, Neumann E, Lindhorst E, Chrubasik S, Müller-Ladner U. Evaluation der chondroprotektiven Wirkung von *Harpagophytum procumbens*. *112. Kongress der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2006, Wiesbaden, Po814*

Chrubasik JE, Roufogalis BD, Chrubasik S. Wirksamkeit pflanzlicher Entzündungshemmer bei Arthrose. *Kongress «Rehabilitation Schweiz 2006», Interlaken, Schweiz*

Gewidmet

*meinen Eltern,*

*meiner Großmutter*

*und meiner Schwester Cosima*

---

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	8
1.1	Rheumatische Erkrankungen	8
1.1.1.	Rheumatoide Arthritis	8
1.1.2.	Arthrose (Osteoarthritis)	10
1.2	Das Gelenk	16
1.2.1	Aufbau des Gelenks	16
1.2.2	Der Gelenkknorpel	17
1.2.2.1	Morphologische Charakteristika	17
1.2.2.2	Der Chondrozyt	20
1.2.2.3	Das Synovium	21
1.2.2.4	Die extrazelluläre Matrix des artikulären Knorpels	22
1.3	Pathogenese der Osteoarthritis	23
1.3.1	Morphologische Veränderungen	23
1.3.2	Molekulare OA-Veränderungen	26
1.3.2.1	Die Proteasen	27
1.3.2.2	Die Zytokine	33
1.3.2.3	Stickoxid	37
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung</b>	38
<b>3.</b>	<b>Materialien und Methoden</b>	40
3.1	Gewinnung des Untersuchungsmaterials	40
3.1.1	Kryoeinbettung	40
3.1.2	Asservierung zur RNA-Extraktion	40
3.2	Histologische Färbungen	41
3.2.1	Anfertigung von Kryogewebsschnitten	41
3.2.1.1	HE Färbung	41
3.2.1.2	Elastica-van Gieson-Färbung	41
3.2.1.3	Safranin-O Färbung	42
3.3	Nachweis von Zytokinen	42
3.3.1	mRNA Isolierung mit Trizol	42
3.3.2	Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA	43

3.3.3	Design der genspezifischen Oligonukleotide	43
3.3.4	Durchführung der PCR zum Zytokinnachweis	45
3.3.5	Phosphatase-Peroxidase Immunhistochemie (AEC Substrat-Kit)	48
3.3.6	Immunogold-Silberreaktion	50
3.4	Zellkulturen	50
3.4.1	Dreidimensionale bovine Alginatchondrozytenkultur	50
3.4.2	S35 Chondrozytenzellkultur und Suspensionskultur	51
3.5	Statistische Auswertung	51
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>53</b>
4.1	Beurteilung der Färbungen	53
4.1.1	HE-Färbung	53
4.1.2	Elastika-Färbung	56
4.1.3	Safranin-O Färbung	58
4.2	Zytokinnachweis	61
4.2.1	Wahl des Housekeeping-Moleküls	61
4.2.2	Design von „Mediator-Primern“	64
4.2.2.1	TIMP-2	64
4.2.2.1.1	Phosphatase-Peroxidase Immunhistochemie und Immunogold-Silberreaktion	70
4.2.2.2	Matrixumbauende Moleküle und Matrixbestandteile	71
4.3	Beurteilung der Zellkulturen	81
<b>5.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>87</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung / Summary</b>	<b>99</b>
<b>7.</b>	<b>Literatur</b>	<b>102</b>
<b>8.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>135</b>

*Abkürzungsverzeichnis*

---

Alpha 2 Makroglobulin ( $\alpha$  2M)  
Alpha-cysteine proteinase inhibitor ( $\alpha$ -CPI)  
Chondroitinsulfat (CS)  
Cyclooxygenase (COX)  
Distales Interphalangealgelenk (DIP)  
Extrazelluläre Matrix (ECM)  
Gammalinolensäure (GLA)  
Glykosaminoglykane (GAGs)  
Insulin-like growth factor (IGF-1)  
Interterritoriale Matrix (ITM)  
Keratansulfat (KS)  
Langsam wirksame Antirheumatika (DMARD)  
Matrix-Metalloproteasen (MMP)  
Metacarpophalangeal-Gelenk (MCP)  
Mitogen activated protein (MAP) kinases  
Molekulargewicht (MG)  
Nichtsteroidale Antirheumatika (NSAR)  
Osteoarthritis (OA)  
Perizelluläre Matrix (PCM)  
Plasminogen Activator Inhibitor (PAI)  
Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)  
Proteoglykane (PG)  
proximales Interphalangealgelenk (PIP)  
Rheumatoide Arthritis (RA)  
Stickoxid (NO)  
Territoriale Matrix (TM)  
Tissue form of Plasminogen (tPA)  
Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP)  
Urokinase Plasminogen (uPA)  
Insulin-Like Growth Factor (IGF)

## 1. Einleitung

### 1.1 Rheumatische Erkrankungen

Schon in den medizinischen Schriften von Hippokrates (4. Jahrhundert v. Chr.) sind Gelenkerkrankungen beschrieben. Der Begriff Rheuma stammt aus dem ersten Jahrhundert nach Christus. Der französische Arzt Guillaume Baillou (er lebte von 1558-1616) definierte das Rheuma als muskuloskelettale Erkrankung. Der Begriff „Rheumatologie“ wurde erstmals im Handbuch von J.L. Hollander im Jahr 1949 erwähnt, wobei der Begriff schon 9 Jahre früher durch Bernard Comroe geprägt wurde. Der Ausdruck „Osteoarthritis“ wurde von dem Engländer J. K. Spender im Jahr 1886 geprägt, obwohl ihn erst A. E. Garrod im Jahr 1907 im heutigen Sinn - als altersbezogenen Verschleiß, der vorwiegend Frauen betrifft und genetisch determiniert sein kann, verwendet hat (Sangha 2000). Unter dem Begriff „Rheumatische Erkrankungen“ verbergen sich über 100 verschiedene Krankheitsbilder, z.B. das „degenerative Rheuma“ (Arthrose = Osteoarthritis), die rheumatoide Arthritis, Autoimmunerkrankungen wie systemischer Lupus erythematosus, Sklerodermie, aber auch Osteoporose, Rückenschmerzen, Gicht, Fibromyalgie und Sehnenscheidenentzündungen (Tabelle 1).

Tabelle 1

Prävalenz rheumatischer Erkrankungen (modifiziert nach Silman und Hochberg 1993)

Erkrankung	pro 1000		Alter 65 : 25 Jahre	Geschlecht weibl : männl
	Punktprävalenz	Häufigkeit		
Rheumatoide Arthritis	8	0,5	06:01	2,5:1
Juvenile chronische Arthritis <sup>a</sup>	0,7	0,1	keine Angabe	2:1-7:1
Osteoarthritis (Knie) <sup>b</sup>	100	keine Angabe	keine Angabe	2:1
Ankyloisierende Spondylitis	2	0,07	keine Angabe	1:3
Lupus erythematosus	0,4	0,05	1,5:1	3:1 bis 9:1
Sklerodermie	0,1	0,01	03:01	4:1
Gicht	keine Angabe	1	02:01	1:6

<sup>a</sup> – Kinder < 15 Jahre

<sup>b</sup> – Prävalenz zwischen 35 und 74 Jahren

#### 1.1.1 Rheumatoide Arthritis (RA)

Etwa 1 bis 2 % der erwachsenen Bevölkerung leiden gemäß der Klassifizierung des American College of Rheumatology (<http://www.rheumatology.org/>) an RA. Mit der 1987 überarbeiteten Einteilung können die einzelnen Krankheitsbilder der RA mit einer Spezifität von 89 % und einer Empfindlichkeit von 91 bis 94 % differenziert werden (Tabelle 2).

Tabelle 2

Klassifizierungskriterien zum Erkennen einer RA: Für die Diagnose müssen 4 der 7 Kriterien erfüllt sein und die Punkte 1 bis 4 mindestens 6 Wochen bestanden haben

1.	Morgensteifigkeit von mindestens 1 Stunde Dauer
2.	Arthritis von 3 oder mehreren Gelenken
3.	Arthritis der Hände (PIP, MCP, Handgelenke)
4.	Symmetrische Arthritis
5.	Rheumaknoten
6.	Rheumafaktor im Serum
7.	Radiologische Veränderungen (Erosionen/Osteoporose)

Die RA ist eine systemische Autoimmunerkrankung, die sich in verschiedenen Veränderungen manifestieren kann. Meist besteht eine chronische symmetrische erosive Synovitis in den peripheren Gelenken. Bei den meisten Patienten sind die Rheumafaktoren erhöht. Die klinische Manifestation kann mild (geringe Gelenkveränderungen, kurzer Verlauf) oder aggressiv verlaufen (mit ausgeprägter Invalidität, auch mit extraartikulären Manifestationen wie subkutanen Knötchen, Vaskulitis, Perikarditis, Lungenveränderungen, intestinaler Fibrose, Mononeuritis, Episkleritis oder Skleritis) (Spector und Hochberg 1994). Zu den Risikofaktoren für die Disposition einer RA gehören

1. Der weibliche Hormonstatus: Bei Frauen, die keine Kinder geboren haben, besteht ein erhöhtes Risiko, eine RA zu bekommen (Spector et al 1990). Während der Schwangerschaft kann häufig eine Remission beobachtet werden, während post partum Exazerbationen nicht selten sind (Persellin 1976; Nelson et al 1993). Ob die Einnahme von Kontrazeptiva sich positiv auf die Erkrankung der RA auswirkt, bleibt weiteren Untersuchungen vorbehalten.
2. Genetische Faktoren: 10 % der Verwandten ersten Grades von RA-Patienten leiden ebenfalls an RA (Spector und Hochberg 1994). Bei eineiigen Zwillingen besteht eine 4fach höhere Wahrscheinlichkeit, an RA zu erkranken im Vergleich zu zweieiigen Zwillingen, die kein erhöhtes Risiko besitzen (Aho et al 1986). Da trotzdem nur bis 20 % der eineiigen Zwillinge konkordant an RA erkranken, müssen andere ätiologische Faktoren beteiligt sein. Einer der wesentlichen genetischen Faktoren ist der Gewebemarker HLA-DR4, der von den T-Lymphozyten als nicht körpereigen erkannt und angegriffen wird (Gregersen et al 1987). Bei 70 % der RA Patienten ist das HLA-

DR4 im Blut nachweisbar, dagegen nur bei 28 % der Normalpersonen. Doch sind weitere Untersuchungen notwendig, den Zusammenhang zwischen RA und genetischer Disposition aufzuklären (Genevay et al 2002).

3. Andere Faktoren: Der soziale und wirtschaftliche Status (Berkanovic et al 1996), die individuelle Ausbildung (Callahan und Pincus 1988) und Stress (Persson et al 1999) können sich nachteilig auf den Krankheitsverlauf auswirken. Bei RA- Patienten ist die Mortalität aufgrund von Infektionen, Nierenerkrankungen und Lungenerkrankungen erhöht. Die Lebenserwartung ist bei Männern um circa 7 Jahre und bei Frauen um circa 3 Jahre verkürzt (Vandenbroucke et al 1984).

### 1.1.2 Arthrose (Osteoarthritis, OA)

Die Arthrose (Synonyme Arthrosis deformans, im englischen Sprachraum Osteoarthritis) ist eine degenerative Gelenkerkrankung, die mit einer zunehmenden Läsion des Knorpels bis hin zum Knorpelverlust einhergeht (Cooke 1985; Sulzbacher 2000). Charakteristisch ist neben dem progressiven Knorpelverlust eine Knochenneubildung in den subchondralen Trabeculae und die Bildung neuen Knorpels und Knochens an den Gelenkrändern (Osteophyten). Die Arthrose kann sich an jedem Gelenk manifestieren. Die häufigsten Manifestationen sind im Knie, in der Hüfte und an den Fingerendgelenken (Heberdensche Arthrose, Abb. 1), den Fingermittelgelenken (Bouchard-Arthrose) sowie im Bereich der Wirbelsäule als so genannte Spondylarthrosen (Remmele 1997). Die OA wird in eine primäre (idiopathische) und in eine sekundäre Arthrose (aufgrund metabolischer, hormoneller, anatomischer, traumatischer (mechanischer)

Abbildung 1

Heberdenknoten an den  
distalen Interphalangealgelenken  
([www.medicine-worldwide.de/arthrose](http://www.medicine-worldwide.de/arthrose))



Veränderungen oder entzündungsbedingt) eingeteilt. Bei der primären OA sind zumeist die distalen und proximalen Interphalangealgelenke der Hand, das erste carpometacarpale Gelenk,

die Knie, die Hüfte und die metatarsophalangealen Gelenke involviert. Die Ätiologie der primären OA ist nicht bekannt. Eine Arthrose geht mit Schmerzen, Steifheit, funktionellen Einschränkungen sowie einem Verlust an Lebensqualität einher. Es gibt 3 Möglichkeiten, die OA zu diagnostizieren: nach den Beschwerden, nach dem Untersuchungsbefund und nach den röntgenologischen Veränderungen – keine der Einteilungen ist perfekt. So haben z.B. bis zu 60 % der Patienten mit radiologischen Veränderungen im Knie keine Beschwerden, weil der Nachweis von Osteophyten nicht mit dem klinischen Erscheinungsbild korreliert (Croft et al 1990) (Abb. 2).

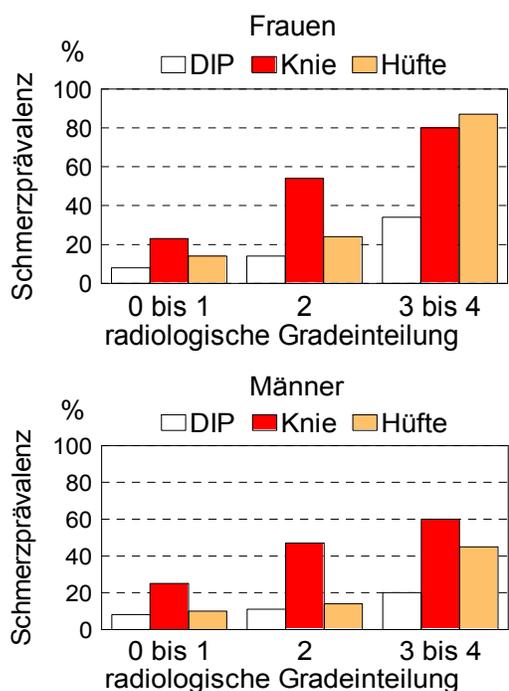


Abbildung 2

Individuelle Schmerzprävalenz in Relation zur Röntgendiagnose OA Grad 0-4 (modifiziert nach Kellgren und Lawrence 1957); DIP = Interphalangealgelenke

Die von Kellgren und Lawrence 1957 definierten radiologischen Kriterien wurden 1961 von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als Standardkriterien akzeptiert (Tabelle 3). Bei Befunden > Grad 2 wird in der Regel die Diagnose einer OA gestellt (Sun et al 1997). Generell lässt sich feststellen, dass der klinische Befund, die subjektiven Beschwerden und der Röntgenbefund beim gleichen Patienten erheblich divergieren können (Bruns et al 1992). So gibt es nicht nur hinsichtlich der Reliabilität bei der Beurteilung des Gelenkspalts Probleme (Spector und Hochberg 1994), auch andere Faktoren können die Reliabilität der radiologischen Klassifizierung beeinflussen, z.B. die Qualität der Aufnahme und die Expertise des diagnostizierenden Arztes. Um die Präzision der Diagnose zu erhöhen, wurde vorgeschlagen, das

Knie in verschiedene Felder einzuteilen und die Felder selektiv hinsichtlich ihrer Gelenkspaltverengung zu beurteilen (Spector et al 1992).

Tabelle 3

Radiologische Schweregrade der OA nach Kellgren und Lawrence (1957)

Grad	Beurteilung	Befund
0	normal	keine Zeichen für OA
1	Verdacht auf OA	kleine Osteophyten, unklare Relevanz
2	geringfügige OA	Osteophyten; Gelenkspalt normal
3	mäßige OA	leichte Gelenkspaltverschmälerung
4	schwere OA	ausgeprägte Gelenkspaltverschmälerung, subchondrale Sklerose

Für die Durchführung von klinischen Studien hat sich die Definition nach diagnostischen Kriterien bewährt, die mit möglichst hoher Sensitivität und Spezifität die Identifikation von Knie-, Hüft- und Handgelenksarthrosen, auch in Abgrenzung zu Patienten mit anderen Gelenkerkrankungen, ermöglichen (Tabellen 4-6, Abb. 3-5). Die Kriterien des American College of Rheumatology haben den Vorteil, dass alternativ zum Röntgen die Diagnose einer Arthrose auch durch nicht-invasive Untersuchungen gestellt werden kann (Altman 1991).

Tabelle 4

Kriterien zur Klassifikation einer klinisch manifesten Knie-OA ([www.rheumatology.org/](http://www.rheumatology.org/))

Klinik und Labor	Klinik und Röntgen	Klinik
Knie-Schmerzen und	Knie-Schmerzen und	Knie-Schmerzen und
mindestens 5 von 9 Kriterien	mindestens 1 von 3 Kriterien	mindestens 3 von 6 Kriterien
1. Alter > 50 Jahre	1. Alter > 50 Jahre	1. Alter > 50 Jahre
2. Steifigkeit < 30 Min	2. Steifigkeit < 30 Min	2. Steifigkeit < 30 Min
3. Krepitation	3. Krepitation	3. Krepitation
4. Druckempfindlichkeit	plus Osteophyten	4. Druckempfindlichkeit
5. Knochenverdichtung		5. Knochenverdichtung
6. kein Calor		6. kein Calor
7. BSG < 40 mm / Std.		
8. RF < 1:40		
9. Erguss		
Sensitivität 92%	Sensitivität 91%	Sensitivität 95%
Spezifität 75%	Spezifität 86%	Spezifität 69%



Abbildung 3  
Röntgenologisch nachgewiesene Kniearthrose



Abbildung 4  
Röntgenologisch nachgewiesene Hüftarthrose

Tabelle 5

Kriterien zur Klassifikation einer klinisch manifesten Hüft-OA (<http://www.rheumatology.org/>)

Kriterium	Klinik, Labor	Klinik, Labor, Radiologie
1.	Hüftschmerz und Innenrotation < 15° und BSG ≤ 45 mm/h (bzw. Hüftflexion ≤ 115°)	Hüftschmerz und (2 der 3 folgenden Kriterien): BSG ≤ 20 mm/h und/oder Röntgen: Osteophyten und/oder Gelenkspaltverschmälerung
2.	Hüftschmerz und Innenrotation ≥ 15° und Morgensteifigkeit ≤ 60 min und Alter > 50 Jahre und Schmerzen bei Innenrotation (bzw. Hüftflexion ≤ 115°)	
Sensitivität	86%	89%
Spezifität	75%	91%

BSG = Blutsenkungsgeschwindigkeit

Tabelle 6

Kriterien zur Klassifikation einer klinisch manifesten Hand-OA ([www.rheumatology.org/](http://www.rheumatology.org/))

Händeschmerzen oder Steifheit und 3 oder 4 der folgenden Kriterien
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Verdickung von 2 oder mehr von 10 selektierten Gelenken*</li> <li>2. Verdickung von 2 oder mehr DIP Gelenken</li> <li>3. weniger als 3 geschwollene MCP Gelenke</li> <li>4. Deformation von mindestens einem der 10 selektierten Gelenke</li> </ol>

\* Die 10 ausgewählten Gelenke umfassen das 2. und 3. distale (DIP), das 2. und 3. proximale Interphalangealgelenk (PIP) und das erste Metacarpophalangeal-Gelenk beider Hände (MCP).

Die Sensitivität der Klassifizierung beträgt 94 %, die Spezifität 87 %



Abbildung 5

Röntgenologisch nachgewiesene Handarthrose

Aus pathologisch-anatomischen Autopsiestudien geht hervor, dass bei fast allen Personen über 65 Jahren osteoarthrotische Gelenkveränderungen diagnostiziert werden können (Heine 1926; Cooper et al 1994). Die Prävalenz der Knie-OA steigt gemäss der amerikanischen NHANES-Studie (National Health and Nutrition Examination Survey) von 0,1 % bei Personen im Alter von 25 bis 34 Jahren auf bis zu 10 % bei Personen im Alter von 65 bis 74 Jahren und auf mehr als 30% bei Personen, die älter als 75 Jahre sind, wobei doppelt so viele Frauen wie Männer unter Knie-OA leiden (Davis et al 1991). In der Framingham-Studie betrug die Prävalenz für Knie-OA bei Personen zwischen 65 und 74 Jahren 30 % (Felson et al 1987). In einer systematischen Literaturübersicht haben Sun et al (1997) 29 epidemiologische Studien zusammengefasst. Die OA wurde anhand radiologischer Zeichen (anhand zweier unterschiedlicher Scores: Kellgren et al 1963; Ahlbäck 1968) ggf. in Verbindung mit unspezifischen Gelenkschmerzen beurteilt. Grundsätzlich wurden zwei verschiedene Rekrutierungswege gewählt: Ein Teil der Studien (n=2) untersuchte eine Bevölkerungsstichprobe, im anderen Teil der Studien (n=6) wurden die Befunde anlässlich von Arztkonsultationen erhoben. Die Vergleichbarkeit der Ergebnisse war

erschwert durch die Heterogenität der Untersuchungspopulationen (Ethnizität, Alter) und Stichprobengrößen. Die Autoren folgerten, dass anhand der derzeit verfügbaren epidemiologischen Literatur keine verlässlichen quantitativen Aussagen zur sozialmedizinischen Bedeutung der OA im Allgemeinen gemacht werden können. Konsistentere Ergebnisse wurden dagegen für die Prävalenz der klinisch symptomatischen Hüftarthrose bei Patienten über 55 Jahren gefunden. In vier Studien betrug die Prävalenz 4,1-5,2 % für Männer und 5,4-6,0 % für Frauen (Sun et al 1997).

Zu den Risikofaktoren für die Disposition einer OA gehören:

1. der weibliche Hormonstatus: Die Häufigkeitsrelation der Knie-OA bei Frauen im Vergleich zu Männern beträgt 1,5:1 bis 4:1. Einige Tiermodelle unterstützen die These, dass die weiblichen Geschlechtshormone an der OA-Entstehung beteiligt sind (Tsai und Liu 1992, 1993; Ushiyama et al 1995; Rosner et al 1986). Jedoch steht ein überzeugender Beweis hierzu noch aus (Hannan et al 1990; Samanta et al 1993).
2. Adipositas: es besteht ein Zusammenhang zwischen zunehmendem Gewicht und Knie-OA (Sturmer et al 2000), nicht aber zwischen Gewicht und Hüft- oder Hand-OA (Felson et al 1988; Oliveria et al 1999; Davis et al 1990; Hart und Spector 1993a). Aus der Framinghamstudie geht hervor, dass Übergewichtige 30 Jahre später ein 4 bis 7fach höheres Risiko besitzen, eine Kniearthrose zu entwickeln (Felson et al 1988). Eine weitere Studie zeigt, dass eine Gewichtsabnahme um 5 kg mit einer 50% Risikoabnahme für eine Knie-OA Manifestation einhergeht (Felson et al 1992).
3. Rauchen: Widersprüchliche Angaben liegen zum Einfluss des Rauchens auf die Entstehung einer OA vor: Kein Einfluss (Hart und Spector 1993b) bzw. ein möglicher protektiver Effekt (Samanta et al 1993; Kraus et al 1978; Anderson und Felson 1988; Felson et al 1989; Sandmark et al 1999). Der protektive Effekt auf die progressiven OA-Veränderungen soll auf einer direkten Wirkung des Nikotins beruhen oder auf der anti-östrogenen Wirkung des Nikotins. Doch sollte aufgrund der insgesamt gesundheitsschädigenden Wirkung das Rauchen aus diesem Grund nicht zur OA-Prophylaxe empfohlen werden.
4. Trauma und repetitiver Stress: Eine Verletzung des vorderen Kreuzbands oder eine Meniscusschädigung führen zur Knie-Arthrose (Slemenda et al 1990), ebenso eine beruflich bedingte Überbelastung der Gelenke (Lindberg und Montgomery 1987), doch ist der Zusammenhang sehr komplex und weitere Untersuchungen müssen den kausalen Zusammenhang zwischen körperlicher Aktivität und Entstehung einer OA aufklären

(McAlindon et al 1999; Cheng et al 2000; Cooper et al 2000; Lane und Buckwalter 1999; Saxon et al 1999).

5. Knochendichte: Zwischen einer Osteoporose mit geringer Knochendichte und einer OA besteht eine inverse Beziehung (Dequeker 1999). Dies wird darauf zurückgeführt, dass Knochen mit geringerer Knochendichte die Belastung besser kompensieren (Cameron und Dewar 1977). Dies korreliert mit dem Befund, dass bei Patienten mit Osteopetrosis (verstärkter Knochendichte) eine höhere Inzidenz an OA beobachtet wurde (Hernandez-Avila et al 1990).
6. Ernährung: Fette und Calcium können das Risiko einer OA erhöhen (Silberberg und Silberberg 1950; Schiefer 1970), während Riboflavin (Vitamin B2) und Selen das Risiko vermindern (Sasaki et al 1994; Wilhelmi und Tanner 1988). Kohortenstudien zeigen, dass Folsäure und Cobalamin einen protektiven Effekt auf die Entwicklung einer OA der Hände besitzen (Flynn et al 1994) und Daten der Framinghamstudie weisen auf eine geringere OA-Inzidenz bei Einnahme von Antioxidantien (Vitamin C, Vitamin E, Betacarotin) (McAlindon et al 1999).

## **1.2 Das Gelenk**

### **1.2.1 Aufbau des Gelenks**

Gelenke variieren bezüglich der am Gelenk beteiligten Anzahl von Knochen, ihrer Form, ihrem Knorpelüberzug und schließlich in der Art und Anzahl von Bewegungen, die dieses Gelenk erlaubt. Die Gelenkflächen der jeweiligen Knochenpartner sind mit Knorpel überzogen. Eine visköse Flüssigkeit verhindert die Reibung der Knorpelteile. Nach außen hin ist das Gelenk durch die Gelenkkapsel abgeschlossen und wird durch Bänder (Ligamente) stabilisiert (Abb. 6). Die Gelenkkapsel besteht aus einer äusseren Schicht, dem Stratum fibrosum und einer inneren, dem Stratum synoviale, die die Synovialflüssigkeit produziert. Das straffe kollagene Bindegewebe des Stratum fibrosum weist unterschiedliche Schichtdicken auf und enthält zahlreiche Nervenfasern und Gefäße. Das Stratum synoviale (synonym: Membrana synovialis) besteht aus lockerem Bindegewebe, das reichlich Zellen (Fibroblasten, Fibrozyten und Adipozyten) enthält. Es ist durch fenestrierte Kapillaren gut vaskularisiert und mit freien sowie enkapsulierten Nervenendigungen durchsetzt (Zimny 1988). Die Deckzellschicht besteht aus zwei verschiedenen Zellarten (Barland et al 1962): aus Makrophagen (früher Synoviozyten Typ

A genannt), die die Fähigkeit zur Phagozytose haben, und aus synovialen Fibroblasten (früher Typ B Synoviozyten genannt) (Athanasou 1995).

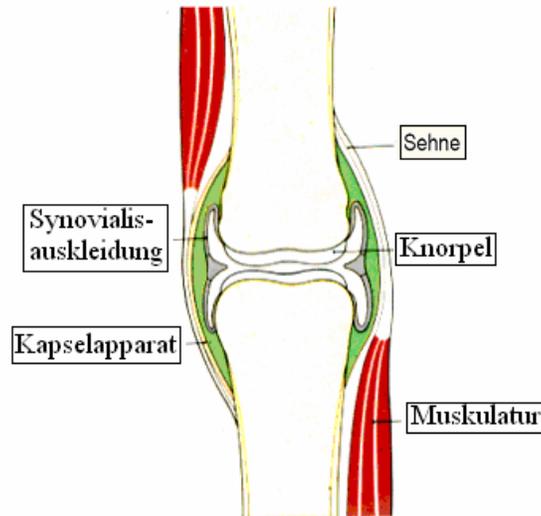


Abbildung 6

Schematische Darstellung eines Gelenks

## 1.2.2 Der Gelenkknorpel

### 1.2.2.1 Morphologische Charakteristika

Der Gelenkknorpel der „echten“ Gelenke (der sog. Diarthrosen), besteht aus dem glasartigen (griechisch: hyalos) hyalinen Knorpel, der zusammen mit der Synovia (der Gelenkflüssigkeit) eine weitestgehend reibungsarme Beweglichkeit der Gelenkpartner ermöglicht (Leonhardt 1990). Der Friktionskoeffizient (Friktion: bei Bewegung entstehende Reibung) des intakten Gelenkknorpels beträgt nur etwa 1/5 des Wertes von Eis auf Eis und ist damit wesentlich niedriger als der künstlicher Ersatzmaterialien (z.B. Polyethylen auf Metall) (Rudert und Wirth 1998). Die in der Matrix enthaltenen Kollagenfaserbündel bilden an der Gelenkoberfläche tangentielle Faserschichten, so dass die dort auftretenden Scher- und Druckkräfte optimal verarbeitet werden können. Charakteristisch ist das Fehlen eines Perichondriums zum Gelenkspalt hin, so dass dem Gelenkknorpel im Falle einer Läsion die Möglichkeit zur Reparation fehlt (Sun et al 1997). In dem hyalinen Knorpel befinden sich weder Blutgefäße noch Nerven. Seine Ernährung erfolgt durch Diffusion, zum einen aus der Synovialflüssigkeit, zum anderen aus den Knochenschichten unterhalb des Knorpels, insbesondere aus dem Knochenmarkraum. Der intakte Knorpel besteht zu 65% bis 80% aus Wasser, zu 1% bis 10% aus

Knorpelzellen (Chondrozyten) und extrazellulärer Matrix aus Kollagen und Glykosaminoglykanen, in die die Knorpelzellen isoliert eingebettet sind (Leonhardt 1990). Den Hauptanteil des Kollagens stellt Kollagen Typ II (ca. 50% des Trockengewichts von Knorpel) dar. Kollagen Typ IX hat die wichtige Funktion, Kollagen Typ II und die Proteoglykane miteinander zu verknüpfen. Zur Elastizität des Knorpels tragen hauptsächlich Hyaluronsäure, Aggrecan und Verbindungsproteine bei. Bei Kompression des Knorpels wird durch die Abstoßung der negativ geladenen Polysaccharidseitenketten der Knorpel wieder in seine Ausgangsform gebracht, sobald die Belastung nachlässt. Auch die osmotischen Eigenschaften von Aggrecan tragen zu dieser Kompressionsresistenz bei. Weiterhin enthält die Knorpelmatrix andere Glykoproteine sowie geringe Anteile an Kollagen Typ V, X und XI.

Trotz ihres geringen Volumenanteils tragen die Knorpelzellen entscheidend zur Erhaltung und Funktion der extrazellulären Matrix bei sowie zum Knorpelabbau durch Bildung von matrixabbauenden Enzymen und Zytokinen. Die stoffwechselaktiven Chondrocyten sind im Gelenkknorpel in verschiedenen Schichten angeordnet. In der Regel erfolgt eine Einteilung in drei oberflächenparallele Zonen: die Superficialzone, Intermediärzone und die Basalzone, die sich oberhalb der kalzifizierten Knorpelzone befindet (Abb. 7). Heute wird der Gelenkknorpel arithmetisch in eine Tangentialzone mit oberflächenparallelen flachen Zellen und in drei weitere, in gleichem Abstand zueinander folgende Zonen unterteilt (Egglı et al 1988) (Abb. 8).

In Zone I, auch superfizielle oder tangential Zone genannt, sind die Zellen oval oder längs gestaltet und die Ausrichtung ihrer Längsachse erfolgt parallel zur Oberfläche (Poole et al 1997; Brighton et al 1984). Die Zellen enthalten reichlich rauhes endoplasmatisches Retikulum (RER) und Mitochondrien, wenig Vakuolen und Vesikel, wenig Golgiapparat, Zytoplasmavakuolen und Glykogen. Das Zytosol erscheint in der Elektronenmikroskopie dunkel (Brighton et al 1984). Der Proteoglykangehalt in dieser Zone ist niedrig (5-10 % des Gewebevolumens) (Poole et al 1997; Muir et al 1970). Diese Zone reguliert den Flüssigkeitsaustausch und ist für das viskoelastische Verhalten des Knorpels verantwortlich (Setton et al 1993), sozusagen als „tension resistant diaphragm“ (Pedley und Meachim 1979), als mechanische Schutzschicht gegen Scherkräfte, Abnutzung und tangential Dehnung (Broom 1986). In dieser gelenkspaltnahen Schicht herrscht eine höhere Zelldichte als in den tieferen Schichten.

In Zone II, der mittleren Zone, sind die Zellen rund oder oval (Poole et al 1997) und oft in Zweier- oder Dreiergruppen (sog. isogenische Gruppen) angeordnet (Brighton et al 1984). Diese Zone enthält mehr Proteoglykane als die superfizielle Zone (Maroudas 1976; Poole et al 1997). Der Kollagenfaseranteil macht 40-45 % des Knorpelvolumens aus (ist geringer im Vergleich zu

Zone I (Muir et al 1970). Zone II nimmt circa 20 % bis 70 % der Gesamtknorpelhöhe ein – je nach Bestimmungsmethode (Broom und Marra 1985).

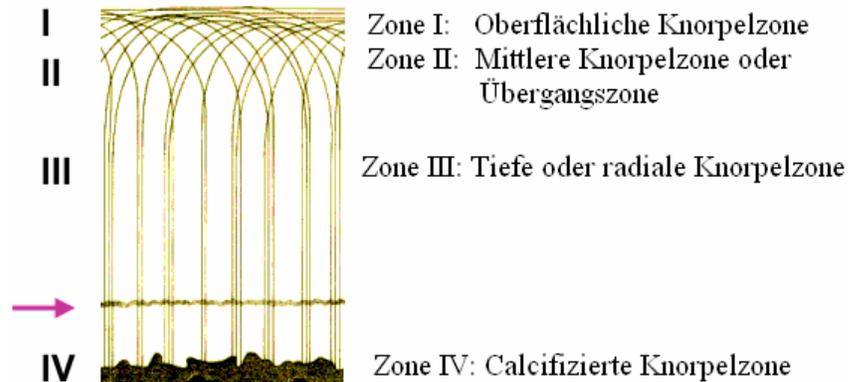


Abbildung 7

Zonale Gliederung des Gelenkknorpels (modifiziert nach Benninghoff 1994)

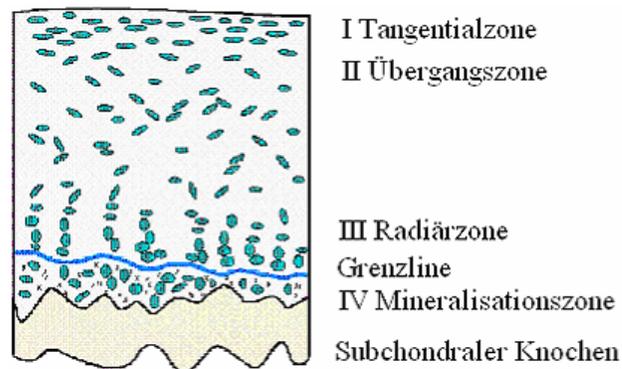


Abbildung 8

Zonale Gliederung des Gelenkknorpels (modifiziert nach Eggli et al 1988 )

In Zone III, der tiefen oder radialen Zone mit einem sehr hohem Proteoglykangehalt (Poole et al 1997), sind die rundlichen Zellgruppen säulenartig aneinander gereiht und die Kollagenfasern rechtwinklig zur Oberfläche angeordnet (Poole et al 1997; Brighton et al 1984; Clarke et al 1971; Clark 1985). Der Kollagenanteil beträgt ebenfalls etwa 40-45 % des Knorpelvolumens.

In Zone IV, der kalzifizierten Zone (Übergang zwischen Knorpel und darunter liegendem Knochen) sind die Kollagenfasern rechtwinklig zur Oberfläche angeordnet, der Kollagenanteil

beträgt nur 5-10 % des Gewebevolumens. Diese Zone ist reich an Kalziumsalzen, vereinzelt finden sich runde Zellen in unkalzifizierten Lakunen (Poole et al 1997; Brighton et al 1984). Der Anteil der mineralisierten Zone an der Knorpelgesamthöhe beträgt durchschnittlich 3 – 9 %. Er ist intraindividuell konstant, schwankt infolge der „Verzahnung“ mit dem subchondralen Knochen lokal allerdings um bis zu 50 % (Müller-Gerbl et al 1987). Brighton (1984) unterscheidet innerhalb der mineralisierten Zone einen oberen von einem unteren Abschnitt, der durch die so genannte „cement line“ (Tidemark) vom subchondralen Knochen abgegrenzt wird (Poole et al 1997). Die mineralisierte Zone reguliert das Wachstum und die enchondrale Verknöcherung und behält eine gewisse Regenerationsfähigkeit (Rudert und Wirth 1998; Wakitani et al 1994).

### **1.2.2.2 Der Chondrozyt**

Die Zellen in den verschiedenen Knorpelzonen unterscheiden sich nicht nur morphologisch in Form, Größe und Anordnung, sondern auch in ihrer Stoffwechselaktivität. Der Zelldurchmesser variiert zwischen 10 und 20 µm (Aydelotte et al 1988). Zellvolumen und Zelloberfläche nehmen von superfizial nach radial um den Faktor zwei zu (Wong et al 1996). Während in Zone I die metabolische Aktivität gemessen am Granulagehalt und an der Anzahl der Zellvakuolen, Transport- oder Speichervesikel relativ gering ist, nimmt die Aktivität zur Radiärzone hin stetig zu (Wong et al 1996; Brighton et al 1984).

Mikroskopisch lassen sich konzentrisch um die Chondrozyten herum Territorien oder Matrices erkennen (Poole et al 1984). Der Chondrocyt und seine Mikroumgebung werden als Chondron bezeichnet (Poole et al 1988). Elektronenmikroskopisch lässt sich bei 3D-Rekonstruktion eine Polarität dieser Chondrone erkennen (Poole et al 1997) mit einem artikulären Pol (zur Oberfläche hin) und einem basalen Pol (zur Tide Mark hin). Die perizelluläre Matrix (PCM) wird als feines Netzwerk aus dünnem, filamentartigem Material (Kollagen IX (Poole et al 1997), Kollagen Typ VI (Poole et al 1992) mit einem hohen Gehalt an kondensierten Proteoglykanen sichtbar. Die PCM besitzt einen hohen Gehalt an Hyaluronsäure (Mason et al 1981; Poole et al 1997), viele sulfatierte Proteoglykane (Poole et al 1984), Biglykan (Miosge et al 1994), Fibronectin (Glant et al 1985), Laminin (Burr et al 1996) und Matrixglykoprotein inklusive des „link proteins“ (Zhu et al 1996).

Die Zweier- bis Siebener-Chondrocytengruppierungen in der mittleren und tiefen Knorpelzone werden von einer perizellulären Kapsel umgeben, einem longitudinal, transversal, schräg und zirkulär angeordneten Netz feiner Fibrillen. In Zone I ist eine perizelluläre Kapsel nur während der Kompression erkennbar (Poole et al 1984). In der mittleren und tiefen Knorpelzone

verbinden perizelluläre Kanäle die PCM mit der territorialen Matrix (TM) durch die perizelluläre Kapsel hindurch (Poole et al 1984). Die um die perizelluläre Kapsel gelegene TM besteht aus Bündeln von Kollagenfibrillen, die Proteoglykanaggregate enthalten. Die TM ist reich an Chondroitinsulfat (Pedley und Meachim 1979). Die interterritoriale Matrix (ITM) ist die eigentliche Knorpelmatrix mit einem im Vergleich zur territorialen Matrix einem höheren Gehalt an Kollagenfasern (Poole et al 1984; Paukkonen und Helminen 1987). Die ITM besitzt einen großen Gehalt an hochmolekularem Keratansulfat (Pedley und Meachim 1979; Kincaid und Van Sickle 1981).

### **1.2.2.3 Das Synovium**

Die Innenfläche des Kapselbandes ist von der sogenannten Synovialhaut (Membrana synovialis) ausgekleidet, die eine zähe Flüssigkeit (Gelenkschmiere, Synovia) zur Verminderung der Reibung absondert. Da Synovium mesenchymalen Ursprungs ist, sind weder Epithelzellen noch eine echte Basalmembran zu finden, obwohl die meisten Komponenten der Basalmembran (außer Entactin) im Synovium enthalten sind. Die sich diffus zwischen den Zellen erstreckende „Basalmembran“ erfüllt ihre Funktion wie in anderen Geweben (Schutz der Zelloberfläche, Trennung der Zellen voneinander, Filtration von diffundierenden Molekülen). Das Synovium besteht aus verschiedenen Schichten: Zum Gelenkspalt hin befindet sich die sog. synoviale Deckzellschicht, eine relativ dichte, normalerweise 1-4 Zellschichten dicke Struktur, die hauptsächlich aus Makrophagen und Fibroblasten besteht (früher Typ A- und Typ B-Synoviozyten genannt). Daran schließt sich eine Schicht aus verstreut liegenden Fibroblasten, Adipozyten, Blutgefäßen und lockerem BG an, die dann in die sehr kollagenhaltige, stabile Gelenkkapsel übergeht (Welsch 2005).

Neben ihrer Funktion, Antigene zu phagozytieren, besitzen die synovialen Makrophagen die Fähigkeit, Zytokine zu exprimieren, die an der Regulation von Knorpelbildung und -zerstörung beteiligt sind (Pap et al 2006). Die synovialen Fibroblasten regulieren die Sekretion von Hyaluronsäure in den Gelenkspalt und von Stoffen, die für die Ernährung und Funktion des Knorpels erforderlich sind. Gemeinsam mit den Makrophagen sind synoviale Fibroblasten wohl auch für die immunologische Überwachung des Gelenkspaltes sowie für die Phagozytose gelöster Knorpelfragmente und anderer „Zelltrümmer“ zuständig (Iwanaga et al 2000, Schedel et al 2004). Außerdem sezernieren sie bereits während der Morphogenese des Gelenks Moleküle, z.B. sog. „bone morphogenetic proteins“ (Storm und Kingsley 1996), die für die Einwanderung und Differenzierung der synovialen Makrophagen von Bedeutung sind.

#### 1.2.2.4 Die extrazelluläre Matrix des artikulären Knorpels

Die extrazelluläre Matrix (ECM) füllt den Zwischenraum zwischen den Chondrozyten. Sie ist amorph, quellbar, reißfest und flexibel und besteht aus einem Netzwerk aus Proteinen und Kohlenhydraten (z.B. Hyaluronsäure), die eine gelartige Struktur haben. Die wichtigsten Proteinkomponenten sind das Kollagen, das durch lange Fasern Festigkeit verleiht, die Proteoglykane (PG), die viskös sind und die Zellen einhüllen (z. B. Heparansulfat), und Adhäsionsmatrixproteine, die die Verbindung zwischen den beiden ersten Gruppen und den Rezeptoren auf den Zellen herstellen (Müller-Ladner und Gay 2006). Diese Bestandteile bilden eine schützende Oberfläche über dem subchondralen Knochen und erlauben eine glatte, nahezu stoßfreie Bewegung des Gelenkes. Um den mechanischen Anforderungen gerecht zu werden, sind die Kollagenfibrillen arkadenförmig angeordnet (Abb. 7). In den kollagenen Arkaden, die sich durch hohe Zug- und Reißfestigkeit auszeichnen, sind hochmolekulare Hyaluron-Aggregan-Komplexe sowie andere keratan- und chondroitinsulfathaltige PG integriert. Die PG-Komponenten werden durch hochaffine molekulare Wechselwirkungen an die Kollagenfibrillen gebunden (Kielty et al 1992). Wird eine dieser Komponenten gestört, folgt eine Funktionsirritation. Die Veränderungen sind typischerweise mit OA verbunden (Lattanzio et al 2005).

Das Kollagen ist die strukturelle Grundlage der Knorpelmatrix. Es sind 19 verschiedene Kollagentypen bekannt. Die Kollagenfibrillen bestehen aus Proteinmonomeren (drei alpha-Polypeptidketten, die in einer Tripelhelix (Faltblattstruktur) angeordnet sind. Die verschiedenen Kollagentypen unterscheiden sich durch die Kombination und Modifikation der verschiedenen alpha-Ketten in der Tripelhelix (Ottani et al 2002). Einige Kollagentypen formen Fibrillen (wie zum Beispiel I, II, III, V, XI), andere nicht (Ottani et al 2002). Kollagentyp II macht den Hauptanteil im artikulären Knorpel aus (Mayne 1989), während sich Typ VI, IX, X, und XI im gesunden Knorpel nur in geringen Mengen finden lassen (Poole et al 1992). Das restliche Kollagen verteilt sich auf die Typen VI, IX, X, XI, XII und XIV.

Kollagentyp VI verbindet die Zelloberfläche mit der Matrix (Poole et al 1992). Bei OA ist Kollagentyp VI vermehrt, besonders im Bereich des Knorpeldefekts (Swoboda et al 1999). Nach Eyre (1991) beträgt die Menge an Kollagentyp IX, der vermutlich an der Organisation des Fibrillennetzwerk beteiligt ist (Mayne 1989), nur 1 % der gesamten Kollagenfraktion. Defizite in Typ IX Kollagen verursachen Knorpelveränderungen, die für die OA typisch sind (Fassler et al 1994). Kollagentyp X wird in der mineralisierten Zone des Gelenkknorpels gefunden (Eyre 1991). Im gesunden hyalinen Knorpel kommt Kollagentyp X nicht vor. Im OA-Gelenkknorpel ist Typ X dagegen nachweisbar. Kollagentyp XI und II polymerisieren zu einem

Kollagenetzwerk im hyalinen Knorpel. Typ XI Kollagen kommt im Inneren des Kollagentyps II vor und begrenzt dessen Fibrillendurchmesser (Cremer et al 1998). Ferner entsteht im Verlauf der OA durch die Schädigung des subchondralen Knochens Faserknorpel, der große Mengen an Kollagen Typ I enthält (Goldwasser et al 1982; Miosge et al 1998).

Die PGs sind Stoffwechselprodukte der Chondrozyten. Ein PG-Monomer wird aus einem zentralen Protein (Core Protein) gebildet, an das ein oder mehrere GAGs-Ketten gebunden sind. Das zentrale Protein hat ein Molekulargewicht (MG) von circa 225 kDa (Hardingham und Fosang 1992). Durch Binden der PG-Monomere an Hyaluronsäure entstehen hochmolekulargewichtige, nicht sulfatierte Aggrekane (Hascall und Kinura 1982). Die nichtkovalente Bindung zwischen den Monomeren und der Hyaluronsäure wird durch ein Bindungsprotein stabilisiert (Hardingham und Fosang 1992). Der menschliche Knorpel enthält drei Bindungsproteine (Heinegard und Oldberg 1989). Das Aggrekan ist aus bis zu 100 GAGs-Monomeren zusammengesetzt (Heinegard und Axelsson 1977). Die wichtigsten GAGs-Monomere des artikulären Knorpels sind Chondroitinsulfat und Keratansulfat (Carvalho et al 2000). Chondroitinsulfat besitzt zwei Seitenketten (eine Sulfat- und Carboxylatgruppe), während Keratansulfat nur eine Seitenkette besitzt (eine Sulfatgruppe). Die Seitenketten ziehen positiv geladene Ionen an. Im Knorpel ist deshalb die Konzentration an Natrium und Kalzium viel höher als in der Synovialflüssigkeit oder im Plasma. Das erklärt den hohen osmotischen Druck in der Knorpelmatrix, der den Druck auf das Gelenk abpuffert (Maroudas et al 1980).

Durch das Wasserbindungsvermögen können PGs ein Mehrfaches ihres Volumens erlangen.

PGs werden, je nach Fähigkeit sich mit Hyaluronsäure zu verbinden, in aggregierende und nicht aggregierende PGs unterteilt. Hyaluronsäure ist ein GAG, obwohl es keine Sulfatgruppe trägt und – anders als Keratin und Chondroitin – nicht an ein zentrales Protein gebunden ist.

Die sich mit der Hyaluronsäure verbindenden Proteine gehören zu den aggregierenden PGs.

Durch die sterische Konfiguration wirkt Hyaluronsäure mit seiner Hydrathülle als Barriere und Gleitfaktor (Muir 1980) und wie ein molekulares Sieb, das fremde Makromoleküle vor dem Eindringen bewahrt (Ghosh 1994).

### **1.3 Pathogenese der Osteoarthritis**

#### **1.3.1 Morphologische Veränderungen**

Bei der OA kommt es zu einer chronisch fortschreitenden Zerstörung der Knorpelmatrix im Gelenk und damit zu einem Funktionsverlust. Durch Degradation molekularer Einzelkomponenten (z.B. Aggrekan) und durch Destabilisierung und Zerstörung

supramolekularer Strukturen (z. B. Kollagennetzwerk) kommt es zu Rissbildungen (mikroskopische Matrixzerstörung) und Knorpelabrieb (makroskopisch sichtbarer Matrixverlust). Anfänglich ist mikroskopisch nur eine Auffaserung der oberflächlichen Knorpelschichten zu sehen (Greisen et al 1982). Die Knorpeloberflächen sind aufgeraut. Im zellulären Bereich nehmen die Chondrozyten an Volumen zu und bilden Cluster aus nicht funktionsfähigen Chondrozyten, besonders an den Rändern der Fissuren, wo durch die Verkürzung der Diffusionsstrecke die Ernährungsverhältnisse besser sind (Fassbender 1983). Belastete Knorpelschichten flachen ab, während unbelastete hypertrophieren. Durch Architekturveränderung des Knorpels bei der OA werden Knorpelfragmente frei. Schließlich kommt es zum kompletten Knorpelverlust unter Einbezug des subchondralen Knochens (Moskowitz und Goldberg 1987). Die freien Knorpelfragmente werden von synovialen Makrophagen phagozytiert, die Zytokine und Prostaglandine freisetzen (Boniface et al 1988). Durch die Freisetzung der Entzündungsmediatoren entsteht eine Entzündung mit vermehrter Zottenbildung und Fibrose der Subsynovialis, Zerstörung der Synoviabeschaffenheit und Steigerung des Knorpelabbaus (Hewicker-Trautwein et al 1999). Die Entzündung stimuliert die PG-Synthese, jedoch werden die qualitativ veränderten Syntheseprodukte wieder verstärkt abgebaut. Qualitative PG-Veränderungen sind nachweisbar, bevor der Knorpelschaden makroskopisch sichtbar wird (McDevitt und Muir 1976). Proteasen aus Chondrozyten zerstören die kollagenen Fibrillen, die Verbindungen zwischen den Kollagenfibrillen und dem Maschenwerk der Knorpelmatrix. Dadurch können die PGs vermehrt Wasser einlagern (Altman et al 1984). Der Knorpel schwillt an, wird dicker, aber auch erheblich weicher als zuvor und ist verletzungsanfälliger (Broom 1982). Der subchondrale Knochen büßt seine Elastizität ein und verdickt, eine hyperostotische Deckplatte ist die Folge (Dedrick et al 1993). Innerhalb von 3 bis 7 Tagen können durch enchondrale Ossifikation Osteophyten- und Exostosen entstehen, die einen Knochengewebekern besitzen, der mit dem subchondralen Knochen verbunden und von fibrinösem oder hyalinem Knorpel überzogen ist. Exostosen vergrößern die Gelenkfläche und stabilisieren so das Gelenk (Moskowitz und Goldberg 1987).

Buckwalter und Mankin (1997) definierten drei morphologisch-biochemisch unterscheidbare Stadien der OA:

Im Stadium 1, noch bevor eine Fibrillation sichtbar wird, besteht eine Störung im Aufbau des Matrixgerüsts. Bei konstantem Kollagen II -Gehalt steigt der Wassergehalt der Matrix. Die PG- und Aggrecankonzentrationen und GAGs-Kettenlängen nehmen ab. Jedoch berichten andere Autoren, dass bei beginnender Knorpeldegeneration der Gehalt an PG und GAG und deren

Kettenlängen zunehmen (Carney et al 1985) und mit dem histologischen Schweregrad der OA korrelieren (Teshima et al 1983). Buckwalter und Mankin (1997) berichten weiterhin über Störungen in der Beziehung zwischen Typ-II-Kollagen und anderen, sogenannten „minor“ Kollagenen. All diese Veränderungen sollen zu gesteigerter Permeabilität, sinkender Steife und konsekutiv erhöhter Vulnerabilität des Knorpels führen. Im Stadium 2 werden die Chondrozyten durch Änderung der Osmolarität, der Ladungsdichte oder direkt als Reaktion auf mechanischen Stress (Guilak 1995) zur Proliferation angeregt und bilden neue Matrix. Das Kollagenetzwerk wird durch Abbau von Matrixbestandteilen destabilisiert. Durch enzymatischen Abbau mittels Stromelysin, Plasmin und Kollagenase werden Zytokine freigesetzt. Sie regen die Neusynthese von Makromolekülen an. Die Reparationsantwort kann über Jahre anhalten und die Degenerationen rückgängig machen (Buckwalter und Mankin 1997). Dennoch erfolgt keine regelhafte Reparatur. Nach Mankin (1994) liegt dies an der fehlenden Blutversorgung im Gelenkknorpel selbst, an der Abwesenheit von Fibrinogen in der Synovialflüssigkeit und am hohen Proteoglykgehalt, der die Aktivierung und Aktionen von IGF- $\beta$  hemmt.

Im Stadium 3 stehen der Verlust an Knorpelsubstanz und Veränderungen des subchondralen Knochens im Vordergrund. Peripher (an der Knorpel-Knochengrenze) entstehen knöchernknorpelig-fibröse Ausziehungen (Osteophyten). Zusätzlich treten in diesem Stadium sekundäre Veränderungen des Muskel- Kapsel- Band- Apparates auf. Zu beachten ist, daß die histologische Ausprägung der Schädigung nicht unbedingt mit dem Grad der klinischen Symptomatik korrelieren muß (Buckwalter und Mankin 1997). Poole et al (1997) beschreiben die Mikroanatomie der OA wie folgt: Die Veränderungen beginnen in der Superficialzone und schreiten von dort fort. Frühestes Zeichen der katabolen Stoffwechsellage bei OA sind Veränderungen in der Mikroanatomie des Chondrons. Es erfolgt eine Remodellierung des Chondrons. Dabei schwillt seine Mikroumgebung auf und weicht auseinander. Um die entstandenen Lücken zu schließen, werden klonale Proliferation und Chondronteilung initiiert (Poole et al 1992). Dabei kommt es zur Abnahme der Anfärbbarkeit mit Toluidin, zum Verlust der fibrillären Architektur und zur Ausbildung einer engen, dichten Glykokalix um den Chondrozyten herum (Poole et al 1997). Poole beschreibt eine reaktive Erosionsfront, die von superficial her fortschreitet. An der Erosionsoberfläche bilden sich Chondrozytencluster. Perizellulär findet sich eine nicht-farbbaffine Matrix, während die Matrix zwischen den einzelnen Clustern dunkel erscheint. In der Mitte der Erosionsfront findet eine deutliche Zellteilung statt. Die Chondrozyten migrieren an den Rand der Schwellzone. Die Konzentration perizellulären Kollagens IX sinkt, ebenso wie an der Erosionsoberfläche. Kollagen Typ VI ist erst perizellulär, dann direkt an der Zelloberfläche nachweisbar. Durch das umgebende Kollagen VI sollen die

Zellen bei der Teilung zusammengehalten werden, was das Auftreten der „Zellklumpen“ erklären könnte (Poole et al 1997).

Heute werden mikroskopisch die Knorpelläsionen in 6 Stufen und makroskopisch in 4 Stufen eingeteilt (Pritzker et al 2006, Abb. 9):

0 : Oberfläche und Knorpel intakt

I : Oberfläche intakt

II : unterbrochene Oberfläche

III: vertikale Fissuren

IV: Erosion

V : Denudation

VI: Deformation

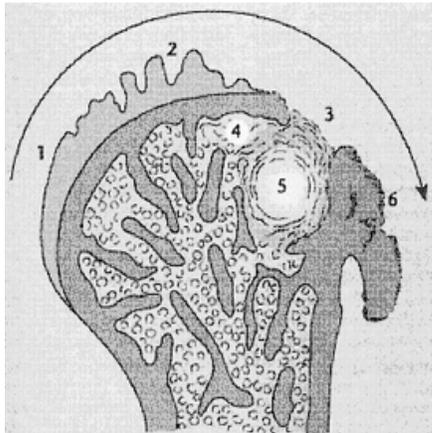


Abbildung 9

Schematische Veränderungen im Rahmen einer Arthrose

1 normaler Knorpel, 2 Auflösung der oberflächlichen Schicht mit Fibrillenstruktur,

3 Knorpelverlust mit freiliegendem Knochengewebe, 4 Markfibrose unter der Gelenkfläche,

5 Pseudozysten in den Markräumen, 6 Osteophytärer Randwall (Grundmann 1994)

### 1.3.2 Molekulare OA-Veränderungen

Auch im gesunden Knorpel finden sich knorpelabbauende Enzyme, die die internen Peptidbindungen von Proteinen spalten. Einige werden in Chondrozyten, andere in den Synovialzellen oder Makrophagen synthetisiert. Sie befinden sich intrazellulär in Lysosomen und extrazellulär in verschiedenen Gewebeflüssigkeiten und im Plasma. Sie werden aktiviert, sobald Proteine entweder endozytotisch in die Zelle oder extrazellulär in den perizellulären Spalt gelangen (Smith 1995).

### 1.3.2.1 Die Proteinasen

Es werden 4 Klassen von Proteinasen differenziert, die Metallo- und die Serinproteinasen, die bei neutralem und leicht alkalischem pH hochaktiv sind, und die Aspartat- und die Cystein-Proteinasen, die im sauren Milieu sehr aktiv sind (Bond und Butler 1987) (Tabelle 7).

Tabelle 7

Charakteristika der 4 ECM-schädigenden Proteinasegruppen (Enzyme, ihre Zelllokalisierung (Ort), pH des Wirkungsoptimums) und ihre Inhibitoren (**L** Lysosom, **E** extrazellulär, **S** Zelloberfläche, **G** Granulat; **PN-1** Protease nexin 1) (modifiziert nach Werb und Alexander 1993)

Klasse	Enzyme	Ort	pH-Breite	Proteininhibitoren
<b>Aspartat</b>	Cathepsin D	L, E	3 - 6	$\alpha_2$ M
<b>Cystein</b>	Cathepsin B Cathepsin L	L, E	3 - 7	$\alpha_2$ M $\alpha$ -CPI
<b>Serin</b>	Plasmin Kallikrein Thrombin uPA tPA PMN elastase Cathepsin G Mastzellenchymase Mastzellentryptase Granzyme	E E E E, S  G, E G, E G, E G, E	6 - 10	$\alpha_2$ M, PN-1, $\alpha_2$ - Antiplasmin  PN-1 PN-1, PAI-1, PAI-2 PAI-1 $\alpha$ 1-Proteinase Inhibitor $\alpha$ -CPI $\alpha$ -CPI Aprotinin
<b>Metallo</b>	Kollagenase Stromelysin 1, 2 MMP-8, MMP-5 Makrophagen-Elastase MMP-9 MMP-2 Pump-1 neutrale Membranendopeptidase	E E G, E E G, E E E S	6 - 9	$\alpha_2$ M, TIMP-1, TIMP-2     keine unbekannt

**Matrix-Metalloproteinasen (MMP):** Die MMPs sind  $Zn^{2+}$  abhängige Enzyme. Sie sind deswegen so wichtig, weil sie zahlreiche Komponenten der extrazellulären Knorpelmatrix abbauen (Zafarullah et al 1993). Bislang sind 18 MMP-Typen bekannt: Gelatinasen (MMP-2 und

9), Kollagenasen (MMP-1, 8 und 13), Stromelysine (MMP-3, 10 und 11), membrantypische MMPs (MT1, 2, 3, 4 und MMP-5) und andere (MMP-7, 12, 19, 20 und 23). In zahlreichen Studien konnten MMP-1, 2, 3, 7, 8, 9, 13 und MT1-MMP im osteoarthritisch veränderten Knorpel gefunden werden. Ihre Freisetzung korreliert nicht selten mit dem Schweregrad der OA. Kollagenasen und andere Metalloproteinasen befinden sich als inaktive Proenzyme im Gewebe und werden latent synthetisiert (pro-MMPs).

Die interstitiellen Kollagenasen werden auch Matrix-Metalloproteinasen [MMP]-1 genannt und von Makrophagen, Fibroblasten, synovialen Zellen, Osteoblasten, Chondrozyten und endothelialen Zellen produziert (Werb und Alexander 1993). Sie sind spezifisch für das Substrat Kollagen und entfernen alle drei Ketten der Tripelhelix an einem bestimmten Punkt, zwischen dem Rest 775 und 776 der  $\alpha 1(I)$  Kette. Die Kollagenase spaltet Kollagen vom Typ VII, VIII und X – aber nicht das basale Membrankollagen vom Typ IV, V oder VI – und zerstört das strukturelle Maschenwerk (Schmid et al 1986). Die primäre Sequenz der Kollagenase besteht aus einem Bereich zur Aktivierung, zur Katalyse, zur Zinkbindung und zur Bindung von homologem Hämopexin-Vitronectin (Whitham et al 1986). Kollagenase wird durch Zink Chelat-Agentien wie z.B. 1,10-Phenanthroline gehemmt. Auch einige Thiolkomponenten wie Thiorphan und Penicillamin sind effektive Inhibitoren, ebenso Goldsalze und Phosphonamide (Blasi et al 1987). Die wichtigsten „endogenen“ Kollagenasehemmer sind die Inhibitoren der Metalloproteinasen (TIMP-1 bis 4) (Docherty und Murphy 1990; Stetler-Stevenson und Seo 2005, Pap et al 2006).

Die Kollagenase 2 wird auch MMP-8 genannt. Sie wird in den Granula der neutrophilen Granulozyten gespeichert und nach entsprechenden Stimula sezerniert (Hasty et al 1986). Kollagenase 2 baut vor allem Typ I Kollagen ab, weniger Typ III Kollagen und bevorzugt lösliches Kollagen im Vergleich zu fibrillärem Kollagen (Horwitz et al 1977). Der zelluläre Gehalt an Kollagenase 2 ist weitaus geringer als der von Elastase und Cathepsin G und seine Bedeutung beim Kollagenabbau ist noch weitgehend unklar (Hasty et al 1990). Stromelysin, auch Proteoglykanase, Transin und neutrale Proteinase oder MMP-3 genannt, findet sich vor allem in Fibroblastenkulturen, Synovium und anderen Zellen (Whitham et al 1986; Wilhelm et al 1986). Zu den Plasmaproteinsubstraten, die von Stromelysin gespalten werden, zählen Kollagen Typ IV; V, VII, IX; denaturiertes Kollagen Typ I; Laminin; Fibronectin; Elastin;  $\alpha 1$ -Proteinaseinhibitor; Immunglobuline und Substanz P (Whitham et al 1986). Stromelysin besitzt in der Multienzymkaskade der Prokollagenaktivierung eine wichtige Funktion (Gruber und Hanlay 2002; Murphy et al 1993; Unemori et al 1991). Stromelysin löst nicht nur Abschnitte, an denen Proteoglykane mit der kollagenen Matrix befestigt sind, sondern greift auch in anderen

Bereichen kollagene Fasern an (Shimada et al 1999). Es wird durch  $\alpha_2$ M und TIMP gehemmt (Murphy et al 1993).

Stromelysin-2, auch MMP-10 oder Transin-2 genannt, besitzt zu Stromelysin eine Sequenzgleichheit von nahezu 80%. Trotz fast gleicher Substratspezifität hat es eine andere Funktion (Nicholson et al 1990), an deren Aufklärung zurzeit gearbeitet wird.

MMP-2, Typ IV Kollagenase, wird auch Matrilysin genannt und von vielen Zellen in Kulturen sezerniert, zu denen auch Fibroblasten und Makrophagen zählen. MMP-2 baut Kollagen Typ IV ab (Garbisa et al 1981; Collier et al 1991). Außerdem spaltet es Fibronectin und Kollagen Typ V, VII und X; aber nicht Kollagen Typ I und VI; es wird durch TIMP-1 und TIMP-2 gehemmt (Stetler-Stevenson et al 2005; Collier et al 1991).

MMP-9, auch Typ IV Kollagenase, Typ V Kollagenase oder Invasin genannt, wird wie MMP-8 in den Granula der neutrophilen Granulozyten und in Makrophagen gespeichert und nach entsprechenden Stimula sezerniert: MMP-9 baut denaturiertes Kollagen, Fibronectin, Elastin und Kollagen Typ IV, V, VII und IX ab (Wilhelm et al 1986). Es wird auch von TIMP-1 gehemmt, während das MMP-9- Proenzym auch von TIMP-2 gehemmt wird.

MMP- 7, auch Pump-1, „punctated metalloproteinase“ oder „small uterine metalloproteinase“ genannt, besitzt dieselbe Substratspezifität wie Stromelysin, indem es Fibronectin, Proteoglykane, Typ IV Kollagen, Elastin und Gelatine abbaut.

Die Regulation der Knorpelsynthese und des Knorpelabbaus über die MMP-Achse ist sehr komplex (Tabelle 8).

**Die Serinproteinasen:** Diese Proteinasen besitzen in ihrem aktiven katalytischen Zentrum ein Serin. Die wichtigsten Vertreter dieser Klasse sind Cathepsin-G, Plasmin, PMN-Elastase, Mastzellproteinase I und II und die Tryptase.

Cathepsin-G löst das Kollagen aus dem Knorpel (Keiser und Sjoerdsma 1969). Die Wirkung von Cathepsin G auf die Knorpel-Proteoglykane ist spezifischer als die der PMN-Elastase (z.B. keine Wirkung auf Elastin oder Typ 1 Kollagen) (Keiser und Sjoerdsma 1969). Zu den Inhibitoren von Cathepsin-G zählen Plasmaprotein  $\alpha_1$ -Antichymotrypsin,  $\alpha_1$ -Proteinase inhibitor und  $\alpha_2$ -Makroglobulin (Travis et al 2001).

Beim extrazellulären Matrixabbau sind vor allem Plasmin, Plasminogenaktivatoren, Plasmakallikrein, Gewebekallikrein und Serinproteinasen aus den Granula der polymorphonukleären Leukozyten, T-Zellen und Mastzellen beteiligt. Plasmin baut Fibrin ab und spaltet das Knorpel-Proteoglykan (Lack 1962). Obwohl Plasmin kaum eine direkte Wirkung auf das Kollagen besitzt, vermag es die Prokollagenase zu aktivieren (Werb et al 1980). Die

wichtigsten Inhibitoren von Plasmin sind  $\alpha_2$ -plasmin Inhibitor und  $\alpha_2$ -M Aprotinin und das Protease-Nexin-1 aus den Fibroblasten (Saksela et al 1985; Blasi et al 1987).

Die PMN-Elastase ist unspezifisch und besitzt eine breite proteolytische Wirkung. Sie degradiert Kollagenfasern. Ihre Wirkung auf Kollagen Typ II ist vielfach stärker als die auf Typ1-Kollagen im Gegensatz zu der Kollagenase (Starkey et al 1977). Das Enzym degradiert auch Typ 4 Kollagen, das gegen die interstitielle Kollagenase resistent ist (Pipoly und Crouch 1987).

Tabelle 8

Stimulierende und hemmende Faktoren der MMP-Funktionen (modifiziert nach Werb und Alexander 1993)

<b>Stimulierende Faktoren</b>	<b>Hemmende Faktoren</b>
Zell zu Zell-Interaktionen	Glukokortikoide
Zell-Matrix Interaktionen über Integrine	Retinoide
Fibronectinfragmente	Erhöhte Produktion endogener Inhibitoren
Lösliches Kollagen	Hormone (Östrogene, Progesterone)
Interleukin-1 $\alpha$ und -1 $\beta$	Indomethacin
TNF- $\alpha$	Transforming Growth-Faktor- $\beta$
Growth Factors (EGF, PDGF, FGF, TGF- $\alpha$ , NGF, Relaxin)	Autokriner Inhibitor-Faktor
$\beta$ -adrenerge Hormone	Interferon- $\gamma$
Proteinasen	Transformation (E1 $\alpha$ )
Phagozytose	
Bildung von multinukleären Riesenzellen	
Prostaglandin E	
Phorbol-diester-Tumorpromoter	
Protein Phosphotyrosin-Phosphatasehemmer	
Bakterielle Toxine	
Colchizin	
Serum Amyloid A	
B <sub>2</sub> -Mikroglobulin	
Hitzeschock	
Ultraviolette Strahlung	
Cytochalasin B	
Calciumionen	
Eisen	
Zellaltern	

Mastzellen enthalten vor allem drei Serinproteinasen: die Mastzellchymase (Mastzellproteinase I), die atypische Mastzellchymase (Mastzellproteinase II), beide homolog zu Cathepsin-G (Werb et al 1980) und die Trypsase. Die Metallo- und Serinproteinasen mit ihrer Kollagentypspezifität sind in Tabelle 9 vergleichend dargestellt.

Tabelle 9

Die Kollagentypspezifitäten der **Metallo-** und **Serin**proteinasen (MMP Metalloproteinase) (modifiziert nach Werb und Alexander 1993)

<b>Proteinasen</b>	<b>Kollagentypspezifitäten</b>
MMP-1 (Kollagenase)	I=III > II, VII, X (keine Reaktion: IV, V, VI)
MMP-5 (PMN-Kollagenase)	I > III
MMP-2 (Typ IV Kollagenase = Matrilysin)	IV, V, VII, X (keine Reaktion: I, II, III, VI)
MMP-9 (Typ V Kollagenase = Inradolysin)	IV, V, VII, X, XI (keine Reaktion I, III)
MMP-3, 10, 11 (Stromelysin)	IV, V, VII, IX (keine Reaktion: I, VI)
MMP-8 (Kollagenase-2)	III, IV; nur bei nichthelik. Peptiden II > I, V )
<b>Mastzellenproteinasen</b>	IV > I
<b>Plasmin</b>	III, IV, V
<b>Cathepsine B, L, N</b>	I, II, IV

Die Proteinasen bildenden Zellen und ihre Inhibitoren sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

**Die Aspartatproteinasen:** Cathepsin D ist die bekannteste lysosomale Aspartatproteinase, die der gleichen Multigenfamilie entstammt wie Renin und Pepsin (Werb et al 1980, Bond und Butler 1987). Bei Entzündungen wird Cathepsin D durch Makrophagen und Bindegewebszellen als Proenzym sezerniert. Bei physiologischem (neutralem) pH besitzt Cathepsin D keine proteolytische Wirkung, auch nicht in seiner aktivierten Form. Hierzu sind vermutlich erhöhte Kohlendioxid- und Laktatkonzentrationen notwendig, die den pH erniedrigen (Dingle 1962). Die Enzymaktivität von Cathepsin D beim Knorpelabbau zu den Proteoglykanen ist bei einem pH von 5 maximal (Werb et al 1980).  $\alpha_2$ -M vermag zwar die Aspartatproteinasen zu binden, ist jedoch bei saurem pH nicht stabil. Die Wirkung von Cathepsin D kann durch Pepstatin (Pentapeptid eines Pilzes) antagonisiert werden.

Tabelle 10

Zellulärer Ursprung der EZM-abbauenden Proteinase und ihre Inhibitoren im Gelenkknorpel (MMP Metalloproteinase, PAI plasminogen Aktivator-Inhibitor, tPA tissue form of Plasminogen, uPA Urokinase-Plasminogen) (modifiziert nach Werb und Alexander 1993)

Zelltypen	Proteinasen	Proteinasehemmer
Synoviale Fibroblasten	Kollagenase, Stromelysin, Pump-1, MMP-2, MMP-9, Cathepsin L und D	TIMP-1, TIMP-2, PAI-1, protease nexin-1
Monozyten-Makrophagen	Kollagenase, Stromelysin, MMP-9, Elastase, Cathepsin L und D, uPA	$\alpha$ 1-Proteinaseinhibitor, $\alpha$ 2M, TIMP-1, PAI-1
Chondrozyten	Kollagenase, Stromelysin, Gelatinasen, Cathepsin D	TIMP-2, TIMP-1
Endotheliale Zellen	Kollagenase, Stromelysin, tPA	TIMP-2, TIMP-1
Granulozyten	MMP-5 und 8, uPA Elastase, Cathepsin G, MMP-9	PAI-1
Mastzellen	Mastzellenchymasen, Tryptase	Aprotinin
Osteoblasten / Osteozyten	Kollagenase, Stromelysin	TIMP-1
Zytotoxische Lymphozyten	Granzyme	

**Die Cysteinproteinasen:** Cathepsin-B und Cathepsin-L sind die bekanntesten lysosomalen Cysteinproteinasen. Diese beiden Enzyme sind nicht nur miteinander verwandt, sondern auch mit Papain verwandt (Turk et al 2003). Die Cathepsine werden als Vorstufen synthetisiert und in Lysosomen gespeichert, wo sie langsam in aktive Enzyme gespalten werden. Sie werden durch  $\alpha_2$ M und durch Proteininhibitoren der Cystatinfamilie (z.B. Plasmaprotein  $\alpha$ 1-cysteine proteinase inhibitor) gehemmt (Turk et al 2003), aber auch durch Thiolblocker, Leupeptin (propionyl-leucyl-leucyl-L-arginaldehyde, reversibler Inhibitor von Cathepsin B), E-64 (L-trans-epoxysuccinyl-leucylamido(4-guanidino) butane, irreversibler Inhibitor beider Enzymen) und einige Chlormethane (Katunuma et al 2003; Bromme und Kaleta 2002).

Eine allgemeine Übersicht zu den Inhibitoren der verschiedenen Proteinaseklassen ist in Tabelle 11 zusammengefasst.

Tabelle 11

Inhibitoren der matrixabbauenden Proteinasen ( **$\alpha$  2M** Alpha 2 Makroglobulin,  **$\alpha$ -CPI** Alpha-cysteine proteinase inhibitor, **TIMP** tissue inhibitor of metalloproteinases, **PAI** plasminogen activator inhibitor, **tPA** tissue form of plasminogen, **uPA** urokinase plasminogen) (modifiziert nach Werb und Alexander 1993)

Inhibitor	MG (kD)	Ursprung	Spezifität
$\alpha_2$ M	725	Plasma, Makrophagen	alle Klassen
$\alpha$ -CPI	54	Plasma	Cysteinproteinasen
$\alpha_1$ -Proteinaseinhibitor		Plasma, Makrophagen	PMN Elastase Cysteinproteinasen
Protease-Nexin-1		Fibroblasten	Trypsin-ähnl. Serinproteinasen
PAI-1		Fibroblasten, endotheliale Zellen	tPA, uPA
PAI-2		Makrophagen	tPA, uPA
$\alpha$ 1-Antichymotrypsin		Plasma	Chymotrypsin-ähnl. Proteinasen
Aprotinin	7	Mastzellen	Serinproteinasen
TIMP-1	28	Fibroblasten, endotheliale Zellen, Makrophagen, Knochen	Metalloproteinasen
TIMP-2	21	Endotheliale Zellen, Fibroblasten, Knorpel	Metalloproteinasen

### 1.3.2.2 Die Zytokine

Die proteinasenbedingten Veränderungen der ECM resultieren in einer Chondrozytenschädigung aufgrund einer vermehrten Zytokinsekretion. Während im gesunden Gelenk die Konzentration der Zytokine niedrig ist, finden sich beim OA-Gelenk hohe Zytokinkonzentrationen. Heute wird vermutet, dass auch bei der OA die Synovitis durch zirkulierende Autoantigene/-antikörper ausgelöst wird (z.B. das „cartilage intermediate layer protein“). Die aktivierten Synovialzellen und Monozyten sezernieren dann proinflammatorische Zytokine, die durch Aktivierung der Proteasen die katabolen knorpelzerstörenden Prozesse einleiten (Kato et al 2004). Nach Van den Berg (2002) werden bei der Arthrose drei Arten von Zytokinen differenziert: aufbauende, regulierende und zerstörende (z.B. die Schlüsselzytokine IL-1 und TNF).

**IGF-1:** Dieses Zytokin (Insulin-like growth factor) stimuliert die Chondrozyten, Proteoglykan und Kollagen zu produzieren (Schalkwijk et al 1989). Zusätzlich stimuliert es die Produktion von Integrin und Zellrezeptoren zur Stabilisierung der extrazellulären Matrix (Loeser 1997).

Außerdem stimuliert IGF-1 die Chondrozyten zur Matrixsynthese. Der Zusammenhang zwischen der abnehmenden IGF-1-Stimulation und der Altersarthrose ist noch unklar, da auch die Chondrozyten alter Affen ohne Arthrose sich weniger durch IGF-1 stimulieren ließen (Loeser und Shanker 2000).

**TGF- $\beta$ :** Dieses Zytokin (transforming growth factor- $\beta$ ) wird von aktivierten T-Zellen, Makrophagen, Blutplättchen, Osteozyten, synovialen Fibroblasten als inaktive Vorstufe produziert, die erst durch Proteinasen aktiviert werden muss. Im Gegensatz dazu produzieren T-Zellen und Makrophagen eine aktivierte Form. TGF- $\beta$  induziert indirekt das Fibroblastenwachstum und hemmt das Wachstum und die Zelldifferenzierung, auch die der B- und T-Zellen und endothelialer Zellen. Bei der Maus induziert TGF- $\beta$  die IGA Produktion der B-Zellen. In Makrophagen stimuliert TGF- $\beta$  die IL-1 Produktion, die wiederum die Makrophagenaktivierung hemmt. TGF $\beta$ -1 fördert wie IGF die Proliferation und Synthese der Knorpelzellen in gealterten Mäusen (Blumenfeld et al 1997). Experimentell (im Arthrosemodell) wurde nachgewiesen, dass TGF- $\beta$  die Expression der MMPs unterdrückt und die Bildung der Osteophyten fördert (Scharstuhl et al 2002). In einem anderen in vivo Modell (C57BI/10 Maus) wurde gezeigt, dass intraartikuläre Injektionen von TGF- $\beta$  in einer vermehrten Proteoglykansynthese resultiert (van Beuningen et al 2000). Zusätzlich schützt TGF- $\beta$  den Knorpel vor der destruktiven Wirkung von IL-1 $\beta$  (van Beuningen et al 1993). In der Synovialflüssigkeit von Arthrosepatienten wurden erhöhte TGF- $\beta$  Spiegel gemessen (Schlaak et al 1996; Scharstuhl et al 2002), aber auch erhöhte Konzentrationen von IL-1, IL-6 und TNF- $\alpha$ , die die Chondrozyten und Synovialzellen zur Produktion der MMPs stimulieren, die dann die Proteoglykansynthese und die Typ II Kollagensynthese modulieren. Neben der anabolen und antikatabolen Wirkung wurde aber auch gezeigt, dass TGF $\beta$  die Aggrecanase 4 stimuliert und damit die Aggrecan-Degradierung (Moulharat et al 2004).

**Interleukin-1:** Es wird zwischen sezerniertem und membrangebundenem IL-1 unterschieden; aber auch zwischen IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ , die beide hauptsächlich von aktivierten Synovialzellen und Monozyten produziert und sezerniert werden (Jacques et al 1999). Sie stimulieren sehr früh die T-Zell Aktivierung und vermehren die T-Zell Proliferationsantwort. Beide binden an den gleichen Rezeptor, der auf den meisten Zellen des Körpers lokalisiert ist, und haben ähnliche Wirkungen, doch besitzt der T-Zell IL-1Rezeptor eine höhere Affinität zu IL-1 $\beta$  als zu IL-1 $\alpha$ . Auch T-Zellen produzieren IL-1 $\alpha$ , doch konnte die mRNA dieser Zytokine erst 4 Tage nach der Aktivierung nachgewiesen werden. IL-1 $\alpha$  trägt daher nicht zur Primärantwort der T-Zellen bei. IL-1 stimuliert das Wachstum und die Differenzierung der B-Zellen und stimuliert sogar die zytotoxische Aktivität der „Natural Killer“ (NK)-Zellen und der Monozyten. IL-1 erleichtert das

Wachstum und die Proteinsynthese vieler Zellen (auch der Fibroblasten, Osteoblasten und Chondrozyten). Inhibitoren von IL-1 binden kompetitiv an den Rezeptor. Die IL-1 $\beta$ -Produktion im arthrotischen Gewebe korreliert mit dem Stadium der Knorpeldegeneration (Martel-Pelletier et al 1992). Die Regulation erfolgt im Wechselspiel mit Stickstoffmonoxid (NO) und dem Cyclooxygenase (COX)- Endprodukt PGE<sub>2</sub>, wobei IL-1 $\beta$  die Expression von PGE<sub>2</sub> (Ausdruck des Entzündungsprozesses (Hardy et al 2002) stimuliert. IL-1  $\beta$  induziert die Expression der MMP- mRNA durch Aktivierung von NF- $\kappa$ B (Elliott-Zytokin) und stimuliert die Neoangiogenese über den gefäßinduzierenden Faktor VEGF (vascular endothelial growth factor) (Voronov-Zytokin). Es reduziert die Transkription von Aggrecan (Stove et al 2000) und anderen Mechanismen, die die Integrität der ECM wiederherstellen könnten (Fernandes et al 2002).

**TNF $\alpha$ :** TNF $\alpha$  kommt membrangebunden vor, wird aber auch sezerniert, vor allem von aktivierten T-Zellen, Mastzellen und Makrophagen (Monozyten). TNF- $\alpha$ -Rezeptoren finden sich u.a. auf aktivierten T- und B-Zellen, Makrophagen, Neutrophilen, Fibroblasten und NK-Zellen (Cavaillon 1993). Die TNF- $\alpha$ - Expression wird durch IFN- $\gamma$  stimuliert. TNF- $\alpha$  selbst stimuliert die IL-2 Rezeptorexpression, nicht aber die IL-2 Sekretion der aktivierten T-Zellen und erhöht die proliferative Antwort der T-Zellen sowie die Proliferation und Differenzierung der B-Zellen und die zytotoxische Aktivität der NK Zellen. Als Antwort auf TNF- $\alpha$  produzieren Makrophagen IL-1 und PGE<sub>2</sub>. TNF- $\alpha$  ist ein potenterer Neutrophilenaktivator als IFN-  $\gamma$ . Wie IL-1 stimuliert TNF- $\alpha$  den Zelltransfer in das Gewebe und die Produktion endothelialer MHC Klasse I Moleküle, von Zytokinen und adhäsiven Molekülen. Der TNF- $\alpha$  Rezeptor wird durch aktivierte Zellen abgebaut und könnte so *in vivo* als TNF- $\alpha$  Aktivitätshemmer wirken. Moos et al 1999 fanden an OA-Knorpeln Phänotypen mit hoher und niedriger TNF $\alpha$ -Produktion. TNF $\alpha$  stimuliert sich gegenseitig mit IL-6. Die TNF $\alpha$  stimulierte NO-Produktion wird durch IL-4 gehemmt (Schuerwegh et al 2003). Die von Moos et al (2000) gefundenen Zusammenhänge zwischen Arthrose und IL1- $\beta$ -Genotyp beim TNF $\alpha$  Low-Phänotyp und IL-1 Rezeptor Antagonist Genotyp beim TNF $\alpha$  High-Phänotyp weisen auf die Bedeutung der katabolen Zytokine bei der Entstehung der OA.

Beide katabolen Zytokine, IL-1 und TNF $\alpha$ , erhöhen signifikant die Genexpression der MMPs (Fernandes et al 2002). Das entzündungsaggressivere IL-1 hemmt aber die Proteoglykansynthese 100-fach stärker als TNF $\alpha$  (van den Berg 1998) und ist damit reaktiv auf diese beiden Zytokine und es kommt es zu einer verstärkten Expression der Zytokine IL-4, IL-10 und TGF $\beta$ . Ob diese Expression durch IL-1 $\beta$  initiiert ist oder als Kontraregulation zu betrachten ist, kann noch nicht beantwortet werden. IL-10 wird in anderen Arbeiten die Rolle eines antiinflammatorischen

Zytokins zugeschrieben (Martel-Pelletier 1999), so dass es durchaus denkbar ist, dass IL-10 reaktiv zum Schutz der Chondrozyten sezerniert wird.

Im experimentellen Modell wurden TNF $\alpha$ -transgene Mäuse (sie exprimieren gelenkspezifisch eine Mutante von menschlichem TNF $\alpha$ ) mit c-fos-Knock-Out-Mäusen gekreuzt, die keine Osteoklasten besitzen und deshalb zur Osteopetrose neigen. Bei den resultierenden transgenen Mäusen kam es zu einer Gelenkentzündung ohne Knochendestruktion. Das belegt, dass auch die Osteoklasten bei der Knochenzerstörung beteiligt sind (Redlich-Zytokin).

**IL-4:** es besitzt eine schwache antientzündliche Wirkung im Wechselspiel mit IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$  (Schuerwegh et al 2003).

**IL-6:** Dieses Zytokin wird durch aktivierte T-Zellen, Makrophagen-Monozyten, und nach TNF- $\alpha$  oder IL-1 Stimulation auch von Fibroblasten produziert. IL-6 wirkt synergistisch zu IL-1 und TNF $\alpha$  auf die Expression von VEGF (Nakahara-Zytokin). Das Zytokin besitzt zwei wichtige Funktionen: die Beeinflussung der B-Zell Differenzierung und die Bildung von Akut-Phase-Proteinen. IL-6 und der IL-6 Rezeptor- $\alpha$  (IL-6-R $\alpha$ ) unterstützen die katabolen Effekte von IL-1 und TNF $\alpha$  (Flannery et al 2000). In Chondrozytenkulturen von menschlichem Knorpel wurde unter IL-6 lediglich eine geringe Hemmung der Proteoglykansynthese beobachtet. Die Kombination von IL-6 mit löslichem IL-6 Rezeptor- $\alpha$  verstärkt die Hemmung, allerdings nicht so stark wie IL-1 $\beta$  (Guerne et al 1999). Die IL-1 $\beta$ -induzierte Proteoglykansynthesehemmung kann durch Antikörper gegen rekombinantes IL-6 aufgehoben werden, was vermuten lässt, dass IL-6 für die IL-1 induzierte Proteoglykansynthesehemmung benötigt wird (Nietfeld et al 1990).

**IL-7** aus RA-Synoviozyten stimuliert die TNF $\alpha$ -Produktion synovialer Monozyten sowie die Expression von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  synovialer CD4 $^+$ T-Zellen (van Roon-Zytokin).

**IL-10 und IL-4:** Dieser die Cytokinsynthese hemmende Faktor wird von murinen und humanen T-Zellen (den Th2-Zellen) produziert. IL-10 und IL-4 hemmen den Knorpelabbau, indem sie die proinflammatorischen Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-1 hemmen. In Chondrozyten von OA-Patienten wurde im Vergleich zu gesundem Knorpel eine vermehrte IL-10-Expression gefunden: je stärker der Arthrosegrad, desto höher die IL-10-Konzentration (Iannone et al 2001). IL-10 antagonisiert zudem die mononukleären Zellen der Synovialis, wodurch es die Wirkung von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  hemmt (van Roon et al 1996; Iannone et al 2001). IL-4 hemmt in menschlichen Chondrozyten die durch IL-1 hervorgerufene mRNA-Produktion von Stromelysin (Nemoto et al 1997) und dessen Aktivierung. Moos und Mitarbeiter (1999) zeigten an menschlichen Knorpelproben, dass IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 und TGF $\beta$  sich gegenseitig stimulieren. Folge der durch die Zytokine aktivierten Fibroblasten und somit der Synthese von Kollagen Typ I und III ist eine Fibrosierung der Gelenkkapsel des veränderten Gelenks (Shiraishi et al 1997).

**IL-17** wirkt bei der RA additiv oder synergistisch mit anderen proinflammatorischen Zytokinen (insbesondere IL-1 und TNF $\alpha$ ) (Miossec 2004). Darüber hinaus stimuliert es die Monozyten zur Synthese von IL-1 und TNF $\alpha$ . Durch Stimulation der NO-Produktion wirkt es hemmend auf die PG-Synthese (Pacquelet et al 2002) und stimulierend auf die Produktion von einem an Hyaluronsäure bindenden Protein (Kehlen et al 2003). Es stimuliert die Expression von MMP-13 (Rifas et al 2003) und ist bei der Regulation der Knochenzerstörung beteiligt (Udagawa 2003).

**IL-18** wird durch IL-12 reguliert. Im Einklang mit IL-12 stimuliert es die IFN $\gamma$ -Produktion der T-Zellen und der NK-Zellen. Synovialzellen von RA-Patienten exprimieren IL-18 zusammen mit IL-1 und TNF $\alpha$  (Joosten et al 2004). Eine lokale Injektion von IL-18 in die Pfoten von Ratten resultiert in einer Entzündung (Komai-Koma et al 2003). Während sich bei RA hohe IL-18-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit nachweisen lassen, ist die IL-18-Expression peripherer Monozyten im Blut trotzdem relativ gering (Moller 2004). Der spezifische endogene IL-18-Hemmer IL18BP (binding protein), der eine hohe Affinität zum Rezeptor besitzt, vermag das Entzündungsausmaß zu reduzieren (Smeets et al 2003).

Auch **IL-23** ist mit der IL-12-Wirkung verflochten. Nach Gabe spezifischer IL-23-Hemmer nahm im Tierexperiment die Entzündung ab (Cua et al 2003). IL-23 stimuliert die CD4 T-Zellen zur IL-17-Expression.

Auch der „**Macrophage Migration Inhibitory Factor**“ (MIF) zählt zu den proinflammatorischen Zytokinen (Morand 2005). Er wirkt über IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  und „ERK mitogen activated protein (MAP) kinases“ (ERK ist ein Bestandteil der Mechanotransduktion in primären bovinen Osteoblasten), nicht aber über NF- $\kappa$ B (Lacey et al 2003). In MIF-Knock-Out-Mäusen ist die Synovialzellenproduktion vermindert, weshalb MIF-Hemmer therapeutisch nicht uninteressant sind.

### 1.3.2.3 Stickoxid

„Nitric Oxide“ (NO), ebenfalls ein wichtiger Mediator des Knorpelabbaus (Evans et al 1995), wurde in osteoarthritisch geschädigten Knorpelzellen in hohen Konzentrationen nachgewiesen (Spreng et al 2000). Die Produktion von intraartikulärem NO und Prostaglandin E2 (PGE2) wird durch Zytokine (vor allem IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ ) über die induzierbare NO-Synthase stimuliert (Pelletier et al 1998). NO kann die Entwicklung der OA durch mehrere Mechanismen aufrecht erhalten, wie durch Hemmung der Synthese der Knorpelmatrix, durch Hemmung der Produktion von IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1Ra) an den Chondrozyten, durch Verlust der Knorpelzell-Differenzierung und Induktion von Zelltod (Apoptose), durch Steigerung der MMP-Expression und NF-KB-Aktivierung (Taskiran et al 1994; Lotz et al 1999, Fernandes et al 2002).

## 2. Zielsetzung

Seit mehr als 50 Jahren werden Zubereitungen aus *Harpagophytum procumbens* DC zur Behandlung rheumatischer Beschwerden eingesetzt (ESCOP 2003). Eine Mitteilung aus der Universität Jena aus dem Jahr 1958 lautet: „Aus unseren Beobachtungen ergibt sich mit hinreichender Deutlichkeit, dass die Wurzeln des *Harpagophytum procumbens* einen überaus wirksamen antiphlogistischen und antiarthritischen Stoff enthalten, welcher beim Kochen in den Teeaufguss übergeht. Die Teeabkochungen bewirken sowohl bei peroraler wie auch parenteraler Zufuhr eine intensive Abschwellung der experimentell erzeugten Gelenkentzündung (Formaldehydarthritis) der weißen Ratte mit Wiederherstellung der vollen Gelenkfunktion. Bemerkenswerterweise kommt es nach dem Absetzen der Behandlung weder zu einem Stillstand des Heilungsvorgangs noch zu einem Rückfall der Entzündung, sondern die einmal in Gang gesetzte Heilung schreitet kontinuierlich fort“ (Zorn 1958). Im Verlauf einer einjährigen Behandlung mit einem wässrigen Extrakt aus *Harpagophytum procumbens* über die Dauer eines Jahres kam es bei Patienten mit chronischen Rückenschmerzleiden innerhalb von 3 Monaten zu einer Besserung der Rückenschmerzexazerbationen um etwa 80% (Per Protokollauswertung) bzw. um etwa 60% (Intention-to-treat-Auswertung). Die Schmerzlinderung hielt bis zum Ende der Behandlung an (Chrubasik et al 2005a). Einige Patienten, die jahrelang unter den Rückenschmerzen gelitten hatten, waren völlig schmerzfrei (Chrubasik et al 2005a). In-vitro Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Wirkbestandteile in *Harpagophytum procumbens* nicht nur die Mediatoren der Entzündung (Prostaglandin E<sub>2</sub> (Fiebich et al 2001; Chrubasik et al 2002a; Jang et al 2003; Huang et al 2005), Leukotriene (Tippler et al 1996; Loew et al 2001) hemmen, sondern auch die Mediatoren der Knorpelzerstörung wie TNF $\alpha$ , Il-1 $\beta$ , Stickoxid (Fiebich et al 2001; Chrubasik et al 2002a; Huang et al 2005) und Elastase (Boje 2003).

Um zu sehen, ob die In-Vitro-Untersuchungen ein Surrogat für eine knorpelprotektive Wirkung sind, wurde in einem Osteoarthritis-Modell beim Kaninchen ein *Harpagophytum*-Spezialextrakt (FB 9195, 14% Harpagosid, Finzelberg, Andernach) über die Dauer von 6 Monaten mit dem Futter verabreicht. Ziel dieser Untersuchung ist es,

- (1) histologisch Hüftknorpelgewebe von mit *Harpagophytum*-Extrakt behandelten an einer Hüfte operierter Kaninchen mit Hüftknorpelgewebe von unbehandelten operierten Tieren zu vergleichen
- (2) das Hüftknorpelgewebe der beiden Kaninchengruppen nach dem Design entsprechender Primer molekularbiologisch aufzuarbeiten und

- (3) die Wirkung von Harpagophytum- und Weidenrindenextrakt auf die stimulierte Expression von Entzündungsmediatoren in bovinen und humanen Chondrozytenkulturen zu untersuchen
- um einen Beleg für eine eventuelle knorpelprotektive Wirkung der Extrakte zu erhalten.

### **3. Materialien und Methoden**

#### **3.1 Gewinnung des Untersuchungsmaterials**

Nach Genehmigung der Veterinärethikkommission der Universität Frankfurt wurde bei 23 weiblichen Kaninchen (New Zealand White Rabbits, mindestens 11 Monate alt, Gewicht 4,2 bis 5,3 kg, Züchter: Lammers, 53881 Euskirchen) am rechten Hinterbein das vordere Kreuzband durchtrennt und der mediale Meniscus entfernt. 11 Kaninchen erhielten über einen Zeitraum von 6 Monaten Futter, dem Harpagophytumextrakt (14% Harpagosid) 76 mg / 100 g mit 0,1 mg Harpagosid pro Gramm zugesetzt war. Tatsächlich nahmen die Kaninchen etwa das Doppelte der in der deutschen Monographie der Kommission E des ehemaligen Bundesgesundheitsamtes (Bundesanzeiger 1989, ergänzt 1990) empfohlenen Tagesdosis für Harpagophytum-Zubereitung auf. Nach 6 Monaten wurden die Kaninchen per Genickschlag anästhesiert und nach Eröffnen der Arteria jugularis entblutet. Der Hüftkopf wurde freipräpariert und der Knorpel abgeschält: zur RNA-Extraktion, zur Kryoeinbettung und zur Fixierung in Formalin.

##### **3.1.1 Kryo-Einbettung**

Aus dem rechten und linken Hüftkopf wurde Gewebe zur Kryo-Einbettung entnommen. Hierzu wurde eine Metall-Nierenschale mit dem Boden nach oben in eine Styroporkiste hineingelegt und die Kiste bis zum oberen Rand der Nierenschale mit flüssigem Stickstoff gefüllt. Das Bett wurde mit Medium (Jung, Darmstadt, Deutschland) gefüllt, das Gewebe in das Medium eingebracht und eventuell mit Medium nachtitriert, bis das Gewebe (ohne Lufteinschluß) völlig bedeckt war. Das Bett wurde auf den Boden der Nierenschale platziert bis es gefroren war, auf Trockeneis zwischengelagert und bei -80°C eingefroren.

##### **3.1.2 Asservierung zur RNA-Extraktion**

Knorpelgewebe beidseits aus rechtem und linkem Hüftkopf wurde für die Extraktion der RNA und späterer DNA-Produktion asserviert. Hierzu wurde der Knorpel in einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Mörser eingebracht und nach Schockgefrieren zerdrückt. Der zerdrückte Knorpel wurde mit flüssigem Stickstoff in ein 50 ml Falconröhrchen (Cellstar, Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt. Anschließend wurde das Zellgemisch mit 1,0 ml Trizol (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) aufgenommen und durch einen Quiaschredder filtriert, bei 13000 UpM zentrifugiert, auf Trockeneis zwischengelagert und bei minus 80 Grad aufbewahrt. Der Transport in die Klinik und Poliklinik für Innere Medizin / Universität Regensburg erfolgte auf Trockeneis.

## **3.2 Histologische Färbungen**

### **3.2.1 Anfertigung von Kryogewebschnitten**

Zum Anfertigen von Kryogewebschnitten wurde ein Jung Frigocut 2800E Kryostat (Leica, Nussloch, Deutschland) verwendet. Die Schichtdicke betrug 5µm bei einer Schneidetemperatur zwischen -20°C bis -28°C. Der Fixierungsvorgang wurde angepasst mit OCTm Tissue-Tek R (DiaTec, Hallstadt, Deutschland). Nach den Färbungen wurden die Schnitte mit dem Mikroskopsystem Leitz DM RBE, Software: Metaview (Leica, Heidelberg, Deutschland) fotografiert. Drei Untersucher zählten unabhängig voneinander die Zellkerne und beurteilten die Farbintensität des Zytoplasmas anhand einer Skala 0-2 (normal = 0, mittelstark = 1, stark = 2). Das Konsensergebnis zur Zellzahl und Farbintensität wurde statistisch berechnet (siehe Statistik, S. 52).

#### **3.2.1.1 HE Färbung (Kernfärbung in Hämalaun)**

Die Schnitte wurden luftgetrocknet. Anschließend wurden sie in eine Hämalaun-Lösung eingetaucht, geschwenkt zur Färbung der Zellkerne und danach mit Wasser 5 Minuten lang gespült. Nach kurzem Einbringen in eine 0,1%ige Eosin-Lösung zur Anfärbung des Zytoplasmas wurde wieder mit Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte in eine aufsteigende Alkoholreihe (Beginn 70%) getaucht und zweimal mit Xylol fixiert und mit Entellan eingedeckt. Kerne und das Zytoplasma wurden mit Eosin rot angefärbt.

#### **3.2.1.2 Elastica van Gieson Färbung**

Es wurde der Färbekit nach Elastica van Gieson, Merck, Darmstadt, Deutschland verwendet. Die Schnitte wurden nach Lufttrocknung 10 Minuten mit einer Elastin-Lösung (nach Weigert) versetzt und anschließend 1 Minute unter fließendem Wasser gespült. Danach wurden die Schnitte 5 Minuten in eine Mischlösung (Weigert A zu Weigert B 1:1) eingebracht und anschließend eine Minute unter fließendem Wasser gespült. Nach Einbringen in eine Pikrofuchsinlösung für die Dauer von 2 Minuten wurden die Schnitte je eine Minute lang in eine aufsteigende Alkoholreihe (Beginn 70%) getaucht, dann mit Xylol fixiert und eingedeckt. Dadurch wurden die Kerne schwarz-braun, das Kollagen und Bindegewebe leuchtend rot und glatte und quergestreifte Muskulatur gelb gefärbt.

### **3.2.1.3 Safranin-O Färbung**

Die Schnitte wurden nach kurzem Eintauchen in destilliertem Wasser 3 Minuten in eine Fast Green Lösung (5g Farbe pro 500 ml Aqua dest: Merck, Darmstadt, Deutschland) getaucht, bevor sie kurz in 3 % Essigsäure-Lösung eingebracht wurden. Anschließend wurden die Schnitte 5 Minuten in einer Safranin-O- Lösung (270 ml 3% Essigsäure + 30 ml Safranin-O: Merck, Darmstadt, Deutschland) geschwenkt und danach kurz mit destilliertem Wasser gespült. Nach Einbringen in eine aufsteigende Alkoholreihe (Beginn 70%) wurden die Schnitte mit Xylol fixiert und eingebettet. Zellkerne mit dichtem Chromatin, Chromosomen, Nucleoli und verholzte Zellwände wurden so rot angefärbt, das Cytoplasma, die Kernmembranen und die Cellulosewände grün.

## **3.3 Nachweis von Zytokinen**

### **3.3.1 mRNA Isolierung mit Trizol**

Die tiefgefrorenen Proben nach Quiaschredder-Behandlung wurden aufgetaut, mit 200µl Chloroform / Isoamylalkohol 24:1 versetzt und nach 3 Minuten vortexen 15 Minuten lang bei 11000 rpm (bei 4°C) zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Eppendorfhütchen überführt, um keine DNA- oder Proteine enthaltenden Bestandteile mitzunehmen. Im Anschluss wurden 500 µl Isopropanol hinzugegeben und mehrmals zur RNA Demaskierung invertiert, bevor die Mischung 30 Minuten im Kühlschrank inkubiert wurde. Nach 20 Minuten Kühlzentrifugation bei 12000 rpm wurde der Überstand bis auf das Pellet abgenommen, 1 ml Ethanol 100% zugegeben und resuspendiert. Nach weiterer Zentrifugation (5 Minuten bei 7500 rpm, 10°C) wurde der Überstand verworfen und der Rest in 1 ml Ethanol 75% resuspendiert, erneut 5 Minuten bei 7500 rpm (10°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei offenem Deckel im Heizblock bei 30°C getrocknet. Danach erfolgte die Resuspension in 45µl RNA Secure, die mit 15 µl DNase versetzt wurde (10 µl DNase + 70 µl RDD-Puffer). Die Mischung wurde kurz gevortext, dann abzentrifugiert und 30 Minuten bei 37°C und 20 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur wurde der RNA Gehalt bestimmt und der Rest bei -80°C gelagert.

Zur exakten Konzentrationsbestimmung der RNA für die RT-PCR und die cDNA-Arrays wurde der RiboGreen tm RNA Quantification Kit (Molecular Probes, Leiden, NL) verwendet, bei dem sich der Fluoreszenzfarbstoff RiboGreen an die RNA bindet. Die Fluoreszenz wurde im Spectra Fluor Plus Fluorometer (Tecan, Crailsheim) bestimmt und die RNA Konzentration anschließend

mit Hilfe der Magellan Software ermittelt. Die Proben wurden entsprechend ihrer RNA Konzentration verdünnt, um einen Endkonzentrationsgehalt von 100 ng/μl zu erreichen.

### 3.3.2 Reverse Transkription zur Herstellung von cDNA

Zum Nachweis von RNA mittels PCR wurde an der einsträngigen RNA mittels einer retroviralen reversen Transkriptase (RT) eine zur RNA komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert. Diese cDNA diente bei der PCR als Matrize. Für diesen Prozess wurde der 1<sup>st</sup> Strand cDNA Synthesis Kit mit AMV reverse Transkriptase (Boehringer, Mannheim, Deutschland) und das RNase-free Dnase Set (Qiagen, Hilden, Deutschland) verwendet. Der Reaktionsansatz zur cDNA-Synthese wurde in 0,2 ml PCR Reaktionsgefäßen auf Eis hergestellt:

Reagenzien	μl pro 20μl Ansatz
5 x RT Puffer (500 mM Tris, 500mM KCl, 40 mM MgCl <sub>2</sub> , pH 8,3)	4
dNTP	2
Random Hexamers p(dN) <sub>6</sub>	0,25
AMV Reverse Transkriptase	2,6
Rnase Inhibitor (40 U/μl)	0,8
H <sub>2</sub> O bidest	5,35
RNA	5

Die cDNA-Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen:

25°	10 Min	Binden der Oligonukleotide an die RNA
42°	60 Min	Überschreiben der RNA in cDNA
99°	5 Min	Inaktivierung der Reversen Transkriptase
4°	∞	Beendigung der Reaktion

### 3.3.3 Design der genspezifischen Oligonukleotide

Da die Gensequenzen des Kaninchengenoms nur zum Teil bekannt sind, wurden aus den matrixum- und abbauenden Molekülen die Gene ausgesucht aus denen sich kompatible Gensequenzen erstellen liessen. Die genspezifischen Oligonukleotide wurden mit dem Programm „DNAsis 2.5“ (Hitachi Software Engineering Co.) entworfen, mittels BLAST Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) auf ihre Spezifität hin geprüft (Altschul et al 1997) und von der Firma MWG Biotech, Ebersberg in HPSF-Qualität (high purity salt free) bezogen. Die lyophilisierten Oligonukleotide wurden in destilliertem Wasser gelöst (100 pmol/μl). Beim Entwurf der genspezifischen Oligonukleotide wurden folgende Parameter beachtet: Die Oligonukleotidlänge sollte 20 bzw. 21 Bp betragen, da der gaschromatographisch ermittelte

Gehalt (GC) der Oligonukleotide Auswirkungen auf die Schmelztemperatur des Oligonukleotids und somit auf die Primerbindungstemperatur hat. Der optimale GC-Gehalt soll 45 bis 55% betragen. Da die veröffentlichte cDNA Bibliothek für Kaninchen nur eine begrenzte Anzahl kompletter Gene enthält, musste ein GC Gehalt bis 70% akzeptiert werden. Der GC-Gehalt der „forward“ and „reverse“ Oligonukleotide musste aber gleich sein. Von den in Tabelle 12 zusammengefassten erstellten und im Blastprogramm geprüften Primern wurden folgende mittels PCR getestet:

Tabelle 12

Design der genspezifischen Oligonukleotide nach Überprüfung mit Blast

<b>Primer</b>	<b>Sequenz(5'-3')</b>
gapDH-forward	ATCACTGCCACCCAGAAGAC
gapDH-reverse	GTGAGTTTCCCGTTCAGGTC
IL-8rec-forward	GTCGTCATCTATGCCCTGGT
IL-8rec-reverse	GCCAGGTTTCAGCAGGTAGAC
IL-6-forward	CTTCAGGCCAAGTTCAGGAG
IL6-reverse	GGGTGGCTTCTTCATTCAA
18Shuman-forward	GTCTGTGATCGGGTTAGATG
18Shuman-reverse	AGCTTATGACCCGCACTTAC
18Srabbit-forward	CGCGGTTCTATTTTGTTGGT
18Srabbit-reverse	GGTCGGGTCATGGGAATAAC
MMP13-forward	TCCCTTGATGCCATTACCAG
MMP13-reverse	TAGCCATTAGGAGCCCAAAA
MMP13-forward*	CCCTTGATGCCATTACCAGT
MMP13-reverse*	GGCCAAAAGGACTTCGTAA
TIMP-2-forward	ACGGCAACCCCATCAAGAGGA
TIMP-2-reverse	GGAGTCCCAGGGCACGATGAA
Aggrecan-forward	GCCTGTGGTGTGCGGTGGTG
Aggrecan-reverse	GGACCCAGGACCCCAAGTT
Osteonectin-forward	ACCCCATGTGCGTGTGCCA
Osteonectin-reverse	ACGCAGTGGGGCCAGCTCAG
Biglykan-forward	GCGCATCTCAGAAGCCAAGC
Biglykan-reverse	CCGTTGTAGTAGGCCCGCTTC

### 3.3.4 Durchführung der PCR zum Zytokinnachweis

#### Thermocycler-Verfahren

Es wurde die PCR-Methode nach Saiki (Saiki et al 1985; Saiki et al 1988) gewählt (Gesamtvolumen 20  $\mu$ l). Als Matrize diente die gewonnene cDNA (siehe oben), zu der je 10 pmol der entsprechenden Oligonukleotid-Primerlösung und 10  $\mu$ l des Mastermixes aus dem Taq PCR Master Mix Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) sowie nukleinsäurefreies destilliertes Wasser hinzugefügt wurden (Gesamtvolumen 20 $\mu$ l):

Reagenzien	$\mu$ l pro 20 $\mu$ l Ansatz
Supermix	10
Primer	1
dH <sub>2</sub> O	7
cDNA	2

Die Amplifizierung erfolgte standardmäßig in einem Thermocycler nach folgendem Programm:

5 Min	94° C		Denaturierung
35x	94° C	30s	Denaturierung
	...° C	30s	Primerbindung (°C: individuelle Annealingstemperatur)
	72° C	60s	Primerverlängerung
7 Min	72° C		Primerverlängerung

Dabei war der Annealingtemperatursturz (schnelles Herabkühlen auf eine Temperatur um 50°C) vom jeweils eingesetzten Oligonukleotid-Primerpaar abhängig und wurde individuell festgelegt, damit sich der komplementäre Primer an die passende Stelle der DNA anlagern (annealen) konnte. Der ca. 20 Basenpaare große Primer lagerte sich im Allgemeinen sehr schnell an die entsprechende Stelle an, so dass in späteren Zyklen bereits angereicherte DNA (die wesentlich größer ist) keine Möglichkeit fand, den Primer zu verdrängen. Bei der anschließenden Polymerisation wurde die Temperatur auf 72°C erhöht, um die thermostabile Polymerase in den Bereich des Temperaturoptimums zu bringen. Dadurch wurde der an der DNA haftende Primer verlängert, indem Desoxynukleotide komplementär zum Template eingebaut wurden. Die Polymerisation endete mit der Komplettierung der DNA. Durch erneutes Aufkochen auf 96°C (Denaturierung) wurde die entstandene DNA-Doppelhelix wieder in zwei Einzelstränge getrennt, von denen der eine wieder als Vorlage für eine erneute Polymerisationsrunde zur Verfügung stand (Abb. 10). Im Einzelfall umfassten die Polymerase-Kettenreaktionen 20 - 50 Zyklen, je nach verwendeter Polymerase, Temperatur oder Template-Länge. Um Mediatoren nachweisen zu können, wurden die PCR-Produkte durch Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe

identifiziert. Das Laufgel wurde wie folgt hergestellt: 0,3g Seaham LE Agarose (Biozym) wurde mit 30 ml TAE Puffer (Tris 40mM, Essig 20mM) vermischt und in der Mikrowelle kurz aufgekocht. Beim Abkühlen wurde Gelstar „nucleid acid gel stain“ (BMA Bio Whittaker Molekular Application) zugegeben und nach dem Erkalten 20µl der cDNA-Loading Buffer-Mischung (je 20µl) auf das Gel appliziert. Die erste Säule diente der Kontrolle mit 2µl 100 bp ladder (Standard) (Agarose-Gelelektrophorese, Gibco, Karlsruhe). Durch das angelegte Spannungsfeld wanderten die kürzeren DNA-Stränge schneller zum Pluspol als die längeren. Zur Identifizierung der Zytokine wurden die Basenpaarlängen der PCR-Produkte mit dem Standard (bp-ladder) verglichen.

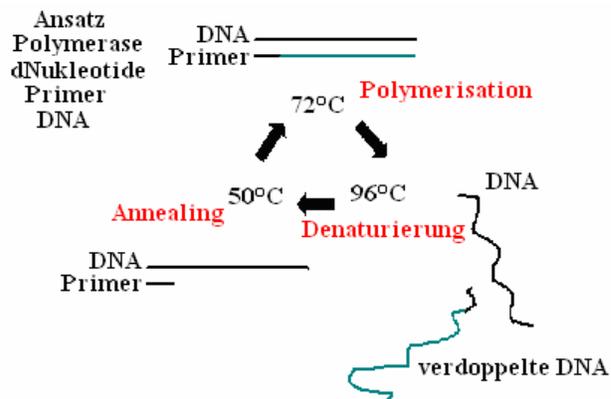


Abbildung 10

Vereinfachtes Schema eines PCR-Ablaufs

### Lightcycler-Verfahren

Der LightCycler® (GeneAmp R PCR System 9700, PE Applied Biosystems, Roche Diagnostics, Weiterstadt) ist ein extrem schneller Thermocycler mit der Möglichkeit der Echtzeit- (Real-Time) Fluoreszenz-Detektion. Dadurch ist es möglich, die Amplifikation einer Nukleinsäure während des Laufes zu beobachten. Das ermöglicht die Quantifizierung der Ausgangsmenge, das heißt die Quantifizierung von mRNA (cDNA) und DNA, sowie die Typisierung von Proben mittels einer Schmelzpunktanalyse. Der LightCycler® arbeitet mit hohen Heiz- und Kühlraten. Innerhalb von nur 20 Minuten können 30 Zyklen durchgeführt werden. Der LightCycler® weist die Fluoreszenz in drei getrennten Kanälen nach. Die Quantifizierung des zunehmenden PCR Produkts erfolgt durch Fluoreszenzmessungen DNA bindender Fluorophore, TaqMan oder Hybridisierungssonden, da während der Elongationsphase immer mehr Farbstoffmoleküle an die neusynthetisierte DNA binden können. Der Lightcycler misst am Ende eines jeden Elongationsschnittes die Gesamtfluoreszenz in der Kapillare (530nm, Kanal 1) und somit die Zunahme an PCR-Produkten. Da die Fluoreszenz unabhängig von der Sequenz der DNA ist, muss nach jedem Lauf eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden, um das Vorhandensein

von Primerdimeren und unspezifischen Produkten ausschließen zu können. Da der Schmelzpunkt, bei dem sich die beiden DNA-Einzelstränge voneinander trennen, für jedes PCR-Produkt spezifisch ist und von dessen Länge und GC-Gehalt abhängt, nimmt die Fluoreszenz zu diesem Zeitpunkt stark ab (da SYBR-Green sich nur an doppelsträngige DNA bindet). Zeigt eine Schmelzkurve zwei oder mehrere solcher Punkte, ist vom Vorhandensein unspezifischer Produkte auszugehen, wodurch die Quantifizierung unmöglich wird. Zur relativen Quantifizierung wurde 18S-rRNA als interner Standard verwendet, wobei die Reaktionen für das zu untersuchende Gen und die 18S-rRNA parallel in einem Lauf angesetzt wurden. So konnte durch die Real-Time Detektion das Amplicon direkt quantifiziert werden. Durch die Vermeidung einer Post-PCR-Manipulation war dazuhin die Kontamination mit anderen PCR Produkten nahezu ausgeschlossen.

Zur relativen Quantifizierung müssen die verwendeten Oligonukleid-Paare an die der 18S-rRNA (internen Standard) angepasst werden. Die ideale Primerbindungstemperatur sollte möglichst nahe an der des internen Standard-Primerpaares liegen, da dies die idealen PCR-Bedingungen zur Bildung beider Fragmente gewährleistet. Unter idealen PCR-Bedingungen findet eine Produktverdopplung pro Zyklus statt, entsprechend einer optimalen Effizienz von 2. Zunächst sollten die Effizienzen der in Relation gesetzten Gene möglichst nahe beieinander liegen, um Fehler zu vermeiden (bei ungleicher Amplifikationseffizienz besteht die Gefahr, bei der relativen Quantifizierung falsche relative Expressionsunterschiede zu erhalten). Dies kann nur durch die Wahl des geeigneten Oligonukleotids vermieden werden (Tabelle 13).

Tabelle 13

Beispiel für effizienzen- und zyklenzahlabhängige Expressionsunterschiede (n=30):

N= Anzahl Zyklen; N=Anzahl amplifizierter Moleküle; No= Anzahl Ausgangsmoleküle

E=1,95	$N = N_0 \times 1,95^{30} = N_0 \times 5,0 \times 10^8$	⇒ 2,2facher Unterschied
E=1,90	$N = N_0 \times 1,90^{30} = N_0 \times 2,3 \times 10^8$	

Außerdem muss für die LightCycler-Analyse eine MgCl<sub>2</sub>-Testung vorgenommen werden, um die ideale MgCl<sub>2</sub>-Konzentration für die jeweiligen Primerpaare zu ermitteln. Vor jeder relativen Quantifizierung muss daher eine Optimierung der PCR durchgeführt werden. Dies erfolgt anhand von Verdünnungen (1:10, 1:100, 1:1000 oder 1:2, 1:4, 1:8) derselben Matrize mit verschiedenen MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (Standardmethode nach Roche / Mannheim), wobei die Verdünnungen als Standards definiert werden. Die Steigung (slope) der Standardkurven (lg der

Konzentration vs ct-Wert) und die Effizienz werden mittels einer Software nach folgender Formel errechnet:  $E = 10^{-1/\text{slope}}$ . Die Effizienz sollte  $2 \pm 0,05$  betragen und die Effizienzen der zu vergleichenden Produkte (spezifisches Gen / internem Standard) sollten nicht sehr davon abweichen.

Mittels der LightCycler Software konnte der ct-Wert jeder Reaktion bestimmt werden (der ct-Wert gibt den Zyklus an, bei dem alle analysierten Proben die gleiche Produktmenge aufweisen). Hierzu wurde die „Second Derivative Maximum“ Methode verwendet. Die ct-Werte der genspezifischen Reaktion wurden auf den ct-Wert der jeweils parallel durchgeführten Reaktion mit dem 18S rRNA Primer normalisiert. Hierzu wurden die ct-Werte voneinander subtrahiert. Die Berechnung und graphische Darstellung wurde mit Microsoft Excel durchgeführt.

$$E = 10^{-1/\text{slope}}$$

### 3.3.4 Phosphatase-Peroxidase Immunhistochemie (AEC Substrat-Kit)

Zur Bestätigung von TIMP-2 auf Proteinebene wurde die Biotin-Streptavidin-Amplified-Methode (BSA) angewandt (Abb. 11). Als Kontrolle wurden VEGF und MMP13 verwendet. Nach Freilegung der antigenen Determinanten der nachzuweisenden Mediatoren erfolgte zuerst die Bindung eines Primärantikörpers an den Mediator. Der Nachweis dieses Antikörpers wird mit einem weiteren, gegen den Primärantikörper gerichteten biotinylierten Antikörper durchgeführt. An das Biotin bindet sich Streptavidin, das vier hochaffine Bindungsstellen für Biotin besitzt (Dissoziationskonstante =  $10^{-15}$  M) und mit einem Enzym konjugiert ist. Durch dieses Enzym wird abschließend ein farbloses, wasserlösliches Chromogen und Substrat in einen wasserunlöslichen Farbstoff umgesetzt.

Die Schnitte wurden 5 bis 10 Minuten lang in kalter Aceton-Lösung fixiert ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet. Die Schnitte wurden dann mit einer die endogene Peroxidase hemmenden Lösung (0,3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  in Tris/NaCl pH 7,6 (6g/l Tris, 8g/l NaCl; 0,5ml einer 30%igen Wasserstoffperoxidlösung in 50ml Tris pH 7,6)) versetzt, um die unspezifischen Bindungsstellen zu blockieren. Danach wurden die Schnitte in Tris pH 7,6 gewaschen. Um weitere unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte in 2% igem Normalserum, das Fishgelatin/Glycin-Lösung enthielt (20  $\mu\text{l}$  Normalserum + 980  $\mu\text{l}$  Fishgelatin/Glycin-Lösung), für die Dauer von 30-45 Minuten bei Raumtemperatur belassen.

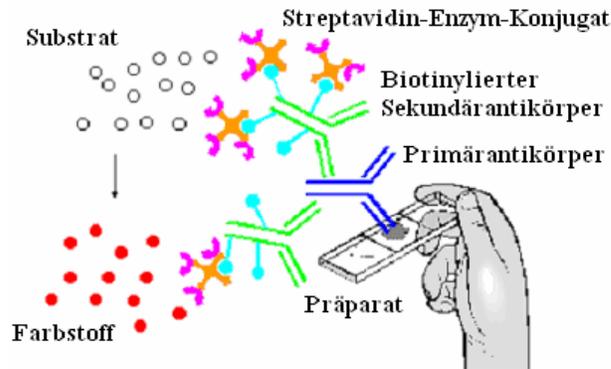


Abbildung 11

Schematische Darstellung der BSA-Methode

Zur Herstellung der Fishgelatin/Glycin-Lösung wurde 350 mg Glycin in 50ml Tris pH 7,6 gelöst, 6 ml davon verworfen und 1 ml Gelatine von „cold Water Fish Skin“ (Sigma, 250 ml) zugeben.

Das Normalserum, das verwendet wird, richtet sich nach der Spezies, in der der Sekundärantikörper produziert wird. In diesem Fall bei Verwendung eines biotinylierten goat anti mouse Antikörpers als Sekundärantikörper muss mit „normal goat serum“ (Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, Deutschland) geblockt werden. Dazu wurde je Schnitt 100 µl appliziert.

Als Primärantikörper wurden TIMP-2, VEGF und MMP-13 verwendet. Hierzu wurden 100 µl pro Schnitt appliziert. Die Inkubationszeit der Schnitte betrug:

- a) eine Stunde bei Raumtemperatur
- b) etwa 14 Stunden bei 4°C
- c) etwa 14 Stunden bei 4°C mit anschließender Silberfärbung

bei drei Konzentrationen (1:25, 1:50 und 1:100) der Serum-Fish Skin /Glycin-Lösung.

Als Negativkontrolle wurde ein primär antikörperfreier Schnitt mitgeführt.

Danach wurden die Schnitte mit Tris pH 7,6 Lösung 3-mal gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation mit 100 µl biotinyliertem sekundären Antikörper in Tris/NaCl Lösung pH 7,6 für die Dauer von 45 Minuten bei Raumtemperatur. Da der Primärantikörper ein mouse anti human Antikörper war, muss der Sekundärantikörper ein Biotin goat-anti-mouse-Antikörper sein („Biotinyliertes goat anti mouse Ig specific polyclonal antibody“, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA). Nach dreimaligem Waschen mit Tris-Lösung pH 7,6 wurden die Schnitte inklusive der Negativkontrolle mit 100 µl Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin-HRP (Jackson Immunoresearch, Dianova, Hamburg, Deutschland, verdünnt in 1:600 Tris pH 7,6) während 45 Minuten inkubiert. Die Signaldetektion erfolgte unter Verwendung des AEC

Substrat-Kits (Vector Laboratories, Burlingame, USA) nach Angaben des Herstellers. Das Substrat wurde für 30 Minuten auf die Schnitte aufgebracht, eine Farbreaktion konnte nach 1-30 Minuten nachgewiesen werden. Die Färbung wurde durch Waschen mit Tris/NaCl-Lösung pH 7,6 gestoppt und wässrig eingedeckelt.

### **3.3.5 Immunogold-Silberreaktion**

Für die Silberfärbung wurden die Schnitte abschließend für 60 Minuten mit 100 µl anti-Meerrettichperoxidase-Antikörper, an die 6nm große Goldpartikel gebunden waren (Anti-HRP goldmarkiert, Jackson Immunoresearch, Dianova, 6nm colloidal Gold-affinepure Anti-HRP [EM-Grade]) inkubiert (Verdünnung mit Tris/NaCl-Lösung 1:30, pH 7,6) nachdem das Meerrettichperoxidase-konjugiertem Streptavidin-HRP Fish Skin mit Glycin-Lösung 1:600 verdünnt wurde. Die Signalentwicklung erfolgte photochemisch in der sog. Immunogold-Silberreaktion, die in einer Modifikation des ursprünglichen Protokolls von Komminoth et al (1992) durchgeführt wurde. Hierfür wurden die Gewebeschnitte zunächst in Tris/NaCl pH 7,6 gewaschen und danach mit 3%igem Glutaraldehyd-Cacodylat (3% Glutaraldehyd-Cacodylat: 37,5% (v/v) Glutaraldehyd (8%) + 50% (v/v) Cacodylatpuffer (0,2 M Cacodylat, pH 7,35)) für 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Zur photochemischen Silberverstärkungsreaktion wurde zunächst exakt 5 Minuten mit der Entwicklungslösung Hydrochinon (Fluka, Sigma-Aldrich, Hannover, Deutschland 100g, 2,5 mg/ml in destilliertem Wasser 1:1), anschließend mit der Entwicklungslösung Hydrochinon/Silberacetat (2 mg/ml Hydrochinon und 2 mg/ml Silberacetat (Fluka, 50 mg) in destilliertem Wasser) zwischen 15 und 20 Minuten inkubiert. Die Schnitte wurden nochmals mit photographischem Fixiermedium (10% Agefix, Agfa, Leverkusen) für 2 Minuten fixiert und anschließend intensiv mit destilliertem Wasser gewaschen. Nun wurden direkt die Deckgläschen zur Beurteilung der Färbung aufgebracht.

## **3.4 Zellkulturen**

### **3.4.1 Dreidimensionale bovine Alginatchondrozytenkultur**

Ein zweifach verschieden gereinigter Harpagophytum-Extrakt wurde zusammen mit einem Weidenextrakt in einem dreidimensionalen Modell untersucht. Die tierischen und humanen Knorpelzellen wurden in gleichmäßige Alginatkügelchen suspendiert und jeder Extrakt wurde in diese Suspension pipettiert. Das erste Knorpelzellmaterial stammte vom Rind. Der Knorpel wurde aus frischen Rinderbeinen durch sterile Eröffnung des Kniegelenks entnommen und mit

Hilfe von den Enzymen Hyaluronidase, Pronase und Kollagenase verdaut. Nach Abschluss der Verdauung wurde mit Tryptanblau die Anzahl der Zellen gezählt um eine gleichmäßige Zellverteilung in den Alginatkügelchen zu erreichen. Die Extrakte wurden mit PBS verdünnt und mit DMEM-Nährlösung (10mM HEPES, 1% sol AB P/S, 1% ITS+, 50µg / ml Vit C, 2mM Prolin, 200µg / ml Glutamin) nach einer Washout Phase in DMEM vermengt, so dass folgende Konzentrationen für die 3 Extrakte vorlagen: 100µg, 33µg, 10µg, 3,3µg und 1µg. Alle 3 Tage wurde die Nährlösung getauscht und mit der alten Suspension wurde eine LDH (Lactatdehydrogenase), NO<sub>2</sub> und NO<sub>3</sub> Messung unternommen. Dies wurde im kontinuierlichen Abstand von 3 Tagen unternommen, in einer Gesamtkulturzeit von 12 Tagen.

### **3.4.2 S35 Chondrozytenzellkultur und Suspensionskultur**

Eine S35 Kultur (36 Stunden) mit Ziel der Prostaglandinkonzentrationsbestimmung wurde mit Rinderknorpelzellen durchgeführt, welche mit destilliertem Wasser aufgelöst wurden nach Ablauf des Verdauungsvorgangs und Stimulation mit und ohne LPS. Die Extraktkonzentration in diesem Versuch war: 100µg/ml, 33µg/ml und 1µg/ml. Für den Dialysevorgang wurde folgende wässrige Lösung verwendet: 72,6g Tris-HCL, 157,2g EACA (Acide diamino caproique), 44,64g EDTA, 6000mg NaN<sub>3</sub>, 10440mg Benzamidine und 12mg Trypsin soybean inhibitor. Im Anschluss an den Dialysevorgang wurde ein DNA-Test durchgeführt, indem die DNA mit PBS vermengt wurde und mit Ultraschall aufgelöst wurde. Daraufhin wurde der Versuch in einer Suspension über den Zeitraum von 3 Tagen mit S35 wiederholt. In einer weiteren Suspensionslösungsreihe über den Zeitraum von 3 Tagen mit und ohne LPS stimulierter boviner Zellen wurde der PGE<sub>2</sub> Gehalt im Vergleich zu der vorhandenen DNA gemessen (Konzentration der Extrakte 100, 33, 1).

In einer Suspensionslösungsreihe über den Zeitraum von 3 Tagen wurden humane Knorpelzellen mit IL 1 beta im Vergleich zu einer Kontrollgruppe stimuliert. Aus dieser Versuchsreihe wurden die PGE<sub>2</sub>, NO<sub>2</sub> und NO<sub>3</sub> Konzentration gemessen.

### **3.5 Statistische Auswertung**

Die statistische Berechnung wurde in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Thomas Torda, University of New South Wales, Sydney, Australien durchgeführt. Zur statistischen Auswertung wurde die Software „Social Sciences package (SPSS Inc. Chicago, ILL)“ genutzt. Alle Variablen wurden hinsichtlich ihrer Normalverteilung unter Verwendung des Kolmogorov-Smirnof Tests geprüft. Bei Normalverteilung der kontinuierlichen Daten wurde der T-test für gepaarte bzw. ungepaarte

Variablen genutzt, bei nicht normaler Verteilung der Wilcoxon Rank Sum Test für gepaarte Daten und der Mann-Whitney-Test für ungepaarte Daten. Als signifikant wurde  $p < 0,05$  definiert.

<b>MW</b>	Mittelwert
<b>SD</b>	Standardabweichung
<b>SEM</b>	Streuung der Differenz
<b>CI</b>	Konfidenzintervall
<b>N</b>	Anzahl der Tiere
<b>df</b>	Freiheitsgrad
<b>Sig</b>	Signifikanz
<b>t-Wert</b>	Transformation des Stichprobenkennwertes

$$t = \frac{(m_t - m_n)}{\text{SEM} * (m_t - m_n)}$$

$m_t$	Mittelwert der Stichprobe t
$m_n$	Mittelwert der Stichprobe n
M	Populations-Mittelwert
SEM *	geschätzter Standardfehler

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Beurteilung der Färbungen

#### 4.1.1 HE-Färbung

Das Konsensergebnis der lichtmikroskopischen Untersuchung der drei Untersucher ist in Tabelle 14 zusammengefasst. Es fand sich kein Unterschied zwischen den linken Hüftknorpeln der Kontroll- und der *Harpagophytum*gruppe. Auf der rechten, operierten Seite war die Kernzahlvermehrung bei etwa 40% der mit *Harpagophytum*-Extrakt behandelten Kaninchen vermindert (Abb. 12-15).

Tabelle 14

Zusammenfassung der lichtmikroskopischen Beurteilung der HE-Schnitte (Übereinstimmung zwischen 2 Interobservern)

	<b>HE-Färbung</b>	
<b>Kontrolle</b>	<b>Kerne</b>	<b>Zytoplasma</b>
N=9 <b>Links</b>	Kernzahl normal, Kernmorphologie unauffällig Chromatingehalt normal Kerngrösse normal	Normal breit Erhaltene Kern-Plasma Relation Regelrechte Anfärbbarkeit
N=9 <b>Rechts</b>	ca. 50% Kernvermehrung Unauffällige Kernmorphologie	Gering verschmälertes Zytoplasmasaum bei Kernvermehrung Regelrechte Anfärbbarkeit
<b>Harpagophytum</b> N=11 <b>Links</b>	Kernzahl normal, Kernmorphologie unauffällig Chromatingehalt normal Kerngrösse normal	Normal breit Erhaltene Kern-Plasma Relation Regelrechte Anfärbbarkeit
N=11 <b>rechts</b>	1/3 der Tiere Normalbefund Bei 60% Kernvermehrung um ca 50% Unauffällige Kernmorphologie	Gering verschmälertes Zytoplasmasaum bei Kernvermehrung Regelrechte Anfärbbarkeit
<b>Kontrolle Normaltier</b>	offenbar Fixations- und Färbeartefakte	normal
<b>Linker Ventikel</b>	nur bedingt beurteilbar, keine Nekrosen erkennbar	

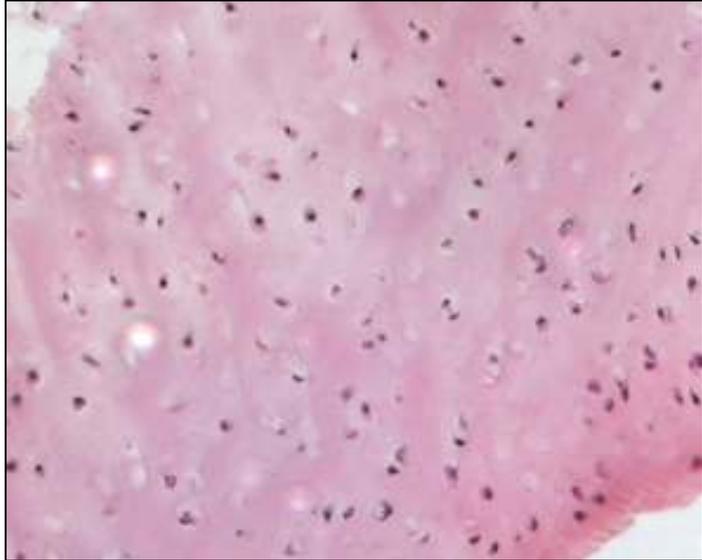


Abbildung 12

HE-Färbung des linken (nicht-operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der *Harpagophytum*-Gruppe: Kernzahl, Kerngrösse und Chromatingehalt normal, Kernmorphologie unauffällig, normal breites Zytoplasma und erhaltene Kern-Plasma Relation bei regelrechter Anfärbbarkeit

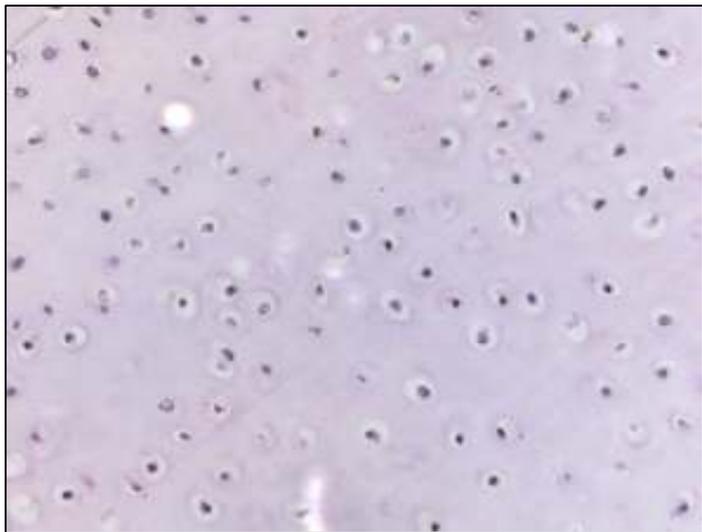


Abbildung 13

HE-Färbung des rechten (operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der *Harpagophytum*-Gruppe: 1/3 der Tiere Normalbefund, unauffällige Kernmorphologie, bei 60% Kernvermehrung um ca 50%, gering verschmälertes Zytoplasmasaum (wegen Kernvermehrung) bei regelrechter Anfärbbarkeit

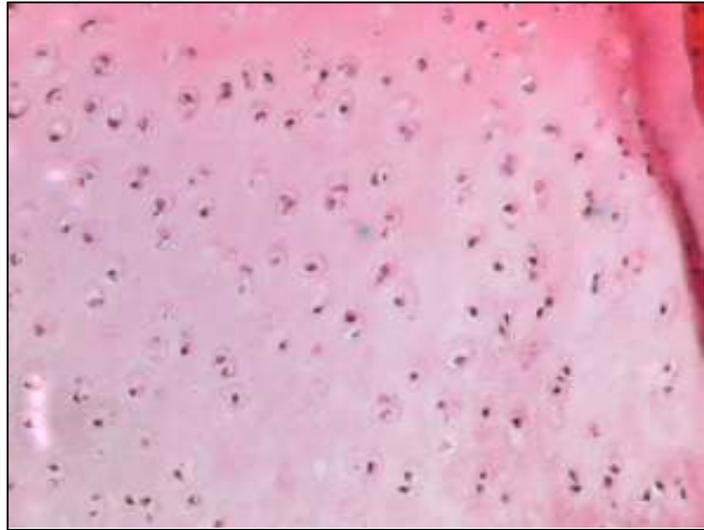


Abbildung 14

HE-Färbung des linken (nicht-operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der Kontrollgruppe: Kernzahl, Kerngrösse und Chromatingehalt normal, Kernmorphologie unauffällig, normal breites Zytoplasma und erhaltene Kern-Plasma Relation bei regelrechter Anfärbbarkeit



Abbildung 15

HE-Färbung des rechten (operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der Kontrollgruppe: Kernzahl z.T. ca. 50% vermehrt, unauffällige Kernmorphologie und gering verschmälerter Zytoplasmasaum (wegen Kernvermehrung) bei regelrechter Anfärbbarkeit

Aufgrund der Normalverteilung wurde zur statistischen Auswertung der T-Test angewandt. Bei der statistischen Auswertung fand sich hinsichtlich Kernzahl und Farbintensität des Zytoplasmas zwischen dem Hüftknorpel der operierten und nicht operierten Seiten und zwischen den Kontrolltieren und den mit *Harpagophytum* behandelten Tieren kein signifikanter Unterschied.

#### 4.1.2 Elastika-Färbung

Die lichtmikroskopische Untersuchung der Präparate zeigte bei allen Kontrolltieren einen Normalbefund, während bei den mit *Harpagophytum* behandelten Kaninchen das Ergebnis heterogen war, bei 6 Tieren fand sich eine deutlich vermehrte Farbintensität (Abb. 16-19).

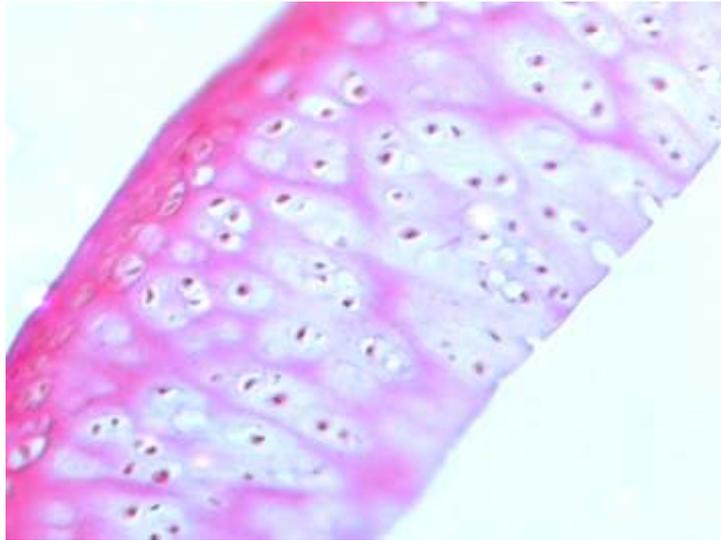


Abbildung 16

Elastika-van-Gieson-Färbung des linken (nicht-operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der *Harpagophytum*-Gruppe

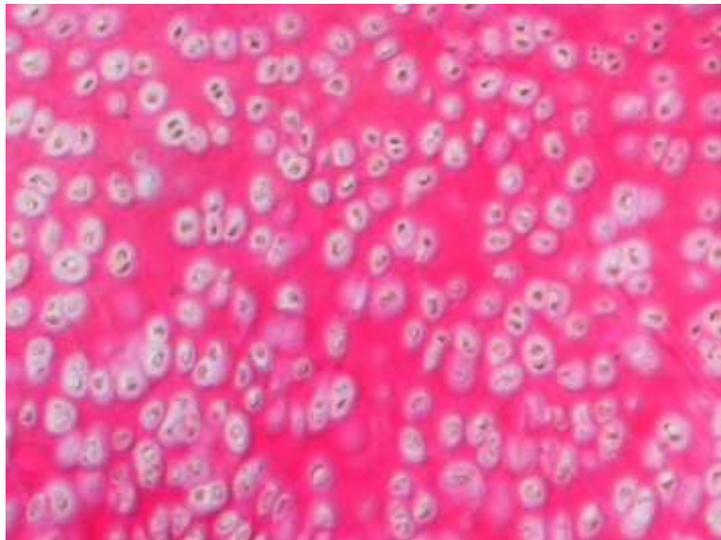


Abbildung 17

Elastika-van-Gieson-Färbung des rechten (operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der *Harpagophytum*-Gruppe: deutlich vermehrte Farbintensität

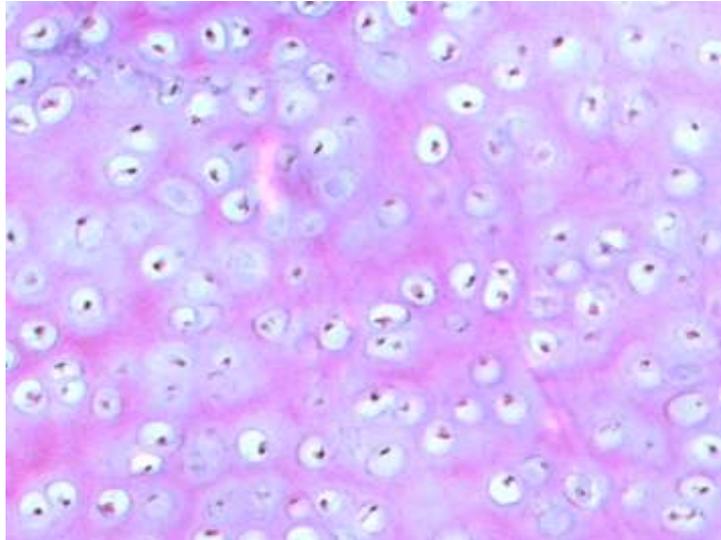


Abbildung 18

Elastika-van-Gieson-Färbung des linken (nicht operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der Kontrollgruppe

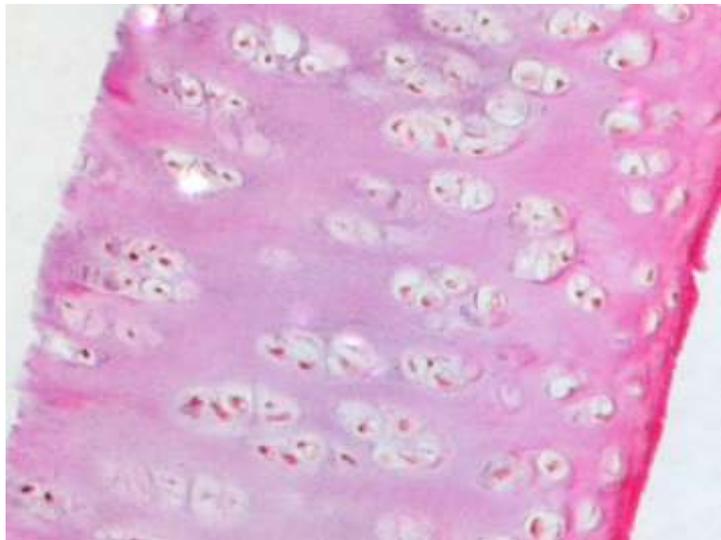


Abbildung 19

Elastika-van-Gieson-Färbung des rechten (operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der Kontrollgruppe

Die statistische Berechnung bestätigte, dass sich bei den Kontrolltieren die Färbintensität zwischen dem rechten und linken Hüftknorpel nicht unterschied. Bei den mit *Harpagophytum* behandelten Kaninchen bestand eine signifikant stärkere Farbintensität auf der rechten, operierten Seite im Vergleich zur nicht-operierten Seite. Der Unterschied war auch im Vergleich zur nicht operierten Seite der Kontrolltiere signifikant (Tabellen 20, 21).

Tabelle 20

In der *Harpagophytum*-Gruppe fand sich eine signifikant stärkere Farbintensität. Gepaarter T-Test: Hüftknorpel links (L) gegen rechts (R) der Kontroll (K)- und *Harpagophytum* (H)-Gruppe

		Gepaarte Unterschiede					t	df	Sig. (2-seitig)
		MW	SD	SEM	95% CI der Differenz				
gepoolt					unterer	oberer			
Paar 1	K_L - K_R	-.36364	1.62928	.49125	-1.45820	.73093	-.740	10	.476
Paar 2	H_L - H_R	-2.63636	1.96330	.59196	-3.95533	-1.31740	-4.454	10	.001

Tabelle 21

In der *Harpagophytum*-Gruppe fand sich eine signifikant stärkere Farbintensität. Ungepaarter T-Test: Hüftknorpel links (L): Kontroll (K)- versus *Harpagophytum* (H)-Gruppe

		T-Test auf Gleichheit der MW						
		T	df	Sig.(2-seitig)	MD	SEM	95% CI der Differenz	
Gleiche Varianz							unterer	oberer
gepoolte Daten	Angenommen	2.743	20	.013	1.90909	.69591	.45744	3.36074
	Nicht angenommen	2.743	20.000	.013	1.90909	.69591	.45744	3.36074

#### 4.1.3 Safranin-O Färbung

Das Ergebnis der lichtmikroskopischen Untersuchung ist in Tabelle 22 zusammengefasst. Bei dieser Färbung fand sich lichtmikroskopisch ein Trend zur Kernzahlverminderung auf der operierten Seite bei den mit *Harpagophytum* behandelten Kaninchen. Bei den Kontrolltieren war die Kernzahl um ca. 50% vermehrt, jedoch bei 3 der mit *Harpagophytum* behandelten Kaninchen nur um ca. 30%. Die Hüftknorpel der Kontrolltiere waren unauffällig (Abb. 20-23). Statistisch fand sich keine signifikant stärkere Farbintensität im Hüftknorpel der operierten rechten Seite im Vergleich zur linken nicht operierten Seite und im Vergleich zu den Kontrolltieren.

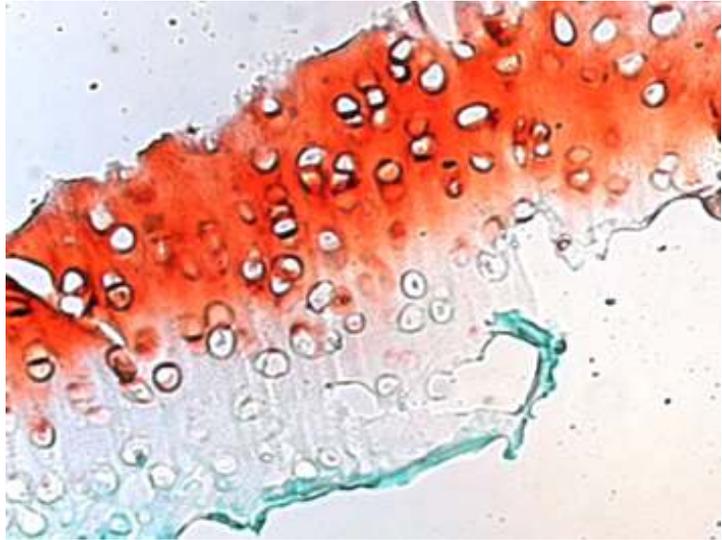


Abbildung 20

Safranin-Färbung des linken (nicht-operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der *Harpagophytum*-Gruppe: Kernzahl, Kerngrösse und Chromatingehalt normal, Kernmorphologie unauffällig, normal breites Zytoplasma und erhaltene Kern-Plasma Relation bei regelrechter Anfärbbarkeit

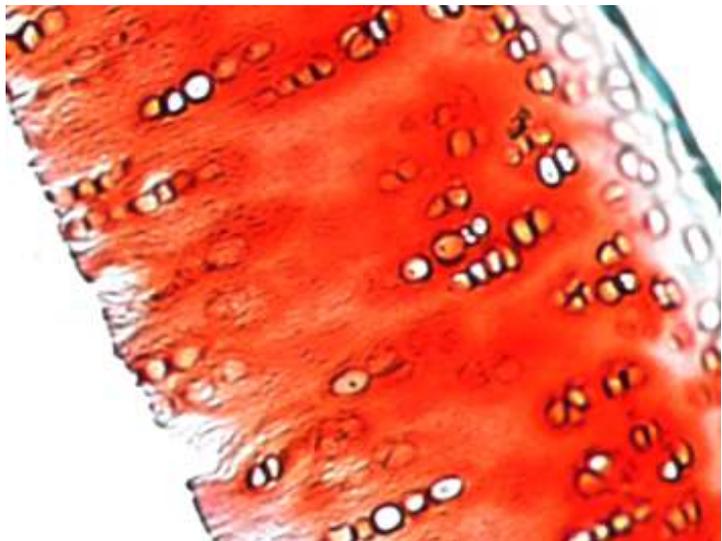


Abbildung 21

Safranin-Färbung des rechten (operierten) Hüftgelenkknorpel bei einem Tier aus der *Harpagophytum*-Gruppe: bei 3 von 9 Tieren Kernvermehrung bis zu 30%, die zytoplasmatische Anfärbung ist gering abgeschwächt

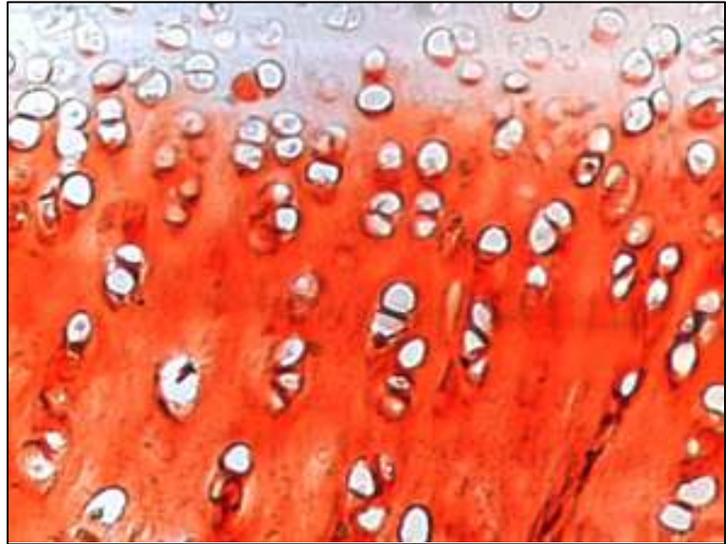


Abbildung 22

Safranin-Färbung des linken (nicht-operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der Kontrollgruppe: Kernzahl, Kerngrösse und Chromatingehalt normal, Kernmorphologie unauffällig, normal breites Zytoplasma und erhaltene Kern-Plasma Relation bei regelrechter Anfärbbarkeit

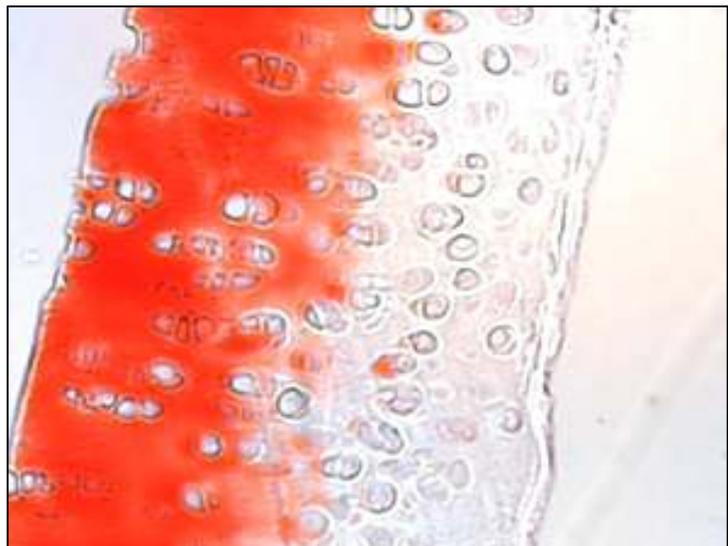


Abbildung 23

Safranin-Färbung des rechten (operierten) Hüftgelenkknorpels bei einem Tier aus der Kontrollgruppe: Kernzahl ca. 50% vermehrt bei unauffälliger Kernmorphologie, mittelgradig schwächere Anfärbbarkeit gegenüber Normaltier

Tabelle 22

Zusammenfassung der lichtmikroskopischen Beurteilung der Safranin-Schnitte (Übereinstimmung zwischen 2 Interobservern)

<b>Kontrolle</b>	<b>Kerne</b>	<b>Zytoplasma</b>
N=9 <b>Links</b>	Kernzahl normal, Kernmorphologie unauffällig Chromatingehalt normal Kerngrösse normal	Normal breit Erhaltene Kern-Plasma Relation Regelrechte Anfärbbarkeit
N=9 <b>Rechts</b>	Kernzahl ca. 50% vermehrt Unauffällige Kernmorphologie	Regelrechte Anfärbbarkeit
<b>Harpagophytum</b> N=11 <b>Links</b>	Kernzahl normal, Kernmorphologie unauffällig Chromatingehalt normal Kerngrösse normal	Normal breit Erhaltene Kern-Plasma Relation Regelrechte Anfärbbarkeit
N=11 <b>rechts</b>	Bei 6/9 Tieren Normalbefund Bei 3/9 Tieren Kernzahl ca. 30% vermehrt	Regelrechte Anfärbbarkeit

## 4.2 Zytokinnachweis

### 4.2.1 Wahl des Houskeeping-Moleküls

Das Gen „18S human“-rRNA konnte in der Kaninchen-RNA (Temperatur 57°) nicht nachgewiesen werden. Für den daraufhin erstellten GAP-DH Primer:

GAP DH forward – ATCACTGCCACCCAGAAGAC und

GAP DH reverse – GTGAGTTTCCCGTTCAGGTC

wurden ebenfalls in Thermocyclerläufen bei der Bande 450 nur unspezifische Primerwolken nachgewiesen (Abb. 24, 25). Unterschiedliche cDNA Konzentrationen (2 µl und 1µl cDNA) beeinflussten das GAP DH Signal nicht (Abb. 26). Bei einer Annealingtemperatur von 60°C deutete die Menge an Primer Dimer auf eine Konkurrenzreaktion mit dem spezifischen Produkt hin, weshalb GAP DH als house keeping molecule verworfen werden musste (Abb. 27).

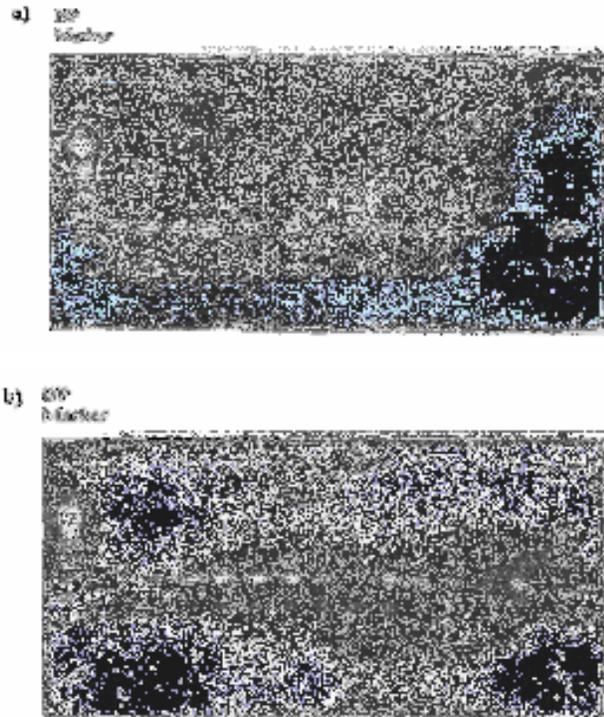


Abbildung 24a und b

PCR zum Nachweis von GAP DH bei einer Annealingtemperatur von 57°C (25 Zyklen):

a) *Harpagophytum*-Gruppe, b) Kontroll-Gruppe

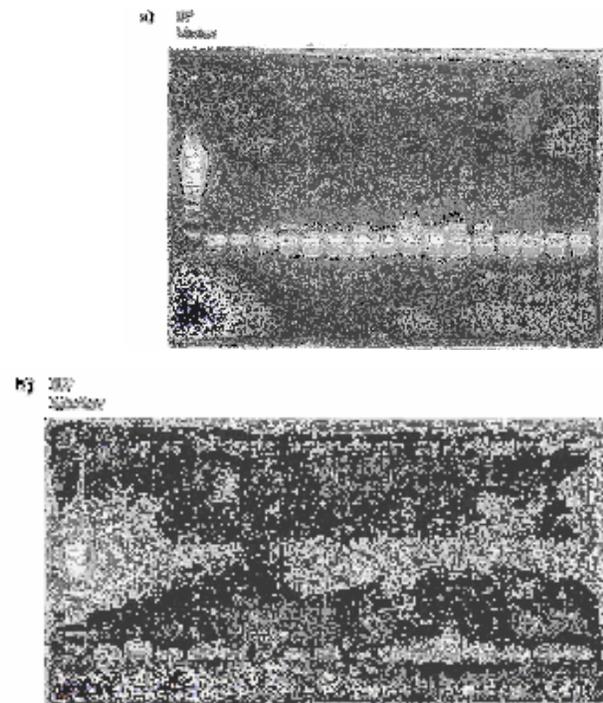


Abbildung 25a und b

PCR nach erneuter RT-PCR zum Nachweis von GAP DH bei einer Annealingtemperatur von

57°C (25 Zyklen): a) *Harpagophytum*-Gruppe, b) Kontroll-Gruppe

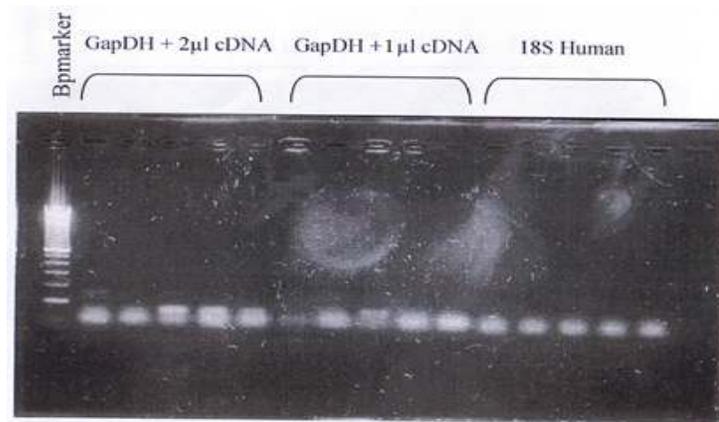


Abbildung 26

PCR zum Nachweis von GAP DH mit unterschiedlichen cDNA-Konzentrationen und PCR zum Nachweis von „18S human“ bei einer Annealingtemperatur von 57°C (25 Zyklen)

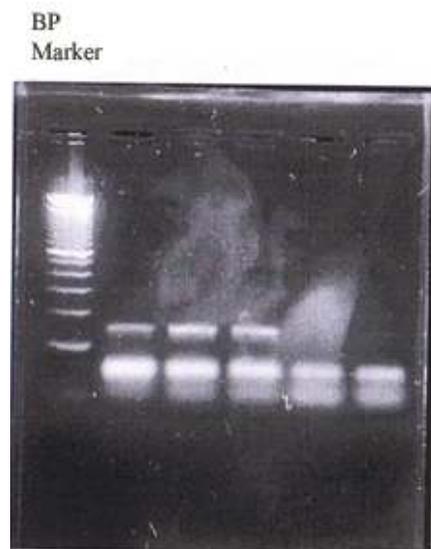


Abbildung 27

PCR zum Nachweis von GAP DH bei einer Annealingtemperatur von 60°C (35 Zyklen)

Jedoch konnte für das erstellte Primerpaar:

18srabbitfor-CGCGGTTCTATTTTGTGGT und

18srabrev-GGTCGGGTCATGGGAATAAC

im Thermocyclerlauf bei 55° C und 57° C eine deutliche Bande und nur geringe Primerwolken (Primer-Dimer) nachgewiesen werden (Abb. 28).

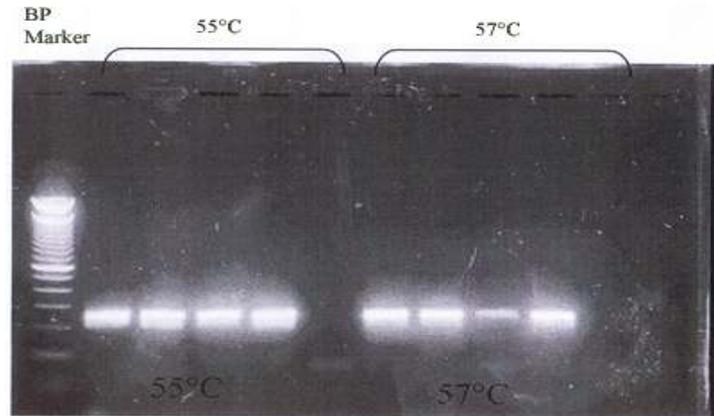


Abbildung 28

PCR zum Nachweis von 18S rabbit bei einer Annealingtemperatur von 55°C und 57°C (35 Zyklen)

Um die Effizienz und die ideale  $MgCl_2$ -Konzentration des Primers zu bestimmen, wurde eine Optimierung der PCR vorgenommen. Eine Magnesiumchloridkonzentration von 3 mM erwies sich als optimal. Bei Annealingtemperaturen von 57°, 59°C und 61°C konnte eine Effizienz zwischen 1,95 und 2,05 erreicht werden (Abb. 40). Somit konnte 18S rabbit als house keeping Molekül in den weiteren Versuchen eingesetzt werden.

#### 4.2.2 Design von „Mediator-Primern“

##### 4.2.2.1 TIMP-2

Die gewählte TIMP-2-Sequenz (TIMP2forward-ACGGCAACCCCATCAAGAGGA und TIMP2reverse – GGAGTCCCAGGGCACGATGAA) wurde einer PCR bei den Annealingtemperaturen von 59°C und 61°C unterzogen. Der Primer zeigte im Thermocycler eine deutliche Bande bei 220 bp (Abb. 29).

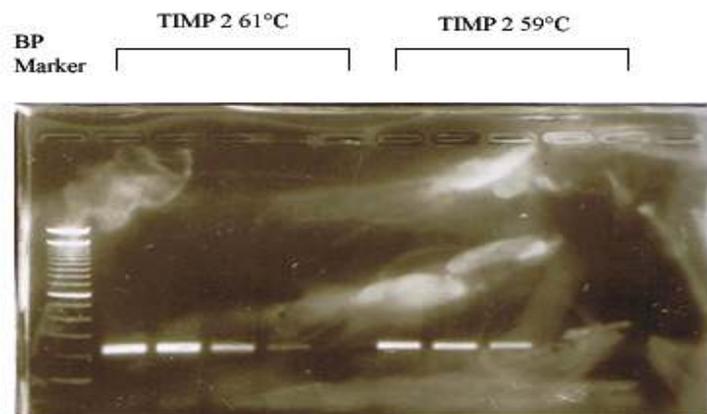


Abbildung 29

PCR zum Nachweis von TIMP-2 (Annealingtemperaturen 61°C und 59°C)

Im Lightcyclerlauf wurden die optimale Magnesiumchloridkonzentration und Annealingtemperatur für 18S und TIMP-2 ermittelt. Sie betragen für 18S: 3 mM Magnesiumchlorid bei einer Annealingtemperatur von 59°C (Effizienz 1,94) und für TIMP-2 3,5mM Magnesiumchlorid bei einer Annealingtemperatur von 60°C (Effizienz 2,094) (Abb. 30).

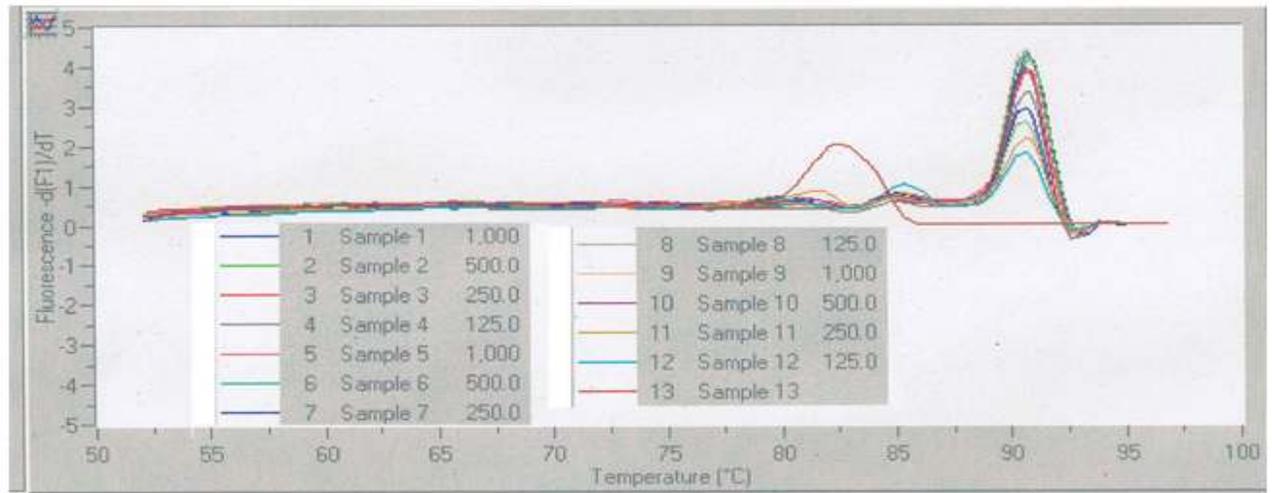


Abbildung 30

Ermittlung der optimalen Magnesiumchloridkonzentration zur Quantifizierung von TIMP-2 im Lightcycler: 3,5 mM MgCl<sub>2</sub> bei einer Annealingtemperatur von 60°C erwiesen sich als optimal

Die aus den Kaninchenknorpeln gewonnene DNA wurden in der Folge mit 18S und dem erstellten TIMP-2 mit 3,5 mM Magnesiumchlorid bei einer Annealingtemperatur von 60°C verglichen (Abb. 31-33).

Die Ergebnisse der Quantifizierung von TIMP-2 sind in den Abbildungen 36-38 dargestellt. Die Werte der mit *Harpagophytum* behandelten Tiere waren statistisch nicht normal verteilt, weshalb nicht-parametrische Tests durchgeführt werden mussten. Es fand sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Knorpeln der Extremitäten in den Gruppen bzw. zwischen den Gruppen. Jedoch wurde im Vergleich zum höchsten TIMP-2-Gehalt in der Kontrollgruppe eine 2- bzw. 5-fache Erhöhung von TIMP-2 im Knorpel der operierten Seite bei zwei mit *Harpagophytum* behandelten Kaninchen gefunden.

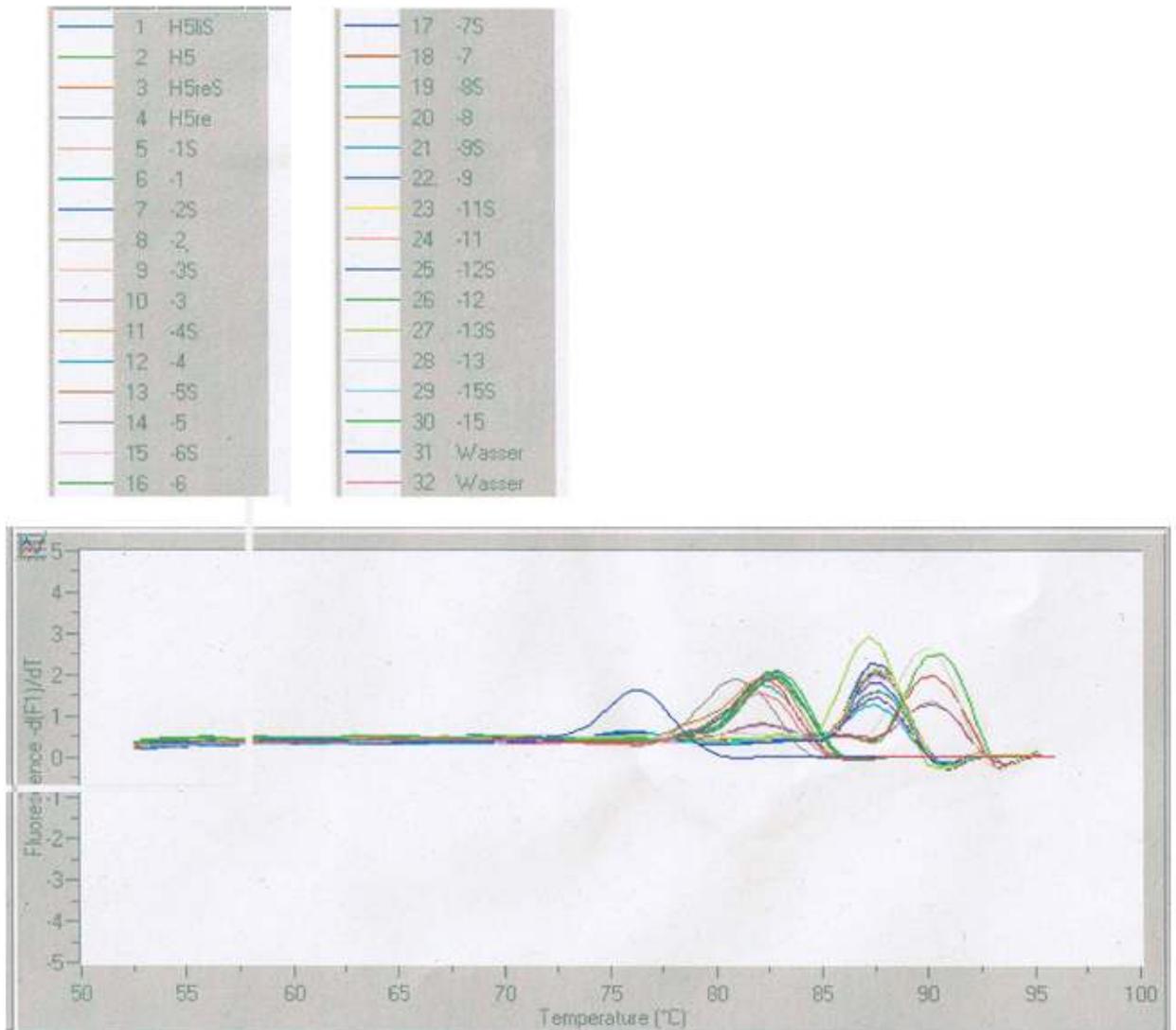


Abbildung 31

Gleichzeitige Quantifizierung von TIMP-2 und 18S im Lightcycler (3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, Annealingtemperatur 60°C) in den Proben der mit *Harpagophytum* (-) behandelten Tiere. Die mit S gekennzeichneten Tiere bezeichnen die auf 18S untersuchten Proben. Die ungeraden Zahlen bezeichnen den Knorpel der nicht-operierten Seite und die geraden Zahlen den Knorpel der operierten Seite. Die unterschiedlichen Farben korrespondieren zum Zytokingehalt der linken und rechten Hüftknorpel der Tiere. Zur Kontrolle je eine Wasserprobe (31 für 18S und 32 für TIMP-2)

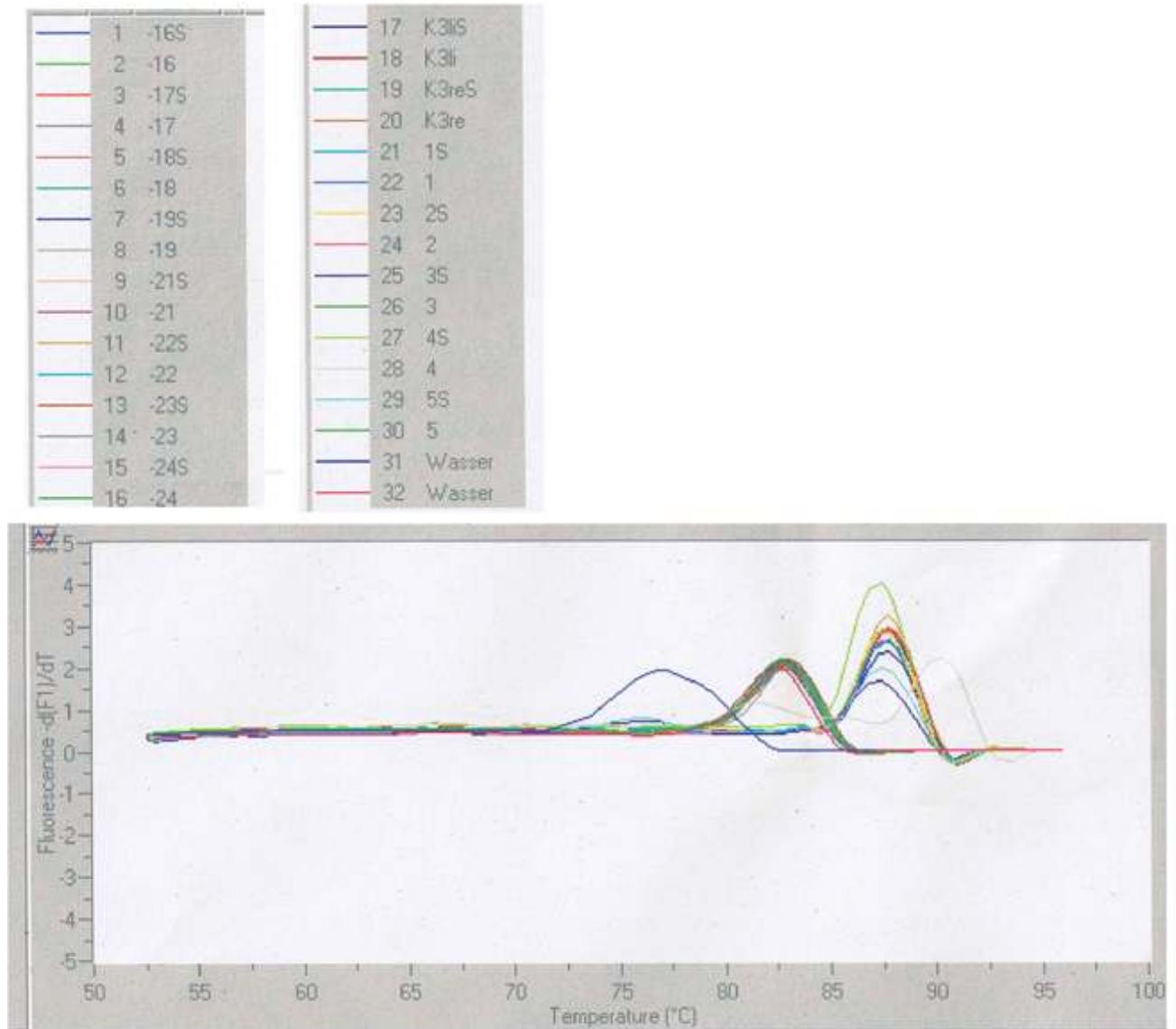


Abbildung 32

Gleichzeitige Quantifizierung von TIMP-2 und 18S im Lightcycler (3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, Annealingtemperatur 60°C) in den Proben der mit *Harpagophytum* (-) behandelten Tiere und bei einigen Tieren der Kontroll-Gruppe (ohne minus gekennzeichnet). Die mit S gekennzeichneten Tiere bezeichnen die auf 18S untersuchten Proben. Die ungeraden Zahlen bezeichnen den Knorpel der nicht-operierten Seite und die geraden Zahlen den Knorpel der operierten Seite. Die unterschiedlichen Farben korrespondieren zum Zytokingehalt der linken und rechten Hüftknorpel der Tiere. Zur Kontrolle je eine Wasserprobe (31 für 18S und 32 für TIMP-2)

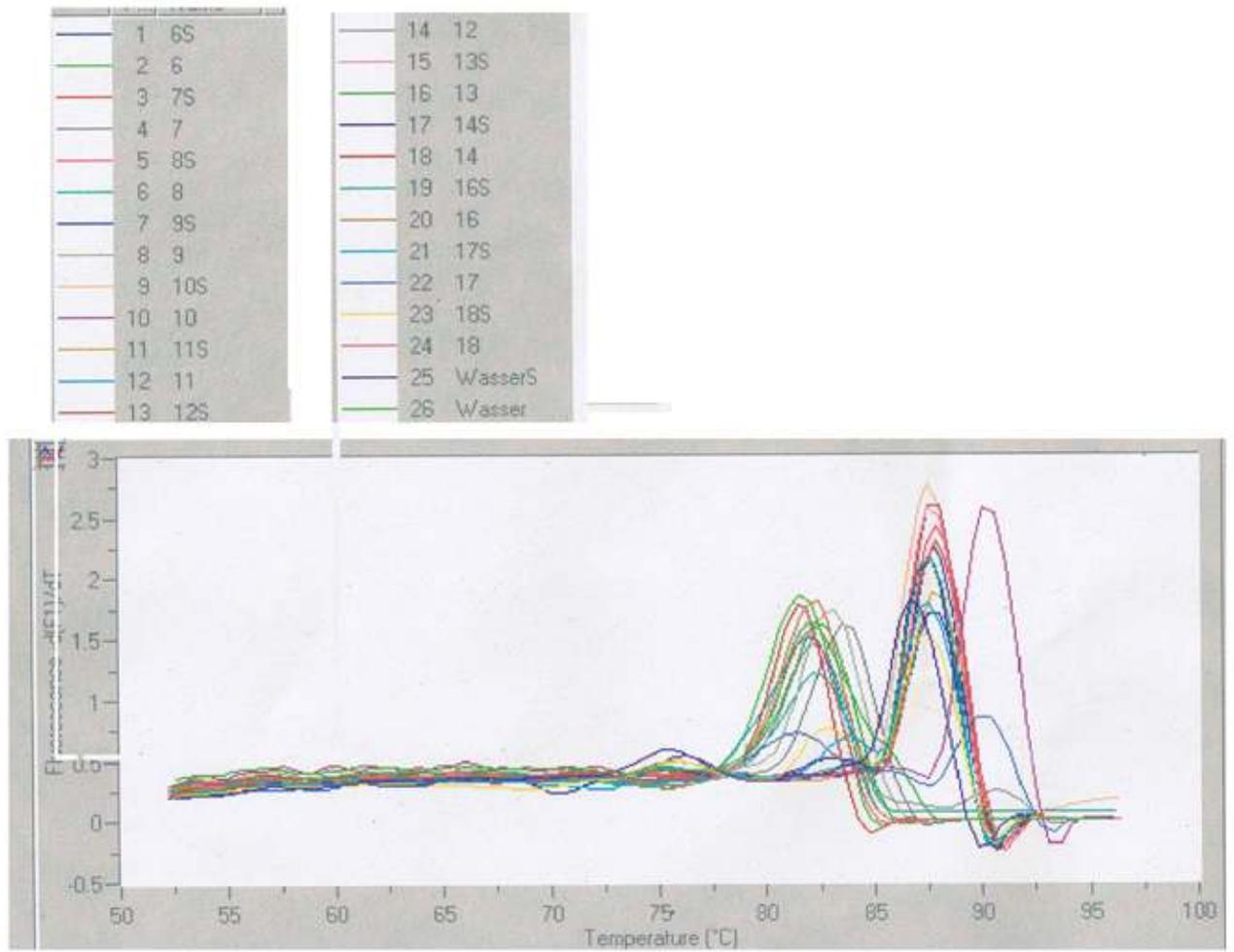


Abbildung 33

Gleichzeitige Quantifizierung von TIMP-2 und 18S im Lightcycler (3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, Annealingtemperatur 60°C) in den Proben der restlichen Tiere der Kontroll-Gruppe (ohne minus gekennzeichnet). Die mit *S* gekennzeichneten Tiere bezeichnen die auf 18S untersuchten Proben. Die ungeraden Zahlen bezeichnen den Knorpel der nicht-operierten Seite und die geraden Zahlen den Knorpel der operierten Seite. Die unterschiedlichen Farben korrespondieren zum Zytokingehalt der linken und rechten Hüftknorpel der Tiere. Zur Kontrolle je eine Wasserprobe (25 für -18S und 26 für -TIMP-2)

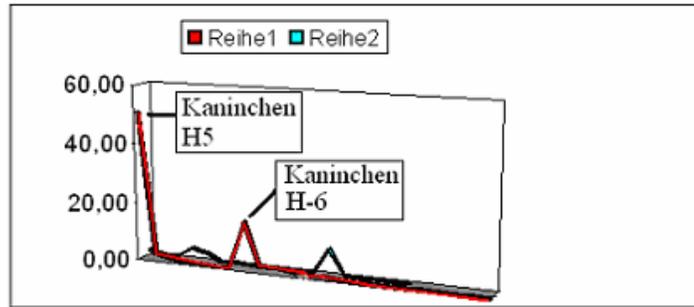


Abbildung 34

Vergleich des TIMP-2-Gehaltes zwischen den Proben der mit *Harpagophytum* behandelten Tiere (Reihe 1) und der Kontroll-Gruppe (Reihe 2)

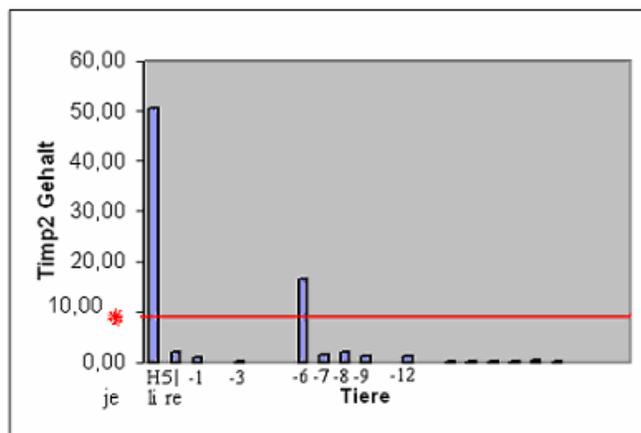


Abbildung 35

TIMP-2-Gehalt in den Proben aus Hüftknorpel der operierten und nicht-operierten Extremität der mit *Harpagophytum* behandelten Tiere (je links/rechts pro Tier)

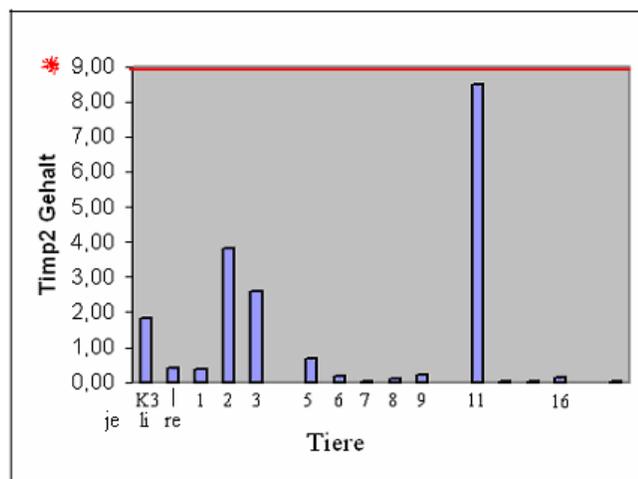


Abbildung 36

TIMP-2-Gehalt in den Proben aus Hüftknorpel der operierten und nicht-operierten Extremität der Kontroll-Gruppe (je links/rechts pro Tier)

#### 4.2.2.1.1 Phosphatase-Peroxidase Immunhistochemie und Immunogold-Silberreaktion

Mit diesem hochsensiblen Verfahren gelang es, TIMP-2 in einer Verdünnung von 1:25 in der hochspezifischen Immunogold-Silberreaktion nachzuweisen (Abb. 37). Das zur Kontrolle eingesetzte MMP-13 und VEGF konnten nicht nachgewiesen werden (Abb. 38, 39).



Abbildung 37

Nachweis von TIMP-2 im Hüftknorpel mittels der Silberfärbung



Abbildung 38

Kein Nachweis von MMP-13 zur Kontrolle im Hüftknorpel mittels der Silberfärbung



Abbildung 39

Kein Nachweis von VEGF im Hüftknorpel mittels der Silberfärbung

#### 4.2.2.2 Matrixumbauende Moleküle und Matrixbestandteile

Weder IL-1 $\beta$  rabbit (Temperatur 55°C bzw. 52°C) noch TNF $\alpha$  rabbit (Temperatur 57° bzw. 54°), noch IL-6 rabbit (Temperatur 57°C bzw. 52°C) konnten mittels der Thermocycler-PCR nachgewiesen werden. Auch bei IL-8 (Temperatur 57°C, 55°C bzw. 52°C) fanden sich ausschließlich unspezifische Primerwolken auf dem Agarosegel (Abb. 40-44).

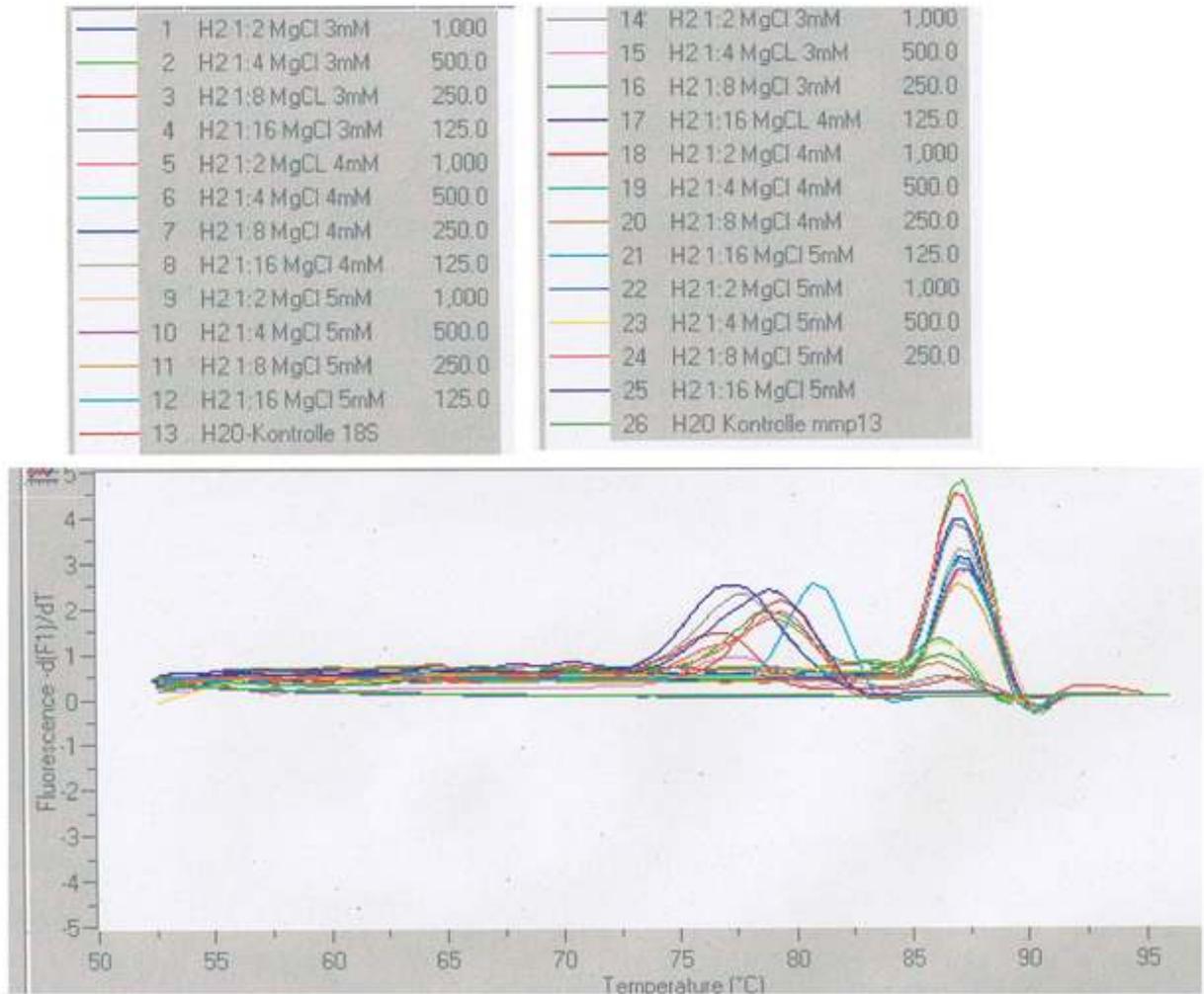


Abbildung 40

Quantifizierung mittels Lightcycler zum Nachweis von „rabbit 18S“ und MMP13 bei einer Annealingtemperatur von 57°C (45 Zyklen). Zur Prüfung verschiedene Magnesiumchloridkonzentrationen (1- 12 Reihe 18S, 13 – Wasserkontrolle 18S und 14-25 Reihe MMP13, 26 Wasserkontrolle MMP-13)

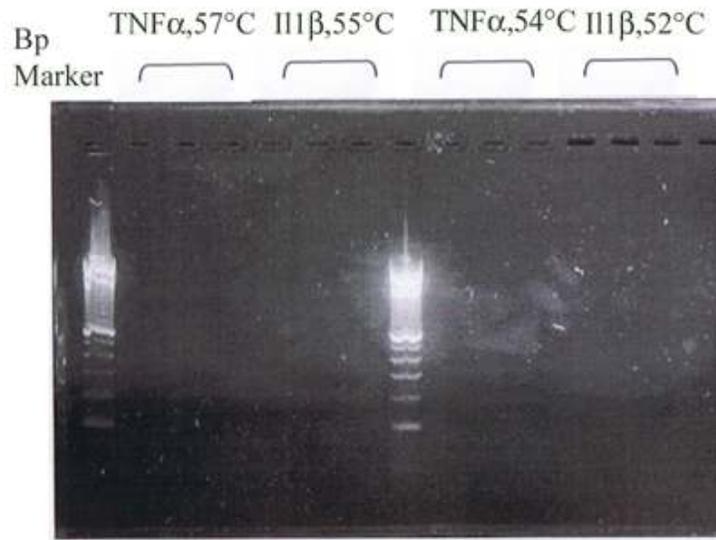


Abbildung 41

PCR zum Nachweis von TNF $\alpha$  rabbit und IL-1 $\beta$  rabbit bei verschiedenen Annealingtemperaturen (35 Zyklen)

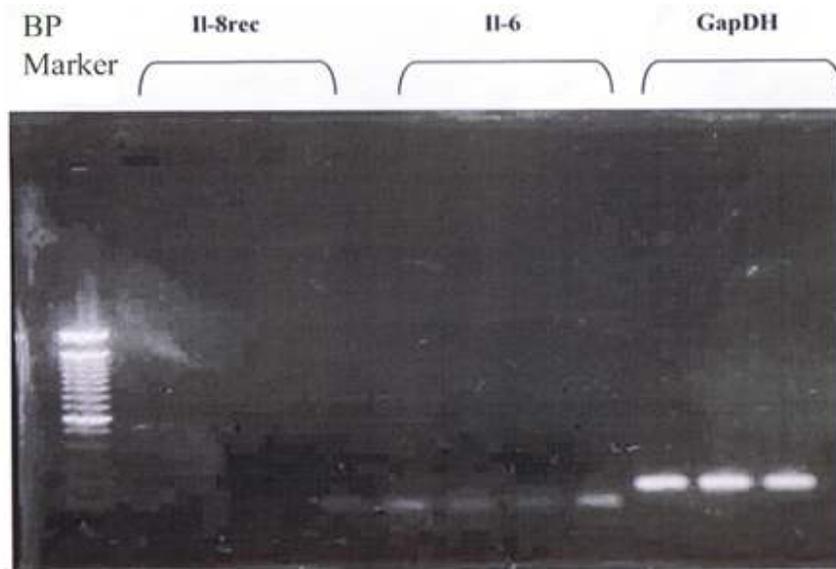


Abbildung 42

PCR zum Nachweis von IL-8 rabbit, IL-6 rabbit, Gap DH rabbit bei einer Annealingtemperatur von 57°C (35 Zyklen). IL-6 wurde schwach nachgewiesen und IL-8 konnte nicht nachgewiesen werden



Abbildung 43

PCR zum Nachweis von IL-6 rabbit, IL-8-Rec rabbit, GAP DH bei einer Annealingtemperatur von 52°C (35Zyklen)



Abbildung 44

PCR zum Nachweis von IL-8 Rec bei einer Annealingtemperatur von 55°C (25 Zyklen)

Ungeeignet war der MMP13 Primer folgender Sequenz:

mmp13for\* - CCCTTGATGCCATTACCAGT und

mmp13rev\* - GGCCAAAAGGACTTCGTAA

der zwar bei der Thermocycler PCR nachgewiesen werden konnte, sich aber im Lightcycler nicht optimieren ließ: Im Thermocycler-Lauf bei den Annealingtemperaturen von 51°C, 53°C, 55°C und 57°C war die bei der Bande 214 zu erwartende Basenpaargröße zwar detektierbar, jedoch fand sich als Störfaktor zu viel „Primerdimer“. Auch im folgenden Optimierungslauf im Lightcycler bei den Annealingtemperaturen von 57°C (45 Zyklen) und 59°C (50 Zyklen) war der Gehalt an „Primerdimeren“ zu hoch (Effizienzen zwischen -2,814 und -2,351 bei drei verschiedenen Mgchlorid-Konzentrationen). Daraufhin wurde ein neuer MMP-13 Primer designed und im Thermocycler bei den Annealingtemperaturen von 54°C, 56°C, 50°C, 52°C, 46°C und 48°C geprüft, es konnte jedoch keine Bande nachgewiesen werden (Abb. 45-47).

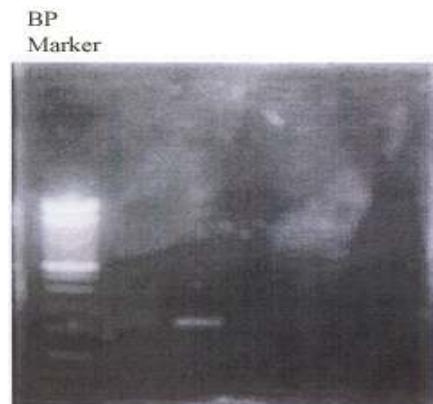


Abbildung 45

PCR zum Nachweis von MMP13 bei einer Annealingtemperatur von 53°C (35Zyklen)

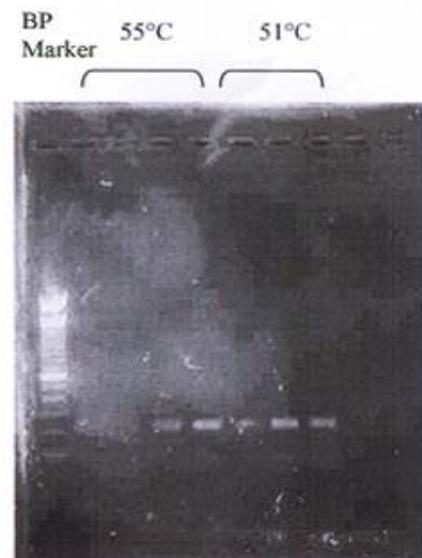


Abbildung 46

PCR zum Nachweis von MMP13 bei Annealingtemperaturen von 55°C und 51°C

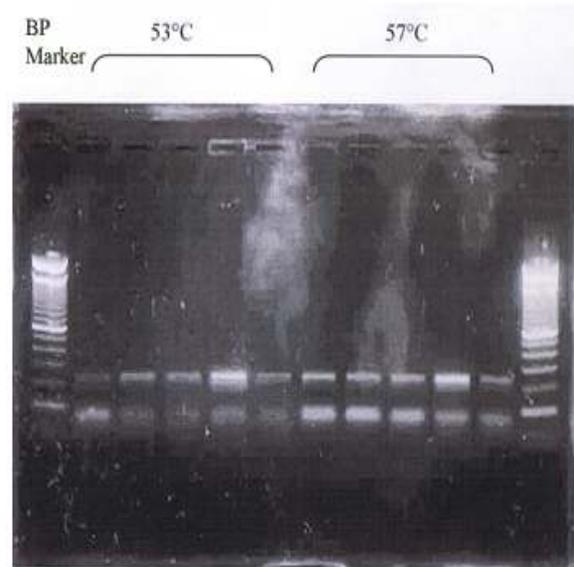


Abbildung 47

PCR zum Nachweis von MMP13 bei Annealingtemperaturen von 53°C und 57°C

Biglykan (biglykanforward – GCGCATCTCAGAAGCCAAGC und biglykanreverse-CGTTGTAG TAGGCCCGCTTC), Aggrecan 2 (aggrecanforward –GCCTGTGGTGTG CGGTGGTG und aggrecanrev – GGACCCAGGACCCCAAGTT) und Osteonectin (osteonectinforward- ACCC CCATGTGCGTGTGCCA und osteonectinreverse – ACGCA GTGGGGCCAGCTCAG) wurden designed und über das BLAST Programm überprüft.

Biglykan wurde bei Annealingtemperaturen von 62°C und 60°C mit dem Thermocycler geprüft. Bei den Proben der mit *Harpagophytum* behandelten Tiere fanden sich Banden bei 342 bp, zugleich jedoch auch unspezifische Banden. Für die Optimierung musste die Annealingtemperatur jedoch so hoch gewählt werden, dass kaum Produkt nachgewiesen werden konnte und somit eine Amplifizierung für Biglykan nicht möglich war (Abb. 48, 49).

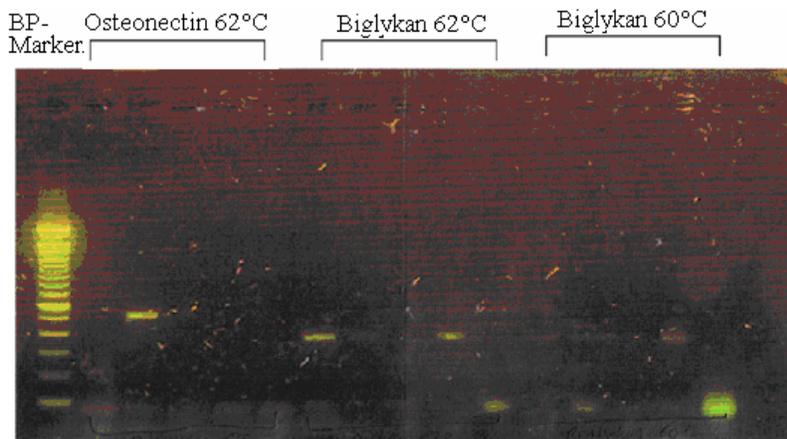


Abbildung 48

PCR zum Nachweis von Osteonectin und Biglykan (35 Zyklen)

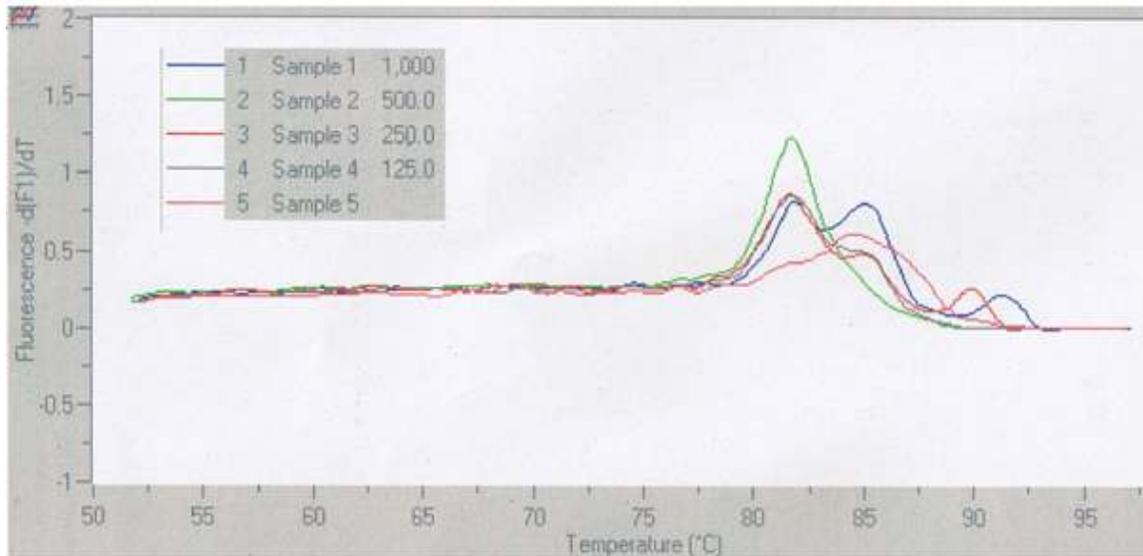


Abbildung 49

Quantifizierung von Biglykan im Lightcycler mit 3mM MgCl<sub>2</sub> bei einer Annealingtemperatur von 58°C (55 Zyklen)

Zum Nachweis von Aggrecan-2 wurde eine PCR bei Annealingtemperaturen von 64°C und 62°C durchgeführt. Die gewonnene DNA von den mit *Harpagophytum* behandelten Tieren besaßen eine Bande bei 177bp (Abb. 50).

Bp  
Marker      Aggrecan 2 64°C      Aggrecan 2 62°C      Osteonectin 64°C



Abbildung 50

PCR zum Nachweis von Aggrecan-2 bei Annealingtemperaturen von 64°C und 62°C und zum Nachweis von Osteonectin bei einer Annealingtemperatur von 64°C (je 35 Zyklen)

Bei der Optimierung für die Quantifizierung wurde Aggrecan-2 bei 5mM und Annealingtemperaturen von 62°C, 64°C und 66°C im Lightcycler geprüft. Die Effizienz lag bei 3,98 bei einer Annealingtemperatur von 62°C und 5 mM MgCl<sub>2</sub>. Eine weitere Optimierung für die ideale Effizienz durch Erhöhung der Annealingtemperatur auf 64°C ergab eine Effizienz von 2,207. Dieser Befund wurde auf das Vorhandensein einer zu großen Menge unspezifischer Produkte zurückgeführt und wurde verworfen. Bei einem weiteren Optimierungslauf (Annealingtemperatur 66°C) kam keine richtige Schmelzkurve zustande. Somit musste die Quantifizierung von Aggrecan-2 ebenfalls verworfen werden (Abb. 51, 52).

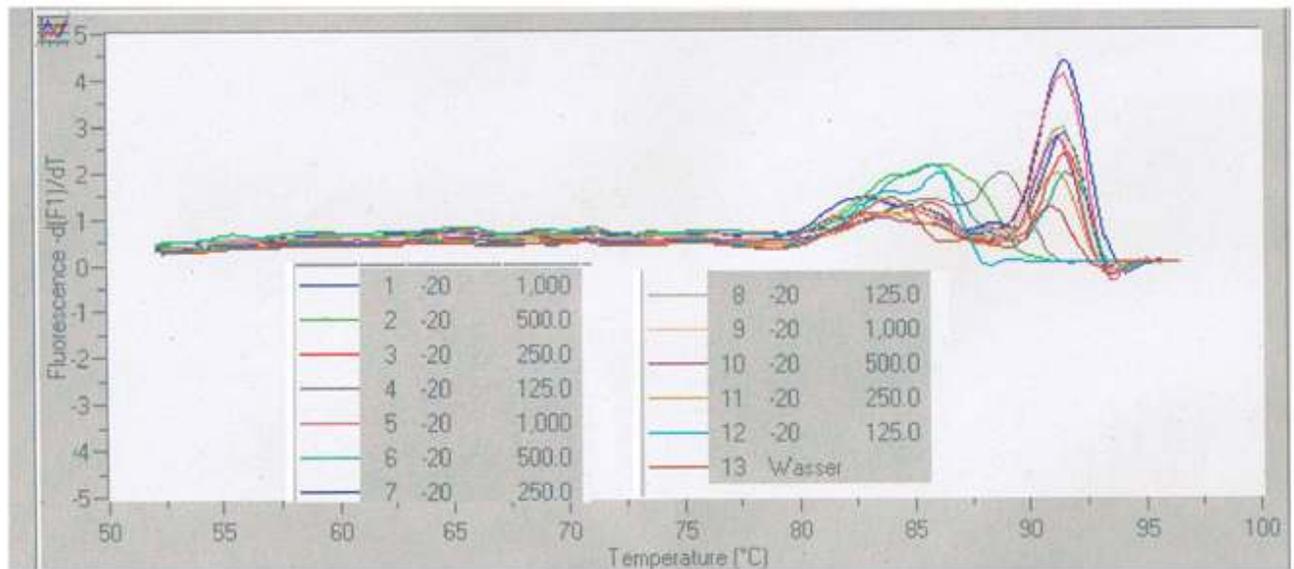


Abbildung 51

Quantifizierung von Aggrecan-2 im Lightcycler bei 3 verschiedenen MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (Annealingtemperatur 62°C, Elongation bei 72°C)

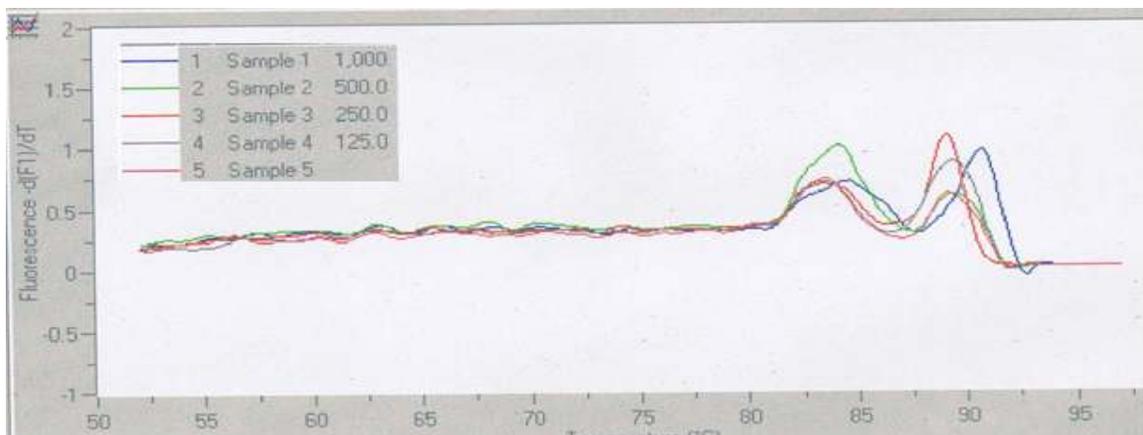


Abbildung 52

Quantifizierung von Aggrecan-2 im Lightcycler bei 5mM MgCl<sub>2</sub> (Annealingtemperatur 64°C)

Osteonectin wurde im Thermocycler bei 64°C getestet. Es fand sich eine 500 bp große Bande in den Proben der mit *Harpagophytum* behandelten Tiere. Da dieses jedoch ein langes Basenpaar ist, musste die Elongation entsprechend erhöht werden (von 20 auf 25). In einem Optimierungslauf im Lightcycler bei einer Annealingtemperatur von 65°C (72°C Elongation, 25 Zyklen) und 3 verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen zeigte sich, dass der Primer nicht richtig „annealte“ und dass zu wenig „template“ vorhanden war, um eine eindeutige Aussage machen zu können (Abb. 53).

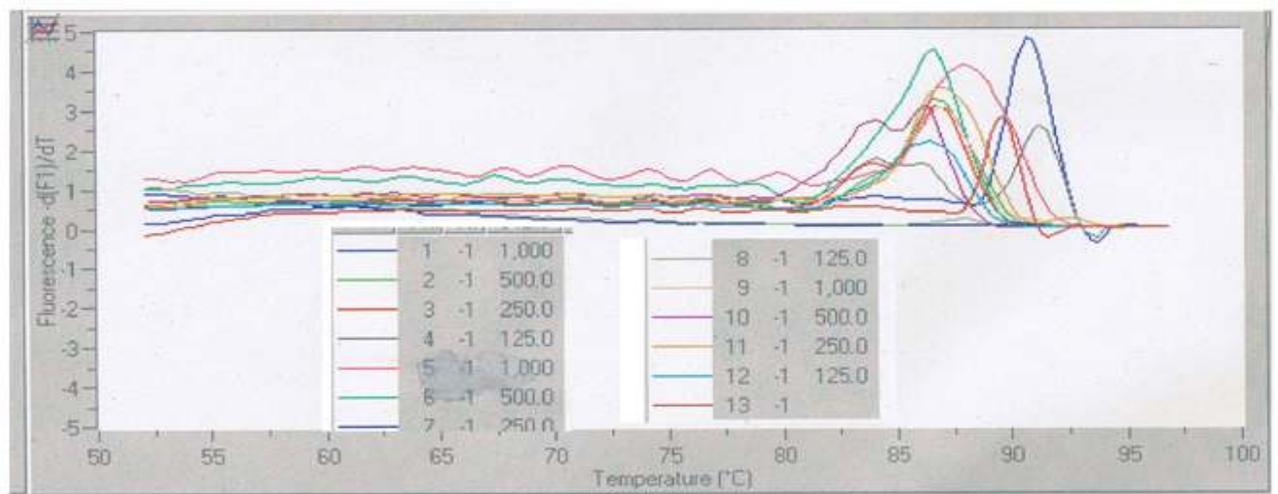


Abbildung 53

Quantifizierung von Osteonectin im Lightcycler (Annealingtemperatur 65°C, Elongation bei 72°C) mit 3 verschiedenen Magnesiumchloridkonzentrationen: der Primer „annealt“ nicht richtig

Der Versuch wurde bei einer 3°C höheren Annealingtemperatur noch einmal durchgeführt (68°C) und die Proben anschließend auf ein Agaroselaufgel überführt. Bei 3mM MgCl<sub>2</sub> war eine Bande zu sehen, jedoch auch eine große Menge unspezifische Produkte (d.h. es war zu wenig Ausgangsmaterial vorhanden, damit der Primer richtig „annealen“ konnte). Somit konnte auch Osteonectin nicht amplifiziert werden (Abb. 54, 55).

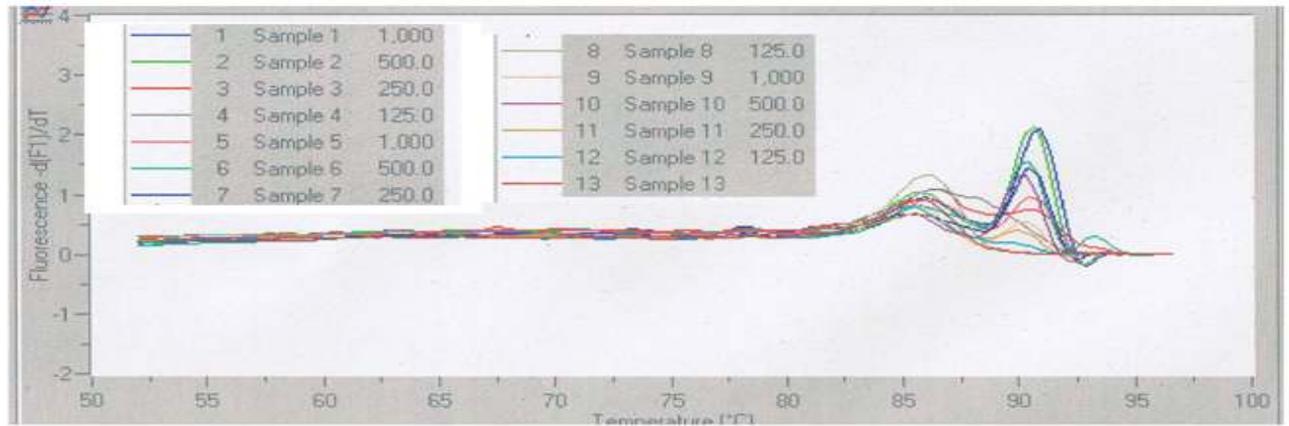


Abbildung 54

Quantifizierung von Osteonectin im Lightcycler (Annealingtemperatur 68°C, 3 verschiedene Magnesiumchloridkonzentrationen). Die Interferenz mit „Primer Dimer“ ist zu hoch

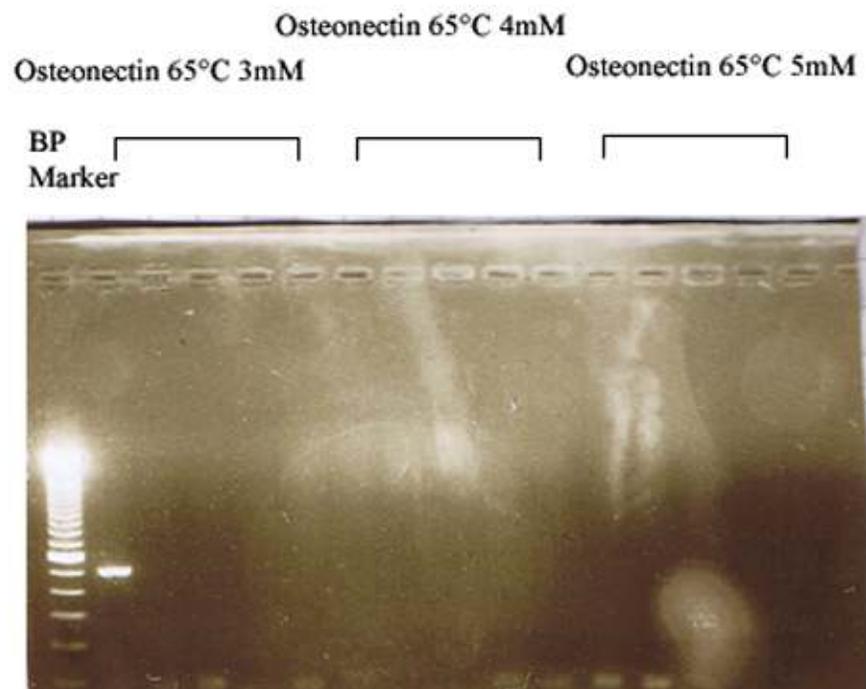


Abbildung 55

Nachweis von Osteonectin (Annealingtemperatur 68°C, 3 verschiedene Magnesiumchloridkonzentration) nach Lightcyclerlauf auf Agarosegel

### 4.3 Beurteilung der Zellkulturen

In der Rinderzellkultursuspension konnte ein Unterschied zwischen dem wässrigen (Firma Finzelberg, 100% nativ, 2,3% Harpagosid; Chargennummer: 98220954) und dem Spezialextrakt (Firma Finzelberg, Spezialextrakt 9195, Chargennummer: TPA 43-02) von *Harpagophytum* und der Weide nicht nachgewiesen werden, da eine unbekannte Sustanz im *Harpagophytum* und der Weide mit dem Alginat in der dreidimensionalen Kultur interferierte und die Alginatkügelchen sich sukzessive auflösten. In der S35 Rinderknorpelkultur über 36 Stunden mit dem Ziel der Prostaglandinbestimmung wurde kein Unterschied zwischen den mit LPS stimulierten Zellen und den Zellen ohne LPS festgestellt. Daraufhin wurde der Versuch in einer Suspensionslösung über einen Zeitraum von 3 Tagen mit S35 wiederholt, wobei festgestellt wurde, dass die *Harpagophytum*-Extrakte (wässrig und Spezialextrakt) keine Wirkung auf die PGE<sub>2</sub> zeigen. Der Weidenextrakt hemmte hingegen signifikant die Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthese, wobei die Konzentration 100µg/ml mit 32% und 33µg/ml Konzentration zu 43% die Synthese im Vergleich zu der Kontrolle (100%) hemmt bei den nicht stimulierten Zellen. Bei den mit LPS stimulierten Zellen weist die 100 µg/ml Weide einen Prozentsatz von 61% und die 33µg/ml Weide 90% auf (Abb. 58- 61).

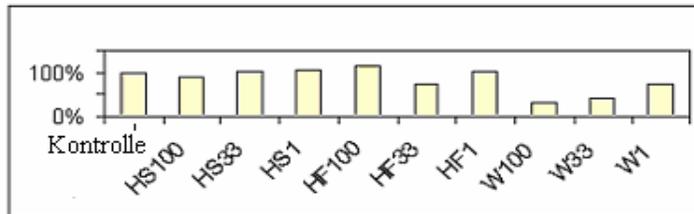


Abbildung 58

Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthese in der mit LPS stimulierter Suspensionskultur über einen Zeitraum von 3 Tagen unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen 100µg/ml, 33µg/ml, 1µg/ml

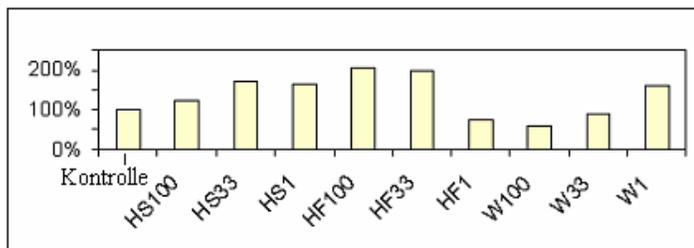


Abbildung 59

Prostaglandin E<sub>2</sub>-Synthese (%) in der unstimulierten Suspensionskultur über einen Zeitraum von 3 Tagen unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen 100µg/ml, 33µg/ml, 1µg/ml

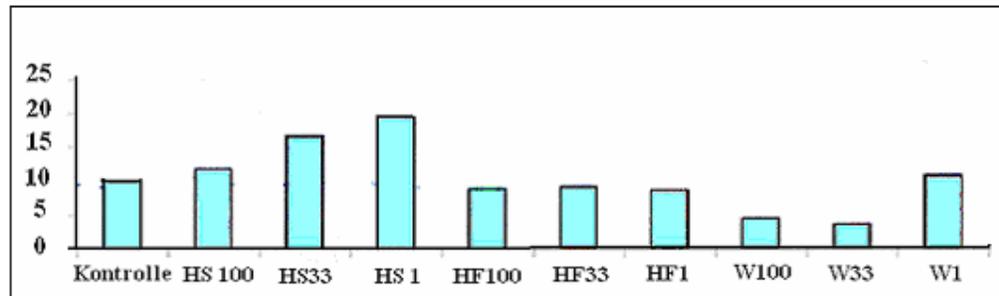


Abbildung 60

Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Konzentration (µg/ml) in der mit LPS stimulierten Suspensionskultur unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen 100µg/ml, 33µg/ml, 1µg/ml

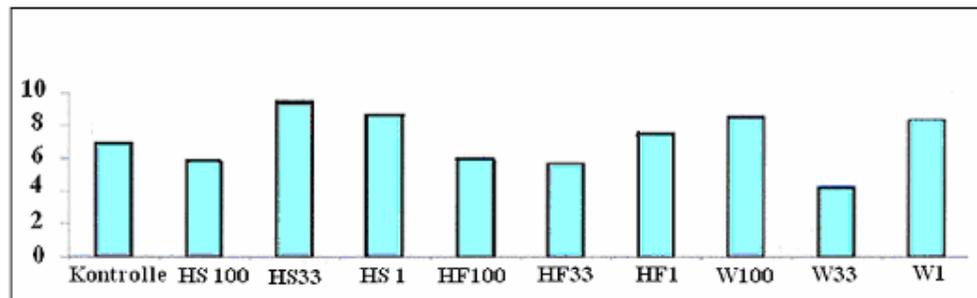


Abbildung 61

Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Konzentration (µg/ml) in der unstimulierten Suspensionskultur unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen 100µg/ml, 33µg/ml, 1µg/ml

Bei der mit IL-1 $\beta$  über einen Zeitraum von 3 Tagen stimulierten Suspensionslösungsreihe aus humanen Knorpelzellen fand sich im Gegensatz zu Beigabe von Weidenrindenextrakt (100µg/ml) bei Zugabe sowohl des hydrophilen wie lipophilen Harpagophytumextrakts eine sehr starke Erhöhung der NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> + NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Konzentration pro DNA (Abb. 62-68) auf.

In den mit IL-1 $\beta$  stimulierten Zellen wurde kein Unterschied zwischen den Extraktproben und der Kontrolle festgestellt. Die LDH Ausscheidung zeigte weder in der stimulierten noch in der nicht stimulierten Reihe einen wesentlichen Unterschied zu der Kontrollgruppe (siehe Abb. 69, 70).

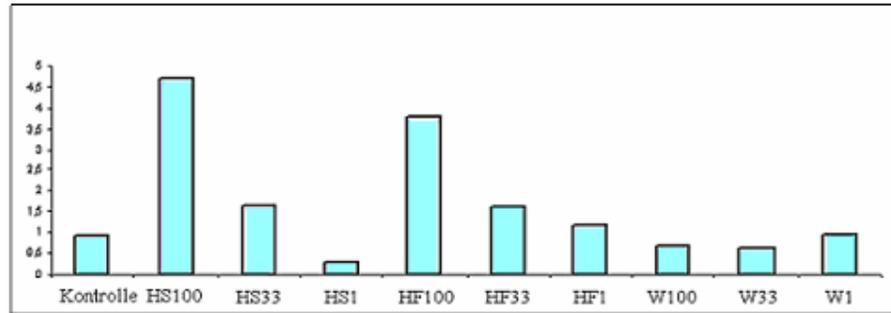


Abbildung 62

Mit LPS stimulierte Suspensionsreihe: NO<sub>3</sub>-Konzentration (µg/ml) pro DNA unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen 100µg/ml, 33µg/ml, 1µg/ml

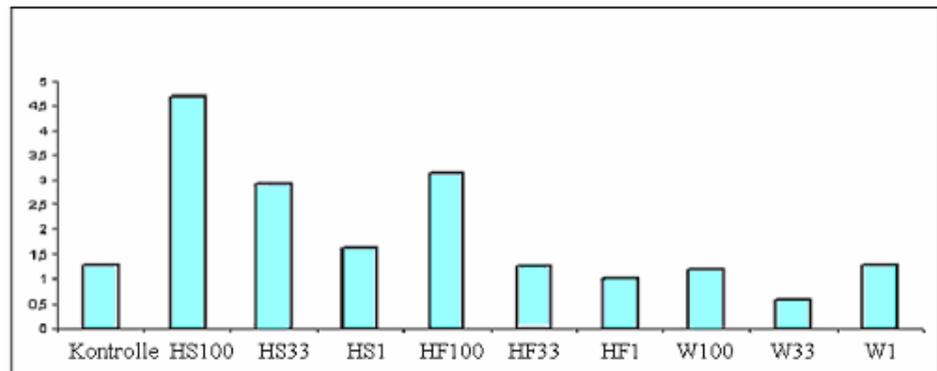


Abbildung 63

Unstimulierte Suspensionsreihe: NO<sub>3</sub>-Konzentration (µg/ml) pro DNA unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen 100µg/ml, 33µg/ml, 1µg/ml

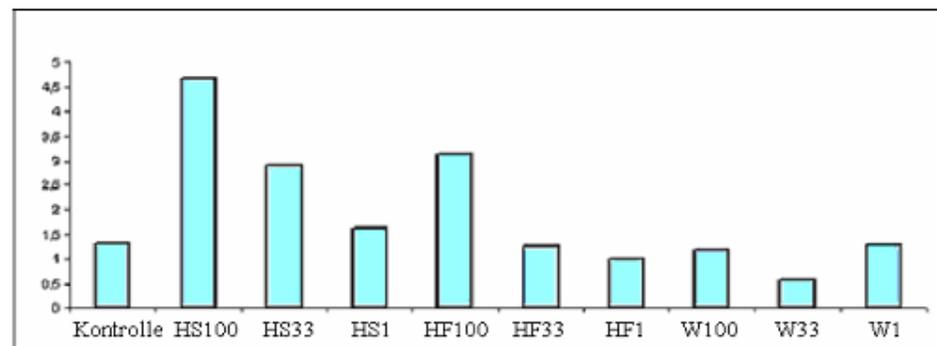


Abbildung 64

Unstimulierte Suspensionsreihe: NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>-Konzentration (µg/ml) pro DNA unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen 100µg/ml, 33µg/ml, 1µg/ml

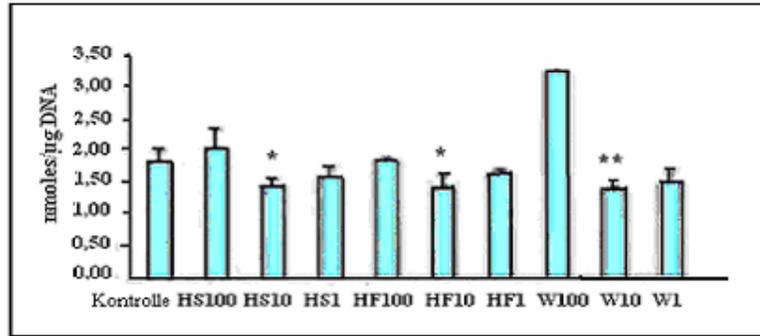


Abbildung 65

Mit IL-1 $\beta$  stimulierte Suspensionsreihe: NO<sub>2</sub>-Konzentration ( $\mu\text{g/ml}$ ) pro DNA unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen 100 $\mu\text{g/ml}$ , 33 $\mu\text{g/ml}$ , 1 $\mu\text{g/ml}$

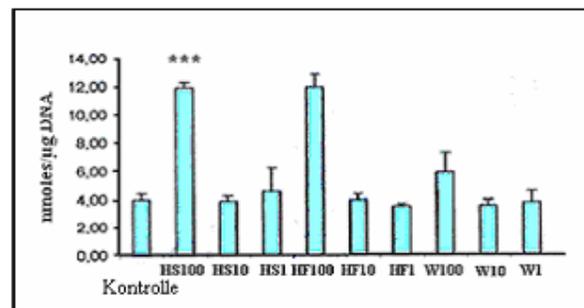


Abbildung 66

Mit IL-1 $\beta$  stimulierte Suspensionsreihe: NO<sub>3</sub> /DNA Verhältnis unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen 100 $\mu\text{g/ml}$ , 33 $\mu\text{g/ml}$ , 1 $\mu\text{g/ml}$

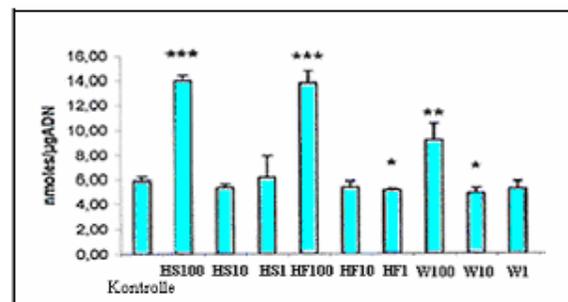


Abbildung 67

Mit IL-1 $\beta$  stimulierte Suspensionsreihe: NO<sub>2</sub> + NO<sub>3</sub>/DNA Verhältnis unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen 100 $\mu\text{g/ml}$ , 33 $\mu\text{g/ml}$ , 1 $\mu\text{g/ml}$

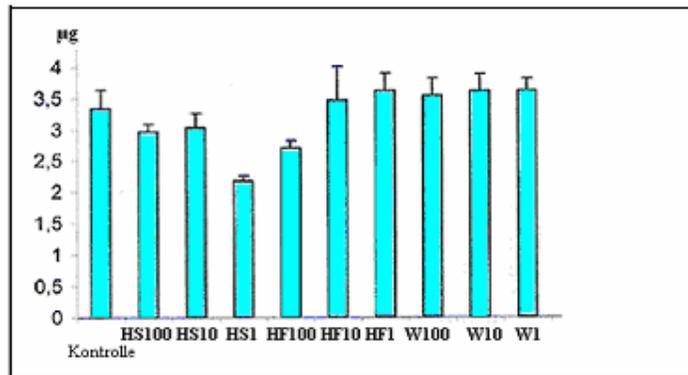


Abbildung 68

Überprüfung des DNA-Gehalts ( $\mu\text{g/ml}$ ) in der humanen Knorpelzellkultur unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen  $100\mu\text{g/ml}$ ,  $33\mu\text{g/ml}$ ,  $1\mu\text{g/ml}$

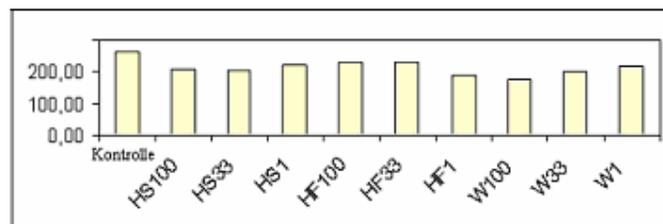


Abbildung 69

Lactatdehydrogenase (LDH)-Synthese in der mit LPS-stimulierten Suspensionskultur. Unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen  $100\mu\text{g/ml}$ ,  $33\mu\text{g/ml}$ ,  $1\mu\text{g/ml}$

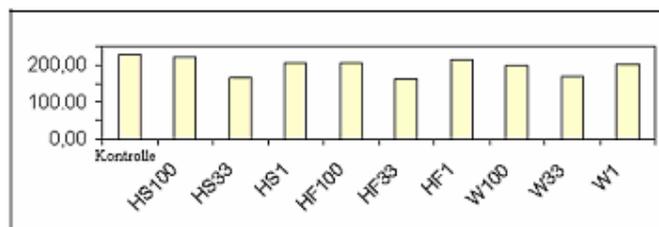


Abbildung 70

Lactatdehydrogenase (LDH)-Synthese in der unstimulierten Suspensionskultur unter Zugabe von wässrigem Harpagophytum-Extrakt (HS), Extrakt FB 9195 (HF) und Weidenrindenextrakt Assalix<sup>R</sup> (W) in den Konzentrationen  $100\mu\text{g/ml}$ ,  $33\mu\text{g/ml}$ ,  $1\mu\text{g/ml}$

Zusammengefasst kann festgestellt werden, dass in der humanen Knorpelzellkultur eine hohe Ausscheidung an  $\text{NO}_3$  nach Zugabe von  $100\mu\text{g/ml}$  der *Harpagophytum*-Extrakte (hydrophil und lipophil) zu finden war. Jedoch muss kritisch hinterfragt werden, ob die Konzentration von

100µg/ml *Harpagophytum* dem Wirkstoffspiegel im Gewebe nach oraler *Harpagophytum*-Einnahme entspricht. Die Ergebnisse zeigen aber, dass der *Harpagophytum*-Extrakt die Zyklooxygenase in bovinen Knorpelzellen nicht hemmte. Der Weidenrindenextrakt hemmte dagegen in den bovinen Knorpelzellen die Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Synthese und damit die Zyklooxygenase.

## 5. Diskussion

Bei der Behandlung der Arthrose (im englischen Sprachraum „osteoarthritis“) steht die Linderung der Schmerzen und die Verbesserung der Lebensqualität im Vordergrund, wobei die Behandlung aufgrund ihres Langzeitcharakters möglichst nebenwirkungsarm sein sollte, da eine krankheitsspezifische antiarthrotische Behandlung nicht zur Verfügung steht.

Die pharmakologischen und nichtpharmakologischen Behandlungsmöglichkeiten sind unter anderem in den „Guidelines“ des American College of Rheumatology (ACR) zusammengefasst (Hochberg et al 1995a und b). Empfehlungen zur chirurgischen Behandlung sind darin nicht enthalten. In der Zwischenzeit – seit Veröffentlichung dieser Guidelines im Jahr 1995 – wurden verschiedene systematische Reviews, Metaanalysen und qualitativ gute klinische Studien zur Behandlung mit Synthetika veröffentlicht (Griffin et al 1988; Towheed und Hochberg 1997a und b; Van Baar et al 1998), so dass die Therapieempfehlungen angepasst werden mussten ([www.rheumatology.org/publications/guidelines/oa-mgmt/oa-mgmt.asp?aud=mem](http://www.rheumatology.org/publications/guidelines/oa-mgmt/oa-mgmt.asp?aud=mem)).

Bei geringen bis mäßigen Schmerzen wird an erster Stelle die Behandlung mit dem Analgetikum Acetaminophen (Paracetamol) empfohlen. Der Therapieerfolg kann dabei ebenso gut sein wie mit nichtsteroidalen Antirheumatika (Bradley et al 1991; Eccles et al 1998), allerdings muss auf die mögliche Lebertoxizität geachtet werden, vor allem wenn bei älteren Patienten mehrere potentiell lebertoxische Medikamente zum Einsatz kommen (Seifert et al 1993; Whitcomb und Block 1994). Die Acetaminophen-Tagesdosis sollte daher 4g nicht überschreiten. Weiterhin sind z.B. Interaktionen mit Warfarin beschrieben (Fitzmaurice und Murray 1997; Hylek et al 1998). Nierenschäden treten dagegen bei einer Dosierung unter 4g/d selten auf (Henrich et al 1996). Bei Patienten mit geringen bis mäßigen Schmerzen, die auf eine Behandlung mit Acetaminophen nicht ansprechen, kann eine lokale Applikation von Analgetika (z.B. Methylsalicylat, Diclofenac oder Capsaicincreme) in Betracht gezogen werden (als zusätzliche Therapie oder als Monotherapie). Bei der Behandlung mit diesen Lokalthérapeutika muss beachtet werden, dass sie mehrmals täglich aufgetragen werden müssen und dass Hautsensationen auftreten können, z.B. Hautrötung oder Brennen, die aber offensichtlich nur selten zum Abbruch der Behandlung führen (Moore et al 1998).

Bei mäßigen bis starken Schmerzen sind nichtsteroidale Antirheumatika indiziert. Vor der Gabe der nichtsteroidalen Antirheumatika sollte das Risiko für das Auftreten gastrointestinaler bzw. renaler Nebenwirkungen überprüft werden. Aus epidemiologischen Studien geht hervor, dass Patienten, die älter als 65 Jahre sind, multimorbide Patienten, Patienten, die Glucocorticoide oder Antikoagulantien einnehmen, die in ihrer Anamnese ein Magengeschwür oder eine Magenblutung haben, ein erhöhtes Risiko für das Auftreten schwerer gastrointestinaler und anderer

Nebenwirkungen aufweisen (Simon et al 1996; Griffin et al 1988 und 1991; Smalley and Griffin 1996). Bei diesen Patienten sollten unspezifische nichtsteroidale Antirheumatika nur mit einer Magenschutzbehandlung (Misoprostol 2 x 200 µg oder Potonenpumpenhemmer, z.B. Pantoprazol, Omeprazol oder Esomeprazol, 20-40 mg) verabreicht werden, auch bei geringen Dosen von unspezifischen nichtsteroidalen Antirheumatika (Silverstein et al 1995; Raskin et al 1995; Ekstrom et al 1996). Vielfach ist nicht bekannt, dass sich mit H<sub>2</sub>-Blockern kein ausreichender Magenschutz erzielen lässt (Yeomans et al 1998). Coxibe sind bei Beachtung der Nebenwirkungen eine sinnvolle Alternative bei gastrointestinalen Risiken. Zurzeit gilt Celecoxib als der sicherste COX-2-Hemmer, wenn er in möglichst niedriger Dosis und nur für möglichst kurze Zeit verabreicht wird (Clemett und Goa 2000). Nach der Marktrücknahme von Rofecoxib wegen eines erhöhten Risikos für das Auftreten von Herz-Kreislauf-Komplikationen bei Langzeitanwendung hat eine erneute aktuelle Bewertung von Sicherheitsdaten für die anderen zugelassenen Coxibe (Celecoxib, Etoricoxib, Valdecoxib und Parecoxib) auf europäischer Ebene begonnen. Eine Stellungnahme wird derzeit in den Fachgremien bei der Europäischen Arzneimittelbehörde (EMA) in London erarbeitet und in Kürze vorgestellt (<http://www.akdae.de/46/20041015.html>).

Weitere Optionen bei Patienten mit einem erhöhten Risiko für gastrointestinale Nebenwirkungen sind die intraartikuläre Injektion von Glucocorticoiden (z.B. Triamcinolon 10 – 40 mg) oder von Opioiden unmittelbar nach der Gelenkpunktion zur Aspiration der Synovialflüssigkeit (Kirwan und Rankin 1997). In den USA ist auch die intraartikuläre Instillation von Hyaluronsäure oder die orale Einnahme von Glucosamin sehr beliebt (Arrich et al 2005). Unter aseptischen Bedingungen ist das Auftreten einer Infektion im Anschluss an die intraartikuläre Injektion gering. Aus beiden Gründen sollte allerdings nicht mehr als viermal im Abstand von 4 Wochen diese Maßnahme durchgeführt werden. Gelegentlich kann die kristalline Lösung eine vorübergehende lokale Reizung auslösen.

Bei Patienten mit mäßigen bis starken Schmerzen, die nicht mit unspezifischen nichtsteroidalen Antirheumatika behandelt werden können oder die nur unzureichend auf diese Therapie ansprechen, sollte die systemische Applikation von Tramadol oder Opioiden (z.B. Tilidin) in Erwägung gezogen werden (Dalgin und die TPS-OA Study Group 1997, American Academy of Pain Medicine and American Pain Society, 1997). Bezüglich der reinen Schmerzreduktion kann eine Opioidbehandlung ebenso wirksam wie eine Behandlung mit Ibuprofen sein. Jedoch muss unter einer Opioidbehandlung mit Nebenwirkungen gerechnet werden, z.B. Übelkeit, Schwindel, Verstopfung und die Fähigkeit zum Führen von Kraftfahrzeugen bzw. zum Bedienen von Maschinen kann herabgesetzt sein. Im Gegensatz zur Opioidbehandlung kommt es bei einer

Tramadol- oder Tilidin/Naloxon-Kombinationsbehandlung nicht zu einer Toleranzentwicklung oder Opioidabhängigkeit (American Academy of Pain Medicine and American Pain Society 1997).

Weder die ACR Guidelines noch die später publizierten Empfehlungen berücksichtigen die oralen pflanzlichen Entzündungshemmer. Dabei könnte es sinnvoll sein, deren Wirkungspotential auszunutzen, bevor Synthetika eingesetzt werden, vor allem dann, wenn die klinische Wirksamkeit (Überlegenheit gegen Plazebo, Nichtunterlegenheit gegen konventionelle Therapiemaßnahmen) der pflanzlichen Medikamente belegt ist. Vorteil der Phytotherapie bei Gelenkerkrankungen ist das breitere Wirkspektrum im Vergleich zu den Synthetika und das potenziell in der Regel geringere Ausmaß an Nebenwirkungen. Phytotherapeutika mit im Detail untersuchten Wirkungsmechanismen greifen ebenfalls über den Arachidonsäurestoffwechsel (Cyclo- und Lipoxygenasehemmung) in das Schmerz- und Entzündungsgeschehen ein, hemmen *in-vitro* und im Tierversuch die bei der Knorpelzerstörung beteiligten Zytokin-Botenstoffe, hemmen die Elastase bzw. die Hyaluronidase und besitzen eine mehr oder weniger ausgeprägte antioxidative Wirkung. Definierte Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden allerdings bislang nur für Teufelskrallenwurzel (Chrubasik et al 1999) und Weidenrindenextrakt (Chrubasik et al 2000) nachgewiesen. Die Dauer der Einnahme von Phytotherapeutika bei Gelenkerkrankungen ist bei Fehlen von limitierenden Nebenwirkungen zeitlich nicht begrenzt. Eine Optimierung der Pflanzenextrakte und ihrer Dosierungen bei den verschiedenen Schmerzursachen ist dennoch dringend erforderlich, um die Präparate gezielter einsetzen zu können. Die Ergebnisse der mit Spezialextrakten durchgeführten Studien können hierbei nicht auf anders zubereitete Extrakte transferiert werden, es sei denn der Nachweis der Bioäquivalenz mit dem getesteten Extrakt wurde erbracht (Chrubasik und Roufogalis 2003).

Zu den bei Gelenkerkrankungen in Frage kommenden Phytotherapeutika zählen Präparate aus der Teufelskrallenwurzel (*Harpagophyti radix*), der Weidenrinde (*Salicis cortex*), den Scheinfrüchten der Hagebutte (*Rosae pseudofructus cum fructibus*), dem Kraut bzw. den Blättern der Brennnessel (*Urticae folium/herba*), ein Kombinationspräparat aus Pappelrinde bzw. -blättern (*Populi cortex bzw. folium*), dem Kraut der Goldrute (*Solidaginis herba*) und der Rinde der Esche (*Fraxini cortex*) sowie die Blätter und das Samenöl der schwarzen Johannisbeere (*Ribis nigri folium/semen*), die Samenöle der Nachtkerze (*Oenotherae semen*) und des Borretsch (*Boraginis semen*), einer unverseifbaren Fraktion aus Avocado (*Persea americana*) und Soja (*Glycine max*), sowie einem Kombinationspräparat aus Pappelblättern, Pappel- und Eschenrinde und Goldrutenkraut (Tabelle 26). Systematische Reviews gibt es zur Teufelskralle (Chrubasik et al 2003a), zur Hagebutte (Chrubasik et al 2006) und zur Avocado-Soja-Fraktion (Ernst 2003).

Entscheidend für eine erfolgreiche Behandlung sind die Qualität der Präparate und eine ausreichende Wirkstoffzufuhr.

**Tabelle 26**

Phytotherapeutika bei Gelenkerkrankungen, empfohlene Dosierungen und Gehalt an Markersubstanz(en) in der Tagesdosis

Zubereitungen aus	Tagesdosis (mg)	Markersubstanz(en) / Tag
<b>Teufelskrallenwurzel</b>	4,5 - 9 g Extrakt	50 bis 100 mg Harpagosid
<b>Scheinfrüchte der Hagebutte</b>	5 - 10 g Pulver	1,5 - 3 mg Galactolipid
<b>Weidenrinde</b>	Extrakt mit	120 bis 240 mg Salicin
<b>Brennesselkraut/-blätter</b>	12 - 15 g Kraut/Blätter	nicht definiert
<b>Johannisbeerblätter</b>	20 - 50 g Blätter	300 bis 750 mg Rutin
<b>Johannisbeersamen</b>	Öl mit	bis 3 g Gammalinolensäure
<b>Nachtkerzensamenöl</b>	Öl mit	bis 3 g Gammalinolensäure
<b>Boretschsamensöl</b>	Öl mit	bis 3 g Gammalinolensäure
<b>Kombinationspräparat aus</b>	Tinkturen mit	
<b>Pappelblättern, -rinde</b>		bis 5,4 mg Salicin
<b>Eschenrinde</b>		bis 0,36 mg Fraxin
<b>Goldrutenkraut</b>		bis 0,18 mg Rutin
<b>Avocado-Soja Fraktion</b>	300 mg (1/3 A., 2/3 S.)	nicht definiert

Die nichtpharmakologischen Behandlungsmöglichkeiten umfassen Patientenanweisungen, Selbsthilfeprogramme, soziale Unterstützung durch Hotlines/telefonische Beratung, Gewichtsabnahme bei Übergewicht, Aerobic-Übungsprogramme, physikalische Therapien, Muskelaufbauübungen, Beschäftigungstherapien, bewegungserleichternde Gerätschaften, Knie-Taping, orthopädische Schuhe bzw. Schuheinlagen, Gelenkschoner und Hilfsmittel für den Alltag. Durch diese Maßnahmen lässt sich die Anzahl der Arztbesuche verringern, die körperliche Aktivität steigern und die Lebensqualität verbessern (Superio-Cabuslay et al 1996; Weinberger et al 1993; Hurley 1999; Ettinger et al 1997; Hurley und Scott 1998; Toda et al 1998). Die aktuellen Empfehlungen der ACR weisen ausdrücklich darauf hin, dass alle nichtmedikamentösen Behandlungen ausgeschöpft werden sollten, um die Medikamentendosen so gering wie möglich zu halten ([www.rheumatology.org/publications/guidelines/oa-mgmt/oa-mgmt.asp?aud=mem](http://www.rheumatology.org/publications/guidelines/oa-mgmt/oa-mgmt.asp?aud=mem)).

Aus ethischen Gründen ist es nicht möglich, bei Patienten systematische Untersuchungen am Knorpel durchzuführen, um die Progression der Knorpelveränderungen bei OA zu erforschen. Deshalb sind Untersuchungen am experimentellen Osteoarthritis-Modell notwendig, um Veränderungen auf molekularer Ebene erkennen zu können. Nur durch den Vergleich von operierten und nicht-operierten Gelenken, bzw. durch den Vergleich behandelter und unbehandelter Tiere können Effekte auf die Matrixdegeneration erkannt werden. So bewirkt die Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes bei Tieren zur Provokation einer Arthrose schon sehr früh am operierten Knie eine massive Hochregulation der Kollagenasen 1 und 2, sowie von YKL 40, dem „human chitinase 3-like 1“-Gen; die Genexpressionen von MMP 13, Aggrecan und Tenascin C werden dagegen erst nach einem halben Jahr beeinflusst (Takahashi et al 1999, Lorenz et al 2005). In unserem Kaninchenmodell wurde durch die zusätzliche Entfernung des medialen Meniskus nach Durchtrennung des vorderen Kreuzbandes und durch die tägliche Mobilisierung der Kaninchen eine früh einsetzende, schwere Gelenkdestruktion provoziert. Obwohl die obduzierenden Untersucher makroskopisch eine Verdickung des Knorpels an den Hüftgelenken der operierten Extremitäten festgestellt hatten (Faller-Marquardt und Chrubasik 2002), wurden morphometrisch keine Unterschiede zwischen den Hüftknorpeln der operierten und nicht-operierten Seite bzw. zwischen den mit *Harpagophytum* behandelten und nicht-behandelten Tieren festgestellt (Gerlach 2002). Der Vorteil unserer molekularbiologisch-analytischen Methode gegenüber der rein morphologischen lag aber darin, dass wir Effekte auf ab- und umbauende Knorpelmoleküle spezifisch (durch Nachweis der Gensequenzen) nachweisen konnten, wobei aus Mangel an bekannten Kaninchen-Gensequenzen sämtliche Primer für die RT-PCR neu etabliert werden mussten (Müller-Ladner und Gay 2003). Als wichtigstes Kandidaten-Molekül stellte sich bei unseren Untersuchungen das TIMP-2 heraus, das als direkter Gegenspieler der Matrixmetalloproteinasen vor allem den Abbau verschiedener Komponenten der Matrix wie Elastin, Gelatin und vor allem des ubiquitären Kollagens hemmt (Ishiguro et al 1999).

Bei Nachweis des TIMP-2-Gehalts mittels PCR und Real-Time PCR konnte bei zwei mit *Harpagophytum* behandelten Kaninchen ein wesentlich höherer TIMP-2-Gehalt (2-fach, 5-fach) als bei der Kontrollgruppe gefunden wurde (bei keinem der Kontroll-Kaninchen wurde ein entsprechender TIMP-2-Gehalt gefunden). Dieser sichere Nachweis des protektiven TIMP-2 bei nur wenigen Tieren beruht wahrscheinlich primär darauf, dass der Knorpel manuell abgeschält wurde, weshalb die Knorpelschicht nicht komplett erfasst wurde. Außerdem wurde das abgeschälte Knorpelstück gedrittelt und zufällig dem Formalin, flüssigem Stickstoff oder der RNA Extraktion zugeteilt ungeachtet der Lokalisation. Da die Beanspruchung des

Hüftgelenks regional unterschiedlich ist, sind auch die molekularen Veränderungen wahrscheinlich medial stärker ausgeprägt als lateral, wie Lorenz et al (2005) inzwischen nachweisen konnten. Das Ergebnis unserer Untersuchung illustriert daher möglicherweise nur ein inkomplettes Bild: Die 2- bis 5-fach erhöhte TIMP-2-Expression bei zwei Kaninchen im Vergleich zum höchsten TIMP-2 Gehalt der Kontrollgruppe kann daher als Hinweis der Zytokin-Hemmung durch den *Harpagophytum*-Extrakt gewertet werden.

TIMP-2 hemmt vor allem die Aggrecanase (z.B. ADAMTS-4) (Hashimoto et al 2001) und nachfolgend den Abbau von Aggrecan (Proteoglykan) (Abb 71). Da die Aggrecanase sowohl durch IL-1 $\beta$  wie durch TNF $\alpha$  induziert wird, könnte eine Hemmung der Aggrecanase durch eine erhöhte TIMP-2-Expression eine ähnliche Wirkung besitzen wie der synthetische, gentechnisch hergestellte Interleukin-1 Rezeptorantagonist (IL-1RA) Anakinra, der in therapeutischen Dosen den Überschuss an IL-1 aufhebt. Der Vorteil der Behandlung mit *Harpagophytum*-Extrakt könnte aber in einem wesentlich geringeren Nebenwirkungspotential bestehen (ESCOP 2003) als die Behandlung mit dem synthetischen IL-1RA (Den Broeder et al 2005).

Es ist bekannt, dass bei traumatisch induzierten Osteoarthritiden die Chondrozyten zu einer vermehrten Produktion von Kollagen-Typ I und II, Aggrecan und Elastase (Matyas et al 2002; Lorenz et al 2005) angeregt werden. Boje et al (2003) konnten nachweisen, dass *Harpagophytum*-Extrakt und vor allem der Inhaltsstoff 6-O-Acetylacteosid mit einer IC<sub>50</sub> von 0,07 mmol/L eine ausgeprägt hemmende Wirkung auf die Elastase-Aktivität *in vitro* besitzen. Kaffeesäure, für die bereits Melzig et al (2005) eine schwache Elastase-Hemmung ermittelte, hemmte das Enzym schwächer als 6-O-Acetylacteosid mit einer IC<sub>50</sub> von 0,475 mmol/L. Ebenso zeigten andere Inhaltsstoffe, z.B. 8-O-p-Cumaroylharpagid (IC<sub>50</sub> von 0,35 mmol/L), Pagosid (IC<sub>50</sub> von 0,26 mmol/L) und Isoacteosid (IC<sub>50</sub> von 0,286 mmol/L) eine hemmende Aktivität, die jedoch schwächer ausgeprägt war als die von 6-O-Acetylacteosid. Die Inhaltsstoffe Harpagosid, Acteosid und Zimtsäure beeinflussten die Elastase-Aktivität in nur sehr geringem Ausmaß. Vor kurzem konnten Schulze-Tanzil et al (2002) nachweisen, dass *Harpagophytum*-Extrakt die IL-1 $\beta$ -stimulierte Expression verschiedener Kollagenasen, insbesondere von MMP-1, MMP-3 und MMP-9, im *In-Vitro*-Chondrozyten-Modell hemmt. Unsere Untersuchung ist daher ein weiterer Hinweis darauf, dass *Harpagophytum*-Extrakt auch unter *In-vivo*-Bedingungen im experimentellen Osteoarthritismodell beim Kaninchen eine knorpelprotektive Wirkung besitzen kann.

Zusätzlich zu den Ergebnissen der TIMP-2-Genexpressionsanalyse fand sich bei den mit *Harpagophytum*-Extrakt behandelten Kaninchen im Unterschied zu den nicht behandelten Kaninchen auf histologischer und morphologischer Ebene ein geringeres Ausmaß an Fibrose und

Gelenkdestruktion bzw. einen Trend zur chondroiden Regeneration im operierten, arthrotisch veränderten Hüftgelenk. Unsere Ergebnisse zeigen auch, dass nach der 6-monatigen Behandlung mit *Harpagophytum*-Extrakt der Gehalt an elastischen Fasern in den operierten Gelenken höher war als in den nicht-operierten Gelenken. Beim Vergleich zur Kontrollgruppe war der Elastaseanteil im operierten Gelenk der *Harpagophytum*-Gruppe signifikant höher als im nicht-operierten Gelenk und im Vergleich zum nicht-operierten Gelenk der Kontrollgruppe. Der Gehalt an kollagenen Fasern war in der mit *Harpagophytum* behandelten Gruppe ebenfalls im Vergleich zur Kontrollgruppe vermehrt, was auf eine chondroide Regeneration hinweist.

Einen ersten Hinweis auf die Interaktion von *Harpagophytum*-Extrakt mit Zytokinen gaben *In-vitro*-Untersuchungen an isolierten menschlichen Monozyten: Wässriger *Harpagophytum*-Extrakt hemmte die LPS-stimulierte Interleukin-1 $\beta$ -Expression, die Wirkung auf TNF- $\alpha$  war hingegen deutlich geringer (Chrubasik et al 2002a). Auch ein mit 60% Alkohol hergestellter Extrakt hemmte die LPS-stimulierte Zytokinexpression im Monozyten-Modell (Fiebich et al 2001). Bei Vorbehandlung isolierter Hep G2 Zellen mit der Leitsubstanz Harpagosid wurde die Aktivierung von NF $\kappa$ B über die Hemmung des Abbaus der Untereinheit I $\kappa$ B- $\alpha$  gehemmt, die die Translokation von NF $\kappa$ B zum Zellkern initiiert (Huang et al 2005). Eine solche Interaktion wurde auch für andere Pflanzenextrakte beschrieben (siehe unten). Der Wirkmechanismus der Pflanzenextrakte inklusive *Harpagophytum*-Extrakt zielt somit auf dieselben Stoffwechselwege wie die derzeit effektivsten wirkenden Antirheumatika, bei der die Zytokine durch Antikörper, lösliche Rezeptoren bzw. Rezeptorantagonisten abgebunden werden, sodass sie am Wirkort nicht angreifen können (Abb. 71).

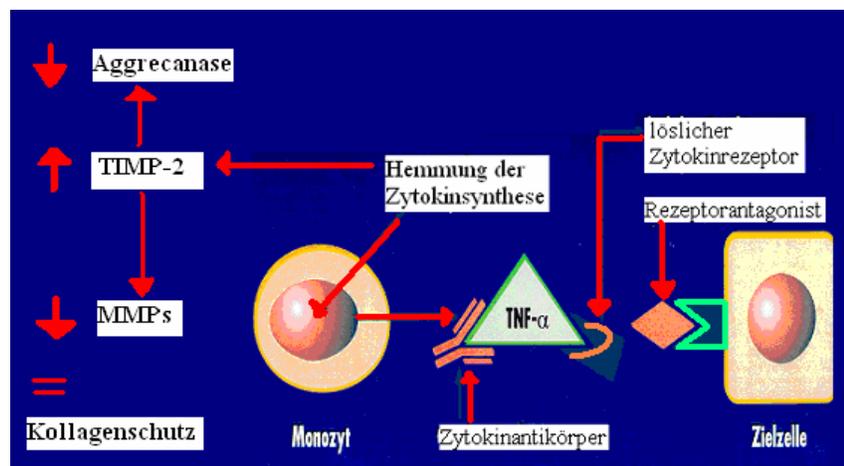


Abbildung 71

Angriffspunkte der Pflanzenextrakte bzw. der neuen synthetischen Antirheumatika durch Hemmung der Zytokinsynthese (Pflanzenextrakte) bzw. durch Verabreichung von Zytokin-Antikörpern, durch lösliche Zytokinrezeptoren oder Rezeptorantagonisten an der Zielzelle

Zum antientzündlichen Wirkungsmechanismus von *Harpagophytum procumbens* liegen noch weitere *In-vitro*-Untersuchungen vor, die erkennen lassen, dass der Extrakt an verschiedenen Ebenen der Entzündungskaskade seine Wirkung entfaltet. Der genaue Zusammenhang ist dabei noch nicht geklärt, denn die Wirkungen einzelner Bestandteile können nicht ohne weiteres auf den Extrakt übertragen werden. Benito et al (2000) konnten zum Beispiel nachweisen, dass nur der Wirkbestandteil Aucubin die Calcium-Iontophor-stimulierte Freisetzung von Leukotrien C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>) *in vitro* (im Modell der Calcium-Iontophor-stimulierten Freisetzung von Entzündungsmediatoren aus peritonealen Makrophagen von Mäusen) hemmte. Die anderen Iridoidglykoside zeigten keine Wirkung. Die über den COX-2-Weg stimulierte Freisetzung von Prostaglandin (PGE<sub>2</sub>) wurde durch die Iridoidglykoside nicht beeinflusst. Dagegen wurde die stimulierte Thromboxan B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>)-Freisetzung durch alle Iridoidglykoside (außer durch Harpagosid) gehemmt. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu den Ergebnissen von Tippler et al (1996) und Loew et al (2001). Im selben Modell fanden diese eine dosisabhängige Hemmung der stimulierten LCT-B<sub>4</sub> und TXB<sub>2</sub>-Freisetzung durch einen wässrigen, 7% Harpagosid enthaltenden Extrakt sowie auch durch Harpagosid. Ein auf 25% angereicherter Extrakt zeigte dagegen keine Hemmung der stimulierten TXB<sub>2</sub>-Freisetzung. Leider war die *Harpagophytum*-zufuhr in der experimentellen Studie von Moussard et al (1992) zu gering (nur 2 g anstelle der klinisch üblichen Dosierung von 4,5 – 9 g), um einen weiteren Aufschluss zur Wirkung der Teufelskralle auf die LCT-B<sub>4</sub> oder die TXB<sub>2</sub> -Freisetzung *ex vivo* / *in vitro* zu erbringen.

In einem Experiment bei Freiwilligen fanden Loew et al (2001) eine dosisabhängige Resorption von Harpagosid nach der Extraktverabreichung, die mit der Hemmung der stimulierten LCT-B<sub>4</sub> -Expression korrelierte. Dieses Ergebnis bedarf allerdings einer Überprüfung, da ein Pilotversuch am Schwein auf eine schlechte Resorption der Leitsubstanz Harpagosid aus dem Magen hinwies (Chrubasik und Eisenberg 1999) und die transepitheliale Passage von Harpagosid durch Caco-Zellen sehr gering war (Boje 2003). Eine gastrointestinale Resorption über das Transporter P-Glycoprotein oder durch parazellulären Transport ist möglich, diese Hypothese muss aber noch bestätigt werden.

Wie die nichtsteroidalen Antirheumatika hemmt *Harpagophytum*-Extrakt auch die bei der Entzündung exprimierten Prostaglandine, doch nicht unselektiv, sondern wahrscheinlich spezifisch über den COX-2 Weg. An menschlichen Monozyten hemmte sowohl wässriger als auch ethanolischer *Harpagophytum*-Extrakt die Lipopolysaccharid (LPS)-stimulierte, COX-2-abhängige PG E<sub>2</sub>-Freisetzung (Chrubasik et al 2002a, Fiebich et al 2001). Jang et al (2003) konnten daneben an Fibroblasten von Mäusen bestätigen, dass der Wirkstoff Harpagosid die

LPS-stimulierte, COX-2-abhängige PG E<sub>2</sub>-Expression und darüber hinaus die induzierbare NO-Synthese hemmte (Huang et al 2005).

Auch in unseren Suspensionskulturen von humanen Knorpelzellen hemmte *Harpagophytum*-Extrakt die stimulierte Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Freisetzung. Warum wir in den bovinen Suspensionskulturen diesen Effekt nicht beobachten konnten, könnte seine Ursache in der Speziesspezifität haben oder darin, dass der Extrakt mit Endotoxin verunreinigt war. Auch Fiebich et al (2001) konnten nach Verwendung von unbehandeltem Extrakt keine hemmende Wirkung auf die stimulierte PGE<sub>2</sub> und Zytokinfreisetzung feststellen. Erst als sie ein spezifisches Verfahren anwandten, um den Extrakt von Endotoxin zu reinigen, gelang es ihnen, diese Wirkungen nachzuweisen. In der humanen Knorpelzellkultur fand sich darüber hinaus nach direkter Applikation des wässrigen und *Harpagophytum*-Spezialextraktes eine hohe Ausscheidung an NO<sub>3</sub> bei einer Konzentration von 100µg/ml, was ebenfalls auf eine Verunreinigung mit Endotoxin hinweisen könnte.

Während *Harpagophytum*-Extrakt antioxidativ wirksame Bestandteile (Flavonoide) enthält, konnte in ersten Untersuchungen für die Leitsubstanz Harpagosid keine antioxidative Wirkung *in vitro* nachgewiesen (Betancor-Fernandez et al 2003) bzw. *in vivo* serologisch bestätigt werden (Jadot und Lecomte 1992), Kürzlich wurde aber eine dosisabhängige Hemmung der Nitritexpression im Modell der mit LPS-stimulierten Stickoxid-Synthase durch die Leitsubstanz Harpagosid nachgewiesen (Huang et al 2005).

Da wässriger Extrakt im Hot-Plate-Test bei Ratten keine Wirkung entfaltet, kann die in Studien beobachtete Analgesie nicht zentral ausgelöst sein (Lanhers et al 1992). Hingegen fand sich nach Injektion von Freudschem Adjuvans in die Fußsohlen von Ratten nicht nur nach akuter Gabe, sondern auch nach chronischer Applikation eine antientzündliche und peripher analgetische Wirkung (Andersen et al 2004). Die Wirkbestandteile Harpagosid und Harpagogenin antagonisierten *in vitro* die durch Bradykinin, Nikotin, 5-Hydroxytryptamin, PGE<sub>2</sub> und Acetylcholin induzierten Spasmen am isolierten Ileummuskel vom Meerschweinchen (Fontaine et al 1981). Dass Harpagid die cholinerge Wirkung in diesem Test potenziert (Fontaine et al 1981), steht im Einklang mit den *In-Vitro*-Befunden von Occhiuto et al (1985). Andere Pflanzenextrakte, für die Interaktionen mit verschiedenen Entzündungsmediatoren nachgewiesen wurden, sind in der Tabelle 51 zusammengefasst. Zum Beispiel wurde für einen Extrakt aus den Blättern der Brennnessel (*Urtica dioica*) neben einer Cyclooxygenase und Lipoxygenasehemmung (Obertreis et al 1996) eine Hemmung der stimulierten Zytokinfreisetzung (IL-1β, TNF-α) *ex vivo/in vitro* nachgewiesen (Teucher et al 1996).

Als Wirkmechanismus wurde eine Hemmung des Abbaus der Untereinheit  $I_{\kappa}N-\alpha$  identifiziert, die eine Aktivierung von  $NF_{\kappa}B$  verhindert und so die Transkription der Zytokine via mRNA im Zellkern (Riehemann et al 1999). Auch konnte eine Hemmung der durch die Zytokine ausgelösten „Up-Regulation“ der Metalloproteinasen (MMP 1, 3 und 9) nach Behandlung humaner Chondrozyten mit dem Extrakt demonstriert werden (Schulze-Tanzil et al 2002). Zum Wirkmechanismus von Weidenrindenextrakt liegen noch nicht so viele Details zum Wirkmechanismus vor. Neben der Hemmung der über den COX-2-Weg mit LPS stimulierten Prostaglandine fand sich vor allem eine Hemmung der stimulierten Interleukin-1 $\beta$ -Produktion (Fiebich und Chrubasik 2004). Gemessen an der Tagesdosis entsprachen die gemessenen COX-2  $IC_{50}$ -Werte von 31 mg/ml (Extrakt) und 0,07 mg/ml (Rofecoxib) etwa den Tagesdosen von 1356 mg Extrakt und 12,6 mg Rofecoxib.

Unser Ergebnis zeigt, dass der Weidenrindenextrakt bei den bovinen Knorpelzellen nicht nur die stimulierte Cyclooxygenase sondern auch die stimulierte Proteoglykansynthese hemmte, so dass auch für Weidenrindenextrakt eine knorpelprotektive Wirkung vermutet werden kann.

Auch Ingwerextrakt hemmte die stimulierte  $TNF\alpha$  und COX-2 Expression und damit die Freisetzung von  $TNF\alpha$  und  $PGE_2$ .

Die Zytokinhemmung erfolgte ebenfalls durch Hemmung von  $NF\kappa b$  bzw. Induktion des hemmenden Proteins  $I\kappa B-\alpha$  im Modell des menschlichen Synoviozyten (Frondoza et al 2004). Eine TIMP-2 Hochregulation sowie eine Hemmung von MMP-1, -3 und -13 Expression sowie eine Hemmung der stimulierten IL1 $\beta$ ,  $PGE_2$  und NO-Freisetzung wurde für ein Präparat aus verschiedenen Pflanzen kürzlich beschrieben (Park et al 2005).

Eine Beurteilung der Evidenz zur Wirksamkeit bei OA zu Präparaten aus den in Tabelle 27 genannten Pflanzenteilen ergab, dass eine gute Evidenz für Teufelskrallenwurzel und die nicht-verseifbare Fraktion aus Avocado-Soja (2/3 – 1/3) vorliegt, eine mäßige Evidenz zu Ingwer und Hagebutte, eine schlechte Evidenz zu Weihrauch und eine widersprüchliche Evidenz zur Weidenrinde (Tabelle 28). Obwohl die 2004 publizierte Studie von Biegert et al qualitativ sehr gut war, ist sie nicht frei von einem Bias (die Transparenz zur Vergleichbarkeit der Gruppen ist ungenügend, zumindest bezüglich der Anzahl der Hüftpatienten die besser auf eine Therapie ansprechen als Kniepatienten (Chrubasik und Black 2004), war die Weidengruppe im Vergleich zur Placebo- bzw. Diclofenac-Gruppe benachteiligt), so dass eine weitere konfirmative Studie mit Weidenrindenextrakt zur bestehenden Evidenzlage (eine konfirmative Studie mit sehr gutem Resultat, eine konfirmative Studie mit negativem Resultat bei möglicher Bias, zwei explorative Studien guter Qualität) durchgeführt werden muss.

Tabelle 27

Pharmakologische Wirkungen verschiedener Pflanzenpräparate, die bei der Behandlung der OA eingesetzt werden

nb= nicht bestimmt

	Hemmung von					Antioxidative
	COX-1	COX-2	LOX	Zytokinen	Elastase	Wirkung
<b>Teufelskrallenwurzel</b>	nein	Ja	ja	ja	ja	ja
<b>Weidenrinde</b>	nein	Ja	ja	ja	nb	ja
<b>Brennnesselblätter</b>	nb	Ja	ja	ja	nb	ja
<b>Avocado-Soja-Fraktion</b>	nb	Ja	nb	ja	ja	nb
<b>Hagebutte</b>	nb	nb	nb	nb	nb	nb
<b>Ingwer</b>	ja	Ja	nb	ja	nb	ja
<b>Weihrauch</b>	nein	nein	ja	nb	nb	nb
<b>Katzenkrallen</b>	evtl	evtl	nb	ja	nb	ja
<b>Samenöle mit GLA</b>	ja	evtl	ja	ja	nb	nb

Tabelle 28

Anzahl systematischer Reviews zur Wirksamkeit pflanzlicher Entzündungshemmer bei schmerzhafter Arthrose und Rückenschmerzen

	Anzahl	Literatur	Evidenz
<b>Teufelskrallenwurzel</b>	3	Chrubasik et al 2003a Chrubasik et al 2004 Gagnier et al 2004	gut
<b>Avocado-Soja-Fraktion</b>	1	Ernst 2003	gut
<b>Hagebutte</b>	1	Chrubasik et al 2006	mässig
<b>Ingwer</b>	1	Chrubasik et al 2005b	mässig
<b>Weihrauch</b>	1	Basch et al 2004	mässig
<b>Verschiedene Präparate</b>	5	Ernst und Chrubasik 2000 Little und Parsons 2001 Long et al 2001 Soeken 2004 Setty und Sigal 2005	schlecht bis mässig

Zusammenfassend ergibt sich, dass Pflanzenextrakte, inklusive der aus *Harpagophytum procumbens* gewonnenen Extrakte, eine antientzündliche Wirkung *in vitro* und im Tiermodell besitzen, die die klinisch beobachtete antiarthrotische Wirkung (Chrubasik et al 1996, 1999, 2002b, 2003b, 2005a) auch anhand einzelner molekularer Marker untermauern.

## 6. Zusammenfassung / Summary

### Zusammenfassung

Präparate aus der Teufelskralle werden seit mehr als 50 Jahren von der Bevölkerung zur Behandlung bei rheumatischen Beschwerden genutzt. Inzwischen belegen klinische Studien eine gute klinische Evidenz der Wirksamkeit und Verträglichkeit von *Harpagophytum procumbens*. *In-vitro*-Untersuchungen weisen darauf hin, dass die Wirkbestandteile der Teufelskrallenwurzel Botenstoffe der Entzündung und Knorpelzerstörung hemmen.

Um nachweisen zu können, ob die *In-vitro*-Untersuchungen ein Surrogat-Marker für eine knorpelprotektive Wirkung sind, wurde in einem Osteoarthritis-Modell beim Kaninchen ein *Harpagophytum*-Spezialextrakt über die Dauer von 6 Monaten mit dem Futter verabreicht. Ziel dieser Untersuchung war es, (1) histologisch Hüftknorpelgewebe von mit *Harpagophytum*-Extrakt behandelten, an einer Hüfte operierten Kaninchen mit Hüftknorpelgewebe mit dem unbehandelten operierten Tiere zu vergleichen, (2) das Hüftknorpelgewebe der beiden Kaninchengruppen molekularbiologisch mittels spezifisch für Kaninchen-RNA konstruierter Primer matrix-umbauender Gene zu untersuchen und (3) die Wirkung von Teufelskrallenwurzel und Weidenrindenextrakt auf die stimulierte Expression von Entzündungsmediatoren in bovinen und humanen Chondrozytenkulturen zu bestimmen.

Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen einen Trend zur chondroiden Regeneration im Hüftknorpel der operierten Seite bei den mit *Harpagophytum procumbens* behandelten Kaninchen (verminderte Zellzahl, vermehrte Farbintensität des Zytoplasmas (stärkere Basophilie) als unspezifischer Ausdruck eines erhöhten Stoffwechsels wie bei chondroider Regeneration) in den histologischen Schnitten. Bei der Elastika—Färbung war die stärkere Farbintensität des Zytoplasmas des rechten Hüftknorpels (operierte Extremität) bei den mit *Harpagophytum* behandelten Kaninchen statistisch signifikant zum linken Hüftknorpel und zur nicht operierten Seite der Kontrolltiere. Im Einklang damit steht eine vermehrte Expression des Inhibitors der knorpelzerstörenden Metalloproteinasen (TIMP-2) bei zwei der mit *Harpagophytum procumbens* behandelten Kaninchen. Alle anderen untersuchten Moleküle wurden durch die *Harpagophytum*-Behandlung in ihrer Genexpression nicht verändert.

In unseren bovinen Zellkulturen beeinflusste *Harpagophytum procumbens* die stimulierte Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Synthese - vermutlich aufgrund von Verunreinigungen des Extraktes - nicht, da der bekannte Effekt auf die Zyklusoxxygenase in diesem Modell nicht nachgewiesen werden konnte, wohl aber eine Stimulierung der schädlichen Stickoxid-Produktion. Der untersuchte Weidenrindenextrakt hemmte dagegen in den bovinen Knorpelzellen die stimulierte

Prostaglandin-E<sub>2</sub>-Synthese, was im Einklang mit der bekannten COX-2-Hemmung steht. Die Stickoxid-Synthese wurde auch hier nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse der Experimente unterstützen somit die Hypothese, dass *Harpagophytum procumbens* eine knorpelprotektive Wirkung ähnlich der moderner Antirheumatika besitzt, die über Effektormoleküle der Matrixsynthese vermittelt wird.

## Summary

Since more than 50 years, *Harpagophytum procumbens* is used by the population for the treatment of rheumatic symptoms. In the meantime, clinical trials have confirmed the effectiveness and tolerability of *Harpagophytum procumbens*. *In-vitro* experiments indicate that ingredients of the root of *Harpagophytum procumbens* inhibit mediators of inflammation and cartilage destruction.

In order to see, whether the *in-vitro* data may reflect cartilage protection *in vivo*, we used an animal model of osteoarthritis to assess the effectiveness of *Harpagophytum* extract following joint destabilization of the right knee. The *Harpagophytum* extract was administered with the food for six months post injury. The aim of the study was (1) to assess, whether hip cartilage of rabbits treated with the *Harpagophytum* extract differed from that of untreated rabbits, (2) to use molecular biological analyses using specific primers for REAL-Time PCR for matrix-remodelling genes designed for rabbit RNA and (3) to investigate the effect of *Harpagophytum* and *Salix* extracts on the stimulated expression of inflammatory mediators in bovine and human chondrocyte cultures.

The results of the experiments demonstrate a trend towards chondroid regeneration of hip cartilage of the operated limb in rabbits treated with *Harpagophytum* extract with regard to decreased cell numbers and increased staining intensity of cytoplasm as unspecific equivalent of increased metabolism. In the Elastica staining, the increase in intensity of the cytoplasm staining was significantly different in the cartilage of the operated limb versus the non-operated limb of the rabbits treated with *Harpagophytum* extract and versus the non-operated limb of the control group. In accordance with this finding, expression of the inhibitor of the cartilage-degrading metalloproteinases (TIMP-2) was increased in rabbits treated with the *Harpagophytum* extract.

In the bovine cell cultures *Harpagophytum procumbens* showed no impact on the stimulated synthesis of postaglandin-E<sub>2</sub> – probably due to contamination, because we were not able to demonstrate the scientifically proven effect on cyclooxygenase but we found an increase of toxic nitric oxide production. In contrast, the *Salix* extract inhibited the synthesis of postaglandin-E<sub>2</sub>, which is in accordance with the COX-2 inhibition. In contrast, nitric oxide synthesis remained unaffected.

In summary, our results support the hypothesis of a cartilage-protective effect of *Harpagophytum procumbens* similar to that of modern antirheumatics by inhibiting the mediators of cartilage destruction.

## 7. Literatur

Ahlbäck S (1968). Osteoarthritis of the knee. A radiographic investigation. *Acta Radiol Diagn (Stockh): Suppl 277:7-72.*

Aho K, Koskenvuo M, Tuominen J, Kaprio J (1986) Occurrence of rheumatoid arthritis in a nationwide series of twins. *J Rheumatol 13(5): 899-902.*

Altman RD (1991) Criteria for classification of clinical osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl 27: 10-2.*

Altman RD, Tenenbaum J, Latta L, Riskin W, Blanco LN, Howell DS (1984) Biomechanical and biochemical properties of dog cartilage in experimentally induced osteoarthritis. *Ann Rheum Dis 43(1): 83-90.*

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res 25(17):3389-402. Review.*

American Academy of Pain Medicine and American Pain Society (1997) The use of opioids for the treatment of chronic pain. Glenview (IL): American Academy of Pain Medicine and American Pain Society.

Andersen ML, Santos EH, Seabra Mde L, da Silva AA, Tufik S (2004) Evaluation of acute and chronic treatments with *Harpagophytum procumbens* on Freund's adjuvant-induced arthritis in rats. *J Ethnopharmacol 91(2-3): 325-30.*

Anderson JJ und Felson DT (1988) Factors associated with osteoarthritis of the knee in the first national Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). Evidence for an association with overweight, race, and physical demands of work. *Am J Epidemiol 128(1): 179-89.*

Arrich J, Piribauer F, Mad P, Schmid D, Klaushofer K, Mullner M (2005) Intra-articular hyaluronic acid for the treatment of osteoarthritis of the knee: systematic review and meta-analysis. *CMAJ 172(8): 1039-43. Review.*

Athanasou NA (1995) Synovial macrophages. *Ann Rheum Dis* 54(5): 392-4.

Aydelotte MB, Greenhill RR, Kuettner KE (1988) Differences between sub-populations of cultured bovine articular chondrocytes. II. Proteoglycan metabolism. *Connect Tissue Res* 18(3): 223-34.

Barland P, Novikoff AB, Hamerman D (1962) Electron microscopy of the human synovial membrane. *J Cell Biol* 14: 207-20.

Basch E, Boon H, Davies-Heerema T, Foppo I, Hashmi S, Hasskarl J, Sollars D, Ulbricht C. *Boswellia* (2004) an evidence-based systematic review by the Natural Standard Research Collaboration. *J Herb Pharmacother* 4: 63-83.

Benito PB, Diaz Lanza AM, Silvan Sen AM, De Santos Galindez J, Matellano LF, Sanz Gomez A, Abad Martinez MJ (2000) Effects of some iridoids from plant origin on arachidonic acid metabolism in cellular systems. *Planta Med* 66:324-8.

Benninghoff (1994) *Anatomie, U&S*, München, Wien, Baltimore.

Berkanovic E, Oster P, Wong WK, Bulpitt K, Clements P, Sterz M, Paulus H (1996). The relationship between socioeconomic status and recently diagnosed rheumatoid arthritis. *Arthritis Care Res* 9(6): 257-62.

Betancor-Fernandez A, Perez-Galvez A, Sies H, Stahl W (2003) Screening pharmaceutical preparations containing extracts of turmeric rhizome, artichoke leaf, devil's claw root and garlic or salmon oil for antioxidant capacity. *J Pharm Pharmacol* 55(7): 981-6.

Biegert C, Wagner I, Ludtke R, Kotter I, Lohmuller C, Gunaydin I, Taxis K, Heide L (2004) Efficacy and safety of willow bark extract in the treatment of osteoarthritis and rheumatoid arthritis: results of 2 randomized double-blind controlled trials. *J Rheumatol* 31(11): 2121-30.

Blasi F, Vassalli JD, Dano K (1987) Urokinase-type plasminogen activator: proenzyme, receptor, and inhibitors. *J Cell Biol* 104(4): 801-4.

Blumenfeld I, Laufer D, Livne E (1997) Effects of transforming growth factor-beta 1 and interleukin-1 alpha on matrix synthesis in osteoarthritic cartilage of the temporo-mandibular joint in aged mice. *Mech Ageing Dev* 95(1-2): 101-11.

Boje K, Lechtenberg M, Nahrstedt A (2003) New and known iridoid- and phenylethanoid glycosides from *Harpagophytum procumbens* and their in vitro inhibition of human leukocyte elastase. *Planta Med* 69(9): 820-5.

Bond JS und Butler PE (1987) Intracellular proteases. *Annu Rev Biochem* 56: 333-64.

Boniface RJ, Cain PR, Evans CH (1988) Articular responses to purified cartilage proteoglycans. *Arthritis Rheum* 31(2): 258-66.

Bradley H, Waring Rh, Emery P, Arthur V (1991) Metabolism of low-dose paracetamol in patients with rheumatoid arthritis. *Xenobiotica* 21(5): 689-93.

Brighton CT, Kitajima T, Hunt RM (1984) Zonal analysis of cytoplasmic components of articular cartilage chondrocytes. *Arthritis Rheum* 27(11): 1290-9.

Bromme D und Kaleta J (2002) Thiol-dependent cathepsins: pathophysiological implications and recent advances in inhibitor design. *Curr Pharm Des* 8(18): 1639-58.

Broom ND (1982) Abnormal softening in articular cartilage: its relationship to the collagen framework. *Arthritis Rheum* 25(10): 1209-16.

Broom ND (1986) The collagenous architecture of articular cartilage--a synthesis of ultrastructure and mechanical function. *J Rheumatol* 13(1): 142-52.

Broom Nd and Marra Dl (1985). New structural concepts of articular cartilage demonstrated with a physical model. *Connect Tissue Res* 14(1): 1-8.

Bruns J, Kersten P, Lierse W, Silbermann M (1992) Autologous rib perichondrial grafts in experimentally induced osteochondral lesions in the sheep-knee joint: morphological results. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 421(1): 1-8.

Buckwalter JA und Mankin HJ (1997) Instructional Course Lectures, The American Academy of Orthopaedic Surgeons - Articular Cartilage. Part II: Degeneration and Osteoarthritis, Repair, Regeneration, and Transplantation. *J Bone Joint Surg Am* 79: 612-32.

Burr DB, Milgrom C, Fyhrie D, Forwood M, Nyska M, Finestone A, Hoshaw S, Saiag E, Simkin A (1996) In vivo measurement of human tibial strains during vigorous activity. *Bone* 18(5): 405-10.

Callahan LF und Pincus T (1988) Formal education level as a significant marker of clinical status in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 31(11): 1346-57.

Cameron HU und Dewar FP (1977) Degenerative osteoarthritis associated with osteopetrosis. *Clin Orthop*(127): 148-9.

Carney SL, Billingham ME, Muir H, Sandy JD (1985) Structure of newly synthesised (35S)-proteoglycans and (35S)-proteoglycan turnover products of cartilage explant cultures from dogs with experimental osteoarthritis. *J Orthop Res* 3(2): 140-7.

Carvalho HF, Felisbino SL, Covizi DZ, Della Colleta HH, Gomes L (2000) Structure and proteoglycan composition of specialized regions of the elastic tendon of the chicken wing. *Cell Tissue Res* 300(3): 435-46.

Cavaillon JM (1993) Contribution of cytokines to inflammatory mechanisms. *Pathol Biol (Paris)* 41(8 Pt 2): 799-811.

Cheng Y, Macera Ca, Davis Dr, Ainsworth Be, Troped Pj, Blair Sn (2000) Physical activity and self-reported, physician-diagnosed osteoarthritis: is physical activity a risk factor?" *J Clin Epidemiol* 53(3): 315-22.

Chrubasik S und Eisenberg E (1999) Treatment of rheumatic pain with kampo medicine in Europe. Part I. *Harpagophytum*. *The Pain Clinic* 11: 171-8.

Chrubasik S und Roufogalis B (2003) Bioequivalence of herbal medicines. *New Zealand J Pharm* 53: 39-44.

Chrubasik S und Black A (2004) Difference in treatment response of osteoarthritic pain in the hip and knee. *Clin Rheumatol* 23(3): 274.

Chrubasik S, Zimpfer CH, Schütt M, Ziegler R (1996) Effectiveness of *Harpagophytum procumbens* in treatment of acute low back pain. *Phytomedicine* 3: 1-10.

Chrubasik S, Junck H, Breitschwerdt H, Conradt C, Zappe H (1999) Effectiveness of *Harpagophytum* extract WS 1531 in the treatment of exacerbation of low back pain: a randomized placebo-controlled double-blind study. *European Journal of Anaesthesiology* 16: 118-129.

Chrubasik S, Eisenberg E, Balan E, Weinberger T, Luzzati R, Conradt C (2000) Treatment of low back pain exacerbations with willow bark extract: a randomized double-blind study. *Am J Med* 109(1):9-14.

Chrubasik S, Fiebich B, Black A and Pollak S (2002a) Treating low back pain with an extract of *Harpagophytum* that inhibits cytokine release. *European Journal of Anaesthesiology* 19: 209.

Chrubasik S, Thanner J, Künzel O, Conradt C, Black A, Pollak S (2002b) Comparison of outcome measures during treatment with Doloteffin<sup>R</sup>. *Phytomedicine* 9: 181-94.

Chrubasik S, Conradt C, Black A (2003a) The quality of clinical trials with *Harpagophytum procumbens*. *Phytomedicine* 10: 613-23.

Chrubasik S, Model A, Black A, Pollak S (2003b) A randomized double-blind pilot study comparing Doloteffin and Vioxx in the treatment of low back pain. *Rheumatology* 42: 141-48.

Chrubasik S, Conradt C, Roufogalis BD (2004) Effectiveness of *Harpagophytum* extracts and clinical efficacy. *Phytother Res* 18:187-9.

Chrubasik S, Künzel O, Thanner J, Conradt C, Black A (2005a) A one-year follow-up after a pilot study with Doloteffin<sup>R</sup> for low back pain. *Phytomedicine* 11:470-77.

Chrubasik S, Pittler M, Roufogalis B (2005b) *Zingiberis rhizoma*: A comprehensive review on the ginger effect and efficacy profiles. *Phytomedicine* 12:684-701.

Chrubasik C, Duke RK, Chrubasik S (2006) Evidence of effectiveness for rose hip and seed: A systematic review. *Phytother Res.*

Clark JM (1985) The organization of collagen in cryofractured rabbit articular cartilage: a scanning electron microscopic study. *J Orthop Res* 3(1): 17-29.

Clarke Ic (1971) Articular cartilage: a review and scanning electron microscope study. 1. The interterritorial fibrillar architecture. *J Bone Joint Surg Br* 53(4): 732-50.

Clemett D und Goa KL (2000) Celecoxib: a review of its use in osteoarthritis, rheumatoid arthritis and acute pain. *Drugs* 59(4): 957-80. Review.

Collier IE, Bruns GA, Goldberg GI, Gerhard DS (1991) On the structure and chromosome location of the 72- and 92-kDa human type IV collagenase genes. *Genomics* 9(3): 429-34.

Cooke Td (1985) Pathogenetic mechanisms in polyarticular osteoarthritis. *Clin Rheum Dis* 11(2): 203-38.

Cooper C, Mcalindon T, Snow S, Vines K, Young P, Kirwan J, Dieppe P (1994) Mechanical and constitutional risk factors for symptomatic knee osteoarthritis: differences between medial tibiofemoral and patellofemoral disease. *J Rheumatol* 21(2): 307-13.

Cooper C, Snow S, Mcalindon Te, Kellingray S, Stuart B, Coggon D, Dieppe Pa (2000) Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 43(5): 995-1000.

Cremer MA, Rosloniec EF, Kang AH (1998) The cartilage collagens: a review of their structure, organization, and role in the pathogenesis of experimental arthritis in animals and in human rheumatic disease. *J Mol Med* 76(3-4): 275-88.

- Croft P, Cooper C, Wickham C, Coggon D (1990) Defining osteoarthritis of the hip for epidemiologic studies. *Am J Epidemiol* 132(3): 514-22.
- Cua Dj, Sherlock J, Chen Y, Murphy Ca, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira Sa, Gorman D, Kastelein Ra, Sedgwick Jd (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421(6924): 744-8.
- Dalgin P und die TPS-OA Study Group (1997) Comparison of tramadol and ibuprofen for the chronic pain of osteoarthritis [abstract]. *Arthritis Rheum* 40 Suppl 1: 5-7.
- Davis Ma, Ettinger Wh, Neuhaus Jm (1990) Obesity and osteoarthritis of the knee: evidence from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES I). *Semin Arthritis Rheum* 20(3 Suppl 1): 34-41.
- Davis Ma, Ettinger Wh, Neuhaus Jm, Mallon Kp (1991) Knee osteoarthritis and physical functioning: evidence from the NHANES I Epidemiologic Followup Study. *J Rheumatol* 18(4): 591-8.
- Dedrick DK, Goldstein SA, Brandt KD, O'Connor BL, Goulet RW, Albrecht M (1993) A longitudinal study of subchondral plate and trabecular bone in cruciate-deficient dogs with osteoarthritis followed up for 54 months. *Arthritis Rheum* 36(10): 1460-7.
- Den Broeder AA, de Jong E, Franssen MJ, Jeurissen ME, Flendrie M, van den Hoogen FH (2005) Observational study on efficacy, safety and drug- survival of anakinra in RA patients in clinical practice. *Ann Rheum Dis* [Epub ahead of print].
- Dequeker J (1999) The inverse relationship between osteoporosis and osteoarthritis. *Adv Exp Med Biol* 455: 419-22.
- Dingle Jt (1962) Aetiological factors in the collagen diseases. Lysosomal enzymes and the degradation of cartilage matrix. *Proc R Soc Med* 55: 109-11.

Docherty Aj und Murphy G (1990) The tissue metalloproteinase family and the inhibitor TIMP: a study using cDNAs and recombinant proteins. *Ann Rheum Dis* 49(1): 469-79.

Eccles M, Freemantle N, Mason J (1998) North of England evidence based guideline development project: summary guideline for non-steroidal anti-inflammatory drugs versus basic analgesia in treating the pain of degenerative arthritis. The North of England Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drug Guideline Development Group. *Bmj* 317(7157): 526-30.

Egglis PS, Hunziker EB, Schenk RK (1988) Quantitation of structural features characterizing weight- and less-weight-bearing regions in articular cartilage: a stereological analysis of medial femoral condyles in young adult rabbits. *Anat Rec* 222(3): 217-27.

Ekstrom P, Carling L, Wetterhus S, Wingren PE, Anker-Hansen O, Lundegardh G, Thorhallsson E, Unge P (1996) Prevention of peptic ulcer and dyspeptic symptoms with omeprazole in patients receiving continuous non-steroidal anti-inflammatory drug therapy. A Nordic multicentre study. *Scand J Gastroenterol* 31(8): 753-8.

Ekstrom P, Carling L, Wetterhus S, Wingren PE, Anker-Hansen O, Lundegardh G, Thorhallsson E, Unge P (1996) Prevention of peptic ulcer and dyspeptic symptoms with omeprazole in patients receiving continuous non-steroidal anti-inflammatory drug therapy. A Nordic multicentre study. *Scand J Gastroenterol* 31(8): 753-8.

Ernst E (2003) Avocado-soybean unsaponifiables (ASU) for osteoarthritis - a systematic review. *Clin Rheumatol* 22(4-5): 285-8.

Ernst E und Chrubasik S (2000) Phyto-anti-inflammatories. A systematic review of randomized, placebo-controlled, double-blind trials. *Rheum Dis Clin North Am* 26:13-27.

Ettinger Wh, Jr., Burns R, Messier Sp, Applegate W, Rejeski Wj, Morgan T, Shumaker S, Berry Mj, O'toole M, Monu J, Craven T (1997) A randomized trial comparing aerobic exercise and resistance exercise with a health education program in older adults with knee osteoarthritis. The Fitness Arthritis and Seniors Trial (FAST). *Jama* 277(1): 25-31.

Evans Ch (1995) Nitric oxide: what role does it play in inflammation and tissue destruction?" Agents Actions Suppl 47: 107-16.

Eyre DR (1991) The collagens of articular cartilage. Semin Arthritis Rheum 21(3 Suppl 2): 2-11.

Faller-Marquardt und Chrubasik 2002, personal communication.

Fassbender HG (1983) The significance of inflammatory processes in osteoarthritis. Z Rheumatol 42(4): 145-52.

Fassler R, Schnegelsberg PN, Dausman J, Shinya T, Muragaki Y, McCarthy MT, Olsen BR, Jaenisch R (1994) Mice lacking alpha 1 (IX) collagen develop noninflammatory degenerative joint disease. Proc Natl Acad Sci U S A 91(11): 5070-4.

Felson Dt (1992) Obesity and osteoarthritis of the knee. Bull Rheum Dis 41(2): 6-7.

Felson Dt, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan Rf (1987) The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. Arthritis Rheum 30(8): 914-8.

Felson Dt, Anderson Jj, Naimark A, Walker Am, Meenan Rf (1988) Obesity and knee osteoarthritis. The Framingham Study. Ann Intern Med 109(1): 18-24.

Felson Dt, Anderson Jj, Naimark A, Hannan Mt, Kannel Wb, Meenan Rf (1989) Does smoking protect against osteoarthritis? Arthritis Rheum 32(2): 166-72.

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP (2002) The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. Biorheology 39(1-2): 237-46.

Fiebich Bl und Chrubasik S (2004) Effects of an ethanolic salix extract on the release of selected inflammatory mediators in vitro. Phytomedicine 11(2-3): 135-8.

Fiebich Bl, Heinrich M, Hiller Ko, Kammerer N (2001) Inhibition of TNF-alpha synthesis in LPS-stimulated primary human monocytes by Harpagophytum extract SteiHap 69. Phytomedicine 8(1): 28-30.

Fitzmaurice Da und Murray Ja (1997) Potentiation of the anticoagulant effect of warfarin. *Postgrad Med J* 73(861): 439-40.

Flannery CR, Little CB, Hughes CE, Curtis CL, Caterson B, Jones SA (2000) IL-6 and its soluble receptor augment aggrecanase-mediated proteoglycan catabolism in articular cartilage. *Matrix Biol* 19(6): 549-53.

Flynn MA, Irvin W, Krause G (1994) The effect of folate and cobalamin on osteoarthritic hands. *J Am Coll Nutr* 13(4): 351-6.

Fontaine J, Elchami Aa, Vanhaelen M, Vanhaelen-Fastre R (1981) Biological analysis of *Harpagophytum procumbens* D.C. II. Pharmacological analysis of the effects of harpagoside, harpagide and harpagogenine on the isolated guinea-pig ileum (author's transl). *J Pharm Belg* 36(5): 321-4.

Frondoza Cg, Sohrabi A, Polotsky A, Phan Pv, Hungerford Ds, Lindmark L (2004) An in vitro screening assay for inhibitors of proinflammatory mediators in herbal extracts using human synoviocyte cultures. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 40(3-4): 95-101.

Gagnier JJ, Chrubasik S, Manheimer E (2004) *Harpagophytum procumbens* for osteoarthritis and low back pain: a systematic review *BMC Complement Altern Med* 4: 13.

Garbisa S, Liotta LA, Tryggvason K, Siegal GP (1981) Antibodies to collagenase-resistant terminal regions of pro-type IV collagen recognize whole basement membrane and 7 S collagen. *FEBS Lett* 127(2): 257-62.

Genevay S, Di Giovine Fs, Perneger Tv, Silvestri T, Stingelin S, Duff G, Guerne Pa (2002) Association of interleukin-4 and interleukin-1B gene variants with Larsen score progression in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 47(3): 303-9.

Gerlach 2002, personal communication.

Ghosh P (1994) The role of hyaluronic acid (hyaluronan) in health and disease: interactions with cells, cartilage and components of synovial fluid. *Clin Exp Rheumatol* 12(1): 75-82.

Glant TT, Hadhazy C, Mikecz K, Sipos A (1985) Appearance and persistence of fibronectin in cartilage. Specific interaction of fibronectin with collagen type II. *Histochemistry* 82(2): 149-58.

Goldwasser M, Astley T, van der Rest M, Glorieux FH (1982) Analysis of the type of collagen present in osteoarthritic human cartilage. *Clin Orthop*(167): 296-302.

Gregersen Pk, Silver J, Winchester Rj (1987) The shared epitope hypothesis. An approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 30(11): 1205-13.

Greisen Ha, Summers Ba, Lust G (1982) Ultrastructure of the articular cartilage and synovium in the early stages of degenerative joint disease in canine hip joints. *Am J Vet Res* 43(11): 1963-71.

Griffin MR, Ray WA, Schaffner W (1988) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and death from peptic ulcer in elderly persons. *Ann Intern Med* 109(5): 359-63.

Griffin MR, Piper JM, Daugherty JR, Snowden M, Ray WA (1991) Nonsteroidal anti-inflammatory drug use and increased risk for peptic ulcer disease in elderly persons. *Ann Intern Med* 114(4): 257-63.

Gruber HE und Hanley EN Jr (2002) Observations on morphologic changes in the aging and degenerating human disc: secondary collagen alterations. *BMC Musculoskelet Disord* 3(1): 9.

Grundmann E (1994) *Allgemeine Pathologie*, Fischer-Verlag, Stuttgart.

Guerne PA, Desgeorges A, Jaspard JM, Relic B, Peter R, Hoffmeyer P, Dayer JM (1999) Effects of IL-6 and its soluble receptor on proteoglycan synthesis and NO release by human articular chondrocytes: comparison with IL-1. Modulation by dexamethasone. *Matrix Biol* 18(3): 253-60.

Guilak F (1995) Compression-induced changes in the shape and volume of the chondrocyte nucleus. *J Biomech* 28(12): 1529-41.

Hannan MT, Felson DT, Anderson JJ, Naimark A, Kannel WB (1990) Estrogen use and radiographic osteoarthritis of the knee in women. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 33(4): 525-32.

Hardingham TE und Fosang AJ (1992) Proteoglycans: many forms and many functions. *Faseb J* 6(3): 861-70.

Hardy MM, Seibert K, Manning PT, Currie MG, Woerner BM, Edwards D, Koki A, Tripp CS (2002) Cyclooxygenase 2-dependent prostaglandin E2 modulates cartilage proteoglycan degradation in human osteoarthritis explants. *Arthritis Rheum* 46(7): 1789-803.

Hart Dj und Spector Td (1993a) The relationship of obesity, fat distribution and osteoarthritis in women in the general population: the Chingford Study. *J Rheumatol* 20(2): 331-5.

Hart Dj und Spector Td (1993b) Cigarette smoking and risk of osteoarthritis in women in the general population: the Chingford study. *Ann Rheum Dis* 52(2): 93-6.

Hascall VC und Kimura JH (1982) Proteoglycans: isolation and characterization. *Methods Enzymol* 82 Pt A: 769-800.

Hashimoto G, Aoki T, Nakamura H, Tanzawa K, Okada Y (2001) Inhibition of ADAMTS4 (aggrecanase-1) by tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, 2, 3 and 4). *FEBS Lett* 13;494(3): 192-5.

Hasty KA, Hibbs MS, Kang AH, Mainardi CL (1986) Secreted forms of human neutrophil collagenase. *J Biol Chem* 261(12): 5645-50.

Hasty KA, Reife RA, Kang AH, Stuart JM (1990) The role of stromelysin in the cartilage destruction that accompanies inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 33(3): 388-97.

Heine J (1926) Über die Arthritis Deformans. *Arch Path Anat* 260: 521.

Heinegard D und Axelsson I (1977) Distribution of keratan sulfate in cartilage proteoglycans. *J Biol Chem* 25; 252(6): 1971-9.

Heinegard D und Oldberg A (1989) Structure and biology of cartilage and bone matrix noncollagenous macromolecules. *Faseb J* 3(9): 2042-51.

Henrich Wl, Agodoa Le, Barrett B, Bennett Wm, Blantz Rc, Buckalew Vm, Jr., D'agati Vd, Debroe Me, Duggin Gg, Eknayan G (1996) Analgesics and the kidney: summary and recommendations to the Scientific Advisory Board of the National Kidney Foundation from an Ad Hoc Committee of the National Kidney Foundation. *Am J Kidney Dis* 27(1): 162-5.

Hernandez-Avila M, Liang MH, Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner B, Roberts WN, Hennekens CH, Speizer FE (1990) Reproductive factors, smoking, and the risk for rheumatoid arthritis. *Epidemiology* 1(4): 285-91.

Hewicker-Trautwein M, Carter SD, Bennett D, Kelly DF (1999) Immunocytochemical demonstration of lymphocyte subsets and MHC class II antigen expression in synovial membranes from dogs with rheumatoid arthritis and degenerative joint disease. *Vet Immunol Immunopathol* 67(4): 341-57.

Hochberg Mc, Altman Rd, Brandt Kd, Clark Bm, Dieppe Pa, Griffin Mr, Moskowitz Rw, Schnitzer Tj (1995a) Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part I. Osteoarthritis of the hip. American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum* 38(11): 1535-40.

Hochberg Mc, Altman Rd, Brandt Kd, Clark Bm, Dieppe Pa, Griffin Mr, Moskowitz Rw, Schnitzer Tj (1995b) Guidelines for the medical management of osteoarthritis. Part II. Osteoarthritis of the knee. American College of Rheumatology. *Arthritis Rheum* 38(11): 1541-6.

Horwitz Al, Hance Aj, Crystal Rg (1977) Granulocyte collagenase: selective digestion of type I relative to type III collagen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74(3): 897-901.

Huang Th, Tran Vh, Duke Rk, Tan S, Chrubasik S, Roufogalis Bd, Duke Cc (2005) Harpagoside suppresses lipopolysaccharide-induced iNOS and COX-2 expression through inhibition of NF-kappaB activation. *J Ethnopharmacol*. [Epub ahead of print].

Hurley Mv (1999) The role of muscle weakness in the pathogenesis of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 25(2): 283-98, vi.

Hurley Mv und Scott DI (1998) Improvements in quadriceps sensorimotor function and disability of patients with knee osteoarthritis following a clinically practicable exercise regime. *Br J Rheumatol* 37(11): 1181-7.

Hylek EM, Heiman H, Skates SJ, Sheehan MA, Singer DE (1998) Acetaminophen and other risk factors for excessive warfarin anticoagulation. *JAMA* 279(9): 657-62.

Iannone F, De Bari C, Dell'Accio F, Covelli M, Cantatore FP, Patella V, Lo Bianco G, Lapadula G (2001) Interleukin-10 and interleukin-10 receptor in human osteoarthritic and healthy chondrocytes. *Clin Exp Rheumatol* 19(2): 139-45.

Ishiguro N, Ito T, Ito H, Iwata H, Jugessur H, Ionescu M, Poole AR (1999) Relationship of matrix metalloproteinases and their inhibitors to cartilage proteoglycan and collagen turnover: analyses of synovial fluid from patients with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 42(1): 129-36.

Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K (2000) Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Arch Histol Cytol* 63(1): 17-31.

Jacques C, Sautet A, Moldovan M, Thomas B, Humbert L, Berenbaum F (1999) Cyclooxygenase activity in chondrocytes from osteoarthritic and healthy cartilage. *Rev Rhum Engl Ed* 66(12): 701-4.

Jadot G und Lecomte A (1992) Activite anti-inflammatoire d'*Harpagophytum procumbens* DC. *Lyon Mediterranee Medical Medicine du Sud-Est* 28: 833-5.

Jang Mh, Lim S, Han Sm, Park Hj, Shin I, Kim Jw, Kim Nj, Lee Js, Kim Ka, Kim Cj (2003) *Harpagophytum procumbens* suppresses lipopolysaccharide-stimulated expressions of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in fibroblast cell line L929. *J Pharmacol Sci* 93(3): 367-71.

Joosten La, Smeets RI, Koenders Mi, Van Den Bersselaar La, Helsen Mm, Oppers-Walgreen B, Lubberts E, Iwakura Y, Van De Loo Fa and Van Den Berg Wb (2004) Interleukin-18 promotes joint inflammation and induces interleukin-1-driven cartilage destruction. *Am J Pathol* 165(3): 959-67.

Kato T, Xiang Y, Nakamura H, Nishioka K (2004) Neoantigens in osteoarthritic cartilage. *Curr Opin Rheumatol* 16(5): 604-8.

Katunuma N, Matsunaga Y, Himeno K, Hayashi Y (2003) Insights into the roles of cathepsins in antigen processing and presentation revealed by specific inhibitors. *Biol Chem* 384(6): 883-90.

Kehlen A, Pachnio A, Thiele K, Langner J (2003) Gene expression induced by interleukin-17 in fibroblast-like synoviocytes of patients with rheumatoid arthritis: upregulation of hyaluronan-binding protein TSG-6. *Arthritis Res Ther* 5(4): R186-92.

Keiser HR und Sjoerdsma A (1969) Direct measurement of the rate of collagen synthesis in skin. *Clin Chim Acta* 23(2): 341-6.

Kellgren JH und Lawrence JS (1957) Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 16(4): 494-502.

Kellgren JH, Lawrence JS und Bier F (1963) Genetic Factors in Generalized Osteo-Arthritis. *Ann Rheum Dis* 22: 237-55.

Kielty CM, Whittaker SP, Grant ME, Shuttleworth CA (1992) Type VI collagen microfibrils: evidence for a structural association with hyaluronan. *J Cell Biol* 118(4): 979-90.

Kincaid SA und Van Sickle DC (1981) Regional histochemical and thickness variations of adult canine articular cartilage. *Am J Vet Res* 42(3): 428-32.

Kirwan JR und Rankin E (1997) Intra-articular therapy in osteoarthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 11(4): 769-94. Review.

- Komai-Koma M, Gracie Ja, Wei Xq, Xu D, Thomson N, Mcinnes Ib, Liew Fy (2003) Chemoattraction of human T cells by IL-18. *J Immunol* 170(2): 1084-90.
- Kraus Jf, D'ambrosia Rd, Smith Eg, Van Meter J, Borhani No, Franti Ce, Lipscomb Pr (1978) An epidemiological study of severe osteoarthritis. *Orthopedics* 1(1): 37-42.
- Lacey D, Sampey A, Mitchell R, Bucala R, Santos L, Leech M, Morand E (2003) Control of fibroblast-like synoviocyte proliferation by macrophage migration inhibitory factor. *Arthritis Rheum* 48(1): 103-9.
- Lack Ch (1962) Aetiological factors in the collagen diseases. Increased vascular permeability, chondrolysis and cortisone. *Proc R Soc Med* 55: 113-6.
- Lane Ne und Buckwalter Ja (1999) Exercise and osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 11(5): 413-6.
- Lanhers Mc, Fleurentin J, Mortier F, Vinche A, Younos C (1992) Anti-inflammatory and analgesic effects of an aqueous extract of *Harpagophytum procumbens*. *Planta Med* 58(2): 117-23.
- Lattanzio PJ, Marshall KW, Damyanovich AZ, Peemoeller H (2005) Characterization of proteoglycan depletion in articular cartilage using two-dimensional time domain nuclear magnetic resonance. *Magn Reson Med* 54(6): 1397-402.
- Leonhardt H (1990) *Histologie, Zytologie und Mikroanatomie des Menschen*. Thieme, Stuttgart Auflage: 8.
- Lindberg H und Montgomery F (1987) Heavy labor and the occurrence of gonarthrosis. *Clin Orthop Relat Res*(214): 235-6.
- Little CV und Parsons T (2001) Herbal therapy for treating osteoarthritis. *Cochrane Database Syst Rev* (1): CD002947.

Loeser RF (1997) Growth factor regulation of chondrocyte integrins. Differential effects of insulin-like growth factor 1 and transforming growth factor beta on alpha 1 beta 1 integrin expression and chondrocyte adhesion to type VI collagen. *Arthritis Rheum* 40(2): 270-6.

Loeser RF und Shanker G (2000) Autocrine stimulation by insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 2 mediates chondrocyte survival in vitro. *Arthritis Rheum* 43(7): 1552-9.

Loew D, Mollerfeld J, Schrodter A, Puttkammer S, Kaszkin M (2001) Investigations on the pharmacokinetic properties of Harpagophytum extracts and their effects on eicosanoid biosynthesis in vitro and ex vivo. *Clin Pharmacol Ther* 69(5): 356-64.

Long L, Soeken K, Ernst E (2001) Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systematic review. *Rheumatology (Oxford)* 40:7 79-93.

Lorenz H, Wenz W, Ivancic M, Steck E, Richter W (2005) Early and stable upregulation of collagen type II, collagen type I and YKL40 expression levels in cartilage during early experimental osteoarthritis occurs independent of joint location and histological grading. *Arthritis Res Ther* 7(1): R156-65.

Lotz M (1999) The role of nitric oxide in articular cartilage damage. *Rheum Dis Clin North Am* 25(2): 269-82.

Mankin HJ (1994) Chondrocyte transplantation--one answer to an old question. *N Engl J Med* 331(14): 940-1.

Maroudas AI (1976) Balance between swelling pressure and collagen tension in normal and degenerate cartilage. *Nature* 260(5554): 808-9.

Maroudas A, Bayliss MT, Venn MF (1980). Further studies on the composition of human femoral head cartilage. *Ann Rheum Dis* 39(5): 514-23.

Martel-Pelletier J (1999) Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7(4): 371-3.

Martel-Pelletier J, McCollum R, DiBattista J, Faure MP, Chin JA, Fournier S, Sarfati M, Pelletier JP (1992) The interleukin-1 receptor in normal and osteoarthritic human articular chondrocytes. Identification as the type I receptor and analysis of binding kinetics and biologic function. *Arthritis Rheum* 35(5): 530-40.

Mason RM (1981) Recent advances in the biochemistry of hyaluronic acid in cartilage. *Prog Clin Biol Res* 54: 87-112.

Matyas Jr, Huang D, Chung M, Adams ME (2002). Regional quantification of cartilage type II collagen and aggrecan messenger RNA in joints with early experimental osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 46(6): 1536-43.

Mayne R (1989) Cartilage collagens. What is their function, and are they involved in articular disease? *Arthritis Rheum* 32(3): 241-6. Review.

McAlindon TE, Wilson PW, Aliabadi P, Weissman B, Felson DT (1999) Level of physical activity and the risk of radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham study. *Am J Med* 106(2): 151-7.

McDevitt CA and Muir H (1976) Biochemical changes in the cartilage of the knee in experimental and natural osteoarthritis in the dog. *J Bone Joint Surg Br* 58(1): 94-101.

Melzig MF, Tran GD, Henke K, Selassie CD, Verma RP (2005) Inhibition of neutrophil elastase and thrombin activity by caffeic acid esters. *Pharmazie* 60(11): 869-73.

Miosge N, Flachsbart K, Goetz W, Schultz W, Kresse H, Herken R (1994) Light and electron microscopical immunohistochemical localization of the small proteoglycan core proteins decorin and biglycan in human knee joint cartilage. *Histochem J* 26(12): 939-45.

Miosge N, Waletzko K, Bode C, Quondamatteo F, Schultz W, Herken R (1998) Light and electron microscopic in-situ hybridization of collagen type I and type II mRNA in the fibrocartilaginous tissue of late-stage osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 6(4): 278-85.

Miossec P (2004) IL-17 in rheumatoid arthritis: a new target for treatment or just another cytokine? *Joint Bone Spine* 71(2): 87-90.

Moller B (2004) Interleukin-18 receptor expression in synovial fluid-derived fibroblast-like synoviocytes: comment on the article by Kawashima and Miossec. *Arthritis Rheum* 50(7): 2373-4.

Moore RA, Tramer MR, Carroll D, Wiffen PJ, McQuay HJ (1998) Quantitative systematic review of topically applied non-steroidal anti-inflammatory drugs. *BMJ* 316(7128):333-8.

Moos V, Fickert S, Muller B, Weber U, Sieper J (1999) Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage. *J Rheumatol* 26(4): 870-9.

Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Hohlig K, Sieper J, Muller B (2000) Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1beta or interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 43(11): 2417-22.

Morand EF (2005) New therapeutic target in inflammatory disease: macrophage migration inhibitory factor. *Intern Med J* 35(7): 419-26. Review.

Moskowitz RW und Goldberg VM (1987) Studies of osteophyte pathogenesis in experimentally induced osteoarthritis. *J Rheumatol* 14(2): 311-20.

Moussard C, Alber D, Toubin Mm, Thevenon N, Henry Jc (1992) A drug used in traditional medicine, harpagophytum procumbens: no evidence for NSAID-like effect on whole blood eicosanoid production in human. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 46(4): 283-6.

Moulharat N, Lesur C, Thomas M, Rolland-Valognes G, Pastoureau P, Anract P, De Ceuninck F, Sabatini M (2004) Effects of transforming growth factor-beta on aggrecanase production and proteoglycan degradation by human chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 12(4): 296-305.

Muir H, Bullough P, Maroudas A (1970) The distribution of collagen in human articular cartilage with some of its physiological implications. *J Bone Joint Surg Br* 52(3): 554-63.

Muir IH (1980) Biochemistry of articular cartilage in rheumatic diseases. *Scand J Rheumatol Suppl* 38: 25-9.

Müller-Gerbl M, Schulte E, Putz R (1987) The thickness of the calcified layer of articular cartilage: a function of the load supported? *J Anat* 154: 103-11.

Müller-Ladner U und Gay S (2003) Neue Werkzeuge zur molekularen Analyse der Arthrose. *Z Rheumatol* 62: 120-121.

Müller-Ladner U und Gay S (2006) Bindegewebe. In: Siegenthaler (Hrsg.). *Klinische Pathophysiologie*, Thieme Verlag, Stuttgart, in press.

Murphy G, Segain JP, O'Shea M, Cockett M, Ioannou C, Lefebvre O, Chambon P, Basset P (1993) The 28-kDa N-terminal domain of mouse stromelysin-3 has the general properties of a weak metalloproteinase. *J Biol Chem* 268(21): 15435-41.

Nelson DL, Manske Pr, Pruitt DL, Gilula La, Martin Ra (1993) Lunotriquetral arthrodesis. *J Hand Surg [Am]* 18(6): 1113-20.

Nemoto O, Yamada H, Kikuchi T, Shinmei M, Obata K, Sato H, Seiki M (1997) Suppression of matrix metalloproteinase-3 synthesis by interleukin-4 in human articular chondrocytes. *J Rheumatol* 24(9): 1774-9.

Nicholson RC, Mader S, Nagpal S, Leid M, Rochette-Egly C and Chambon P (1990). Negative regulation of the rat stromelysin gene promoter by retinoic acid is mediated by an AP1 binding site. *Embo J* 9(13): 4443-54.

Nietfeld JJ, Wilbrink B, Helle M, van Roy JL, den Otter W, Swaak AJ, Huber-Bruning O (1990) Interleukin-1-induced interleukin-6 is required for the inhibition of proteoglycan synthesis by interleukin-1 in human articular cartilage. *Arthritis Rheum* 33(11): 1695-701.

NN (2003) *Harpagophyti radix*. In *Escop Monographs*. Springer Press, Heidelberg, New York etc.: 233-240.

Obertreis B, Ruttkowski T, Teucher T, Behnke B, Schmitz H (1996) Ex-vivo in-vitro inhibition of lipopolysaccharide stimulated tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1 beta secretion in human whole blood by extractum urticae dioicae foliorum. *Arzneimittelforschung* 46(4): 389-94.

Occhiuto F, Circosta C, Ragusa S, Ficarra P, Costa De Pasquale R (1985) A drug used in traditional medicine: *Harpagophytum procumbens* DC. IV. Effects on some isolated muscle preparations. *J Ethnopharmacol* 13(2): 201-8.

Oliveria SA, Felson DT, Cirillo PA, Reed JI, Walker AM (1999). Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee. *Epidemiology* 10(2): 161-6.

Ottani V, Martini D, Franchi M, Ruggeri A, Raspanti M (2002) Hierarchical structures in fibrillar collagens. *Micron* 33(7-8): 587-96.

Pacquelet S, Presle N, Boileau C, Dumond H, Netter P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Terlain B, Jouzeau JY (2002) Interleukin 17, a nitric oxide-producing cytokine with a peroxynitrite-independent inhibitory effect on proteoglycan synthesis. *J Rheumatol* 29(12): 2602-10.

Pap T, Meinecke I, Muller-Ladner U, Gay S (2006) Are fibroblasts involved in joint destruction? *Ann Rheum Dis* 64 Suppl 4: iv52-4.

Park Kc, Park Ej, Kim Er, Kim Y, Chung Sh, Cho Bw, Kim S, Jin M (2005) Therapeutic effects of PG201, an ethanol extract from herbs, through cartilage protection on collagenase-induced arthritis in rabbits. *Biochem Biophys Res Commun* 331(4): 1469-77.

Paukkonen K und Helminen HJ (1987) Chondrocyte ultrastructure in exercise and experimental osteoarthrosis. A stereologic morphometric study of articular cartilage of young rabbits using transmission electron microscopy. *Clin Orthop Relat Res* (224): 284-8.

Pedley Rb und Meachim G (1979) Topographical variation in patellar subarticular calcified tissue density. *J Anat* 128(Pt 4): 737-45.

Pelletier Jp, Jovanovic D, Fernandes Jc, Manning P, Connor Jr, Currie Mg, Di Battista Ja,

Martel-Pelletier J (1998) Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective inhibition of inducible nitric oxide synthase. *Arthritis Rheum* 41(7): 1275-86.

Persellin Rh (1976) The effect of pregnancy on rheumatoid arthritis. *Bull Rheum Dis* 27(9): 922-7.

Persson Lo, Berglund K, Sahlberg D (1999) Psychological factors in chronic rheumatic diseases- a review. The case of rheumatoid arthritis, current research and some problems. *Scand J Rheumatol* 28(3): 137-44.

Pipoly Dj und Crouch Ec (1987). Degradation of native type IV procollagen by human neutrophil elastase. Implications for leukocyte-mediated degradation of basement membranes. *Biochemistry* 26(18): 5748-54.

Poole Ar, Pidoux I, Reiner A, Choi H, Rosenberg Lc (1984) Association of an extracellular protein (chondrocalcin) with the calcification of cartilage in endochondral bone formation. *J Cell Biol* 98(1): 54-65.

Poole Ca, Flint Mh, Beaumont Bw (1988) Chondrons extracted from canine tibial cartilage: preliminary report on their isolation and structure. *J Orthop Res* 6(3): 408-19.

Poole Ca, Ayad S, Gilbert Rt (1992) Chondrons from articular cartilage. V. Immunohistochemical evaluation of type VI collagen organisation in isolated chondrons by light, confocal and electron microscopy. *J Cell Sci* 103 ( Pt 4): 1101-10.

Poole Ca, Gilbert Rt, Herbage D, Hartmann Dj (1997) Immunolocalization of type IX collagen in normal and spontaneously osteoarthritic canine tibial cartilage and isolated chondrons. *Osteoarthritis Cartilage* 5(3): 191-204.

Pritzker KP, Gay S, Jimenez SA, Ostergaard K, Pelletier JP, Revell PA, Salter D, van den Berg WB (2006) Osteoarthritis cartilage histopathology: grading and staging. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 13-29

Raskin JB, White RH, Jackson JE, Weaver AL, Tindall EA, Lies RB, Stanton DS (1995) Misoprostol dosage in the prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric and duodenal ulcers: a comparison of three regimens. *Ann Intern Med* 123(5): 344-50.

Remmele W (1997) *Pathologie Springer 1997; Band 5: 444 – 454.*

Riehemann K, Behnke B, Schulze-Osthoff K (1999) Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF-kappaB. *FEBS Lett* 442(1): 89-94.

Rifas L and Arackal S (2003) T cells regulate the expression of matrix metalloproteinase in human osteoblasts via a dual mitogen-activated protein kinase mechanism. *Arthritis Rheum* 48(4): 993-1001.

Rosner IA, Goldberg VM, Moskowitz RW (1986). Estrogens and osteoarthritis. *Clin Orthop*(213): 77-83.

Rudert M und Wirth CJ (1998) Cartilage regeneration and substitution. *Orthopade* 27(5): W309-21.

Saiki Rk, Scharf S, Faloona F, Mullis Kb, Horn Gt, Erlich Ha, Arnheim N (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350-4.

Saiki Rk, Gelfand Dh, Stoffel S, Scharf Sj, Higuchi R, Horn Gt, Mullis Kb, Erlich Ha (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-91.

Saksela O, Hovi T, Vaheri A (1985) Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor secreted by cultured human monocyte-macrophages. *J Cell Physiol* 122(1): 125-32.

Samanta A, Jones A, Regan M, Wilson S, Doherty M (1993) Is osteoarthritis in women affected by hormonal changes or smoking? *Br J Rheumatol* 32(5): 366-70.

Sandmark H, Hogstedt C, Lewold S, Vingard E (1999) Osteoarthritis of the knee in men and women in association with overweight, smoking, and hormone therapy. *Ann Rheum Dis* 58(3): 151-5.

Sangha O (2000) Epidemiology of rheumatic diseases. *Rheumatology (Oxford)* 39 Suppl 2: 3-12.

Sasaki S, Iwata H, Ishiguro N, Habuchi O, Miura T (1994) Low-selenium diet, bone, and articular cartilage in rats. *Nutrition* 10(6): 538-43.

Saxon L, Finch C, Bass S (1999) Sports participation, sports injuries and osteoarthritis: implications for prevention. *Sports Med* 28(2): 123-35.

Schalkwijk J, Joosten LA, van den Berg WB, van Wyk JJ, van de Putte LB (1989) Insulin-like growth factor stimulation of chondrocyte proteoglycan synthesis by human synovial fluid. *Arthritis Rheum* 32(1): 66-71.

Scharstuhl A, Glansbeek HL, van Beuningen HM, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB (2002) Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair. *J Immunol* 169(1): 507-14.

Schedel J, Wenglen C, Distler O, Muller-Ladner U, Scholmerich J, Heinegard D, Krenn V (2004) Differential adherence of osteoarthritis and rheumatoid arthritis synovial fibroblasts to cartilage and bone matrix proteins and its implication for osteoarthritis pathogenesis. *Scand J Immunol* 60(5): 514-23.

Schiefer B (1970) Osteoarthritis in young bulls due to excessive calcium feeding. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 83(11): 214-8.

Schlaak JF, Pfers I, Meyer Zum Buschenfelde KH, Marker-Hermann E (1996) Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies. *Clin Exp Rheumatol* 14(2): 155-62.

Schmid Tm, Mayne R, Jeffrey Jj, Linsenmayer Tf (1986) Type X collagen contains two cleavage sites for a vertebrate collagenase. *J Biol Chem* 261(9): 4184-9.

Schuerwegh AJ, Dombrecht EJ, Stevens WJ, Van Offel JF, Bridts CH, De Clerck LS (2003) Influence of pro-inflammatory (IL-1 alpha, IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma) and anti-inflammatory (IL-4) cytokines on chondrocyte function. *Osteoarthritis Cartilage* 11(9): 681-7.

Schulze-Tanzil G, de SP, Behnke B, Klingelhofer S, Scheid A, Shakibaei M (2002) Effects of the antirheumatic remedy hox alpha--a new stinging nettle leaf extract--on matrix metalloproteinases in human chondrocytes in vitro. *Histol Histopathol* 17(2): 477-85.

Seifert CF, Lucas DS, Vondracek TG, Kastens DJ, McCarty DL, Bui B (1993) Patterns of acetaminophen use in alcoholic patients. *Pharmacotherapy* 13(4): 391-5.

Setton LA, Mow VC, Muller FJ, Pita JC, Howell DS (1993) Altered structure-function relationships for articular cartilage in human osteoarthritis and an experimental canine model. *Agents Actions Suppl* 39: 27-48.

Setty AR und Sigal LH (2005) Herbal medications commonly used in the practice of rheumatology: mechanisms of action, efficacy, and side effects. *Semin Arthritis Rheum* 34: 773-84.

Shimada T, Nakamura H, Ohuchi E, Fujii Y, Murakami Y, Sato H, Seiki M, Okada Y (1999) Characterization of a truncated recombinant form of human membrane type 3 matrix metalloproteinase. *Eur J Biochem* 262(3): 907-14.

Shiraishi A, Dudler J, Lotz M (1997) The role of IFN regulatory factor-1 in synovitis and nitric oxide production. *J Immunol* 159(7): 3549-54.

Silberberg M und Silberberg R (1950) Effects of a high fat diet on the joints of aging mice. *AMA Arch Pathol* 50(6): 828-46.

Silman AJ und Hochberg MC. (1993) *Epidemiology of the rheumatic diseases*. Oxford: Oxford University Press.

Silverstein FE, Graham DY, Senior JR, Davies HW, Struthers BJ, Bittman RM, Geis GS (1995) Misoprostol reduces serious gastrointestinal complications in patients with rheumatoid arthritis receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 123(4): 241-9.

Simon LS, Hatoum HT, Bittman RM, Archambault WT, Polisson RP (1996) Risk factors for serious nonsteroidal-induced gastrointestinal complications: regression analysis of the MUCOSA trial. *Fam Med* 28(3): 204-10.

Slemenda CW, Hui SL, Longcope C, Wellman H, Johnston CC, Jr (1990) Predictors of bone mass in perimenopausal women. A prospective study of clinical data using photon absorptiometry. *Ann Intern Med* 112(2): 96-101.

Smalley WE und Griffin MR (1996) The risks and costs of upper gastrointestinal disease attributable to NSAIDs. *Gastroenterol Clin North Am* 25(2): 373-96. Review.

Smeets RI, Van De Loo Fa, Arntz Oj, Bennink Mb, Joosten La, Van Den Berg Wb (2003) Adenoviral delivery of IL-18 binding protein C ameliorates collagen-induced arthritis in mice. *Gene Ther* 10(12): 1004-11.

Smith RL (1995) Degradative enzymes in osteoarthritis. *Front Biosci* 4: D704-12.

Soeken KL (2004) Selected CAM therapies for arthritis-related pain: the evidence from systematic reviews. *Clin J Pain* 20: 13-8.

Spector TD und Hochberg MC (1994) Methodological problems in the epidemiological study of osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 53(2): 143-6.

Spector TD, Roman E, Silman AJ (1990) The pill, parity, and rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 33(6):782-9.

Spector Td, Woodward L, Hall Gm, Hammond A, Williams A, Butler Mg, James It, Hart Dj, Thompson Pw, Scott Dl (1992) Keratan sulphate in rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and inflammatory diseases. *Ann Rheum Dis* 51(10): 1134-7.

- Spreng D, Sigrist N, Jungi T, Busato A, Lang J, Pfister H, Schawalder P (2000) Nitric oxide metabolite production in the cranial cruciate ligament, synovial membrane, and articular cartilage of dogs with cranial cruciate ligament rupture. *Am J Vet Res* 61(5): 530-6.
- Starkey PM, Barrett AJ, Burleigh MC (1977) The degradation of articular collagen by neutrophil proteinases. *Biochim Biophys Acta* 483(2): 386-97.
- Stetler-Stevenson Wg und Seo Dw (2005) TIMP-2: an endogenous inhibitor of angiogenesis. *Trends Mol Med* 11(3): 97-103.
- Storm EE und Kingsley DM (1996) Joint patterning defects caused by single and double mutations in members of the bone morphogenetic protein (BMP) family. *Development* 122(12): 3969-79.
- Stove J, Huch K, Gunther KP, Scharf HP (2000) Interleukin-1beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro. *Pathobiology* 68(3): 144-9.
- Sturmer T, Gunther KP, Brenner H (2000) Obesity, overweight and patterns of osteoarthritis: the Ulm Osteoarthritis Study. *J Clin Epidemiol* 53(3): 307-13.
- Sulzbacher I (2000) Arthrosis--histology and pathogenetic approaches. *Radiologe* 40(12): 1126-33.
- Sun Y, Sturmer T, Gunther Kp, Brenner H (1997) Incidence and prevalence of cox- and gonarthrosis in the general population. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 135(3): 184-92.
- Superio-Cabuslay E, Ward Mm, Lorig Kr (1996) Patient education interventions in osteoarthritis and rheumatoid arthritis: a meta-analytic comparison with nonsteroidal antiinflammatory drug treatment. *Arthritis Care Res* 9(4): 292-301.
- Swoboda B, Pullig O, Kladny B, Pfander D, Weseloh G (1999) Collagen type VI content in healthy and arthritis knee joint cartilage. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 137(6): 540-4.

Takahashi K, Goomer RS, Harwood F, Kubo T, Hirasawa Y, Amiel D (1999) The effects of hyaluronan on matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), interleukin-1beta(IL-1beta), and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) gene expression during the development of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 7(2): 182-90.

Taskiran D, Stefanovic-Racic M, Georgescu H, Evans C (1994) Nitric oxide mediates suppression of cartilage proteoglycan synthesis by interleukin-1. *Biochem Biophys Res Commun* 200(1): 142-8.

Teshima R, Treadwell BV, Trahan CA, Mankin HJ (1983) Comparative rates of proteoglycan synthesis and size of proteoglycans in normal and osteoarthritic chondrocytes. *Arthritis Rheum* 26(10): 1225-30.

Teucher T, Obertreis B, Ruttkowski T, Schmitz H (1996) Cytokine secretion in whole blood of healthy subjects following oral administration of *Urtica dioica* L. plant extract. *Arzneimittelforschung* 46(9): 906-10.

Tippler B, Syrovets T, Loew D, Simmet Th (1996) *Harpagophytum procumbens*: Wirkung von Extrakten auf die Eicosanoidbiosynthese in Ionophor A23187-stimuliertem menschlichem Vollblut. In: *Phytopharmaka II. Forschung und klinische Anwendung*. Hrsg. D. Loew, N. Rietbrock, Steinkopf-Verlag, Darmstadt, s. 95-100.

Toda Y, Toda T, Takemura S, Wada T, Morimoto T, Ogawa R (1998) Change in body fat, but not body weight or metabolic correlates of obesity, is related to symptomatic relief of obese patients with knee osteoarthritis after a weight control program. *J Rheumatol* 25(11): 2181-6.

Towheed Te und Hochberg Mc (1997a) A systematic review of randomized controlled trials of pharmacological therapy in osteoarthritis of the hip. *J Rheumatol* 24(2): 349-57.

Towheed Te und Hochberg Mc (1997b) A systematic review of randomized controlled trials of pharmacological therapy in osteoarthritis of the knee, with an emphasis on trial methodology. *Semin Arthritis Rheum* 26(5): 755-70.

Travis JA, Hughes MG, Wong JM, Wagner WD, Geary RL (2001) Hyaluronan enhances contraction of collagen by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts: Role of CD44 and implications for constrictive remodeling. *Circ Res* 88(1): 77-83.

Tsai CI und Liu TK (1992) Up-regulation of estrogen receptors in rabbit osteoarthritic cartilage. *Life Sci* 50(22): 1727-35.

Tsai CI und Liu TK (1993) Estradiol-induced knee osteoarthritis in ovariectomized rabbits. *Clin Orthop Relat Res*(291): 295-302.

Turk B, Turk V, Turk D (2003) Structural and functional aspects of papain-like cysteine proteinases and their protein inhibitors. *Biol Chem* 378(3-4): 141-50.

Udagawa N (2003) The mechanism of osteoclast differentiation from macrophages: possible roles of T lymphocytes in osteoclastogenesis. *J Bone Miner Metab* 21(6): 337-43.

Unemori EN, Bair MJ, Bauer EA, Amento EP (1991) Stromelysin expression regulates collagenase activation in human fibroblasts. Dissociable control of two metalloproteinases by interferon-gamma. *J Biol Chem* 266(34): 23477-82.

Ushiyama T, Inoue K, Nishioka J (1995) Expression of estrogen receptor related protein (p29) and estradiol binding in human arthritic synovium. *J Rheumatol* 22(3): 421-6.

Van Baar ME, Dekker J, Oostendorp RA, Bijl D, Voorn TB, Lemmens JA, Bijlsma JW (1998) The effectiveness of exercise therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee: a randomized clinical trial. *J Rheumatol* 25(12): 2432-9.

Van Beuningen HM, van der Kraan PM, Arntz OJ, van den Berg WB (1993) Protection from interleukin 1 induced destruction of articular cartilage by transforming growth factor beta: studies in anatomically intact cartilage in vitro and in vivo. *Ann Rheum Dis* 52(3): 185-91.

Van Beuningen HM, Glansbeek HL, van der Kraan PM, van den Berg WB (2000) Osteoarthritis-like changes in the murine knee joint resulting from intra-articular transforming growth factor-beta injections. *Osteoarthritis Cartilage* 8(1): 25-33.

Van den Berg WB (1998) Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled. Springer Semin Immunopathol 20(1-2): 149-64.

Van den Berg WB (2002) Is there a rationale for combined TNF and IL-1 blocking in arthritis? Clin Exp Rheumatol 20 (5 Suppl 27): 21-5.

Van Roon JA, van Roy JL, Gmelig-Meyling FH, Lafeber FP, Bijlsma JW (1996) Prevention and reversal of cartilage degradation in rheumatoid arthritis by interleukin-10 and interleukin-4. Arthritis Rheum 39(5): 829-35.

Vandenbroucke Jp, Hazevoet Hm, Cats A (1984) Survival and cause of death in rheumatoid arthritis: a 25-year prospective followup. J Rheumatol 11(2): 158-61.

Wakitani S, Goto T, Pineda Sj, Young Rg, Mansour Jm, Caplan Ai, Goldberg Vm (1994) Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage. J Bone Joint Surg Am 76(4): 579-92.

Weinberger M, Tierney Wm, Cowper Pa, Katz Bp, Booher Pa (1993) Cost-effectiveness of increased telephone contact for patients with osteoarthritis. A randomized, controlled trial. Arthritis Rheum 36(2): 243-6.

Welsch U (2005) Sobotta Atlas Histologie Urban&Fischer Auflage:7 s. 294.

Werb Z und Alexander CM (1993) Proteinases and Matrix Degradation. In: Textbook of Rheumatology, Eds Kelly WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB. Saunders Company, Philadelphia, London etc: 248-268

Werb Z, Banda Mj, Jones Pa (1980) Degradation of connective tissue matrices by macrophages. I. Proteolysis of elastin, glycoproteins, and collagen by proteinases isolated from macrophages. J Exp Med 152(5): 1340-57.

Whitcomb Dc und Block Gd (1994) Association of acetaminophen hepatotoxicity with fasting and ethanol use. Jama 272(23): 1845-50.

Whitham SE, Murphy G, Angel P, Rahmsdorf HJ, Smith BJ, Lyons A, Harris TJ, Reynolds JJ, Herrlich P, Docherty AJ (1986) Comparison of human stromelysin and collagenase by cloning and sequence analysis. *Biochem J* 240(3): 913-6.

Wilhelm SM, Eisen AZ, Teter M, Clark SD, Kronberger A, Goldberg G (1986) Human fibroblast collagenase: glycosylation and tissue-specific levels of enzyme synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(11): 3756-60.

Wilhelmi G und Tanner K (1988) Effect of riboflavin (vitamin B2) on spontaneous gonarthrosis in the mouse. *Z Rheumatol* 47(3): 166-72.

Wong M, Wuethrich P, Egli P, Hunziker E (1996) Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography. *J Orthop Res* 14(3): 424-32.

Yeomans ND, Tulassay Z, Juhasz L, Racz I, Howard JM, van Rensburg CJ, Swannell AJ, Hawkey CJ (1998) A comparison of omeprazole with ranitidine for ulcers associated with nonsteroidal antiinflammatory drugs. Acid Suppression Trial: Ranitidine versus Omeprazole for NSAID-associated Ulcer Treatment (ASTRONAUT) Study Group. *N Engl J Med* 338(11): 719-26.

Zafarullah M, Pelletier Jp, Cloutier Jm, Martel-Pelletier J (1993) Elevated metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA in human osteoarthritic synovia. *J Rheumatol* 20(4): 693-7.

Zhu W, Iatridis Jc, Hlibczuk V, Ratcliffe A, Mow Vc (1996) Determination of collagen-proteoglycan interactions in vitro. *J Biomech* 29(6): 773-83.

Zimny Ml (1988) Mechanoreceptors in articular tissues. *Am J Anat* 182(1): 16-32.

Zorn B (1958) Antiarthritis effect of the Harpagophytum root; preliminary report. *Z Rheumaforsch* 17(3-4): 134-8.

**„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtliche oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.“**

## Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. U. Müller-Ladner, nicht nur für die Überlassung des Themas, die motivierenden Gespräche, die geduldige Diskussionsbereitschaft und die wertvollen Ratschläge, sondern auch für die freundschaftliche Unterstützung in den vergangenen Jahren und die kritische Durchsicht dieser Arbeit.

Die experimentellen Untersuchungen wurden zum grössten Teil an der Universität Regensburg durchgeführt, die Untersuchungen mit den Zellkulturen erfolgten an der Université de Liège / Belgien unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Y. Henrotin, dem ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit und seine wertvolle Unterstützung bei den Experimenten danke.

*Elena* danke ich herzlich für die vielen hilfreichen, anregenden Gespräche, für ihre Unterstützung und ihre Interesse. *Birgit* und *Wibke* danke ich für die geduldigen Stunden und die moralische Unterstützung in meiner Einweisung und während meiner Versuche. Dank gilt auch *allen anderen Mitarbeitern und Kollegen* der Institute, die mich in dieser Zeit begleitet haben, insbesondere für das freundschaftliche Arbeitsklima.

Christian danke ich für seine moralische Unterstützung während der Versuche und Korrekturen.

Einen ganz besonderen Dank schulde ich meiner Mutter für ihre immense Geduld.

## 8. Lebenslauf

Geburtsdatum 07.10.1980

Geburtsort Offenbach am Main

- 1983 - 1985 École maternelle, Freiburg i. Br.
- 1985 - 1991 École centre-ville Freiburg i. Br.
- 1991 - 1998 Lycée franco-allemand (LFA/DFG) – section française  
Baccalaureat franco-allemand Juni 1998
- WS 1998/99 Immatrikulation an der Albert-Ludwig Universität Freiburg im Fachbereich  
Zahnmedizin
- 26.09.2000 Vorphysikum
- 04/ 2002 Beginn der Doktorarbeit: Zur Knorpelprotektion von *Harpagophytum*  
*procumbens* DC in der Universitätsklinik Liège, Belgien.
- 16.09.2002 Physikum
- WS 02/03 Fortsetzung des Zahnmedizinstudiums am Carolinum der Universität Frankfurt a.  
Main
- 07/ 2003 Fortsetzung der experimentellen Doktorarbeit in der Universitätsklinik  
Regensburg (Rheumatologie: Prof. Dr. U Müller-Ladner)
- 06/ 2005 Staatsexamen und Approbation als Zahnärztin
- seit 07/ 2005 praktische Tätigkeit im Militärkrankenhaus 301 und in der Zahnarztpraxis  
Dr. Vlachojanis, Athen, Griechenland
- ab 06/2006 Beginn der 3-jährigen Facharztausbildung (Kieferorthopädie) an der Columbia  
University, New York, USA