

Aus der Klinik für Unfallchirurgie und Wiederherstellungschirurgie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Einfluss verschiedener Pflanzenextrakte auf die Vitalität und das
Expressionsprofil humaner Chondrozyten vor dem Hintergrund
einer Arthrotherapie**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Nora Willwoll

aus Wermelskirchen

Datum der Promotion: 05.06.2016

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Abstract	3
1 Einleitung	5
1.1 Gelenkknorpel	5
1.2 Osteoarthritis	8
1.2.1 Rolle der Proteinasen & Zytokine bei der Entstehung der Osteoarthritis.....	8
1.3 Therapieansätze	11
1.3.1 Phytopharmaka.....	12
1.4 Ziel der Arbeit	14
2 Material	15
2.1 Chemikalien.....	15
2.2 Enzyme	16
2.3 Rekombinante Zytokine	16
2.4 Quantitative Real -Time PCR (qRT-PCR) Reagenzien & Primer	17
2.5 Medien	17
2.6 Puffer & Lösungen	19
2.7 Pflanzenextrakte	21
2.8 Verbrauchsmaterialien.....	22
2.9 Testkits.....	22
2.10 Laborgeräte & Auswertungsprogramme	23
3 Methoden	24
3.1 Zellkultur	24
3.1.1 Isolierung und Kultivierung von humanen Gelenkchondrozyten	24
3.1.2 Einfrieren von Zellen	25
3.1.3 Auftauen von Zellen.....	25
3.1.4 Passagieren von Zellen.....	26
3.1.5 Zellzählung.....	26
3.2 Herstellung von Pflanzenextrakt – Stammlösungen.....	26

3.3	Beschichten von Poly-L-Lysin Glasplättchen	27
3.4	Stoffwechselaktivitätsnachweis	27
3.4.1	mittels Alamar Blue Assay	27
3.4.2	mittels Lebend–Tod-Färbung	28
3.5	Stimulationsversuche zur Gewinnung von RNA für die Genexpressions-analyse	29
3.6	Genexpressionsanalyse	31
3.6.1	RNA- Isolierung	31
3.6.2	RNA Konzentrationsmessung	31
3.6.3	cDNA-Synthese	31
3.6.4	Prinzip der quantitativen Real Time PCR	31
3.6.5	Effizienzbestimmungen	32
3.6.6	Durchführung der qRT- PCR	32
3.7	Bestimmung des Gesamtgehalts sulfatierter (s-)Glykosaminoglykane und des Gesamtgehalts von Kollagen	33
3.7.1	mittels s-GAG-Bestimmung	35
3.7.2	mittels Hydroxyprolin-Bestimmung	35
3.8	Statistik	36
4	Ergebnisse	37
4.1	Makroskopische Ergebnisse – Arthroscore	37
4.2	Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Zellmorphologie	37
4.3	Einfluss der Pflanzenextrakte auf die metabolische Aktivität und die Zellvitalität	39
4.3.1	mittels Alamar Blue Assay	39
4.3.2	mittels Lebend-Tod-Färbung	42
4.4	Genexpressionsanalysen	43
4.4.1	Effizienzbestimmung	43
4.4.2	Genexpressionsanalyse Kollagen Typ II	47
4.4.3	Genexpressionsanalyse ACAN	49
4.4.4	Genexpressionsanalyse SOX 9	51
4.4.5	Genexpressionsanalyse IL-1 β	53
4.4.6	Genexpressionsanalyse TNF- α	55
4.4.7	Genexpressionsanalyse MMP-1 & -3	57

4.4.8	Genexpressionsanalyse COX-2 (PTGS2)	60
4.5	Einfluss der Pflanzenextrakte auf den s-Glykosaminoglykan- und Kollagengehalt	62
5	Diskussion.....	65
5.1	Im Labor verwendeter makroskopischer Arthroscore.....	65
5.2	Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Zellmorphologie	66
5.3	Einfluss der Pflanzenextrakte auf die metabolische Aktivität und die Zellvitalität	67
5.3.1	mittels Alamar Blue Assay.....	67
5.3.2	mittels Lebend-Tod-Färbung.....	68
5.4	Einfluss der Pflanzenextrakte auf das Genexpressionsprofil der Chondrozyten.....	69
5.4.1	Pflanzenextrakt 1 – Birkenblätterextrakt - <i>Betula pendula / pubescens</i>	69
5.4.2	Pflanzenextrakt 2 – Brennnesselextrakt - <i>Urtica dioica / urens</i>	70
5.4.3	Pflanzenextrakt 3 – Klettenwurzelextrakt – <i>Arctium lappa</i>	70
5.4.4	Pflanzenextrakt 4 – Zwiebelextrakt – <i>Allium cepa</i>	71
5.4.5	Pflanzenextrakt 5 – schwarzer Pfefferextrakt – <i>Piper nigrum</i>	72
5.5	Einfluss der Pflanzenextrakte auf den s-GAG -und Kollagengehalt.....	73
6	Fazit und Ausblick	75
7	Literaturverzeichnis	77
8	Abbbildungsverzeichnis.....	85
9	Abkürzungsverzeichnis.....	87
	Eidesstattliche Versicherung	89
	Lebenslauf	90
	Danksagung.....	90

Zusammenfassung

Einleitung: Die Osteoarthritis (OA) ist die häufigste degenerative Gelenkerkrankung der westlichen Welt. Das Krankheitsbild ist geprägt durch chronische Schmerzen und Verlust von Mobilität und Lebensqualität. Auf Grund der stetig alternden Bevölkerung und der bisher erfolglosen Therapie der Erkrankung gewinnt die OA weiter zunehmende volkswirtschaftliche Bedeutung.

Bei der Therapie dieser chronisch entzündlichen Gelenkerkrankung steht die Schmerztherapie mit non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) im Vordergrund, da vor allem die durch das Schlüsselenzym IL-1 β getriggerte Entzündungsreaktion erheblichen Anteil an der Pathogenese der OA hat. Als letzte Therapieoption bleibt häufig nur der künstliche Gelenkersatz.

Für viele pflanzliche Wirkstoffe wurde bereits eine anti-inflammatorische Wirkung nachgewiesen und so könnten sogenannte Phytopharmaka eine Alternative zu den nebenwirkungsreichen NSAID darstellen.

Ziel dieser Arbeit war es fünf dieser Phytopharmaka auf ihre anti-inflammatorischen und chondroprotektiven Wirkungen zu untersuchen.

Methodik: Es wurden humane Gelenkchondrozyten kultiviert und mit den jeweiligen Pflanzenextrakten (Phy-1-5) in drei unterschiedlichen Konzentrationen (5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml) stimuliert. Durch eine weitere Stimulation mit Interleukin (IL)-1 β (10 ng/ml) sollte die Entzündungssituation bei einer arthrotischen Stoffwechsellage abgebildet werden. Zur Ermittlung der Zellvitalität wurden der Alamar Blue Assay sowie eine Lebend-Tod-Färbung eingesetzt.

Mittels quantitativer Real Time-PCR wurde die Genexpression der extrazellulären Matrix (EZM)-Bestandteile Aggrecan und Kollagen Typ II, der Matrixmetalloproteinasen (MMP)-1 und -3, des chondrogenen Transkriptionsfaktors SOX 9 sowie der pro-inflammatorischen Mediatoren Interleukin (IL)-1 β , Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α und Cyclooxygenase (COX)-2 bestimmt. Über den Dimethylmethyleneblue (DMMB)-Assay erfolgte die Bestimmung des Glykosaminoglykan (s-GAG)-Gehalts. Die Ermittlung des Kollagengesamtgehalts erfolgte weiterhin durch die Verwendung des Hydroxyprolin-Assays.

Ergebnisse: Für alle getesteten Pflanzenextrakte konnte eine dosisabhängige nicht zytotoxische Wirkung festgestellt werden. Lediglich in den hohen Dosen zeigten einzelne Extrakte eine zytotoxische Wirkung. Für einzelne Extrakte ließ sich eine ebenfalls dosisabhängige Suppression der katabol wirkenden Gene beobachten. So wurde die Expression von MMP-3 durch den

angewendeten Zwiebelextrakt signifikant supprimiert sowie die COX-2 Expression durch den Extrakt des schwarzen Pfeffers. Allerdings konnten auch potenziell katabole Effekte einiger Extrakte nachgewiesen werden. So wurde zum Beispiel durch den Birkenblätterextrakt die Genexpression der MMPs induziert sowie die Aggrecanexpression durch den Brennesselextrakt supprimiert.

Fazit: Viele auch in dieser Arbeit zitierte Studien zeigen, dass aus Pflanzen gewonnene Extrakte anti-inflammatorische Wirkung besitzen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenextrakte konnte eine nicht zytotoxische Wirkung der niedrig dosierten Extrakte nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich nur für einige wenige Extrakte eine anti-inflammatorische bzw. chondroprotektive Wirkungskomponente.

Abstract

Introduction: Osteoarthritis (OA) is the most common degenerative joint diseases of the western world. Symptoms are chronic pain and loss of mobility and furthermore, a reduced quality of life. Due to a steadily aging population and so far unsuccessful treatment of the disease, OA is gaining an increasing economic significance.

The current therapeutic approach is mainly analgesia and based on the use of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) because the pro-inflammatory cytokine interleukin (IL)-1 β plays a key role in the pathogenesis of OA. Often the only therapeutic option left is an endoprosthetic joint replacement.

Many herbal drugs have shown an anti-inflammatory effect and the question is if they should be considered as a therapeutic alternative besides NSAID, which are associated with adverse effects.

In this study the potential anti-inflammatory and chondroprotective effects of five herbal extracts were tested.

Methods: Human chondrocytes were cultivated and stimulated with each herbal extract using three different concentrations (5 μ g/ml, 50 μ g/ml, 500 μ g/ml). IL-1 β (10 ng/ml) was later used to induce an OA-like inflammatory metabolic microenvironment.

To determine the cell's metabolic activity and vitality the Alamar Blue Assay and a fluorescence staining method were used.

Genexpression was measured by using quantitative Real Time-PCR including the expression of the extracellular matrix (ECM) components aggrecan and type II collagen as well as the matrix metalloproteinases (MMP)-1 & 3, the chondrogenic transcription factor SOX 9 and the pro-inflammatory cytokines and metabolites IL-1 β , tumor necrosis factor (TNF)- α and cyclooxygenase (COX)-2.

The Dimethylmethyleneblue (DMMB)- and Hydroxyprolin-assays were used to analyze the production of glycosaminoglycans (s-GAGs) and total collagen.

Results: All herbal extracts tested showed a dose dependent non-cytotoxic effect. Only in the highest dose some of the extracts showed a cytotoxic effect. For some of the extracts there was also a dose dependent suppression of the genes transcribing for catabolic mediators noted. The extract won from onion suppressed the expression of MMP-3 and the black pepper extract inhibited expression of COX-2.

But there were also catabolic effects of some of the herbal extracts. For example the expression of MMP-1 was induced by the birch tree extract and expression of aggrecan was suppressed by the stinging nettle extract

Conclusion: Overall many studies show a potential anti-inflammatory effect for different herbal drugs. In this study a dose-dependent non-cytotoxic effect was shown for all herbal extracts used in the lower doses. But only for a few a potential anti-inflammatory and chondroprotective component was detected.

1 Einleitung

Die Osteoarthritis (OA) ist die häufigste primär degenerative Gelenkerkrankung der westlichen Welt.^{1,2,3} Dabei geht OA mit einem progressiven Verlust des Gelenkknorpels und einer Veränderung der angrenzenden Strukturen, wie der Sklerosierung des Knochens und der Hyperplasie der Synovialmembran einher.^{1,4,5} Die Lebenszeitprävalenz in Deutschland in der Altersgruppe ab 65 Jahren liegt bei Frauen bei 52,9% und bei Männern bei 34,8%.⁶ Bei der OA handelt es sich nicht nur um eine Erkrankung, die durch chronischen Schmerz und körperliche Einschränkungen die Lebensqualität der betroffenen Bevölkerung im hohen Maße einschränkt,³ sondern auch durch frühe Invalidität und Berentung hohe volkswirtschaftliche Kosten nach sich zieht.⁶

Nach aktuellen Leitlinien⁷ stehen für die Therapie der OA vor allem konservative Behandlungen, Schmerzreduktion und Entzündungshemmung mit NSAID und als *Ultima Ratio* der endoprothetische Gelenkersatz zur Verfügung. Neuere innovative Behandlungskonzepte von Knorpelschäden ergeben sich durch die autologe Knorpelzelltransplantation (ACT) und die Stammzelltransplantation, die allerdings nur bei jüngeren Patienten nach Knorpeltrauma und bei isolierten Defekten angewandt werden können.^{8,9}

Die Suche nach alternativen Behandlungsmethoden ist daher auch für die OA sowohl auf medikamentöser Ebene als auch auf operativer noch nicht abgeschlossen.

1.1 Gelenkknorpel

Da die OA eine Erkrankung des hyalinen Knorpels ist und die Experimente in dieser Arbeit sich auf die Auswirkungen der OA auf hyaline Gelenkknorpelzellen des Hüftgelenks beziehen, wird auch im Verlauf nur auf den Aufbau und Metabolismus des hyalinen Knorpels eingegangen.

Um die Pathophysiologie der Arthrose verstehen zu können, ist es zunächst einmal wichtig sich den Aufbau und die Struktur des Gelenkknorpels vor Augen zu führen.

Knorpel zählt zu den Binde- und Stützgeweben mesenchymalen Ursprungs in unserem Körper.¹⁰ Er besteht aus einem einzigen Zelltypen, dem Chondrozyten (Knorpelzelle), der die Extrazellulärmatrix (EZM) produziert.¹¹ Die wichtigsten Bestandteile der EZM sind Proteoglykane (PGs) v.a. Aggrecan und Kollagenfibrillen vom Typ II.^{10,12} Bei Knorpelgewebe handelt es sich um ein äußerst zellarmes Gewebe, das lediglich zu 5-10% seines Volumens aus Chondrozyten besteht. Diese wenigen Zellen werden im Gefäß- und Nerven-freien Knorpel über

Diffusion ernährt und sind in den verschiedenen Schichten des Knorpels unterschiedlich dicht verteilt.^{13,14}

Knorpelgewebe weist eine charakteristische Zonenstruktur auf. Die der Gelenkhöhle zugewandte Seite wird Tangentialzone genannt und von Gelenkflüssigkeit, der Synovia, umspült. Hier verlaufen die Kollagenfibrillen tangential und sind in Richtung der stärksten Zugspannung ausgerichtet.¹⁰ Die in EZM-Höhlen, den sogenannten Lakunen, liegenden Chondrozyten produzieren hier eine Matrix mit einem hohen Kollagen- und niedrigem PG-Gehalt.¹⁵ In der Übergangs- und der Radiärzone besitzen die Kollagenfibrillen den höchsten Durchmesser und die Chondrozyten sind weniger dicht in Säulen angeordnet.^{15,16} Der PG-Anteil ist hier am höchsten.^{15,16} Zwischen der Radiärzone und der Zone des mineralisierten Knorpels liegt die sogenannte Tidemark, durch die die Kollagenfasern senkrecht bis in die darunter liegende mineralisierte Knorpelzone einstrahlen (Abbildung 1).^{10,15,177}

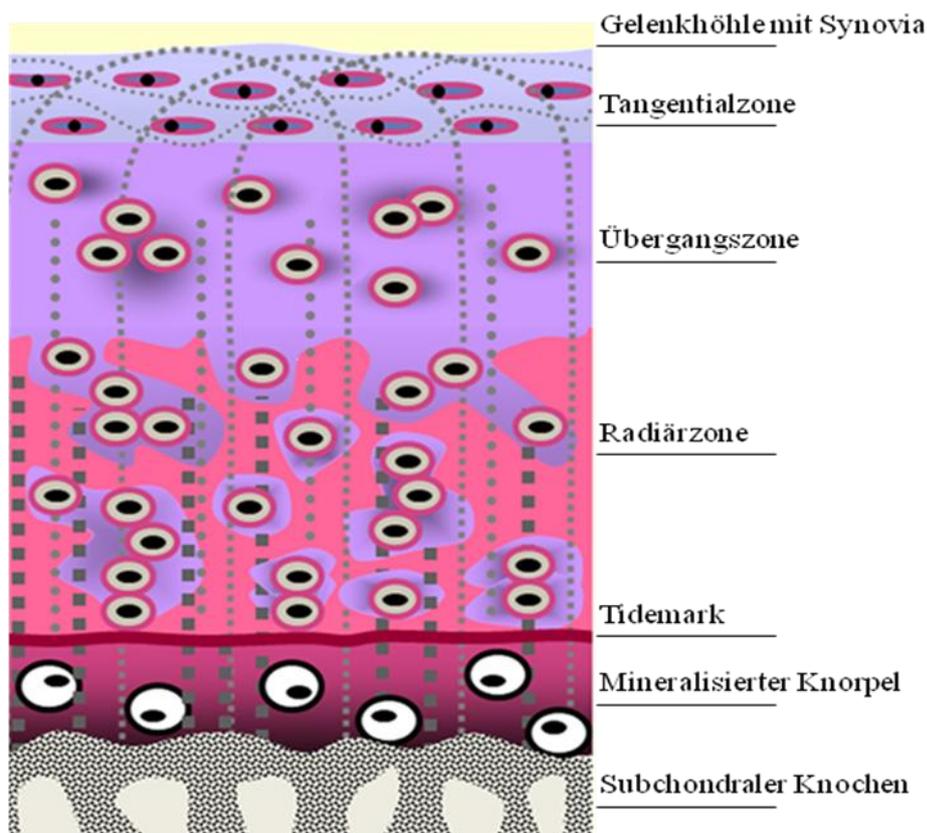


Abbildung 1: Gelenkknorpelzonen nach Schulze-Tanzil

Die Kollagenfibrillen beschreiben einen bogenförmigen Verlauf durch die einzelnen Knorpelzonen bis zur Verankerung in der mineralisierten Knorpelzone. Die Knorpelzellen zeigen eine Zonen-abhängig unterschiedliche Form und Verteilung.

Die EZM besteht zum größten Teil aus Wasser, Kollagen Typ II (COL2A1) und dem PG Aggrecan (ACAN) (Tabelle 1). Aber auch weitere Kollagen Typen, wie III, VI, IX, X, XI, XII und XIV sowie weitere PGs und Hyaluronan tragen zum Aufbau der EZM bei.^{18,19}

Tabelle 1: Bestandteile der extrazellulären Matrix des hyalinen Knorpels nach V. Martinek (2003)¹⁵

Komponente	% des Gewichts
Wasser	60-80%
Kollagen Typ II	10-20%
Aggrecan (großes Proteoglykan)	5-7%
Andere Bestandteile:	
- kleine Proteoglykane (Biglykan, Decorin, Fibromodulin)	
- Kollagen Typen V, VI, IX, X, XI	
- Link-Protein	
- Annexin	< 5%
- Hyaluronan	
- Fibronectin	
- Lipide	

Die Kollagenfibrillen bilden ein großes Fasernetzwerk in dem sich die PGs, vor allem Aggrecan, verzweigen.¹⁶ Dieses Netzwerk verleiht dem Knorpel seine Zugfestigkeit und hindert die Wasser aufnehmenden PGs daran sich unendlich auszudehnen.^{10,13}

Über ein Core Protein sind Chondroitinsulfat und Keratansulfat als sulfatierte Glykosaminoglykane (s-GAG) im Aggrecan gebunden. Eine weitere Domäne dieses PGs bindet Hyaluronan.^{16,20} Die so entstandenen Aggregate binden durch ihre negative Ladung vermehrt positiv geladene Ionen und somit Wasser, welches in das Netzwerk von Kollagenfibrillen ein- und ausströmt.¹⁵ Dieser Mechanismus verleiht dem Knorpel zusätzlich seine Druckelastizität.^{16,13}

Die Funktionstüchtigkeit des Knorpels hängt somit von der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der PGs und s-GAG-Ketten und den geordneten Kollagenfibrillen ab.¹⁰

Mit zunehmendem Alter ändert sich allerdings die Zusammensetzung des Knorpels und es kommt vermehrt zu Umbauprozessen.^{15,21}

1.2 Osteoarthrose

Diese im Alter zunehmenden Umbauprozesse begünstigen das Auftreten einer OA ebenso wie traumatische Ereignisse, mechanischer Stress, Übergewicht und genetische Disposition.^{22,23,11}

Dabei wird eine lokale Entzündungsreaktion hervorgerufen, die die Degeneration des Knorpels zur Folge hat und nicht nur den Knorpel sondern auch alle ihn umgebenden Gewebe verändert – somit wird OA als „whole joint disease“ verstanden.^{19,24}

Dazu gehören osteophytäre Anlagerungen, Veränderungen des subchondralen Knochens, Entzündungsreaktionen in der Synovia und degenerative Veränderungen der Bandstrukturen.^{19,5}

Unter physiologischen Bedingungen bewegen sich anabole und katabole Stoffwechselreaktionen des Chondrozyten in einem ausgewogenen Gleichgewicht.^{25,26,8}

Dieses Gleichgewicht wird unter anderem durch den chondrogenen Transkriptionsfaktor SRY (sex determining region Y) box 9 (SOX 9) aufrecht erhalten, welcher zusammen mit Kollagen Typ II co-exprimiert wird und ebenfalls die Aktivität des Aggrecan Gens induziert.^{27,28} Über die Aktivierung dieses und des Col2a1 Gens spielt SOX 9 eine Schlüsselrolle in der Produktion der EZM- Bestandteile und der Differenzierung der Chondrozyten.^{29,30,15}

Durch starke Belastung und Alterungsprozesse kommt es jedoch zu einem Ungleichgewicht dieses Verhältnisses und die daraus resultierende Schädigung des Kollagennetzwerks und verminderte Synthese von PGs führt zu strukturellen und funktionellen Umbauprozessen im Knorpelgewebe.^{25,9}

1.2.1 Rolle der Proteinase & Zytokine bei der Entstehung der Osteoarthrose

Die Synthese von Proteinase wie Matrixmetalloproteinase (MMPs) und Aggrecanase wird gesteigert, die EZM-Synthese supprimiert und die Zahl der Chondrozyten geht zurück.^{25,12,26}

Die Proteinase werden zum einen über Kollagenfragmente zum anderen über aktivierte Zytokine, wie Interleukin (IL)-1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor (TNF)- α , die von den Synovialzellen, mononuklearen Zellen und Chondrozyten selbst produziert werden, induziert und aktiviert.⁵

Die MMP- Familie umfasst zur Zeit 23 Enzyme, die zur Degradierung der EZM beitragen.³¹

Zwei der wichtigsten MMPs sind MMP-1 (Kollagenase-1) und MMP-3 (Stromelysin-1), die nicht nur in der Entstehung der OA eine wichtige Rolle spielen, sondern auch bei der Entzündungsreaktion der rheumatoiden Arthritis.^{32,4} Aber auch MMP-13 (Kollagenase-3) ist durch den Abbau von Kollagen Typ II in hohem Maße an der Zerstörung der Knorpelarchitektur

beteiligt.^{33,34} MMP-1 ist in diesem Zusammenhang vor allem verantwortlich für den Abbau von Kollagen Typ I, II und III.^{32,35} MMP-3 baut verschiedene Kollagen Typen, PGs, Fibronectin und Laminin ab.^{32,36}

Das sich in der Synovialmembran und der oberflächlichen Knorpelschicht befindliche IL-1 β Converting Enzym sorgt weiterhin dafür, dass das pro-inflammatorische IL-1 β in seine aktive Form überführt wird und so gemeinsam mit TNF- α die Entzündungsprozesse im Gelenk hervorruft.⁴ IL-1 und TNF- α stimulieren die Synthese weiterer Zytokine wie IL-8 und IL-6 ebenso wie die Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) über die Cyclooxygenase-2 (COX-2), die alle Bestandteile der Entzündungskaskade sind.^{5,26,25} Zusätzlich wird die Stickstoffmonoxid (NO) Freisetzung erhöht, welche wiederum die katabolen Effekte verstärkt, die Synthese von Kollagen und PGs verhindert und Apoptose im Chondrozyten induziert.^{5, 20, 26} Das synergistisch wirkende TNF- α supprimiert die Synthese von Kollagen Typ II und Aggrecan und induziert zusätzlich die MMP-3 (Abbildung 2).³⁷

Anti-inflammatorisch wirken vor allem IL-10,-4 & -13, die über verschiedene Wege als Gegenspieler in der Entzündungskaskade fungieren und so zum Beispiel den TNF- α vermittelten Signalweg beeinflussen.^{25,37,38}

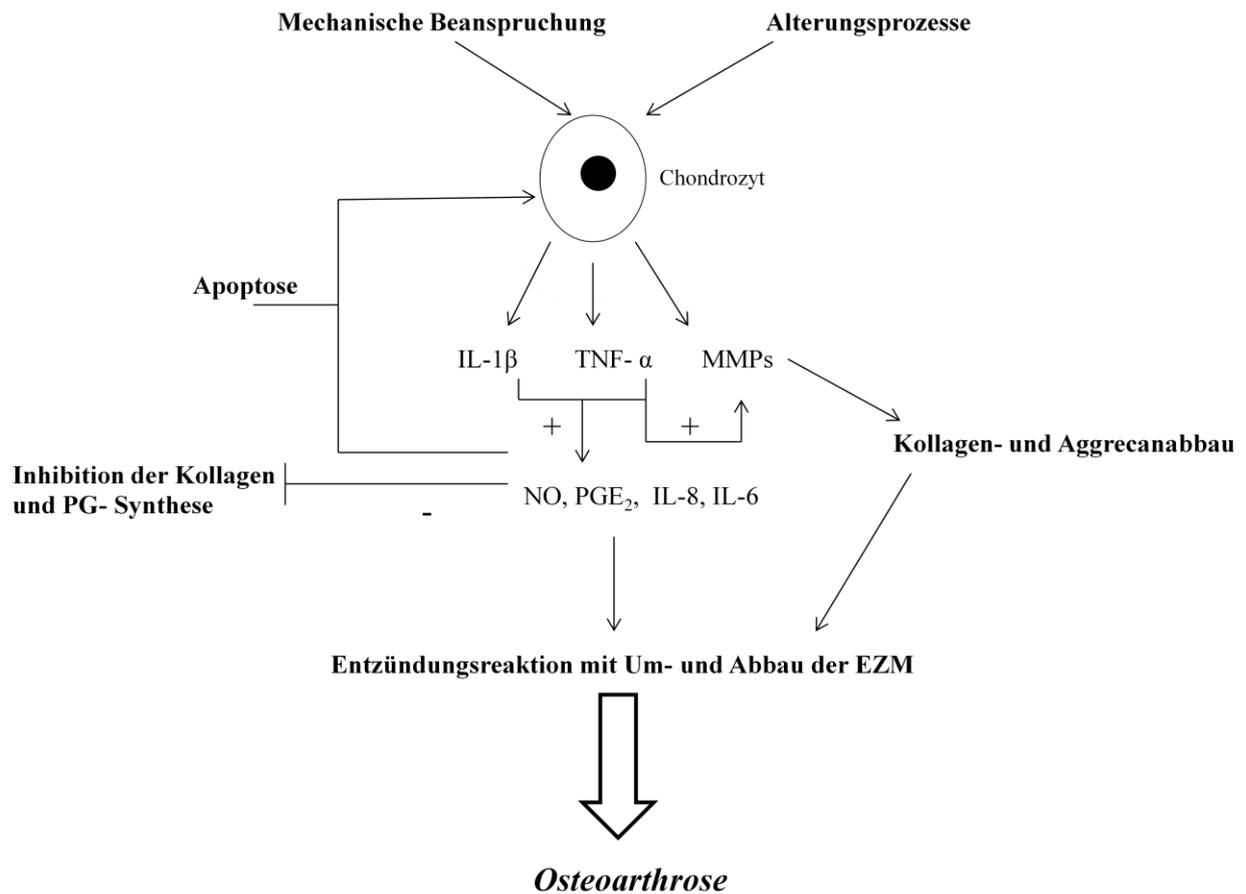


Abbildung 2: Pathogenese der Osteoarthritis.

Einfluss von IL-1β, TNF-α und MMPs vereinfacht dargestellt.

Durch das Zusammenspiel von Alterungsprozessen, mechanischen Traumen und entzündlichen Prozessen wird der Knorpel so stark geschädigt, dass es zur Fibrillation und zum Abrieb kommt.^{24,15} Gegenregulatorisch kommt es zur Hypertrophie der Chondrozyten, zur vermehrten Kollagen Typ X Synthese und zur Bildung von Faserknorpel als Reparaturversuch.^{39,1}

Schlussendlich ist die Wirkung der katabolen Prozesse zu stark und es kommt zur Sklerosierung des subchondralen Knochens, welche in einem Elastizitätsverlust des Knochens resultiert.^{15,40} Einbrüche des Knochens führen zu sog. Geröllzysten. Vermutlich aufgrund der durch den Knorpelverlust verstärkten Druckbelastung werden Osteophyten gebildet und das Gelenk verliert seine ursprüngliche Funktionalität.³⁹

1.3 Therapieansätze

Nach den S3-Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädischen Chirurgie (DGOOC) stehen vor allem konservativ-medikamentöse Therapieansätze im Vordergrund. Zur konservativen Behandlung gehören Gewichtsreduktion, gelenkschonende sportliche Aktivität und muskulärer Aufbau sowie jegliche Formen von Physiotherapie.

Bei der medikamentösen Therapie konzentriert sich die Behandlung vor allem auf die Schmerztherapie und Entzündungshemmung mit Paracetamol, NSAID, COX-2-Hemmern (Coxibe), intraartikulären Glucocorticoid-Kristallsuspensions-Injektionen und Hyaluronan-Injektionen.⁷ Diese Behandlungsoptionen wirken jedoch rein symptomatisch, da der einmal zerstörte Knorpel nicht wieder aufgebaut werden kann.^{41,42} Zusätzlich steigt das Risiko von kardiovaskulären Erkrankungen sowie Magenschleimhautschädigung und -blutung mit einer langjährigen NSAID Einnahme.^{43,44,45} Diese Nebenwirkungen könnten durch eine effektive Therapie mit entzündungshemmenden Phytopharmaka möglichst verhindert werden.

Bleiben alle konservativen Therapiemethoden ohne Erfolg, kommen als *Ultima Ratio* operative Verfahren zum Einsatz. Hierbei unterscheidet man die gelenkerhaltenden Operationsverfahren wie z.B. die Osteotomie von den gelenkersetzenden endoprothetischen Verfahren.^{7,46,42}

Bestandteil der aktuellen Arthrosetherapieforschung bei traumatischen Defekten ist im operativen Bereich die autologe Knorpelzelltransplantation (ACT), die vor allem bei größeren Läsionen ($> 4 \text{ cm}^2$) zum Einsatz kommt. Dabei werden Knorpelzellen aus einem Bereich des Gelenks, der geringerer Belastung ausgesetzt ist, isoliert. Nach der Zellexpansion wird der Defekt mit den zuvor kultivierten Chondrozyten überdeckt.^{8,47} Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens ist die Matrix gestützte autologe Chondrozyten Transplantation (MACT), bei der die Knorpelzellen auf einem geeigneten Biomaterial kultiviert und dann in den Defekt eingebracht werden.^{8,48}

Trotz allem wird auch durch diese Verfahren keine *Restitutio ad integrum* erreicht und so sind Bestandteile aktueller Forschung die Wiederherstellung des Knorpels durch mesenchymale Stammzellen (MSCs) und die heterotope autologe Chondrozyten Transplantation.^{9,49,50}

Im medikamentösen Bereich gilt das Interesse vor allem der Modulation und Inhibition von entzündlichen und katabolen Prozessen auf molekularer Ebene. Im Vordergrund stehen hier Therapieverfahren, die den Entzündungsprozess im Gelenk aufhalten sollen. Dazu gehören IL-1 Rezeptor Antagonisten (Anakinra) und IL-1 β Converting Enzyme Inhibitoren.^{51,52}

1.3.1 Phytopharmaka

Ein weiterer alternativer therapeutischer Ansatz ist die Behandlung der OA mit pflanzlichen Medikamenten, sogenannten Phytopharmaka.

In dieser Arbeit werden fünf unterschiedliche Pflanzenextrakte der Firma PhytoLab auf ihre toxische und potenziell anti-inflammatorische und chondroprotektive Wirkung hin untersucht.

Bei diesen Extrakten handelt es sich um Produkte aus Birkenblättern (*Betula pendula* / *pubescens*), Brennnessel (*Urtica dioica* / *urens*), Klettenwurzel (*Arctium lappa*), Zwiebel (*Allium cepa*) und schwarzem Pfeffer (*Piper nigrum*).

In einigen Studien konnten bereits positive Effekte einiger dieser Pflanzenextrakte auf entzündliche Prozesse und teilweise auf den Metabolismus der Chondrozyten *in vitro* nachgewiesen werden.^{53,54,55,56}

Brennnesselextrakte (*Urtica dioica* / *urens*) werden schon seit einigen Jahren in der symptomatischen Behandlung der rheumatoiden Arthritis und OA eingesetzt.⁵⁷ Im Jahre 1999 konnten Riehemann et al. einen inhibierenden Effekt von Brennnesselextrakt auf den pro-inflammatorischen Transkriptionsfaktor NF- κ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), der bei vielen chronisch entzündlichen Erkrankungen erhöht und aktiviert ist, nachweisen.⁵⁸ In einer weiteren Studie zeigte ein Brennnesselextrakt dosisabhängig eine inhibierende Wirkung auf die Prostaglandin-, TNF- α und IL-1 β - Synthese.⁵⁷ Im Tiermodell konnte außerdem ein anti-inflammatorischer Effekt bei Gonarthrose festgestellt werden.⁵⁷ Durch das Brennnesselextrakt Hox alpha wurde *in vitro* die Expression von MMPs verringert und so ein weiterer möglicher therapeutischer Angriffspunkt durch Schulze-Tanzil et al. identifiziert.⁵⁹

Ebenso konnten Huh et al., bei Extrakten aus der asiatischen weißen Birke (*Betula Platyphyla* var. *Japonica*) eine supprimierende Wirkung auf MMP-1 und 3, sowie eine verminderte Synthese von COX-2 feststellen.⁶⁰ In einer weiteren Studie zeigten Huh et al., dass Extrakte aus *Betula Platyphyla* var. *Japonica* ebenfalls, die durch IL-1 β induzierte NO und PGE₂-Synthese sowie die NF- κ B Aktivität in Synoviozyten verringern.⁵⁶

Klettenwurzel (*Arctium lappa*) wird schon lange in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) eingesetzt und in vielen asiatischen Ländern als Tee mit antioxidativer und anti-inflammatorischer Wirkung verkauft.^{53,61} Zahlreiche Arbeiten beschäftigen sich deshalb mit dem inhibitorischen Effekt der einzelnen Komponenten dieser Pflanze auf die Synthese von freien Radikalen sowie auf die von NO durch die induzierte NO-Synthetase (iNOS), die auch in der Entstehung der OA eine entscheidende Rolle spielt.^{26,62} Durch NO wird nicht nur die Aktivität der COX-2 hochreguliert und somit vermehrt PGE₂ produziert, sondern ebenfalls die Apoptose des Chondrozyten induziert.⁶³

Arctium Lappa Extrakte zeigten mehrfach, dass sie ebenfalls über eine NF- κ B – Hemmung in dieses System eingreifen und so die Synthese von NO in mit Lipopolysachcharid - (LPS) stimulierten Makrophagen *in vitro* reduzieren.^{64,65,66}

Quercetin ist ein aus der Zwiebel gewonnenes Flavonoid, das auch aus anderen Pflanzen extrahiert werden kann und für das *in vitro* eine anti-inflammatorische Wirkung nachgewiesen wurde.^{67,68} Im *in vitro* Versuch von Mamani-Matsuda et al. zeigte sich für diesen Wirkstoff eine dosisabhängige Suppression der durch Makrophagen sezernierten Mediatoren TNF- α und IL-1 β .⁶⁷ Dabei wird diese Hemmung der Entzündungskaskade ebenfalls über die Inhibierung von NF- κ B reguliert.^{54,68,69} In einer Studie von Apichart et al. wurde unter dem Einfluss von Quercetin eine verstärkte SOX 9 und Kollagen Typ II Expression in Zellen der sphenoccipitalen Synchondrose von Mäusen, die sich aus Knorpelzellen formiert, nachgewiesen.⁷⁰ Durch diesen aus der Zwiebel gewonnenen Wirkstoff zeigen sich durchaus Effekte auf Mediatoren und Transkriptionsfaktoren, die auch in dieser Arbeit als mögliche therapeutische Ziele identifiziert werden.

Auch aus schwarzem Pfeffer wurde ein bestimmter Wirkstoff, das Piperin, schon mehrfach extrahiert und auf seine anti-entzündliche Wirkung hin in verschiedenen Zelltypen untersucht.

So wurde ebenfalls ein dosisabhängiger inhibitorischer Effekt auf die Expression von COX-2 durch murine Makrophagen nachgewiesen.⁷¹ Nicht nur in Makrophagen sondern auch in Synoviozyten und Chondrozyten konnte eine Hemmung der pro-inflammatorischen COX-2 durch Piperin beobachtet werden.

Mit IL-1 β stimulierte Synoviozyten zeigten unter dem Einfluss von Piperin eine verminderte Expression von COX-2 und dem pro-inflammatorischen Zytokin IL-6.⁵⁵

In den Experimenten von Ying et al. zeigte sich eine Suppression der PEG₂ und der COX-2 Expression sowie der MMP-3 und MMP-13 nach Behandlung von Chondrozyten mit einem Piperinextrakt.⁷²

Alle in dieser Arbeit verwendeten Pflanzenextrakte wurden bereits auf ihr anti-inflammatorisches Potenzial hin untersucht. Im Gegensatz zu anderen Arbeiten werden in dieser Arbeit nicht nur die Effekte der Pflanzenextrakte auf die pro-inflammatorischen Mediatoren sondern ebenfalls die Effekte auf die für den Knorpelaufbau wichtigen Genprodukte, wie Kollagen Typ II und Aggrecan, untersucht. In anderen Arbeiten wird der Fokus häufig entweder auf die katabolen oder die anabolen Mediatoren gelegt. Diese Arbeit zeigt ein breiteres Spektrum der für die Knorpelhomöostase wichtigen Mediatoren und Transkriptionsfaktoren.

Desweiteren wurden alle Experimente dieser Arbeit mit humanen Gelenkchondrozyten durchgeführt. In vielen der bereits beschriebenen Arbeiten wird die anti-inflammatorische

Wirkung der auch hier genutzten Extrakte in anderen Zellsystemen wie Makrophagen und Synoviozyten untersucht. Diese sind zwar Teil des Entzündungsprozesses, stellen jedoch nicht das letztendlich betroffene Zellsystem dar.^{56,67}

1.4 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit soll die Wirkung der von der Firma PhytoLab zur Verfügung gestellten fünf Pflanzenextrakten auf die Stoffwechselaktivität und Genexpression von humanen Gelenkchondrozyten getestet werden. Ob und inwiefern diese beeinflusst werden, ist für einen eventuellen therapeutischen Einsatz der Extrakte von enormer Bedeutung.

Hierzu wurden Chondrozyten kultiviert und mit fünf verschiedenen Extrakten in drei verschiedenen Konzentrationen (5 µg/ml, 50 µg/ml, 500 µg/ml) verblindet behandelt.

Lediglich die Herkunft der Extrakte war bekannt nicht aber die Zuordnung. Getestet wurden Birkenblätter-, Brennnessel-, Klettenwurzel-, Zwiebel- und schwarzer Pfefferextrakt.

Zunächst stellte sich die Frage nach der Auswirkung auf den Metabolismus der Zellen und die potenzielle Zytotoxizität der verschiedenen Extrakte und ebenso der verschiedenen Konzentrationen. Des Weiteren sollte der Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Genexpression der Chondrozyten unter katabolen Stoffwechselbedingungen, wie bei der OA, untersucht werden. Die Zellen wurden zu diesem Zweck mit IL-1 β vorbehandelt und erneut mit den unterschiedlichen Extrakten stimuliert. Als Zielgene wurden die wichtigsten EZM-Bestandteile Kollagen Typ II und Aggrecan ausgewählt. Als weiterer Marker für den anabolen Stoffwechsel kam der Transkriptionsfaktor SOX 9 zum Einsatz. Um das Expressionsprofil der pro-inflammatorischen Zytokine und der in arthrotischem Knorpel vorkommenden Entzündungsmediatoren beurteilen zu können wurde weiterhin IL-1 β , TNF- α , COX-2, MMP-1 und MMP-3 untersucht. Von weiterem Interesse war ebenfalls die EZM-Syntheseleistung der durch die Pflanzenextrakte behandelten Zellen. Zu diesem Zweck wurden in einem weiteren Experiment der Gesamtkollagen- und s-GAG-Gehalt der stimulierten Chondrozyten analysiert.

Bei Nachweis einer nicht toxischen und den Chondrozytenstoffwechsel anabol beeinflussenden Wirkung der Pflanzenextrakte wäre die weitere Untersuchung des therapeutischen Potenzials und die eventuelle Darreichungsform von großem Interesse für die Behandlung einer Osteoarthritis.

2 Material

2.1 Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Aceton, $\geq 99,8$ Vol%	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Alamar Blue®	Invitrogen, DE
Aqua purificata	Carl Roth GmbH & Co KG, DE
Chloramin - T - Trihydrat	Merk KGaA, DE
Chondroitin-Sulfat C	Sigma-Aldrich, USA
Citronensäure-Monohydrat	Merk KGaA, DE
DMSO - Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Dinatriumhydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co KG, DE
DMEM/Ham's F12 (1:1)	Biochrom AG, DE
EDTA - Ethylendiamintetraacetat	Sigma-Aldrich, USA
essentielle Aminosäuren (50x) MEM-AS	Biochrom AG, DE
Essigsäure, 100 Vol%	Merck KGaA, DE
EtBr - Ethidiumbromidlösung	Carl Roth GmbH & Co. KG, DE
Ethanol, 100 Vol%	Merck KGaA, DE
FDA - Fluorescein Diacetat	Sigma-Aldrich, DE
Fetales Kälberserum (FCS–hitzeinaktiviert 65°C,30 min)	Biochrom AG, DE
Gentamycin 10 mg/ ml lypophilisiert	Biochrom AG, DE
HBSS -Hanks' Balanced Salt Solution	Invitrogen, USA
Kalb-Thymus DNA 1 mg/ml	Sigma-Aldrich, USA
L-Ascorbinsäure, 25 mg/ml	Sigma AG, DE
L-Glutamin, 200 mM	Biochrom AG, DE
L-Hydroxyprolin	AppliChem GmbH, DE
Methylcellosolve (2-Methoxyethanol), $\geq 99,5\%$	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Natriumacetat	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Natriumhydroxyd	Carl Roth GmbH und Co KG, DE
Partricin, 50 µg/ml	Biochrom AG, DE
PBS - Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung	PAA Laboratories GmbH, DE

p-Dimethylaminobenzaldehyd	J.T.Baker Mallinckrodt Baker B.V, NL
Penicillin/ Streptomycin, 10 mg/ml	Biochrom AG, DE
Perchlorsäure, 0,1 mol/l	Carl Roth GmbH & Co KG, DE
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, DE
RLT Lysis Puffer	Qiagen, DE
Salzsäure Carl Roth GmbH und Co KG, DE	Carl Roth GmbH & Co KG, DE
SDS-Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH & Co KG, DE
Tris/HCl, $\geq 99\%$	Carl Roth GmbH & Co KG, DE
Trypanblau	Biochrom AG, DE
Tween 20	Sigma Aldrich, USA
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, USA

2.2 Enzyme

Tabelle 3: Verwendete Enzyme

Enzym	Hersteller
DNase I	Qiagen, DE
Kollagenase II aus <i>Clostridium histolyticum</i>	Serva Electrophoresis, DE
Pronase aus <i>Streptomyces griseus</i>	Serva Electrophoresis, DE
Proteinase-K aus <i>Engyodontium album</i>	Sigma Aldrich, USA
Trypsin (1 %) / EDTA Solution (10x)	Biochrom AG, DE

2.3 Rekombinante Zytokine

Tabelle 4: Verwendete rekombinante Zytokine

Rekombinantes Zytokin	Hersteller	Katalog #
Humanes IL-1 β	PeptoTech Inc., USA	200-01B

2.4 Quantitative Real -Time PCR (qRT-PCR) Reagenzien & Primer

Tabelle 5: Verwendete qRT-PCR Reagenzien

Real Time PCR Reagenzien	Hersteller
RNase freies Wasser	Qiagen, DE
TaqMan® Gene Expression Master Mix	Applied Biosystems, USA

Tabelle 6: Verwendete Primer

Primer	TaqMan® Gene Expression Assay ID	Größe	Hersteller
ACAN	Hs00202971_m1	93 bp	Applied Biosystems, USA
BAC	Hs99999903_m1	171 bp	Applied Biosystems, USA
COL2A1	Hs00264051_m1	124 bp	Applied Biosystems, USA
IL-1β	Hs00174097_m1	94 bp	Applied Biosystems, USA
MMP-1	Hs00233958_m1	133 bp	Applied Biosystems, USA
MMP-3	Hs00968308_m1	98 bp	Applied Biosystems, USA
PTGS2 (COX-2)	Hs00153133_m1	75 bp	Applied Biosystems, USA
SOX 9	Hs00165814_m1	102 bp	Applied Biosystems, USA
TNF-α	Hs00174128_m1	80 bp	Applied Biosystems, USA*

* Sequenzen wurden von der Firma Applied Biosystem nicht zur Verfügung gestellt

2.5 Medien

Tabelle 7: Zellkulturmedium

1 % essentielle Aminosäuren
2 mM L-Glutamin
0,5 µg/ml Partricin
100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin
1 % L-Ascorbinsäure
in DMEM/ Ham´s F-12 (1:1)

Tabelle 8: Pronaseverdau - Medium

20 mg/ml Pronase

in Ham's F-12 Medium

Tabelle 9: Kollagenaseverdau-Medium

1 mg/ml Kollagenase

0,5% FCS

in Ham's F-12 Medium

Tabelle 10: Kultivierungsmedium

90% Ham's F-12 Medium

10 % FCS

1 Vol% essentielle Aminosäuren

2 mM L-Glutamin

0,5 µg/ml Partricin

100 µg/ml Penicillin/ Streptomycin

1 Vol% L-Ascorbinsäure

Tabelle 11: Einfriermedium

10% DMSO

90% FCS

Tabelle 12: Stimulationsmedium

99% Ham's F-12 Medium

1% FCS

2.6 Puffer & Lösungen

Tabelle 13: Verwendete Puffer & Lösungen

Methoden	Puffer	Herstellung
Proteinase-K-Verdau	Proteinase-K-Verdaupuffer	50 nM Tris/HCl; 1 mM EDTA ; 0,5% Tween 20; pH 8,5
	Proteinase-K-Lösung	10 mg/ml Proteinase-K; in Reinstwasser
DNA-Gehaltsbestimmung	TE-Puffer	1 M Tris-HCL pH 8,0; 0,5 M EDTA
DMMB– (Dimethylmethylenblau) Assay	DMMB-Farbpuffer	40 mM Glycin; 40 mM Natriumchlorid; pH 3
	DMMB-Farblösung	8,9 mM DMMB in Ethanol
	PBE-(Phosphate buffered saline) -Puffer	100 mM Na ₂ HPO ₄ ; 5 mM EDTA; pH 8
	Chondroitinsulfat-Standardlösung	10 mg/ml Chondroitinsulfat; 0,9% NaCl in Reinstwasser
Hydroxyprolin-Assay	Citrat/Acetat-Puffer	0,24 M Citronensäure Monohydrat; 0,88 M Natriumacetat Trihydrat; 0,85 M Natriumhydroxyd; 1,2% Essigsäure; in Reinstwasser
	NaOH-Citrat/ Acetat-Puffer p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung	2,2% (w/v) in Citrat/Acetat-Puffer 1g p-Dimethylaminobenzaldehyd; in 5 ml Methylcellosolve
	Chloramin-T-Reagenz	14,1 mg/ml Chloramin-T; 30% Methylcellosolve; 50% Citrat/ Acetat-Puffer; 20% Reinstwasser
Lebend/Tod-Färbung	FDA/EtBr-Lösung	5 µl FDA-Stammlösung (3 mg/ml FDA in Aceton);

		1 µl Ethidiumbromidlösung in 1 ml PBS
Beschichtung der Glasplättchen	Poly-L-Lysin-Lösung	99% PBS 1% Poly-L-Lysin

2.7 Pflanzenextrakte

Tabelle 14: Verwendete Pflanzenextrakte der Firma PhytoLab

MU-Nr.	Pflanze	Etikettenzeile	DEV nativ	Zusammensetzung/ Hilfsstoffe	Auszugsmittel	Verwendetes Pflanzenteil	
15128/12	<i>Betula pendula pubescens</i>	Birkenblätter-Phy / getrocknet	ca. 5,75 : 1	60% Birkenblätter-Phy 40% Maltodextrin	Demineralisiertes Wasser	Blätter	
15129/12	<i>Urtica dioica urens</i>	Brennnessel-Phy getrocknet	ca. 5,25 : 1	50% Brennnessel-Phy 50% Maltodextrin	Demineralisiertes Wasser	Blätter	
15130/12	<i>Arctium lappa</i>	Klettenwurzel-Phy getrocknet	2,5 - 4 : 1	80% Klettenwurzel-Phy 20% Trockenglucosesirup	Wasser	Wurzel	
15131/12	<i>Allium cepa</i>	Zwiebel-Phy getrocknet	ca. 1,6 : 1	43% Zwiebel-Phy 57% Maltodextrin/ Glucosesirup	Demineralisiertes Wasser	Zwiebel	
15174/12	<i>Piper nigrum</i>	Schwarzer Pfeffer Fluid-Phy	*	100% Schwarzer Pfeffer Fluid- Phy	Ethanol 40 % (m/m)	Samen	
*	Ansatzverhältnis	Schwarzer Pfeffer		/	Ethanol	40 %	(m/m)

2.8 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 15: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Biosphere Filter Tips 0,5-1000 µl	Sarstedt AG & Co., DE
Kryoröhrchen	VWR International GmbH, DE
PCR-Platten	Biozym Scientific, DE
SafeSeal Reagiergefäße	Sarstedt AG & Co., DE
Steriflip (Porengröße 60 µm)	Millipore Corporation, USA
Zellkulturflaschen Cell+	Sarstedt AG & Co., DE
Zellschaber Techno	Plastic Products AG, CH
6-Well Multiwell	BD Becton Dickinson Labware, USA
96-Well Cell Culture Cluster Flat Bottom	Corning Incorporated, USA

2.9 Testkits

Tabelle 16: Verwendete Testkits

Kit	Hersteller	Methode
CyQuant [®] NF Cell Proliferation Assay	Invitrogen, USA	DNA-Gehaltsbestimmung
QuantiTec Reverse Transcription Kit	Qiagen, DE	cDNA-Synthese
RNeasy Mini Kit	Qiagen, DE	RNA-Isolierung

2.10 Laborgeräte & Auswertungsprogramme

Tabelle 17: Verwendete Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Chromo 4™ Real Time PCR Detector	BIO RAD, USA
CO ₂ -Inkubator ® HERAcellR 150	Thermo Scientific, DE
Einfrierbox Cryo-Safe™	neoLab, DE
Fluoreszenzmikroskop Axioskop 40	Carl Zeiss AG, DE
HERAsafeR KS Sicherheitswerkbank der Klasse II	Thermo Scientific, DE
Invertmikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss AG, DE
Mastercycler	Eppendorf AG, DE
Mikroskopiekamera Olympus XC30	Olympus Europa Holding GmbH, DE
Mikrotiterplattenreader Tecan GENios	Tecan Trading AG, CH
NanoDropR 1000 Spektrophotometer	Peqlab Biotechnologie GmbH, DE
Real Time PCR System Opticon™	MJ Research, Inc., USA

Tabelle 18: Verwendete Auswertungsprogramme

Programm	Hersteller
CellD Imaging Software	Olympus Europa Holding GmbH, DE Mikroskopie
GraphPad Prism® Version 5.02	GraphPad Software, Inc., USA Statistik
MJ Opticon Monitor™ Analyse Software, Version 3.1	MJ Research USA Real-Time-PCR, Inc.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Isolierung und Kultivierung von humanen Gelenkchondrozyten

Die für die Zellkulturexperimente benötigten primären humanen Gelenkchondrozyten wurden aus Hüftgelenkknorpel gewonnen, der im Zuge von Gelenkersatzoperationen entnommen wurde (Ethikantrag: Nr. EA4/063/06).

Für insgesamt 11 der 13 Spender mit dem durchschnittlichen Alter von ~ 76 Jahren wurde zunächst der Hüftkopfkorpel makroskopisch beurteilt, fotografiert und durch einen im Labor entwickelten makroskopischen Arthrose-Score bewertet (Tabelle 19). Auf der Skala von 0-12 Punkten, wobei eine hohe Punktzahl schwerere arthrotische Veränderungen beschreibt, wurden dabei durchschnittlich 5 Punkte erreicht. Weitere Besonderheiten in der Beschaffenheit oder dem Aussehen wurden zusätzlich ohne Punktevergabe dokumentiert.

Tabelle 19: Im Labor verwendeter Arthrosescore

Farbe		Knorpelkonsistenz (beim Schneiden)	
weiß, beige	0	normal	0
gelblich	1	zäh-wachsartig, faserig,	
deutlich graubraun/andere		gummiartig	1
Verfärbungen	2	breiig	2
Ausdehnung arthrotischer Veränderungen		Knorpeldicke	
Wie viele Quadranten des Hüftkopfes enthalten		normal (ca. > 1 mm)	0
erkennbar arthrotisches Gewebe?		fokal dünn (deutlich < 1 mm)	1
keine Arthrose	0	überwiegend dünn	2
25%	1		
50%	2		
75%	3		
Wie stark arthrotisch sieht das Gewebe aus?			
gesund	0		
leicht	1		
mittel	2		
schwer	3		

Nach der Dokumentation erfolgte der enzymatische Knorpelverdau mittels Pronase und Kollagenase um die Chondrozyten aus ihrer EZM zu isolieren.

Dafür wurde der Knorpel unter Spülung mit Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS-Lösung) vom Hüftkopf abpräpariert und die so entstandenen Knorpelchips in ein 50-ml Falcon überführt.

Für den Übernachtverdau wurden die Knorpelchips für eine Stunde in einer Lösung aus PBS und 1 % Gentamycin inkubiert um sie dann in ca. 1 mm x 1 mm große Teile zu zerschneiden.

Die so entstandenen Knorpelstückchen wurden nun zum Verdau der Knorpelmatrix in eine zuvor hergestellte 2% ige Pronase-Lösung gegeben (Tabelle 8) und für circa 45 min im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ unter ständigem Mischen bei 36 rpm auf einem Orbitalschüttler inkubiert.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Pronase abgesaugt und die Knorpelstückchen erneut mit PBS gespült. Im Anschluss wurden die Stückchen in eine Spinnerflasche überführt in der sie über Nacht in einer Suspension aus 0,1% Kollagenase und 0,5% FCS inkubiert (Tabelle 9) und bei mittlerer Drehzahl (ca. 70 Umdrehungen pro Minute) gemischt wurden.

Nach 24 h wurde die so entstandene Zellsuspension in ein 50 ml Falcon überführt und durch ein Steriflip (60 µm Porengröße) filtriert um die Chondrozyten aus der entstandenen Suspension von EZM-Resten zu trennen.

Nach Zentrifugation bei 200 g für 5 min und Zellzählung in der Neubauer Zählkammer konnten die gewonnen Chondrozyten je nach Anzahl in eine T175 (bei hoher Zellzahl) oder T75 Flasche (bei geringerer Zellzahl) ausgesät werden und danach weiter verwendet oder eingefroren werden.

3.1.2 Einfrieren von Zellen

Für das Einfrieren wurden die Zellen einer T75 Flasche mit 10 ml PBS (ohne Magnesiumionen) gespült, dann mit 2 ml 0,5% Trypsin/ Ethylendiamintetraacetat (EDTA) 5 min bei 37° Celsius abgelöst, in 5 ml 10% FCS-haltiges Kulturmedium suspendiert und 5 min bei 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml Gefriermedium (fetales Kälberserum (FCS) mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)) suspendiert und in ein Kryoröhrchen überführt.

3.1.3 Auftauen von Zellen

Zur weiteren Verwendung der Chondrozyten wurden die zuvor in Kryoröhrchen im Stickstoff gelagerten Proben wieder aufgetaut. Dazu wurden 5 ml eines 10% FCS-Kulturmediums in einer T75 Flasche vorinkubiert, die Proben im Wasserbad aufgetaut, vorsichtig in ein Falcon überführt, in dem 5 ml FCS-Medium vorlagen und suspendiert. Nach Zentrifugation bei 300 g für 5 min war ein Zellpellet zu erkennen, der Überstand wurde abgesaugt und die Zellen in 5 ml 10% igem FCS Kulturmedium resuspendiert und in die schon vorbereitete T75 Flasche

überführt. Um Wachstum und Adhäsion der Zellen zu erreichen wurden diese nun für einige Tage im Brutschrank bei 37° Celsius und 5% CO₂ inkubiert.

3.1.4 Passagieren von Zellen

Bei Erreichen einer Konfluenz von ca. 80% konnten die Zellen passagiert werden um so die Zellzahl in einer größeren Zellkulturflasche oder mehreren Flaschen zu erhöhen. Für das Passagieren wurde zunächst das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit PBS gespült. Um die Zellen vom Flaschenboden zu lösen wurden 1-2 ml Trypsin /EDTA in die Flasche gegeben und diese für ca. 5 min inkubiert. Danach ließen sich die Zellen unter leichtem Klopfen vom Flaschenboden lösen und um die weitere Wirkung von Trypsin zu unterbinden wurden 5-10 ml 10% FCS Kulturmedium in die Flasche gegeben. Durch weiteres Spülen des Flaschenbodens wurden alle Zellen in die Suspension überführt. Die Zellsuspension wurde nun in ein 50 ml Falcon überführt, bei 300 g für 5 min zentrifugiert und der Überstand erneut entfernt. Die Zellen konnten jetzt entweder in 1 ml Medium für die Zellzählung suspendiert werden oder in 20 ml resuspendiert und in einer neuen größeren Flasche ausgesät werden.

3.1.5 Zellzählung

Für die Zellzählung wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Je nach Zellpelletgröße wurden die Zellen in 1-2 ml 10% igem FCS-Medium resuspendiert. Dann wurden 20 µl Trypanblau und 10 µl Zellsuspension in einem Well einer 96-Well-Platte gemischt und 10 µl dieser Suspension in die Zählkammer gegeben. Die Zellen wurden nun in den vier Quadranten gezählt und die Zellzahl nach folgender Formel berechnet.

$$\text{Zellzahl}/4 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

3.2 Herstellung von Pflanzenextrakt – Stammlösungen

Um die vorgesehenen Stimulationen durchzuführen zu können wurden Stammlösungen mit der Konzentration 5 mg/ml aus den von der Firma PhytoLab zur Verfügung gestellten Pflanzenextrakten hergestellt. Dazu wurden jeweils 100 mg der Extrakte 1-4, die als Feststoff geliefert wurden, in 20 ml Milliporewasser gelöst und anschließend steril filtriert. Von Extrakt 5 wurden 166 µl in 20 ml Milliporewasser gelöst, da dieser bereits in Ethanol gelöst vorlag.

In der folgenden Tabelle 20 werden die einzelnen Inhaltsstoffe der jeweiligen Pflanzenextrakte aufgeschlüsselt. Die genaue Zusammensetzung lässt sich der Tabelle 14 entnehmen.

Tabelle 20: Inhaltsstoffe der verwendeten Pflanzenextrakte

Pflanzenextrakt Nr.	Inhaltsstoff
Phy-1	Birkenblätter
Phy-2	Brennnessel
Phy-3	Klettenwurzel
Phy-4	Zwiebel
Phy-5	Schwarzer Pfeffer

3.3 Beschichten von Poly-L-Lysin Glasplättchen

Um die Zelladhärenz bei der Besiedelung von Glasplättchen zu erhöhen und eine gleichmäßige Zellverteilung zu ermöglichen wurden diese zuvor mit Poly-L-Lysin beschichtet. Dazu wurden die Plättchen für 20 min mit einer 10 µg/ml Poly-L-Lysin Lösung überschichtet und anschließend mit sterilem Wasser gewaschen und für 2 h getrocknet. Nun konnten die Glasplättchen mit Chondrozyten besiedelt werden.

3.4 Stoffwechselaktivitätsnachweis

3.4.1 mittels Alamar Blue Assay

Mittels des bereits im Labor etablierten Alamar Blue Assays wurde die Stoffwechselaktivität unbehandelter und behandelter Chondrozyten über 24 h gemessen. Der Test beruht auf der Messung des Absorptionsspektrums, das sich während der Reduktion des blauen Farbstoffs Resazurin zum rosafarbenen Farbstoff Resofurin ändert. Diese Reaktion spiegelt die metabolische Aktivität und somit indirekt die Zellvitalität wieder. Die zu testenden Pflanzenextrakte wurden so auf ihre potenzielle Zelltoxizität getestet.^{73,74}

Die humanen Chondrozyten wurden in einer definierten Zellzahl von 5000 Zellen/ Well in eine 96-Well-Platte mit jeweils 2 ml 10% FCS Kulturmedium eingebracht und über 24 h inkubiert. Nach erfolgter Zelladhäsion wurde der Zellrasen jeweils mit 100 µl einer Suspension aus Zellkulturmedium, 10% Alamar Blue Farbstoff und dem jeweiligen Pflanzenextrakt Phy-1-5 in den Konzentrationen 5 µg/ml, 50 µg/ml und 500 µg/ml behandelt. Als Negativ-Kontrollen wurden unbehandelte Zellen mit 10 % Alamar Blue Farbstoff, eine Kavität mit reinem Medium ohne Zellen und eine mit Zellkulturmedium und 10% Alamar Blue Farbstoff ohne Zellen

mitgeführt. Als zytotoxische Positiv-Kontrolle diente Natriumdodecylsulfat (SDS) (10^{-3} mol/l) (Tabelle 21). Jeder Versuchsansatz wurde in einer Dreifachbestimmung angesetzt und gemessen. Die Messung der Absorption erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 570$ nm und einer Referenzwellenlänge von $\lambda = 595$ nm. Während der ersten sieben Stunden wurden stündliche Messungen durchgeführt und dann eine weitere Messung nach 24 h.⁷⁵

Tabelle 21: Übersicht eingesetzter Extraktkonzentrationen bei der Zytotoxizitätstestung

Behandlung		Eingesetzte Konzentrationen
Kontrolle I		Unbehandelte Zellen + Alamar Blue
Kontrolle II		Medium
Kontrolle III		Medium + Alamar Blue
Kontrolle IV		SDS, 10^{-3} mol/l
Phy-1	Birkenblätter	Phy-1- 5 μ g/ml
		Phy-1- 50 μ g/ml
		Phy-1- 500 μ g/ml
Phy-2	Brennnessel	Phy-2- 5 μ g/ml
		Phy-2- 50 μ g/ml
		Phy-2- 500 μ g/ml
Phy-3	Klettenwurzel	Phy-3- 5 μ g/ml
		Phy-3- 50 μ g/ml
		Phy-3- 500 μ g/ml
Phy-4	Zwiebel	Phy-4- 5 μ g/ml
		Phy-4- 50 μ g/ml
		Phy-4- 500 μ g/ml
Phy-5	Schwarzer Pfeffer	Phy-5- 5 μ g/ml
		Phy-5- 50 μ g/ml
		Phy-5- 500 μ g/ml

3.4.2 mittels Lebend–Tod-Färbung

Zur optischen Darstellung der Zellvitalität unter Einfluss der Pflanzenextrakte Phy-1-5 wurde eine Lebend-Tod-Färbung mittels Fluoreszeindiazetat (FDA) und Ethidiumbromid (EB) durchgeführt. Dafür wurden Chondrozyten auf mit Poly-L-Lysin beschichteten Glasplättchen

angezüchtet und nach 24 h mit Phy-1-5 in den jeweiligen Konzentrationen 5 µg/ml, 50 µg/ml und 500 µg/ml stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Chondrozyten. Um nun die Reaktion der Zellen auf die Stimulation sichtbar zu machen folgte nach weiteren 24 h die Färbung mit FDA und EB. Zur Herstellung der Färbelösung wurden 3 mg FDA in 1 ml Aceton gelöst. Aus dieser FDA-Stammlösung wurden 5 µl in 1 ml PBS gegeben und 1 µl der gebrauchsfertigen EB-1% igen- Stammlösung ergänzt. 100 µl dieser Färbelösung konnten nach Spülung der Glasplättchen mit PBS auf die Zellen appliziert werden.

FDA wird nach Eindringen in eine vitale Zelle von deren Esterasen von seiner nicht fluoreszierenden Form in die grün fluoreszierende Form gespalten und akkumuliert in der Zelle.^{76,77} Tote Zellen werden durch den in die DNA interkalierenden Farbstoff EB fluoreszenzmarkiert und erscheinen rot. Die Reaktion wurde unter dem Fluoreszenzmikroskop photodokumentiert.

3.5 Stimulationsversuche zur Gewinnung von RNA für die Genexpressionsanalyse

Um die Wirkung der einzelnen Pflanzenextrakte auf Chondrozyten und deren Genexpressionsprofil analysieren zu können wurden zunächst Chondrozyten in definierter Zellzahl von ca 21.000 Zellen/cm² in eine 6-Well Platte ausgesät und für 48 h in 10% Kulturmedium kultiviert. Bei ausreichender Adhäsion der Zellen wurden diese in serumarmen Kulturmedium (1% FCS) 3 h vorinkubiert. Nach der Vorbehandlung wurden die Chondrozyten mit den jeweiligen Pflanzenextrakten, die in den Konzentrationen 5 µg/ml und 50 µg/ml in serumarmes Medium gegeben wurden, für 30 min bei 37° C und 5% CO₂ inkubiert.

Nach 30 min wurden die Zellen dann für die nächsten 24 h mit dem jeweiligen Extrakt und 10ng/ml IL-1β stimuliert. Als Kontrollen wurden sowohl unbehandelte Zellen, Zellen, die nach 30 min ausschließlich mit IL-1β behandelt wurden und Zellen, die nur mit den jeweiligen Pflanzenextrakten behandelt wurden, mitgeführt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Eingesetzte Extrakt- und Zytokinkonzentrationen bei den Stimulationsversuchen für die Genexpressionsanalysen

Behandlung		0h	1/2h
Kontrolle -unbehandelt		unbehandelt	-
Kontrolle-IL-1 β		-	+ IL-1 β 10 ng/ml
Phy-1	Birkenblätter	Phy-1-50 μ g/ml	-
		Phy-1-5 μ g/ml	+ IL-1 β 10 ng/ml
		Phy-1-50 μ g/ml	+ IL-1 β 10 ng/ml
Phy-2	Brennnessel	Phy-2-50 μ g/ml	-
		Phy-2-5 μ g/ml	+ IL-1 β 10 ng/ml
		Phy-2-50 μ g/ml	+ IL-1 β 10 ng/ml
Phy-3	Klettenwurzel	Phy-3-50 μ g/ml	-
		Phy-3-5 μ g/ml	+ IL-1 β 10 ng/ml
		Phy-3-50 μ g/ml	+ IL-1 β 10 ng/ml
Phy-4	Zwiebel	Phy-4-50 μ g/ml	-
		Phy-4-5 μ g/ml	+ IL-1 β 10 ng/ml
		Phy-4-50 μ g/ml	+ IL-1 β 10 ng/ml
Phy-5	Schwarzer Pfeffer	Phy-5-50 μ g/ml	-
		Phy-5-5 μ g/ml	+ IL-1 β 10 ng/ml
		Phy-5-50 μ g/ml	+ IL-1 β 10 ng/ml

3.6 Genexpressionsanalyse

3.6.1 RNA- Isolierung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die zuvor stimulierten Zellen mit PBS gespült und dann mit jeweils 250 µl Lysepuffer (hergestellt aus 990 µl RLT-Puffer und 10 µl β-Mercaptoethanol) versetzt. Zur RNA Isolierung wurde das RNeasy Mini Kit von Qiagen nach den entsprechenden Herstellerangaben verwendet. Die Konzentration der gewonnenen 30 µl RNA wurde am NanoDrop gemessen und die gewonnene RNA bis zur weiteren Verwendung bei -80° C eingefroren.

3.6.2 RNA Konzentrationsmessung

Um die Konzentration und Reinheit der zuvor gewonnenen RNA zu ermitteln, wurde eine photometrische Messung am NanoDrop durchgeführt. Dazu wurde 1 µl der isolierten RNA benötigt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260$ nm. Zur Bestimmung der Reinheit und Intaktheit wurde der Absorptionsquotient A_{260}/A_{280} herangezogen, bei dem Werte zwischen 1,9-2,0 für reine, nicht degradierte RNA sprechen.

3.6.3 cDNA-Synthese

Zur Durchführung der Genexpressionsanalyse wurde nun die gewonnene RNA mittels des Quantitect Reverse Transcription Kit von Qiagen nach Herstellerangaben in cDNA mit unterschiedlichem Endvolumen abhängig von der Konzentration der gewonnenen RNA umgeschrieben. Diese wurde dann bei -20°C gelagert.

3.6.4 Prinzip der quantitativen Real Time PCR

Bei der quantitativen Real Time PCR handelt es sich um ein Verfahren, das anhand von Fluoreszenz-markierten Sonden Aussagen über die Menge der vorhandenen cDNA trifft. Dabei nimmt die Fluoreszenz proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu und die Quantifizierung findet in Echtzeit statt.^{78, 79} Als Messergebnis werden die sogenannten Ct-Werte (Threshold-Cycle) herangezogen. Diese spiegeln die Anzahl der Zyklen wieder, die benötigt werden, um ein konstant definiertes Fluoreszenzniveau zu erreichen.⁷⁹ Als Kontrolle dient ein Referenzgen, das ubiquitär und durch die auf die Zellen einwirkenden Faktoren kaum beeinflusst, möglichst konstant exprimiert wird.⁷⁹ Die Expression der zu untersuchenden Proben wird auf dieses house keeping Gen bezogen und unter Einbeziehung der Primer-Effizienz normalisiert.^{79,78}

Bei der optimalen Effizienz verdoppelt sich die DNA-Menge in jedem Zyklus entsprechend einer Effizienz von 2. Im realen Experiment liegt die Effizienz jedoch zwischen 1,7-1,9.^{79,78}

Bei der Berechnung der Ratio wird deshalb eine Effizienzkorrektur vorgenommen.

$$E = \frac{(E_{\text{Zielgen}})^{\Delta CT_{\text{Zielgen (Kontrolle-Probe)}}}}{(E_{\text{Referenzgen}})^{\Delta CT_{\text{Referenzgen (Kontrolle-Probe)}}}}$$

3.6.5 Effizienzbestimmungen

Für die Ermittlung der Genexpression ist es von entscheidender Bedeutung, mit welcher Effizienz die Primer an die Zielgenesequenz binden. Wie bereits in 3.6.4 erläutert, entspricht eine Effizienz von 2,0 dabei einer optimalen Effizienz von 100% und würde die Verdopplung der DNA in jedem Zyklus voraussetzen.⁷⁹ Der anzustrebende Schwankungsbereich liegt deshalb zwischen 1,5 und 2,0.

Für die im Experiment verwendeten Primer der Zielgene β -Aktin (BAC), SOX 9, IL-1 β , TNF- α , MMP-3 & COX-2 lagen bisher keine Effizienzbestimmungen für humane Gelenkchondrozyten im Labor vor. Die Effizienzbestimmung fand anhand einer Verdünnungsreihe der cDNA eines Spenders der Passage 3 (P3) in sechs Verdünnungsstufen und im Dreifachansatz statt. Über die ermittelten Ct-Werte konnte die Effizienz (E) mittels Regressionsanalyse aus der Steigung berechnet werden.

$$E = 10^{\left(-\frac{1}{\text{Steigung}}\right)}$$

3.6.6 Durchführung der qRT-PCR

Um das Genexpressionsprofil der humanen Gelenkchondrozyten nach Stimulation mit den verschiedenen Pflanzenextrakten beschreiben zu können wurde eine umfangreiche Expressionsanalyse von Genen, die für den chondrozytären Phänotyp und das Remodelling der extrazellulären Knorpelmatrix von Bedeutung sind, vorgenommen. Bei diesen handelte es sich um COL2A1, ACAN, SOX 9, und MMP-1 sowie MMP-3.

Da bei der Coxarthrose auch Entzündungsprozesse im Gelenk eine wichtige Rolle spielen, wurde ebenfalls die Expression der Gene IL-1 β , TNF- α und COX-2 analysiert.

Das house keeping Gen BAC wurde bei allen Versuchen als Referenzgen verwendet. Das Reaktionsvolumen von 20 μ l für die PCR bestand aus den in Tabelle 23 aufgeführten Reagenzien.

Tabelle 23: Zusammensetzung des qRT-PCR Ansatzes der Firma Applied Biosystem (ABI)

qRT-PCR Reaktionsansatz ABI	Volumen
TaqMan Gene Expression Master Mix	10 µl
TaqMan Gene Expression Primer	1 µl
cDNA	1 µl
RNase freies Wasser	8 µl

Die PCR lief nach dem Cycloprotokoll der Firma ABI ab (Tabelle 24).

Tabelle 24: Cycloprotokoll ABI

Schritt	Temperatur (°C)	Dauer	Prozess
1	50	2 min	UNG Aktivierung
2	95	10 min	Inkubation
3	95	15 sec	Denaturierung
4	60	1 min	Annealing und Elongation
5	-	-	Lesen der Platte
6	-	-	Zurück zu Schritt 3 für weitere 40 Zyklen

UNG: Uracil-N-Glycosylase

Die Auswertung erfolgte mittels des Programms Opticon Monitor 3. Die relative Genexpression der einzelnen Zielgene wurde, wie in 3.7.4. beschrieben, ermittelt.

3.7 Bestimmung des Gesamtgehalts sulfatierter (s-)Glykosaminoglykane und des Gesamtgehalts von Kollagen

Die von den kultivierten Chondrozyten gebildeten und ins Medium abgegebenen sowie die in den Zellen enthaltenen s-GAG und Kollagene lassen sich nach Lysierung der Zellen in mehreren Versuchsschritten bestimmen. Hierzu wurden Zellen im Doppelansatz unter Einfluss der verschiedenen Pflanzenextrakte und IL-1 β angezüchtet. Wobei unbehandelte Zellen, nur mit IL-1 β stimulierte und nur mit dem jeweiligen Pflanzenextrakt behandelte Zellen als Kontrollgruppen dienen (siehe Tabelle 25). Die Inkubationszeit betrug 24 h.

Für den Versuch wurden pro Well 150.000 Zellen eingesetzt.

Tabelle 25: Stimulationsschema für die Bestimmung des s-GAG - und Gesamtkollagen-gehalts

Behandlung		0 h	1/2 h
Kontrolle I		unbehandelt	-
Kontrolle II		unbehandelt	IL-1 β 10 ng/ml
Kontrolle-Phy-1	Birkenblätter	5 μ g/ml	-
Phy-1		5 μ g/ml	IL-1 β 10 ng/ml
Kontrolle-Phy-2	Brennnessel	5 μ g/ml	-
Phy-2		5 μ g/ml	IL-1 β 10 ng/ml
Kontrolle-Phy-3	Klettenwurzel	5 μ g/ml	-
Phy-3		5 μ g/ml	IL-1 β 10 ng/ml
Kontrolle-Phy-4	Zwiebel	5 μ g/ml	-
Phy-4		5 μ g/ml	IL-1 β 10 ng/ml
Kontrolle-Phy-5	Schwarzer Pfeffer	5 μ g/ml	-
Phy-5		5 μ g/ml	IL-1 β 10 ng/ml

Um den ins Medium abgegebenen s-GAG- und Kollagengehalt bestimmen zu können wurde vor Beginn der Versuche das Kulturmedium aus dem Well abgezogen und in separate Eppendorfgefäße gegeben. Danach folgte eine Lysierung der zurück gebliebenen Zellen mittels Proteinase-K Verdau. Der so gewonnene Zellextrakt wurde ebenfalls zur weiteren Analyse in Eppendorfgefäße überführt. Sowohl das zuvor separierte Zellkulturmedium wie auch das gewonnene Zelllysat wurden durch Zentrifugation bei 10.000 g von Zelldebris getrennt und nur die Überstände zur weiteren Untersuchung genutzt. Um den Proteoglykan – und Kollagengehalt in μ g/ 10^6 Zellen bestimmen zu können musste zunächst der DNA-Gehalt jeder Probe ermittelt werden. Dieses gelang mit dem CyQuant[®] NF Cell Proliferation Assay Kit der Firma Invitrogen, das über interkalierende Farbstoffe die DNA Fluoreszenz-markiert. Die Absorption wurde bei der Extinktion 485 nm / 530 nm im Tecan mittels CyQuantNF Programm gemessen. Als Standard wurde Kälber Thymus DNA in einer definierten Verdünnungsreihe mitgeführt.

3.7.1 mittels s-GAG-Bestimmung

s-GAG bilden, gebunden an ein Coreprotein, die Proteoglykane. Dementsprechend korrelieren die Konzentrationen von s-GAG und Proteoglykanen miteinander. Der s-GAG-Gehalt lässt sich mittels Dimethylmethylenblau (DMMB)-Assay bestimmen und ermöglicht einen Rückschluss auf den s-GAG-Gehalt der Probe.

Zur Quantifizierung wurde das gewonnene Zelllysate 1:2 mit Polybuffer exchanger (PBE)-Puffer verdünnt. Der zu Anfang gewonnene Zellkulturüberstand wurde unverdünnt eingesetzt. Zur Absorptionsmessung wurden nun 20 µl im Dreifachansatz in ein Well vorgelegt. Die Messung erfolgte sofort nach Zugabe von 180 µl einer 1: 133 mit DMMB-Farbpuffer verdünnten DMMB-Farblösung. Durch die Komplexbildung der negativ geladenen s-GAG mit dem positiven DMMB kommt es zu einer Änderung des Absorptionsspektrums. Dieser Shift kann zwischen einer Wellenlänge von $\lambda = 525$ nm Extinktion und $\lambda = 595$ nm Referenz gemessen werden. Die s-GAG Konzentration wurde anhand des mitgeführten Chondroitin-Sulfat-Standards ermittelt und auf die zuvor berechnete Zellzahl bezogen.

3.7.2 mittels Hydroxyprolin-Bestimmung

Hydroxyprolin, eine α -Aminosäure, ist als wichtiger Bestandteil im Kollagen gebunden, deshalb lässt eine Hydroxyprolin-Bestimmung Rückschlüsse auf den Gesamtkollagengehalt einer Probe zu. Für die Bestimmung wurden 25 µl jeder Probe mit 25 µl HCL 6 mol/l über Nacht bei 105°C hydrolysiert. Das entstandene Hydrolysat wurde mit 50 µl NaOH-Citrat/Acetat-Puffer neutralisiert und 1:2 mit Citrat/Acetat-Puffer verdünnt. Jede Messung umfasste die Bestimmung eines Leerwertes, der nur Citrat/Acetat-Puffer enthielt, eine Hydroxyprolin-Verdünnungsreihe als Standard und die einzelnen Proben. Jeder Ansatz wurde jeweils mit 250 µl Chloramin-T-Reagenz versetzt und bei Raumtemperatur (RT) 20 min inkubiert. Während dieser Zeit oxidiert das freie Hydroxyprolin zu Pyrrol.⁸⁰ Dieses reagiert nach Zugabe von 250 µl Perchlorsäure, weiterer Inkubation bei RT für 12 min und Zusatz von p-Dimethylaminobenzaldehyd, sowie nach Inkubation bei 60° C und Schütteln bei 400 rpm für weitere 20 min, zu einem Chromophor.⁸⁰ Dessen Lichtabsorption konnte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 565$ nm im Tecan gemessen werden. Für die Messung wurden jeweils 150 µl jeder Probe in ein Well einer 96-Well-Platte gegeben. Durch die Berechnung der Hydroxyprolinkonzentration konnte nun der Kollagengehalt der Proben nach folgenden Formeln berechnet werden.

Berechnung der Hydroxyprolinkonzentration in µg/ml

$$c_{Hyp} = \frac{(Extinktion_{Probe} \times c_{Standard})}{Extinktion_{Standard}}$$

Berechnung der Hydroxyprolinmasse in mg

$$m_{Hyp} = c_{Hyp} \times Verdünnungsfaktor \times 0,15 \text{ ml} \times 0,001$$

Berechnung der Kollagenmasse in mg

$$m_{Kollagen} = m_{Hyp} \times 7,1 \text{ [Umrechnungsfaktor von Hydroxyprolin zu Kollagen]}$$

(Homicz et al., 2003)

Berechnung des prozentualen Kollagengehaltes

$$\%_{Kollagen} = \frac{(m_{Kollagen} \times 100)}{Trockengewicht_{Probe} \text{ in mg}}$$

Wie auch der s-GAG- Gehalt wurde nun ebenfalls der Kollagengehalt auf die zuvor ermittelte Zellzahl bezogen.

3.8 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism 5. Zur Prüfung eines Vorliegens einer Gaußschen Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test eingesetzt. Für die Identifizierung von Ausreißern kam der Grubbs Ausreißertest zum Einsatz. Der gepaarte one sample t-Test wurde zum Vergleich zwischen Kontroll- und Behandlungsgruppe angewendet. Für den Vergleich der Gruppen untereinander wurde zusätzlich eine ANOVA Varianzanalyse durchgeführt. Der Standardfehler (SEM) wurde abgetragen. Als Signifikanzniveau wurde, wie üblich, $p^* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$ festgesetzt

4 Ergebnisse

4.1 Makroskopische Ergebnisse – Arthrosescore

Tabelle 26: Arthrosescore aller verwendeten Spender

Spender	Farbe	Ausdehnung	Aussehen	Konsistenz	Dicke	Gesamtscore
hGC 235	kein Score erhoben					
hGC 245	kein Score erhoben					
hGC 257	2	2	2	0	1	7
hGC 261	1	3	3	1	1	9
hGC 268	1	0	0	0	0,5	1,5
hGC 281	0	0	0	0	1	1
hGC 282	1	0	0	0	1	2
hGC 283	1	1	1	1	2	6
hGC 284	1	3	3	2	2	11
hGC 285	2	1	1	0	0	4
hGC 288	0	3	3	0	0	6
hGC 287	1	1	1	0	1	4
hGC 257	2	2	2	0	1	7

Die hier gezeigten Gesamtscorewerte berechnen sich aus dem in Tabelle 19 erhobenen im Labor etablierten makroskopischen Arthrosescore.

Wie in Tabelle 26 zu sehen, konnte für 11 der 13 Spender ein Score erhoben werden.

Nur zwei der Spender haben einen sehr hohen Score (hGC 261 & hGC 284) bei den restlichen Spendern wurden makroskopisch nur geringe bis kaum arthrotische Veränderungen festgestellt.

4.2 Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Zellmorphologie

Die Auswirkung der zu testenden Pflanzenextrakte auf die Morphologie der Chondrozyten wurde nach dem Stimulationsversuch 3.4.1 lichtmikroskopisch untersucht und photodokumentiert (Abbildung 3).

Dabei zeigten die Zellen eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie, wie üblich für Chondrozyten in einer Monolayerkultur. Unter dem Einfluss der Pflanzenextrakte konnte nur vereinzelt eine

Veränderung der Morphologie der Zellen beobachtet werden. Vor allem in den 500 $\mu\text{g/ml}$ Konzentrationen der Pflanzenextrakte 1, 2 und 3 ließen sich eine verminderte Zelladhärenz und leichte Abrundung der Chondrozyten nachweisen.

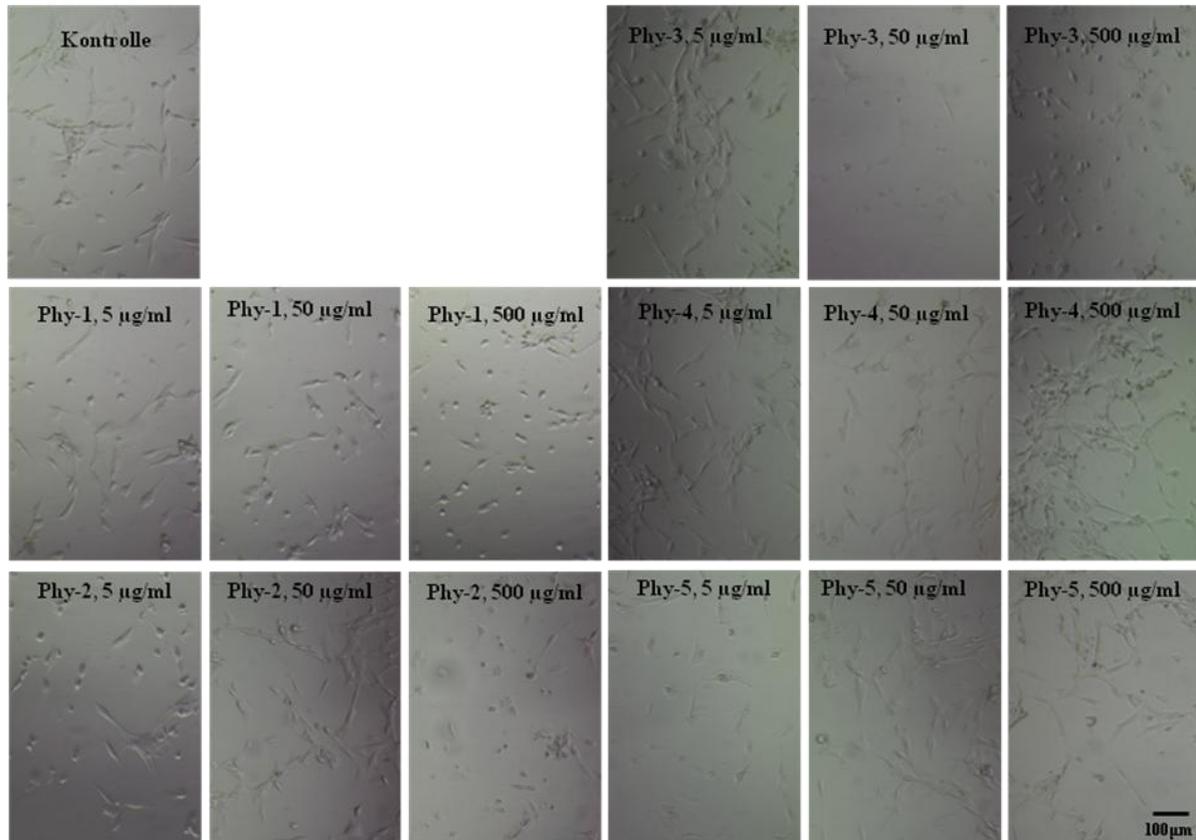


Abbildung 3: Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Zellmorphologie humaner Chondrozyten

Die Zellen wurden zuvor mit den jeweiligen Pflanzenextrakten (1-5) in drei Konzentrationen (5, 50 oder 500 $\mu\text{g/ml}$) für 24 h behandelt. Als Kontrolle (links oben) wurden unbehandelte Zellen mitgeführt. Exemplarisch werden hier repräsentative Bilder eines Spenders gezeigt. Insgesamt wurden vier Spender aus unabhängigen Experimenten photodokumentiert.

4.3 Einfluss der Pflanzenextrakte auf die metabolische Aktivität und die Zellvitalität

4.3.1 mittels Alamar Blue Assay

Bei der Untersuchung der metabolischen Aktivität der behandelten Zellen zeigte sich bereits nach 7 h eine signifikante Suppression der Stoffwechselaktivität bei der Positivkontrolle (SDS) und den mit Phy-1, Phy-2, Phy-3 und Phy-5 (alle mit 500 µg/ml) behandelten Chondrozyten. Phy-5 induzierte bereits zu diesem Zeitpunkt einen signifikant hemmenden Effekt auf Höhe des SDS Niveaus (Abbildung 4), das als toxische Kontrolle mitgeführt wurde.

Nach 24 h war eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität bei mit Phy-1 behandelten Zellen in allen getesteten Konzentrationen zu erkennen. Ebenfalls konnte eine signifikante Suppression bei Phy-2, Phy-3, Phy-4 und Phy-5 in den höchsten eingesetzten Konzentrationen (500 µg/ml) beobachtet werden (Abbildung 3). Die Reduktion der metabolischen Aktivität war bei Behandlung der Zellen mit Phy-3 und Phy-4 nur moderat. Phy-5 (500 µg/ml) allerdings supprimierte die Stoffwechselaktivität der behandelten Zellen hoch signifikant stärker als SDS.

Zum Messzeitpunkt 24 h ließen sich weitere signifikante Unterschiede in der metabolischen Aktivität zwischen den mit SDS behandelten Zellen und Phy-4 (50 µg/ml) und Phy-5 (5 µg/ml) erkennen. Bei der Behandlung mit SDS war die metabolische Aktivität signifikant geringer als bei Stimulation mit Phy-4 (50 µg/ml) und Phy-5 (5 µg/ml). Ebenfalls war ein signifikanter Unterschied der hemmenden Effekte von Phy-5 bei der Stimulation mit der höchsten Konzentrationen im Vergleich zu den Konzentrationen 5 & 50 µg/ml zu beobachten (Abbildung 5). Auch die Extrakte Phy-1, Phy-2 und Phy-3 ließen eine signifikante Reduktion der Stoffwechselaktivität in der höchsten Konzentration erkennen.

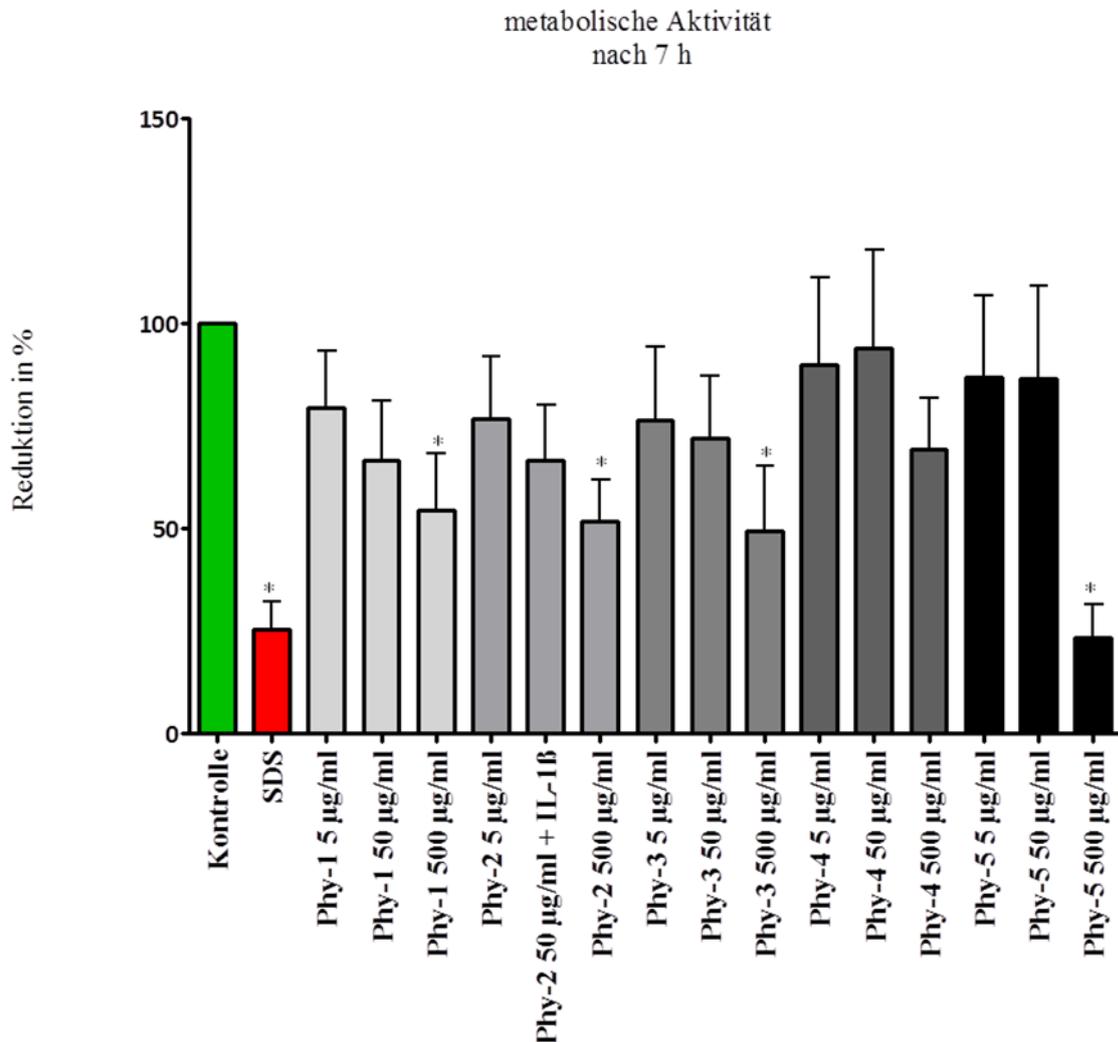


Abbildung 4: Metabolische Aktivität humaner Chondrozyten unter dem Einfluss von verschiedenen Pflanzenextrakten nach 7 h.

Die Chondrozyten wurden mit den fünf verschiedenen Pflanzenextrakten (Phy-1 – Phy-5) in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen (5, 50, 500 µg/ml) 7 h behandelt. Der Alamar Blue Test wurde verwendet. Unbehandelte Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Als Kontrolle für einen induzierten Zelltod dienten mit SDS (10^{-3} mol/l) behandelte Zellen. Der Messzeitpunkt 7 h wurde als Zwischenergebnis gewählt. $n = 4$.

* signifikanter Unterschied beim Vergleich einer behandelten Probe mit der unbehandelten Kontrolle.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

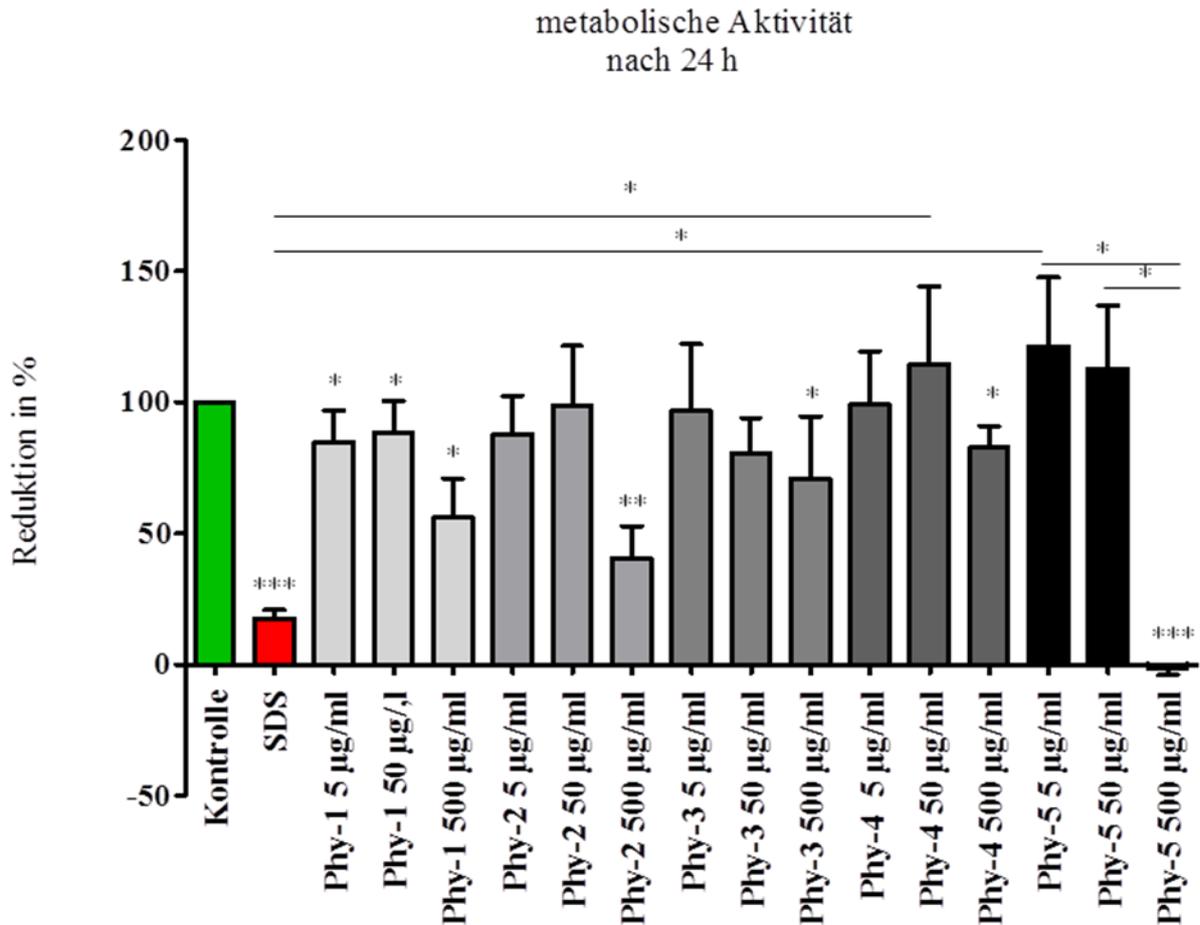


Abbildung 5: Metabolische Aktivität humaner Chondrozyten unter dem Einfluss von verschiedenen Pflanzenextrakten nach 24 h.

Die Chondrozyten wurden mit den fünf verschiedenen Pflanzenextrakten (Phy-1 – Phy-5) in jeweils drei verschiedenen Konzentrationen (5, 50, 500 µg/ml) 24 h behandelt. Der Alamar Blue Test wurde verwendet. Unbehandelte Zellen wurden als Negativkontrolle mitgeführt. Als Kontrolle für einen induzierten Zelltod dienten mit SDS (10^{-3} mol/l) behandelte Zellen. Der Messzeitpunkt 24 h wurde als Endergebnis gewählt. $n = 4$.

* signifikanter Unterschied beim Vergleich einer behandelten Probe mit der unbehandelten Kontrolle. ** signifikanter Unterschied beim Vergleich behandelter Proben in der Varianzanalyse.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

4.3.2 mittels Lebend-Tod-Färbung

Um die Wirkung der Pflanzenextrakte auf die Vitalität der humanen Gelenkchondrozyten zu visualisieren wurde eine qualitative Lebend-Tod-Färbung durchgeführt.

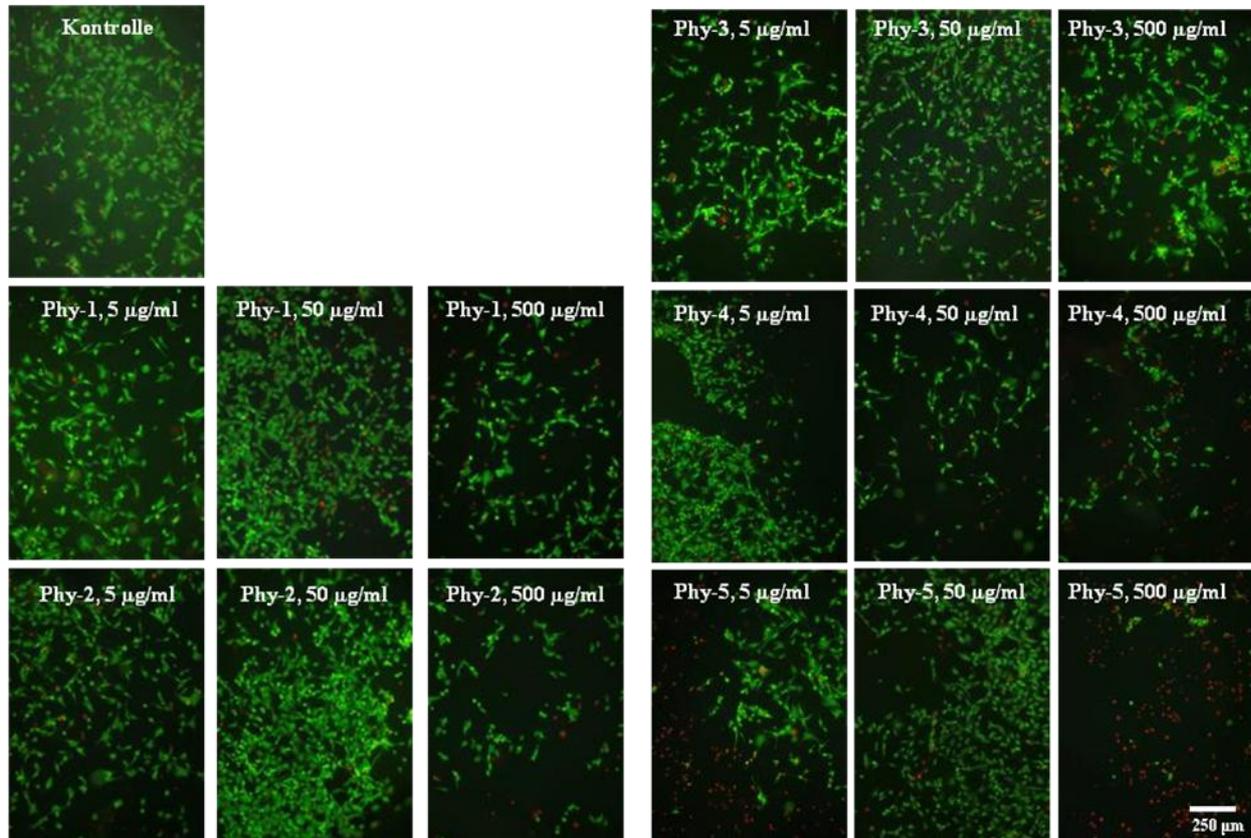


Abbildung 6: Vitalitätsprüfung humaner Chondrozyten mittels FDA/EB- Färbung.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Chondrozytenkulturen nach 24 h und Behandlung mit Phy-1-5 in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen (5, 50 und 500 µg/ml) nach FDA/EB- Färbung. Exemplarisch werden Bilder eines Spenders gezeigt. Insgesamt wurde die Methode in sieben unabhängigen Experimenten mit Zellen unterschiedlicher Spender durchgeführt. Grün: lebende Zellen; Rot: tote Zellen.

Wie in Abbildung 6 dargestellt, nahmen die Pflanzenextrakte Phy-1-4 in den Konzentrationen 5 und 50 µg/ml kaum Einfluss auf die Proliferation und Vitalität der Chondrozyten. Die höchste Konzentration (500 µg/ml) hatte bei allen Pflanzenextrakten eine suppressive Wirkung auf das Zellwachstum.

Phy-5 beeinflusste die Zellvitalität bereits in der geringsten Konzentrationen (5 µg/ml) aber vor allem in der höchsten Konzentration (500 µg/ml) zeigten sich vermehrt tote Zellen.

Auf Grund der Ergebnisse des Alamar Blue Tests und der hiermit korrelierenden Ergebnisse der Lebend-Tod-Färbung wurde die höchste Konzentration (500 µg/ml) aller Pflanzenextrakte von der nachfolgenden Genexpressionsanalyse mittels PCR ausgeschlossen.

4.4 Genexpressionsanalysen

4.4.1 Effizienzbestimmung

Anhand der DNA-Verdünnungsreihe eines Spenders wurden die bisher noch nicht bestimmten Effizienzen für die Primer BAC (Abbildung 7), SOX 9 (Abbildung 8), IL-1 β (Abbildung 9), TNF- α (Abbildung 10), MMP-3 (Abbildung 11) und COX-2 (Abbildung 12) ermittelt.

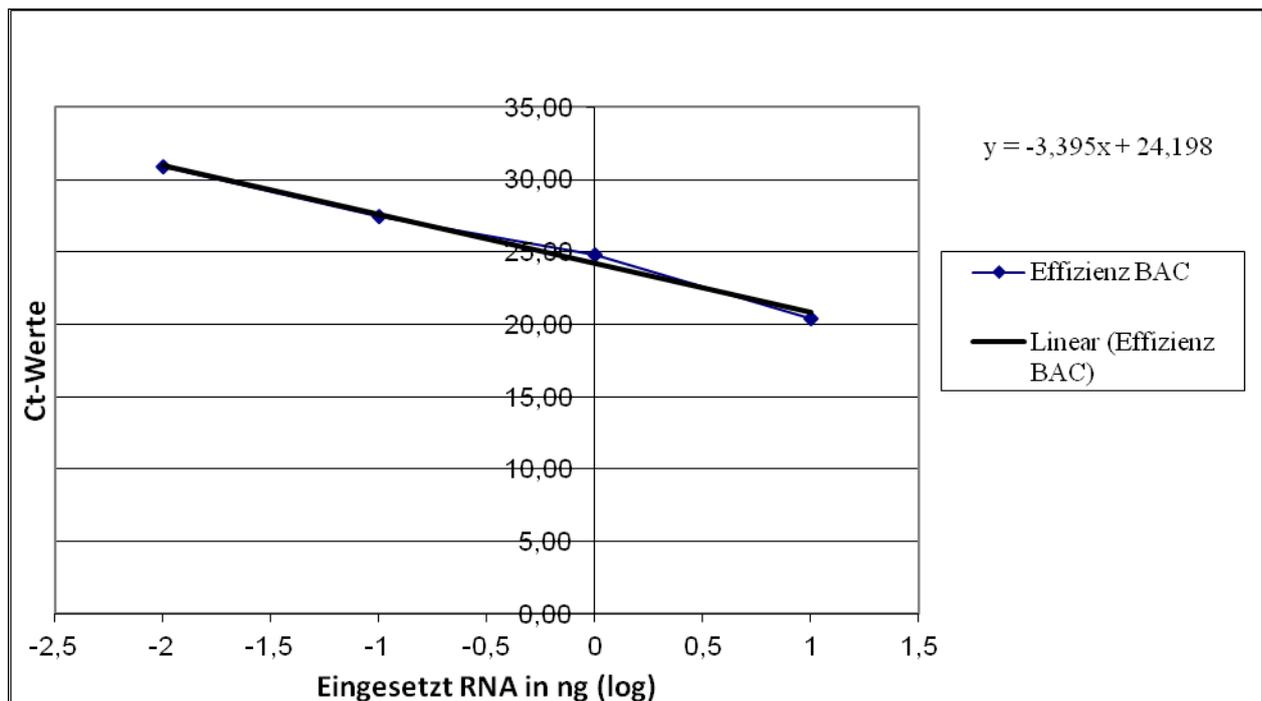


Abbildung 7: Effizienzbestimmung des Primers BAC für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.

Aufgetragen wurden die Ct-Werte einer Verdünnungsreihe gegen den Logarithmus der Menge eingesetzter RNA in ng.

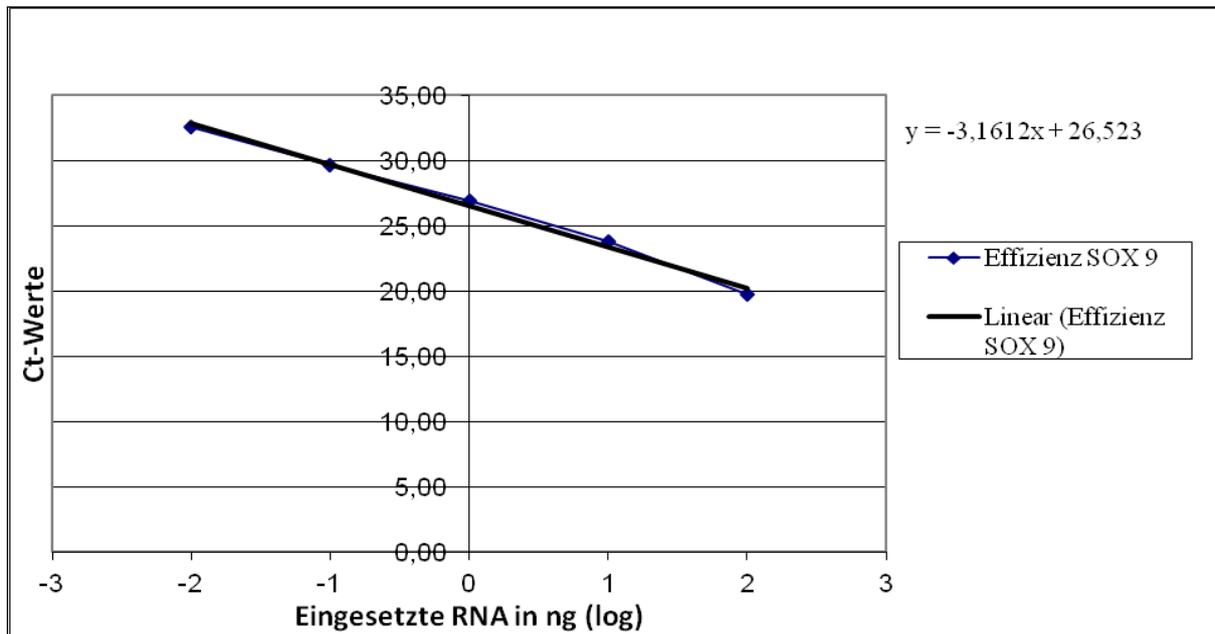


Abbildung 8: Effizienzbestimmung des Primers SOX 9 für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.

Aufgetragen wurden die Ct-Werte einer Verdünnungsreihe gegen den Logarithmus der Menge eingesetzter RNA in ng.

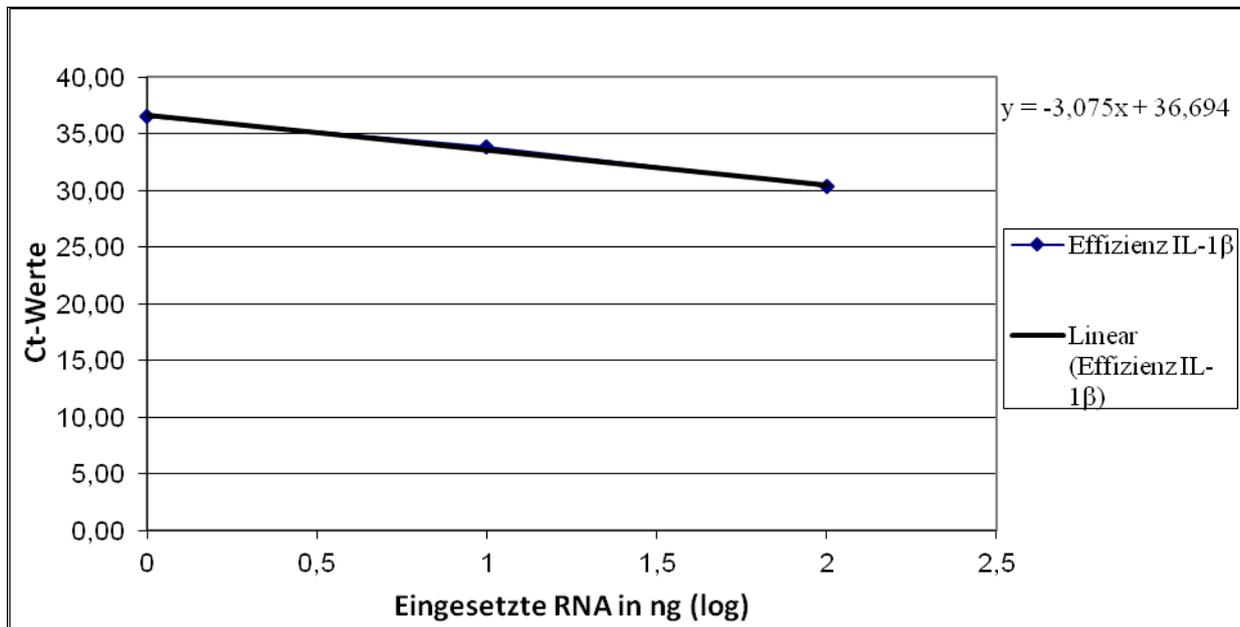


Abbildung 9: Effizienzbestimmung des Primers IL-1β für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.

Aufgetragen wurden die Ct-Werte einer Verdünnungsreihe gegen den Logarithmus der Menge eingesetzter RNA in ng

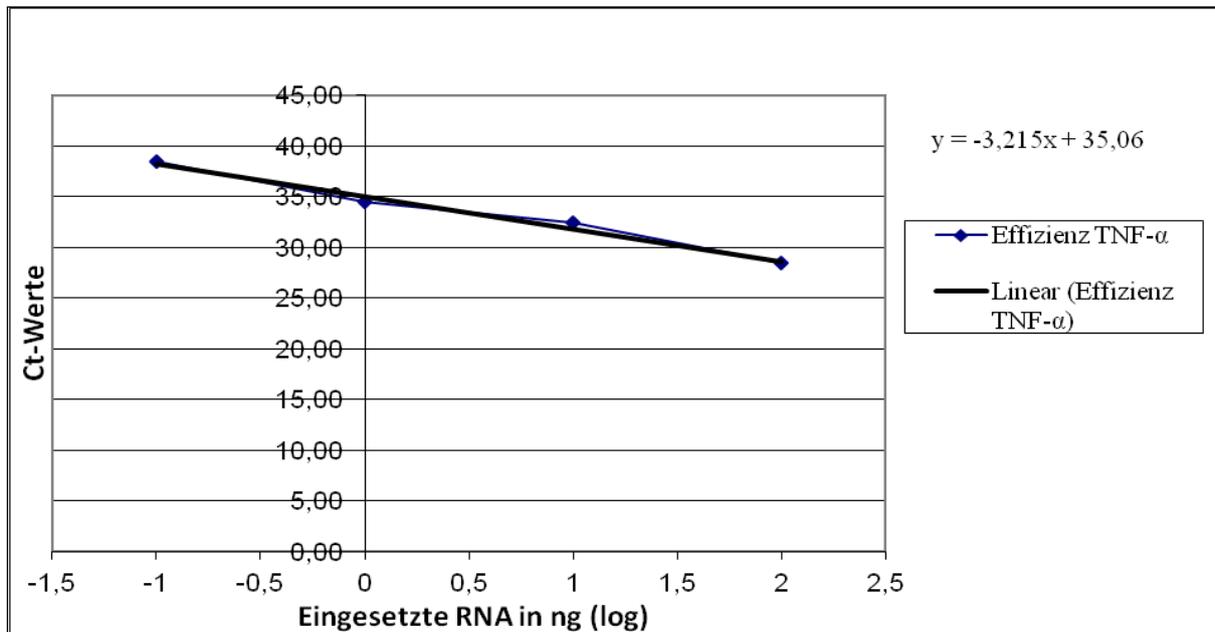


Abbildung 10: Effizienzbestimmung des Primers TNF- α für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.

Aufgetragen wurden die Ct-Werte einer Verdünnungsreihe gegen den Logarithmus der Menge eingesetzter RNA in ng.

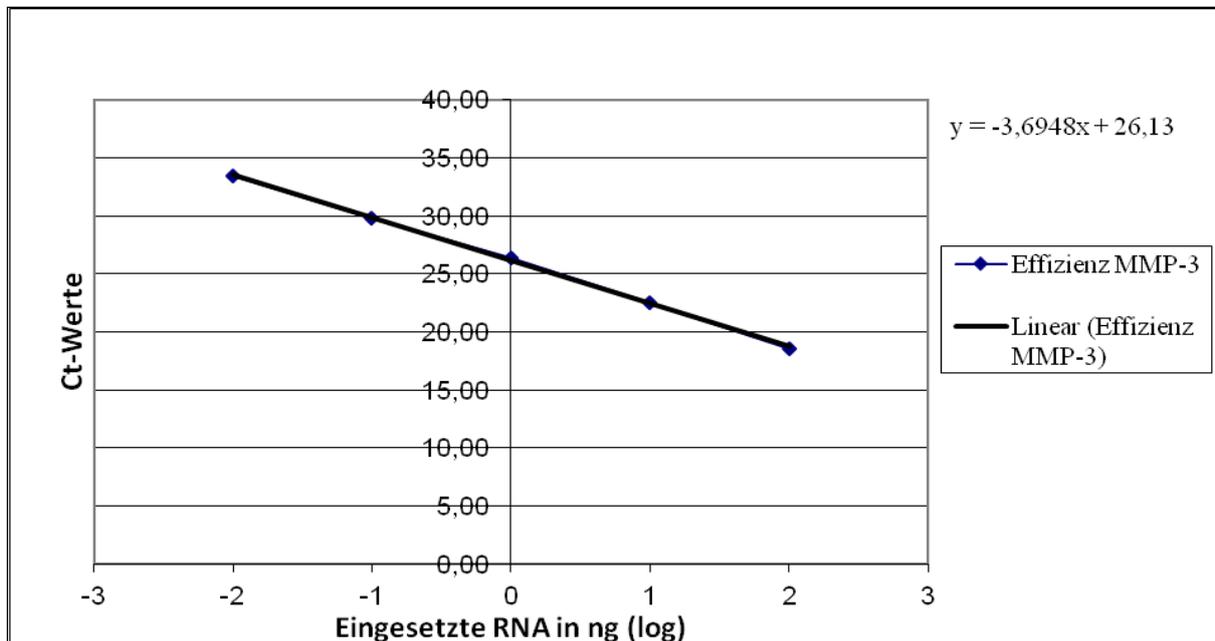


Abbildung 11: Effizienzbestimmung des Primers MMP-3 für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.

Aufgetragen wurden die Ct-Werte einer Verdünnungsreihe gegen den Logarithmus der Menge eingesetzter RNA in ng.

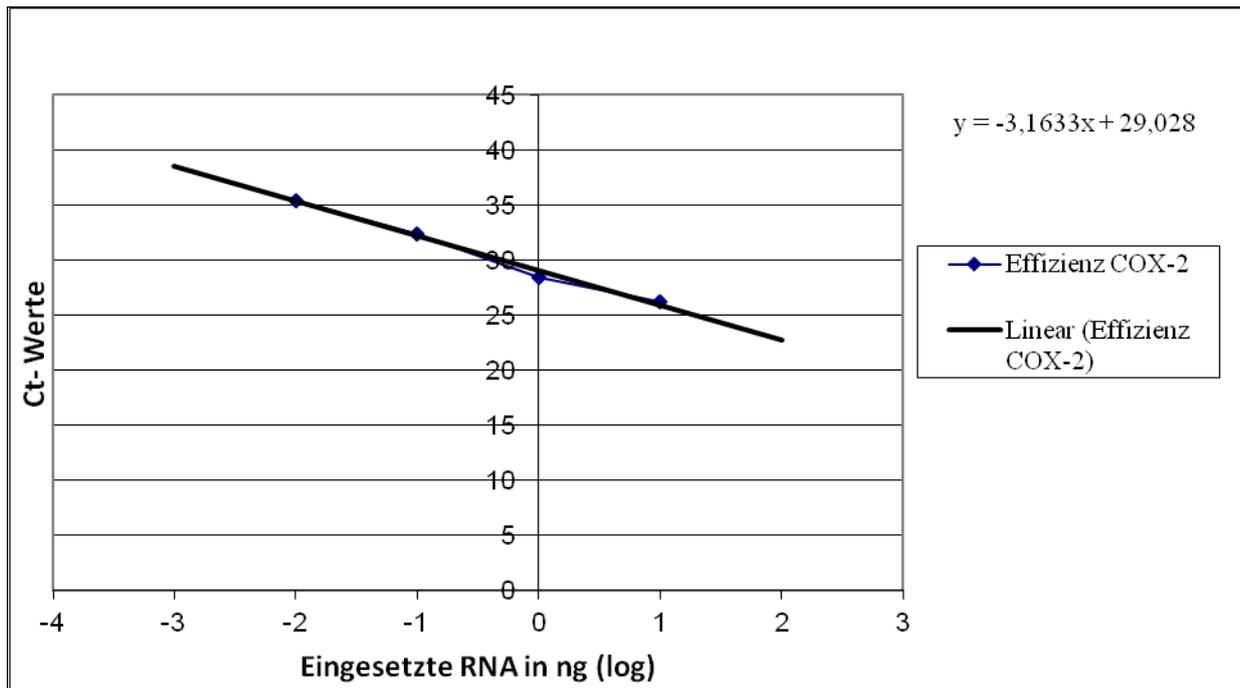


Abbildung 12: Effizienzbestimmung des Primers COX-2 für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.

Aufgetragen wurden die Ct-Werte einer Verdünnungsreihe gegen den Logarithmus der Menge eingesetzter RNA in ng.

Über die Steigung der Geraden und die in 3.6.5 beschriebene Formel wurde die Effizienz (E) der Primer für humane Gelenkchondrozyten bestimmt.

Tabelle 27 zeigt eine Zusammenfassung aller für die Genexpressionsanalyse verwendeten Primer und deren Effizienzen.

Tabelle 27: Effizienzen aller für die Genexpressionsanalyse verwendeten Primer.

Selbst bestimmt wurden die Effizienzen für die Primer für: BAC, SOX 9, IL-1 β , TNF- α MMP-3.

Im Labor bereits etabliert waren die Primer für: COL2A1, ACAN, MMP-1.

Primer	Effizienz
BAC	1,97
COL2A1	1,86
ACAN	1,87
SOX 9	2,07
IL-1β	2,11
TNF-α	2,05
MMP-1	1,98
MMP-3	1,86
COX-2	2,07

4.4.2 Genexpressionsanalyse Kollagen Typ II

Kollagen Typ II (COL2A1) ist eines der wichtigsten Knorpelmatrixproteine. Es verleiht dem Knorpel Druckfestigkeit und macht ihn widerstandsfähig gegen Scherkräfte. Nach der 24 stündigen Behandlung mit dem jeweiligen Pflanzenextrakt und IL-1 β , das als Entzündungsmediator einen katabolen Stoffwechsel induziert, wurde die Genexpression dieses wichtigen EZM-Bestandteils gemessen. Dabei zeigte sich eine signifikante Suppression der Expression von Kollagen Typ II unter dem Einfluss von Phy-3 bei der Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$. Phy-1 und Phy-5 hingegen führten allein und in Kombination mit IL-1 β tendenziell zu einer Induktion von Kollagen Typ II. Dieser Effekt war allerdings nicht signifikant (Abbildung 13).

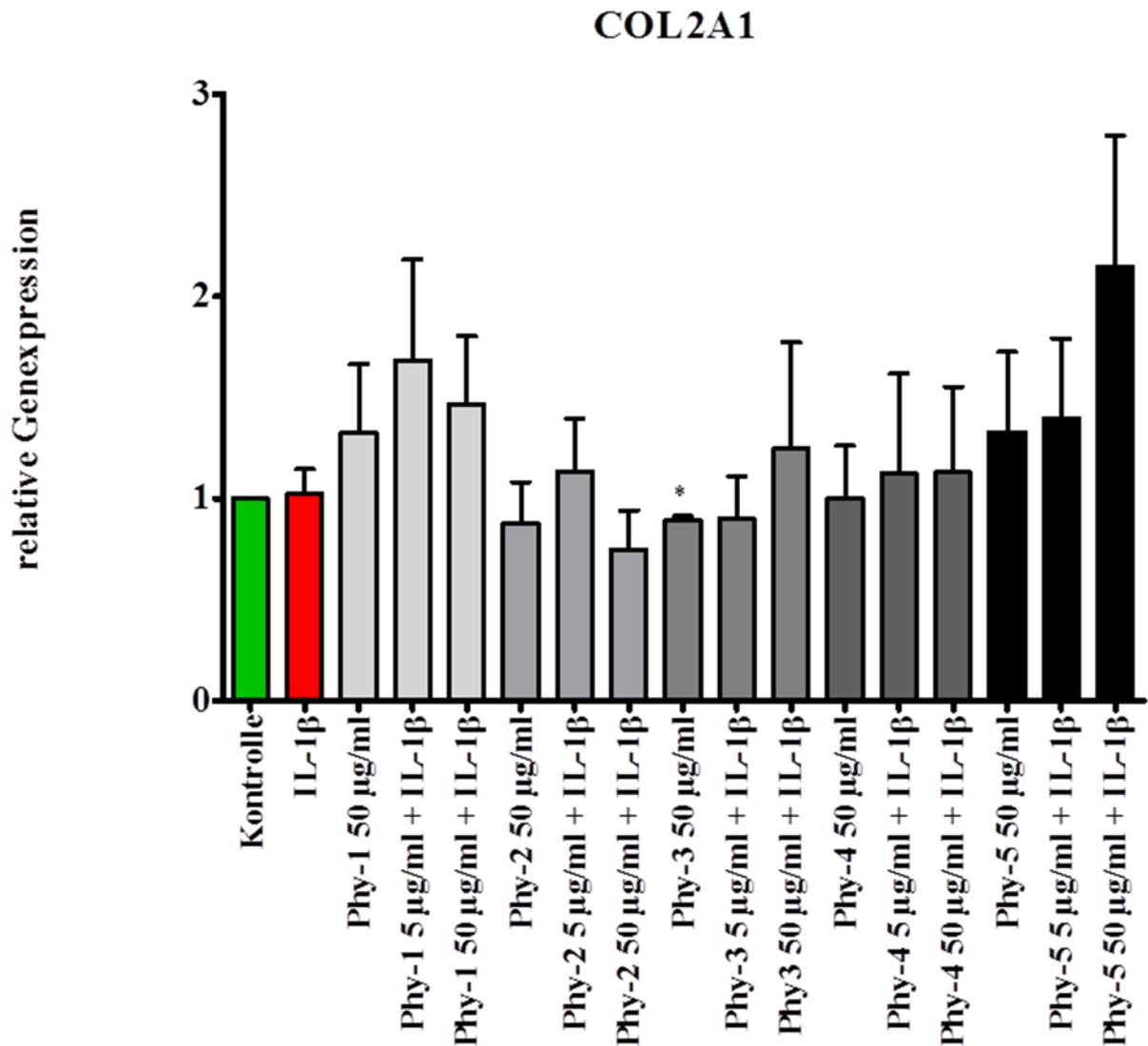


Abbildung 13: Genexpression von COL2A1 unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.

Nach 30 min Vorstimulation wurde für 24 h wie an der X-Achse abzulesen stimuliert.

IL-1 β : 10 ng/ml. Die Kontrolle wurde normiert.

**signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle.*

** $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$;*

Phy-1 & 2: $n = 7$; Phy-3 & 4: $n = 4$; Phy-5: $n = 5$

4.4.3 Genexpressionsanalyse ACAN

Einen weiteren wichtigen Bestandteil der EZM des Knorpels stellt das große Proteoglykan Aggrecan dar. Durch seine Interaktion mit Hyaluronan und Bindung von zahlreichen Chondroitin- und Keratansulfat-Seitenketten trägt es zur reversiblen Wasserbindungsfähigkeit und somit zur Elastizität des Knorpels bei. Durch die Behandlung mit den Extrakten Phy-2 und Phy-3 wurde Aggrecan in seiner Expression gehemmt. Phy-2 zeigte hier allein und in Kombination mit IL-1 β in jeder Konzentration einen hochsignifikant hemmenden Effekt ebenso wie Phy-3 in der niedrigsten Konzentration (5 $\mu\text{g/ml}$). Als einziger Extrakt stimulierte Phy-1 (ohne gleichzeitige IL-1 β Behandlung) die Expression von Aggrecan signifikant. Ebenso ließen sich stimulierende Effekte bei Phy-5 in der höchsten Konzentration (mit und ohne IL-1 β) erkennen. Außerdem zeigte sich im Vergleich zu Chondrozyten, die nur mit IL-1 β behandelt wurden, ein signifikant stimulierender Effekt bei den mit Phy-5 50 $\mu\text{g/ml}$ + IL-1 β behandelten Zellen (Abbildung 14).

ACAN

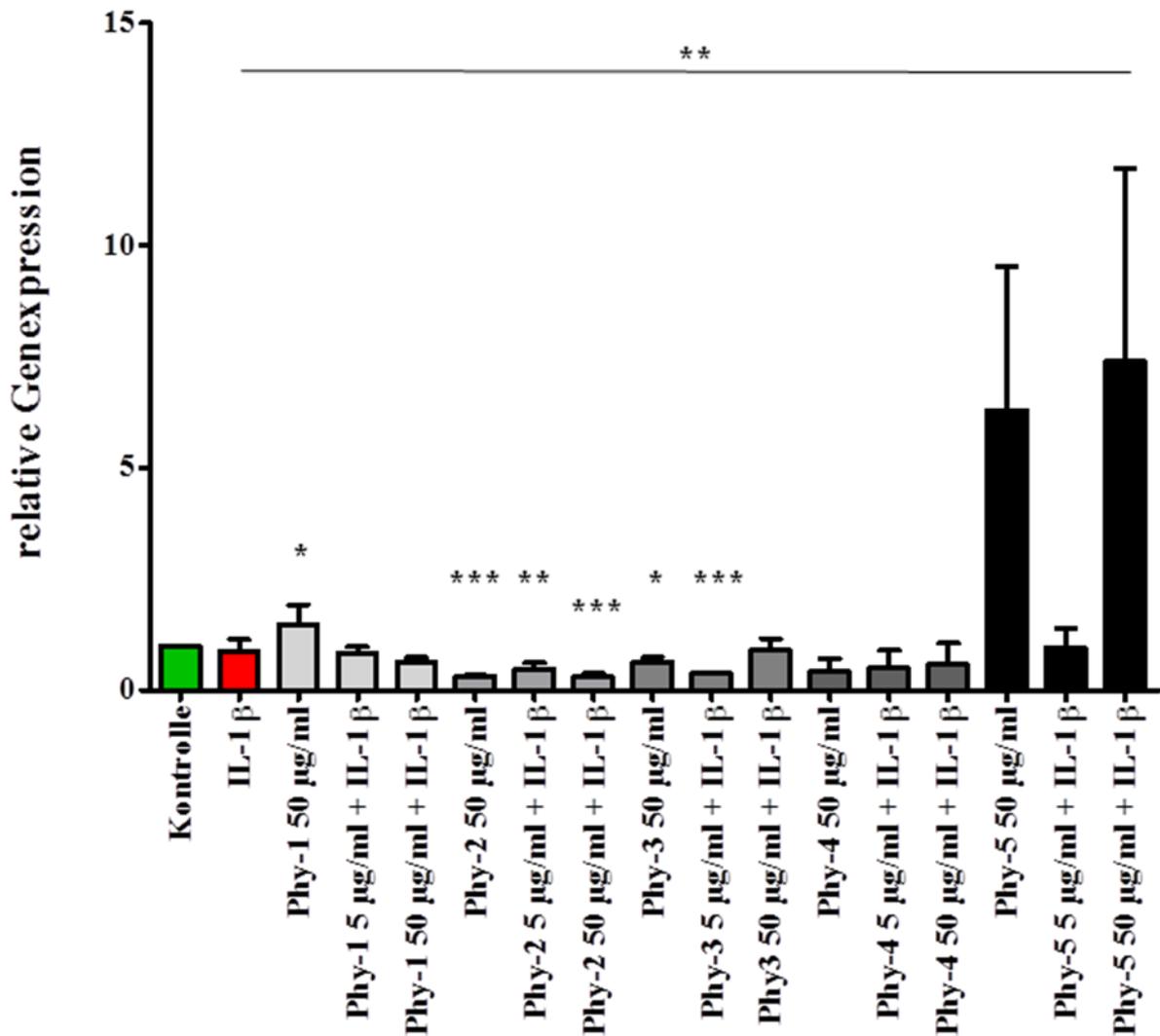


Abbildung 14: Genexpression von ACAN unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.

Nach 30 min Vorstimulation wurde für 24 h wie an der X-Achse abzulesen stimuliert.

IL-1β: 10 ng/ml. Die Kontrolle wurde normiert. * signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. * signifikanter Unterschied beim Vergleich behandelter Proben in der Varianzanalyse.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$;

Phy-1 & 2: $n = 7$; Phy-3 & 4: $n = 4$; Phy-5: $n = 5$

4.4.4 Genexpressionsanalyse SOX 9

Dieser Transkriptionsfaktor vermittelt die Chondrogenese und Differenzierung der Chondrozyten.²⁷ Eine signifikante Induktion der Genexpression konnte jedoch nur bei der Stimulation mit IL-1 β allein und in Kombination mit dem Pflanzenextrakt Phy-3 in der höchsten getesteten Konzentration nachgewiesen werden. Einige Stimulationsansätze zeigten jedoch eine Tendenz zur Steigerung der Genexpression von SOX 9 (Abbildung 15).

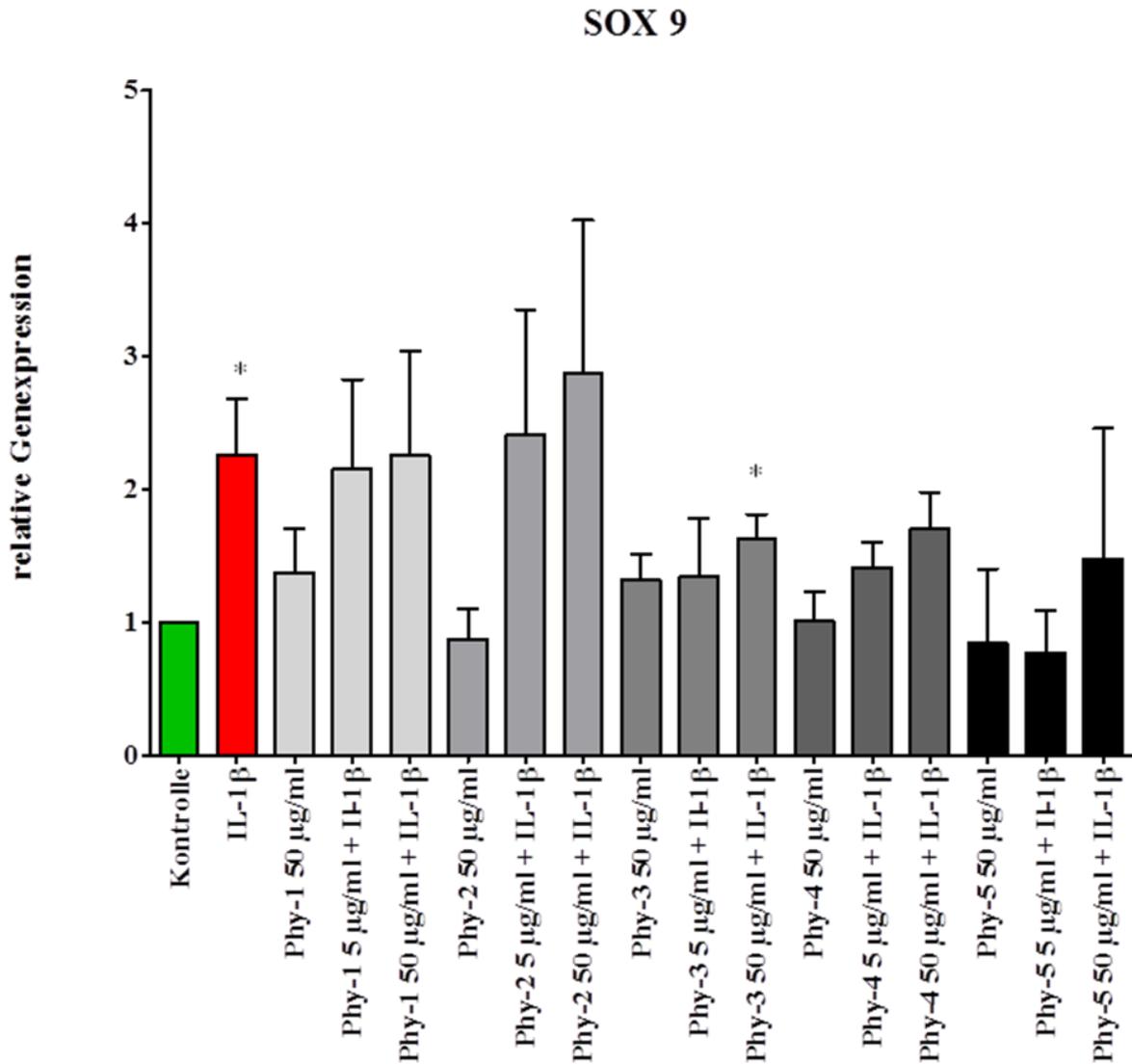


Abbildung 15: Genexpression von SOX 9 unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.

Nach 30 min Vorstimulation wurde für 24 h wie an der X-Achse abzulesen stimuliert.

*IL-1β: 10 ng/ml. Die Kontrolle wurde normiert. * signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. * signifikanter Unterschied beim Vergleich behandelter Proben in der Varianzanalyse.*

p < 0.05, **p < 0.01, *p < 0.001;*

Phy-1 & 2: n = 7; Phy-3 & 4: n = 4; Phy-5: n = 5

4.4.5 Genexpressionsanalyse IL-1 β

IL-1 β , ein Schlüsselzytokin der Entzündungsreaktion, spielt so auch bei der Arthrosepathogenese über die Induktion sekundärer Mediatoren wie COX-2 und IL-6 eine entscheidende Rolle.

Seine eigene Induktion stimuliert IL-1 β hochsignifikant. Eine hohe IL-1 β Genexpression ist auch in Kombination mit den jeweiligen Pflanzenextrakten zu erkennen, diese ist jedoch nicht signifikant unterschiedlich zur alleinigen Behandlung mit IL-1 β .

Allein angewendet zeigten die Extrakte keine signifikante Auswirkung auf die Expression von IL-1 β . Das Expressionsniveau lag hier nahe des Kontrollniveaus. Im Trend hatte Phy-2, -3 und -5 einen leicht stimulatorischen Effekt auf die IL-1 β Genexpression (Abbildung 16).

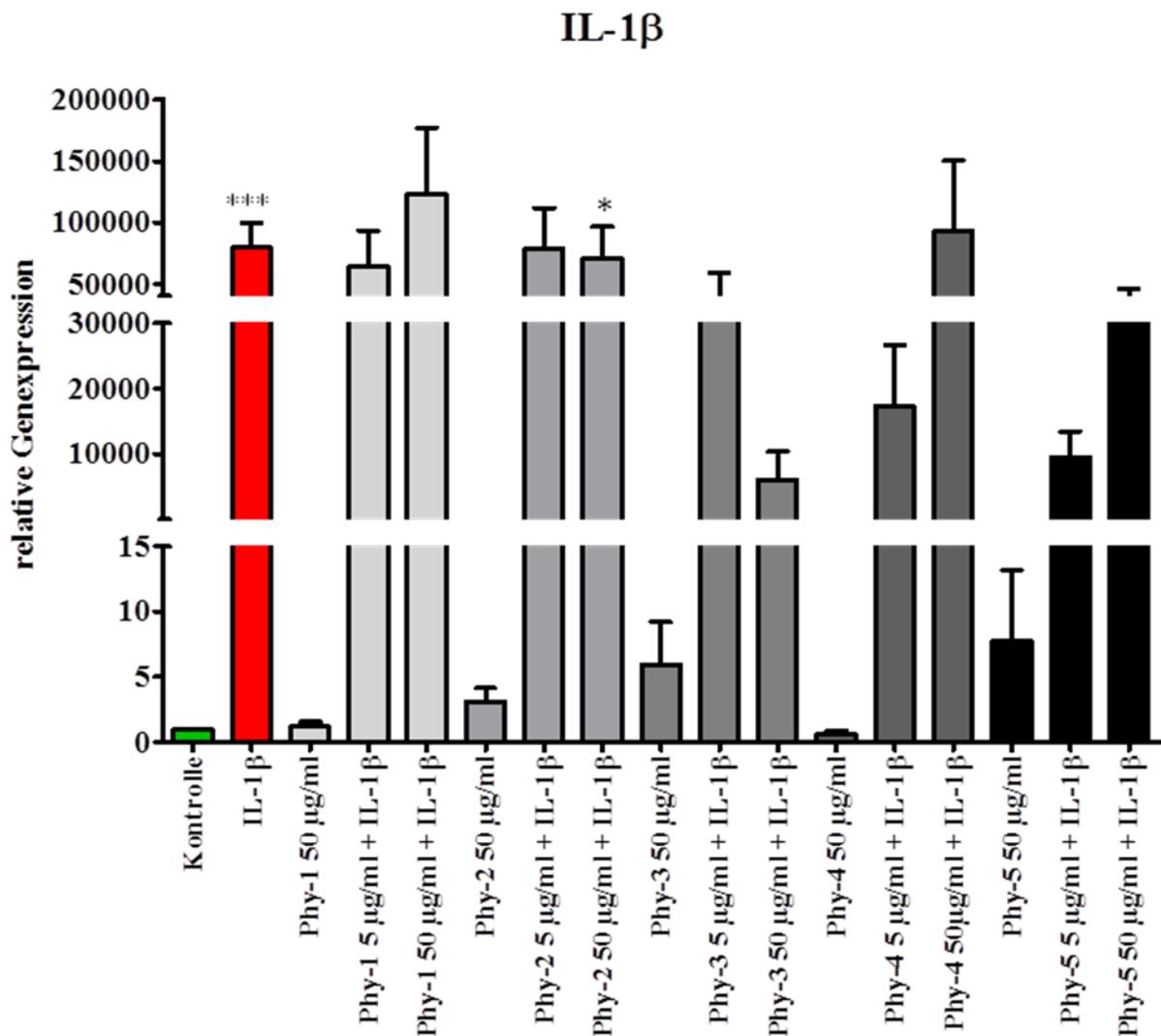


Abbildung 16: Genexpression von IL-1 β unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.

Nach 30 min Vorstimulation wurde für 24 h wie an der X-Achse abzulesen stimuliert.

*IL-1 β : 10 ng/ml. Die Kontrolle wurde normiert. * signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. * signifikanter Unterschied beim Vergleich behandelter Proben in der Varianzanalyse.*

** $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$;*

Phy-1 & 2: $n = 7$; Phy-3 & 4: $n = 4$; Phy-5: $n = 5$

4.4.6 Genexpressionsanalyse TNF- α

Da TNF- α ebenso wie IL-1 β einen großen Anteil an der Entstehung von inflammatorischen Prozessen und an der Freisetzung der COX-2 hat, ist auch dieses Zytokin wichtiger Mediator in der Arthrosepathogenese. Ebenso wie IL-1 β selbst wird TNF- α durch die Behandlung der Chondrozyten mit IL-1 β hochsignifikant exprimiert. Auch in allen mit IL-1 β behandelten Proben lässt sich eine Steigerung der Genexpression von TNF- α beobachten. Diese ist jedoch nur beim Pflanzenextrakt Phy-4 in beiden Konzentrationen signifikant. Außerdem stimulierten auch die Extrakte Phy-1 und Phy-2 allein die Expression dieses Zytokins signifikant (Abbildung 17).

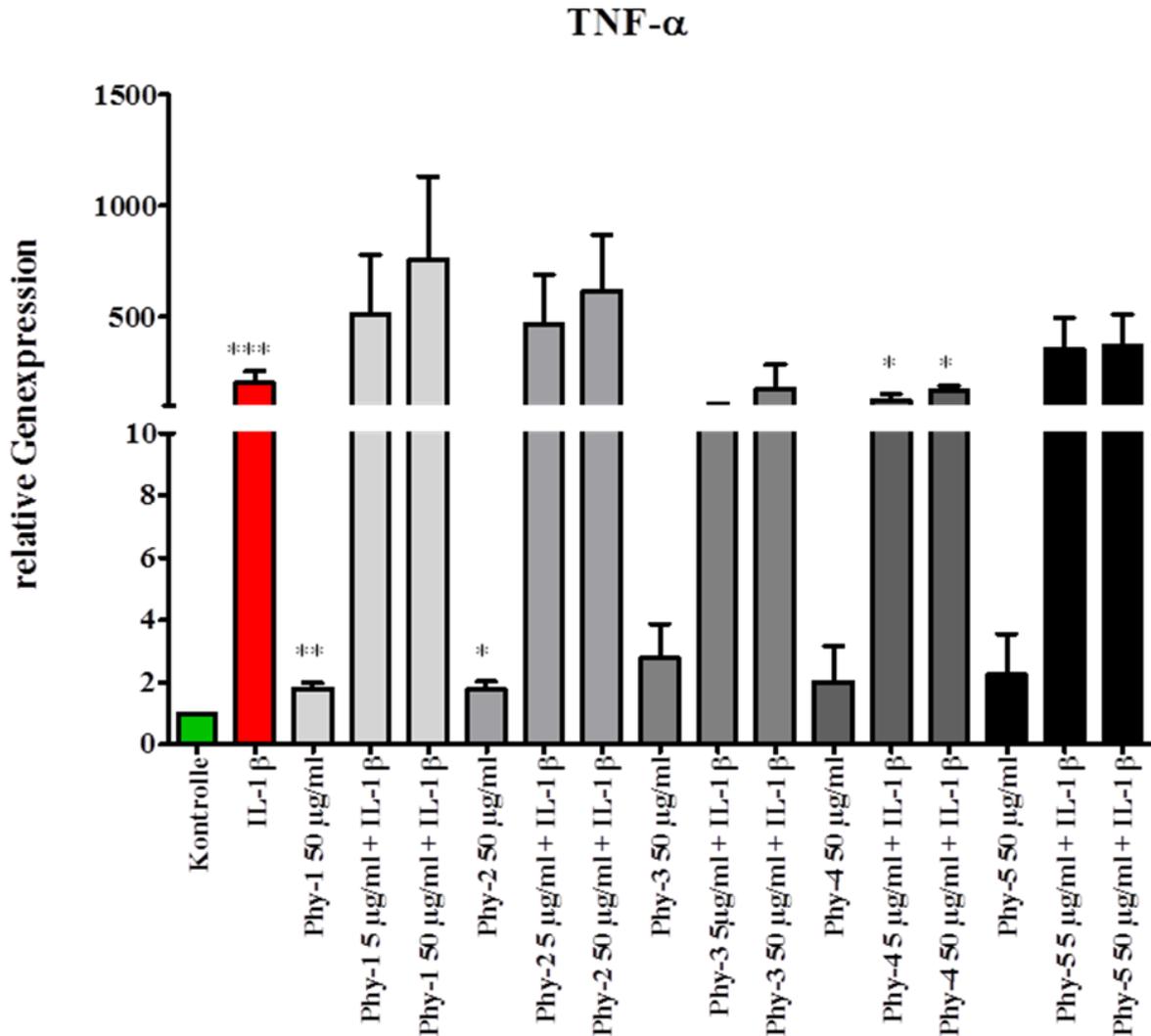


Abbildung 17: Genexpression von TNF- α unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.

Nach 30 min Vorstimulation wurde für 24 h wie an der X-Achse abzulesen stimuliert.

*IL-1 β : 10 ng/ml. Die Kontrolle wurde normiert. * signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. * signifikanter Unterschied beim Vergleich behandelter Proben in der Varianzanalyse.*

** $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$;*

Phy-1 & 2: $n = 7$; Phy-3 & 4: $n = 4$; Phy-5: $n = 5$

4.4.7 Genexpressionsanalyse MMP-1 & -3

MMPs sind Endopeptidasen und Akteure im Knorpelremodelling, da sie die wichtigen Komponenten der extrazellulären Knorpelmatrix spalten können. Sie werden mit dem Entzündungsprozess im Knorpel assoziiert.

Für MMP-1 zeigte sich vor allem unter dem Einfluss von IL-1 β allein aber auch bei der zusätzlichen Stimulation mit Phy-1 und Phy-2 unabhängig von der Konzentration eine signifikante Induktion der MMP-1 Genexpression gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Diese Erhöhung des MMP-1 Expressionsniveaus im Vergleich zur Kontrolle stellte sich ebenfalls bei der Behandlung mit Phy-3, -4 und -5 kombiniert mit IL-1 β dar. Hier war sie jedoch lediglich für Phy-3 bei 5 μ g/ml und Phy-4 bei 50 μ g/ml signifikant. Phy-1 allein führte zu einer signifikanten Induktion der MMP-1 Genaktivität. Die durch Phy-5 hervorgerufene Erhöhung der MMP-1 Genexpression war im Vergleich zu der durch die alleinige Stimulation mit IL-1 β erreichten Expression signifikant höher. Auch beim Vergleich der MMP-1 Genexpression nach Stimulation mit den drei verschiedenen Phy-5 Konzentrationen kombiniert mit IL-1 β zeigten sich signifikante Unterschiede untereinander (Abbildung 18).

Ein ähnliches Expressionsprofil zeigte sich für MMP-3. Auch hier induzierte die Behandlung mit IL-1 β allein und gemeinsam mit den einzelnen Pflanzenextrakten die Genexpression dieser Proteinase. Für Phy-1 und Phy-2 sind diese Effekte auch hier in beiden getesteten Konzentrationen signifikant.

Im Vergleich zu MMP-1 wurde die Genexpression von MMP-3 durch die alleinige Behandlung der Zellen mit Phy-2, -3 nicht beeinflusst oder im Falle von Phy-4 eher supprimiert. Diese Suppression ist für Phy-4 auch bei MMP-1 zu erkennen. Sie ist hier aber im Gegensatz zu MMP-3 nicht signifikant (Abbildung 19). Phy-5 hatte eine nicht signifikante induzierende Wirkung auf die MMP-3 Genexpression.

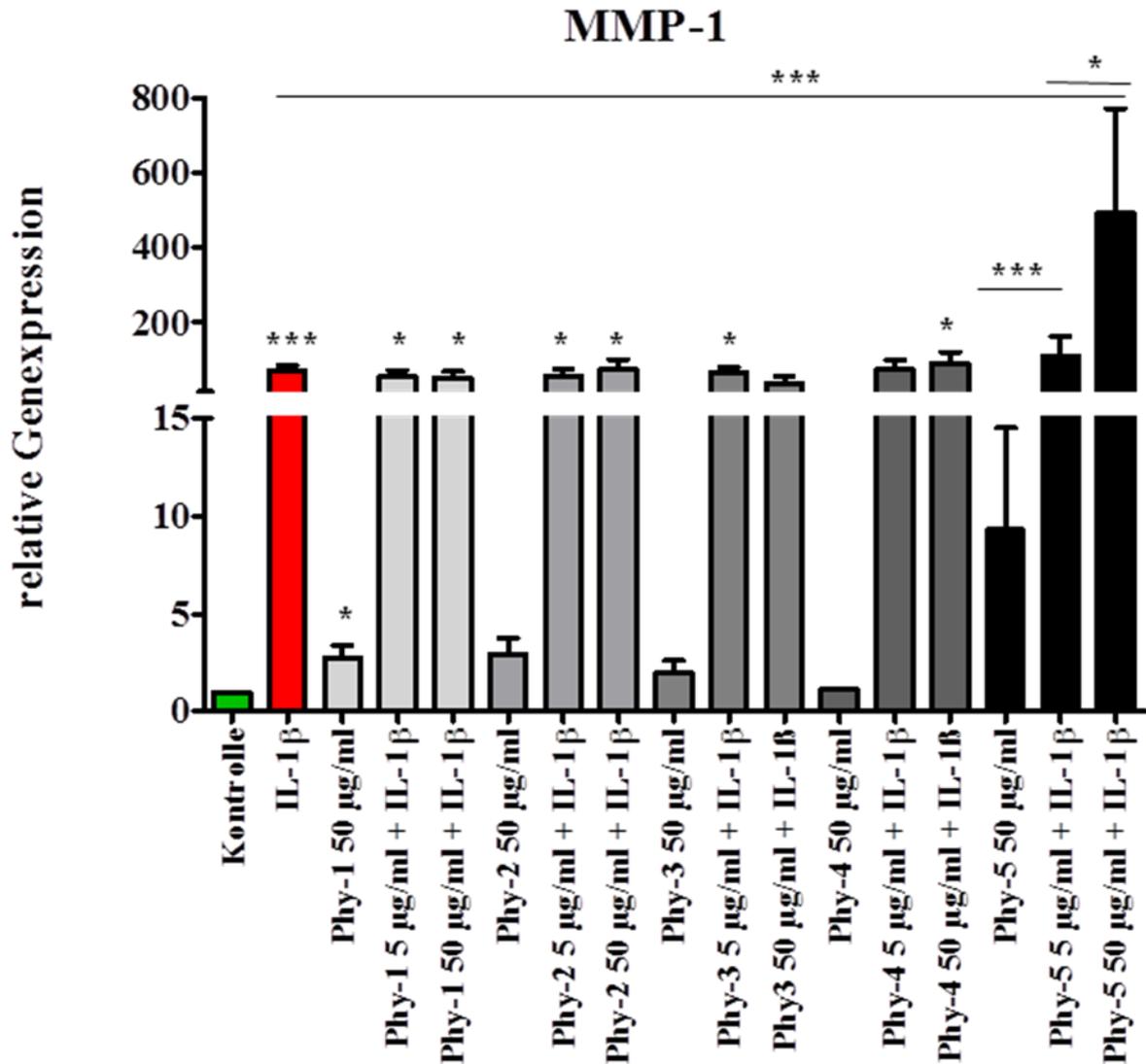


Abbildung 18: Genexpression von MMP-1 unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.

Nach 30 min Vorstimulation wurde für 24 h wie an der X-Achse abzulesen stimuliert.

*IL-1β: 10 ng/ml. Die Kontrolle wurde normiert. * signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. * signifikanter Unterschied beim Vergleich behandelter Proben in der Varianzanalyse.*

** $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$;*

Phy-1 & 2: $n = 7$; Phy-3 & 4: $n = 4$; Phy-5: $n = 5$

MMP-3

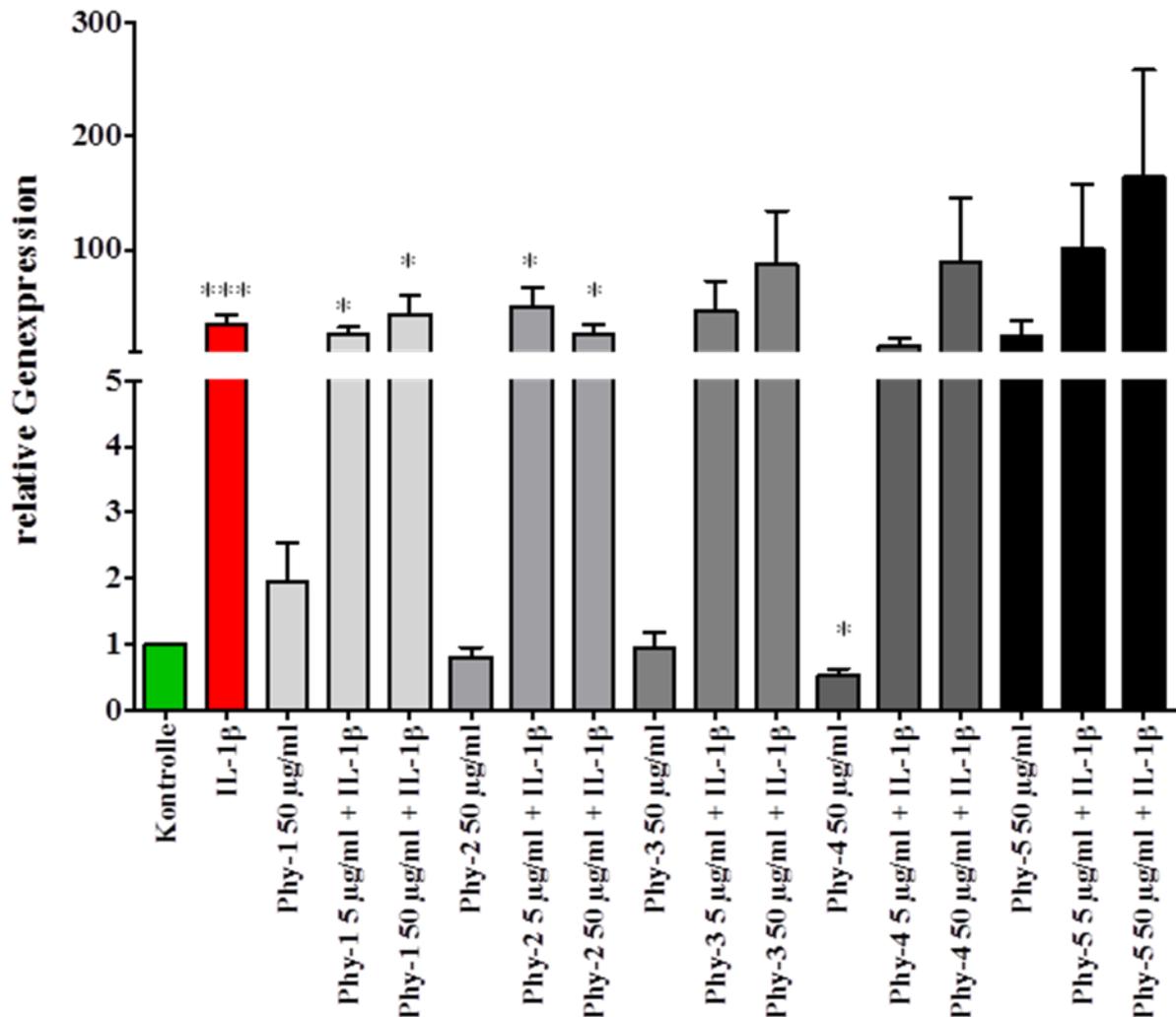


Abbildung 19: Genexpression von MMP-3 unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.

Nach 30 min Vorstimulation wurde für 24 h wie an der X-Achse abzulesen stimuliert.

*IL-1β: 10 ng/ml. Die Kontrolle wurde normiert. * signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. * signifikanter Unterschied beim Vergleich behandelter Proben in der Varianzanalyse.*

** $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$;*

Phy-1 & 2: $n = 7$; Phy-3 & 4: $n = 4$; Phy-5: $n = 5$

4.4.8 Genexpressionsanalyse COX-2 (PTGS2)

Die Genexpression von COX-2 wurde auf Grund der wichtigen Stellung der COX-2 in der Entzündungskaskade untersucht. Die bei Verletzung oder Entzündung durch Zytokine wie IL-1 β und TNF- α aktivierte COX-2 produziert Prostaglandin E₂, welches sich katabol auf den Aggrecan und Kollagen Typ II Stoffwechsel auswirkt. Durch die Behandlung mit IL-1 β wurde die Expression von COX-2 hochsignifikant stimuliert. Bei Kombination der IL-1 β Stimulation mit allen Pflanzenextrakten Phy-1-5 blieb dieser induzierende Effekt unbeeinflusst. Die COX-2 Expression, hervorgerufen durch IL-1 β in Kombination Phy-2, war bei beiden Phy-2 Konzentrationen signifikant höher als in der unbehandelten Kontrolle. Signifikante Änderungen gegenüber der Kontrollen konnten sich bei Phy-1, -3 und -4 dagegen nur in einer der beiden Konzentrationen nachweisen lassen. Als einziges Pflanzenextrakt hemmte Phy-5, ohne zusätzliche IL-1 β Behandlung, die Genexpression von COX-2 hochsignifikant (Abbildung 20).

COX-2 (PTGS2)

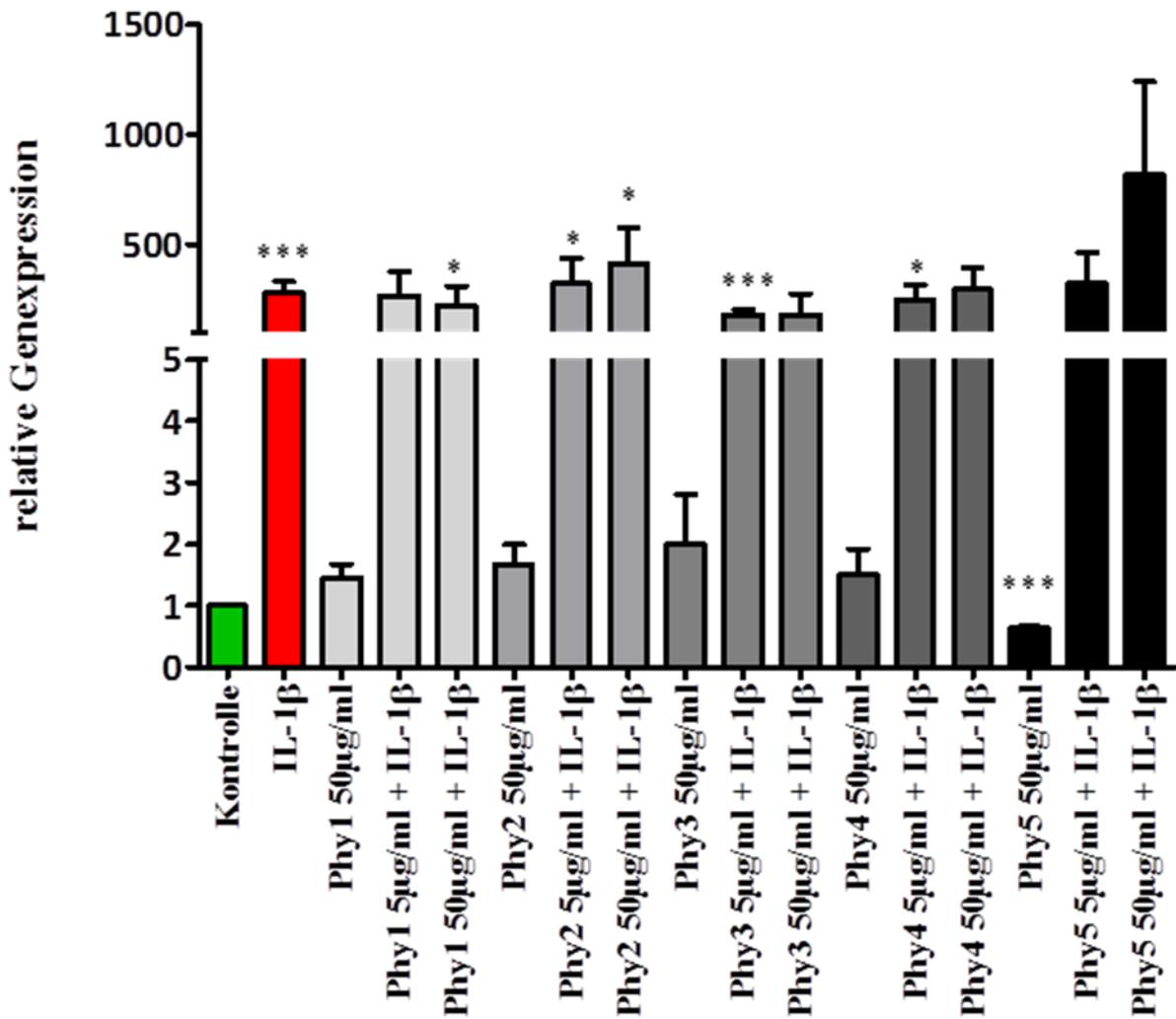


Abbildung 20: Genexpression von COX-2 (PTGS2) unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.

Nach 30 min Vorstimulation wurde für 24 h wie an der X-Achse abzulesen stimuliert.

IL-1β: 10 ng/ml. Die Kontrolle wurde normiert. * signifikanter Unterschied im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle. * signifikanter Unterschied beim Vergleich behandelter Proben in der Varianzanalyse.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$;

Phy-1 & 2: $n = 7$; Phy-3 & 4: $n = 4$; Phy-5: $n = 5$

4.5 Einfluss der Pflanzenextrakte auf den s-Glykosaminoglykan- und Kollagengehalt

Als Indikator für die Syntheseleistung der Chondrozyten wurde der s-GAG- und Kollagengehalt bestimmt. Die zur Stimulation verwendete Konzentration wurde in Orientierung an die Genexpressionsanalysen ausgewählt (5 µg/ml) und die Zellen wie in Tabelle 25 für 24 h behandelt. Mit der Überlegung, dass frisch synthetisierte s-GAG und Kollagen zunächst löslich sind bevor unlösliche Polymere durch Aggregatbildung oder Quervernetzung entstehen, wurde der Kulturüberstand und die lysierten Zellen getrennt gewonnen. Beide Fraktionen (Lysat) und Kulturüberstand wurden daher bestimmt und dann als Gesamtgehalt zusammengefasst. Der s-GAG-Gehalt wurde durch die verwendeten Pflanzenextrakte nicht signifikant beeinflusst. Lediglich Phy-2 und Phy-5 zeigten in Kombination mit IL-1 β tendenziell eine Erhöhung der Syntheseleistung, ein signifikanter Unterschied zwischen den Behandlungsgruppen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

s-Glykosaminoglykane in Zellen und Zellkulturüberstand

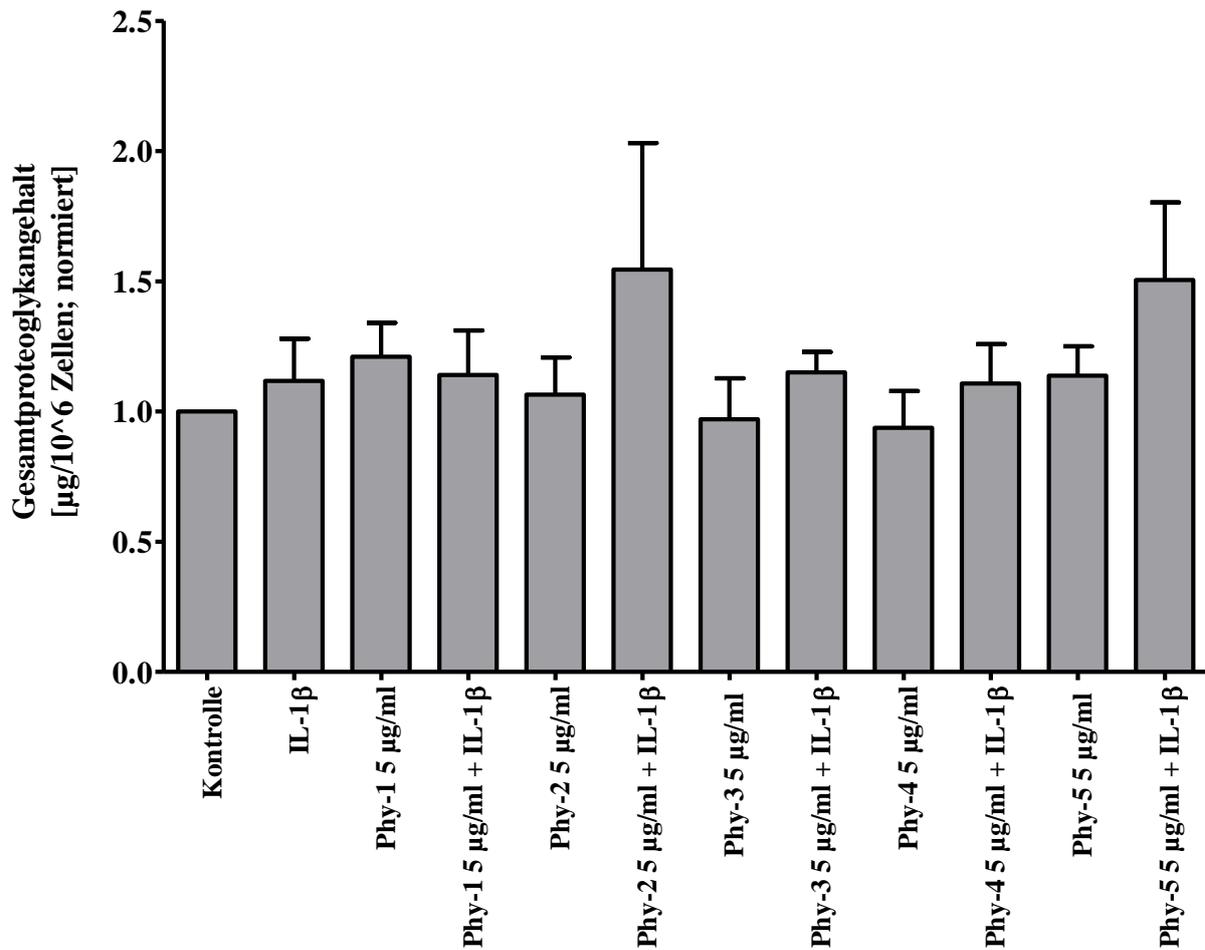


Abbildung 21: Gesamt-s-GAG-Gehalt der einzelnen Proben unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten und IL-1β

Nach 30 min Vorstimulation (Tabelle 25) wurde für 24 h, wie an der X-Achse abzulesen, stimuliert. IL-1β: 10 ng/ml. Die Kontrolle wurde normiert. n= 4

Auch die Kollagengehaltsbestimmung erfolgte zunächst in Zellen (Lysat) und Kulturüberstand und wurde dann als Gesamtgehalt betrachtet. Ebenso wie beim s-GAG-Gehalt konnten keine signifikanten Effekte auf die Kollagensynthese durch die eingesetzten Pflanzenextrakte Phy-1 -5 beobachtet werden. Tendenziell ist ein stimulierender Effekt bei der Behandlung mit IL-1β und unter dem Einfluss von Phy-4 (mit IL-1β) und Phy-5 (mit IL-1β) festzustellen. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede erreicht werden (Abbildung 22).

Kollagengehalt in Zellen und Zellkulturüberstand

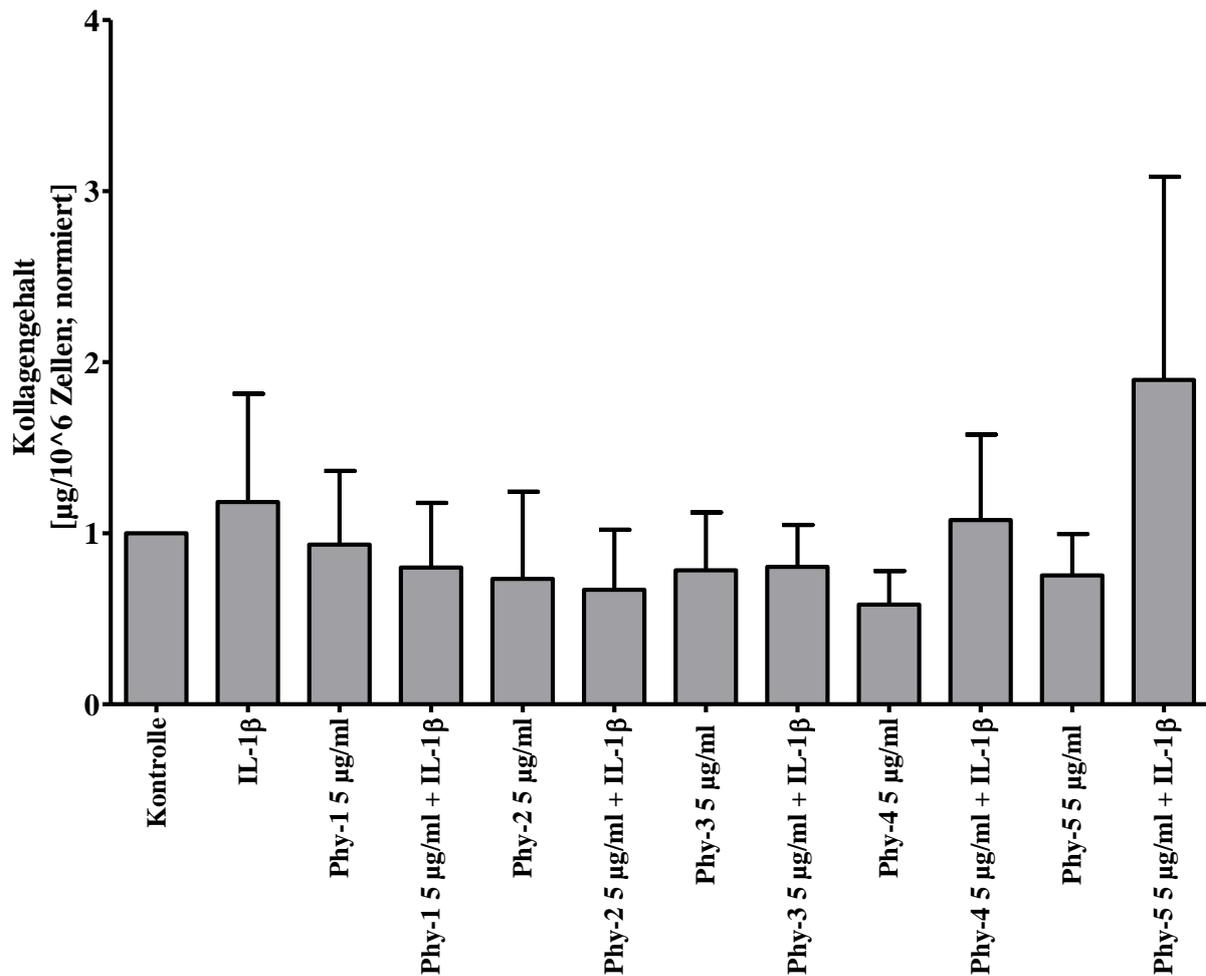


Abbildung 22 : Gesamtkollagengehalt der einzelnen Proben unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten und IL-1 β .

Nach 30 min Vorstimulation (Tabelle 25) wurde für 24 h wie an der X-Achse abzulesen stimuliert. IL-1 β : 10 ng/ml. Die Kontrolle wurde normiert. n = 3

5 Diskussion

5.1 Im Labor verwendeter makroskopischer Arthrosescore

Der für diese Arbeit herangezogene makroskopische Arthrosescore (Tabelle 19) wurde in der AG Bioreconstruction selbst entwickelt und nun zur Beurteilung der aus dem OP bezogenen Knorpelproben herangezogen. Anhand dieses Scores lassen sich schon durch alleinige makroskopische Betrachtung des Probenmaterials Aussagen über die arthrotische Veränderung des Knorpels treffen um somit eine Vorauswahl von Spendermaterial, das möglichst wenig arthrotisch verändert ist, zu realisieren.

Die S3-Leitlinien der DGOOC von 2009-2011 sehen lediglich eine radiologische Einteilung nach Kellgren und Lawrence und mehrere klinische Scores für die Stadieneinteilung der Arthrose vor.⁷ Weiterhin existieren verschiedene klinisch/makroskopische Ansätze Gelenkknorpel einzuteilen wie zum Beispiel der Evaluationsfragebogen der International Cartilage Repair Society (ICRS).⁸¹ In diesem bewerten Patient und Operateur unter anderem das Aktivitätslevel des Patienten, Symptome, Bewegungsausmaß und im Röntgen sichtbare Veränderungen. Um einen weiteren möglichen Klassifikationsansatz für die Bewertung eines Knorpeldefekts handelt es sich bei der Outerbridge Classification, bei der das makroskopische Ausmaß eines Knorpeldefekts in vier Schweregrade eingeteilt wird.⁸²

Für die Auswahl des Knorpels, der in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde, kamen diese beiden Klassifikationen jedoch nicht in Frage und so wurde der eigens im Labor entwickelte Score angewandt.

Für die späteren Experimente ist es essenziell, dass sich noch nicht zu viele Zellen in einer katabolen Stoffwechsellage befinden und die Zellen noch vital genug sind um das spätere Passagieren und die Experimente zu überleben. Außerdem soll verhindert werden, dass die Chondrozyten bereits vermehrt Zytokine und Entzündungsmediatoren exprimieren, da eine definierte pro-inflammatorische Stoffwechsellage erst später *in vitro* durch die Stimulation mit IL-1 β geschaffen werden soll.

Beim Vergleich von gesunden kultivierten Chondrozyten und bereits arthrotisch veränderten zeigte sich in der Arbeit von Lin et al. eine zwar weitestgehend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit vergleichbare Expression von anabolen EZM-Bestandteilen und katabolen Zytokinen. Allerdings wurde ebenfalls eine im OA-Knorpel bereits tendenziell erhöhte Zytokin Expression beobachtet, wobei vor allem die Konzentration von COX-2 signifikant erhöht ist. Das Genexpressionsprofil der Chondrozyten verändert sich hier jedoch ebenfalls durch die

Kultivierung und das Passagieren der Zellen.⁸³ Aus diesem Grund wurden auch in der vorliegenden Arbeit nur Zellen bis maximal Passage 4 (P4) verwendet.

Fan et al. konnten in ihrer Arbeit eine, im Gegensatz zu der in gesunden Zellen, verminderte Antwort auf die IL-1 β -Stimulation bei Zellen beobachten, die bereits hohen IL-1 β Konzentrationen durch OA ausgesetzt waren. Hier wird von einem autokrinen/parakrinen Loop ausgegangen, der über IL-1 β getriggert wird, das sich bereits in der Synovialflüssigkeit und der oberflächlicheren Knorpelzone befindet.⁸⁴

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chondrozyten sollten deshalb vorher einer möglichst geringen IL-1 β Konzentration ausgesetzt sein und aus diesem Grund wurde bereits vor der Kultivierung eine Vorauswahl getroffen.

Für die Spender, deren Knorpel für diese Arbeit verwendet wurde, ergab sich im Mittel ein Score von ca. 5,3 Punkten, welcher nach dem im Labor angewandten Score einer leichten bis mittleren arthrotischen Veränderung entspricht.

Bei einem Spenderpool von 11 Spendern war jedoch eine Varianz in den erzielten Scores zu erkennen. So gab es zwei Spender mit hohen Gesamtscores und drei Spender mit kaum arthrotischen Veränderungen des Knorpels. Diese Varianz beeinflusst später sicherlich auch die Ergebnisse der Stoffwechselaktivität und das Genexpressionprofil der einzelnen Spenderzellen.

5.2 Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Zellmorphologie

Bei der Entwicklung eines neuen Medikaments ist es von Bedeutung, dass diese Substanz für den Körper wie für die Zellen am Wirkort verträglich ist und im Zielgewebe nicht zytotoxisch wirkt. Daher wurden die fünf Pflanzenextrakte in jeweils drei unterschiedlichen Konzentrationen (5 μ g/ml, 50 μ g/ml und 500 μ g/ml) zunächst auf ihre zytotoxische Wirkung getestet. Die behandelten Chondrozyten wurden nach 24 h unter dem Lichtmikroskop betrachtet.

Diese zeigten in der Monolayerkultur eine Fibroblasten-ähnliche Morphologie wie für diesen Zelltyp typisch.^{85, 8, 86} Zum Teil ließen sich spenderabhängig zellmorphologische Unterschiede unter dem Einfluss der verschiedenen Pflanzenextrakte erkennen. Dabei konnte bei den einzelnen Extrakten vor allem in den höheren Konzentrationen (Phy-1 500 μ g/ml, Phy-2 500 μ g/ml, Phy-3 50 μ g/ml & 500 μ g/ml, Phy-5 5 μ g/ml & 500 μ g/ml) eine Verminderung der adhärennten Zellen, eine teilweise Abrundung der Zellen sowie eine erhöhte Granularität festgestellt werden (Abbildung 3).

Diese Beobachtungen lassen darauf schließen, dass die Pflanzenextrakte dosisabhängig einen Einfluss auf die Proliferation und Zellmorphologie z. B. durch Effekte auf das Zytoskelett der Chondrozyten haben. Um diese Ergebnisse zu validieren wurde mittels Alamar Blue Test der Stoffumsatz und somit indirekt die Stoffwechselaktivität der Zellen untersucht.

5.3 Einfluss der Pflanzenextrakte auf die metabolische Aktivität und die Zellvitalität

5.3.1 mittels Alamar Blue Assay

Bei diesem Test wurde als Maß für die von den einzelnen Pflanzenextrakten ausgehende Toxizität die Minderung der Stoffwechselaktivität im Verhältnis zu einer unbehandelten Kontrolle gemessen. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle das Zellgift SDS mitgeführt, bei dem von einer Hemmung des Stoffwechsels auszugehen ist.

Auch in anderen Arbeiten wurde zur Beurteilung der Zytotoxizität der dort zu testenden Pflanzenextrakte die Veränderung des Absorptionsspektrums der hinzugefügten Farbstoffe verwendet. So nutzten Kim et al. den water soluble tetrazolium-1 (WST-1) Assay um die mögliche zytotoxische Wirkung des Piperins auf die kultivierten Makrophagen zu beurteilen. Genau wie in der vorliegenden Arbeit wurde der Test weiterhin genutzt um eine Vorauswahl aus unterschiedlichen Dosierungen vorzunehmen.⁷¹ Auch in einer weiteren Arbeit, die sich mit der Wirkung eines aus *Arctium Lappa* gewonnen Wirkstoffes auf die durch den Transkriptionsfaktor NF- κ B induzierten Signalwege im Makrophagen befasst, wurde um die Zellproliferation beurteilen zu können der WST-1-Assay verwendet.⁸⁷

Bei der Bestimmung der Absorptionsspektrumsänderung handelt es sich also um ein regelmäßig verwendetes Verfahren. Mit diesem lassen sich verschiedene Dosierungen eines Wirkstoffes im Hinblick auf ihren Einfluss auf die Zellproliferation einzelner Zelltypen relativ einfach beurteilen.

Da der Alamar Blue Assay im Labor bereits etabliert war und sich zuvor schon aussagekräftige Ergebnisse bei der Testung von humanen Chondrozyten erzielen ließen, kam dieser Assay auch in der hier vorliegenden Arbeit zur Anwendung.

Wie in Abbildung 4 zu erkennen, wurde bereits nach 7 h ein signifikant hemmender Effekt auf den Stoffumsatz der Chondrozyten durch die Extrakte 1, 2, 3 und 5 in der höchsten Konzentration (500 μ g/ml) verzeichnet. Diese Beobachtung ist deckungsgleich mit den zuvor lichtmikroskopisch festgestellten zellmorphologischen Veränderungen.

Auch nach 24 h waren diese Ergebnisse noch zu erkennen. Hier zeigt sich, dass der Birkenblätterextrakt in allen Konzentrationen eine hemmende Wirkung auf den Stoffwechsel der Chondrozyten hat. Bei den mit 500 µg/ml behandelten Zellen ist diese auf 56% im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Auch bei den mit Brennesselextrakt in der höchsten Konzentration behandelten Zellen lässt sich eine Reduktion auf 40% feststellen.

Der größte hoch signifikante Effekt in Form einer Suppression des Zellmetabolismus zeigt sich jedoch vor allem für Phy-5 (schwarzer Pfeffer) in der Konzentration 500 µg/ml. Hier wurde eine weit höhere prozentuale Reduktion gemessen als bei SDS. Bei diesem Extrakt ist somit davon auszugehen, dass die Konzentration 500 µg/ml einen zytotoxischen Effekt auf die Knorpelzellen hat.

5.3.2 mittels Lebend-Tod-Färbung

Ebenfalls bestätigt wurden diese Ergebnisse in der Lebend-Tod-Färbung. Auch hier zeigte sich verminderte Zellproliferation und verminderte Zellvitalität bei der Stimulation mit dem jeweiligen Pflanzenextrakt in der Konzentration 500 µg/ml (Abbildung 6).

In Korrelation mit dem Alamar Blue Assay zeigte sich auch hier eine klar erkennbare Inhibition der Zellvitalität und somit ein zytotoxischer Effekt nach der Behandlung mit schwarzem Pfefferextrakt in der höchsten Konzentration.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die Stimulationsversuche mit der Konzentration 500 µg/ml nicht fortgesetzt und diese Konzentration für die Genexpressionsanalyse nicht mit eingeschlossen, da bei nahezu allen Extrakten eine Verminderung der Stoffwechselaktivität zu beobachten war und deshalb davon auszugehen ist, dass eine Verzehnfachung der Konzentration keinen protektiven Nutzen für die Chondrozyten hat.

Allerdings muss im Hinblick auf die inhibierende Wirkung des schwarzen Pfefferextraktes auch seine Herstellung mit 40% Ethanol als Extraktionsmittel in Betracht gezogen werden. Da Ethanol bekanntlich als starkes Zellgift wirkt^{88,89} und die Wirkung von schwarzem Pfeffer auf Knorpelzellen wenig erforscht ist, wäre es sinnvoll, die Wirkung dieses Extraktes gelöst in einem anderen Extraktionsmittel erneut zu testen.

Für die anderen Pflanzenextrakte stehen nur vereinzelt vergleichbare Studienergebnisse zur Verfügung.

So konnte in den Experimenten von Huh et al. kein zytotoxischer Effekt für das aus der Rinde der *Betula Platyphyla var. japonica* gewonnenen Extraktes nachgewiesen werden.^{60,56} Hier wurde allerdings ein oraler Zytotoxizitäts-Test mit einer Dosierung von 5 g/kg Körpergewicht an Ratten und Kaninchen vorgenommen. Die direkten Auswirkungen des Birkenextraktes auf den

Stoffwechsel der Chondrozyten wurden so in keinem vergleichbaren Experiment untersucht. Außerdem wurde in den Versuchen dieser Arbeit der Extrakt aus den Blättern nicht der Rinde der *Betula pendula / pubescens* verwendet und ein Vergleich lässt sich auch aus diesem Grund schwer herstellen.

Zhao et al. führen in ihrer Studie ebenfalls ein Zytotoxizitäts-Assay *in vitro* mit einer aus Klettenwurzel gewonnenen Stoffgruppe an Makrophagen durch und stellen hier bei einer Konzentration von 100 µM keinen zytotoxischen Effekt dieser Substanz fest.⁶⁵

Auch für diesen Pflanzenextrakt stehen sonst keine vergleichbaren experimentellen Ergebnisse an Chondrozyten zur Verfügung.

5.4 Einfluss der Pflanzenextrakte auf das Genexpressionsprofil der Chondrozyten

Nach Ausschluss der höchsten Konzentration von 500 µg/ml auf Grund der Inhibierung der Stoffwechselaktivität und Zellvitalität wurden die fünf Pflanzenextrakte in den verbliebenen Konzentrationen von 5 µg/ml und 50 µg/ml auf ihren Einfluss auf das Genexpressionsprofil der Chondrozyten getestet. Die Stimulation mit IL-1β diente hier als stark vereinfachtes *in vitro* induziertes Arthrosemodell. Durch die alleinige Verwendung der Pflanzenextrakte in der Konzentration 50 µg/ml sollte zumindest in einer Konzentration die Wirkung der Extrakte auf Knorpelzellen überprüft werden.

Es wurde vor allem die Expression von für den EZM – Aufbau verantwortlicher Proteine sowie für mit OA assoziierten Entzündungsmediatoren untersucht, da diese als Ziele für eine medikamentöse Therapie vielversprechend sind.

5.4.1 Pflanzenextrakt 1 – Birkenblätterextrakt - *Betula pendula / pubescens*

Dieser Extrakt übte auf die Expression wichtiger EZM–Bestandteile einen eher im Trend stimulatorischen Effekt aus und ließ bei der Aggrecanexpression bei alleiniger Stimulation eine signifikante Erhöhung der Expression erkennen. Auch beim chondrogenen Transkriptionsfaktor SOX 9 ließ sich dieser stimulatorische Trend erkennen aber nicht als signifikant darstellen.

Interessanterweise scheint der Extrakt zwar keine inhibierenden Effekt auf die Genexpression der für den Knorpelaufbau wichtigen Proteine und Transkriptionsfaktoren zu haben, allerdings supprimiert er genauso wenig die Expression der für die Entstehung der OA verantwortlichen Entzündungsmediatoren wie IL-1β, TNF-α und COX-2 sowie für die Knorpeldegradation

verantwortlichen MMPs-1 und -3, deren Genexpression durch den Birkenblätterextrakt signifikant erhöht werden.

Huh et al. konnten dem Extrakt der asiatischen Birke im Tiermodell und an Synoviozyten über die Downregulation von NF- κ B und die daraus resultierende Inhibierung der PGE₂ und iNOs einen anti-inflammatorischen Effekt nachweisen und empfehlen dieses Extrakt zu Therapie Zwecken der OA.^{60,56} Diese Beobachtungen konnten sich jedoch für den in dieser Arbeit verwendeten Birkenblätterextrakt nicht bestätigen.

5.4.2 Pflanzenextrakt 2 – Brennnesselextrakt - *Urtica dioica / urens*

Die Kollagen Typ II Expression blieb durch den Extrakt unbeeinflusst allerdings wurde die Aggrecanexpression z.T. hochsignifikant supprimiert. Der für SOX 9 gemessenen stimulatorische Effekt lässt sich in diesem Hinblick am wahrscheinlichsten als gegenregulatorischer Effekt auf die Supprimierung von Aggrecan erklären. SOX 9 wird nämlich nicht nur mit Kollagen Typ II co-exprimiert sondern ebenfalls mit Aggrecan.^{27,28}

Ebenso wie Phy-1 induzierte Phy-2 signifikant die TNF- α Induktion hat aber allein auf die Transkription der Gene der anderen katabolen und entzündlichen Mediatoren keinen Einfluss.

Bei einer verminderten Expression von Aggrecan und einer TNF- α Induktion kann bei diesem Pflanzenextrakt auf eine potenziell eher katabole Wirkung geschlossen werden.

Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse von Schulze-Tanzil et al. bei der Verwendung eines Medikamentes (Hox alpha), welches auf der Basis eines Brennnesselsubstrates beruht, ließ sich in dieser Studie eine Hemmung der MMPs erkennen.⁵⁹

Allerdings wurden die Chondrozyten im Gegensatz zu dieser Arbeit auf Kollagen Typ- II kultiviert und die Zusammensetzung von Hox alpha wird ebenfalls nicht dem hier verwendeten Extrakt entsprechen. Daher ist eher von unterschiedlichen experimentellen Voraussetzungen auszugehen und ein Vergleich ist erneut schwer herzustellen.

5.4.3 Pflanzenextrakt 3 – Klettenwurzelextrakt – *Arctium lappa*

Auch durch das Klettenwurzelextrakt wird die Genexpression von Kollagen Typ II und Aggrecan inhibiert. Bei der Expression von Aggrecan war diese Inhibierung ebenfalls signifikant und genau wie bei Phy-2 lässt sich ein Trend zur auf Genebene gegenregulatorischen Expression von SOX 9 feststellen. Dieser tritt in der Konzentration von 50 μ g/ml und in Kombination mit IL-1 β auf.

Auf die Genexpression der katabol wirkenden Mediatoren hat der Extrakt keine signifikante Auswirkung. Die IL-1 β Wirkung wird ebenfalls durch keine der untersuchten Konzentrationen

signifikant beeinflusst. Einzig die Expression von COX-2 wird in Kombination mit IL-1 β durch die niedrigste Konzentration signifikant erhöht.

Also zeigt sich auch bei diesem Extrakt eher eine Verstärkung der katabolen Effekte des IL-1 β .

Da auch für die Verwendung von Klettenwurzel keine vergleichbaren Studien an Chondrozyten vorliegen, können keine vergleichbaren Ergebnisse herangezogen werden. Lediglich die antioxidative und anti-inflammatorische Wirkung wurden in einzelnen Studien an monozytischen Makrophagen und Tumorzelllinien untersucht, wobei sich eine inhibitorische Wirkung auf die Produktion von NO- und pro-inflammatorische Zytokinen sowie ein hemmender Effekt auf den NF- κ B Pathway und weiterhin eine Aktivierung von antioxidativen Enzymen zeigte.^{53,65,61}

5.4.4 Pflanzenextrakt 4 – Zwiebelextrakt – *Allium cepa*

Weder die Genexpression von Kollagen Typ II noch Aggrecan und SOX 9 wurden durch den Zwiebelextrakt signifikant supprimiert. Allerdings hatte der Pflanzenextrakt auch keinen Einfluss auf die Genexpression der Entzündungsmediatoren und katabolen Substanzen. Lediglich die MMP-3 konnte durch die Konzentration 50 μ g/ml signifikant supprimiert werden.

Auf die IL- 1 β Wirkung hatten beide Konzentrationen jedoch keinen Einfluss.

Auch der Zwiebel werden wie allen anderen Pflanzenextrakten anti-inflammatorische und antioxidative Eigenschaften zugesprochen.^{90,91} Jedoch liegen für die Wirkung der Zwiebel auf Gelenkchondrozyten nur vereinzelte publizierte Studien vor und so lassen sich auch nur schwer vergleichbare experimentelle Ergebnisse dieser Art heranziehen.

Vereinzelte Studien haben jedoch die Wirkung von Quercetin auf andere Zelltypen untersucht.

So zeigt die bereits erwähnte Studie von Apichart et al. eine gesteigerte Proliferation von Knorpelzellen der sphenooccipitalen Synchondrose durch eine induzierende Wirkung von Quercetin, einem Flavonoid aus der Zwiebel, auf die Genexpression von SOX 9 und Kollagen Typ II.⁷⁰

In einer Studie von Sato et al. konnte für Quercetin eine Inhibierung der durch TNF- α induzierten NF- κ B-Aktivierung in humanen Synoviozyten nachgewiesen werden. Durch diese Inhibierung wird gleichzeitig die Transkription der pro-inflammatorischen Gene für IL-8 und das monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), ein Chemokin, das für die Migration von T-Lymphozyten und Natürlichen Killer (NK)-Zellen mitverantwortlich ist, reduziert.^{92,69}

In einer weiteren Studie von Jackson et al. wurde durch Quercetin die Angiogenese sowie die Proliferation von Synoviozyten inhibiert. Beides spielt eine Rolle in der Pannusbildung bei rheumatoider Arthritis und fortgeschrittener OA. Bei der Behandlung von Chondrozyten mit

Quercetin hatte dieses in dieser Studie allerdings keinen Effekt auf die Expression der MMP-1. Allerdings zeigte sich ein geringer Effekt auf die Expression der MMP-3 durch die höchste verwendete Konzentration von 10 μM .⁵⁴ Dieser supprimierende Effekt konnte auch in der vorliegenden Arbeit bei einer Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden.

5.4.5 Pflanzenextrakt 5 – schwarzer Pfefferextrakt – *Piper nigrum*

Ähnlich wie bei den anderen Pflanzenextrakten gibt es auch nur wenige vergleichende Studien, in denen Chondrozyten mit schwarzem Pfefferextrakt behandelt wurden.

In den Experimenten dieser Arbeit zeigte sich, dass die zuvor in den Vitalitätsassays beobachtete Zytotoxizität des Extraktes das Genexpressionsprofil der Chondrozyten nicht wesentlich beeinflusste. Ein allerdings nicht-signifikanter Trend zur Induktion der Kollagen Typ II und Aggrecan Genexpression wurde beobachtet. Verglichen mit der IL-1 β Kontrolle war die Aggrecanexpression bei der Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ in der Kombination mit IL-1 β signifikant höher. Dieses lässt darauf schließen, dass der Extrakt trotz induzierter Entzündungsmediatoren, die für den Aufbau der EZM verantwortlichen Gene induzieren konnte. Diese Beobachtung spiegelt sich ebenfalls in der Induktion von SOX 9 in der höchsten Konzentration in Kombination mit IL-1 β wider. Hier könnte es sich um eine kompensatorische Gegenregulation handeln, der chondrogene Transkriptionsfaktor wird hochreguliert, um einer stattfindenden Entzündungsreaktion entgegen zu wirken. Dieses könnte ebenfalls mit der erhöhten Expression von Kollagen Typ II und Aggrecan in der Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ einhergehen.

Zusätzlich ließ sich eine hochsignifikante Reduktion von COX-2 bei alleiniger Stimulation mit dem Pflanzenextrakt mit der Konzentration 50 $\mu\text{g/ml}$ verzeichnen. So wird möglicherweise synergistisch die Entzündungsreaktion gehemmt und der Aufbau der EZM induziert.

Allerdings ergaben sich im Hinblick auf die Zytokin- und MMP-Expression keine signifikanten Einflüsse durch die alleinige Behandlung mit schwarzem Pfefferextrakt. Ein weiterer kataboler Effekt zeigte sich in der Induktion von MMP-1. Die MMP-1- Expression wurde signifikant durch den Extrakt (50 $\mu\text{g/ml}$) in Kombination mit IL-1 β gegenüber der alleinigen IL-1 β Behandlung verstärkt. Entsprechend der zuvor beobachteten Beeinflussung des Chondrozyten - stoffwechsels durch den Pfefferextrakt wären weitere solcher eher katabolen Wirkungen zu erwarten gewesen als eine anti-inflammatorische, wie die Supprimierung der COX-2.

Ying et al. erzielten in Bezug auf die Suppression von COX-2 vergleichbare Ergebnisse. Hier wurden OA-Chondrozyten mit Piperin einem phenolisch aktiven Extrakt, das aus schwarzem Pfeffer gewonnen wurde, in drei Konzentrationen (10, 50, 100 $\mu\text{g/ml}$) behandelt und danach mit IL-1 β stimuliert. In dieser Arbeit konnte ein signifikant supprimierender Effekt durch die

Konzentrationen 50 und 100 µg/ml auf die Expression von COX-2 sowie PGE₂ und NO festgestellt werden. Ying et al. konnten weiterhin nachweisen, dass Piperin signifikant den Promoter des NF-κB-Gens inhibiert und so die Produktion von PGE₂ und NO reduziert. Außerdem wurde eine Inhibierung der Genexpression der MMP-3 und MMP-13 nachgewiesen.⁷² Kritisch muss allerdings in dieser Veröffentlichung die geringe Spenderzahl betrachtet werden. So wurden die Experimente lediglich mit Zellen von drei Spendern durchgeführt, welches einer geringeren Spenderzahl als in dieser Arbeit entspricht. Außerdem wurde eine geringere IL-1β Konzentration (5 ng/ml) verwendet als in der gegenwärtigen Studie.

Um das mögliche therapeutische Potential dieses Extrakts zu erforschen wären weitere Versuche, wie bereits oben erwähnt, mit einem anderen Extraktionsmittel und einer anderen Dosierung nötig.

Zu beachten ist weiterhin, dass es bei der Arbeit mit Pflanzenextrakten immer auch auf die Herkunft der Pflanze, die dortigen Bodenbeschaffenheiten und die verwendeten Pflanzenteile, die Lagerung und Extraktionsmethode ankommt. Eine vollständige Übereinstimmung dieser Komponenten ist somit kaum zu gewährleisten.

5.5 Einfluss der Pflanzenextrakte auf den s-GAG -und Kollagengehalt

Um die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse im Hinblick auf die EZM-Bestandteile noch einmal auf Proteinebene zu quantifizieren wurden der DMMB-Assay und der Hydroxyprolinassay mit der Extrakt-Konzentration 5 µg/ml durchgeführt. Diese Konzentration wurde ausgewählt, da sie in den Genexpressionsanalysen recht häufig signifikante Ergebnisse lieferte und es durchaus von Interesse war, ob und wenn ja, welche Wirkung eine so geringe Konzentration auf die Syntheseleistung der Chondrozyten haben könnte. Des Weiteren wäre ein Versuchsaufbau mit beiden Konzentrationen vom Material und Zeitaufwand schlichtweg nicht möglich gewesen.

Im DMMB-Assay zeigte sich nur bei den Extrakten aus Brennnessel und schwarzem Pfeffer ein tendenzielle GAG-Synthese steigernder Effekt in Kombination mit IL-1β, welches wieder auf eine gegenregulatorische Steigerung schließen lassen könnte, da auch die Synthese bei alleiniger IL-1β Stimulation leicht erhöht war.

Diese Ergebnisse entsprechen allerdings nicht der Genexpressionsanalyse, da hier die Aggrecanexpression durch Phy-2 5 µg/ml in Kombination mit IL-1β signifikant supprimiert wird und auch Phy-5 wirkt tendenziell eher hemmend.

Es gilt jedoch zu beachten, dass es sich beim DMMB-Assay um eine Messung aller s-GAGs als Bestandteil der Proteoglykane handelt. Somit wird hier nicht nur die sulfatierte Seitenkette des Aggrecans erfasst sondern auch alle anderen PGs.

Womit eine Divergenz der Genexpressionsanalyse und der Ergebnisse des DMMB-Assays erklärbar wäre. Die Ergebnisse des DMMB-Assays konnten allerdings kein Signifikanzniveau erreichen und so lässt sich hier auch nur von Tendenzen sprechen.

Auch bei der Kollagengehaltsbestimmung durch die Hydroxyprolinmessung konnten keine signifikanten Ergebnisse erzielt werden. Lediglich eine Tendenz zur Synthesesteigerung durch Pflanzenextrakt 5 (schwarzer Pfeffer) konnte gemessen werden. Auch hier lässt sich ein gegenregulatorischer Effekt annehmen, da auch hier der Kollagengehalt durch IL-1 β leicht erhöht wurde. Auch in der Genexpressionsanalyse lässt sich eine tendenziell erhöhte Expression von Kollagen Typ II feststellen.

Es muss jedoch auch beim Hydroxyprolinassay in Betracht gezogen werden, dass sich die Messung auf den Gesamtkollagengehalt bezieht und somit nicht nur die Synthese von Kollagen Typ II gemessen wird sondern auch alle anderen durch Chondrozyten synthetisierte Kollagene.

Möglich wäre es, dass sich der Gesamtkollagengehalt nach einer längeren Inkubationszeit deutlich erhöht hätte, da kultivierte Chondrozyten durch Dedifferenzierung zunächst die Expression von Kollagen Typ II herunter regulieren und erst nach ihrer Dedifferenzierung zu einem Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp nach mehreren Tagen dann vermehrt Kollagen Typ I produzieren.^{8,93,94,83}

6 Fazit und Ausblick

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen für alle verwendeten Pflanzenextrakte eine dosisabhängige und bei moderaten Dosen nicht zytotoxische Wirkung auf Chondrozyten. Dieses ist im Hinblick auf einen therapeutischen Einsatz der Extrakte von hoher Bedeutung.

Allerdings lassen sich in der Genexpression auch keine hervorstechenden entzündungshemmenden Effekte der einzelnen Extrakte nachweisen. Lediglich der aus der Zwiebel gewonnene Extrakt supprimierte die Genexpression der MMP-3 signifikant (Abbildung 19). Auch der schwarze Pfefferextrakt ließ zumindest eine hochsignifikante Unterdrückung der COX-2 Expression erkennen (Abbildung 20). Durch diese Ergebnisse stellt sich nun die Frage des therapeutischen Nutzens der jeweiligen Pflanzenextrakte. Die anti-inflammatorische und EZM- Abbau hemmende Wirkung der Extrakte 4 und 5 müsste in weiteren Experimenten erneut untersucht und bestätigt werden. Da in dieser Arbeit lediglich die Genexpression untersucht wurde, kann über die eigentliche Aktivität der MMPs hier keine Aussage getroffen werden und müsste ebenfalls in einer weiteren Studie untersucht werden.

Außerdem wäre es von Interesse die Extrakte auch in anderen Konzentrationen zu testen. In der vorliegenden Arbeit wurden lediglich drei Konzentrationen untersucht deren Spanne untereinander sehr hoch war. So zeigten sich in der Konzentration 500 µg/ml zum Teil zytotoxische Effekte sowohl beim Extrakt aus schwarzem Pfeffer als auch bei allen anderen Extrakten (Abbildung 6). Zu diskutieren wäre hier, ob eine erneute Testung mit Konzentrationen in geringerer Abstufung sinnvoll wäre, um die optimale Wirkdosis der einzelnen Extrakte einzugrenzen.

Da sich allerdings auch potenziell katabole Effekte vor allem der Pflanzenextrakte 1, 2 und 3 nachweisen ließen, ist hier fraglich ob eine weitere Testung überhaupt in Frage käme.

Da die einzelnen Wirkkomponenten der Pflanzenextrakte nicht bekannt sind, kann ebenfalls kein Rückschluss auf das Einfluss nehmende Substrat gezogen werden. So wurden in dieser Arbeit die Pflanzenextrakte als Ganzes untersucht und nicht die einzelnen Wirkstoffe, die diese enthalten. So bleibt unklar, welche Wirkstoffgruppe den genauen Einfluss auf die Chondrozyten genommen hat. Zu überlegen wäre ob man sich bei weiteren Versuchen auf eine Komponente der Pflanze beschränken sollte, so wie bereits bei den Experimenten mit Piperin (Wirkstoff aus schwarzem Pfeffer) und Quercetin (Wirkstoff der Zwiebel) verfahren wurde.^{55,67,72}

Desweiteren gilt zu bedenken, dass trotz durchgeführtem makroskopischem Arthrosescoreing (Tabelle 19) eine arthrotische Veränderung des Probenmaterials nicht auszuschließen ist. So

ergibt sich bei der Verwendung humaner Chondrozyten eine erhebliche Spendervarianz und somit auch eine hohe Varianz der Ergebnisse. Dieses ist sicherlich ebenfalls beeinflusst durch die untersuchte Spenderanzahl, die zwischen $n = 3$ und $n = 7$ rangierte. Erklären lässt sich dies durch den hohen Aufwand der mit der Chondrozyten-Kultivierung einhergeht und den zum Teil erfolglosen Kultivierungsversuchen einiger Spender.

All umfassend besteht vor allem im Bereich der Therapie mit Phytopharmaka noch Forschungsbedarf. So sind nicht nur der Bestandteil der Pflanze, sowie das Extraktionsmittel von Interesse, sondern es zeigen sich durchaus dosisabhängige Effekte, die weiter untersucht werden können.

Im Blick der Forschung stehen zudem nicht nur die fünf in dieser Arbeit getesteten Pflanzenextrakte sondern auch aus anderen Pflanzen konnten bereits potenzielle medikamentöse Therapeutika gewonnen werden.

So wurden in einer Arbeit von Shakibaei et al. Chondrozyten mit Curcumin, einem aus der Gelbwurzel (*Curcuma longa*) gewonnenem Farbstoff mit anti-inflammatorischen und antioxidativen Eigenschaften, behandelt. Hier ergab sich eine Suppression, der durch NF- κ B regulierten und durch IL-1 β und TNF- α induzierten katabolen und pro-inflammatorischen Signalwege.⁹⁵

Im Hinblick auf die Behandlung der Osteoarthrose und den protektiven Eigenschaften verschiedener Pflanzenextrakte lassen sich weitere Arbeiten in diesem Bereich anfügen.

So konnten Kim et al., dem Amur Korkbaum (*Phellodendron amurense*) Extrakt eine dosisabhängige inhibierende Wirkung auf die Synthese von Aggrecanase und MMPs bei mit IL-1 α stimulierten Chondrozyten nachweisen.⁹⁶

Neuere Studien befassen sich mit der Wirkung der Ingwerwurzel auf durch OA und rheumatoide Arthritis veränderte Gelenke und Knorpelzellen.^{97,98,99}

Auch im weiten Feld der Phytopharmaka ist die Suche nach einem potenten Medikament gegen die OA noch nicht beendet und so bleiben sicherlich viele pflanzliche Wirkstoffe als potenzielle Behandlungsoptionen in der Therapie der OA zu untersuchen.

7 Literaturverzeichnis

1. Bertrand, J. & Pap, T. Neues aus der Arthroseforschung. *DMW - Dtsch. Med. Wochenschr.* 137, 1766–1768 (2012).
2. Millennium, W. S. G. on the B. of M. C. at the S. of the N. The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium: report of a WHO Scientific Group. 919, (World Health Organization, 2003).
3. Woolf, A. D. & Pfleger, B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull. World Health Organ.* 81, 646–656 (2003).
4. Martel-pelletier, J. Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 31–33 (2004).
5. Fernandes, J. C., Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J.-P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39, 237–246 (2002).
6. Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie ‘Gesundheit in Deutschland aktuell 2010’ - Arthrose.pdf. at http://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/Geda2010/Arthrose.pdf?__blob=publicationFile
7. AWMF online. Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC) und des Berufsverbandes der Ärzte für Orthopädie (BVO). (2009). at http://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/033-0011_S3_Koxarthrose_2009-11.pdf
8. Schulze-Tanzil, G. Activation and dedifferentiation of chondrocytes: Implications in cartilage injury and repair. *Ann. Anat. - Anat. Anz.* 191, 325–338 (2009).
9. Cucchiaroni, M., Orth, P., Rey-Rico, A., Venkatesan, J. K. & Madry, H. Current perspectives in stem cell research for knee cartilage repair. *Stem Cells Cloning Adv. Appl.* 1 (2014). doi:10.2147/SCCAA.S42880
10. Lüllmann-Rauch, R. & Paulsen, F. Taschenlehrbuch Histologie. (Georg Thieme Verlag, 2012).
11. Goldring, M. B. & Marcu, K. B. Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases. *Arthritis Res Ther* 11, 224 (2009).
12. Poole, A. R. et al. Type II collagen degradation and its regulation in articular cartilage in osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 61, ii78–ii81 (2002).
13. Lin, Z., Willers, C., Xu, J. & Zheng, M.-H. The chondrocyte: biology and clinical application. *Tissue Eng.* 12, 1971–1984 (2006).

14. Archer, C. W. & Francis-West, P. The chondrocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 35, 401–404 (2003).
15. Martinek, V. Anatomie und Pathophysiologie des hyalinen Knorpels. *Dtsch. Z. Für Sportmed.* 54, 166–170 (2003).
16. Poole, A. R. et al. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin. Orthop.* 391, S26–S33 (2001).
17. Madry, H., van Dijk, C. N. & Mueller-Gerbl, M. The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 18, 419–433 (2010).
18. Reginato, A. M. & Olsen, B. R. The role of structural genes in the pathogenesis of osteoarthritic disorders. *Arthritis Res.* 4, 337–345 (2002).
19. Goldring, M. B. Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis. *Ther. Adv. Musculoskelet. Dis.* 4, 269–285 (2012).
20. Goggs, R., Carter, S. D., Schulze-Tanzil, G., Shakibaei, M. & Mobasheri, A. Apoptosis and the loss of chondrocyte survival signals contribute to articular cartilage degradation in osteoarthritis. *Vet. J.* 166, 140–158 (2003).
21. Venn, M. F. Variation of chemical composition with age in human femoral head cartilage. *Ann. Rheum. Dis.* 37, 168–174 (1978).
22. Blagojevic, M., Jinks, C., Jeffery, A. & Jordan, K. P. Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* 18, 24–33 (2010).
23. Bierma-Zeinstra, S. M. & Koes, B. W. Risk factors and prognostic factors of hip and knee osteoarthritis. *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* 3, 78–85 (2007).
24. Poole, A. R. Osteoarthritis as a Whole Joint Disease. *HSS J.* 8, 4–6 (2012).
25. Goldring, S. R. & Goldring, M. B. The Role of Cytokines in Cartilage Matrix Degeneration in Osteoarthritis: *Clin. Orthop.* 427, S27–S36 (2004).
26. Blanco Garcia, F. J. Catabolic events in osteoarthritic cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 7, 308–309 (1999).
27. Wegner, M. From head to toes: the multiple facets of Sox proteins. *Nucleic Acids Res.* 27, 1409–1420 (1999).
28. Sekiya, I. SOX9 Enhances Aggrecan Gene Promoter/Enhancer Activity and Is Up-regulated by Retinoic Acid in a Cartilage-derived Cell Line, TC6. *J. Biol. Chem.* 275, 10738–10744 (2000).

29. Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N. & de Crombrughe, B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1 (II) collagen gene. *Mol. Cell. Biol.* 17, 2336–2346 (1997).
30. Hardingham, T. E., Oldershaw, R. A. & Tew, S. R. Cartilage, SOX9 and Notch signals in chondrogenesis. *J. Anat.* 209, 469–480 (2006).
31. Lauder, S. N. et al. Interleukin-1 induced activation of nuclear factor- κ B can be inhibited by novel pharmacological agents in osteoarthritis. *Rheumatology* 46, 752–758 (2007).
32. Chen, Y., Nixon, N. B., Dawes, P. T. & Matthey, D. L. Influence of variations across the MMP-1 and-3 genes on the serum levels of MMP-1 and-3 and disease activity in rheumatoid arthritis. *Genes Immun.* 13, 29–37 (2011).
33. Bau, B. et al. Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro. *Arthritis Rheum.* 46, 2648–2657 (2002).
34. Eyre, D. Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res.* 4, 30–35 (2002).
35. Ayad, S., Boot-Handford, R., Humphries, M. J., Kadler, K. E. & Shuttleworth, A. in *The Extracellular Matrix FactsBook (Second Edition)* (eds. Ayad, S., Boot-Handford, R., Humphries, M. J., Kadler, K. E. & Shuttleworth, A.) 202–204 (Academic Press, 1998). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120689118501494>>
36. Ayad, S., Boot-Handford, R., Humphries, M. J., Kadler, K. E. & Shuttleworth, A. in *The Extracellular Matrix FactsBook (Second Edition)* (eds. Ayad, S., Boot-Handford, R., Humphries, M. J., Kadler, K. E. & Shuttleworth, A.) 208–209 (Academic Press, 1998). at <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780120689118501512>>
37. Müller, R. D. et al. IL-10 overexpression differentially affects cartilage matrix gene expression in response to TNF- α in human articular chondrocytes in vitro. *Cytokine* 44, 377–385 (2008).
38. Inhibition of tumor necrosis factor α -induced prostaglandin E2 production by the antiinflammatory cytokines interleukin-4, interleukin-10, and interleukin-13 in osteoarthritic synovial fibroblasts: Distinct targeting in the signaling pathways - Alaaeddine - 2001 - *Arthritis & Rheumatism* - Wiley Online Library. at <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131\(199904\)42:4%3C710::AID-ANR14%3E3.0.CO;2-4/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1529-0131(199904)42:4%3C710::AID-ANR14%3E3.0.CO;2-4/pdf)>
39. Li, Y., Xu, L. & Olsen, B. R. Lessons from genetic forms of osteoarthritis for the pathogenesis of the disease. *Osteoarthr. CartilageOARS Osteoarthr. Res. Soc.* 15, 1101 (2007).

40. Botter, S. M. et al. Cartilage damage pattern in relation to subchondral plate thickness in a collagenase-induced model of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16, 506–514 (2008).
41. Heisel, J. Konservative Behandlungsmöglichkeiten bei der Koxarthrose. *Hüfte* 77–87 (2005).
42. Hunziker, E. Articular cartilage repair: basic science and clinical progress. A review of the current status and prospects. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 432–463 (2002).
43. Bhala, N. et al. Vascular and upper gastrointestinal effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: meta-analyses of individual participant data from randomised trials. *Lancet* 382, 769–779 (2013).
44. Dib, R. A., Chinzon, D., de Souza Fontes, L. H., de Sá Teixeira, A. C. & Navarro-Rodriguez, T. Ulcer and bleeding complications and their relationship with dyspeptic symptoms in NSAIDs users: a transversal multicenter study. *Scand. J. Gastroenterol.* 49, 785–789 (2014).
45. Rofecoxib for osteoarthritis - Cochrane Database of Systematic Reviews - Garner - Wiley Online Library. at <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/14651858.CD005115/pdf>>
46. Mayer, S., Vitzthum, K., Schöffel, N., Groneberg, D. A. & Spallek, M. Arthrose — zum aktuellen Kenntnisstand über die Ätiologie, Diagnose und Therapie. *Zentralblatt Für Arbeitsmedizin Arbeitsschutz Ergon.* 60, 154–168 (2010).
47. Schulze-Tanzil. Characterization of auricular chondrocytes and auricular/articular chondrocyte co-cultures in terms of an application in articular cartilage repair. *Int. J. Mol. Med.* 25, (2010).
48. Marlovits, S., Zeller, P., Singer, P., Resinger, C. & Vécsei, V. Cartilage repair: Generations of autologous chondrocyte transplantation. *Eur. J. Radiol.* 57, 24–31 (2006).
49. Murphy, J. M., Fink, D. J., Hunziker, E. B. & Barry, F. P. Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis Rheum.* 48, 3464–3474 (2003).
50. Sayed, K. E. et al. Heterotopic Autologous Chondrocyte Transplantation—A Realistic Approach to Support Articular Cartilage Repair? *Tissue Eng. Part B Rev.* 16, 603–616 (2010).
51. Lovell, D. J., Bowyer, S. L. & Solinger, A. M. Interleukin-1 blockade by anakinra improves clinical symptoms in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease. *Arthritis Rheum.* 52, 1283–1286 (2005).
52. Rudolphi, K. Pralnacasan, an inhibitor of interleukin-1 β converting enzyme, reduces joint damage in two murine models of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 11, 738–746 (2003).
53. Chan, Y.-S. et al. A review of the pharmacological effects of *Arctium lappa* (burdock). *Inflammopharmacology* 19, 245–254 (2011).

54. Jackson, J. K., Higo, T., Hunter, W. L. & Burt, H. M. The antioxidants curcumin and quercetin inhibit inflammatory processes associated with arthritis. *Inflamm. Res.* 55, 168–175 (2006).
55. Bang, J. S. et al. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Res. Ther.* 11, R49 (2009).
56. Huh, J.-E. et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effect of *Betula platyphylla* var. *japonica* in human interleukin-1 β -stimulated fibroblast-like synoviocytes and in experimental animal models. *J. Ethnopharmacol.* 135, 126–134 (2011).
57. Chrubasik, J. E., Roufogalis, B. D., Wagner, H. & Chrubasik, S. A. A comprehensive review on nettle effect and efficacy profiles, Part I: *Herba urticae*. *Phytomedicine* 14, 423–435 (2007).
58. Riehemann, K., Behnke, B. & Schulze-Osthoff, K. Plant extracts from stinging nettle (*Urtica dioica*), an antirheumatic remedy, inhibit the proinflammatory transcription factor NF- κ B. *FEBS Lett.* 442, 89–94 (1999).
59. Schulze-Tanzil, C. et al. Effects of the antirheumatic remedy Hox alpha-a new stinging nettle leaf extract-on matrix metalloproteinases in human chondrocytes in vitro. (2002). at <http://digitum.um.es/jspui/handle/10201/20774>
60. Huh, J.-E. et al. Protective effects of butanol fraction from *Betula Platyphylla* var. *japonica* on cartilage alterations in a rabbit collagenase-induced osteoarthritis. *J. Ethnopharmacol.* 123, 515–521 (2009).
61. Predes, F. S., Ruiz, A. L., Carvalho, J. E., Foglio, M. A. & Dolder, H. Antioxidative and in vitro antiproliferative activity of *Arctium lappa* root extracts. *BMC Complement. Altern. Med.* 11, 25 (2011).
62. Fermor, B. Induction of cyclooxygenase-2 by mechanical stress through a nitric oxide-regulated pathway. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 792–798 (2002).
63. Blanco, F. J., Ochs, R. L., Schwarz, H. & Lotz, M. Chondrocyte apoptosis induced by nitric oxide. *Am. J. Pathol.* 146, 75 (1995).
64. Wang, B.-S., Yen, G.-C., Chang, L.-W., Yen, W.-J. & Duh, P.-D. Protective effects of burdock (*Arctium lappa* Linne) on oxidation of low-density lipoprotein and oxidative stress in RAW 264.7 macrophages. *Food Chem.* 101, 729–738 (2007).
65. Zhao, F., Wang, L. & Liu, K. In vitro anti-inflammatory effects of arctigenin, a lignan from *Arctium lappa* L., through inhibition on iNOS pathway. *J. Ethnopharmacol.* 122, 457–462 (2009).

66. Park, S. Y. et al. Lignans from *Arctium lappa* and their inhibition of LPS-induced nitric oxide production. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* 55, 150–152 (2007).
67. Mamani-Matsuda, M. et al. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. *Biochem. Pharmacol.* 72, 1304–1310 (2006).
68. Comalada, M. et al. In vivo quercitrin anti-inflammatory effect involves release of quercetin, which inhibits inflammation through down-regulation of the NF- κ B pathway. *Eur. J. Immunol.* 35, 584–592 (2005).
69. Sato, M., Miyazaki, T., Kambe, F., Maeda, K. & Seo, H. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the induction of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human synovial cells. *J. Rheumatol.* 24, 1680–1684 (1997).
70. Apichart, V., Wong, R., Rabie, B. & Lei, S. The effect of quercetin on expression of SOX9 and subsequent release of type II collagen in sphenoid-occipital synchondroses of organ-cultured mice. *Angle Orthod.* 82, 247–253 (2012).
71. Kim, H. G. et al. Piperine inhibits PMA-induced cyclooxygenase-2 expression through downregulating NF- κ B, C/EBP and AP-1 signaling pathways in murine macrophages. *Food Chem. Toxicol.* 50, 2342–2348 (2012).
72. Ying, X. et al. Piperine inhibits IL- β induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte. *Int. Immunopharmacol.* 17, 293–299 (2013).
73. Bonnier, F. et al. Cell viability assessment using the Alamar blue assay: A comparison of 2D and 3D cell culture models. *Toxicol. In Vitro* 29, 124–131 (2015).
74. O'Brien, J., Wilson, I., Orton, T. & Pognan, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. *Eur. J. Biochem.* 267, 5421–5426 (2000).
75. Al-Nasiry, S., Geusens, N., Hanssens, M., Luyten, C. & Pijnenborg, R. The use of Alamar Blue assay for quantitative analysis of viability, migration and invasion of choriocarcinoma cells. *Hum. Reprod.* 22, 1304–1309 (2007).
76. Breeuwer, P. et al. Characterization of uptake and hydrolysis of fluorescein diacetate and carboxyfluorescein diacetate by intracellular esterases in *Saccharomyces cerevisiae*, which result in accumulation of fluorescent product. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1614–1619 (1995).
77. Boyd, V., Cholewa, O. M. & Papas, K. K. Limitations in the use of fluorescein diacetate/propidium iodide (FDA/PI) and cell permeable nucleic acid stains for viability measurements of isolated islets of Langerhans. *Curr. Trends Biotechnol. Pharm.* 2, 66 (2008).

78. Holzapfel, B. & Wickert, L. Die quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR). Methoden und Anwendungsgebiete. *Biol. Unserer Zeit* 37, 120–126 (2007).
79. Pfaffl, M. W. Real-time RT-PCR: Neue Ansätze zur exakten mRNA Quantifizierung. *BIOspektrum* 1, 92–95 (2004).
80. Kesava Reddy, G. & Enwemeka, C. S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clin. Biochem.* 29, 225–229 (1996).
81. ICRS - International Cartilage Repair Society. at <http://www.cartilage.org/index.php?pid=223&search=ICRS%20Evaluation&result=true>
82. Rodríguez-Merchán, E. C. & Gómez-Cardero, P. The Outerbridge Classification Predicts the Need for Patellar Resurfacing in TKA. *Clin. Orthop.* 468, 1254–1257 (2010).
83. Lin, Z. et al. Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation. *J. Orthop. Res.* 26, 1230–1237 (2008).
84. Fan, Z., Bau, B., Yang, H., Soeder, S. & Aigner, T. Freshly isolated osteoarthritic chondrocytes are catabolically more active than normal chondrocytes, but less responsive to catabolic stimulation with interleukin-1? *Arthritis Rheum.* 52, 136–143 (2005).
85. Huch, K., Stöve, J. & Puhl, W. Vergleichender Überblick über Verfahren zur Kultivierung artikulärer Chondrozyten. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 140, 145–152 (2002).
86. Sasazaki, Y., Seedhom, B. B. & Shore, R. Morphology of the bovine chondrocyte and of its cytoskeleton in isolation and in situ: are chondrocytes ubiquitously paired through the entire layer of articular cartilage? *Rheumatology* 47, 1641–1646 (2008).
87. Kim, B. H. et al. Diarctigenin, a Lignan Constituent from *Arctium lappa*, Down-Regulated Zymosan-Induced Transcription of Inflammatory Genes through Suppression of DNA Binding Ability of Nuclear Factor- κ B in Macrophages. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 327, 393–401 (2008).
88. Johnson, C. S., Blanton, M. R. & Hunter III, E. S. Effects of ethanol and hydrogen peroxide on mouse limb bud mesenchyme differentiation and cell death. *Vitro Cell. Dev. Biol.-Anim.* 40, 108–112 (2004).
89. Verdegaal, S. H. M., Corver, W. E., Hogendoorn, P. C. W. & Taminiau, A. H. M. The cytotoxic effect of phenol and ethanol on the chondrosarcoma-derived cell line OUMS-27 AN IN VITRO EXPERIMENT. *J. Bone Joint Surg. Br.* 90, 1528–1532 (2008).
90. González-Peña, D. et al. Hyaluronidase Inhibiting Activity and Radical Scavenging Potential of Flavonols in Processed Onion. *J. Agric. Food Chem.* 61, 4862–4872 (2013).

91. Takahashi, M. & Shibamoto, T. Chemical Compositions and Antioxidant/Anti-inflammatory Activities of Steam Distillate from Freeze-Dried Onion (*Allium cepa* L.) Sprout. *J. Agric. Food Chem.* 56, 10462–10467 (2008).
92. Deshmane, S. L., Kremlev, S., Amini, S. & Sawaya, B. E. Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *J. Interferon Cytokine Res.* 29, 313–326 (2009).
93. Dedifferentiated chondrocytes cultured in alginate beads: Restoration of the differentiated phenotype and of the metabolic responses to Interleukin-1 β - Lemare - 1998 - *Journal of Cellular Physiology* - Wiley Online Library. at [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-4652\(199808\)176:2%3C303::AID-JCP8%3E3.0.CO;2-S/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-4652(199808)176:2%3C303::AID-JCP8%3E3.0.CO;2-S/pdf)
94. Elima, K. & Vuorio, E. Expression of mRNAs for collagens and other matrix components in dedifferentiating and redifferentiating human chondrocytes in culture. *FEBS Lett.* 258, 195–198 (1989).
95. Shakibaei, M., John, T., Schulze-Tanzil, G., Lehmann, I. & Mobasheri, A. Suppression of NF- κ B activation by curcumin leads to inhibition of expression of cyclo-oxygenase-2 and matrix metalloproteinase-9 in human articular chondrocytes: Implications for the treatment of osteoarthritis. *Biochem. Pharmacol.* 73, 1434–1445 (2007).
96. Kim, J.-H. et al. Effect of *Phellodendron amurense* in protecting human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J. Ethnopharmacol.* 134, 234–242 (2011).
97. Funk, J. L., Frye, J. B., Oyarzo, J. N. & Timmermann, B. N. Comparative Effects of Two Gingerol-Containing *Zingiber officinale* Extracts on Experimental Rheumatoid Arthritis \pm . *J. Nat. Prod.* 72, 403–407 (2009).
98. Levy, A. S., Simon, O., Shelly, J. & Gardener, M. 6-Shogaol reduced chronic inflammatory response in the knees of rats treated with complete Freund's adjuvant. *BMC Pharmacol.* 6, 12 (2006).
99. Villalvilla, A. et al. 6-Shogaol inhibits chondrocytes' innate immune responses and cathepsin-K activity. *Mol. Nutr. Food Res.* 58, 256–266 (2014).

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Gelenkknorpelzonen nach Schulze-Tanzil.....	6
Abbildung 2: Pathogenese der Osteoarthrose.	10
Abbildung 3: Einfluss der Pflanzenextrakte auf die Zellmorphologie humaner Chondrozyten ...	38
Abbildung 4: Metabolische Aktivität humaner Chondrozyten unter dem Einfluss von verschiedenen Pflanzenextrakten nach 7 h.....	40
Abbildung 5: Metabolische Aktivität humaner Chondrozyten unter dem Einfluss von verschiedenen Pflanzenextrakten nach 24 h.....	41
Abbildung 6: Vitalitätsprüfung humaner Chondrozyten mittels FDA/EB- Färbung	42
Abbildung 7: Effizienzbestimmung des Primers BAC für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.....	43
Abbildung 8: Effizienzbestimmung des Primers SOX 9 für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.	44
Abbildung 9: Effizienzbestimmung des Primers IL-1 β für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.	44
Abbildung 10: Effizienzbestimmung des Primers TNF- α für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.....	45
Abbildung 11: Effizienzbestimmung des Primers MMP-3 für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.....	45
Abbildung 12: Effizienzbestimmung des Primers COX-2 für die Genexpressionsanalyse in humanen Gelenkchondrozyten.....	46
Abbildung 13: Genexpression von COL2A1 unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.	48
Abbildung 14: Genexpression von ACAN unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.	50
Abbildung 15: Genexpression von SOX 9 unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.	52
Abbildung 16: Genexpression von IL-1 β unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.	54
Abbildung 17: Genexpression von TNF- α unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.	56

Abbildung 18: Genexpression von MMP-1 unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.	58
Abbildung 19: Genexpression von MMP-3 unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.	59
Abbildung 20: Genexpression von COX-2 (PTGS2) unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten.	61
Abbildung 21: Gesamt-s-GAG-Gehalt der einzelnen Proben unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten und IL-1 β	63
Abbildung 22 : Gesamtkollagengehalt der einzelnen Proben unter dem Einfluss von fünf verschiedenen Pflanzenextrakten und IL-1 β	64

9 Abkürzungsverzeichnis

ABI	Applied Biosystems
ACAN	Aggrecan
ACT	autologe Knorpelzelltransplantation
BAC	β-Aktin
Ct-Werte	Threshold - Cycle
COL2A1	Kollagen Typ II
COX-2	Cyclooxygenase-2
DGOOC	Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie
DMMB	Dimethylmethylenblau
DMSO	Dimethylsulfoxid
E	Effizienz
EB	Ethidiumbromid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EZM	Extrazellulärmatrix
FDA	Fluoreszeindiazetat
FCS	fetal calf serum
GAG	Glykosaminoglykane
hGC	Humane Gelenkchondrozyten
ICRS	International Cartilage Repair Society
IL-1β	Interleukin-1 (β)
IL-6	Interleukin-6
iNOS	NO-Synthetase
LPS	Lipopolysachcharid
MACT	Matrix gestützte autologe Chondrozyten Transplantation
MCP-1	monocyt chemoattractant protein-1
MMPs	Matrixmetalloproteinasen
MMP 1	Kollagenase-1
MMP 3	Stromelysin-1
MMP 13	Kollagenase-3
MSCs	mesenchymale Stammzellen
NF-κB	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)

NK-Zellen	Natürliche Killer Zellen
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	non steroidal antiinflammatory drugs
OA	Osteoarthrose
PBE	Polybuffer exchanger
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PGs	Proteoglykane
PGE₂	Prostaglandin E ₂
Phy 1-5	Pflanzenextrakt 1-5
PTGS2	Prostaglandin-endoperoxide synthase 2
qRT-PCR	Quantitative Real Time Polymerasekettenreaktion
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
s-GAG	Sulfatierte Glykosaminoglykane
SOX 9	SRY (sex determining region Y) box 9
TCM	traditionellen chinesischen Medizin
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
WST-1 Assay	water soluble tetrazolium-1 Assay

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Nora Willwoll, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **Einfluss verschiedener Pflanzenextrakte auf die Vitalität und das Expressionsprofil humaner Chondrozyten vor dem Hintergrund einer Arthrotherapie** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Danksagung

Hiermit möchte ich mich herzlichst bei Frau Prof. Dr. Schulze-Tanzil für die Ermöglichung dieser Dissertation und ihre hervorragende Betreuung bedanken. Durch ihre ständige Präsenz und Erreichbarkeit sowie durch viel Geduld, konstruktive Kritik und hilfreiche Korrekturen war es mir möglich diese Arbeit zu realisieren.

Weiterhin gilt mein Dank der Firma PhytoLab GmbH & Co. KG, die dieses Projekt, unter anderem durch die Bereitstellung der verwendeten Pflanzenextrakte, ermöglicht haben.

Ein ganz besonderer Dank geht ebenfalls an Herrn Benjamin Kohl für die tägliche Hilfe bei jeglichen Fragen und Problemen im Laboralltag. Für jedes Problem wurde durch viel Optimismus und Einsatzbereitschaft eine Lösung gefunden. Vielen Dank für die unermüdliche Hilfsbereitschaft und Anleitung.

Außerdem möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Bioreconstruction für ihre herzliche Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe bedanken. Ich wurde stets als Teil des Teams behandelt und konnte mich mit jeglichen Fragen an alle Mitarbeiter wenden.

Es war mir eine große Freude meine Dissertation in dieser Arbeitsgruppe abschließen zu können.