

Aus der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik

Klinik für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie

An der Universität Tübingen

**Einfluss des Connective Tissue Growth Factor (CCN2)
auf das posttraumatische Überleben humaner
Chondrozyten im Kompressionstrauma-Modell**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Holweg, Maximilian

2023

Dekan: Professor Dr. B. Pichler
1. Berichterstatter: Professor Dr. B. Rolauffs
2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

Tag der Disputation: 21.03.2023

**Für meine gesamte Familie, die alle zusammen die wichtigste Säule in
meinem Leben darstellen.**

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	XVII
1. Einleitung	1
1.1. Makroskopischer Aufbau des Kniegelenks	1
1.2. Mikroskopischer Aufbau des Kniegelenkknorpels	1
1.3. Arthrose	7
1.4. Kompressionstrauma.....	12
1.5. Fibroblast Growth Factor 2	14
1.6. CCN2.....	16
1.7. Zelltod in Chondrozyten.....	18
1.8. Ziele der Arbeit	20
2. Material und Methoden.....	22
2.1. Materialliste	22
2.1.1. Verwendete Verbrauchsmaterialien.....	22
2.1.2. Verwendete Reagenzien und Chemikalien.....	27
2.1.3. Verwendete Geräte	31
2.1.4. Verwendete Software	32
2.2. Sterile Herstellung von 300µm Knorpel-Discs aus Resektaten humaner Femurkondylen bei Knie-Totalendoprothesen zur Gewinnung von 300µm Knorpel-Discs in frühem Osteoarthritis-Stadium	34
2.2.1. Sterile Herstellung des Dulbecco's modified Eagle Mediums	34
2.2.2. Sterile Herstellung von 300 µm Knorpel-Discs aus den Resektaten der Femurkondylen bei Implantation von Knie-Endoprothesen	34

2.3. Farbstoffe und Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung von Chondrozyten	43
2.3.1. Calcein-Färbung zur Darstellung vitaler Zellen.....	43
2.3.2. Live-Dead-Färbung zur Darstellung vitaler und toter Zellen	45
2.3.3. Charakterisierung der superficial chondrocyte spatial organization von Chondrozyten in 300 µm Knorpel-Discs durch Calcein-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der verschiedenen Osteoarthritisstadien.....	46
2.3.4. Fluoreszenzmikroskopie und Aufnahme von Mosaikaufnahmen zur Darstellung der jeweiligen Färbung	46
2.4. Herstellung verschiedener Zellkulturen zur Inkubation von 300 µm Knorpel-Discs und anderer steriler Lösungen.....	48
2.4.1. Sterile Herstellung des Chondrozyten-Mediums zur Inkubation der 300 µm Knorpel-Discs	48
2.4.2. Sterile Herstellung einer Zellkultur zur Inkubation der 300µm Knorpel-Discs in Chondrozyten-Medium.....	49
2.4.3. Herstellung einer sterilen 0,1% Bovine Serum Albumin-Lösung	50
2.4.4. Umgang mit CCN2	50
2.4.5. Sterile Herstellung einer Zellkultur zur Inkubation der 300µm Knorpel-Discs in Chondrozyten-Medium mit Zugabe von CCN2	51
2.5. Ausübung des Injury-Kompressionsmodells auf 300 µm Knorpel-Discs mit Ausübung eines biomechanischen Traumas auf den Knorpel im frühen Osteoarthritis-Stadium zur Simulation der Progression der primären Osteoarthritis	52
2.5.1. Auswahl der 300 µm Knorpel-Discs für die Injury- beziehungsweise Kontrollgruppe	52
2.5.2. Injury-Kompressionsmodell	52

2.5.3. Auswertung der Zellzahl der Live-Dead-Färbung in den Mosaikaufnahmen mit Fiji is just ImageJ	59
2.6. 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung des Verlusts an Glykosaminoglykanen von 300 µm Knorpel-Discs in das Kulturmedium	60
2.6.1. Herstellung der 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Färbelösung	60
2.6.2. Herstellung des Chondroitinsulfat-Standards	62
2.6.3. Herstellung der Proteinase-K-Lösung mit einer Konzentration von 5000 µg/ml.....	63
2.6.4. Isolation der Glykosaminoglykane aus dem Inkubationsmedium durch Schockfrieren und Lyophilisieren	64
2.6.5. Verdau der Discs in der Proteinase-K-Lösung mit einer Konzentration von 5000 µg/ml.....	64
2.6.6. Durchführung des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay	65
2.6.7. Statistische Auswertung der Live-Dead-Assays sowie der 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays.....	67
3. Ergebnisse	68
3.1. Generation optimierter Kniegelenkpräparate zur Analyse des pharmakologischen Arthrosehemmstoffs CCN2.....	68
3.1.1. Übersicht über das Patientenkollektiv zur Generierung von 300 µm Knorpel-Discs	68
3.2. Verbesserung des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays zum Nachweis von Glykosaminoglykanen in Knorpel-Discs	70
3.2.1. Ermittlung des optimalen Bereichs der Standardkurve für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der	

Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays	70
3.2.2. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen der verdauten 300 µm Knorpel-Discs durch unterschiedliche Anzahl an 300 µm Knorpel-Discs für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays	74
3.2.3. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen der verdauten 300 µm Knorpel-Discs durch Verdünnungsreihen für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays	75
3.2.4. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen der verdauten 300 µm Knorpel-Discs durch Verdünnung der Verdauungslösung für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays	76
3.2.5. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen des Kulturmediums durch unterschiedliche Anzahl an 300 µm Knorpel-Discs für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays	77
3.2.6. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen des Kulturmediums durch unterschiedliche Verdünnungsreihen für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays	78
3.2.7. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen des Kulturmediums durch unterschiedliche Volumina bei der Rekonstitution für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen	

Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays.....	79
3.2.8. Ermittlung der geeigneten Temperatur für den Verdau von Knorpel-Discs für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay	80
3.2.9. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Proteinase-K für den Verdau von Knorpel-Discs für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay.....	81
3.2.10. Ermittlung der geeigneten Schüttelzahl in rpm für den Verdau von Knorpel-Discs für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay	82
3.3. Ermittlung des optimalen Injury-Kompressionsmodells zur Simulation eines Knorpeltraumas.....	83
3.3.1. Nachweis der benötigten Dicken der Knorpel-Discs für das Injury-Kompressionsmodell durch Ausübung des Kompressionstraumas auf 300 µm Knorpel-Discs und 600 µm Knorpel-Discs und anschließender Live-Dead-Färbung mit Fluoreszenzmikroskopie	83
3.3.2. Ermittlung der benötigten Kompressionsstärke in % der Ausgangshöhe der Knorpel-Discs durch Ausübung des Kompressionstraumas auf 300 µm Knorpel-Discs und anschließender Live-Dead-Färbung mit Fluoreszenzmikroskopie	83
3.4. Nachweis des Einflusses des Kompressionstraumas auf den Anteil toter Zellen und die Glykosaminoglykanmatrix von Chondrozyten in Knorpel-Discs mit Hilfe von Zelltod-Assays und 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay in Abhängigkeit von An- und Abwesenheit von CCN2.....	110
3.4.1. Ermittlung der optimalen Konzentration von CCN2 durch Kompressionstrauma und Inkubation in der Zellkultur mittels Live-Dead-Assay sowie 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay	110

3.4.2. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 bei einem Tag Inkubationszeit mit Hilfe des Live-Dead-Assays	123
3.4.3. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 bei drei Tagen Inkubationszeit mit Hilfe des Live-Dead-Assays	140
3.4.4. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 bei vier Tagen Inkubationszeit mit Hilfe des Live-Dead-Assays	155
3.4.5. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 nach einem Tag Inkubationszeit mit Hilfe des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays	172
3.4.6. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 nach drei Tagen Inkubationszeit mit Hilfe des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays	176
3.4.7. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 nach vier Tagen Inkubationszeit mit Hilfe des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays	180
4. Diskussion	184
5. Zusammenfassung	195
6. Literaturverzeichnis	197
7. Erklärung zum Eigenanteil	209
Danksagung	210

Abkürzungsverzeichnis

% : Prozent

°C : Grad Celsius

µl : Mikroliter (10⁻⁶ Liter)

µm : Mikrometer (10⁻⁶ Meter)

ADAMTS : A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs

ADP : Adenosindiphosphat

BC : Big Cluster

BSA : Bovine Serum Albumin

CCN : Cysteine-rich 61, Connective tissue growth factor, Nephroblastoma-overexpressed

CCN2 : CCN family member 2, Connective tissue growth factor

cm² : Quadratcentimeter

COL10A1 : collagen type X a 1 chain

COL2A1 : collagen type II α 1 chain

CT : C-terminal

D : Diffuse

DAMPs : Damage-associated molecular patterns

DMB Cl : 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)

DMEM : Dulbecco's modified Eagle Medium

DMMB : 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)

DNA : Desoxyribonukleinsäure

DNase : Desoxyribonuklease

DS : Double Strings

DW : Deionisiertes Wasser, : Deionisiertes Wasser: Wasser ohne Ionen,
bei uns: Doppelt destilliertes, autoklaviertes Wasser

ECM : Extrazellulärmatrix

ELF-3 : E74-like factor 3

ERK : Extracellular signal-regulated kinase

FCS : Fetal calv serum beziehungsweise Fötales bovines Serum

FGF : Fibroblast Growth Factor

FGF-2 : Fibroblast Growth Factor 2

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptors

FN : Fibronektin

g : Gramm

GAG : Glykosaminoglykane

IGFBP : Insulin-like growth factor-binding protein

IL-1 : Interleukine-1

IL-17 : Interleukine-17

IL-1 β : Interleukine-1 β

IL-6 : Interleukine-6

JNK : C-Jun N-terminal kinase

kDa : Kilodalton

KG : Kontrollgruppe

M : Molarität in Molar beziehungsweise mol/l

MAP : Mitogen-Activated Protein

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase), : MAP-Kinasen

mg : Milligramm (10^{-3} Gramm)

mg/ml : Milligramm pro Milliliter

ml	: Milliliter (10^{-3} Liter)
mm	: Millimeter
mM	: Millimolar, 10^{-3} Molar beziehungsweise 10^{-3} mol/l
MMP-1	: Matrix Metalloproteinase 1
MMP-13	: Matrix Metalloproteinase 13
MMP-3	: Matrix Metalloproteinase 3
MMP-9	: Matrix Metalloproteinase 9
MMPs	: Matrix Metalloproteinasen
mRNA	: messenger Ribonukleinsäure
N	: Normalität beziehungsweise Äquivalenzkonzentration unter Berücksichtigung der Äquivalenzzahl
NaCl	: Natriumchlorid
NaN ₃	: Natriumazid-Lösung
NFκB	: Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
ng	: Nanogramm (10^{-9} Gramm)
nm	: Nanometer
OA	: Osteoarthritis
OD	: Optische Dichte beziehungsweise Extinktion
PBS	: Phosphate-buffered Saline
PCM	: Perizelluläre Matrix
PG	: Proteoglykane
PI3K	: Phosphoinositide 3-kinases
PKCδ	: Protein kinase C delta type
PTOA	: posttraumatischen Osteoarthritis
RAS	: rat sarcoma viral onkogene homolog

RNA : Ribonukleinsäure
rpm : Revolutions per minute: Umdrehungen pro Minute
RUNX2 : runt related transcription factor 2
S : Strings
SC : Small Cluster
SCSO : Superficial chondrocyte spatial organization
SZ : Superficial Zone
TGF- β : Transforming growth factor beta
TGF- β 1 : Transforming growth factor beta 1
TIMP : Tissue Inhibitor of Metalloproteinases
TNF- α : Tumornekrosefaktor- α
TSG-6 : TNF-stimulated gene 6 protein
TSP : Thrombospondin
VG : Versuchsgruppe
VWC : von Willebrand factor type C repeat
 μ g/ml : Mikrogramm pro Milliliter

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1:** Mikroskopischer Aufbau des humanen hyalinen Gelenkknorpels wie in 1.2 beschrieben. Schnittführung senkrecht von der Oberfläche bis zum subchondralen Knochen. (1): Superfizialschicht/Tangentialzone. (2): Übergangszone. (3): Radiärzone. (4): Tidemark. (5): Kalzifizierte Zone. (6): Subchondraler Knochen. (7): Chondrozyten. (8): Perizelluläre Matrix. (9): Territoriale Matrix. (10): Kollagenfasern mit charakteristischem Faserverlauf. Bild entnommen aus [14]. Beschriftung mittels [7, 14]..... 4
- Abbildung 2:** Aufsicht auf die Oberfläche von humanem Gelenkknorpel der Femurkondylen. Die Chondrozyten der SZ weisen eine spezifische horizontale räumliche Anordnung auf. Bei OA und deren Progression kommt es zu Veränderungen dieser Anordnung. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und Anfärbung der Zellkerne mit Propitium Iodid sind hier Femurkondylen mit makroskopisch intakten (Collins Grad 0 – 1), leicht geschädigtem (Collins Grad 2) sowie milde OA (Collins Grad 3) dargestellt. Bild publiziert in [97]..... 10
- Abbildung 3:** Darstellung der räumlichen Organisationsstruktur humaner Chondrozyten in der SZ von Femurkondylen. Man sieht die Entwicklung vom unreifen zum reifen Knorpel mit der Entwicklung der räumlichen Organisationsstruktur und die Entstehung von OA sowie deren Progression mit der Zerstörung der räumlichen Anordnung der Chondrozyten. Bild entnommen aus [17]. 11
- Abbildung 4:** Beispielhafte Darstellung der Herstellung von 300 µm Knorpel-Discs. Zu sehen sind zwei Knochen-Knorpel-Resektate aus dem Kniegelenk eines Patienten mit dem pinkfarbenen Knorpel auf dem gelblichen Knochen. 1: Makroskopisch glatter, guter Gelenkknorpel, 2: Makroskopisch schlechter Gelenkknorpel mit Osteoarthritis, 3: Komplett abgetragener Gelenkknorpel als Endstadium der Osteoarthritis mit Riefenbildung. Abbildung aus eigener Aufnahme..... 41
- Abbildung 5:** Beispielhafte Darstellung einer Knorpel-Stanze bei der Identifikation der ehemaligen Gelenk- und Schneidefläche. Die Stanze hat

einen Durchmesser von 4mm und eine Fläche von 1 cm². Abbildung aus eigener Aufnahme..... 43

Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung einer Fluoreszenzmikroskopie einer Knorpel-Disc mittels Live-Dead-Färbung. Die lebenden Zellen werden grün, die toten Zellen rot gefärbt dargestellt. Die Disc hat eine Stärke von 300 µm, einen Durchmesser von 4 mm und eine Fläche von 1 cm². Abbildung aus eigener Aufnahme..... 48

Abbildung 7: Workflow des Injury-Kompressionsmodells. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Eigene Abbildung. 53

Abbildung 8: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Eigene Abbildung..... 54

Abbildung 9: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit einer Inkubationszeit von 72 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden

die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden die Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Eigene Abbildung..... 55

Abbildung 10: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit einer Inkubationszeit von 96 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 96 Stunden Inkubationszeit wurden die Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Eigene Abbildung..... 56

Abbildung 11: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay durchgeführt. Eigene Abbildung. 57

Abbildung 12: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay mit einer Inkubationszeit von 72 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay durchgeführt. Eigene Abbildung. 58

Abbildung 13: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay mit einer Inkubationszeit von 96 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 96 Stunden Inkubationszeit wurden das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay durchgeführt. Eigene Abbildung. 59

Abbildung 14: Beispielhafte Darstellung einer Referenzstandardkurve aus dem Chondroitinsulfat-Standard, erstellt am 13.09.2016. In x-Richtung ist die Menge an GAG in µg aufgetragen, in y-Richtung die OD. 66

Abbildung 15: Darstellung der Verteilung des Patientenkollektivs nach Seite der Probenentnahme und Geschlecht. 69

Abbildung 16: Darstellung einer Referenzstandardkurve aus dem Chondroitinsulfat-Standard, hergestellt am 28.04.2016, Messung am

03.05.2016. In x-Richtung ist die Menge an GAG in μg aufgetragen, in y-Richtung die OD. Man erkennt die anfangs annähernd linear verlaufende Kurve, die ab einer OD von mehr als 0,58 immer stärkere abflacht und so bei hohen OD-Werten zu einer Überschätzung der enthaltenen Menge an GAG führen würde. 71

Abbildung 17: Darstellung einer Referenzstandardkurve aus dem Chondroitinsulfat-Standard, hergestellt am 31.05.2016, Messung am 31.05.2016. In x-Richtung ist die Menge an GAG in μg aufgetragen, in y-Richtung die OD. Man erkennt die anfangs annähernd linear verlaufende Kurve, die ab einer OD von mehr als 0,58 immer stärkere abflacht und so bei hohen OD-Werten zu einer Überschätzung der enthaltenen Menge an GAG führen würde. 72

Abbildung 18: Darstellung einer Referenzstandardkurve aus dem Chondroitinsulfat-Standard, hergestellt am 02.06.2016, Messung am 03.06.2016. In x-Richtung ist die Menge an GAG in μg aufgetragen, in y-Richtung die OD. Man erkennt die anfangs annähernd linear verlaufende Kurve, die ab einer OD von mehr als 0,58 immer stärkere abflacht und so bei hohen OD-Werten zu einer Überschätzung der enthaltenen Menge an GAG führen würde. 73

Abbildung 19: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelstadien bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen. 94

Abbildung 20: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der ehemaligen Gelenkfläche bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen. 96

Abbildung 21: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der mittleren Fläche des Knorpels bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen. 97

Abbildung 22: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der Schneidefläche des Knorpels bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.	99
Abbildung 23: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelenebenen bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.	101
Abbildung 24: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der ehemaligen Gelenkfläche bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.	102
Abbildung 25: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der mittleren Fläche des Knorpels bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.	104
Abbildung 26: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der Schneidefläche des Knorpels bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.	105
Abbildung 27: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelenebenen bei den Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 beziehungsweise 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.	106
Abbildung 28: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 beziehungsweise 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.	107
Abbildung 29: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50	

beziehungsweise 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.	108
Abbildung 30: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 beziehungsweise 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.	109
Abbildung 31: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelbenen bei den Versuchsgruppen 1 bis 5 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2, 50 ng/ml CCN2, 100 ng/ml CCN2, 150 ng/ml CCN2 und 200 ng/ml CCN2.	114
Abbildung 32: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelbenen bei den Versuchsgruppen 1 und 4 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 4).	115
Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 bis 5 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2, 50 ng/ml CCN2, 100 ng/ml CCN2, 150 ng/ml CCN2 und 200 ng/ml CCN2.	116
Abbildung 34: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 4 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 4).	117
Abbildung 35: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 bis 5 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2, 50 ng/ml CCN2, 100 ng/ml CCN2, 150 ng/ml CCN2 und 200 ng/ml CCN2.	118
Abbildung 36: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 4 nach Kompressionstrauma	

und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 4).	119
Abbildung 37: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 bis 5 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2, 50 ng/ml CCN2, 100 ng/ml CCN2, 150 ng/ml CCN2 und 200 ng/ml CCN2.	120
Abbildung 38: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 4 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 4).	121
Abbildung 39: Darstellung der Ergebnisse des DMMB-Assays bei den Versuchsgruppen 1 bis 5 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2, 50 ng/ml CCN2, 100 ng/ml CCN2, 150 ng/ml CCN2 und 200 ng/ml CCN2.....	122
Abbildung 40: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpeleneben bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	127
Abbildung 41: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	129
Abbildung 42: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	131
Abbildung 43: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	133

Abbildung 44: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpeleneben bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	135
Abbildung 45: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	136
Abbildung 46: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	138
Abbildung 47: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	139
Abbildung 48: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpeleneben bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	143
Abbildung 49: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	145
Abbildung 50: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	147
Abbildung 51: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und	

2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	149
Abbildung 52: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpeleneben bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	151
Abbildung 53: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	152
Abbildung 54: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	153
Abbildung 55: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	154
Abbildung 56: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpeleneben bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	159
Abbildung 57: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	161
Abbildung 58: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	163

Abbildung 59: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	165
Abbildung 60: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelbenen bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	167
Abbildung 61: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	169
Abbildung 62: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	170
Abbildung 63: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	171
Abbildung 64: Darstellung der Ergebnisse des DMMB-Assays bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	174
Abbildung 65: Darstellung des Verlustes an sulfatierten GAG bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	175
Abbildung 66: Darstellung der Ergebnisse des DMMB-Assays bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.....	178

Abbildung 67: Darstellung des Verlustes an sulfatierten GAG bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	179
Abbildung 68: Darstellung der Ergebnisse des DMMB-Assays bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	182
Abbildung 69: Darstellung des Verlustes an sulfatierten GAG bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.	183

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien. Die Tabelle enthält jeweils Produktbezeichnungen und Hersteller.	22
Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Chemikalien. Die Tabelle enthält jeweils Produktbezeichnungen, Inhaltsstoffe und Verwendungszweck und Referenz- beziehungsweise CAS-Nummer.....	27
Tabelle 3: Verwendete Geräte. Die Tabelle enthält jeweils Gerätebezeichnung und Hersteller.	31
Tabelle 4: Verwendete Software. Die Tabelle enthält jeweils Produktbezeichnungen und Hersteller.	32
Tabelle 5: Patientenübersicht. Die Tabelle enthält eine für die vorliegende Arbeit eingeführte fortlaufende Patientenummer zur Anonymisierung, das Geschlecht (weiblich: W, männlich: M), das Alter zum Operationszeitpunkt in Jahren, die Seite der Probenentnahme und immunologische oder neoplastische Vorerkrankungen und Rheuma beziehungsweise Trauma in der Anamnese...	35
Tabelle 6: Berechnung für die Calcein-Arbeitslösung (1 : 1000 Verdünnung) für n Knorpeldiscs.....	44
Tabelle 7: Berechnung für die Live-Dead-Arbeitslösung (1 : 1000 Verdünnung) für n Knorpeldiscs.....	45
Tabelle 8: Formel für die Berechnung der Menge an Albumin Faktor V und PBS-Lösung.	50
Tabelle 9: Mengenkalkulation für 500 ml DMMB-Färbelösung	61
Tabelle 10: Übersicht über die verschiedenen Konzentrationen des Chondroitinsulfat-Standards. Angegeben ist die Menge des Grundstandards in ml (Konzentration 125 µg/ml), die Menge an destilliertem Wasser in ml und die Konzentration an GAG der jeweiligen Verdünnung.	63
Tabelle 11: Mengenkalkulation der Proteinase-K-Lösung für n Knorpel-Discs.	64
Tabelle 12: Pipettierschema des Chondroitinsulfat-Standards auf der 96er Well-Platte. Angegeben sind die Position in x-Richtung (Zahl 1 bis 12) und in y-	

Richtung (Buchstabe A bis B) und die Konzentration des Chondroitinsulfat-Standards in der Einheit µg/ml.	65
Tabelle 13: Übersicht aller für das Experiment vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.....	85
Tabelle 14: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen aller genutzten Discs inklusive Standardfehler des Mittelwerts und Standardabweichung für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.	86
Tabelle 15: Übersicht der für das Experiment mit 50 % Kompressionshöhe vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.	88
Tabelle 16: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen der für das Experiment mit 50 % Kompressionshöhe genutzten Discs inklusive Standardfehler des Mittelwerts und Standardabweichung für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.	89
Tabelle 17: Übersicht der für das Experiment mit 65 % Kompressionshöhe vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.	91
Tabelle 18: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen der für das Experiment mit 65 % Kompressionshöhe genutzten Discs inklusive Standardfehler und Standardabweichung für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.....	92
Tabelle 19: Übersicht aller für die Live-Dead-Färbung vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG.	111

Tabelle 20: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen aller genutzten Discs für die Live-Dead-Färbung inklusive Standardfehler und Standardabweichung mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG.....	112
Tabelle 21: Übersicht aller für das DMMB-Assay vorgesehenen und genutzten Discs mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG.....	113
Tabelle 22: Übersicht aller für das Experiment vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien mit einer Inkubationszeit von einem Tag. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.....	124
Tabelle 23: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen aller genutzten Discs inklusive Standardfehler und Standardabweichung mit einer Inkubationszeit von einem Tag. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.....	125
Tabelle 24: Übersicht aller für das Experiment vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.....	141
Tabelle 25: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen aller genutzten Discs inklusive Standardfehler und Standardabweichung mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.....	141
Tabelle 26: Übersicht aller für das Experiment vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien mit einer Inkubationszeit von vier Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.....	156
Tabelle 27: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen aller genutzten Discs inklusive Standardfehler und Standardabweichung mit einer Inkubationszeit von vier Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.....	157
Tabelle 28: Übersicht aller für das DMMB-Assay vorgesehenen und genutzten Discs mit einer Inkubationszeit von einem Tag. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.....	173
Tabelle 29: Übersicht aller für das DMMB-Assay vorgesehenen und genutzten Discs mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.....	177

Tabelle 30: Übersicht aller für das DMMB-Assay vorgesehenen und genutzten Discs mit einer Inkubationszeit von vier Tagen. Versuchsgruppe: VG.
Kontrollgruppe: KG..... 181

1. Einleitung

1.1. Makroskopischer Aufbau des Kniegelenks

Das Kniegelenk ist eine Diarthrose [1] und besteht aus mehreren Anteilen, die durch das distale Femur, die proximale Fibula und Patella gebildet werden. Die Teilgelenke sind das Femoropatellargelenk zwischen Patella und Facies patellaris des Femurs und das Femorotibialgelenk zwischen Condylus medialis und lateralis femoris und Condylus medialis und lateralis tibiae. Das Femorotibialgelenk ist ein funktionelles Drehscharniergelenk, die Patella dient als Sesambein für den Musculus quadriceps femoris. Mehrere Schleimbeutel unterstützen die Gleitbewegung der Weichteile gegenüber den knöchernen Strukturen. Die Synovialflüssigkeit, die sich innerhalb der Gelenkkapsel befindet, wird durch die Zellen der Synovia sezerniert. Sie dient der Ernährung des Knorpels und anderer Strukturen innerhalb des Gelenks, vermindert die Reibung zwischen den artikulierenden Gelenkflächen und fungiert als Stoßdämpfer [1]. Der Gelenkknorpel des Femorotibialgelenks ist mit durchschnittlich 2 – 3 Millimeter (mm) und maximal bis 7 mm auf den Femur- und Tibiakondylen sehr dick und hat drei Hauptfunktionen. Er dient, neben den Menisci als Faserknorpel, auch dem Inkongruenzausgleich der Gelenkflächen [2]. Durch seine biomechanischen Eigenschaften und der reversiblen Verformbarkeit ist der Knorpel in der Lage, den Druck möglichst gleichmäßig auf das subchondrale Gewebe zu verteilen [1]. Zusätzlich schafft der Gelenkknorpel durch seine glatte Oberfläche und den sehr niedrigen Reibungskoeffizienten ein gutes Gleitlager für die Gelenkbewegung. Dieser Effekt wird durch ein Schmiermittel an der Grenzschicht der Gelenkoberfläche aus Hyaluronsäure und Lubricin verstärkt, die durch Chondrozyten und Synovialzellen gebildet werden [3, 4].

1.2. Mikroskopischer Aufbau des Kniegelenkknorpels

Knorpel ist ein avaskuläres, nicht innerviertes Bindegewebe ohne Lymphbahnen. Mit seinen viskoelastischen Eigenschaften durch hydrodynamische Effekte trägt und verteilt der Gelenkknorpel die Last und

ermöglicht eine nahezu reibungsfreie Bewegung [5, 6]. Man unterscheidet drei große Typen humanen Knorpels: Hyaliner, elastischer und Faserknorpel. Das Knorpelgewebe besteht aus zwei Hauptbestandteilen: Einzelne oder gruppierte Chondrozyten, die in einer Extrazellulärmatrix (ECM) eingebettet sind. Die ECM besteht aus Proteoglykanen (PG) und Kollagenfibrillen.

Der Gelenkknorpel gehört zur Untergruppe des hyalinen Knorpels, der sich durch einen großen Anteil von Kollagen II auszeichnet und kein Perichondrium aufweist. Aufgrund der Avaskularität und des fehlenden Perichondriums erfolgt die Versorgung des Gelenkknorpels mit Nährstoffen durch die Synovialflüssigkeit. Bei anderen Knorpeltypen bildet das Perichondrium zwei Schichten, eine äußere Schicht, die aus straffem Bindegewebe besteht und Zugkräfte auf den Knorpel abfängt und einer inneren Schicht mit undifferenzierten mesenchymalen Zellen. Diese Zellen können zu Chondroblasten proliferieren und dienen der Regenerationsfähigkeit. Zusätzlich enthält das Perichondrium Blutgefäße. Folglich ist die Regenerationsfähigkeit beim Gelenkknorpel mit fehlendem Perichondrium stark limitiert.

Der gesunde, reife Chondrozyt hat seine Teilungsfähigkeit verloren – seine Aufgabe liegt im langsamen Umsatz der ECM [7]. Zu beachten ist, dass der Chondrozyt im Rahmen von Pathologien wie der Arthrose seine Teilungsfähigkeit wiedererlangen und es erneut zur Proliferation kommen kann [8]. Der Aufbau und das spezielle Gerüst der ECM ist für die biomechanischen Eigenschaften, insbesondere die Druckelastizität, entscheidend. Die Kollagenfibrillen des Gelenkknorpels bestehen hauptsächlich aus Kollagen Typ II, aber auch Typ IX und Typ XI, mit einer Dicke von 50 bis 100 Nanometer (nm). Die Fibrillen sind arkadenartig angeordnet. In der Folge entsteht eine zonale Gliederung von oben nach unten. Ganz oben befindet sich die Tangentialzone, in der die Fibrillen in Richtung der stärksten Zugspannung tangential angeordnet sind. Es folgen nach unten die Übergangszone mit bogenförmigem Verlauf und Radiärzone mit senkrechtem Verlauf der Kollagenfibrillen zur Knorpeloberfläche. Die Fibrillen sind in der Zone des mineralisierten Knorpels verankert. In dieser Zone befinden sich in der ECM Hydroxyapatit-Kristalle. Darunter liegt der subchondrale Knochen. Zwischen der

Radiärzone und Zone des mineralisierten Knorpels befindet sich eine Grenzlinie [7]. Während der unreife Knorpel einen hohen Umsatz an Kollagen II zeigt, sinkt nach Ausreifung im Erwachsenenalter der Umsatz von Kollagen II relativ zum unreifen Knorpel stark ab [9-13].

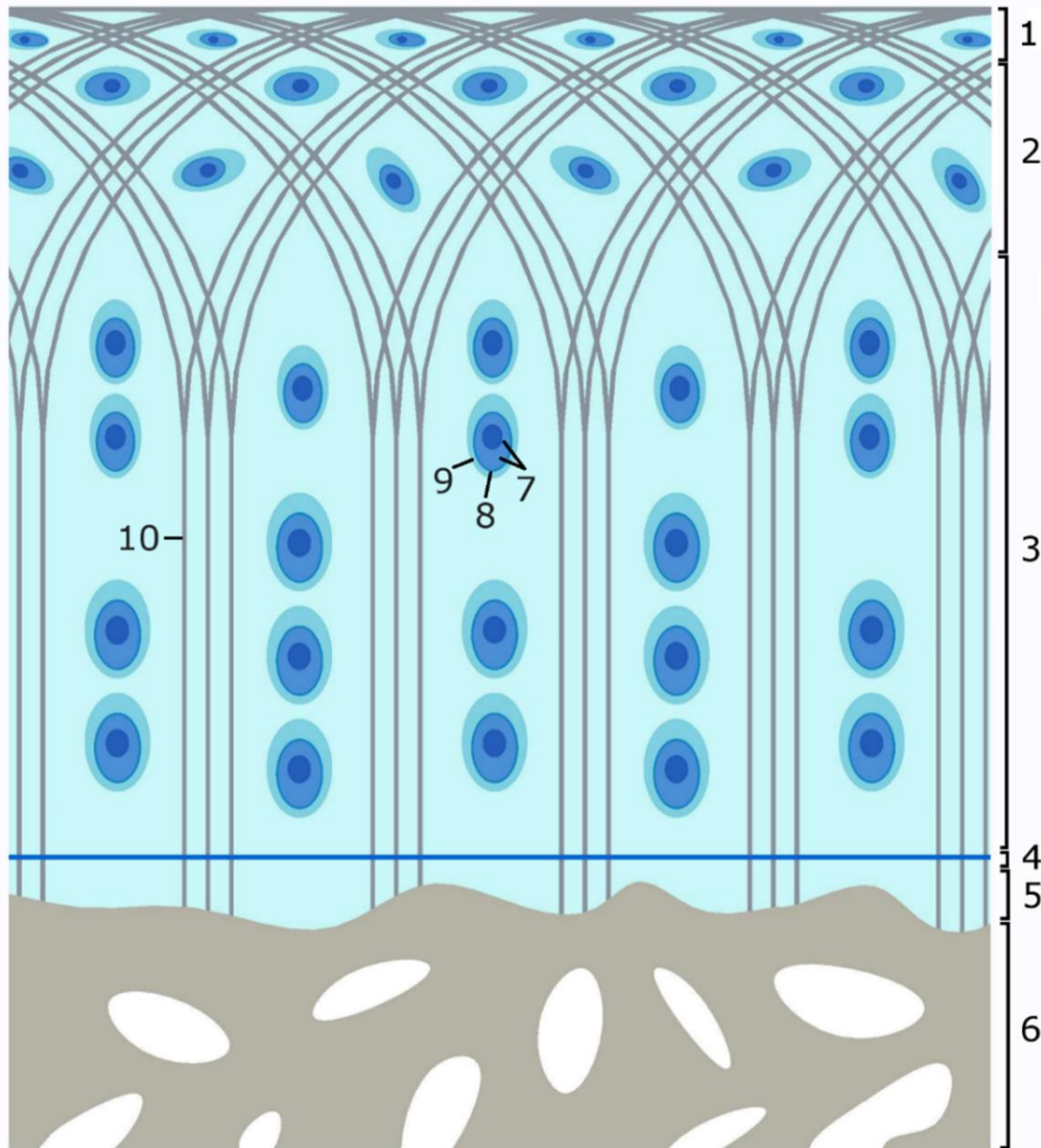


Abbildung 1: Mikroskopischer Aufbau des humanen hyalinen Gelenknorpels wie in 1.2 beschrieben. Schnitfführung senkrecht von der Oberfläche bis zum subchondralen Knochen. (1): Superfizialschicht/Tangentialzone. (2): Übergangszone. (3): Radiärzone. (4): Tidemark. (5): Kalzifizierte Zone. (6): Subchondraler Knochen. (7): Chondrozyten. (8): Perizelluläre Matrix. (9): Territoriale Matrix. (10): Kollagenfasern mit charakteristischem Faserverlauf. Bild entnommen aus [14]. Beschriftung mittels [7, 14].

Auch die ECM aus PG und Kollagenfibrillen lässt sich in verschiedene Zonen einteilen. Direkt um die Chondrozyten befindet sich die schmale perizelluläre Matrix (PCM), die im Unterschied zur übrigen ECM hauptsächlich aus Kollagen

VI besteht. An die PCM schließt sich um jeden Chondrozyt beziehungsweise jede Chondrozytengruppe die territoriale Matrix mit einem hohen Anteil an Kollagen II an, die sich aufgrund ihres hohen polyanionischen Proteoglykangehaltes in der Hämatoxylin-Eosin-Färbung stärker basophil gegenüber der interterritorialen Matrix abgrenzt. Chondrozyt plus territoriale Matrix werden als Territorium bezeichnet, Chondrozyt plus PCM als Chondron. Die Chondrozyten sind über Rezeptoren, wie Integrine, in der PCM verankert. Die PCM wiederum ist mit der territorialen Matrix verbunden [7, 15, 16].

Die Chondrozyten und damit auch Chondrone sind in charakteristischen Mustern, mit einer spezifischen räumlichen Anordnung, der sogenannten superficial chondrocyte spatial organization (SCSO), in der superfiziellen Zone der ECM angeordnet [6, 17]. Die PCM beeinflusst sowohl die lokale Belastung als auch den Flüssigkeitsstrom der Chondrozyten – sie bildet eine Art Schutzhülle um die Zellen. Sie ist weniger durchlässig für Wasser als die ECM und vermindert den Flüssigkeitsstrom innerhalb des Chondrons, nahe der Chondrozyten, um den Faktor 30. Zusätzlich schützt sie die Chondrozyten vor biomechanischem Stress [18].

Neben den Kollagenfibrillen besteht die ECM auch aus PG. PG sind Proteine, an die ein oder mehrere (sulfatierte) Glykosaminoglykane (GAG) kovalent gebunden sind. Die GAG binden dabei an einen zentralen Proteinfaden, das sogenannte Core-Protein [7, 19, 20]. GAG sind Polysaccharide, die aus sich wiederholenden Disacchariden bestehen. Diese Disaccharide bestehen aus einem Hexosamin, meist D-Glukosamin oder D-Galaktosamin, das über eine glykosidische Bindung an eine Hexuronsäure wie D-Glukuronsäure oder L-Iduronsäure oder an D-Galaktose gebunden ist. Es gibt insgesamt vier Klassen von GAG: Chondroitinsulfat mit seiner Modifizierung Dermatansulfat, Hyaluronsäure (Hyaluronan), Keratansulfat und schließlich Heparansulfat sowie Heparin [20]. Im Knorpelgewebe kommt hauptsächlich das PG Aggrecan vor, dessen sulfatierte GAG-Ketten aus Chondroitinsulfat und Keratan-Sulfat bestehen. Viele dieser Aggrecan-Monomere binden an ein Rückgrat aus Hyaluronan [7, 19], das einzige nicht sulfatierte und nicht an Proteine gebundene GAG [20] und bildet so riesige Proteoglykan-Aggregate. Die PG

sind wiederum mit den Kollagenfibrillen vernetzt. Die PG und das Hyaluronan sind durch ihre hydrophilen Eigenschaften für den hohen Wasseranteil (circa 80 Prozent (%)) der ECM verantwortlich. Die Druckelastizität ergibt sich aus der negativen Ladung der PG, die durch die Bindung von Wasser expandieren würden, wenn sie nicht durch die Zugfestigkeit der Kollagenfibrillen an ihrer Expansion gehindert würden. Hierdurch wird Schwelldruck in Elastizität umgewandelt [7, 19, 20]. Dies führt zur Widerstandsfähigkeit, der Widerstandskraft gegen Kompression bei minimaler Verformung sowie der geringen Reibung der Gelenkoberfläche im Knorpel [20]. Wird der Knorpel komprimiert, strömt zunächst das extrazelluläre Wasser aus der Matrix aus und die Matrix wird dichter. Bei steigender Kompression wird die Matrix irgendwann so dicht, dass kein Wasser mehr ausströmen kann – man spricht von der Grenze der Komprimierbarkeit. Lässt der Druck nach, kommt es zu einem erneuten Wassereinstrom und nachfolgend zur Expansion. Durch diesen Wiedereinstrom erfolgt die Ernährung der Chondrozyten [7, 19].

Die Zelldichte der Chondrozyten ist in der Superficial Zone (SZ) am größten und nimmt in die tieferen Schichten immer weiter ab. Die Ausrichtung sowohl der Chondrozyten in ihren Chondronen als auch der Zellverbände innerhalb der verschiedenen Zonen folgt dem Kollagenfaserverlauf. In der SZ sind die Zellen beziehungsweise Zellverbände horizontal ausgerichtet mit einer flachen, diskoiden Gestalt. Hier sind die Zellen von einer feinstrukturierten PCM umgeben. Im weiteren Verlauf sind die Chondrozyten und die Zellverbände zuerst schräg mit runder beziehungsweise ovaler Form und dann vertikal ausgerichtet. Die PCM ist hier von einer perizellulären Kapsel mit Poren umgeben, die die PCM von der territorialen Matrix abgrenzt [15, 21]. Die Größe der Chondrozyten nimmt mit der Tiefe zu [22]. Chondrozyten sind im Knorpelgewebe in einer gelenkspezifischen Anordnung lokalisiert, insbesondere in der SZ. Man unterscheidet: Singles, Pairs, Clusters, Strings. Als Singles definiert man einzelne Chondrozyten ohne direkte Nachbarschaft zu anderen. Pairs sind zwei Zellen, die in der Nähe des jeweils anderen befinden. Cluster bestehen aus drei oder mehr Zellen, die in einer Ellipse oder einem Kreis angeordnet sind. Strings sind drei oder mehr Chondrozyten in einer geraden

Linie. Die SCSO ist horizontal angeordnet und folgt in seiner Ausrichtung der Gelenkoberfläche. In den großen Gelenken herrscht bei gesundem Knorpel pro Gelenk jeweils eine dieser SCSO vor. Da die SCSO auch vom Gelenktyp abhängt, liegt die Vermutung nahe, dass diese SCSO mit einer spezifischen Gelenkfunktion assoziiert sind [6, 23]. Die Schichten im Knorpelgewebe unterscheiden sich neben verschiedenen Zell- und Chondronmorphologien auch in der Funktion der Chondrozyten, der biochemischen Zusammensetzung der ECM und den biomechanischen Eigenschaften [24, 25]. In der gelenkflächennahen SZ ist der Metabolismus der Chondrozyten vergleichsweise niedrig, dafür werden hier sekretorische Moleküle wie PG 4 produziert und sezerniert [24, 26, 27]. Mit zunehmender Tiefe steigt die Syntheserate der Matrixmoleküle wie Kollagen II und Aggrecan an [22, 24, 28]. Der Wassergehalt des Knorpelgewebes ist nahe der Oberfläche am größten und nimmt mit zunehmender Tiefe ab. Umgekehrt verhält es sich bei den GAG und dem Kollagen: Der Gehalt nimmt mit zunehmender Tiefe zu [24, 25]. Auch die biomechanischen Eigenschaften sind tiefenabhängig: Die Druckfestigkeit des Knorpels nimmt von der weichen SZ an der Gelenkfläche in die Tiefe immer weiter zu [24].

1.3. Arthrose

Die Arthrose beziehungsweise Osteoarthritis (OA) ist eine noch nicht vollständig verstandene degenerative Gelenkerkrankung, die das gesamte Gelenk, also den Gelenkknorpel und die umgebenden Strukturen und Gewebe, betrifft. Der Ursprung der OA ist nicht nur, wie initial vermutet, der Gelenkknorpel [4, 8, 29-31], sondern auch der subchondralen Knochen [32-45]. Sie ist weltweit die häufigste Form der Gelenkerkrankungen des erwachsenen Menschen [46-48] sowie eine der Hauptursachen für Schmerzen und Einschränkungen beziehungsweise Behinderung [49]. Im Jahr 2010 lag die Lebenszeitprävalenz in Deutschland bei Frauen etwa bei einem Viertel (2010: 27,1 %) und bei Männern bei etwa einem Sechstel (2010: 17,9 %), mit steigender Prävalenz über die Zeit (2003 bis 2012). 2012 betrug die Lebenszeitprävalenz bei Frauen 27,8% und bei Männern 19,7 %. Neben dem Zeitfaktor steigt zunehmendem

Alter die Lebenszeitprävalenz der OA. In der Altersgruppe ab 65 Jahren ist jede zweite Frau und jeder dritte Mann von dieser Erkrankung betroffen [50, 51]. Mehr als 50% der von OA betroffenen Gelenke entfällt auf das Kniegelenk. Die Erkrankung verursacht hohe direkte und indirekte Kosten [50]. Man unterscheidet die primäre OA von der sekundären, z. B. posttraumatischen Osteoarthritis (PTOA) [52]. Das Kniegelenk ist durch seine Inkongruenz der Gelenkflächen besonders anfällig für die Entstehung einer OA [2]. Die ersten arthrotischen Veränderungen am Gelenkknorpel treten an der Oberfläche im Bereich hoher mechanischer Belastung auf. Hier spielen ganz besonders Scherkräfte eine übergeordnete Rolle [4]. Als Folge kommt es zu einer zunehmenden Schädigung des Gelenkknorpels, die durch die Freisetzung von Makromolekülen aus dem Gewebe und dem nachfolgenden Verlust der Gewebsintegrität und der mechanischen Fähigkeiten gekennzeichnet ist. Die genaue Ätiologie der Erkrankung ist bisher nicht geklärt [53]. Die Biosynthese des Knorpels in vivo korreliert direkt mit der Belastung des Knorpels [53-55]. Als großer Risikofaktor für die Entstehung einer OA gilt zunehmendes Alter [46, 50, 56-60]. Weitere Risikofaktoren sind weibliches Geschlecht [50, 56, 60, 61], genetische Faktoren [57], Überlastung durch Adipositas [53, 56, 62, 63] oder durch berufliche Überbelastung [64-69], Hyperlaxizität der Gelenke durch Bandschäden [70], eine veränderte Gelenkgeometrie [71], operative Eingriffe wie Menishektomie [72], Muskelschwäche des Quadrizeps [73, 74], Fehlhaltungen sowie Fehlstellung (Varus, Valgus) und Fehlbildungen (zum Beispiel Hüftdysplasie) [50]. Auch traumatische Gelenkverletzungen erhöhen das Risiko, an OA zu erkranken [56, 57, 62, 75, 76], der genaue Mechanismus ist aber noch nicht vollständig verstanden [77].

Posttraumatisch kommt es zur vermehrten Freisetzung sogenannter damage-associated molecular patterns (DAMPs), proinflammatorischer Zytokine, Matrix Metalloproteinasen (MMPs) und Chemokine. Beispiele sind Interleukine wie Interleukine-1 (IL-1), Interleukine-1 β (IL-1 β), Interleukine-6 (IL-6) und Interleukine-17 (IL-17), Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und Matrix Metalloproteinase 3 (MMP-3) [77]. Studien zeigen, dass Stunden nach Trauma die Werte von Stromelysin-1, MMP-3, in der Synovialflüssigkeit bis zu

vierzigmal höher sind als der Normalwert und auch bis zu 20 Jahre später noch erhöhte Werte gemessen werden können. Auch die Werte an Tissue Inhibitor of Metalloproteinases (TIMP) und PG sind erhöht [78-81]. Die Aktivität von MMPs und Aggrecanase A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs (ADAMTS) in der Synovialflüssigkeit führt posttraumatisch zur Spaltung von PG und in der Folge zur Zerstörung von Knorpelgewebe [53, 82-84]. Die Hemmung von MMPs nach Trauma führt außerdem zu einer geringeren Freisetzung von GAG aus der Knorpelmatrix [53]. Die Synthese von Kollagen II, die in gesundem, reifem Knorpelgewebe kaum noch stattfindet, wird in arthrotischem Knorpel wieder stark gesteigert [10-13]. Zusätzlich ist auch die Kollagen-III-Produktion gesteigert und die Synthese von Kollagen II und III von der Kollagen-I-Synthese entkoppelt [9]. Zur Kollagen-I-Synthese gibt es widersprüchliche Aussagen in der Literatur [9, 85, 86].

Makroskopisch lassen sich vier Typen (Typ I bis IV) traumatischer Knorpelläsionen unterscheiden, deren jeweilige Form mit den verschiedenen Unfallmechanismen beziehungsweise Krafteinwirkungen zusammenhängt. Zusätzlich gibt es zwei weitere Typen (Typ V, Typ VI), die den degenerativen Erkrankungen zugeordnet werden können. Typ II (stellate fracture) findet sich hauptsächlich an Stellen mit hoher Gewichtsbelastung und sind mit direktem Aufpralltrauma assoziiert [87, 88]. Im Gewebe führt diese Traumaform zur Spaltbildung [89, 90], Zelltod [89, 91] und gestörter Kollagenintegrität [90, 92, 93]. Traumatische Knorpelläsionen beginnen sowohl bei reifem als auch bei unreifem Knorpelgewebe mit Schäden im Bereich der Gelenkoberfläche [87-93]. Das liegt an den tiefenabhängigen strukturellen [88, 90], biochemischen [25, 88, 90] und biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels [88, 90, 94]. Eine weitere makroskopische Einteilung von Gelenkknorpel wurde von Collins durchgeführt und durch Muehleman modifiziert. Sie haben Knorpelläsionen in 5 Grade eingeteilt. Grad 0 entspricht völlig gesundem, intaktem Knorpel. Bei Grad 1 finden sich geringe oberflächliche Aufrauungen. Grad 2 ist definiert durch Fibrillierung und Rissbildung. Grad 3 sowie 4 sind Volldefekte des Knorpels mit weniger beziehungsweise mehr als 30% der Gelenkoberfläche [6, 23, 95]. Wie in 1.2 beschrieben sind Chondrozyten im

Knorpelgewebe in einer gelenkspezifischen Anordnung lokalisiert. In der besonders vulnerablen SZ verändert sich diese SCSO bei OA sowie bei Progression der Erkrankung und es kommt zu einer Reorganisation der Chondrozyten [6, 23, 96, 97]. Allgemein ausgedrückt lagern sich Knorpelzellen an Läsionsstellen wie Fissuren oder tieferen Verletzungen zu großen Aggregaten, sogenannten Clustern, zusammen [23, 98, 99]. In einem frühen Stadium kann man am distalen Femur eine Double String Bildung nachweisen, also zwei String-Formationen dicht nebeneinander. Im Verlauf kommt es zur typischen Clusterbildung und im Endstadium zum völligen Organisationsverlust [6, 17, 23, 96, 97].

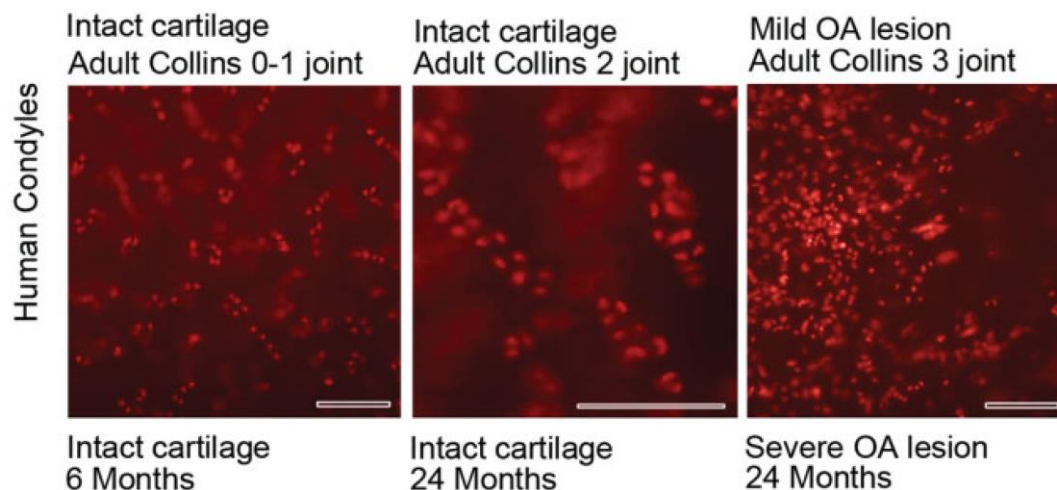


Abbildung 2: Aufsicht auf die Oberfläche von humanem Gelenknorpel der Femurcondylen. Die Chondrozyten der SZ weisen eine spezifische horizontale räumliche Anordnung auf. Bei OA und deren Progression kommt es zu Veränderungen dieser Anordnung. Mittels Fluoreszenzmikroskopie und Anfärbung der Zellkerne mit Propidium Iodid sind hier Femurcondylen mit makroskopisch intakten (Collins Grad 0 – 1), leicht geschädigtem (Collins Grad 2) sowie milde OA (Collins Grad 3) dargestellt. Bild publiziert in [97].

Korreliert man die Einteilung nach Collins [6, 23, 95-97] mit den mikroskopischen Befunden, entsteht ein Bild für die Progression der Erkrankung. An der menschlichen Femurcondyle dominiert bei gesundem (Grad 0 – 1) Knorpel die SCSO Strings (S), bei früher OA (Grad 2) die SCSO Double Strings (DS) und bei Fortschreiten der OA (Grad 3 und 4) Small Cluster (SC) sowie Big Cluster (BC). Im Endstadium wird die Organisation komplett aufgelöst, es entsteht eine diffuse Verteilung von Chondrozyten, die als Diffuse

(D) bezeichnet wird [17, 96, 97]. In vitro-Versuche konnte als Ursache für die Veränderung der Organisation eine Proliferation der Chondrozyten nachweisen [17].

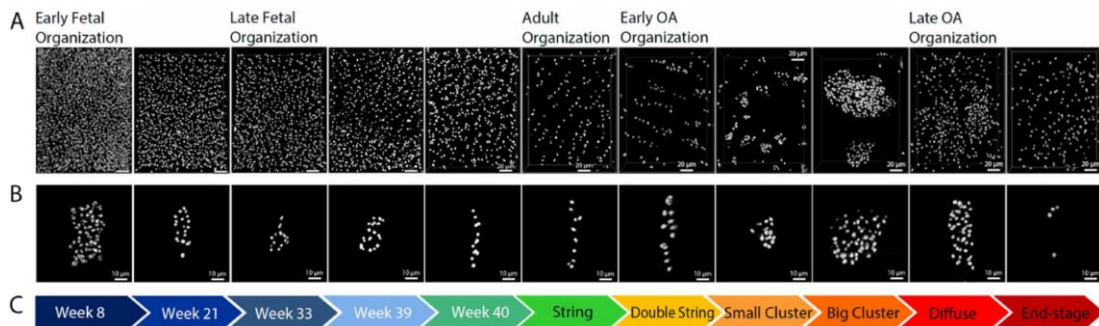


Abbildung 3: Darstellung der räumlichen Organisationsstruktur humaner Chondrozyten in der SZ von Femurkondylen. Man sieht die Entwicklung vom unreifen zum reifen Knorpel mit der Entwicklung der räumlichen Organisationsstruktur und die Entstehung von OA sowie deren Progression mit der Zerstörung der räumlichen Anordnung der Chondrozyten. Bild entnommen aus [17].

Indikatoren für OA im Knorpel sind unter anderem Kollagen Typ I, Kollagen Typ X und Matrix Metalloproteinase 13 (MMP-13). Diese Proteine sind in normalem, gesundem Knorpel nicht oder in geringer Menge nachweisbar [9, 100, 101].

In der Therapie der OA gibt es drei Hauptziele: Schmerzkontrolle, Funktionserhalt beziehungsweise -verbesserung und Verbesserung der Lebensqualität. Nach Möglichkeit sollten diese Therapieziele ohne Therapietoxizität und damit Nebenwirkungen erreicht werden. Therapeutisch stehen konservative und operative Verfahren zur Verfügung. Derzeit ist eine Heilung der OA aber nicht möglich. Konservativ gibt es nicht-medikamentöse und medikamentöse Therapieansätze. Operativ stehen gelenkerhaltende, gelenkersetzende und gelenkeliminierende Optionen zur Verfügung. Die Therapie erfolgt nach einem Stufenschema, an deren Ende der Gelenkersatz mittels Endoprothese beziehungsweise die heute seltenere Gelenkelimination mittels Arthrodesese steht [50, 102].

1.4. Kompressionstrauma

Die oberflächliche, weiche Knorpelschicht, die SZ ist besonders anfällig für Kompressionstraumata. Komprimiert man den Knorpel, kann das zu Veränderungen der Textur und Verdichtung des Knorpels führen [90]. Eine starke Kompression kann zu Nekrose, Apoptose oder deren Kombination [89, 91, 103-107], Freisetzung von PG beziehungsweise GAG aus der Knorpelmatrix [89, 91, 104, 106], erhöhten Wassergehalt im Gewebe und Gewebsschwellung [91, 107, 108], verminderte mechanische Funktion [91, 103, 105-107] und beeinträchtigter Funktion bei mechanischer Belastung führen [103]. Chondrozyten, die nicht apoptotisch oder nekrotisch zugrunde gehen, zeigen erhöhte Werte von messenger Ribonukleinsäure (messenger RNA beziehungsweise mRNA) Matrix-zerstörender Enzyme [53, 109]. Weitere Studien deuten an, dass die Matrix um diese überlebenden Zellen zudem schneller abgebaut wird [106]. Verletzungen des Gelenkknorpels können vom Körper nur unzureichend repariert werden und führen gemeinsam mit Schäden am subchondralen Knochen zur Bildung von Fibroknorpel. Tierexperimente zeigen, dass der Körper nach einer Verletzung des Gelenkknorpels innerhalb der ersten drei Wochen hauptsächlich Kollagen I bildet, nach sechs bis acht Wochen ändert sich die Synthese in Richtung Kollagen II. Radiochemische Analysen legen dar, dass der Reparaturknorpel nach sechs Monaten mehr Kollagen und weniger Hexosamine enthält als die Kontrollgruppe. Folglich besteht Grund zur Annahme, dass die fibrösen Eigenschaften des neu synthetisierten Knorpels eher durch den Verlust an PG als durch eine Veränderung des Kollagentyps entstehen [110]. Das neu gebildete Gewebe hat schlechtere biochemische und biomechanische Eigenschaften [110, 111] und weist eine verminderte Tragfähigkeit als der ursprünglichen Gelenkknorpel auf [112]. Dies begünstigt die Entwicklung einer sekundären OA [113]. Verschiedene Experimente mit Injury-Modellen haben versucht, die Zusammenhänge zwischen mechanisch verursachten Schäden an ECM und Degradation, Apoptose und Verlust an PG nach Verletzung zu verstehen [90, 91, 93, 106, 107]. Innerhalb des ersten Tages, genauer gesagt innerhalb der ersten 4 Stunden nach Trauma, ist der Verlust an GAG aus der Knorpelmatrix

durch mechanische Zerreißung der Matrix am größten und bleibt auch 24 bis 48 Stunden nach Trauma erhöht. Dieser Verlust innerhalb des ersten Tages nach Trauma kann nicht beeinflusst werden. MMP-Inhibitoren zeigen einen Effekt innerhalb einer Woche nach Trauma und eine Reduktion des Verlustes an GAG [53, 90, 91, 93, 106, 114]. In reifem Knorpel fällt der verletzungsbedingte Schaden je nach Gewebetiefe unterschiedlich aus. Das hängt mit der tiefenabhängigen Zusammensetzung [25, 90], Struktur [90, 115] und biomechanischen Eigenschaften der ECM zusammen [90, 94]. Das Scher- [116] und Kompressionsmodul und der GAG - und Kollagengehalt des Knorpels nehmen mit zunehmender Tiefe zu [24]. Schäden des Gelenkknorpels wie Risse der Gelenkoberfläche [89, 90], Zelltod [89, 90, 92], Verdichtung [90] und Schäden an Kollagen [90, 92] treten nahe der Gelenkoberfläche in der besonders weichen SZ auf und führen nach Trauma zu einem sofortigen Verlust der biomechanischen Funktion. Der Verlust an GAG ist in dieser SZ signifikant höher als in tieferen Knorpelbereichen, findet aber laut neuesten Studien nicht sofort nach Trauma, sondern erst im Verlauf [90] und durch passives Ausschwemmen statt [53]. Verletzungen am intakten Knorpelgewebe führen zur schnellen Aktivierung der drei Mitogen-Activated Protein (MAP)-Kinasen (MAPK): C-Jun N-terminal kinase (JNK), p38 und Extracellular signal-regulated kinase (ERK). Außerdem werden Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (NFkB) und andere Signalwege (Phosphoinositide 3-kinases (PI3K), Src-Kinasen) aktiviert und es kommt zur Induktion der mRNA-Produktion von IL-1 [117, 118]. Weitere Studien zeigten, dass TNF- α und IL-6 auslösende und IL-1 β sowie IL-17 wahrscheinlich progressive Faktoren der PTOA sind. Diese proinflammatorischen Zytokine führen unter anderem über erhöhte Konzentrationen von MMPs (Matrix Metalloproteinase 1 (MMP-1), MMP-3, -13), verminderter Synthese von GAGs, vermehrter Verlust von GAGs zu katabolen Effekten und Degradation des Knorpels sowie Beeinflussung der Chondrozyten. Darüber hinaus beeinflussen und potenzieren sich die Zytokine gegenseitig in ihrer Wirkung [77]. Zusätzlich kommt es zu einer frühen und schnellen Aktivierung von Genen, die eine Entzündungsreaktion auslösen, wie Inhibin β A, TNF-stimulated gene 6 protein

(TSG-6) und Arginase 1. Inhibin β A wird nach Trauma sehr schnell hochreguliert (etwa 30 Minuten), während Arginase 1 erst im Verlauf exprimiert wird (etwa nach 4 Stunden). Inhibin β A homodimerisiert und bildet so Activin a, ein Mitglied der Transforming growth factor beta (TGF- β)-Familie [117]. Activin a in Knorpel mit Osteoarthritis verehrt gebildet und könnte ein anaboler Faktor zur Steigerung der Typ-II-Kollagen-Synthese in arthrotischem Knorpel sein [12, 117]. Die Synthese von (Pro-)Inhibin β A 1 und damit Activin a wird durch verschiedene Faktoren beeinflusst, darunter Wachstumsfaktoren wie Transforming growth factor beta 1 (TGF- β 1), Fibroblast Growth Factor 2 (FGF-2), PDGF, EGF sowie Zytokine wie IL-1 und TNF- α , sowie auch eine Selbstinduktion durch Activin a. Erneutes Verletzen, in vitro simuliert durch Schneiden, von 6 Tage inkubierten Knorpelimplantaten weist durch Aktivierung von einzelnen Signalwegen, hier ERK und PI3K, darauf hin, dass eine vollständige Entzündungsreaktion nur bei Schädigung einer intakten Gelenkoberfläche ausgelöst wird. Zusätzlich steigt bei erneuter Verletzung der zytoplasmatische β -Catenin-Gehalt und es kommt zu einer Hochregulierung von Wnt-abhängigen Genen [117, 119, 120].

1.5. Fibroblast Growth Factor 2

Fibroblast Growth Factor (FGF) 2 (= basic FGF [121]) ist Bestandteil der großen FGF-Familie und wird sowohl in embryonalem als auch postnatalem Gewebe verbreitet exprimiert [122-125]. FGF-2 wurde zuerst aus Rinderhirnen und Rinder-Hypophysen aufgrund seiner proliferativen Wirkung auf Fibroblasten nachgewiesen [126-128]. FGF-2 hat viele biologische Eigenschaften und beeinflusst und reguliert unter anderem die Zellproliferation, Zelldifferenzierung, Skelettbildung, Angio- sowie Mitogenese und die Wundheilung. Die Effekte von FGF-2 werden durch die Bindung an vier affine FGF-Rezeptoren (FGFR) an der Zelloberfläche und Heparansulfat-PG vermittelt, deren Expressionsmuster sich zwischen gesundem und arthrotischem Knorpel unterscheidet [122-125]. Sowohl die Chondrozyten im gesunden als auch arthrotischen Knorpelgewebe exprimieren alle der vier FGFR. Dabei ist zu beachten, dass die FGFR-1 und -3 gegenüber FGFR-2 und -4 überwiegen. Zudem ist in arthrotischem Knorpel ist

die Expression von FGFR-1 erhöht und FGFR-3 entsprechend erniedrigt [129-131]. Heparin und Heparansulfat-PG haben wichtige Funktionen für FGFs zur Stabilisierung, Schutz vor thermischer Denaturierung und Proteolyse und effektiven Aktivierung der FGFR [122-125]. Die FGFR gehören zur Superfamilie der Rezeptor-Tyrosinkinase [132]. Nach Bindung von FGF-2 kommt es zu einer Dimerisierung der Rezeptoren und zur Autophosphorylierung spezifischer Tyrosinreste. Dies aktiviert mehrere Signaltransduktionswege im Cytoplasma [122].

Im Knorpelgewebe kommt FGF-2 in der PCM vor und wird bei mechanischer Stimulation freigesetzt [117, 133-135]. FGF-2 hat sowohl anabole als auch katabole Auswirkungen auf Knorpelhomöostase und die ECM, je nachdem, an welchen FGFR es bindet [117, 123, 127, 136, 137]. Die beiden wichtigsten Rezeptoren im Knorpelgewebe sind der FGFR-1 und der FGFR-3. Bindet und aktiviert FGF-2 den FGFR-1 im Gelenkknorpel, führt dies zu katabolen und anti-anabolen Prozessen. Durch FGFR-1 wird die Aktivität von abbauenden Enzymen der Knorpelmatrix gesteigert, es kommt zur Hemmung der Produktion der ECM und Proteoglykan-Synthese und zu einer gesteigerten Zellproliferation, die zu einer Clusterbildung der Zellen führt, wie man sie bei OA findet [117, 127, 136, 137]. Blockiert man den FGFR-1, führt dies zu einem Schutz vor OA durch verminderte Expression von MMP-13 sowie einer stärkeren Expression von FGFR-3 [117, 136, 137]. Betrachtet man diesen Mechanismus genauer, so kommt es durch Bindung von FGF-2 an FGFR-1 zur Phosphorylierung und Aktivierung von Protein kinase C delta type (PKC δ)- und rat sarcoma viral oncogene homolog (Ras). Ras und die PKC δ aktivieren die RAF-MEK1/2-ERK1/2-Kaskade. Die PKC δ aktiviert die drei Untergruppen der MAP-Kinasen (MAPK): ERK, JNK und p38. Diese Signalwege laufen in der Hochregulation des Transkriptionsfaktors ELK-1 wieder zusammen. ELK-1 führt über Erhöhung der Genexpression zur vermehrten Bildung von MMP-1 und MMP-13 [129, 138]. Bindet FGF-2 an den FGFR-3, führt dies eher zu anabolen Prozessen. Beispielsweise kommt es zu einer vermehrten Zelldifferenzierung sowie Bildung von Matrixproteinen (Produktion von PG). Fehlt FGFR-3, führt dies zu einer frühen OA-Entstehung. Spezifisch für den FGFR-3 ist FGF-18

[117, 136, 137, 139]. MMP-13 ist ein äußerst potentes, abbauendes Enzym der ECM und spielt eine Schlüsselrolle bei hohen Konzentrationen in arthrotischem Knorpel. Mehrere MAPK-Signalwege (alle drei Untergruppen: ERK, JNK und p38) müssen aktiviert werden, um eine Stimulation von MMP-13 zu erreichen. Dies dient wahrscheinlich als Kontrollmechanismus, um die Aktivität von MMP-13 zu regulieren. Andere Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 oder FGF-18 führen nicht zu einer Stimulation von MMP-13, obwohl sie ebenfalls ERK-MAPK aktivieren können [127]. Proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α führen indirekt über den NF κ B-Signalweg und die MAPK über E74-like factor 3 (ELF-3) zur Hochregulation von MMP-13. Zudem werden durch diese Zytokine MMP-1 und -3 hochreguliert [129, 140]. FGF-2 als einziger Wachstumsfaktor selbst ist in der Lage, die Expression von TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8 und MCP-1 im Knorpelgewebe zu steigern [129, 141]. PKC δ liegt weiter upstream der drei MAPK-Subgruppen und des NF κ B-Pathways und beeinflusst regulatorisch die Aktivierung der Downstream-Effektoren und ihrer regulatorischen Transkriptionsfaktoren, was zur Aktivierung von MMP-13 führt [127]. FGF-2 steigert darüber hinaus die Aktivität von runt related transcription factor 2 (RUNX2) und damit die Expression von ADAMTS-5, eine Aggrecanase, collagen type X a 1 chain (COL10A1) und MMP-13. Zudem hemmt FGF-2 die Synthese von PG wie Aggrecan und collagen type II α 1 chain (COL2A1) [129] und antagonisiert möglicherweise anabole Stoffe wie BMP7 und IGF-1 [127, 138]. Außerdem führt FGF-2 zu einer vermehrten Expression von Inhibin β A (und damit Activin a) und Arginase 1. Activin a könnte ein anaboler Faktor zur Steigerung der Typ-II-Kollagen-Synthese in arthrotischem Knorpel sein [117].

1.6. CCN2

Cysteine-rich 61, Connective tissue growth factor, Nephroblastoma-overexpressed (CCN) family member 2 (CCN2) gehört zur CCN-Proteinfamilie, die aus sechs Mitgliedern besteht. Es sind Cystein-reiche sekretorische Proteine und jedes enthält vier Module: Insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) module, von Willebrand factor type C repeat (WVC) module,

Thrombospondin (TSP) type 1 repeat, C-terminal (CT) module (außer CCN5) [101].

CCN2 interagiert direkt mit FGF-2 und bindet direkt an FGF-2 über die C-terminale Domäne von CCN2 (CT-module). Spektralanalysen zeigen eine Dissoziationskonstante von 5,5 nM zwischen FGF-2 und CCN2 [101, 123]. Das CT-module von CCN2 ist in der Lage, die durch FGF-2 ausgelöste Zellproliferation und die Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9)- und MMP-13-Produktion zu hemmen. Das CT-module, nicht aber das komplette CCN2-Molekül führt zu dieser Hemmung. CCN2, nicht aber das CT-Modul allein, bindet an FGFR1. Die durch FGF-2 ausgelöste Phosphorylierung der MAPK (ERK1/2, p38 und c-Jun N-terminal kinase) kann durch Bindung des CT-Moduls an FGF-2 vermindert werden, nicht aber durch das komplette CCN2-Molekül. Das komplette CCN2-Molekül ist durch Bindung an FGF-2 und den FGFR1 in der Lage, den intrazellulären FGF-2-Signalweg zu aktivieren, das CT-Modul dagegen nicht [101, 123]. Zudem stimuliert CCN2 die DNA- und Proteoglykan-Synthese in Chondrozyten. Im Gegensatz zu Stimulation der Kalzifikation bei Chondrozyten der Wachstumsfuge stimuliert CCN2 die unerwünschte Kalzifikation bei artikulären Chondrozyten nicht. Zudem konnten bei gleichzeitiger Applikation von CCN2 und Hydrogelen auf Gelatinebasis in Knorpeldefekte Reparaturvorgänge nachgewiesen werden [101, 142-144]. Das CCN2 sammelt sich bei Überexpression in der oberflächlichen (SZ) und tiefen Knorpelschicht (Deep Zone). CCN2 führt im Mausexperiment zu einer vermehrten Ansammlung von PG im Gelenkknorpel und zu einem stabilem Kollagengehalt beim Alterungsprozess. Zusätzlich konnte in Mäusen mit einer Überexpression von CCN2 keine arthrotischen Veränderungen wie die Produktion von Kollagen I, X und MMP-13 nachgewiesen werden. Man kann annehmen, dass CCN2-Überexpression zu einem Schutz vor arthrotischen Veränderungen im Alterungsprozess von Gelenkknorpel führt [101]. Darüber hinaus bindet CCN2 an verschiedenste extrazelluläre Matrixproteine, wie Heparansulfat-PG über das CT-Modul und viele mehr [101, 145, 146] sowie auch an Matrix-degradierende Enzyme wie MMPs, die CCN2 spalten [101, 147]. CCN2 bindet auch an Perlecan, ein Heparansulfat-PG [101, 146]. Der

Hauptbindungspartner von CCN2 ist das Genprodukt von Fibronectin 1, das Fibronectin (FN). Die CT-Domäne von CCN2 bindet direkt an FN und verbessert Anhaften von Chondrozyten an FN. Integrin alpha5beta1 ist vermutlich an diesem Prozess beteiligt [101, 148]. Mitglieder der CCN-Familie binden verschiedene Integrine (wie Integrin alpha5beta1). Diese Integrine sind Rezeptoren für die ECM [101, 142, 149, 150]. Zudem kann CCN2 über seine N-terminalen Module (IGFBP module und VWC module) direkt an Aggrecan binden. Diese Bindung ist unter Umständen für die durch CCN2 ausgelöste gesteigerte Produktion und Sekretion von Aggrecan durch die Chondrozyten verantwortlich [101, 151]. Das CCN2-Molekül wird durch MMP-13 gespalten. Die Spaltung wird durch FGF-2 und durch an FGF-2 gebundenes CCN2 gesteigert. Das CT-Modul ist durch Bindung an FGF-2 in der Lage, die Spaltung von CCN2 zu verringern [123]. MMP-9 und MMP-13 werden durch FGF-2 und die Kombination aus FGF-2 und CCN2 stimuliert und durch Bindung des CT-Moduls an FGF-2 gehemmt [123].

1.7. Zelltod in Chondrozyten

Im Allgemeinen unterscheidet man drei Arten von Zelltodtypen: Apoptose, Nekrose und Autophagie [52, 152]. Diese verschiedenen Mechanismen kommen nicht ausschließlich im Gewebe vor, sondern bedingen und beeinflussen sich gegenseitig durch fein gesteuerte molekulare Mechanismen [52, 153]. Im Knorpelgewebe kommt noch ein spezifischer, vierter Typ des Zelltodes hinzu, die Chondroptosis, die sowohl apoptotische als auch autophagische Anteile aufweist [52, 154, 155]. Die Apoptose ist ein programmierter Zelltod, der aus verschiedenen, regulierten Schritten und Phasen besteht und zum normalen Zellzyklus gehört, um an bestimmten Stellen einen Zelltod zu initiieren und abnormale, infizierte oder beschädigte Zellen abzutöten und deren Vermehrung zu verhindern [52, 156, 157]. Man unterscheidet zwei Hauptaktivierungswege: Den extrinsischen, Todesrezeptor-vermittelten und den intrinsischen, mitochondrial vermittelten Signalweg. Über verschiedene Caspasen werden durch die beiden Wege die ausführenden Caspasen 3, 6 und 7 aktiviert [52, 158, 159]. Caspase 3 spaltet viele

verschiedene Substrate wie Zytokeratine, Proteine des Zytoskeletts und Proteine des Zellkerns wie Poly(ADP-Ribose)-Polymerase sowie die Hemmstoffe der Caspase-Activated DNase [52, 158, 160]. Dies führt zu einer Fragmentation der Desoxyribonukleinsäure (DNA) [52, 158, 160], Umorganisation der Zytoskelettstruktur und auch zur Bildung von Apoptotic bodies sowie Initiierung der Phagozytose durch Expression von Phosphatidylserin an der äußeren Plasmamembran [52, 158, 161-164]. Zusätzlich existiert noch der Granzym-B-Signalweg, bei dem es durch Degranulierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) sowie zytotoxischen T-Zellen im Rahmen einer Immunantwort zur Freisetzung von Perforin, Granulysin sowie unter anderem der Serin-Protease Granzym-B kommt. Granzym-B gelangt durch einen Perforin-assoziierten Mechanismus in die Zelle und aktiviert dort direkt und indirekt über grBid, das zur Cytochrom-c-Freisetzung aus dem Mitochondrium und darüber zur Caspase-9-Aktivierung und Bildung des Apoptosoms führt, die Caspase 3 [52, 165-167]. Über die Beteiligung dieses Weges bei der Entstehung der OA ist bisher nur wenig bekannt, man konnte aber Granzym-A und -B in der Synovialflüssigkeit nachweisen [52, 167, 168]. Dieser programmierte Zelltod geht mit Verlust an Extrazellulärmatrixproteinen wie GAG, Aggrecan und Kollagen Typ II einher [52, 169, 170]. Demgegenüber steht die Nekrose, die lange als unbeabsichtigter, passiver Zelltod galt und die Folge von schädlichen Reizen wie Hitze, Strahlung, Sauerstoffmangel und zytotoxische Stoffe zu sein schien. Neuere Studien zeigten aber, dass auch die Nekrose zum Teil reguliert abläuft und auch in physiologisch wichtigen Situationen vorkommt, wie beim Zelltod der Chondrozyten bei der Kontrolle des Längenwachstums der Knochen [52, 171]. Übt man auf Chondrozyten Kompression aus, führt dieses Trauma zu einem signifikanten Zelltod, sowohl durch Apoptose [52, 91, 169, 172] als auch durch Nekrose [52, 172, 173]. Direkt nach dem Trauma kommt es in den Chondrozyten der superfiziellen Schicht zunächst überwiegend zur Nekrose mit geringem Apoptoseanteil, im Verlauf dann zunehmend zur Apoptose. Die Art des Zelltodes (Apoptose versus Nekrose) korreliert mit der Belastungsstärke. Je mehr Belastung, desto größer der Nekroseanteil [52, 174]. Darüber hinaus

korreliert die Anzahl der durch Zelltod untergegangenen Chondrozyten positiv mit der Dauer der Belastung. Je länger die Belastung einwirkt, desto größer die Anzahl der durch Zelltod untergegangenen Chondrozyten [52, 172].

1.8. Ziele der Arbeit

Es existieren viele verschiedene Studien zu den biomechanischen Eigenschaften [24, 116, 175-178] und Auswirkungen von Kompressionstraumata auf Gelenkknorpel [53, 88, 90, 105, 114, 179-181]. Die genauen molekularen (Patho-)Mechanismen der OA sind bisher aber unverstanden und die Erkrankung ist zum aktuellen Zeitpunkt nicht kausal therapierbar. In einem frühen Stadium scheint die Erkrankung potenziell reversibel zu sein [4, 182]. Deshalb ist es entscheidend, diese Mechanismen genauer zu verstehen, um durch die Weiterentwicklung interventioneller Strategien in Zukunft Patienten in einem frühen Stadium der OA, z. B. direkt posttraumatisch, einer Intervention zuführen zu können.

In der vorliegenden Arbeit soll die Frage geklärt werden, ob durch die Zugabe von CCN2 der posttraumatisch auftretende Zelltod und der Verlust an GAG nach uniaxialen Kompressionstrauma als Modell eines Gewebeschadens moduliert werden kann. Hierzu wurden mehrere Teilaspekte untersucht.

Zunächst wurde das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay optimiert. Es wurde eruiert, welcher Bereich der Standardkurve für die Messung der GAG einen optimalen, linearen Bereich aufweist. Die Konzentration sowie Verdünnung der Knorpel-Discs sowie des Kulturmediums wurden mit der Fragestellung in mehreren Experimenten untersucht, welche Konzentration sowie Verdünnung zu einer Messung im Optimalbereich der Standardkurve führt. Auch der Verdau der Knorpeldiscs wurde bezüglich optimaler Temperatur, Proteinase-K-Konzentration und Schüttelzahl untersucht.

Das Injury-Kompressionsmodell wird an humane Knorpelimplantate angepasst. Hier wurden die Fragen beantwortet, welche die geeignete Dicke der Knorpel-Discs nach Kompressionstrauma im Vergleich zur Kontrollgruppe ist sowie

welche Kompressionsstärke bei humanen Kniegelenksexplantaten zu einem guten Verhältnis zwischen vitalen und avitalen Chondrozyten nach Kompressionstrauma im Vergleich zur Kontrollgruppe führt.

Nach diesen Vorarbeiten und unter Zuhilfenahme der ermittelten Ergebnisse wurden die Hauptexperimente mit CCN2 begonnen. Wie oben bereits beschrieben, ging es hierbei um die Frage, wie der Anteil toter Zellen sowie Verlust an GAG durch CCN2 beeinflusst werden kann. Zunächst wurde die Frage geklärt, welche Konzentration von CCN2 den Anteil toter Zellen sowie den Verlust an Glykosaminoglykanen im Vergleich zur Kontrollgruppe am besten vermindert. Dann wurden mit der optimalen Konzentration die Inkubationszeiten variiert und die Fragestellung bearbeitet, wann CCN2 nach Kompressionstrauma sowie ohne Kompressionstrauma den größten Effekt hat sowie auf welche Knorpelschicht der maximale Effekt messbar ist, alles im Vergleich zu den Kontrollgruppen ohne CCN2-Exposition. Bei den Inkubationszeiten ging es hierbei vor allem um die Fragestellung, ob CCN2 eher auf die früh auftretende Nekrose oder auf die später einsetzende Apoptose [52, 96, 172, 174] wirkt. Auch wurde geklärt, ob CCN2 auch auf die Kontrollgruppe ohne Kompressionstrauma den Anteil toter Zellen senken kann.

2. Material und Methoden

2.1. Materialliste

2.1.1. Verwendete Verbrauchsmaterialien

Tabelle 1: Verwendete Verbrauchsmaterialien. Die Tabelle enthält jeweils Produktbezeichnungen und Hersteller.

Produktbezeichnung	Artikelnummer	Hersteller
100 µl RPT-Filterspitze, konisch (steril)	S1180-1840	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
200 µl RPT-Filterspitze, graduiert, Rack (steril)	S1180-8810	STARLAB International GmbH, Hamburg, Deutschland
3M™ Comply™ Indicator Tape	1322/18	3M, Maplewood, Vereinigte Staaten von Amerika
Alufolie 30 cm x 10 m	354309 / 2070299	O+S Offterdinger & Sailer GmbH, Kornwestheim, Deutschland
Biopsiestanze 4 mm	49401	Pfm Medical, Köln, Deutschland
CELLSTAR® 96W Microplate, flat bottom	655185	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Duran® Laborflasche 100 ml	21 801 24 58	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Duran® Laborflasche 500 ml	21 801 44 59	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland

Eppendorf Safe-Lock Tubes, 0,5 ml	0030121112	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 1,5 ml	0030120086	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Eppendorf Safe-Lock Tubes, 2 ml	0030120094	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Filterspitzen, peqGOLD SafeGuard™, Standard, 0,1 – 10 µl	PEQL81-101 (732-2961)	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Filterspitzen, peqGOLD SafeGuard™, Standard, 1 – 100 µl	PEQL81-1012 (732-2963)	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Filterspitzen, peqGOLD SafeGuard™, Standard, 1 – 200 µl	PEQL81-1040 (732-2967)	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Filterspitzen, peqGOLD SafeGuard™, Standard, 100 – 1000 µl	PEQL81-1050 (732-2968)	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika
Filtrierpapier MN 615 1/4	531015	Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Deutschland
Kryo Boxen zur Aufbewahrung von Proben, inklusive Rastereinsatz	KA1050WH1	Roland Vetter Laborbedarf OHG, Ammerbuch, Deutschland

Medimex Klarsichtsterilverpackung für Autoklaven Klarsichtbeutel ohne Falte 150 x 300 mm	S-20 (433116)	Medimex GmbH, Limburg an der Lahn, Deutschland
Messzylinder 50 ml	21 390 17 06	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Messzylinder 1000 ml	21 390 54 08	DWK Life Sciences GmbH, Wertheim/Main, Deutschland
Millex-GP, 0,22 µm, Polyethersulfon, 33 mm, gamma-sterilisiert (Sterilfilter)	SLGP033RS	Merck Millipore, Burlington, Vereinigte Staaten von Amerika
Nitrile Medical Examination Gloves powderfree L	290420	Abena GmbH, Oberderdingen, Deutschland
Objektträger 76 x 26 mm	03-0004	R. Langenbrinck GmbH, Emmendingen, Deutschland
Petrischale, PS, 145/20 mm, mit Nocken	639102	Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Pipetten Eppendorf Research® plus, Einkanal, 0,5 – 10 µl	3123000020	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland

Pipetten Eppendorf Research® plus, Einkanal, 10 – 100 µl	3123000047	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research® plus, Einkanal, 20 – 200 µl	3123000055	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Pipetten Eppendorf Research® plus, Einkanal, 100 – 1000 µl	3123000063	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Pipetten Eppendorf Xplorer plus 50 – 1200 µl/12 Kanal	4861000830	Eppendorf Research, Hamburg, Deutschland
Rasierklingen Wilkinson Sword Classic, 10 Stück		Wilkinson Sword, Drogeriemarkt, Tübingen, Deutschland
Recombinant Human CTGF (CCN2), 20 µg	120-19	PeptoTech GmbH, Rocky Hill, Vereinigte Staaten von Amerika
Rotilabo®-Magnetstäbchen, zylindrisch, verschiedene Größen		Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schraubbecher 100 ml, PP	75.562.105	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 10 ml	86.1254.025	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland
Serologische Pipette 50 ml	86.1256.001	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

Spatel unterschiedlicher Größen		Aesculap, Tuttlingen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen), Deutschland
Standard-Skalpell	200130021	No. 21 FEATHER Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Tube, 15 ml, PP, 17/120 mm, Conical bottom, Cellstar® (BlueCaps 15 ml)	188261	Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Tube, 50 ml, PP, 30/115 mm, Conical bottom, Cellstar® (BlueCaps 50 ml)	210261	Greiner bio-one International GmbH, Kremsmünster, Österreich
Wiegelöffel unterschiedlicher Größen		Aesculap, Tuttlingen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen), Deutschland
Pinzetten anatomisch		Aesculap, Tuttlingen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen), Deutschland
Pinzetten chirurgisch		Aesculap, Tuttlingen (B. Braun Melsungen AG, Melsungen), Deutschland

2.1.2. Verwendete Reagenzien und Chemikalien

Tabelle 2: Verwendete Reagenzien und Chemikalien. Die Tabelle enthält jeweils Produktbezeichnungen, Inhaltsstoffe und Verwendungszweck und Referenz- beziehungsweise CAS-Nummer.

Produkt- bezeichnung	Referenz- /CAS- Nummer	Inhaltsstoffe und Verwendungszweck	Hersteller
1,9-Dimethyl- Methylene-blue chloride (DMMB/DMB Cl)	03610	DMMB-Färbung zur Darstellung von Glykosaminoglykanen	Polysciences Inc., Warrington, Vereinigte Staaten von Amerika
Amphotericin B	15290026	Amphotericin B, 250 µg/ml	Gibco® by lifetechnologies™ (Thermo Fischer Scientific), Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Ampuwa®	10333412	Wasser für Injektionszwecke	Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
AnalaR NORMAPUR Ethanol absolute	64-17-5	2,5 l Ethanol 100 % Katalognummer: 20821.330	VWR International, Radnor, Vereinigte Staaten von Amerika

Albumin Fraction V; pH 7,0, BC	A1393,00 50	Bovine Serum Albumin (BSA)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Calcein, AM	C3099	Fertige Lösung Menge: 1 ml Konzentration Stock: 1 mg/ml Lösung in Dry Dimethylsulfoxide (DMSO)	Gibco® by lifetechnologies™ (Thermo Fischer Scientific), Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Chondroitin sulfate sodium salt from shark cartilage	C4384-5G	1x 5 g Chondroitinsulfat	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Descosept AF	00-311-010	Flächendesinfektionsmittel	Dr. Schumacher, Malsfeld, Deutschland
DMEM(1X) = Dulbecco's Modified Eagle Medium 500ml	41966-029	Enthält: [+] 4,5 g/l D-Glucose [+] L-Glutamine [+] Pyruvate	Gibco® by lifetechnologies™ (Thermo Fischer Scientific), Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

Ethanol 99 % vollständig vergällt MEK/BITREX	ETO- 5000-99-1	Ethanol 99 %, vollständig vergällt	SAV-Liquid Production GmbH, Flintsbach am Inn, Deutschland
FCS (Fetal calv serum)	S 0115		Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Ham's F-12 Nutrient Mix, GlutaMAX™ Supplement	31765035		Gibco® by lifetechnologies™ (Thermo Fischer Scientific), Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
L-Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt (Phosphitan)			Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
PBS 1X (Phosphate- buffered saline)	10010056	PBS, pH 7,4	Gibco® by lifetechnologies™ (Thermo Fischer Scientific), Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika

Pen Strep Penicillin Streptomycin	15140122	[+] 10 000 Units/ml Penicillin [+] 10 000 µg/ml Streptomycin	Gibco® by lifetechnologies™ (Thermo Fischer Scientific), Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Propitium Iodide	P4170- 10MG	Menge: 10 mg Pulver Konzentration Stock: 10 mg/ml (Lösung in Ampuwa-Wasser)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Vereinigte Staaten von Amerika
Proteinase K	EO0491	Grundkonzentration: 20 mg/ml	Thermo Fischer Scientific, Waltham, Vereinigte Staaten von Amerika
Salzsäure TitriPUR	MC10905 72500	c(HCL) = 1mol/l (1N)	Merck Millipore, Burlington, Vereinigte Staaten von Amerika
Sekusept® PLUS	30 111 00	6 l Kanister mit Desinfektionslösung zur Instrumentendesinfekti on	Ecolab Inc., Saint Paul, Vereinigte Staaten von Amerika

Stickstoff, flüssig			Westfalen AG, Münster, Deutschland
----------------------------	--	--	--

2.1.3. Verwendete Geräte

Tabelle 3: Verwendete Geräte. Die Tabelle enthält jeweils Gerätebezeichnung und Hersteller.

Gerätebezeichnung	Hersteller
Abzug	Prutscher Laboratory Systems, Neudörfel, Österreich
Analysewaage „handy“	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Autoklav HIKLAVEC HV-50	HMC-Europe GmbH, Tüßling, Deutschland
CO₂-Inkubator Serie CB	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
ELISA-Reader	
Gefrierschrank -24 °C	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Gefrierschrank -72 °C	GFL, Burgwedel, Deutschland
MTS 2/4 digital Mikrotiterschüttler	IKA-Werke, Staufen im Breisgau, Deutschland
Kühlschrank 4 °C	Liebherr, Bulle FR, Schweiz
Kühlschrank 4 °C	Severin, Sundern, Deutschland
LSM 510 META Laser Scanning Mikroskop mit ApoTome	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland
pH-Meter Five easy FE 20	Mettler-Toledo, Columbus, Vereinigte Staaten von Amerika

Pipetus®, Akku-betriebene Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG, Eberstadt, Deutschland
Savant SpeedVac Concentrator SVC-100H Vakuumzentrifuge	Savant
Schneideblock	Privatanfertigung
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl, Deutschland
Thermomixer Comfort 5355	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexmischer REAXtop	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach, Deutschland
Wasserbad Mendingen W12	Mendingen Labortechnik, Dresden, Germany
Zentrifuge 5242	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge 5242R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.4. Verwendete Software

Tabelle 4: Verwendete Software. Die Tabelle enthält jeweils Produktbezeichnungen und Hersteller.

Produktbezeichnung	Hersteller
Axio Vision 4.8	Carl Zeiss GmbH, Oberkochen, Deutschland
EndNote	Clarivate Analytics, Philadelphia, Vereinigte Staaten von Amerika
Gen5 Data Analysis Software	Biotek Instruments, Inc., Winooski, Vereinigte Staaten von Amerika

Fiji is just ImageJ	NIH Image, Vereinigte Staaten von Amerika
IBM SPSS Statistics 24	IBM Corporation, Armonk, Vereinigte Staaten von Amerika
Microsoft Excel 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika
Microsoft Windows 10	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika
Microsoft Windows 2000	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika
Microsoft Word 2016	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika
Microsoft 365 (Word, Excel, PowerPoint)	Microsoft Corporation, Redmond, Vereinigte Staaten von Amerika
SigmaPlot 12.0	Systat Software Inc., San Jose, Vereinigte Staaten von Amerika

2.2. Sterile Herstellung von 300µm Knorpel-Discs aus Resektaten humaner Femurkondylen bei Knie-Totalendoprothesen zur Gewinnung von 300µm Knorpel-Discs in frühem Osteoarthritis-Stadium

2.2.1. Sterile Herstellung des Dulbecco's modified Eagle Mediums

Als Grundmedium wurden 500 Milliliter (ml) 1X Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) high glucose pyruvate genutzt. Unter sterilen Bedingungen (unter der Sterilbank) erfolgte die Hinzugabe von 6 ml Amphotericin B und 10 ml Pen Strep mithilfe von Stangenpipetten und dem Pipetus® sowie die gute Durchmischung der Lösung. Die Lagerung des fertigen, sterilen Mediums erfolgte bei 4 Grad Celsius (°C). Anwendungsgebiete waren der sterile Transport der Knorpelproben vom Operationssaal bis zum Labor, die Herstellung von 300 Mikrometer (µm) Knorpel-Discs aus den Resektaten humaner Femurkondylen und als Grundsubstanz für Fluoreszenzfärbungen.

2.2.2. Sterile Herstellung von 300 µm Knorpel-Discs aus den Resektaten der Femurkondylen bei Implantation von Knie-Endoprothesen

Die Knorpelproben zur Herstellung der 300 µm starken Knorpel-Discs (Explantate der superfiziellen Zone des Gelenkknorpels) wurden bei der Implantation von Endoprothesen des Knies gewonnen. Die beteiligten Kliniken waren die Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen und die Winghofer Medicum Chirurgische Fachklinik in Rottenburg. Die Probengewinnung erfolgte mit Genehmigung der zuständigen Ethik-Kommission (713/2012BO2) und nach Aufklärung und Zustimmung der jeweiligen Patienten. Bei den Patienten lag als Grunderkrankung eine Gonarthrose mit Indikation zur Implantation einer Totalendoprothese vor. Bei der Operation erfolgte die Resektion der Femurkondylen und der Fossa intercondylaris mit dem darauf aufliegenden Kniegelenksknorpel. Die Proben mit dem resezierten Knochen und Knorpel wurden intraoperativ steril in Schraubbecher mit etwa 80 ml DMEM high glucose pyruvate verpackt. Das DMEM high glucose pyruvate wurde wie in 2.2.1 beschrieben hergestellt. Die Resektate wurden über Nacht steril bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Verarbeitung im Labor erfolgte am nächsten Tag

zu einer bestimmten Uhrzeit – wenn möglich, gegen 08:00 Uhr. Die Uhrzeit der Disc-Herstellung wurde dokumentiert, um eine genaue Zeitabfolge der folgenden Experimente zu erhalten.

Tabelle 5: Patientenübersicht. Die Tabelle enthält eine für die vorliegende Arbeit eingeführte fortlaufende Patientenummer zur Anonymisierung, das Geschlecht (weiblich: W, männlich: M), das Alter zum Operationszeitpunkt in Jahren, die Seite der Probenentnahme und immunologische oder neoplastische Vorerkrankungen und Rheuma beziehungsweise Trauma in der Anamnese.

Patienten- Nummer	Geschlecht	Alter	OP-Seite	Vorerkrankungen (immunologisch, Neoplasien)	Rheuma/ Trauma	Anzahl Discs
Patient 1	M	60	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	12
Patient 2	W	67	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	12
Patient 3	M	63	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	12
Patient 4	M	64	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	12
Patient 5	W	68	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	12
Patient 6	W	71	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	12
Patient 7	W	80	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	12
Patient 8	M	58	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	28

Patient 9	M	76	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	22
Patient 10	M	56	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	25
Patient 11	W	63	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	7
Patient 12	W	64	R	Nein	Nein	18
Patient 13	M	74	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	9
Patient 14	W	72	L	Nein	Nein	9
Patient 15	W	75	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	9
Patient 16	W	79	R	Nein	Nein	10
Patient 17	M	56	R	Nein	Nein	5
Patient 18	W	61	R	Nein	Nein	24
Patient 19	M	54	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	24
Patient 20	W	74	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	24
Patient 21	W	61	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	24

Patient 22	M	64	R	Nein	Nein	17
Patient 23	M	53	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	16
Patient 24	M	56	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	35
Patient 25	M	63	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	41
Patient 26	W	88	R	Nein	Nein	10
Patient 27	M	69	L	Nein	Nein	38
Patient 28	M	57	R	Nein	Nein	9
Patient 29	W	59	L	Nein	Nein	24
Patient 30	M	84	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	20
Patient 31	M	52	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	24
Patient 32	W	70	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	24
Patient 33	M	52	L	Nein	Nein	15
Patient 34	W	64	R	Nein	Nein	19

Patient 35	M	73	L	Nein	Nein	24
Patient 36	W	71	R	Nein	Nein	24
Patient 37	W	67	L	Nein	Nein	19
Patient 38	W	76	R	Nein	Nein	15
Patient 39	W	82	L	Nein	Nein	19
Patient 40	M	69	L	Nein	Nein	14
Patient 41	M	78	R	Nein	Nein	14
Patient 42	W	76	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	25
Patient 43	W	53	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	15
Patient 44	W	64	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	20
Patient 45	W	54	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	39
Patient 46	W	50	L	Nein	Nein	31
Patient 47	W	60	R	Nein	Nein	21

Patient 48	W	71	L	Nein	Nein	11
Patient 49	W	62	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	23
Patient 50	W	75	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	14
Patient 51	W	75	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	11
Patient 52	M	51	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	15
Patient 53	M	64	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	17
Patient 54	M	60	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	15
Patient 55	M	54	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	11
Patient 56	W	79	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	9
Patient 57	M	62	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	4
Patient 58	M	69	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	22
Patient 59	M	71	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	18
Patient 60	M	60	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	22

Patient 61	W	57	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	10
Patient 62	W	74	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	7
Patient 63	M	53	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	19
Patient 64	W	76	R	Nicht bekannt	Nicht bekannt	9
Patient 65	M	77	L	Nicht bekannt	Nicht bekannt	10
Patient 66	M	70	R	Nein	Nein	8

Die Instrumente waren gereinigt, autoklaviert und steril verpackt. Die Unterlage des Schneideblocks und die Rasierklinge zum Schneiden der 300 µm Knorpel-Discs aus den Knorpel-Stanzen konnten nicht autoklaviert werden und mussten vor der Nutzung zur Sterilisation in 70 % Ethanol eingelegt werden. Nach einer Einwirkzeit von mindestens fünf Minuten wurden die Unterlage und die Rasierklinge unter die Sterilbank gebracht und abgetrocknet. Wichtig war, dass das Ethanol vor der Anwendung an den Knorpelproben vollständig evaporierte, da Ethanol zytotoxisch wirkt und so die Experimente beeinflussen könnte. Unter der Sterilbank wurde eine 96er Well-Platte (Cellculture Microplate, 96 Well) mit jeweils 200 Mikroliter (µl) DMEM high glucose pyruvate pro Vertiefung vorbereitet. Wichtig war hierbei, dass pro Patient mindestens zwei Reihen an Vertiefungen pipettiert wurden, um eine Einteilung der Knorpelstanzen beziehungsweise Knorpel-Discs in Versuchs- und Kontrollgruppen zu ermöglichen. Die obere Reihe war für die Versuchsgruppen, die untere Reihe für die Kontrollgruppen vorgesehen. Die Resektate der Femurkondylen wurden in ihrem sterilen Transportbehältnis mit jeweils etwa 80 ml DMEM high glucose

pyruvate unter die Sterilbank gebracht. Die Proben wurden dann möglichst atraumatisch mit einer anatomischen Pinzette in eine Petrischale mit etwas frischem DMEM high glucose pyruvate gelegt, sodass der Knorpel die ganze Zeit mit Flüssigkeit bedeckt war und so vor Austrocknung geschützt wurde. Der Knorpel wurde mit der Pinzette an einer möglichst unbrauchbaren Stelle angefasst, um die gesunden Abschnitte möglichst nicht zu komprimieren oder zu zerstören. Es erfolgte die Begutachtung des Knorpels und das Aussuchen des makroskopisch am besten erscheinenden Knorpels. Dieser war glatt, weißlich und weich zu schneiden. Violett verfärbter, fibrosierter, granulierter, harter Knorpel, starke Verletzungen, Riefenbildung oder vollständig freigelegter Knochen waren makroskopisch als schlecht zu deklarieren.

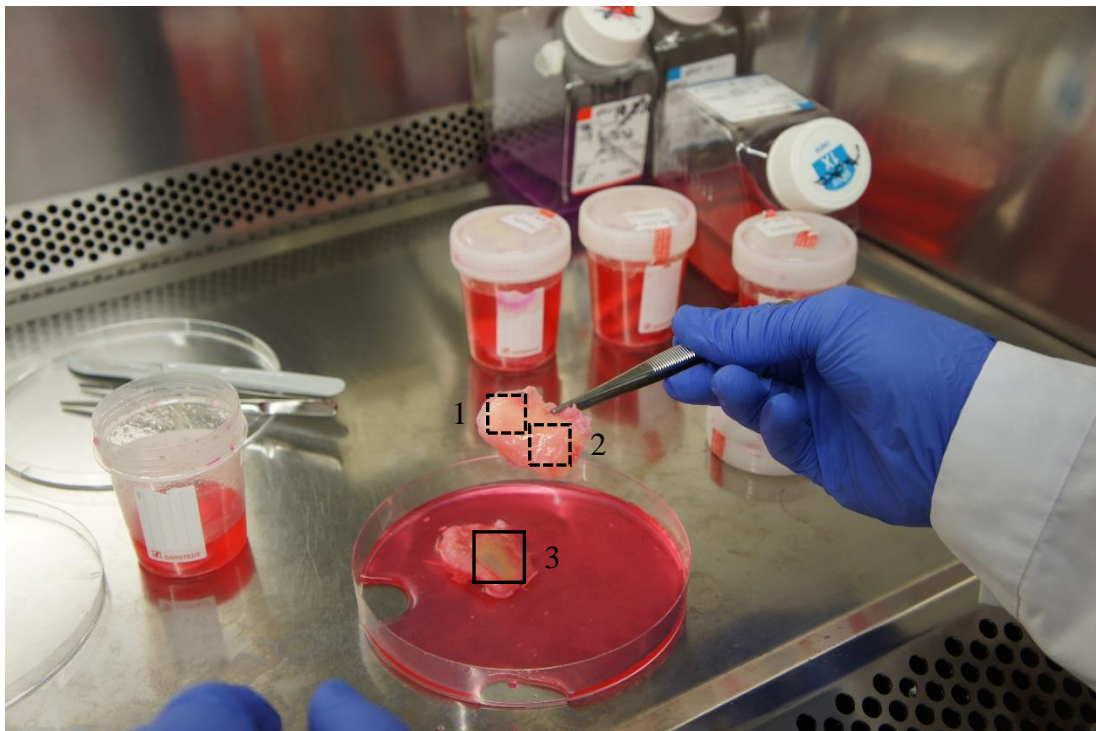


Abbildung 4: Beispielhafte Darstellung der Herstellung von 300 μm Knorpel-Discs. Zu sehen sind zwei Knochen-Knorpel-Resektate aus dem Kniegelenk eines Patienten mit dem pinkfarbenen Knorpel auf dem gelblichen Knochen. 1: Makroskopisch glatter, guter Gelenkknorpel, 2: Makroskopisch schlechter Gelenkknorpel mit Osteoarthritis, 3: Komplett abgetragener Gelenkknorpel als Endstadium der Osteoarthritis mit Riefenbildung. Abbildung aus eigener Aufnahme.

Mit einer chirurgischen Pinzette wurde das Resektat an einer makroskopisch möglichst unbrauchbaren Stelle festgehalten, mit einem sterilen Einmalskalpell der makroskopisch gute Kniegelenksknorpel vom Knochen abgetragen und in die Petrischale mit dem DMEM high glucose pyruvate gegeben. Mit einer Biopsiestanze wurden aus dem makroskopisch guten Gelenkknorpel benachbarte Knorpelstanzen mit einem Durchmesser von 4 mm und einer Fläche von 1 Quadratzentimeter (cm²) hergestellt und in jeweils eine für diese Knorpelstanze vorgesehene Vertiefung der 96er Well-Platte gegeben. So wurden immer jeweils eine der benachbarten Stanzen der Versuchsbeziehungsweise Kontrollgruppe zugeordnet, um ein möglichst homogenes Muster der Chondron- und Chondrozytenverteilung zu haben. Nach der Herstellung der Stanzen musste nun die besonders weiche, 300 µm dicke SZ vom Rest der Knorpelschicht abgelöst werden. Dazu wurde eine frische 96er Well-Platte mit jeweils 200 µl Chondrozyten-Medium pro Vertiefung zur Anlage einer Zellkultur vorbereitet, wie in 2.4.2 beschrieben. Die Knorpelstanze wurde mit einem kleinen Spatel aus der Vertiefung der 96er Well-Platte extrahiert und beide Seiten eingehend betrachtet. Die Schneide- und die ehemalige Gelenkseite mussten identifiziert werden. Die ehemalige Gelenkfläche war violetter, leicht aufgeraut und hatte eine insgesamt homogenere Oberfläche als die Schneideseite. Diese war heller beziehungsweise weißlich, glatt durch das Schneiden mit dem Skalpell und wies eventuell Schnittabdrücke auf. Die Knorpelstanze wurde mit der ehemaligen Gelenkfläche nach unten in die 300 µm tiefe, 4 mm im Durchmesser große Vertiefung eines eigens dafür angefertigten Schneideblocks gelegt.

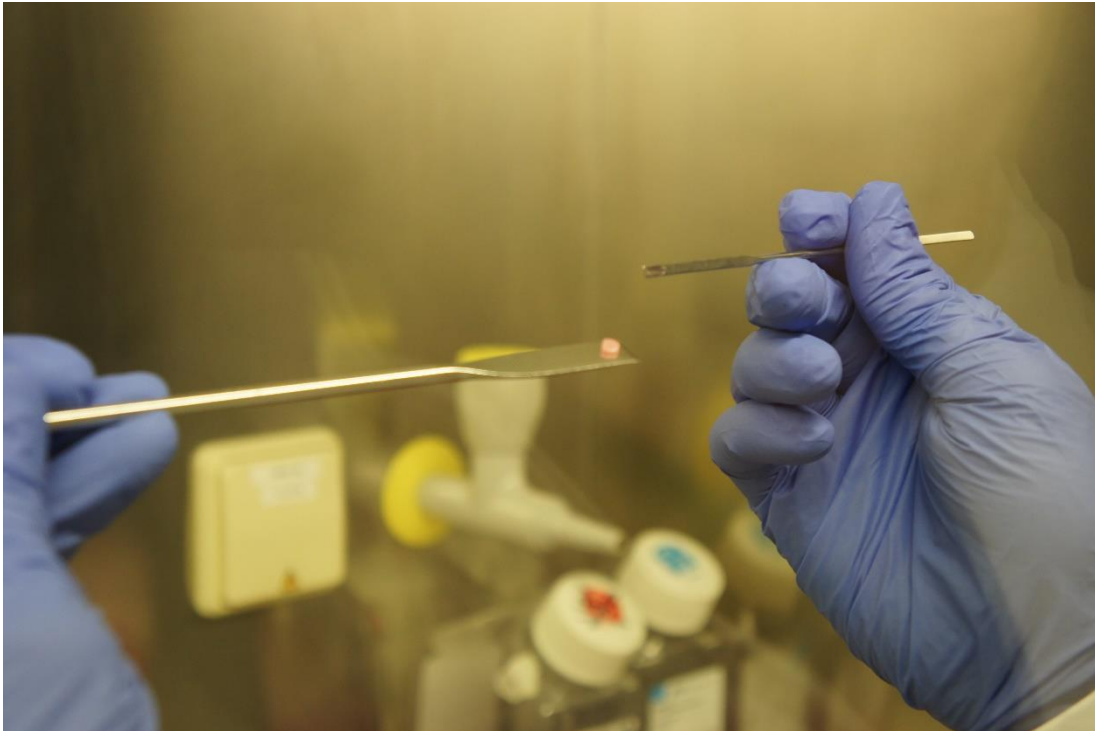


Abbildung 5: Beispielhafte Darstellung einer Knorpel-Stanze bei der Identifikation der ehemaligen Gelenk- und Schneidefläche. Die Stanze hat einen Durchmesser von 4mm und eine Fläche von 1 cm². Abbildung aus eigener Aufnahme.

Mit der Rasierklinge wurde die 300 µm Knorpel-Disc vom Rest der Knorpel-Stanze getrennt. Die 300 µm entsprechen der sehr weichen und empfindlichen SZ des Kniegelenkknorpels. Die 300 µm Knorpel-Discs wurde dann mit der ehemaligen Gelenkfläche nach oben jeweils in eine Vertiefung einer 96er Well-Platte gegeben und die Anlage einer Zellkultur erfolgte, wie in 2.4.2 beschrieben.

2.3. Farbstoffe und Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung von Chondrozyten

2.3.1. Calcein-Färbung zur Darstellung vitaler Zellen

Die Calcein-Lösung zur Darstellung vitaler Zellen mit einer Konzentration von 1 Milligramm pro Milliliter (mg/ml) wurde steril aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Lagerung des Farbstoffs erfolgte lichtgeschützt. Wichtig bei der Herstellung

von Fluoreszenz-Arbeitslösung war, dass die Schritte in einem möglichst dunklen Umfeld erfolgen, um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe zu vermeiden. Die Calcein-Arbeitslösung wurde in einer 1 : 1000 Verdünnung hergestellt. Als Volumengrundlage wurde DMEM high glucose pyruvate genutzt. Je nach Anzahl n der Proben wurde die benötigte Menge DMEM und Calcein berechnet. Pro Probe (pro Knorpel-Disc) und Vertiefung der 96er Well-Platte wurden 150 µl Arbeitslösung mit einer Calcein-Konzentration von 1 Mikrogramm pro Milliliter (µg/ml) pipettiert. Entsprechend erfolgte die Berechnung der 1 : 1000 Verdünnung.

Tabelle 6: Berechnung für die Calcein-Arbeitslösung (1 : 1000 Verdünnung) für n Knorpeldiscs.

DMEM	149,85 µl · n
Calcein (1 mg/ml)	0,15 µl · n
Gesamt	150 µl · n

Die Arbeitslösung wurde je nach berechnetem Gesamtvolumen in ein Eppendorf-Cup beziehungsweise ein BlueCap pipettiert. Im Folgenden wurde das Inkubationsmedium der Probe (Disc) in der Vertiefung der 96er Well-Platte abpipettiert und durch 150 µl Arbeitslösung mit einer Calcein-Konzentration von 1 µg/ml ersetzt. Dabei war darauf zu achten, dass die Knorpel-Discs nur für Sekunden ohne Medium waren, um eine Austrocknung und damit einen Zelltod zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte im Inkubator bei 37 °C für 15 bis 30 Minuten. Nun konnte die Fluoreszenzmikroskopie der vitalen Zellen durchgeführt werden, beispielsweise zur Charakterisierung der SCSO der jeweiligen Discs.

2.3.2. Live-Dead-Färbung zur Darstellung vitaler und toter Zellen

Die Calcein-Lösung zur Darstellung vitaler Zellen mit einer Konzentration von 1 mg/ml wurde steril aliquotiert und bei -20 °C gelagert. Die Propitium-Iodid-Lösung zur Darstellung toter Zellen (nekrotischer und apoptotischer Zelltod) wurde als 10 Milligramm (mg) Pulver geliefert, mit 1 ml Ampuwa®-Wasser gemischt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert. Die Konzentration der Propitium-Iodid-Lösung betrug 10 mg/ml. Die Lagerung der Farbstoffe erfolgte lichtgeschützt. Wichtig bei der Herstellung von Fluoreszenz-Farbstoffen war, dass die Schritte in einem möglichst dunklen Umfeld erfolgen sollten, um eine Zerstörung der Fluoreszenz-Farbstoffe zu vermeiden. Die Live-Dead-Färbelösung wurde in einer 1 : 1000 Verdünnung hergestellt. Als Volumengrundlage wurde DMEM high glucose pyruvate von genutzt. Je nach Anzahl n der Proben wurde die benötigte Menge DMEM, Calcein und Propitium Iodid berechnet. Pro Probe (Knorpel-Disc) und Vertiefung der 96er Well-Platte wurden 150 µl Arbeitslösung mit einer Calcein-Konzentration von 1 µg/ml und einer Propitium-Iodid-Konzentration von 10 µg/ml pipettiert. Entsprechend erfolgte die Berechnung der 1 : 1000 Verdünnung.

Tabelle 7: Berechnung für die Live-Dead-Arbeitslösung (1 : 1000 Verdünnung) für n Knorpeldiscs.

DMEM	149,7 µl · n
Calcein (1 mg/ml)	0,15 µl · n
Propitium Iodid (10 mg/ml)	0,15 µl · n
Gesamt	150 µl · n

Die Arbeitslösung wurde je nach Gesamtvolumen in ein Eppendorf-Cup beziehungsweise ein BlueCap® pipettiert. Im Folgenden wurde das

Inkubationsmedium der Probe (Knorpel-Disc) aus der Vertiefung der 96er Well-Platte abpipettiert und durch 150 µl Arbeitslösung mit einer Calcein-Konzentration von 1 µg/ml und einer Propitium-Iodid-Konzentration von 10 µg/ml ersetzt. Dabei war darauf zu achten, dass die Knorpel-Discs nur für eine kurze Zeit ohne Medium waren, um eine Austrocknung und damit einen Zelltod zu vermeiden. Die Inkubation erfolgte im Inkubator bei 37 °C für 30 Minuten bis 1 Stunde. Nun konnte die Fluoreszenzmikroskopie der vitalen und toten Zellen durchgeführt werden.

2.3.3. Charakterisierung der superficial chondrocyte spatial organization von Chondrozyten in 300 µm Knorpel-Discs durch Calcein-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie zur Darstellung der verschiedenen Osteoarthritisstadien

Die Anfärbung der vitalen Zellen wurde wie in 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Die Mikroskopie erfolgte, wie in 2.3.4 beschrieben, jedoch ohne Aufnahme eines Mosaiks. Die Betrachtung der Knorpel-Discs erfolgte durch das Okular. Zur Anregung der Fluoreszenz von Calcein wurde die Halogen-Lampe und der Filter 38 HE GFP mit einer Wellenlänge von 470 nm verwendet. Im Folgenden wurde die SCSO durch das Okular beurteilt und auf einem Übersichtsblatt der 96er Well-Platte entsprechend notiert.

2.3.4. Fluoreszenzmikroskopie und Aufnahme von Mosaikaufnahmen zur Darstellung der jeweiligen Färbung

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit dem Mikroskop LSM 510 META Laser Scanning Mikroskop mit ApoTome und dem Computerprogramm AxioVision® durchgeführt. Die Anfärbung der Knorpel-Discs erfolgte je nach Verwendung mit der Calcein-Arbeitslösung (Herstellung siehe 2.3.1) oder der Live-Dead-Arbeitslösung (Herstellung siehe 2.3.2). Die Mikroskopie fand in einem abgedunkelten Raum statt, um eine Zerstörung der Fluoreszenzfarbstoffe zu verhindern. Die Aufnahme der gesamten Knorpel-Disc war eine Zusammensetzung (Mosaik) aus mehreren Einzelaufnahmen. Wichtig war,

dass zur Mikroskopie die ehemalige Gelenkfläche der Knorpel-Discs in der 96er Well-Platte nach unten in Richtung des Okulars lag. Die Mikroskopie wurde mit dem 10x Objektiv durchgeführt. Zur Darstellung der Calcein-Arbeitslösung wurde in „6D-Aquisition“ der grüne Kanal (Halogen-Lampe und der Filter 38 HE GFP mit einer Wellenlänge von 470 nm) ausgewählt, für die Live-Dead-Arbeitslösung der grüne (Halogen-Lampe und der Filter 38 HE GFP mit einer Wellenlänge von 470 nm) und der rote Kanal (Halogen-Lampe und der Filter 43 HE DsRed mit einer Wellenlänge von 590 nm). Die Voreinstellungen wurden als Vorlage gespeichert und konnten so für das jeweilige Experiment abgerufen werden. Die Knorpel-Discs wurden einzeln möglichst mittig mit dem Okular eingestellt und grob mit der Trimmung scharfgestellt. In „6D-Aquisition“ wurde unter „Mosaik“ und „Measure“ die Belichtungszeit in Millisekunden für den grünen und roten Kanal entsprechend der Fluoreszenz angepasst, um eine Überbelichtung zu vermeiden. Unter „MosaiX“ wurde die Größe der Mosaik-Sequenz eingestellt und die Mitte der Disc festgesetzt. Da die Aufnahme in drei Ebenen erfolgen sollte, wurde die Höhe der Knorpel-Disc ausgemessen. Dazu wurde die Mitte der Knorpel-Disc auf dem PC-Monitor mit einer Echtzeit-Aufnahme dargestellt, die ehemalige Gelenkfläche der Knorpel-Disc scharf eingestellt und die Z-Position in μm wurde notiert. Dann wurde die Schneidfläche der Knorpel-Disc eingestellt und auch hier die Z-Position in μm notiert. Mit Microsoft Excel erfolgte die Berechnung der Gesamthöhe der Knorpel-Disc und der mittleren Ebene. Die Aufnahme erfolge dann in den drei Ebenen, dazu wurde die Z-Position unter „Mosaik“, „MosaiX“, „Focus correction“ eingegeben und die Aufnahme gestartet. Um möglichst optimale Bedingungen zu erhalten, war es nötig, während der Aufnahme den Raum komplett abzudunkeln. Die Aufnahme wurde mit „Convert Title Image“, „Adjust overlapping areas“ nachbearbeitet, um die Kanten der einzelnen Aufnahmen zu glätten. Um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse gewährleisten zu können, wurden Helligkeit und Kontrast der Aufnahme immer linear eingestellt. Die Mosaik-Aufnahme wurde im Format einer .zvi-Datei gespeichert.

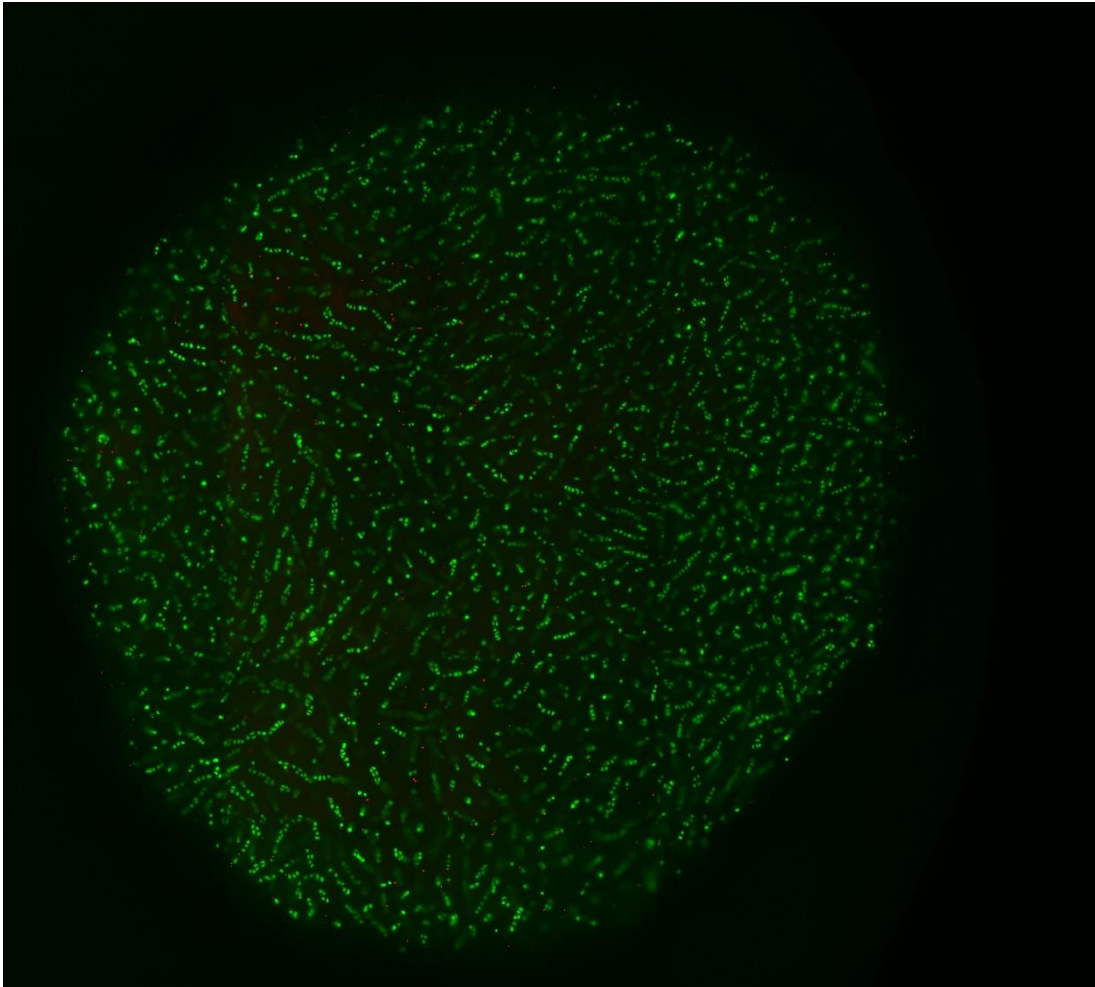


Abbildung 6: Beispielhafte Darstellung einer Fluoreszenzmikroskopie einer Knorpel-Disc mittels Live-Dead-Färbung. Die lebenden Zellen werden grün, die toten Zellen rot gefärbt dargestellt. Die Disc hat eine Stärke von 300 μm , einen Durchmesser von 4 mm und eine Fläche von 1 cm^2 . Abbildung aus eigener Aufnahme

2.4. Herstellung verschiedener Zellkulturen zur Inkubation von 300 μm Knorpel-Discs und anderer steriler Lösungen

2.4.1. Sterile Herstellung des Chondrozyten-Mediums zur Inkubation der 300 μm Knorpel-Discs

Als Grundmedium wurden 250 ml 1X DMEM high glucose pyruvate und 250 ml F-12 Nut Mix 1X + GlutaMAX genutzt. Unter sterilen Bedingungen (unter der Sterilbank) wurden 6ml Amphotericin B, 10ml Pen Strep), 50 ml Fetal calv serum (FCS) und 500 μl L-Ascorbic Acid Phosphate Magnesium Salt (Phosphitan) mithilfe von Stangenpipetten und dem Pipetus® hinzugegeben. Es

erfolgte die gute Durchmischung der Lösung. Die Lagerung fertigen, sterilen Mediums erfolgte bei 4 °C. Anwendungsgebiete waren die Inkubation von Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 über einen längeren Zeitraum, wie in 2.4.2, 2.4.4, 2.4.5, 2.5.2 und 2.6.6.

2.4.2. Sterile Herstellung einer Zellkultur zur Inkubation der 300µm Knorpel-Discs in Chondrozyten-Medium

Die Herstellung einer Zellkultur erfolgte unter sterilen Bedingungen unter der Sterilbank. Die Inkubation der 300µm Knorpel-Discs erfolgte in 96er Well-Platten mit Chondrozyten-Medium. Die Herstellung des Chondrozyten-Mediums erfolgte, wie in 2.4.1 beschrieben. Die Menge des Chondrozyten-Mediums war abhängig von der anzulegenden Zellkultur. Bei normalen Zellkulturen wurden 150 µl Chondrozyten-Medium pro Vertiefung der 96er Well-Platte verwendet, bei Injury-Versuchen wurden 200 µl Chondrozyten-Medium pro Vertiefung der 96er Well-Platte verwendet. Die Pipettierung erfolgte mit einer 200 µl Pipette und wurde immer auf den ersten Druckpunkt und mit jeweils einer frischen Pipettenspitze durchgeführt, um immer die exakt gleiche Menge Medium und die exakte Konzentration der Stoffe in jeder Vertiefung der 96er Well-Plate zu haben. Pro Vertiefung der 96er Well-Platte wurde mit einem Spatel jeweils eine 300 µm Knorpel-Disc zugegeben. Der Spatel wurde nach jeder Disc mit einem sterilen Tuch abgewischt, um keine Verschleppung von Konzentrationen oder Menge an Medium zu haben. Die 96er Well-Platte wurde unter der Sterilbank verschlossen und beschriftet. Die Inkubation erfolgte im Inkubator bei 37 °C. Die im Chondrozyten-Medium enthaltenen Nährstoffe reichten etwa für drei bis vier Tage, danach musste das Medium ausgetauscht werden. Bei Zellkulturen von drei bis vier Tagen Inkubationszeit konnte das Medium so belassen werden. Wichtig war, dass bei Kulturen über vier Tagen ein Medium-Wechsel erfolgen musste und standardisiert an Inkubationstag 4, also nach 96 Stunden, durchgeführt wurde.

2.4.3. Herstellung einer sterilen 0,1% Bovine Serum Albumin-Lösung

Mit einer Feinwaage wurde Albumin Faktor V abgewogen und in ein 50 ml BlueCap überführt. Unter der Sterilbank wurde die vorher berechnete Menge Phosphate-buffered Saline (PBS)-Lösung steril hinzugefügt.

Tabelle 8: Formel für die Berechnung der Menge an Albumin Faktor V und PBS-Lösung.

$\text{Konzentration in \%} = \frac{\text{g Substanz}}{100 \text{ ml Lösemittel}}$
$0,1 \% = \frac{0,1 \text{ g BSA}}{100 \text{ ml PBS}}$
$0,1 \% = \frac{100 \text{ mg BSA}}{100 \text{ ml PBS}}$
$0,1 \% = 1 \text{ mg/ml}$

Auf einem Tischrüttler wurde die Lösung für einige Minuten bei 1000 revolutions per minute (rpm) gemischt. Anschließend wurde die Bovine Serum Albumin (BSA)-Lösung in eine 20 ml Spritze überführt, ein Sterilfilter aufgesteckt und in ein frisches BlueCap sterilfiltriert. Vor dem Benutzen der Lösung sollte der Prozess der Sterilfiltration erneut durchgeführt werden, um eine mögliche Kontamination auszuschließen. Die Lagerung der sterilen BSA-Lösung erfolgte bei 4 °C.

2.4.4. Umgang mit CCN2

Für die Experimente wurde CCN2 der Firma Peprotech verwendet, in Form von Recombinant Human CTGF mit einem Molekulargewicht von 11,0 Kilodalton (kDa) und 97 Aminosäureresten. Die Aminosäuresequenz des verwendeten CCN2 war: GKKCIRTPKI SKPIKFELSG CTSMKTYRAK FCGVCTDGRC CTPHRTTTL PVEFKCPDGEV MKKNMMFIKT CACHYNCPGD NDIFESLYYR

KMYGDMA. Dies entsprach etwa dem CT-Modul des CCN2. Mature Human CTGF war ein sekretorisches Protein mit einem Molekulargewicht von 38,0 kDa und 323 Aminosäureresten. Das CCN2 wurde in lyophilisierter Form in einer Menge von 20 µg geliefert. Vor der Öffnung des Cups sollte das Pulver herunterzentrifugiert werden. Die Rekonstitution erfolgte mit doppelt destilliertem, autoklaviertem Wasser bis zu einer Konzentration von 1 mg/ml. Die weitere Verdünnung mit einer 0,1 % BSA-Lösung erfolgte bis zu einer Konzentration von 50 µg/ml. Die Lösung wurde in Eppendorf-Cups zu jeweils 15 µl aliquotiert und bei -70 °C gelagert. Repetitive Einfrier- und Auftau-Zyklen sollten vermieden werden. Ein einmal aufgetautes CCN2-Aliquot wurde nicht erneut verwendet.

2.4.5. Sterile Herstellung einer Zellkultur zur Inkubation der 300µm Knorpel-Discs in Chondrozyten-Medium mit Zugabe von CCN2

Die Herstellung der Zellkultur erfolgte steril unter der Sterilbank möglichst kurz vor Verwendung der Zellkultur. Das CCN2 in der Konzentration 50 µg/ml wurde unter der Sterilbank aufgetaut. Je nach Konzentration des CCN2 erfolgte die Berechnung der Menge an CCN2 und Chondrozyten-Medium, um auf eine Gesamtmenge von 200µl Inkubationsmedium pro Vertiefung der 96er Well-Platte zu kommen. Es wurden CCN2-Konzentrationen von 50 Nanogramm (ng)/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml und 200 ng/ml verwendet, jeweils berechnet auf eine Gesamtmenge des Inkubationsmediums von 200 µl. Die Pipettierung des CCN2 und des Chondrozyten-Mediums erfolgte mit Pipetten auf den ersten Druckpunkt und immer mit frischen Spitzen, um immer eine gleiche Menge und Konzentration der Stoffe in den Vertiefungen der 96er Well-Platte zu haben. Die 96er Well-Platte wurde mit Aluminium-Folie abgedeckt, um Lichteinflüsse auf das CCN2 zu vermeiden. Zur Anlage einer Zellkultur wurde pro Vertiefung der 96er Well-Platte jeweils eine 300 µm Knorpel-Disc mit einem Spatel hineingelegt. Der Spatel wurde nach jeder Disc mit einem sterilen Tuch abgewischt, um keine Verschleppung von Konzentrationen oder Menge an Medium zu haben. Die 96er Well-Platte wurde unter der Sterilbank verschlossen und beschriftet. Die Inkubation erfolgte in einem Inkubator bei 37

°C für die vorgesehene Inkubationszeit. Bei CCN2 sollte kein Medium-Wechsel erfolgen, um keine Veränderung von Konzentrationen durch Anhaftung und damit Addition zu erhalten. Deshalb war eine Kultur bis maximal vier Tage möglich, da bei weiterer Inkubation an Tag 4 standardmäßig ein Wechsel des Mediums erfolgte. Die Inkubation mit der Zellkulturen mit CCN2 fand standardisiert für einen, drei und vier Tage, also 24, 72 und 96 Stunden statt. Ein Wechsel des Mediums war bei dieser Inkubationszeit nicht notwendig.

2.5. Ausübung des Injury-Kompressionsmodells auf 300 µm Knorpel-Discs mit Ausübung eines biomechanischen Traumas auf den Knorpel im frühen Osteoarthritis-Stadium zur Simulation der Progression der primären Osteoarthritis

2.5.1. Auswahl der 300 µm Knorpel-Discs für die Injury- beziehungsweise Kontrollgruppe

Die Herstellung der 300 µm Knorpel-Discs erfolgte, wie in 2.2.2 beschrieben. Für einige Versuche wurde bei der Herstellung makroskopisch guter Knorpel ausgewählt, wie in 2.2.2 beschrieben. Für weitere Versuche erfolgte am Tag der Herstellung der 300 µm Knorpel-Discs die Anfärbung mit Calcein und Charakterisierung unter dem Fluoreszenzmikroskop wie in 2.3.1 und 2.3.3 beschrieben. Die 300 µm Knorpel-Discs wurden bis zum nächsten Tag in 150 µl beziehungsweise 200 µl Chondrozytenmedium in einer Zellkultur bei 37 °C inkubiert. Der Ablauf einer Zellkultur erfolgte, wie in 2.4.2 beschrieben.

2.5.2. Injury-Kompressionsmodell

Unter der Sterilbank wurde eine neue 96er Well-Platte für die Versuchsgruppen vorbereitet. Das Inkubationsmedium wurde entsprechend der Versuchsgruppen pipettiert. Bei Gruppen mit normalem Chondrozyten-Medium erfolgte die Anlage der Zellkultur wie in 2.4.2 beschrieben. Bei Gruppen mit CCN2 entsprechend wie in 2.4.5 beschrieben. Die sterile Ladekammer wurde mit Chondrozyten-Medium befeuchtet und die Höhe der Kammer wurde mit der Injury-Maschine ausgemessen und auf den Wert 0 gestellt. Danach wurde die 300 µm Knorpel-

Disc mit der Gelenkfläche nach oben in die sterile Ladekammer überführt und es fand in der Injury-Maschine das Injury-Modell statt. Dabei wurde die Knorpel-Disc-Höhe genau ausgemessen und die Disc um einen Prozentsatz der Ausgangshöhe komprimiert, in unseren Experimenten um 50 % und 65 % der Ausgangshöhe. Im Anschluss an das Injury-Modell wurde die Knorpel-Disc mit der Gelenkfläche nach oben in die der Versuchsgruppe entsprechende Vertiefung der vorbereiteten 96er Well-Platte überführt. Die Kontroll-Discs ohne Injury-Modell wurden ebenfalls in der für sie vorgesehenen Vertiefung der Well-Platte platziert. Die 300 µm Knorpel-Discs wurden im Anschluss für die vorgesehene Inkubationszeit in einem Inkubator bei 37 °C mit Medium mit und ohne CCN2 inkubiert. Der Ablauf einer Zellkultur erfolgte, wie in 2.4.2 beziehungsweise 2.4.5 beschrieben.

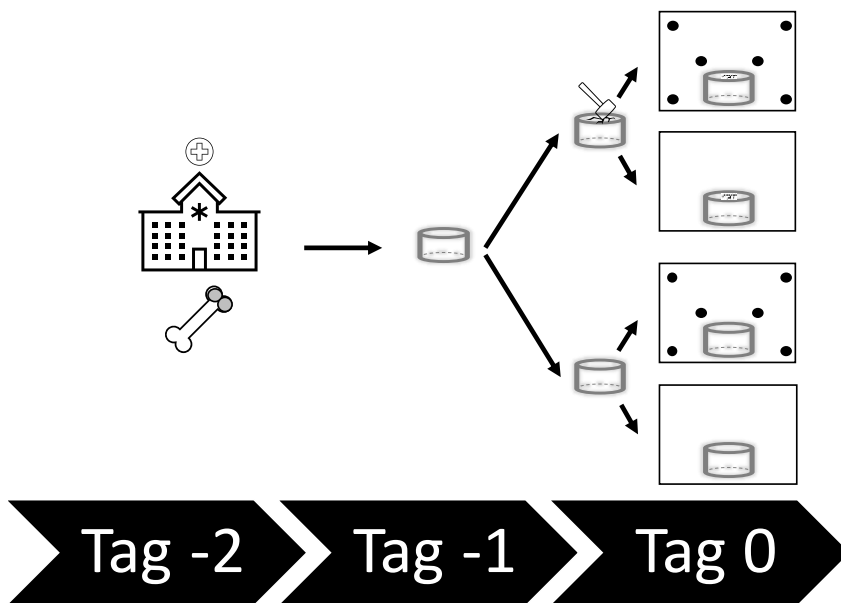


Abbildung 7: Workflow des Injury-Kompressionsmodells. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Eigene Abbildung.

Nach der entsprechenden Inkubationszeit wurde die Zellzahl der lebenden und toten Chondrozyten der Versuchs- und Kontrollgruppen mit und ohne Injury sowie mit und ohne CCN2 mittels Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie bestimmt, wie in 2.3.2 und 2.3.4 beschrieben.

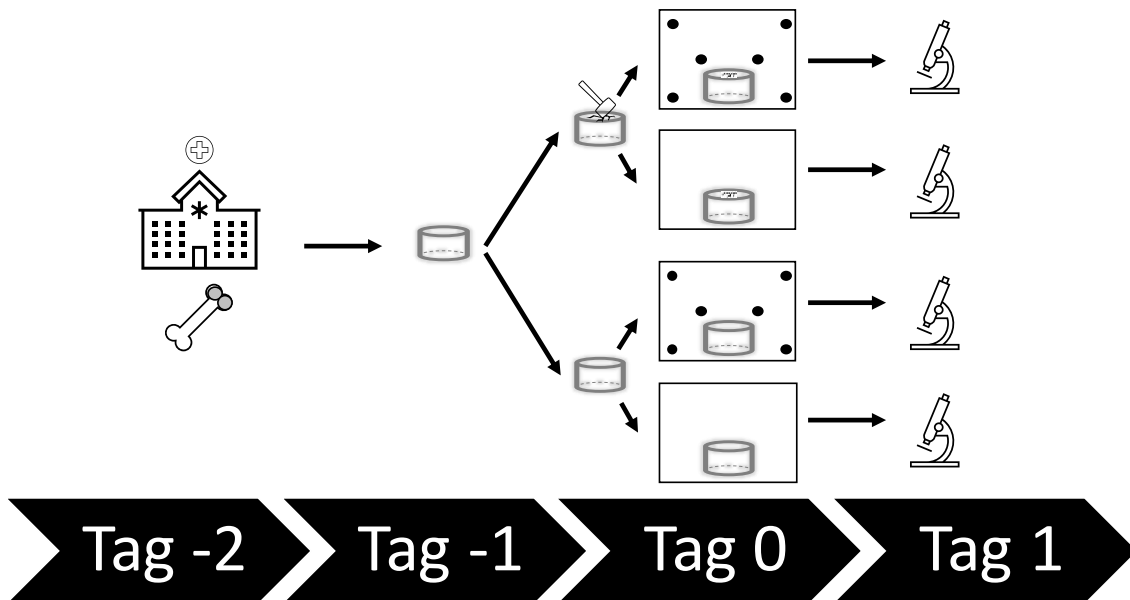


Abbildung 8: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden die Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Eigene Abbildung.

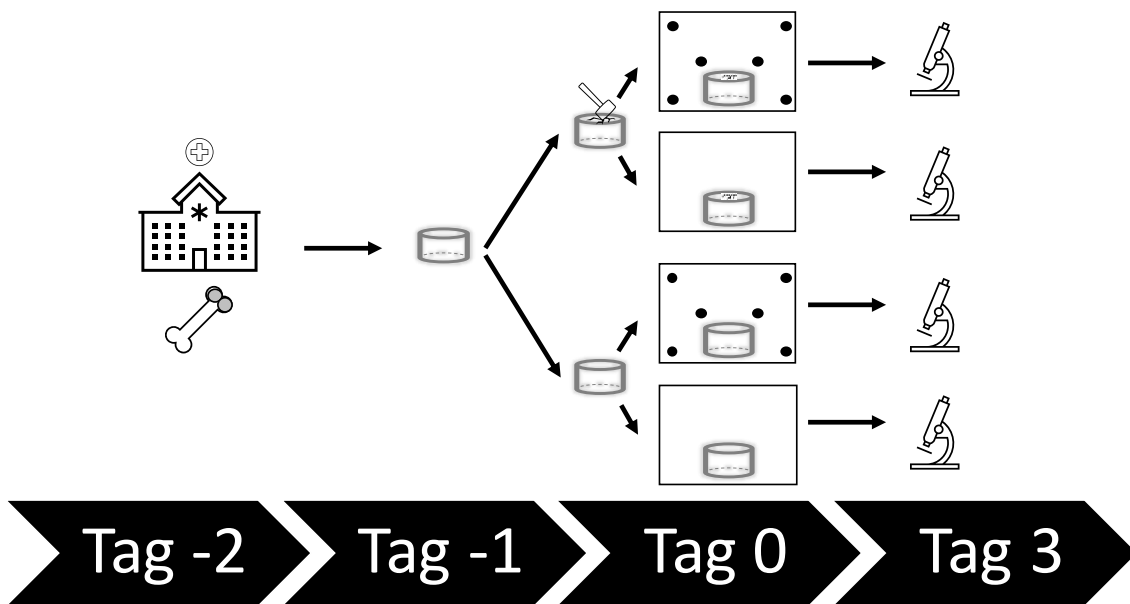


Abbildung 9: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit einer Inkubationszeit von 72 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden die Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Eigene Abbildung.

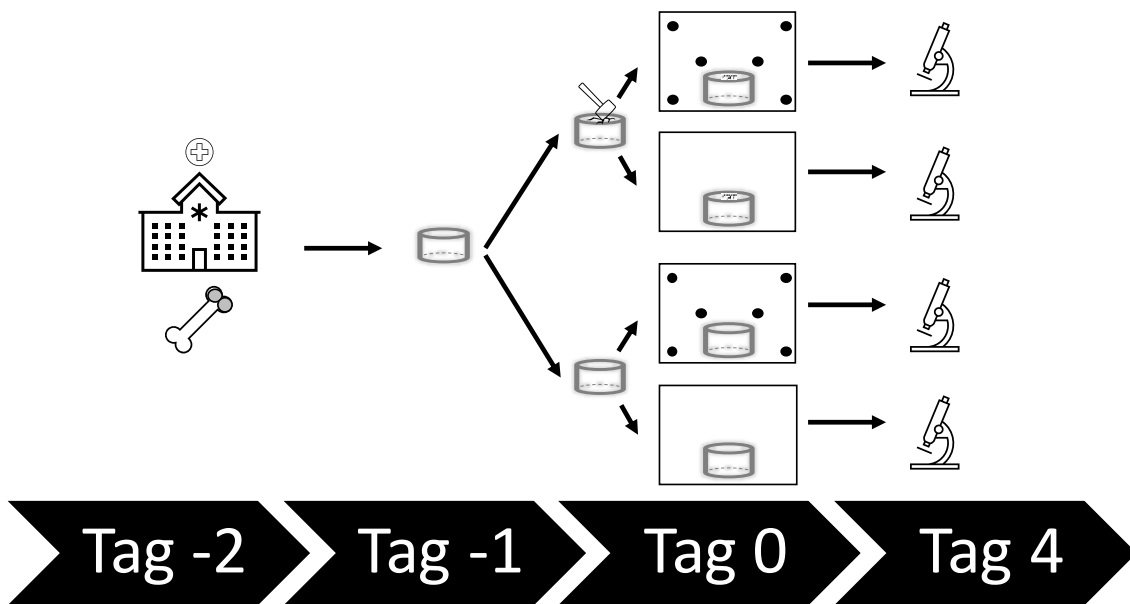


Abbildung 10: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie mit einer Inkubationszeit von 96 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 96 Stunden Inkubationszeit wurden die Live-Dead-Färbung und Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Eigene Abbildung.

In anderen Versuchsansätzen wurde nach der entsprechenden Inkubationszeit der Verlust an Glykosaminoglykanen aus den Knorpel-Discs in das Kulturmedium der Versuchs- und Kontrollgruppen mit und ohne Injury sowie mit und ohne CCN2 mittels 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay bestimmt, wie in 2.6.4, 2.6.5 und 2.6.6 beschrieben.

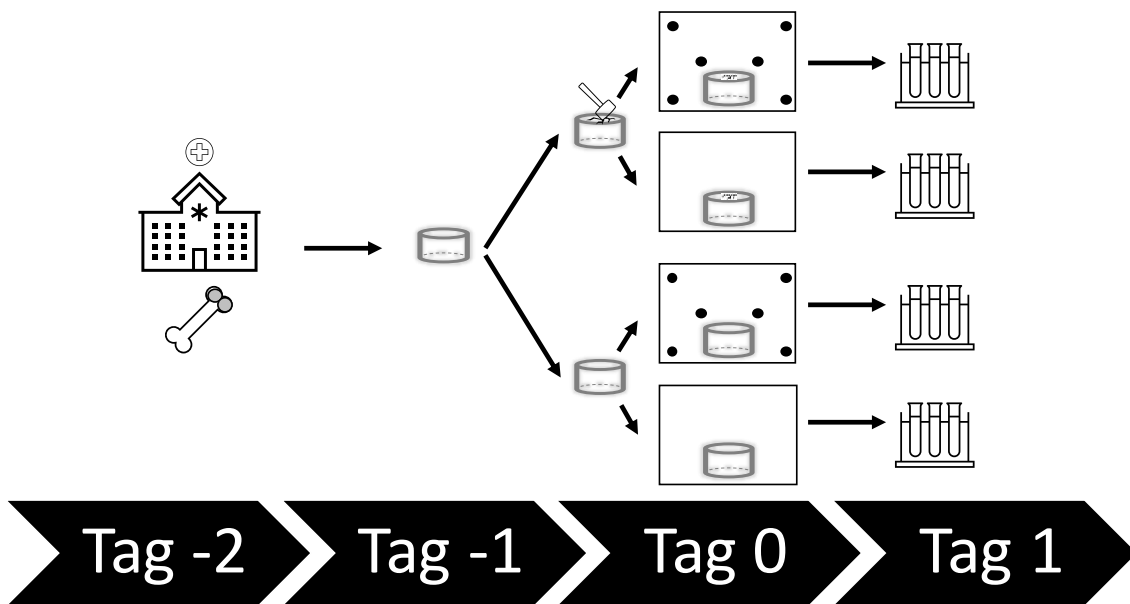


Abbildung 11: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay mit einer Inkubationszeit von 24 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 24 Stunden Inkubationszeit wurden das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay durchgeführt. Eigene Abbildung.

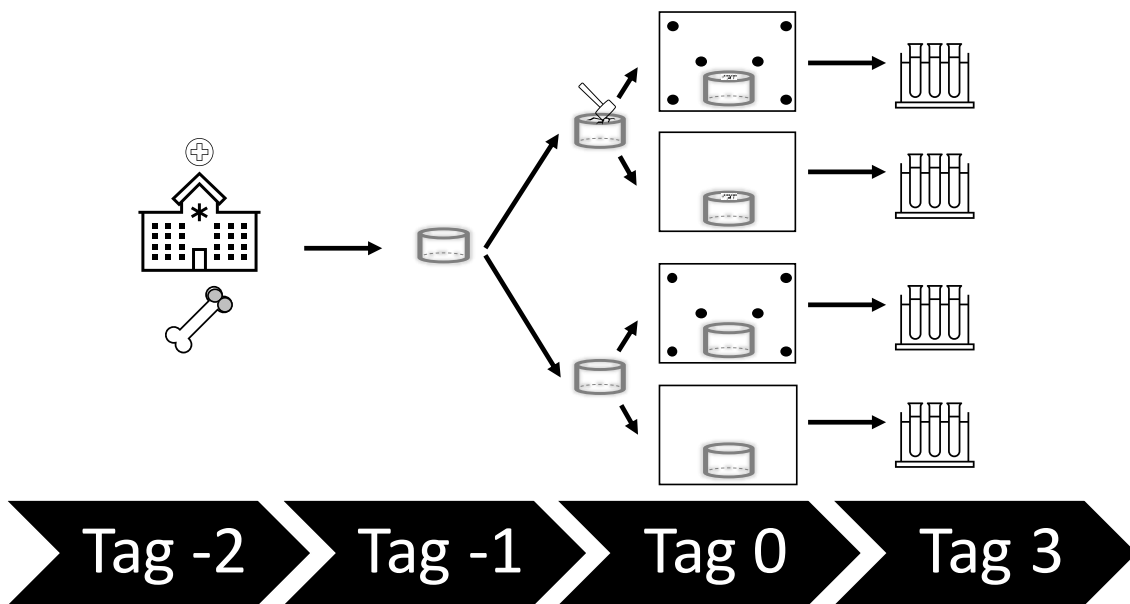


Abbildung 12: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay mit einer Inkubationszeit von 72 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 72 Stunden Inkubationszeit wurden das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay durchgeführt. Eigene Abbildung.

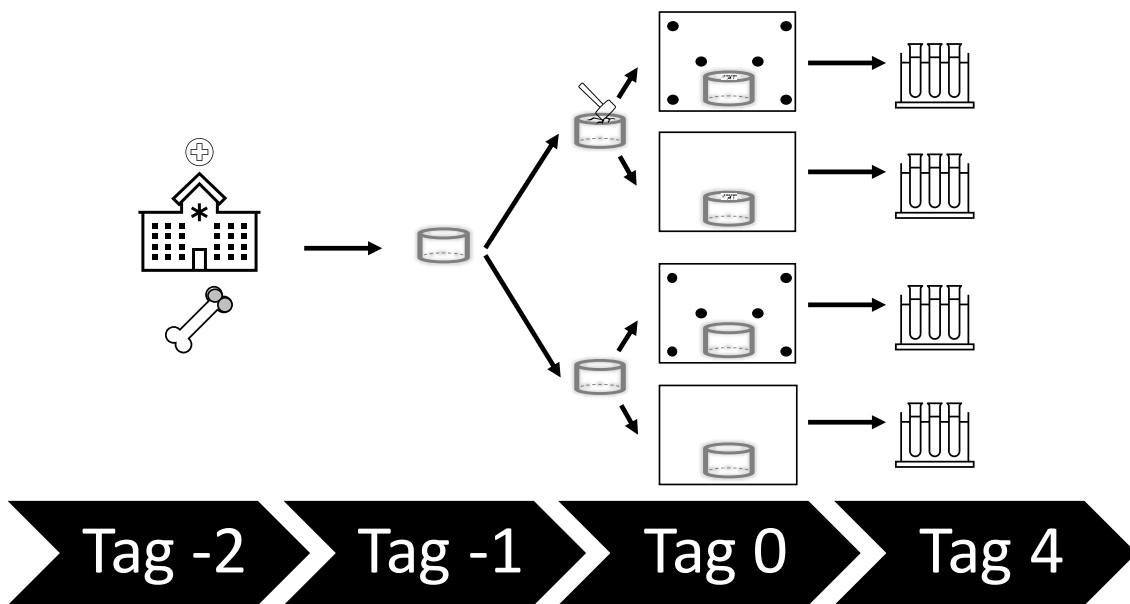


Abbildung 13: Workflow des Injury-Kompressionsmodells für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay mit einer Inkubationszeit von 96 Stunden. An Tag -2 werden die Knorpelproben (Knorpel grau dargestellt) nach der Operation aus den Kliniken abgeholt und bei 4 °C gelagert. An Tag -1 werden die Knorpel-Discs hergestellt und für 24 Stunden inkubiert. An Tag 0 werden die Knorpel-Discs der Kompression (Hammer) ausgesetzt beziehungsweise in die Kontrollgruppen verteilt, jeweils mit normalem Medium (Kasten ohne Punkte) oder Medium mit CCN2 (Kasten mit Punkte). Discs nach Injury sind für die Inkubation mit veränderter, Discs der Kontrollgruppe mit glatter Oberfläche dargestellt. Nach 96 Stunden Inkubationszeit wurden das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) Assay durchgeführt. Eigene Abbildung.

2.5.3. Auswertung der Zellzahl der Live-Dead-Färbung in den Mosaikaufnahmen mit Fiji is just ImageJ

Die Zellzahl der Live-Dead-Färbung in der Mosaikaufnahme wurde mit dem Computerprogramm Fiji is just ImageJ bestimmt. Die jeweilige Mosaikaufnahme als .zvi-Datei wurde im Programm geöffnet und es wurde die Größe des Bildes in Fiji is just ImageJ konfiguriert. Dazu wurde über „Analyse“ und „Set Scale“ überprüft, ob die Bildgröße mit den Einstellungen des Mikroskops übereinstimmte. 1 Pixel sollte 0,65 µm entsprechen und somit entsprach 1 µm 1,5385 Pixeln. Bei „Global“ musste ein Häkchen gesetzt werden. Dann mussten die beiden Farbkanäle der Mosaikaufnahme in jeweils ein Einzelbild überführt

werden, um die mit Calcein gefärbten lebenden Zellen und die mit Propitium Iodid gefärbten toten Zellen in jeweils einem Einzelbild zu erhalten. Dazu musste man über „Image“ auf „Stacks“ und dann „Stack to Images“ gehen. Beide Bilder mussten nun von einem 16 Bit Farbraum in einen 8 Bit Farbraum konvertiert werden. Dies war über „Image“, „Type“ und „8-bit“ möglich. Um die inhomogene Anfärbung zu kompensieren, wurden die Einzelbilder mit einem Weichzeichnungsfilter über „Process“, „Filters“, „Gaussian blur“ und einem „Sigma Radius“ von 2.00 nachbearbeitet. Nun musste noch die Empfindlichkeit eingestellt werden. Unter „Process“ und „Find maxima“ konnte ein ganzzahliger Wert für die „Noise tolerance“ eingestellt werden. Unter dem Button „Output type“ konnte „Point selection“ ausgewählt werden und der Wert der „Noise tolerance“ kontrolliert werden. Es sollten möglichst alle Chondrozyten mit Kreuzen erfasst werden, ohne nicht vorhandene Chondrozyten zu erfassen. Dementsprechend wurde ein Wert für die „Noise tolerance“ zwischen 1 und 7 ausgewählt. Dann wurde unter „Output type“ „Single Points“ ausgewählt und die gefundenen Maxima (und damit Zellen) wurden in einem neuen Bild als Pixel an der jeweiligen Zellposition dargestellt. Über „Analyze“, „Tools“ und „Save XY Coordinates“ wurde eine Liste mit den X- und Y-Koordinaten der Zellen erstellt und die Gesamtzahl der Zellen ausgegeben. Die Gesamtzahl der lebenden und toten Zellen wurden in ein Excel-Sheet zur Auswertung übertragen, die Gesamtzahl der Zellen berechnet und die Anteile der lebenden und toten Chondrozyten in Prozent angegeben.

2.6. 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay zum Nachweis und zur Quantifizierung des Verlusts an Glykosaminoglykanen von 300 µm Knorpel-Discs in das Kulturmedium

2.6.1. Herstellung der 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Färbelösung

Die Herstellung der 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) (DMMB) -Färbelösung erfolgte im Dunklen, da der DMMB-Farbstoff sehr lichtempfindlich ist.

Tabelle 9: Mengenkalkulation für 500 ml DMMB-Färbelösung

DMB Cl (MW 347.9 – 46 μ M)	8 mg
100 % Ethanol	4 ml
NaCl (MW 58.44 – 40.6 mM)	1,183 g
Glycin (MW 75.1 – 40.5 mM)	1,52 g
Natriumazid (NaN_3)	0,1 g
Alternativ: 10 %e Natriumazid-Lösung (NaN_3)	1 ml
1 N HCl (= 1 M)	4,35 ml
Deionisiertes Wasser (DW) (95% des Totalvolumens)	475 ml
Gesamtvolumen	500 ml

In ein 50 ml BlueCap wurden 4 ml Ethanol 100 % pipettiert. Mit einer Feinwaage wurden 8 mg 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue) (DMB Cl) abgewogen und zu den 4 ml Ethanol 100% dazugegeben. Das BlueCap wurde mit Aluminiumfolie umwickelt, um für einen Lichtschutz zu sorgen und über Nacht 4 bis 16 Stunden bei Raumtemperatur auf einem Tischrüttler mit 1000 rpm gemischt. Nach den 4 bis 16 Stunden wurden unter der Sterilbank 450 ml des deionisierten Wassers (DW) abgemessen und in eine autoklavierte 500 ml Flasche überführt. Die Flasche

mit den 450 ml DW wurde unter einen Abzug gebracht und auf einen Magnetrührer mit einem Rührfisch durchmischt. Während des Rührvorgangs erfolgte die Zugabe von 1,183 Gramm (g) Natriumchlorid (NaCl) mit einem Molekulargewicht (MW) von 58.44 – 40.6 Millimolar (mM), 1,52 g Glycin (MW 75.1 – 40.5 mM) und 1 ml 10 % Natriumazid-Lösung (NaN₃). Der Inhalt des BlueCap mit dem in Ethanol gelöste DMB Cl wurde hinzugegeben. Unter der Sterilbank wurden 20 ml DW abgemessen, um das BlueCap vollständig auszuspülen und ebenfalls zur Lösung hinzugegeben. Zur Lösung wurden 4,35 ml 1 Normalität (N) HCl (= 1 Molar (M)) hinzugefügt. Mit einem pH-Meter wurde der pH-Wert bestimmt und bei einem pH > 3 wurde mit 1 N HCl bis zu einem pH von 3 titriert. Die Lösung wurde in einen 1000 ml Messzylinder überführt und auf 500 ml mit DW aufgefüllt. Der pH-Wert wurde erneut mit einem pH-Meter gemessen. Die Lösung wurde über ein Filtrierpapier in eine mit Aluminiumfolie umwickelten 500ml Glasflasche überführt. Das Ablaufdatum der Lösung betrug 3 Monate ab Herstellung der Lösung. Die Lösung wurde im Dunklen bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.2. Herstellung des Chondroitinsulfat-Standards

4 mg Shark Chondroitin Sulfat Sodium wurden in 32 ml doppelt destilliertem Wasser gelöst. Die Konzentration dieses Grundstocks betrug 125 µg/ml. Die Konzentration der einzelnen Standard-Lösungen sollte 0 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml und 125 µg/ml betragen. Entsprechend erfolgte die Verdünnung des Grundstandards mit doppelt destilliertem Wasser auf 10ml Gesamtlösung in 10ml BlueCaps. Die BlueCaps mit den unterschiedlichen Standard-Konzentrationen wurden bei -20 °C gelagert. Die nachfolgende Tabelle gibt eine Übersicht über die Verdünnung.

Tabelle 10: Übersicht über die verschiedenen Konzentrationen des Chondroitinsulfat-Standards. Angegeben ist die Menge des Grundstandards in ml (Konzentration 125 µg/ml), die Menge an destilliertem Wasser in ml und die Konzentration an GAG der jeweiligen Verdünnung.

	I	II	III	IV	V	VI
Grundstandard [ml]	0	2	4	6	8	10
Destilliertes Wasser [ml]	10	8	6	4	2	0
GAG-Konzentration des Standards [µg/ml]	0	25	50	75	100	125

2.6.3. Herstellung der Proteinase-K-Lösung mit einer Konzentration von 5000 µg/ml

Zum Herstellen der Proteinase-K-Lösung wurde Proteinase K mit einer Grundkonzentration von 20 mg/ml und einem Temperaturoptimum von 65 °C (laut Hersteller) verwendet. Zur Ermittlung der optimalen Konzentration der Proteinase K zum Verdau der Discs wurde Vorversuche mit Proteinase-K-Konzentrationen von 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2500 µg/ml und 5000 µg/ml und verschiedenen Volumina der Proteinase-K-Lösung (200 µl, 400 µl, 600 µl) bei konstanter Konzentration von 500 µg/ml durchgeführt. Zum Verdau der humanen 300 µm Knorpel-Discs wurde pro Knorpel-Disc 200 µl Proteinase-K-Lösung mit einer Proteinase-K-Konzentration von 5000 µg/ml genutzt. Die 200 µl Proteinase-K-Lösung pro 300 µm Knorpel-Disc wurden mit 50 µl Proteinase K und 150 µl DMEM high glucose pyruvate hergestellt.

Tabelle 11: Mengenkalkulation der Proteinase-K-Lösung für n Knorpel-Discs.

Proteinase K (20,0 mg/ml)	50 μ l · n
DMEM	150 μ l · n
Gesamtvolumen	200 μ l · n

2.6.4. Isolation der Glykosaminoglykane aus dem Inkubationsmedium durch Schockfrieren und Lyophilisieren

Das Inkubationsmedium wurde nach der vorgegebenen Inkubationszeit in jeweils ein frisches Eppendorf-Cup abpipettiert und dann in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C. Die Lyophilisierung erfolgte mit einer Vakuumzentrifuge. Dazu wurden die Eppendorf-Cups mit dem gefrorenen Medium geöffnet und in der Vakuumzentrifuge für dreieinhalb Stunden zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Proben mit 160 μ l DMEM high glucose pyruvate rekonstituiert und wieder bei -70 °C gelagert.

2.6.5. Verdau der Discs in der Proteinase-K-Lösung mit einer Konzentration von 5000 μ g/ml

Die 300 μ m Knorpel-Discs wurden nach der vorgegebenen Inkubationszeit jeweils in ein Eppendorf-Cup mit 200 μ l Proteinase-K-Lösung überführt (Herstellung der Proteinase-K-Lösung siehe 0) und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Im Anschluss wurden sie bei -70 °C gelagert. Zur Ermittlung der optimalen Temperatur und rpm-Einstellung zum Verdau der Discs wurden Vorversuche mit Temperaturen von 55 °C, 52 °C und 60 °C und rpm-Einstellungen von 400 rpm, 500 rpm, 800 rpm, 850 rpm und 1000 rpm durchgeführt. Der Verdau der 300 μ m Knorpel-Discs erfolgte in einem Thermomixer bei 60 °C für 72 Stunden bei 850 rpm. Im Anschluss an den Verdau wurden der Lösung 400 μ l DMEM high glucose pyruvate hinzugefügt

und sie wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70 °C.

2.6.6. Durchführung des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay

Der Chondroitinsulfat-Standard (Herstellung siehe 2.6.2) wurde in die ersten beiden Spalten der 96er Well-Platte in aufsteigender Konzentration (in µg/ml) nach folgendem Schema pipettiert.

Tabelle 12: Pipettierschema des Chondroitinsulfat-Standards auf der 96er Well-Platte. Angegeben sind die Position in x-Richtung (Zahl 1 bis 12) und in y-Richtung (Buchstabe A bis B) und die Konzentration des Chondroitinsulfat-Standards in der Einheit µg/ml.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0	0	25	25	50	50	75	75	100	100	125	125
B	0	0	25	25	50	50	75	75	100	100	125	125

Jede Probe wurde jeweils zweimal gemessen. Dazu wurden 40 µl der Lösung in jeweils zwei Vertiefungen direkt untereinander pipettiert. Da die DMMB-Färbelösung lichtempfindlich ist, wurde die Pipettierung der Färbelösung und die Messung im Dunklen durchgeführt. Es wurden zu den 40 µl Chondroitinsulfat-Standard sowie den 40 µl Lösung der verdauten Disc beziehungsweise der Lösung des rekonstituierten Mediums jeweils 360 µl der DMMB-Färbelösung in die Vertiefung der Well-Platte hinzugegeben. Die Messung wurde mit dem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 515 nm und der Software Gen5 Data Analysis Software auf einem Computer mit dem Betriebssystem Windows 2000® durchgeführt. Die Messwerte wurden in ein Excel-Sheet übertragen und ausgewertet. Das Ergebnis in Mikrogramm GAG wurde auf das Gesamtvolumen und damit die Gesamtmenge an GAG hochgerechnet. Bei Messwerten mit einer optischen Dichte (OD) über 0,58 wurde eine weitere Verdünnung durchgeführt und das Ergebnis entsprechend auf das Gesamtvolumen mit Berücksichtigung der Verdünnung hochgerechnet.

Als Referenz diente die Standard-Kurve, die mithilfe des Chondroitinsulfat-Standards berechnet wurde.

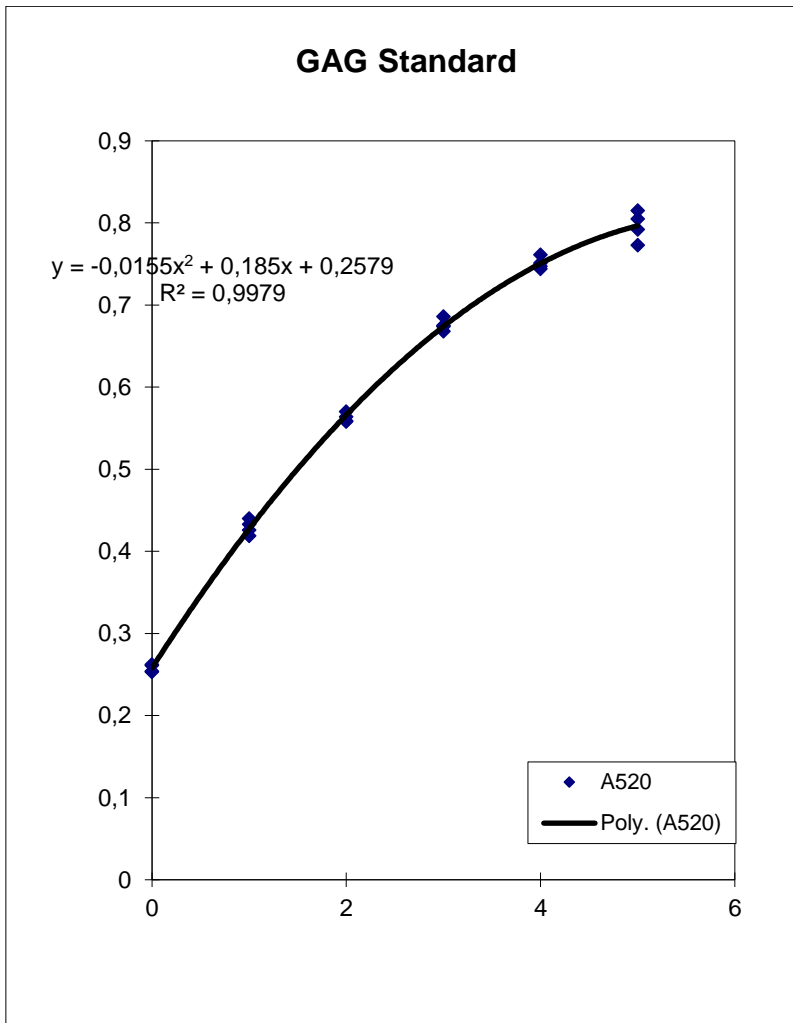


Abbildung 14: Beispielhafte Darstellung einer Referenzstandardkurve aus dem Chondroitinsulfat-Standard, erstellt am 13.09.2016. In x-Richtung ist die Menge an GAG in µg aufgetragen, in y-Richtung die OD.

2.6.7. Statistische Auswertung der Live-Dead-Assays sowie der 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Alle erhobenen Daten, die Zellzahlen, Anteile lebender und toter Zellen, Menge an GAG, Mittelwerte, Standardabweichungen und Standardfehler wurden mit Microsoft Excel 2016 und Excel aus Microsoft 365 berechnet, die Grafiken mit Microsoft Excel 2016 und Excel aus Microsoft 365 dargestellt. Die Live-Dead-Assays sowie die DMMB-Assays wurden mit dem Statistik-Programm Sigma Plot in Version 12.0 ausgewertet. Mittels Shapiro-Wilk-Test wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Bei Normalverteilung wurde ANOVA, bei nicht-normalverteilten Daten ANOVA on Ranks (Kruskal-Wallis One way Analysis of Variance on Ranks) angewandt und untersucht, ob eine statistische Signifikanz anzunehmen war. Bei statistischer Signifikanz wurden als Post Hoc Test der Dunn's Test sowie die Holm-Sidak-Methode angewandt. Zur weiteren Überprüfung wurden teilweise ergänzend t-Tests zum Vergleich zweier individueller Datengruppen angewandt. Mittels Shapiro-Wilk-Test wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft. Bei normalverteilten Daten wurde dazu ein Equal-variance-Test, bei nicht-normalverteilten Daten ein Mann-Whitney-Rank-Sum-Test durchgeführt. Auch hier war das Signifikanzniveau $p < 0,05$.

3. Ergebnisse

3.1. Generation optimierter Kniegelenkpräparate zur Analyse des pharmakologischen Arthrosehemmstoffs CCN2

3.1.1. Übersicht über das Patientenkollektiv zur Generierung von 300 µm Knorpel-Discs

Wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben bestand das Kollektiv zur Gewinnung von humanem Gelenkknorpel aus für die wissenschaftliche Verwendung des Materials aufgeklärten Patienten mit der Erkrankung Gonarthrose und Indikation zur Implantation einer Totalendoprothese des Knies. So wurden bei insgesamt 66 Patienten Knorpelproben entnommen, darunter 34 Frauen (51,52 %) und 32 Männer (48,48 %). Insgesamt wurden 19 dieser Probenentnahmen in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen (28,79 %) und 47 in der Winghofer Medicum Chirurgische Fachklinik in Rottenburg (71,21 %) durchgeführt. Die Patienten waren zwischen 50 und 88 Jahre alt, das Durchschnittsalter zum Zeitpunkt der Operation lag bei 66,06 Jahren. Es wurden insgesamt 33 Totalendoprothesen auf der rechten Seite (50 %) implantiert, davon 18 bei Frauen (27,27 %) und 15 bei Männern (22,73 %) und 33 Totalendoprothesen auf der linken Seite (50%), davon 16 bei Frauen (24,24 %) und 17 bei Männern (25,76 %). Ausgeschlossen wurden Patienten mit immunologischen und neoplastischen Vorerkrankungen und Patienten nach Kniegelenkstrauma beziehungsweise mit rheumatischen Vorerkrankungen.

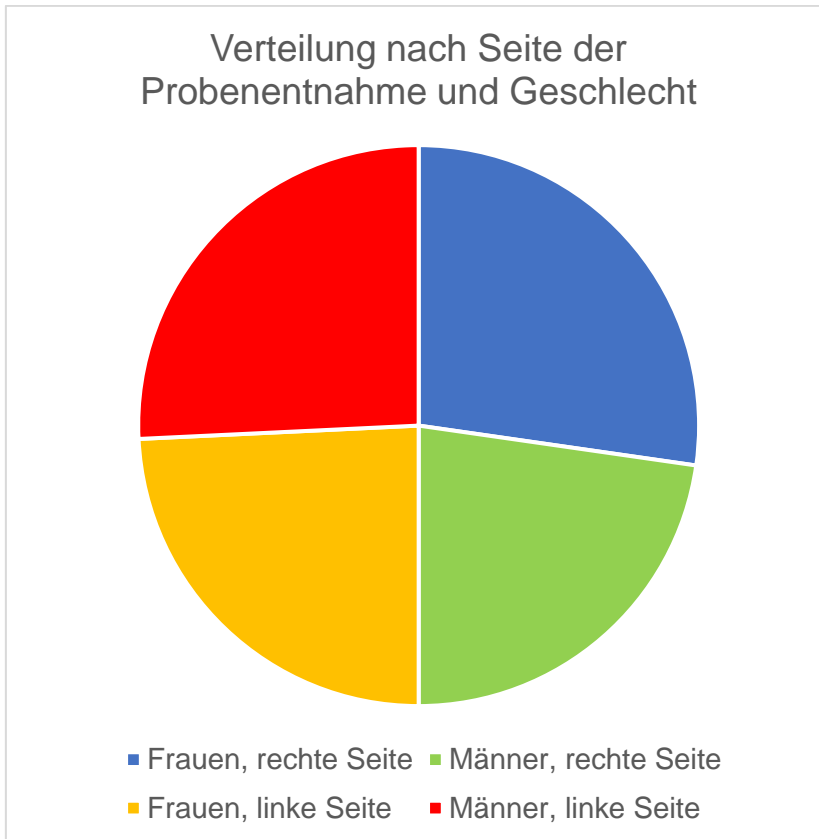


Abbildung 15: Darstellung der Verteilung des Patientenkollektivs nach Seite der Probenentnahme und Geschlecht.

Auf diese Weise wurden insgesamt 1149 Knorpel-Discs mit jeweils 300 µm Dicke hergestellt und für die Experimente genutzt. Die Verteilung der Probengewinnung nach Geschlecht und auf die jeweilige Seite war insgesamt sehr homogen.

3.2. Verbesserung des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays zum Nachweis von Glykosaminoglykanen in Knorpel-Discs

3.2.1. Ermittlung des optimalen Bereichs der Standardkurve für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Zur Ermittlung des optimalen Bereichs der Standardkurve des DMMB-Assays wurde der Chondroitinsulfat-Standard, wie in 2.6.2 beschrieben, hergestellt und mehrere Messungen der OD des hergestellten Standards, wie in 2.6.6 beschrieben, durchgeführt. Der Standard diente zur Berechnung der Menge an GAG aus der OD der Proben. Aus diesem Grund sollte die Messung in einem Bereich der Standardkurve durchgeführt werden, die möglichst linear verläuft, um eine Überschätzung der Menge an GAG zu vermeiden. Insgesamt wurden 3 verschiedene Standard-Ansätze hergestellt und diese mehrfach gemessen.

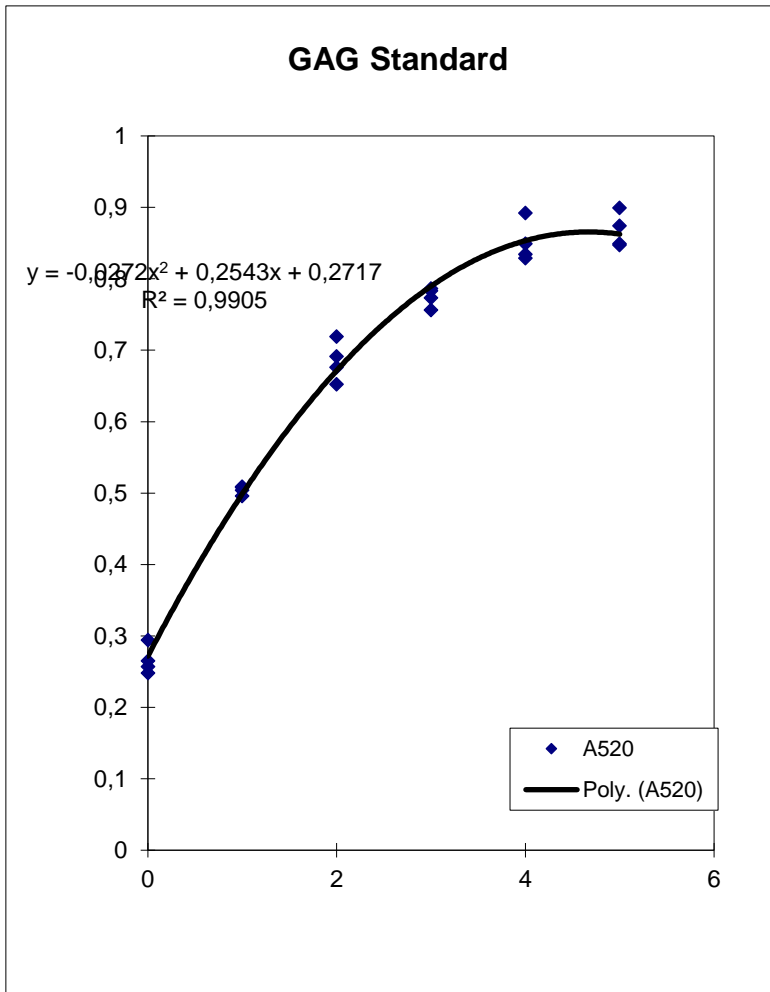


Abbildung 16: Darstellung einer Referenzstandardkurve aus dem Chondroitinsulfat-Standard, hergestellt am 28.04.2016, Messung am 03.05.2016. In x-Richtung ist die Menge an GAG in μg aufgetragen, in y-Richtung die OD. Man erkennt die anfangs annähernd linear verlaufende Kurve, die ab einer OD von mehr als 0,58 immer stärkere abflacht und so bei hohen OD-Werten zu einer Überschätzung der enthaltenen Menge an GAG führen würde.

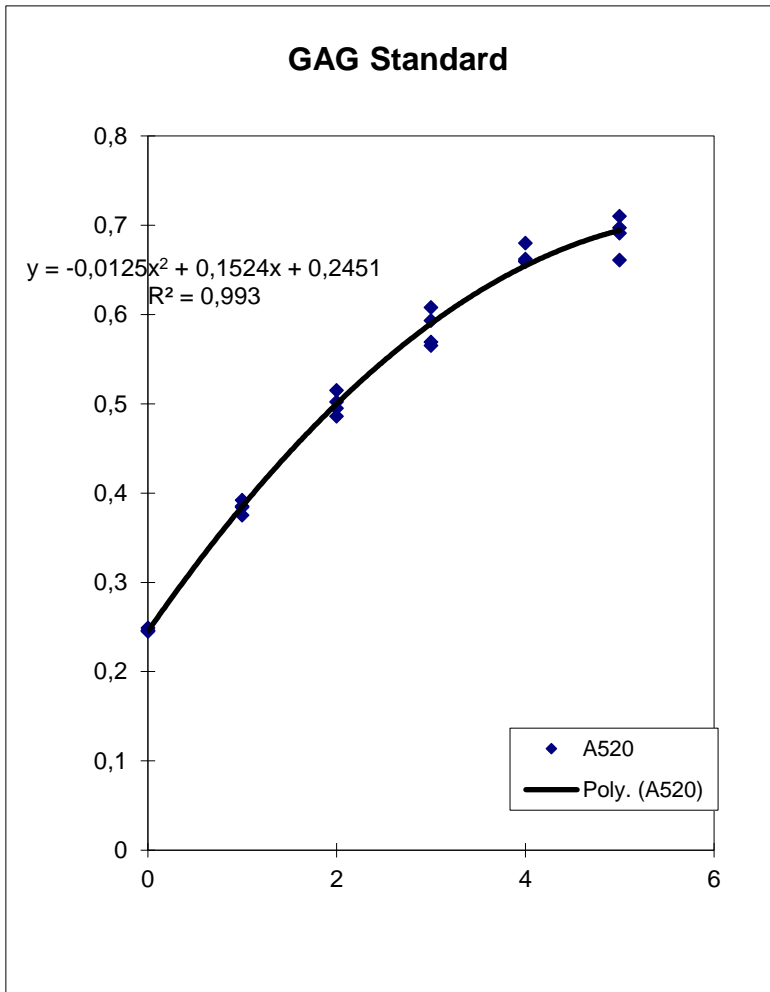


Abbildung 17: Darstellung einer Referenzstandardkurve aus dem Chondroitinsulfat-Standard, hergestellt am 31.05.2016, Messung am 31.05.2016. In x-Richtung ist die Menge an GAG in µg aufgetragen, in y-Richtung die OD. Man erkennt die anfangs annähernd linear verlaufende Kurve, die ab einer OD von mehr als 0,58 immer stärkere abflacht und so bei hohen OD-Werten zu einer Überschätzung der enthaltenen Menge an GAG führen würde.

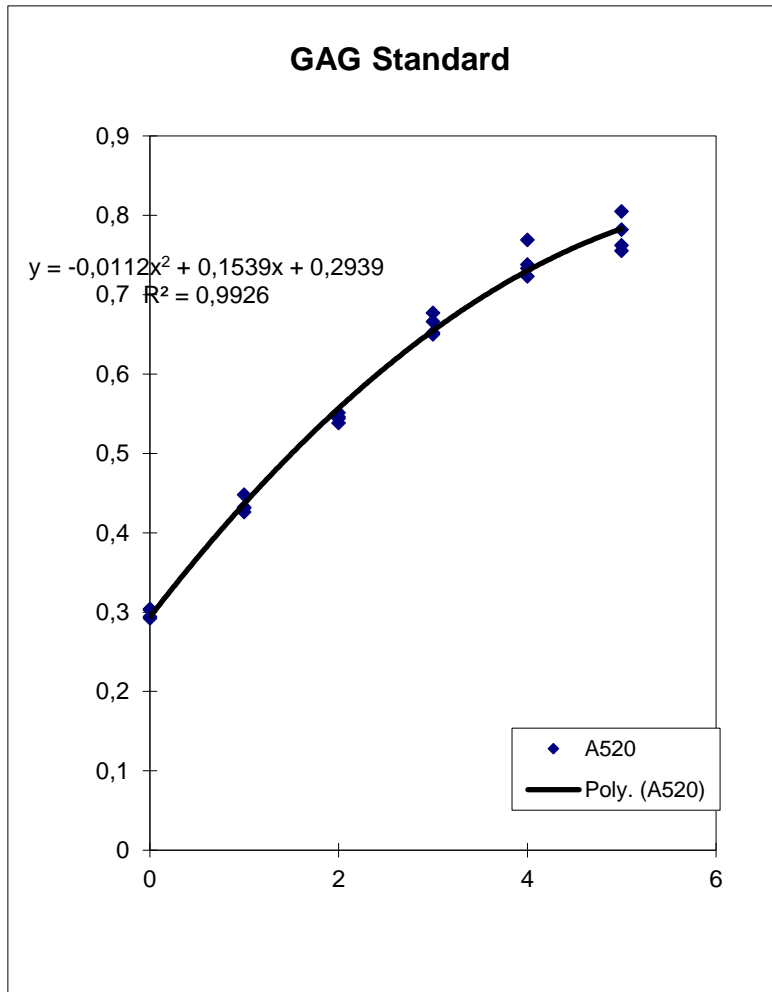


Abbildung 18: Darstellung einer Referenzstandardkurve aus dem Chondroitinsulfat-Standard, hergestellt am 02.06.2016, Messung am 03.06.2016. In x-Richtung ist die Menge an GAG in μg aufgetragen, in y-Richtung die OD. Man erkennt die anfangs annähernd linear verlaufende Kurve, die ab einer OD von mehr als 0,58 immer stärkere abflacht und so bei hohen OD-Werten zu einer Überschätzung der enthaltenen Menge an GAG führen würde.

Es zeigte sich bei allen Messungen, dass die Kurve bis zu einer OD von 0,58 etwa linear verläuft. Im weiteren Verlauf flacht die Kurve immer weiter ab.

Der optimale Bereich zur Messung der OD der Proben wurde bis zu einem OD-Wert von 0,58 festgelegt. Proben mit einer gemessenen OD größer 0,58 wurden weiter verdünnt und die Menge an GAG entsprechend hochgerechnet.

3.2.2. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen der verdauten 300 µm Knorpel-Discs durch unterschiedliche Anzahl an 300 µm Knorpel-Discs für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Zur Ermittlung der geeigneten Konzentration an GAG für die Messung des DMMB-Assays wurden die 300 µm Knorpel-Discs, wie in 2.2.2 beschrieben, hergestellt und die Zellkultur, wie in 2.4.2 beschrieben, mit einer Inkubationszeit von 1 Tag angelegt. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Isolation und Verarbeitung des Inkubationsmediums, wie in 2.6.4 beschrieben und der Verdau der 300 µm Knorpel-Discs, wie in 2.6.5 aufgeführt. Zur Messung wurde die Verdauungslösung mit einem Volumen von 200 µl genutzt und die Messung der OD wurde, wie in 2.6.6 beschrieben, durchgeführt. Es wurden insgesamt 3 Versuchsgruppen mit einer unterschiedlichen Anzahl an 300 µm Knorpel-Discs und damit Menge an GAG gebildet:

Versuchsgruppe 1: Eine 300 µm Knorpel-Disc

Versuchsgruppe 2: Zwei 300 µm Knorpel-Discs

Versuchsgruppe 3: Drei 300 µm Knorpel-Discs

Es fiel auf, dass bei einer Poolung der Discs (Versuchsgruppe 2 und 3) die OD-Werte bei allen Verdünnungen zu hoch waren. Nur die Versuchsgruppe 1 mit der Inkubation von 1 Disc konnten OD-Werte im linearen Bereich der Standardkurve (unter 0,58) gemessen werden. Auch waren die Werte in einem Bereich der Standardkurve, der eine Steigerung des GAG-Verlustes nach Injury zuließ.

Die optimale Anzahl der Discs zur Messung des GAG-Verlustes aus den 300 µm Knorpel-Discs betrug eine Disc bei Knorpel aus humanen Kniegelenken. Eine Poolung der Knorpel-Discs zur Messung des GAG-Gehaltes der Discs war folglich nicht nötig.

3.2.3. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen der verdauten 300 µm Knorpel-Discs durch Verdünnungsreihen für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Zur Ermittlung der geeigneten Konzentration an GAG für die Messung des DMMB-Assays wurden die 300 µm Knorpel-Discs, wie in 2.2.2 beschrieben, hergestellt und die Zellkultur, wie in 2.4.2 beschrieben, mit einer Inkubationszeit von 1 Tag angelegt. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Isolation und Verarbeitung des Inkubationsmediums, wie in 2.6.4 beschrieben und der Verdau der 300 µm Knorpel-Discs, wie in 2.6.5 aufgeführt. Zur Messung wurde die Verdauungslösung mit einem Volumen von 200 µl genutzt und die Messung der OD wurde, wie in 2.6.6 beschrieben, durchgeführt. Es wurden 5 Verdünnungsgruppen gebildet, um die verschiedenen Konzentrationen an GAG zu untersuchen:

Verdünnungsgruppe 1: 40 µl DMEM (Kontrollgruppe)

Verdünnungsgruppe 2: 10 µl GAG-Lösung + 30 µl DMEM (1 : 20)

Verdünnungsgruppe 3: 20 µl GAG-Lösung + 20 µl DMEM (1 : 10)

Verdünnungsgruppe 4: 30 µl GAG-Lösung + 10 µl DMEM (1 : 6,67)

Verdünnungsgruppe 5: 40 µl GAG-Lösung

Bei der Untersuchung der Verdünnungsgruppen zeigte sich, dass bei einer Verdünnung der verdauten GAG aus den 300 µm Knorpel-Discs um den Faktor 1 : 20 (Versuchsgruppe 2) bei der Messung der OD die Messwerte im linearen Bereich der Standardkurve unter einem OD-Wert von 0,58 lagen. Auch waren die Werte in einem Bereich der Standardkurve, der eine Steigerung des GAG-Verlustes nach Injury zuließ. Bei allen anderen Verdünnungsgruppen lagen die OD-Werte in einem zu hohen Bereich.

Die optimale Verdünnung der verdauten GAG aus den 300 µm Knorpel-Discs zur Messung der OD war eine Verdünnung um den Faktor 1 : 20 bei Knorpel aus humanen Kniegelenken.

3.2.4. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen der verdauten 300 µm Knorpel-Discs durch Verdünnung der Verdauungslösung für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Zur Ermittlung der geeigneten Konzentration an GAG für die Messung des DMMB-Assays wurden die 300 µm Knorpel-Discs, wie in 2.2.2 beschrieben, hergestellt und die Zellkultur, wie in 2.4.2 beschrieben, mit einer Inkubationszeit von 1 Tag angelegt. Nach der Inkubationszeit erfolgte die Isolation und Verarbeitung des Inkubationsmediums, wie in 2.6.4 beschrieben und der Verdau der 300 µm Knorpel-Discs, wie in 2.6.5 aufgeführt. Zur Messung wurde die Verdauungslösung (200 µl) mit 400 µl und 600 µl DMEM verdünnt und die Messung der OD wurde, wie in 2.6.6 beschrieben, durchgeführt. Es wurden insgesamt 2 Versuchsgruppen gebildet, bei denen die Verdünnung der Verdauungslösung mit jeweils einem anderen Volumen durchgeführt wurde:

Versuchsgruppe 1: Verdünnung mit 600 µl DMEM (1 : 20)

Versuchsgruppe 2: Verdünnung mit 400 µl DMEM (1 : 15)

Es zeigte sich, dass bei einer Verdünnung mit 600 µl DMEM (1 : 20) die OD-Werte in einem zu geringen Bereich der Standardkurve lagen. Zusätzlich musste bedacht werden, dass bei Injury und auch bei längerer Inkubationszeit der erwartete Verlust der GAG aus den 300 µm Knorpel-Discs in das Kulturmedium größer war als in diesem Experiment und die Messwerte dann bei einer zu starken Verdünnung aus dem Messbereich fallen würden. Bei einer Verdünnung mit 400 µl DMEM (1 : 15) lagen die OD-Werte in einem optimalen Bereich der Standard-Kurve, sodass auch ein höherer Verlust an GAG bei Injury und längerer Inkubationszeit nicht zu Problemen bei der Messung geführt hätten.

Die optimale Verdünnung der verdauten GAG aus den 300 µm Knorpel-Discs zur Messung der OD war eine Verdünnung um den Faktor 1 : 15 bei Knorpel aus humanen Kniegelenken durch Zugabe von 400 µl DMEM und Messung der OD mit jeweils 40 µl der verdünnten Verdauungslösung.

3.2.5. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen des Kulturmediums durch unterschiedliche Anzahl an 300 µm Knorpel-Discs für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Zur Ermittlung der geeigneten Konzentration an GAG für die Messung des DMMB-Assays wurden die 300 µm Knorpel-Discs, wie in 2.2.2 beschrieben, hergestellt und die Zellkultur, wie in 2.4.2 beschrieben, mit einer Inkubationszeit von 1 Tag angelegt. Nach der Inkubationszeit erfolgten die Isolation und Verarbeitung des Inkubationsmediums, wie in 2.6.4 beschrieben. Die Rekonstitution wurde mit 40 µl DMEM und die Messung der OD, wie in 2.6.6 beschrieben, durchgeführt. Es wurden insgesamt 3 Versuchsgruppen mit einer unterschiedlichen Anzahl an 300 µm Knorpel-Discs und damit Menge an GAG gebildet:

Versuchsgruppe 1: Eine 300 µm Knorpel-Disc

Versuchsgruppe 2: Zwei 300 µm Knorpel-Discs

Versuchsgruppe 3: Drei 300 µm Knorpel-Discs

Es fiel auf, dass bei einer Poolung der Discs (Versuchsgruppe 2 und 3) die OD-Werte zu hoch waren. Nur die Versuchsgruppe 1 mit der Inkubation von 1 Disc konnten OD-Werte im linearen Bereich der Standardkurve (unter 0,58) gemessen werden. Auch waren die Werte in einem Bereich der Standardkurve, der eine Steigerung des GAG-Verlustes aus den Knorpel-Discs nach Injury sowie eine längere Inkubationszeit und damit höheren Verlust an GAG aus den Knorpel-Discs zuließ.

Die optimale Anzahl der Discs zur Messung des GAG-Verlustes in das Kulturmedium betrug eine 300 µm Knorpel-Disc bei Knorpel aus humanen Kniegelenken. Eine Poolung der Knorpel-Discs zur Messung des GAG-Verlustes in das Kulturmedium war folglich nicht nötig.

3.2.6. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen des Kulturmediums durch unterschiedliche Verdünnungsreihen für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Zur Ermittlung der geeigneten Konzentration an GAG für die Messung des DMMB-Assays wurden die 300 µm Knorpel-Discs, wie in 2.2.2 beschrieben, hergestellt und die Zellkultur, wie in 2.4.2 beschrieben, mit einer Inkubationszeit von 1 Tag angelegt. Nach der Inkubationszeit erfolgten die Isolation und Verarbeitung des Inkubationsmediums, wie in 2.6.4 beschrieben. Die Rekonstitution wurde mit 40 µl DMEM und die Messung der OD, wie in 2.6.6 beschrieben, durchgeführt. Es wurden 5 Verdünnungsgruppen gebildet, um die verschiedenen Konzentrationen an GAG zu untersuchen:

Verdünnungsgruppe 1: 40 µl DMEM (Kontrollgruppe)

Verdünnungsgruppe 2: 10 µl GAG-Lösung + 30 µl DMEM (1 : 4)

Verdünnungsgruppe 3: 20 µl GAG-Lösung + 20 µl DMEM (1 : 2)

Verdünnungsgruppe 4: 30 µl GAG-Lösung + 10 µl DMEM (3 : 4)

Verdünnungsgruppe 5: 40 µl GAG-Lösung

Bei der Untersuchung der Verdünnungsgruppen zeigte sich, dass bei einer Verdünnung des Kulturmediums um den Faktor 1 : 4 (Versuchsgruppe 2) bei der Messung der OD die Messwerte im linearen Bereich der Standardkurve unter einem OD-Wert von 0,58 lagen. Auch waren die Werte in einem Bereich der Standardkurve, der eine Steigerung des GAG-Verlustes nach Injury sowie eine längere Inkubationszeit mit einem erhöhten Verlust an GAG aus den Knorpel-Discs in das Kulturmedium zuließ. Bei allen anderen Verdünnungsgruppen lagen die OD-Werte in einem zu hohen Bereich.

Die optimale Verdünnung des Kulturmediums zur Messung der OD war eine Verdünnung um den Faktor 1 : 4 bei Knorpel aus humanen Kniegelenken.

3.2.7. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Glykosaminoglykanen des Kulturmediums durch unterschiedliche Volumina bei der Rekonstitution für eine Messung im möglichst geeigneten, linearen Bereich der Standardkurve des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Zur Ermittlung der geeigneten Konzentration an GAG für die Messung des DMMB-Assays wurden die 300 µm Knorpel-Discs, wie in 2.2.2 beschrieben, hergestellt und die Zellkultur, wie in 2.4.2 beschrieben, mit einer Inkubationszeit von 1 Tag angelegt. Nach der Inkubationszeit erfolgten die Isolation und Verarbeitung des Inkubationsmediums, wie in 2.6.4 beschrieben. Die Rekonstitution wurde mit 80 µl, 120 µl und 160 µl DMEM und die Messung der OD, wie in 2.6.6 beschrieben, durchgeführt. Es wurden insgesamt 3 Versuchsgruppen gebildet, bei denen die Rekonstitution des lyophilisierten Kulturmediums mit jeweils einem anderen Volumen durchgeführt wurde:

Versuchsgruppe 1: Rekonstitution mit 80 µl DMEM (1 : 2)

Versuchsgruppe 2: Rekonstitution mit 120 µl DMEM (1 : 3)

Versuchsgruppe 3: Rekonstitution mit 160 µl DMEM (1 : 4)

Es bestätigte sich, dass die 1 : 4 Verdünnung bei der Messung der OD zu Werten im linearen Bereich der Standardkurve (OD-Werte < 0,58) führte. Auch waren die Werte in einem Bereich der Standardkurve, der eine Steigerung des GAG-Verlustes nach Injury sowie eine längere Inkubationszeit mit einem erhöhten Verlust an GAG aus den Knorpel-Discs in das Kulturmedium zuließ. Geringere Verdünnungen verursachte auch hier zu hohe Werte. Bei der Rekonstitution mit 160 µl DMEM und Messung der OD von 40 µl (1 : 4 Verdünnung) war die mögliche Fehlerquelle geringer als bei der Rekonstitution mit 40 µl DMEM und weitere Verdünnung von 10 µl Probe mit 30 µl DMEM zur Messung der OD.

Die optimale Verdünnung des Kulturmediums zur Messung der OD war eine Verdünnung um den Faktor 1 : 4 bei Knorpel aus humanen Kniegelenken durch Rekonstitution des lyophilisierten Kulturmediums mit 160 µl und Messung der OD mit jeweils 40 µl der Lösung des rekonstituierten Kulturmediums.

3.2.8. Ermittlung der geeigneten Temperatur für den Verdau von Knorpel-Discs für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay

Die Herstellung der Proteinase-K-Lösung erfolgte, wie in 0 beschrieben. Es wurden insgesamt 3 Versuchsgruppen mit einer unterschiedlichen Anzahl an 300 µm Knorpel-Discs und damit Menge an GAG gebildet:

Versuchsgruppe 1: Eine 300 µm Knorpel-Disc

Versuchsgruppe 2: Zwei 300 µm Knorpel-Discs

Versuchsgruppe 3: Drei 300 µm Knorpel-Discs

Die Versuche zum Verdau der 300 µm Knorpel-Discs mit verschiedenen Temperaturen wurden mit einer Proteinase-K-Konzentration von 500 µg/ml, einem Volumen der Proteinase-K-Lösung von 200 µl und einer Einstellung der rpm-Zahl von 400 rpm über drei Tage Inkubationszeit durchgeführt. Die untersuchten Temperaturen waren 52 °C, 55 °C und 60 °C, da der Hersteller ein Temperaturoptimum von 65 °C angibt, diese sich aber aus vorherigen Versuchen nicht als optimal erwiesen hatte. Es zeigte sich, dass mit zunehmender Temperatur der Verdau der 300 µm Knorpel-Discs besser wurde. So konnte bei 60 °C eine nahezu optimale Verdauung mit nur noch sehr geringen Rückständen erzielt werden. Bei 52 °C und 55 °C war die Menge an Rückständen jeweils größer.

Die optimale Temperatur für den Verdau von 300 µm Knorpel-Discs betrug 60 °C.

3.2.9. Ermittlung der geeigneten Konzentration an Proteinase-K für den Verdau von Knorpel-Discs für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay

Die Herstellung der Proteinase-K-Lösung erfolgte, wie in 0 beschrieben. Es wurden insgesamt 3 Versuchsgruppen mit einer unterschiedlichen Anzahl an 300 µm Knorpel-Discs und damit Menge an GAG gebildet:

Versuchsgruppe 1: Eine 300 µm Knorpel-Disc

Versuchsgruppe 2: Zwei 300 µm Knorpel-Discs

Versuchsgruppe 3: Drei 300 µm Knorpel-Discs

Es wurden zuerst verschiedene Volumina an Proteinase-K-Lösungen von 200 µl, 400 µl und 600 µl bei konstanter Proteinase-K-Konzentration von 500 µg/ml getestet. Die Temperatur wurde bei 55 °C und die rpm-Zahl bei 850 rpm eingestellt. Dabei wurde sowohl über drei Tage alle drei Volumina getestet als auch drei Tage Inkubation mit 200 µl und dann Zugabe von 200 µl beziehungsweise 400 µl und erneute Inkubation für einen Tag. Es zeigte sich, dass sich bezüglich der unterschiedlichen Volumina und damit Gesamtmenge an Proteinase K kein Unterschied im Ergebnis des Verdau erzielen ließ. Es blieben immer Reste zurück.

Im Folgenden wurden unterschiedliche Proteinase-K-Konzentrationen von 500 µg/ml, 1000 µg/ml, 1500 µg/ml, 2500 µg/ml und 5000 µg/ml bei konstantem Volumen von 200 µl ausprobiert. Die Temperatur wurde bei 55 °C und die rpm-Zahl bei 850 rpm eingestellt. Mit zunehmender Konzentration der Proteinase-K-Lösung zeigte sich eine Abnahme der Reste. Bei 5000 µg/ml blieben so gut wie keine Reste mehr übrig, die am ehesten unverdaulichen Reste des Knorpels entsprachen.

Somit erwies sich eine Proteinase-K-Konzentration von 5000 µg/ml bei einem Volumen von 200 µl als beste Option zum Verdau des Knorpels.

3.2.10. Ermittlung der geeigneten Schüttelzahl in rpm für den Verdau von Knorpel-Discs für das 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay

Die Herstellung der Proteinase-K-Lösung erfolgte, wie in 0 beschrieben. Es wurden insgesamt 3 Versuchsgruppen mit einer unterschiedlichen Anzahl an 300 µm Knorpel-Discs und damit Menge an GAG gebildet:

Versuchsgruppe 1: Eine 300 µm Knorpel-Disc

Versuchsgruppe 2: Zwei 300 µm Knorpel-Discs

Versuchsgruppe 3: Drei 300 µm Knorpel-Discs

Es wurden unterschiedliche rpm-Zahlen am Eppendorf Thermomixer Comfort 5355 eingestellt, 400 rpm, 500 rpm, 800 rpm, 850 rpm und 1000 rpm. Die Temperatur wurde auf 55 °C eingestellt, das Volumen der Proteinase-K-Lösung betrug 200 µl bei einer Konzentration von 500 µg/ml. Die Inkubationszeit betrug jeweils drei Tage. Die Erhöhung der rpm-Zahl sollte der Proteinase K ermöglichen, an alle Bereiche des Knorpels zu gelangen und ein zu frühes Absetzen der Knorpelstücke verhindern. Am Ende wurden die Rückstände in den 1,5 ml Eppendorf-Cups miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass mit zunehmender rpm-Zahl weniger Rückstände in den Eppendorf-Cups zu finden waren, mit dem Optimum bei 850 rpm. Eine weitere Erhöhung der rpm-Zahl auf 1000 rpm führte nicht zu einer weiteren Verbesserung des Verdau, sondern erneut zu vermehrten Rückständen der Knorpel-Discs.

Die optimale Einstellung der rpm-Zahl zum Verdau der 300 µm Knorpel-Discs am Eppendorf Thermomixer Comfort 5355 betrug 850 rpm.

3.3. Ermittlung des optimalen Injury-Kompressionsmodells zur Simulation eines Knorpeltraumas

3.3.1. Nachweis der benötigten Dicken der Knorpel-Discs für das Injury-Kompressionsmodell durch Ausübung des Kompressionstraumas auf 300 µm Knorpel-Discs und 600 µm Knorpel-Discs und anschließender Live-Dead-Färbung mit Fluoreszenzmikroskopie

Die Herstellung der 300 und 600 µm Knorpel-Discs erfolgte, wie in 2.2.2 aufgeführt. Die Ausübung des Kompressionstraumas und der Live-Dead-Färbung mit Fluoreszenzmikroskopie wurde, wie in 2.5.2, 2.3.2, 2.3.4 beziehungsweise 2.5.3 beschrieben, durchgeführt. Es wurden 2 Versuchsgruppen mit 300 µm und 600 µm Knorpel-Discs gebildet:

Versuchsgruppe 1: 300 µm Knorpel-Disc

Versuchsgruppe 2: 600 µm Knorpel-Discs

Es zeigte sich mikroskopisch, dass eine Dicke von 300 µm, die der oberflächlichen, sehr fragilen SZ des humanen Kniegelenksknorpels entspricht, besser für das Kompressionsmodell geeignet war wie eine 600 µm Knorpel-Disc. Da sich die Anzahl der lebenden und toten Zellen bei beiden Dicken für das Experiment eigneten, wurden die 300 µm Knorpel-Discs ausgewählt, da wir uns besonders für die vulnerable SZ der humanen Kniegelenkexplantate interessierten.

3.3.2. Ermittlung der benötigten Kompressionsstärke in % der Ausgangshöhe der Knorpel-Discs durch Ausübung des Kompressionstraumas auf 300 µm Knorpel-Discs und anschließender Live-Dead-Färbung mit Fluoreszenzmikroskopie

Die Herstellung der 300 µm Knorpel-Discs erfolgte, wie in 2.2.2 beschrieben. Die Ausübung des Kompressionstraumas, die Inkubation und die anschließende Live-Dead-Färbung mit Fluoreszenzmikroskopie erfolgte, wie in 2.5.2, 2.4.5, 2.3.2, 2.3.4 beziehungsweise 2.5.3 aufgeführt. Die Daten wurden mit Excel ausgewertet. Es wurde makroskopisch guter Knorpel ohne

Charakterisierung der SCSO genutzt. Es wurden 4 Versuchsgruppen und 4 Kontrollgruppen gebildet:

Versuchsgruppe 1: Injury mit 50 % und Inkubationsdauer 1 Tag

Kontrollgruppe 1: Kein Injury und Inkubationsdauer 1 Tag

Versuchsgruppe 2: Injury mit 50 % und Inkubationsdauer 3 Tage

Kontrollgruppe 2: Kein Injury und Inkubationsdauer 3 Tage

Versuchsgruppe 3: Injury mit 65 % und Inkubationsdauer 1 Tag

Kontrollgruppe 3: Kein Injury und Inkubationsdauer 1 Tag

Versuchsgruppe 4: Injury mit 65 % und Inkubationsdauer 3 Tage

Kontrollgruppe 4: Kein Injury und Inkubationsdauer 3 Tage

Für den Versuchsansatz wurden Proben von 7 Gewebespendern gewonnen. Die Gesamtanzahl der hergestellten Knorpel-Discs betrug 84. In die Auswertung gingen 77 Proben ein, 4 Knorpel-Discs konnten aus zeitlichen Gründen nicht gemessen werden, 3 Proben mussten aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden. Die durchschnittliche, mit der Fluoreszenzmikroskopie gemessene Disc-Höhe, betrug 171,96 μm mit einem Standardfehler des Mittelwerts von 6,51 μm und einer Standardabweichung von 57,11 μm .

Tabelle 13: Übersicht aller für das Experiment vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Alle Discs	Zeitlich nicht geschafft	Fehlende Calcein- Aufnahme	Genutzte Discs
Injury mit 50 % Kompression (VG 1 + VG 2)	24	2	1	21
Kontrolle ohne Injury für 50 % Kompression (KG 1 + KG 2)	24	2	0	22
Injury mit 65 % Kompression (VG 3 + VG 4)	18	0	1	17
Kontrolle ohne Injury für 65 % Kompression (KG 3 + KG 4)	18	0	2	17
Gesamt	84	4	3	77

Tabelle 14: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen aller genutzten Discs inklusive Standardfehler des Mittelwerts und Standardabweichung für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Durchschnittliche Disc-Höhe [μm]	Standardfehler des Mittelwerts [μm]	Standard- abweichung [μm]
Injury mit 50 % Kompression (VG 1 + VG 2)	157,90	12,54	57,46
Kontrolle ohne Injury für 50 % Kompression (KG 1 + KG 2)	162,14	13,00	61,00
Gesamt 50 % (VG 1 + VG 2 + KG 1 + KG 2)	160,07	9,05	59,33
Injury mit 65 % Kompression (VG 3 + VG 4)	177,24	9,64	39,75
Kontrolle ohne Injury für 65 % Kompression (KG 3 + KG 4)	196,75	13,91	57,37
Gesamt 65 % (VG 3 + VG 4 + KG 3 + KG 4)	187,00	8,63	50,30
Gesamt	171,96	6,51	57,11

Für Versuchsgruppe 1, Kontrollgruppe 1, Versuchsgruppe 2 und Kontrollgruppe 2 wurden Proben von 4 Gewebespendern mit einer Gesamt-Disc-Anzahl von 48 gewonnen. Versuchsgruppe 1 beinhaltete 12 Knorpel-Discs, davon wurden 9 in die Auswertung eingeschlossen, 2 Knorpel-Discs konnten aus zeitlichen Gründen nicht gemessen werden, 1 musste wegen fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden. Kontrollgruppe 1 bestand aus 12 Knorpel-Discs, davon wurden 10 in die Auswertung eingeschlossen, 2 Knorpel-Discs konnten aus zeitlichen Gründen nicht gemessen werden. Versuchs- und Kontrollgruppe 2 bestanden jeweils aus 12 Knorpel-Discs, hier wurden alle in die Auswertung eingeschlossen.

Tabelle 15: Übersicht der für das Experiment mit 50 % Kompressionshöhe vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Alle Discs	Zeitlich nicht geschafft	Fehlende Calcein- Aufnahme	Genutzte Discs
Injury mit 50 % Kompression + Inkubationszeit 1 Tag (VG 1)	12	2	1	9
Kontrolle ohne Injury für 50 % Kompression und Inkubation 1 Tag (KG 1)	12	2	0	10
Injury mit 50 % Kompression + Inkubationszeit 3 Tage (VG 2)	12	0	0	12
Kontrolle ohne Injury für 50 % Kompression und Inkubation 3 Tage (KG 2)	12	0	0	12
Gesamt	48	4	1	43

Tabelle 16: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen der für das Experiment mit 50 % Kompressionshöhe genutzten Discs inklusive Standardfehler des Mittelwerts und Standardabweichung für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Durchschnittliche Disc-Höhe [μm]	Standardfehler des Mittelwerts [μm]	Standardabweichung [μm]
Injury mit 50 % Kompression + Inkubationszeit 1 Tag (VG 1)	174,93	22,97	68,91
Kontrolle ohne Injury für 50 % Kompression und Inkubation 1 Tag (KG 1)	160,42	17,52	55,40
Gesamt (VG 1 + KG 1)	167,29	14,36	62,58
Injury mit 50 % Kompression + Inkubationszeit 3 Tage (VG 2)	145,12	12,37	42,84

Kontrolle ohne Injury für 50 % Kompression und Inkubation 3 Tage (KG 2)	163,58	18,84	65,26
Gesamt (VG 2 + KG 2)	154,35	11,42	55,97
Gesamt 50 %	160,07	9,05	59,33

Für Versuchsgruppe 3, Kontrollgruppe 3, Versuchsgruppe 4 und Kontrollgruppe 4 wurden Proben von 3 Gewebespendern mit einer Gesamt-Disc-Anzahl von 36 gewonnen. Versuchsgruppe 3 beinhaltete 9 Knorpel-Discs, davon wurden 8 in die Auswertung eingeschlossen, 1 musste wegen fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden. Kontrollgruppe 3 und Versuchsgruppe 4 bestanden aus jeweils 9 Knorpel-Discs, hier wurden alle in die Auswertung eingeschlossen. Kontrollgruppe 4 beinhaltete insgesamt 9 Knorpel-Discs, davon wurden 8 in die Auswertung eingeschlossen, 1 musste wegen fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden.

Tabelle 17: Übersicht der für das Experiment mit 65 % Kompressionshöhe vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Alle Discs	Zeitlich nicht geschafft	Fehlende Calcein- Aufnahme	Genutzte Discs
Injury mit 65 % Kompression + Inkubationszeit 1 Tag (VG 3)	9	0	1	8
Kontrolle ohne Injury für 65 % Kompression und Inkubation 1 Tag (KG 3)	9	0	0	9
Injury mit 65 % Kompression + Inkubationszeit 3 Tage (VG 4)	9	0	0	9
Kontrolle ohne Injury für 65 % Kompression und Inkubation 3 Tage (KG 4)	9	0	1	8
Gesamt	36	0	2	34

Tabelle 18: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen der für das Experiment mit 65 % Kompressionshöhe genutzten Discs inklusive Standardfehler und Standardabweichung für Inkubationsdauer ein und drei Tage. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Durchschnittliche Disc-Höhe [μm]	Standardfehler des Mittelwerts [μm]	Standardabweichung [μm]
Injury mit 65 % Kompression + Inkubationszeit 1 Tag (VG 3)	180,64	11,55	32,65
Kontrolle ohne Injury für 65 % Kompression und Inkubation 1 Tag (KG 3)	183,1	20,40	61,19
Gesamt (VG 3 + KG 3)	181,94	12,09	49,85
Injury mit 65 % Kompression + Inkubationszeit 3 Tage (VG 4)	174,22	14,97	44,91

Kontrolle ohne Injury für 65 % Kompression und Inkubation 3 Tage (KG 4)	212,11	17,09	48,33
Gesamt (VG 4 + KG 4)	192,05	11,42	55,97
Gesamt 65 %	187,00	8,63	50,30

Bei Kompression der Knorpel-Discs um 50 % der Ausgangshöhe wurden ein beziehungsweise drei Tage nach Injury mittels Fluoreszenzmikroskopie der Anteil lebender und toter Zellen bestimmt, ebenso bei den Kontrollgruppen. Nach einer Inkubationszeit von einem Tag betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen der jeweiligen Gruppe in der Gesamtübersicht der drei Knorpel Ebenen nach 50 % Kompression in der Versuchsgruppe 1 36,49 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,85 %. Standardabweichung: 14,25 %), in der Kontrollgruppe 1 23,90 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,42 %. Standardabweichung: 13,27 %), nach drei Tagen in der Versuchsgruppe 2 36,12 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,68 %. Standardabweichung: 10,06 %) und in der Kontrollgruppe 2 24,50 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,47 %. Standardabweichung: 8,82 %).

Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in der Gesamtübersicht der drei Knorpel Ebenen war statistisch signifikant und betrug nach einem Tag 12,59 % (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$), nach drei Tagen 11,61 % (ANOVA (Holm-Sidak) $p < 0,001$, t-Test $p < 0,001$). Im Vergleich zwischen den lebenden und toten Zellen war der Unterschied in allen Gruppen statistisch signifikant (Tag 1 ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$. Tag 3 ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$). Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen (Injury mit

Inkubationszeit ein und drei Tage) war statistisch nicht signifikant (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,623$) und war nach einem Tag Inkubationszeit um 0,38 % größer als nach drei Tagen Inkubationszeit.

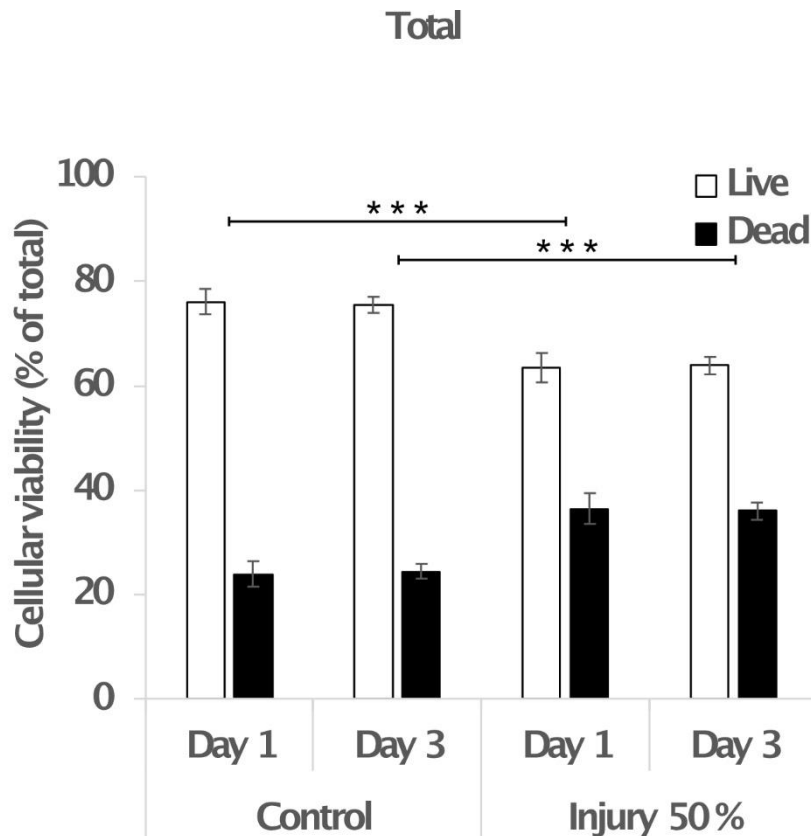


Abbildung 19: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpel Ebenen bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

Bei Betrachtung der drei einzelnen Knorpel Ebenen (ehemalige Gelenkfläche, mittlere Fläche und Schneidefläche) betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen der jeweiligen Gruppe in der Gelenkfläche nach einem Tag bei Injury mit 50 % Kompression (Versuchsgruppe 1) 33,48 % (Standardfehler des Mittelwerts: 4,06 %. Standardabweichung: 11,48 %), in der Kontrollgruppe 1 19,13 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,23 %. Standardabweichung: 7,04 %)

und nach drei Tagen bei Injury mit 50 % Kompression (Versuchsgruppe 2) 35,52 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,99 %. Standardabweichung: 10,36 %), in der Kontrollgruppe 2 21,19 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,30 %. Standardabweichung: 7,96 %).

Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in der ehemaligen Gelenkfläche war statistisch signifikant und betrug nach einem Tag 14,35 % (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,004$, t-Test: $p = 0,007$), nach drei Tagen 14,34 % (ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$, t-Test: $p = 0,001$). Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen (Injury mit Inkubationszeit ein und drei Tage) war statistisch nicht signifikant und war an Tag 1 um 2,04 % geringer als an Tag 3 (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,647$, t-Test: 0,699).

Articular zone

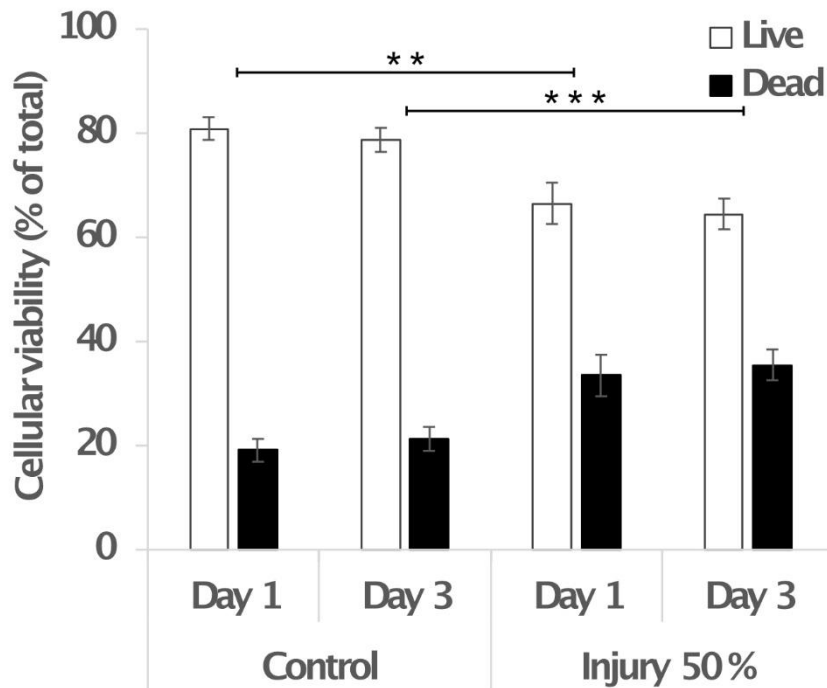


Abbildung 20: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der ehemaligen Gelenkfläche bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

In der Mitte der Knorpel-Disc sowie an der Schneidefläche zeigten sich etwas andere Ergebnisse. In der mittleren Fläche zeigte sich ein Mittelwert des Anteils toter Zellen der jeweiligen Gruppe an Tag 1 nach Injury in der Versuchsgruppe 1 von 34,24 % (Standardfehler des Mittelwerts: 5,18 %. Standardabweichung: 14,66 %), in der Kontrollgruppe 1 von 23,42 % (Standardfehler des Mittelwerts: 4,30 %. Standardabweichung: 13,59 %) mit einer statistisch nicht-signifikanten Differenz zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe von 10,82 % (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, t-Test: $p = 0,100$). An Tag 3 konnte der Mittelwert des Anteils toter Zellen der jeweiligen Gruppe in der Injury-Gruppe (Versuchsgruppe 2) mit 34,75 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,90 %. Standardabweichung: 10,04 %) tote Zellen gemessen werden, in der Kontrollgruppe 2 mit 24,48 %

(Standardfehler des Mittelwerts: 2,44 %. Standardabweichung: 8,44 %). Dies entsprach einer statistisch signifikanten Differenz von 10,27 % (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,013$, t-Test: $p = 0,016$). Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen (Injury mit Inkubationszeit ein und drei Tage) war statistisch nicht signifikant und war an Tag 1 um 0,51% kleiner als an Tag 3 (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,995$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,563$).

Middle zone

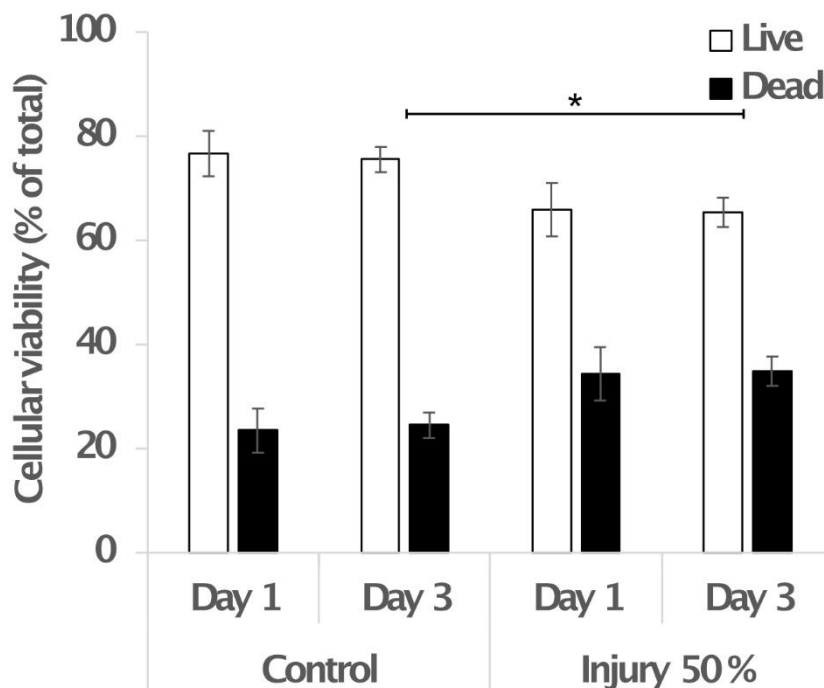


Abbildung 21: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der mittleren Fläche des Knorpels bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

An der Schneidefläche betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen der jeweiligen Gruppe nach einem Tag Inkubationszeit nach Kompressionstrauma in Versuchsgruppe 1 41,17 % (Standardfehler des Mittelwerts: 4,97 %).

Standardabweichung: 14,90 %), in der Kontrollgruppe 1 29,15 % (Standardfehler des Mittelwerts: 4,93 %. Standardabweichung: 15,60 %).

Die Differenz zwischen beiden Gruppen war statistisch nicht-signifikant und betrug 12,02 % (ANOVA (Dunns-Test): $p > 0,05$, t-Test: $p = 0,111$). Nach drei Tagen wurden für den Mittelwert des Anteils toter Zellen in der Injury-Gruppe (Versuchsgruppe 2) 38,08 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,73 %. Standardabweichung: 9,45 %) tote Zellen gemessen, in der Kontrollgruppe 2 27,85 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,52 %. Standardabweichung: 8,74 %) mit einer statistisch signifikanten Differenz von 10,24 % (ANOVA (Holm-Sidak): 0,012, t-Test: $p = 0,015$). Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen (Injury mit Inkubationszeit ein und drei Tage) war statistisch nicht signifikant (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,749$) und war an Tag 1 um 3,09 % größer als an Tag 3.

Cutting zone

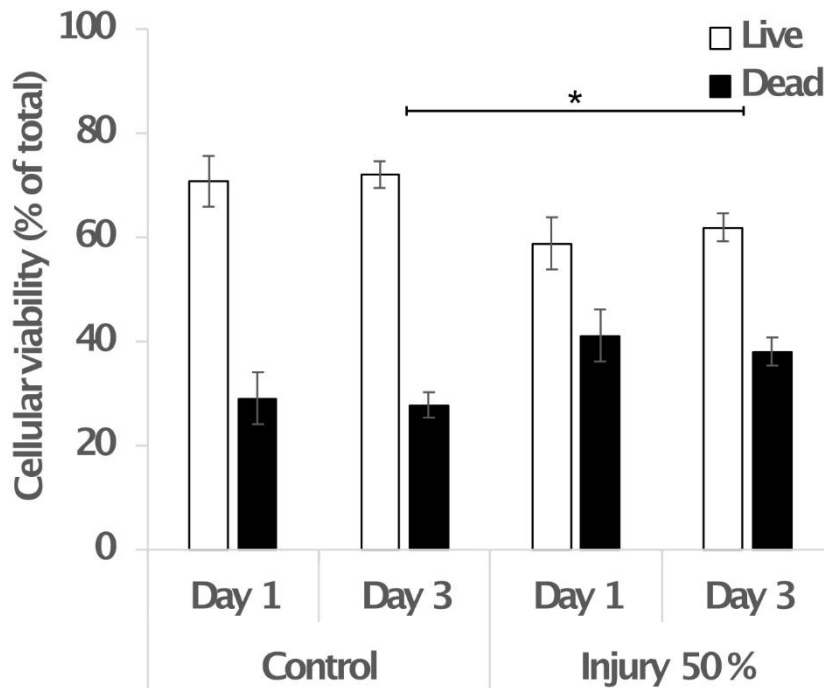


Abbildung 22: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der Schneidefläche des Knorpels bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

Insgesamt fiel ein erhöhter Anteil toter Zellen mit zunehmend tieferen Schichten auf. In den Mittelwerten der Anteile toter Zellen der jeweiligen Gruppen zeigte sich in den Kontrollgruppen (Kontrollgruppe 1) der ehemaligen Gelenk- und Schneidefläche an Tag 1 ein Anteil toter Zellen von 19,13 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,23 %. Standardabweichung: 7,04 %) im Bereich der Gelenkfläche, 23,42 % (Standardfehler des Mittelwerts: 4,30 %. Standardabweichung: 13,59 %) im Bereich der mittleren Fläche sowie 29,15 % (Standardfehler des Mittelwerts: 4,93 %. Standardabweichung: 15,60 %) im Bereich der Schneidefläche auf, die Differenzen waren aber statistisch nicht signifikant (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,258$). An Tag 3 betragen die Mittelwerte der Anteile toter Zellen in der

Kontrollgruppe im Bereich der Gelenkfläche 21,19 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,30 %. Standardabweichung: 7,96 %), in der mittleren Fläche 24,48 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,44 %. Standardabweichung: 8,44 %) und im Bereich der Schneidefläche 27,84 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,52 %. Standardabweichung: 8,74 %), auch hier waren die Differenzen nicht statistisch signifikant (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,157$). Im Vergleich der Injury-Gruppen der Gelenk- und Schneidefläche waren die Differenzen statistisch nicht signifikant (Tag 1: 7,69 %, Tag 3: 2,56 %).

In der Folge wurden bei Kompression der Knorpel-Discs um 65 % der Ausgangshöhe ein beziehungsweise drei Tage nach Injury mittels Fluoreszenzmikroskopie die Mittelwerte der Anteile lebender und toter Zellen der jeweiligen Gruppen bestimmt. Bei 65% Kompression der Ausgangshöhe lag der Mittelwert des Anteils toter Zellen in der Zusammenschau der drei Knorpelschichten nach einem Tag Inkubationszeit (Versuchsgruppe 3) bei 45,90 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,69 %. Standardabweichung: 13,19 %) und in der Kontrollgruppe 3 bei 18,00 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,71 %. Standardabweichung: 8,91 %) beziehungsweise drei Tage nach Injury (Versuchsgruppe 4) bei 46,97 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,05 %. Standardabweichung: 10,67 %) und in der Kontrollgruppe 4 bei 20,11 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,48 %. Standardabweichung: 7,26 %), ein statistisch signifikanter Unterschied nach einem Tag von 27,90 % (ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$) beziehungsweise nach drei Tagen von 26,86 % (ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$). Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen (Injury mit Inkubationszeit ein und drei Tage) war statistisch nicht signifikant (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p > 0,540$) und war an Tag 1 um 1,07 % kleiner als an Tag 3.

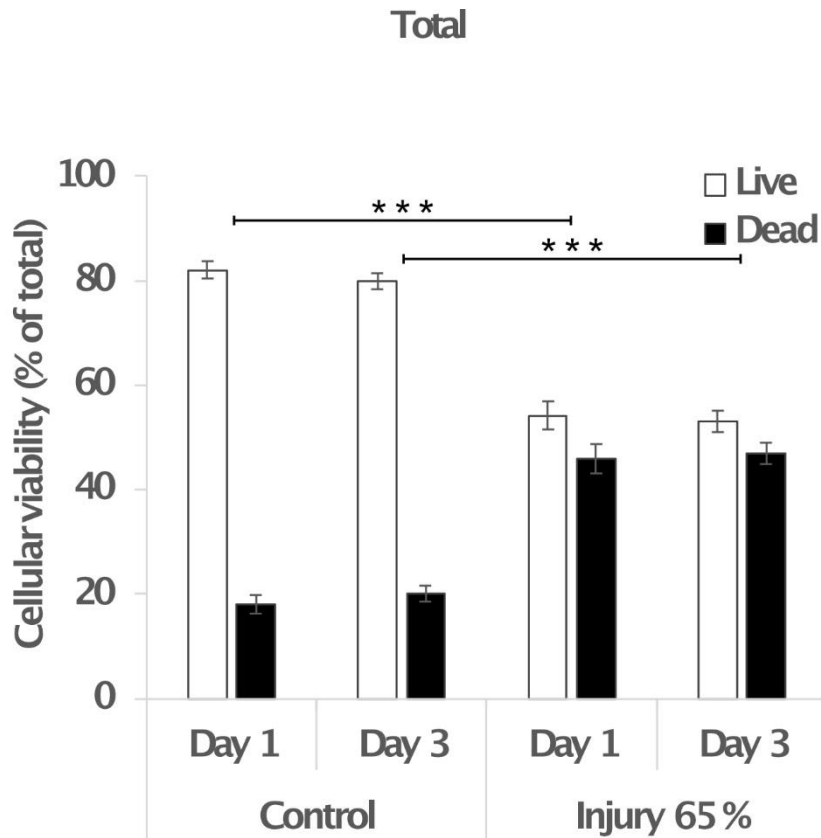


Abbildung 23: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelbenen bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

Bei Betrachtung der drei einzelnen Knorpelbenen (ehemalige Gelenkfläche, mittlere Fläche und Schneidefläche) betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen der jeweiligen Gruppe in der Gelenkfläche nach einem Tag bei Injury (Versuchsgruppe 3) 41,50 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,32 %. Standardabweichung: 9,38 %), in der Kontrollgruppe 3 16,37 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,99 %. Standardabweichung: 5,96 %) und nach drei Tagen bei Injury (Versuchsgruppe 4) 45,25 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,15 %. Standardabweichung: 9,45 %), in der Kontrollgruppe 4 18,42 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,62 %. Standardabweichung: 4,57 %). Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in der

ehemaligen Gelenkfläche war statistisch signifikant und betrug nach einem Tag 25,12 % (ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$, t-Test: $p < 0,001$), nach drei Tagen 26,83 % (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$). Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen (Injury mit Inkubationszeit ein und drei Tage) war statistisch nicht signifikant (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, t-Test: $p = 0,453$) und war an Tag 1 um 3,75 % kleiner als an Tag 3.

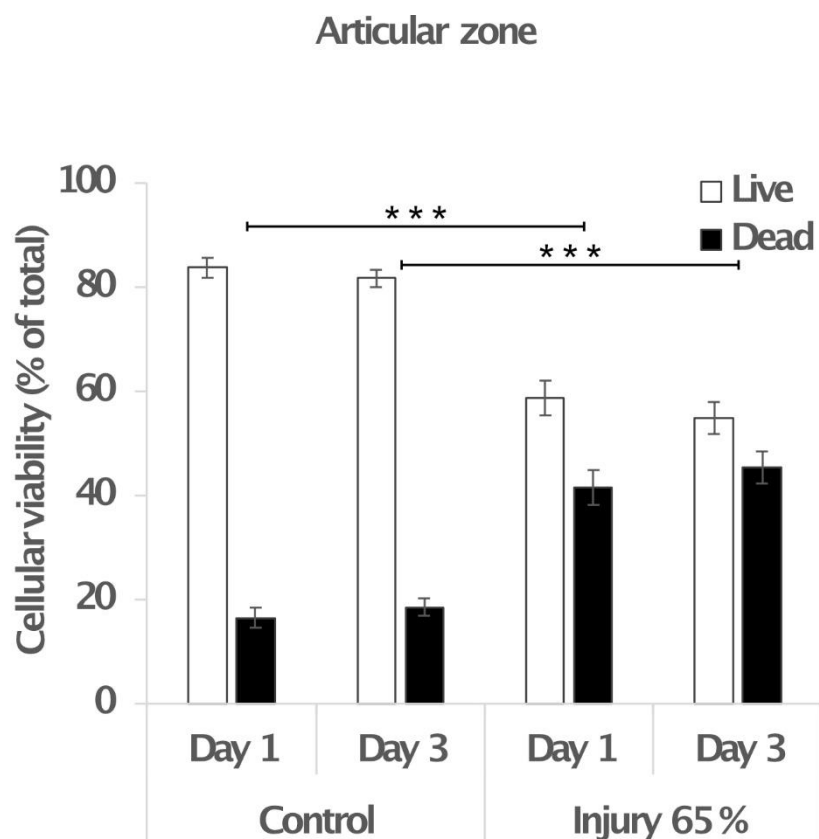


Abbildung 24: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der ehemaligen Gelenkfläche bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

In der Mitte der Knorpel-Disc sowie an der Schneidefläche zeigten sich ähnliche Ergebnisse. In der mittleren Fläche zeigte sich ein Mittelwert des Anteils toter Zellen der jeweiligen Gruppe an Tag 1 nach Injury in der Versuchsgruppe 3 von

44,24 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,95 %. Standardabweichung: 11,18 %), in der Kontrollgruppe von 17,02 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,85 %. Standardabweichung: 8,56 %) mit einer statistisch signifikanten Differenz zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe von 27,22 % (ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$, t-Test: $p < 0,001$). An Tag 3 konnten in der Injury-Gruppe (Versuchsgruppe 4) ein Anteil toter Zellen von 46,15 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,65 %. Standardabweichung: 10,95 %) gemessen werden, in der Kontrollgruppe 4 19,35 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,54 %. Standardabweichung: 7,19 %). Dies entsprach einer statistisch signifikanten Differenz von 26,80 % (ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$, t-Test: $p < 0,001$). Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen (Injury mit Inkubationszeit ein und drei Tage) war statistisch nicht signifikant (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, t-Test: $p = 0,743$) und war an Tag 1 um 1,91 % größer als an Tag 3.

Middle zone

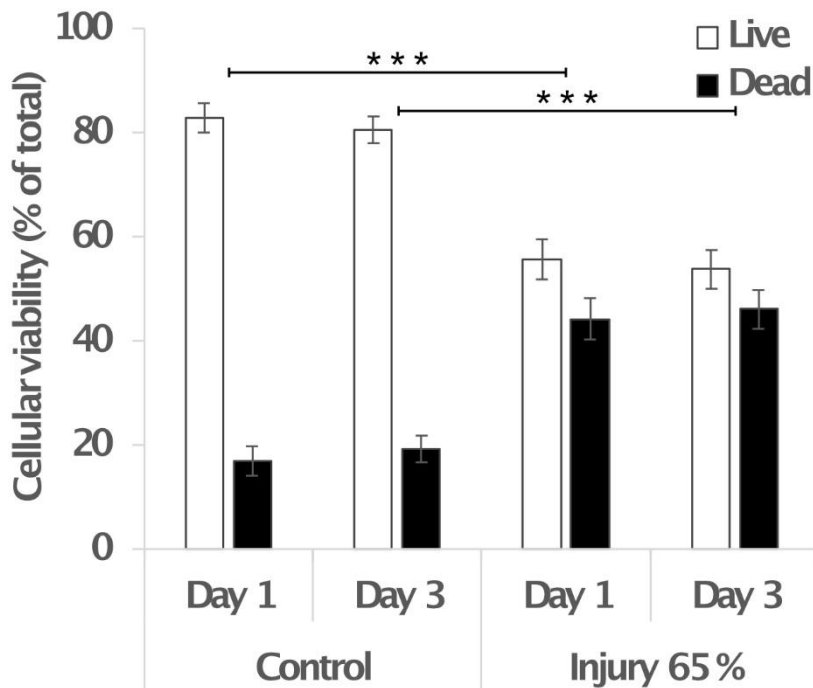


Abbildung 25: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der mittleren Fläche des Knorpels bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

An der Schneidefläche betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen der jeweiligen Gruppe nach einem Tag Inkubationszeit nach Kompressionstrauma (Versuchsgruppe 3) 51,97 % (Standardfehler des Mittelwerts: 5,59 %. Standardabweichung: 15,82 %), in der Kontrollgruppe 3 20,62 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,63 %. Standardabweichung: 10,90 %). Die Differenz zwischen beiden Gruppen war statistisch signifikant und betrug 31,35 % (ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$, t-Test: $p < 0,001$). Nach drei Tagen betrug der Anteil toter Zellen in der Injury-Gruppe (Versuchsgruppe 4) 49,52 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,68 %. Standardabweichung: 11,05 %), in der Kontrollgruppe 22,58 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,08 %. Standardabweichung: 8,72 %) mit einer statistisch signifikanten Differenz

(ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$) von 26,94 %. Der Unterschied des Anteils der toten Zellen zwischen den beiden Versuchsgruppen (Injury mit Inkubationszeit ein und drei Tage) war statistisch nicht signifikant (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, t-Test: $p = 0,731$) und war an Tag 1 um 2,45 % größer als an Tag 3.

Cutting zone

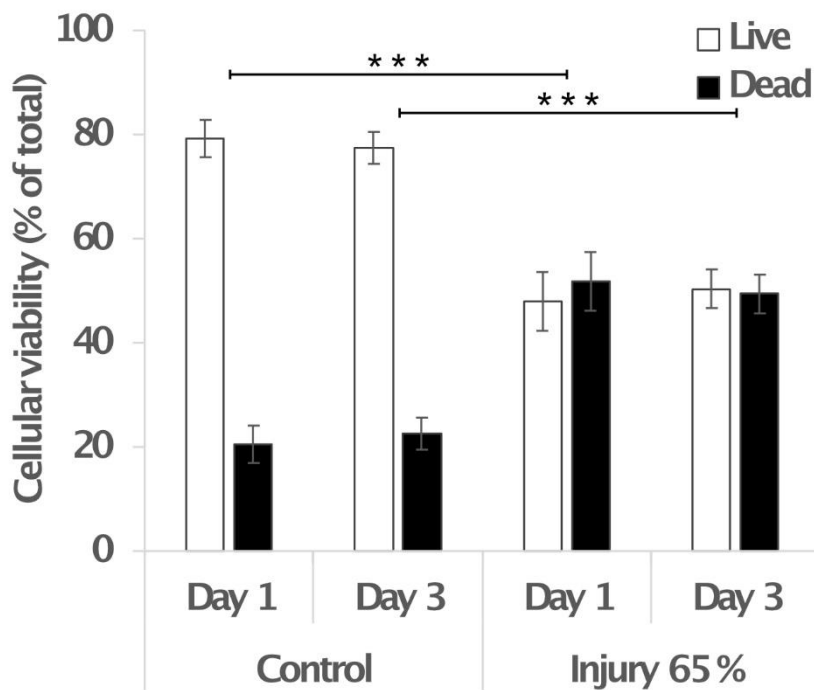


Abbildung 26: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der Schneidefläche des Knorpels bei den Kontroll- und Versuchsgruppen mit einer Kompression von 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

Zusammengefasst führte Injury sowohl bei 50 % als auch bei 65 % Kompression zu einem signifikant höheren Anteil toter Zellen (p-Werte siehe oben).

Im direkten Vergleich der beiden Kompressionen in der Gesamtübersicht der drei Knorpelstadien zeigte sich, dass nach Tag 1 bei 65 % Kompression der

Anteil toter Zellen um statistisch signifikante 9,41 % (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,026$) größer war als bei 50 % Kompression und nach drei Tagen Inkubationszeit um statistisch signifikante 10,86 % (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$).

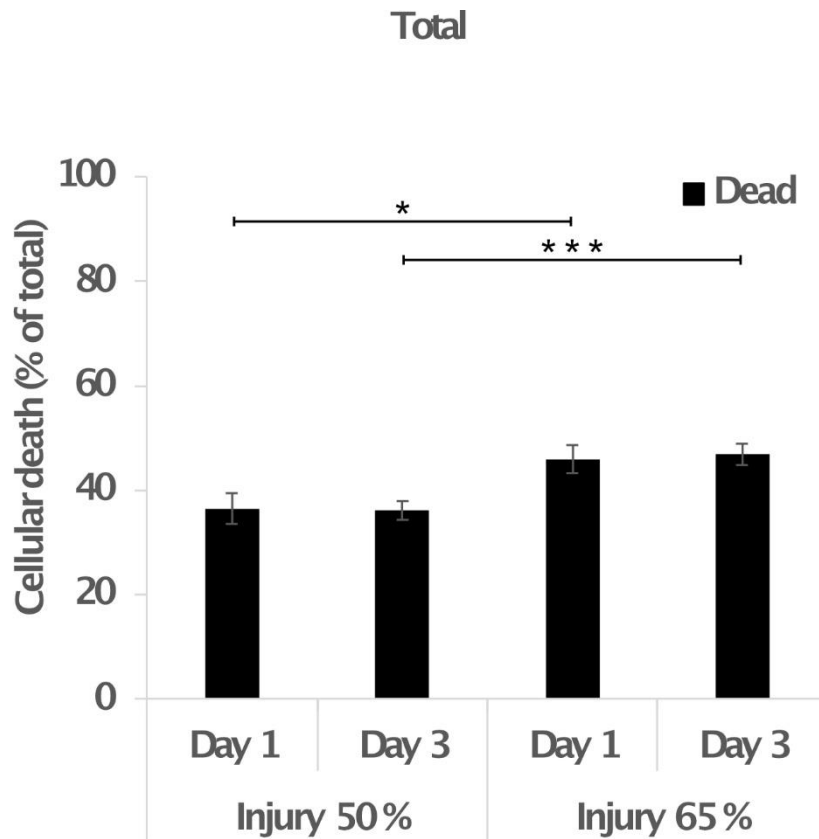


Abbildung 27: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelenebenen bei den Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 beziehungsweise 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

Bei Betrachtung der einzelnen Schichten des Knorpels zeigte sich an der ehemaligen Gelenkfläche ein statistisch nicht signifikanter Unterschied zwischen 50 % und 65 % Kompression von 8,02 % an Tag 1 (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, t-Test: $p = 0,174$) sowie ein statistisch signifikanter Unterschied von 9,73 % an Tag 3 (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,019$, t-Test: $p = 0,049$). In der mittleren Zone betrug der statistisch nicht signifikante Unterschied 10,00 %

an Tag 1 (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,195$) und statistisch signifikante 11,40 % an Tag 3 (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,017$) und an der Schneidefläche statistisch nicht signifikante 10,80 % an Tag 1 (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,268$) sowie statistisch signifikante 11,44 % an Tag 3 (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,013$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,009$).

Articular zone

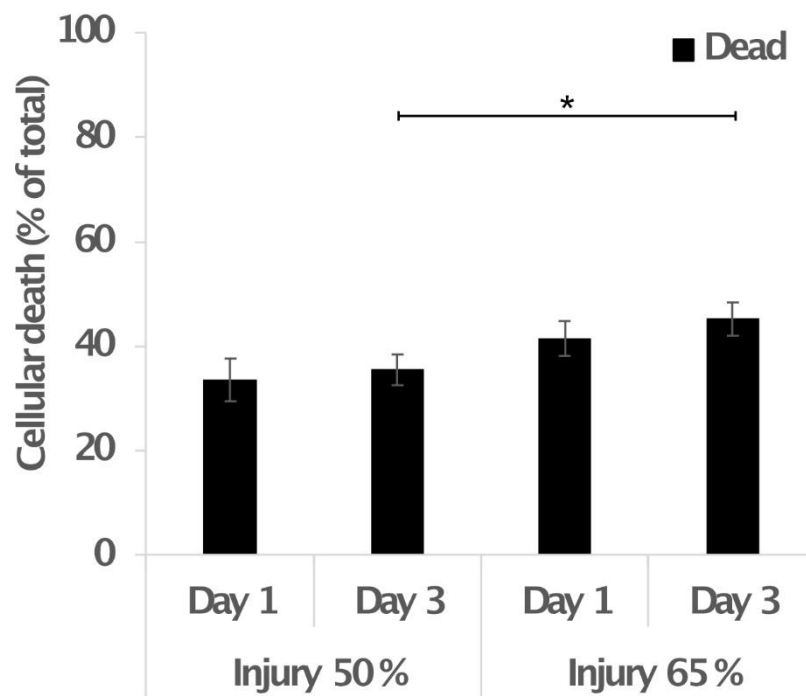


Abbildung 28: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 beziehungsweise 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

Middle zone

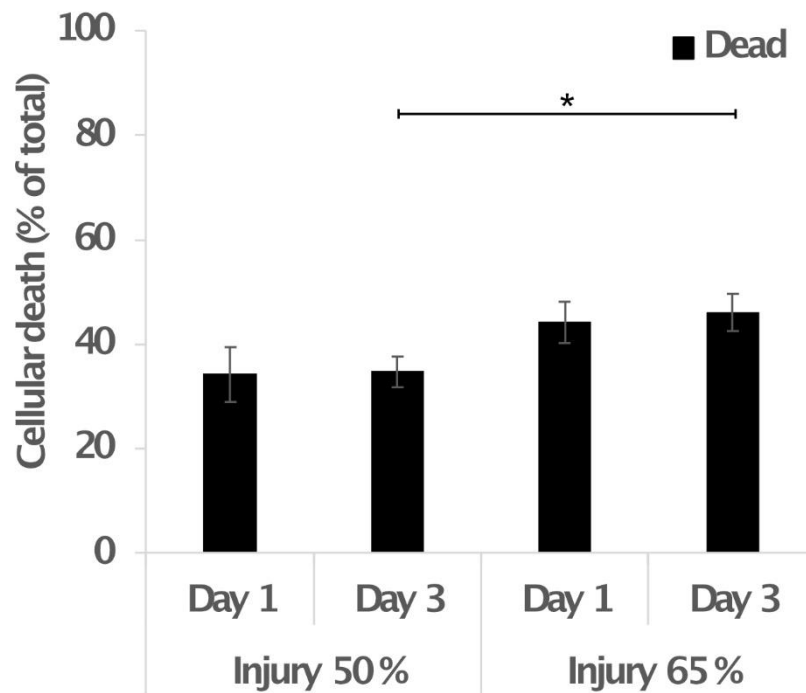


Abbildung 29: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 beziehungsweise 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

Cutting zone

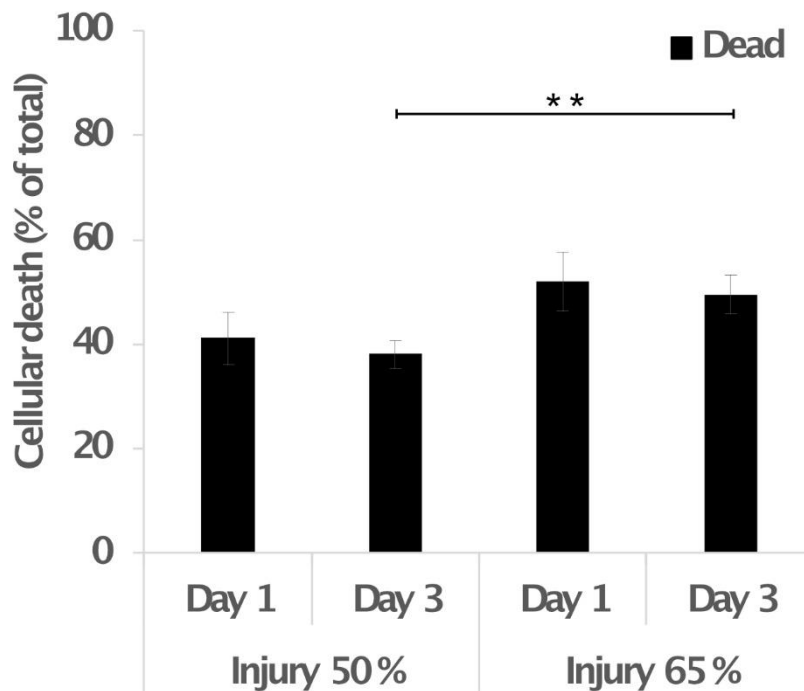


Abbildung 30: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen mit einer Kompression von 50 beziehungsweise 65 % und einer Inkubationsdauer von einem und drei Tagen.

Sowohl bei 50% als auch bei 65% Kompression konnte ein signifikanter Einfluss (p-Werte siehe oben) auf den Anteil toter Zellen nachgewiesen werden. Durch Erhöhung der Kompression und damit der biomechanischen Belastung auf die 300 µm Knorpel-Discs von 50 % der Ausgangshöhe auf 65 % der Ausgangshöhe führte zu einem signifikant höheren Anteil toter Zellen nach drei Tagen Inkubationszeit (alle Flächen: 10,86 %, Gelenkfläche: 9,73 %, mittlere Fläche: 11,40 %, Schneidefläche: 11,44 %). In diesem Experiment wurde nur makroskopisch guter Knorpel genutzt, er wurde aber nicht mikroskopisch charakterisiert. Aus diesem Grund wurde für die Untersuchung mit CCN2 die Kompression mit 65 % ausgeführt.

3.4. Nachweis des Einflusses des Kompressionstraumas auf den Anteil toter Zellen und die Glykosaminoglykanmatrix von Chondrozyten in Knorpel-Discs mit Hilfe von Zelltod-Assays und 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay in Abhängigkeit von An- und Abwesenheit von CCN2

3.4.1. Ermittlung der optimalen Konzentration von CCN2 durch Kompressionstrauma und Inkubation in der Zellkultur mittels Live-Dead-Assay sowie 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assay

Die Herstellung der 300 µm Knorpel-Discs erfolgte, wie in 2.2.2 beschrieben. Die Ausübung des Kompressionstraumas mit 65 %, die Inkubation mit und ohne CCN2 über drei Tage und die anschließende Live-Dead-Färbung mit Fluoreszenzmikroskopie erfolgte, wie in 2.5.2, 2.4.5, 2.3.2, 2.3.4 beziehungsweise 2.5.3 aufgeführt. Das DMMB-Assay wurde, wie in 2.6 beschrieben, durchgeführt. Die Daten wurden mit Excel ausgewertet. Es wurde makroskopisch guter Knorpel ohne Charakterisierung der SCSO genutzt.

Es wurden 5 Versuchsgruppen für die Live-Dead-Färbung gebildet:

Versuchsgruppe 1: Injury mit Inkubation mit 0 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 2: Injury mit Inkubation mit 50 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 3: Injury mit Inkubation mit 100 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 4: Injury mit Inkubation mit 150 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 5: Injury mit Inkubation mit 200 ng/ml CCN2

Es wurden 5 Versuchsgruppen für das DMMB-Assay gebildet:

Versuchsgruppe 1: Injury mit Inkubation mit 0 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 2: Injury mit Inkubation mit 50 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 3: Injury mit Inkubation mit 100 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 4: Injury mit Inkubation mit 150 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 5: Injury mit Inkubation mit 200 ng/ml CCN2

Für den Versuchsansatz wurden Proben von 16 Gewebespendern gewonnen. Die Gesamtanzahl der hergestellten Knorpel-Discs betrug 285. In die Auswertung gingen 273 Proben ein, 11 Proben konnten aus zeitlichen Gründen nicht mittels Live-Dead-Färbung gemessen werden, 1 Probe musste aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme bei der Live-Dead-Färbung ausgeschlossen werden. Für die Versuchsgruppen 1 bis 5 der Live-Dead-Färbung wurden Proben von 6 Gewebespendern mit einer Gesamt-Disc-Anzahl von 107 gewonnen, davon gingen 95 in die Auswertung ein. Versuchsgruppe 1 beinhaltete davon 22 Knorpel-Discs, davon wurden 20 in die Auswertung eingeschlossen, 2 konnten aus zeitlichen Gründen nicht gemessen werden. Versuchsgruppe 2 bestand aus 21, Versuchsgruppe 3 aus 22 und Versuchsgruppe 5 20 Knorpel-Discs, davon wurden 19, 20 und 20 in die Auswertung eingeschlossen, jeweils 2 Knorpel-Discs konnten aus zeitlichen Gründen nicht gemessen werden. Versuchsgruppe 4 bestand aus 22 Knorpel-Discs, davon wurden 19 in die Auswertung eingeschlossen, 3 Knorpel-Discs konnten aus zeitlichen Gründen nicht gemessen werden, 1 Knorpel-Disc musste aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden.

Tabelle 19: Übersicht aller für die Live-Dead-Färbung vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG.

	Alle Discs	Zeitlich nicht geschafft	Fehlende Calcein-Aufnahme	Genutzte Discs
VG 1	22	2	0	20
VG 2	21	2	0	19
VG 3	22	2	0	20
VG 4	22	3	1	18
VG 5	20	2	0	18
Gesamt	107	11	1	95

Tabelle 20: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen aller genutzten Discs für die Live-Dead-Färbung inklusive Standardfehler und Standardabweichung mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG.

	Durchschnittliche Disc-Höhe [μm]	Standardfehler des Mittelwerts [μm]	Standardabweichung [μm]
VG 1	155,19	9,07	40,55
VG 2	150,28	12,33	50,84
VG 3	153,61	11,05	46,88
VG 4	169,44	7,71	32,70
VG 5	164,54	10,19	40,76
Gesamt	158,49	4,59	43,29

Für die Versuchsgruppen 1 bis 5 des DMMB-Assays wurden Proben von 12 Gewebespendern mit einer Gesamt-Disc-Anzahl von 178 gewonnen, davon gingen alle in die Auswertung ein. Versuchsgruppe 1 und 4 beinhalteten jeweils 37 Knorpel-Discs, Versuchsgruppe 2 und 3 jeweils 36 und Versuchsgruppe 5 32 Knorpel-Discs.

Tabelle 21: Übersicht aller für das DMMB-Assay vorgesehenen und genutzten Discs mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG.

	Alle Discs	Genutzte Discs
VG 1	37	37
VG 2	36	36
VG 3	36	36
VG 4	37	37
VG 5	32	32
Gesamt	178	178

Nach Kompressionstrauma der Knorpel-Discs und Inkubation mit 0 bis 200 ng/ml CCN2 wurde drei Tage nach Injury mittels Fluoreszenzmikroskopie der Anteil lebender und toter Zellen bestimmt. In der Summe aller drei Knorpel-ebenen betrug der der Mittelwert des Anteils toter Zellen bei 0 ng/ml CCN2 38,89 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,62 %. Standardabweichung: 12,56 %), bei 50 ng/ml CCN2 37,45 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,56 %. Standardabweichung: 11,13 %), bei 100 ng/ml CCN2 36,26 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,75 %. Standardabweichung: 12,87 %), bei 150 ng/ml CCN2 28,50 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,25 %. Standardabweichung: 9,16 %) und bei 200 ng/ml CCN2 35,30 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,96 %. Standardabweichung: 13,60 %). Es wurde die Differenz zum Mittelwert des Anteils toter Zellen der Versuchsgruppe 1 mit 0 ng/ml gebildet, hier ergab sich für 150 ng/ml CCN2 eine statistisch signifikante Differenz und folglich signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen um 10,40 % (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$). Die Differenzen für 50 ng/ml CCN2 mit 1,44 %, 100 ng/ml CCN2 mit 2,64 % und 200 ng/ml CCN2 mit 3,59 % waren statistisch nicht signifikant (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$).

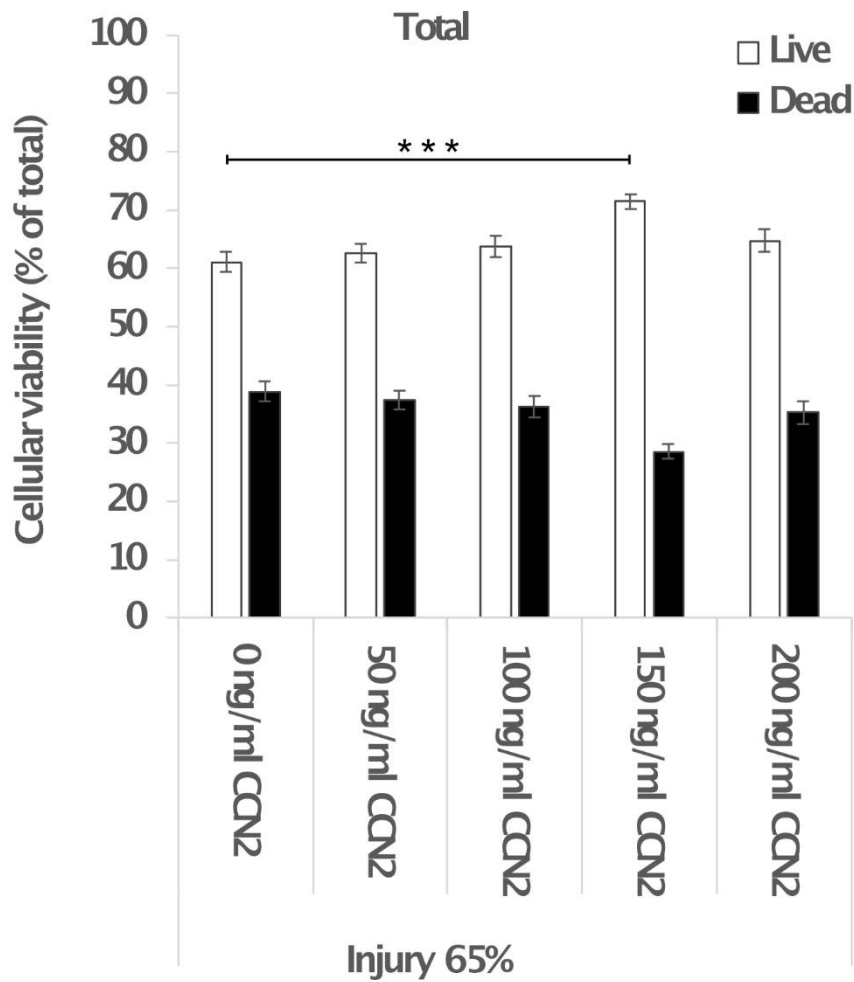


Abbildung 31: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpel-ebenen bei den Versuchsgruppen 1 bis 5 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2, 50 ng/ml CCN2, 100 ng/ml CCN2, 150 ng/ml CCN2 und 200 ng/ml CCN2.

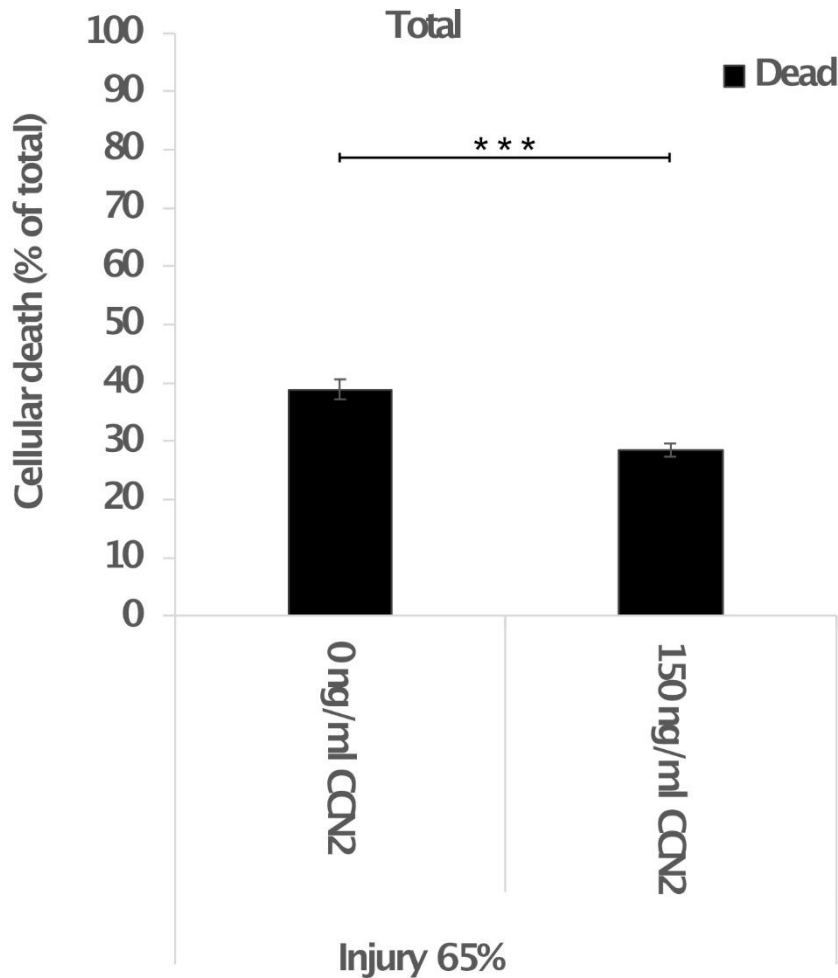


Abbildung 32: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelbenen bei den Versuchsgruppen 1 und 4 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 4).

Bei Betrachtung der drei einzelnen Knorpelbenen (ehemalige Gelenkfläche, mittlere Fläche und Schneidefläche) betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen der jeweiligen Gruppe in der Gelenkfläche nach Inkubation über drei Tage mit 0 ng/ml CCN2 37,62 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,48 %. Standardabweichung: 11,09 %), 50 ng/ml CCN2 36,50 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,36 %. Standardabweichung: 9,72 %), 100 ng/ml CCN2 35,72 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,03 %. Standardabweichung: 12,86 %), 150 ng/ml CCN2 26,66 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,62 %. Standardabweichung: 6,87 %) sowie 200 ng/ml CCN2 33,90 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,79 %. Standardabweichung: 15,17 %). Erneut wurde jeweils

die Differenz zum Mittelwert des Anteils toter Zellen der Versuchsgruppe 1 mit 0 ng/ml CCN2 gebildet. Bei 150 ng/ml CCN2 ergab sich eine statistisch signifikante Differenz und damit eine signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen um 10,96 % (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,004$). Die Differenzen für 50 ng/ml CCN2 mit 1,11 %, 100 ng/ml CCN2 mit 1,90 % und 200 ng/ml CCN2 mit 3,72 % waren statistisch nicht signifikant (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$).

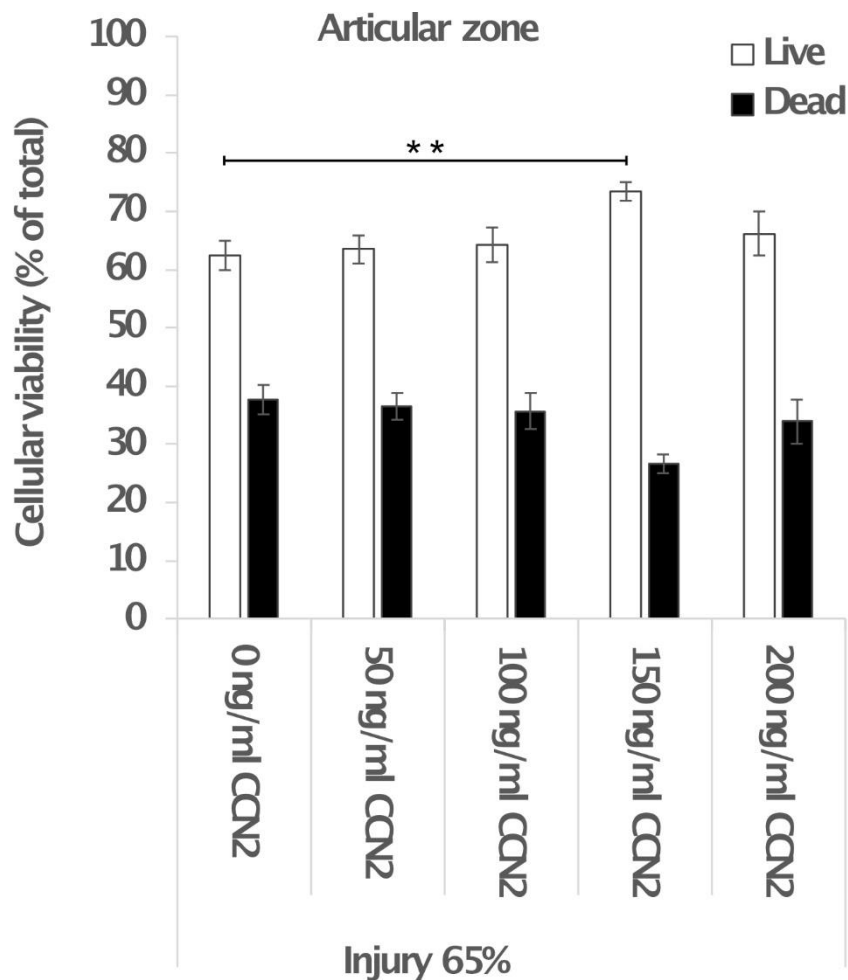


Abbildung 33: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 bis 5 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2, 50 ng/ml CCN2, 100 ng/ml CCN2, 150 ng/ml CCN2 und 200 ng/ml CCN2.

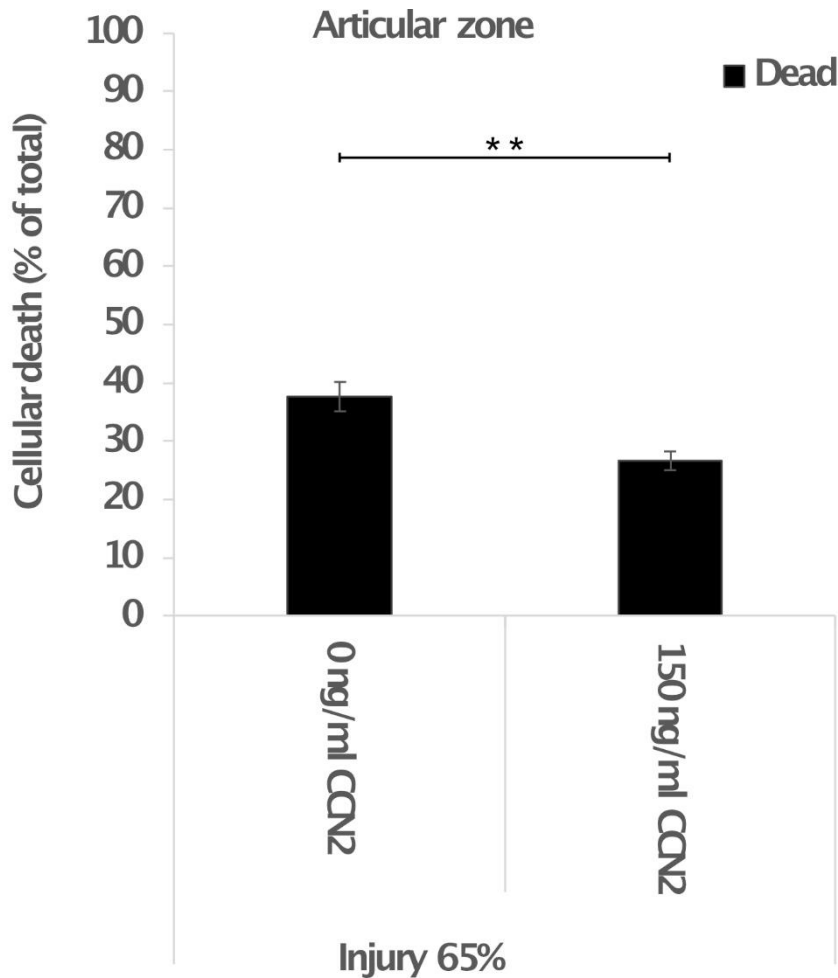


Abbildung 34: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 4 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 4).

In der Mitte der Knorpel-Disc sowie an der Schneidefläche zeigten sich ähnliche Ergebnisse. In der mittleren Fläche betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen nach Inkubation über drei Tage mit 0 ng/ml CCN2 38,70 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,85 %. Standardabweichung: 12,74 %), 50 ng/ml CCN2 36,23 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,52 %. Standardabweichung: 10,41 %), 100 ng/ml CCN2 36,02 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,27 %. Standardabweichung: 13,87 %), 150 ng/ml CCN2 27,23 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,89 %. Standardabweichung: 8,00 %) sowie 200 ng/ml CCN2 34,32 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,47 %. Standardabweichung: 13,90 %). In der Differenz zur Versuchsgruppe 1 mit 0 ng/ml ergab sich bei 150 ng/ml

CCN2 eine statistisch signifikante Differenz und damit eine signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen um 11,47 % (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, t-Test: $p = 0,003$). Die Differenzen für 50 ng/ml CCN2 mit 2,46 %, 100 ng/ml CCN2 mit 2,67 % und 200 ng/ml CCN2 mit 4,37 % waren statistisch nicht signifikant (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$).

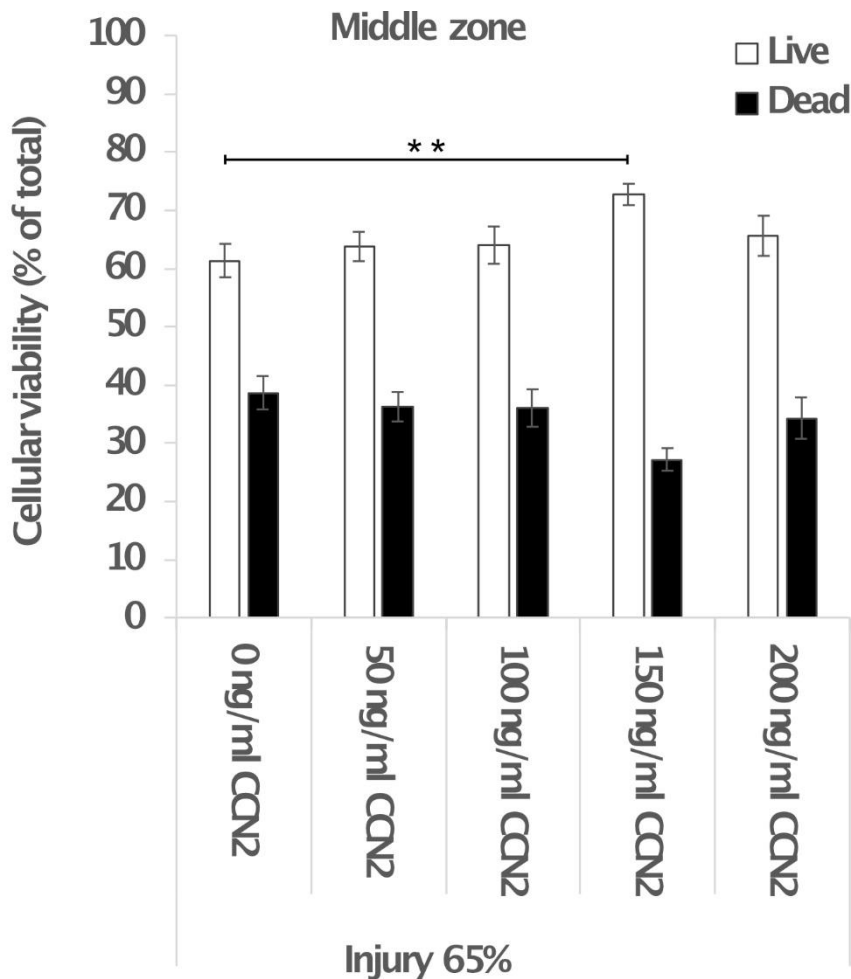


Abbildung 35: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 bis 5 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2, 50 ng/ml CCN2, 100 ng/ml CCN2, 150 ng/ml CCN2 und 200 ng/ml CCN2.

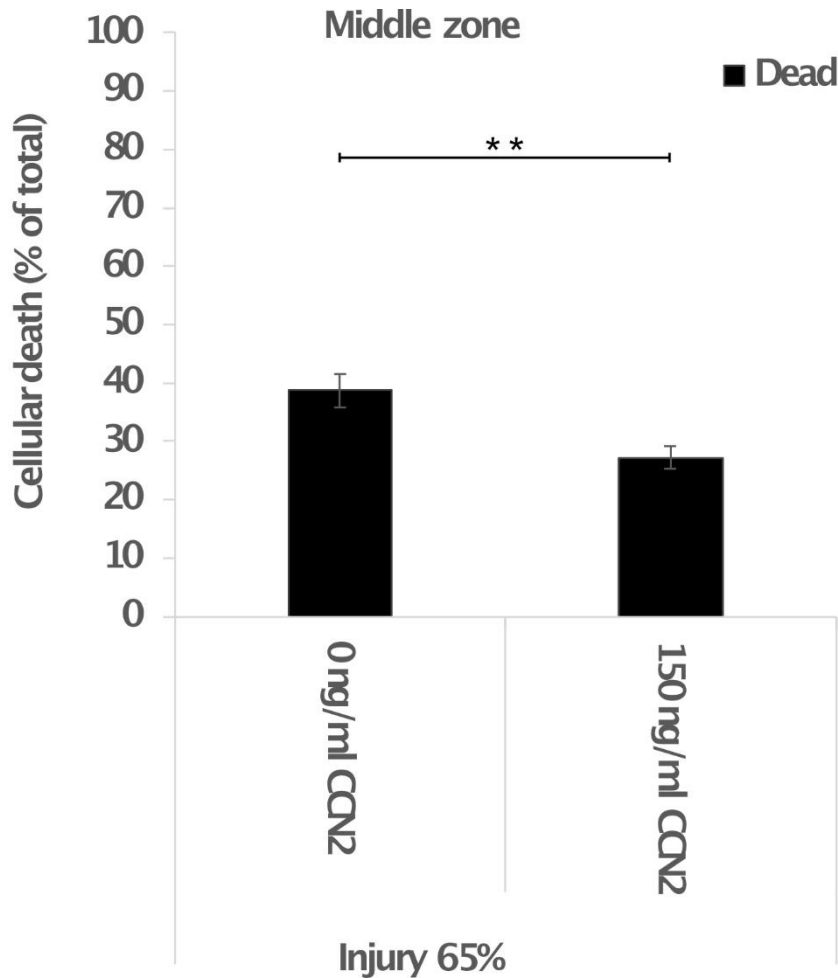


Abbildung 36: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 4 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 4).

An der Schneidefläche war der Mittelwert des Anteils toter Zellen der jeweiligen Gruppe nach drei Tagen Inkubationszeit mit 0 ng/ml CCN2 40,36 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,04 %. Standardabweichung: 13,58 %), bei 50 ng/ml CCN2 39,63 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,08 %. Standardabweichung: 12,71 %), 100 ng/ml CCN2 37,03 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,77 %. Standardabweichung: 11,75 %), 150 ng/ml CCN2 31,60 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,65 %. Standardabweichung: 11,23 %) sowie 200 ng/ml CCN2 37,69 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,77 %. Standardabweichung: 11,10 %). In der Differenz zu den Mittelwerten des Anteils toter Zellen der Versuchsgruppe 1 mit 0 ng/ml ergab sich bei 150 ng/ml

CCN2 eine statistisch signifikante Differenz und damit eine signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen um 8,76 % (t-Test: $p = 0,043$). Die Differenzen für 50 ng/ml CCN2 mit 0,73 %, 100 ng/ml CCN2 mit 3,33 % und 200 ng/ml CCN2 mit 2,67 % waren statistisch nicht signifikant (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,246$).

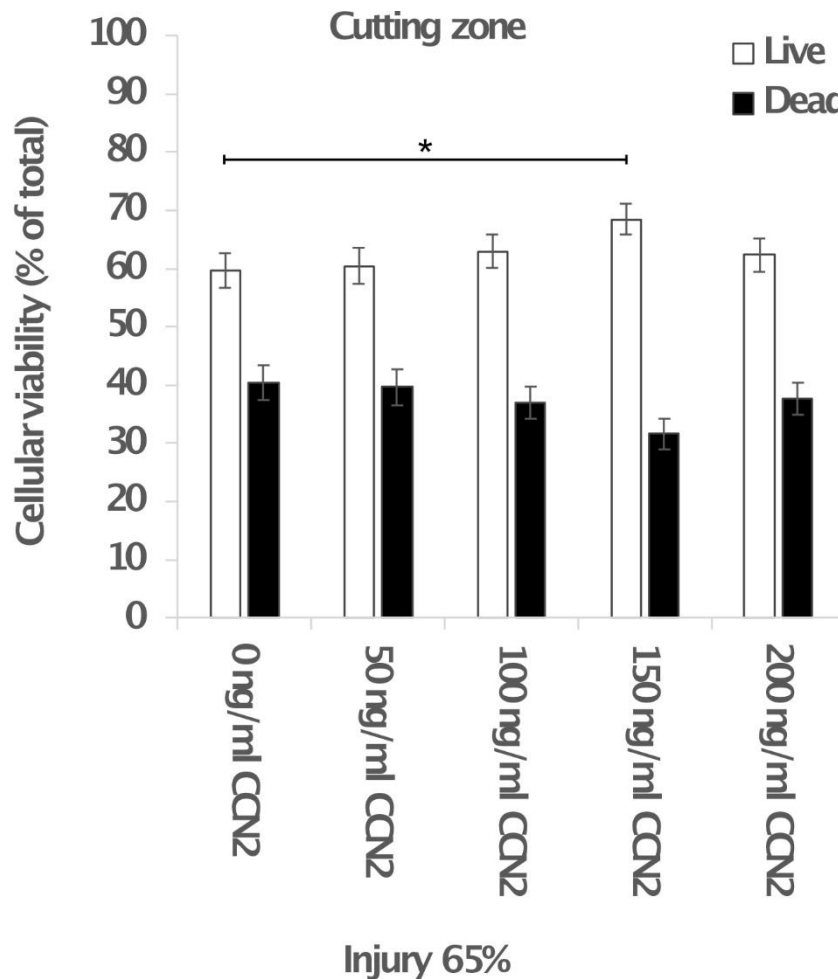


Abbildung 37: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 bis 5 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2, 50 ng/ml CCN2, 100 ng/ml CCN2, 150 ng/ml CCN2 und 200 ng/ml CCN2.

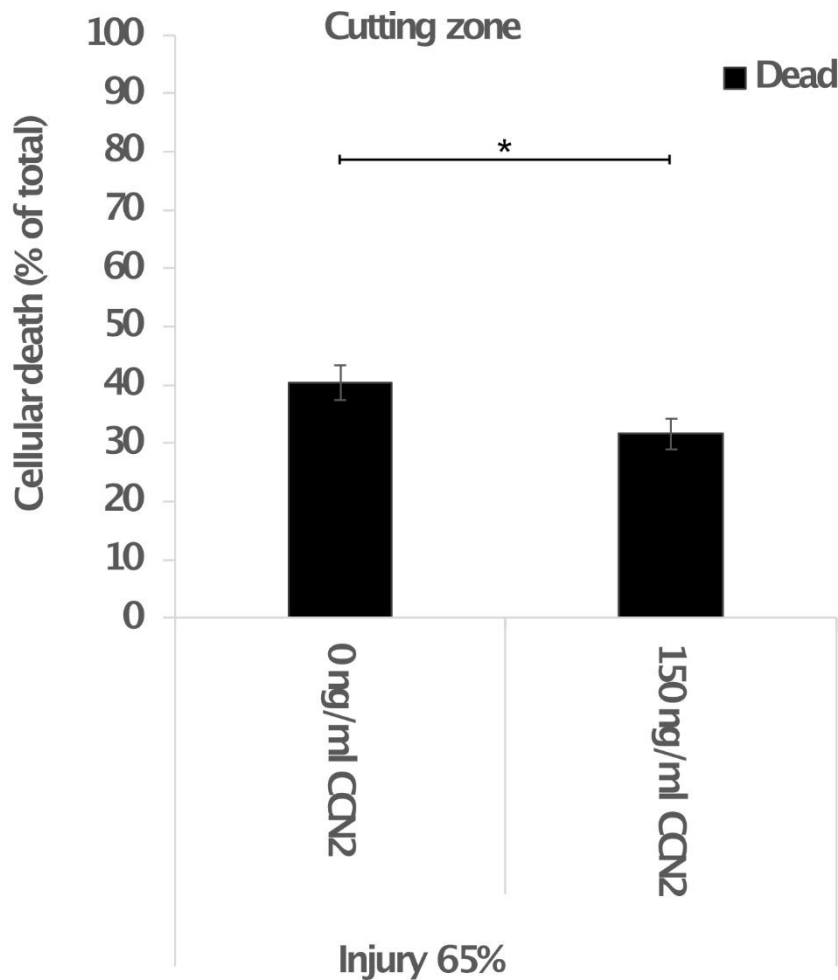


Abbildung 38: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 4 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 4).

Nach Kompressionstrauma der Knorpel-Discs und Inkubation mit 0 bis 200 ng/ml CCN2 wurde drei Tage nach Injury mittels DMMB-Assay der Anteil der sulfatierten GAG in den Knorpel-Discs sowie der Verlust an sulfatierten GAG aus den Knorpel-Discs in das Medium bestimmt. Der Verlust an sulfatierten GAG aus den Knorpel-Discs in das Kulturmedium betrug bei 0 ng/ml CCN2 24,72 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,36 %. Standardabweichung: 8,25 %), bei 50 ng/ml 21,47 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,44 %. Standardabweichung: 8,63 %), bei 100 ng/ml 25,27 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,84 %. Standardabweichung: 11,06 %), bei 150 ng/ml 22,14 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,54 %. Standardabweichung: 9,39 %) sowie

bei 200 ng/ml 27,48 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,83 %. Standardabweichung: 10,37 %). Die Unterschiede waren statistisch nicht signifikant (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,053$).

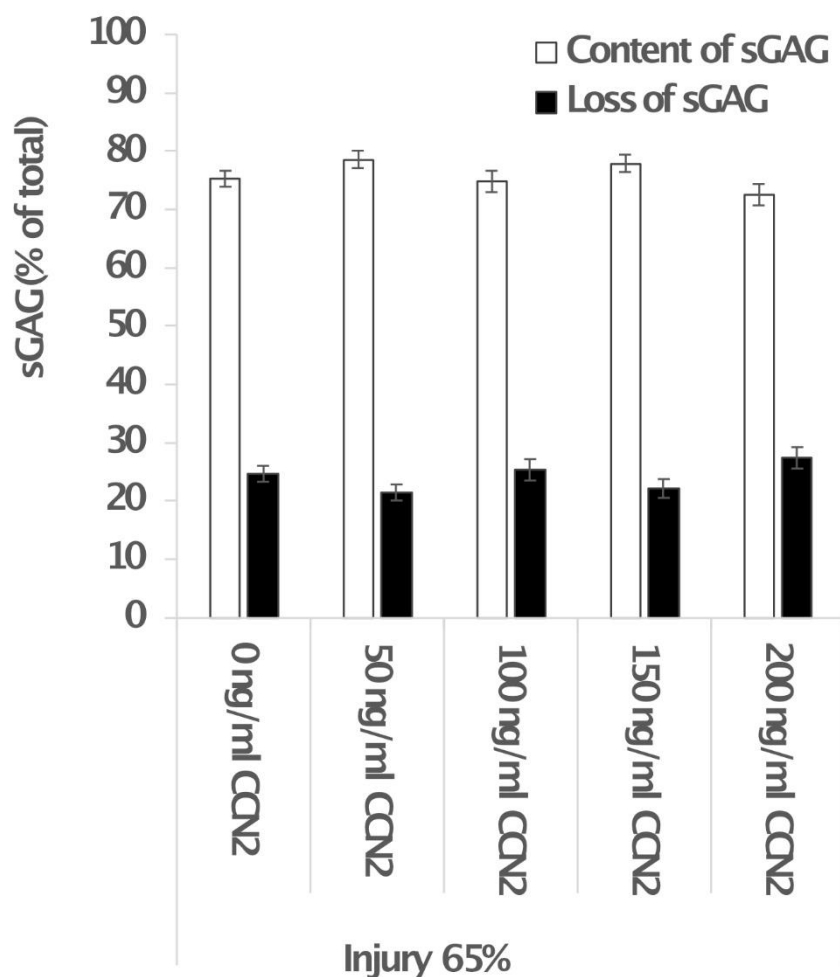


Abbildung 39: Darstellung der Ergebnisse des DMMB-Assays bei den Versuchsgruppen 1 bis 5 nach Kompressionstrauma und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit 0 ng/ml CCN2, 50 ng/ml CCN2, 100 ng/ml CCN2, 150 ng/ml CCN2 und 200 ng/ml CCN2.

Die optimale CCN2-Konzentration zur signifikanten Reduktion des Anteils toter Zellen betrug 150 ng/ml. Beim DMMB-Assay konnte in den Versuchsgruppen kein signifikanter Einfluss auf den Verlust an sulfatierten GAG aus den Knorpel-Discs in das Kulturmedium nachgewiesen werden.

3.4.2. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 bei einem Tag Inkubationszeit mit Hilfe des Live-Dead-Assays

Die Herstellung der 300 µm Knorpel-Discs erfolgte, wie in 2.2.2 beschrieben. Die Ausübung des Kompressionstraumas, die Inkubation und die anschließende Live-Dead-Färbung mit Fluoreszenzmikroskopie erfolgte, wie in 2.5.2, 2.4.5, 2.3.2, 2.3.4 beziehungsweise 2.5.3 aufgeführt. Die Daten wurden mit Excel ausgewertet. Es wurde makroskopisch guter Knorpel zu Beginn ohne, im Verlauf mit Charakterisierung der SCSO genutzt. Es wurden im Verlauf nur Knorpel-Discs mit S- und DS-SCSO ausgesucht und für die Experimente genutzt. Es wurden 2 Versuchsgruppen und 2 Kontrollgruppen gebildet:

Versuchsgruppe 1: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 1 Tag mit 150 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 1: Kein Injury, Inkubationsdauer 1 Tag mit 150 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 2: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 1 Tag mit 0 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 2: Kein Injury, Inkubationsdauer 1 Tag mit 0 ng/ml CCN2

Für den Versuchsansatz wurden Proben von 7 Gewebespendern gewonnen. 1 kompletter Patient mit 12 Knorpel-Discs musste wegen fehlender Calcein-Aufnahme in allen Gruppen ausgeschlossen werden, 6 Gewebespenden gingen in die Auswertung ein. Die Gesamtanzahl der hergestellten Knorpel-Discs betrug 49 In die Auswertung gingen 33 Proben ein, 4 Knorpel-Discs wiesen in ihrer Oberfläche Risse auf, 12 Proben eines Gewebespenders mussten aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme bei der Live-Dead-Färbung ausgeschlossen werden. Versuchsgruppe 1 beinhaltete davon 13 Knorpel-Discs, davon wurden 8 in die Auswertung eingeschlossen, 2 Knorpel-Discs wiesen in der Oberfläche Risse auf, 3 Knorpel-Discs mussten aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden. Kontrollgruppe 1 bestand aus 12 Knorpel-Discs, davon wurden 7 in die Wertung eingeschlossen, 2 Knorpel-Discs wiesen in ihrer Oberfläche Risse auf, 3 Probe musste aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme bei der Live-Dead-Färbung ausgeschlossen werden. Versuchsgruppe 2 beinhaltete 12 Knorpel-Discs, davon wurden 9 in die

Auswertung eingeschlossen, 3 Knorpel-Disc musste aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden. Kontrollgruppe 2 bestand aus 12 Knorpel-Discs, davon wurden 9 in die Auswertung eingeschlossen, 3 Knorpel-Disc musste aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden.

Tabelle 22: Übersicht aller für das Experiment vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien mit einer Inkubationszeit von einem Tag. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Alle Discs	Zeitlich nicht geschafft	Risse in der Disc	Oberflächenstörung	Fehlende Calcein-Aufnahme	Genutzte Discs
VG 1	13	0	2	0	3	8
KG 1	12	0	2	0	3	7
VG 2	12	0	0	0	3	9
KG 2	12	0	0	0	3	9
Gesamt	49	0	4	0	12	33

Tabelle 23: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen aller genutzten Discs inklusive Standardfehler und Standardabweichung mit einer Inkubationszeit von einem Tag. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Durchschnittliche Disc-Höhe [μm]	Standardfehler des Mittelwerts [μm]	Standardabweichung [μm]
VG 1	130,57	13,21	37,37
KG 1	134,10	8,42	22,28
VG 2	157,52	13,88	41,64
KG 2	152,25	15,74	47,23
Gesamt	144,58	7,09	40,72

Nach Kompression der Knorpel-Discs um 65 % der Ausgangshöhe wurden ein Tag nach Injury mittels Fluoreszenzmikroskopie der Mittelwert des Anteils lebender und toter Zellen in den jeweiligen Versuchsgruppen bestimmt, ebenso bei den jeweiligen Kontrollgruppen. Nach einer Inkubationszeit von einem Tag betrug der Mittelwert des Anteils der toten Zellen in der Gesamtübersicht der drei Knorpelenebenen in der Gruppe mit Injury und Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) 11,22 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,75 %. Standardabweichung: 3,66 %), bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) 17,61 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,57%. Standardabweichung: 8,14 %). Bei Betrachtung der Gruppen ohne Injury zeigte sich bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) ein Anteil toter Zellen von 11,02 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,71 %. Standardabweichung: 3,27%), bei 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) von 13,84 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,51 %. Standardabweichung: 2,65 %).

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen konnte zwischen der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) ein signifikanter Unterschied zugunsten der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) festgestellt werden.

Hierbei zeigte sich in Versuchsgruppe 1 ein um 6,39 % geringer Anteil toter Zellen als in Versuchsgruppe 2 (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,002$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 0,19 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,991$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 2,63 % signifikant geringerer Anteil toter Zellen (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,005$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 6,58 % signifikant größer als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 3,76 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,132$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 2,82 % signifikant geringer als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, t-Test: $p = 0,002$).

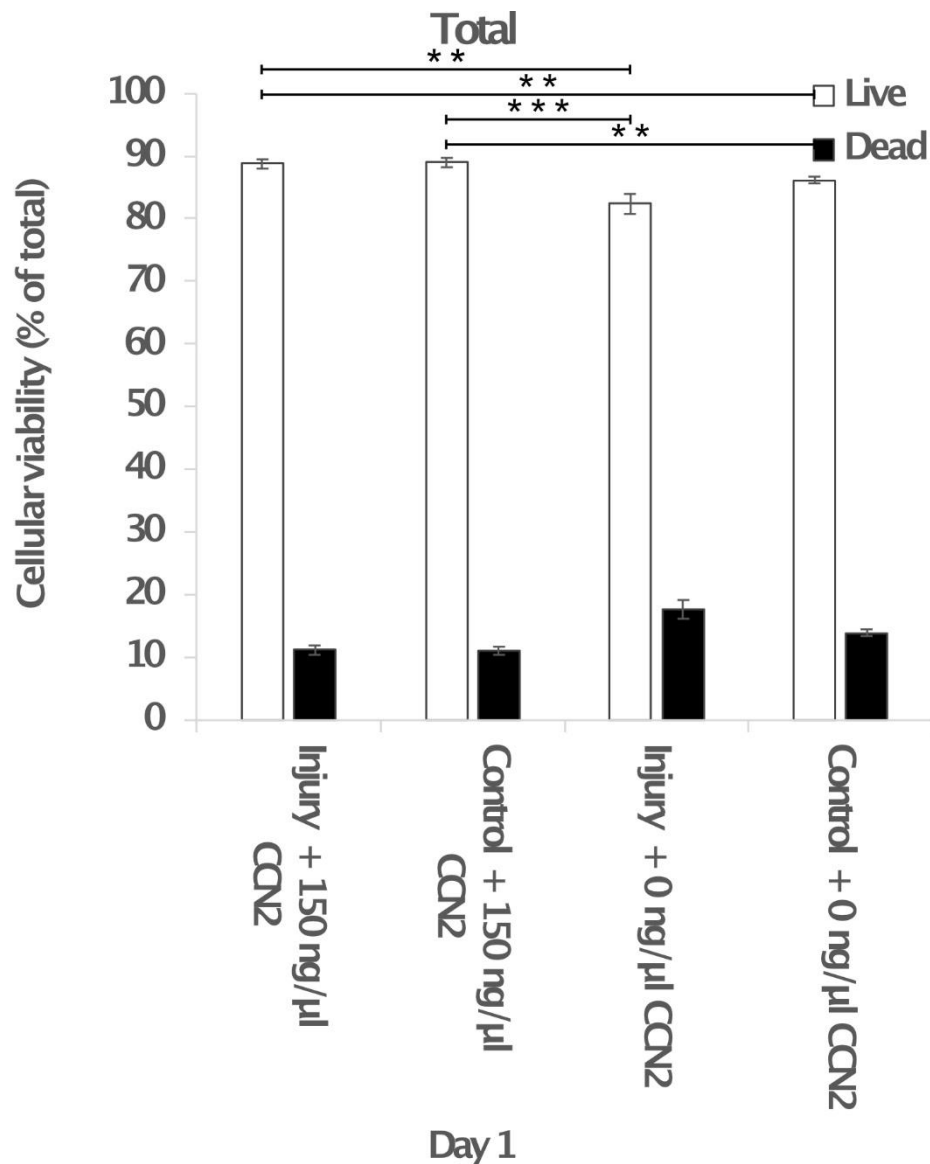


Abbildung 40: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelbenen bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Bei Betrachtung der drei einzelnen Knorpelbenen (ehemalige Gelenkfläche, mittlere Fläche und Schneidefläche) betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen in der Gelenkfläche nach Injury und Inkubation über einen Tag mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) 10,38 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,97 %. Standardabweichung: 2,74 %), nach Injury und 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) 15,72 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,56 %. Standardabweichung: 4,69 %). In den Kontrollgruppen wurde ein Anteil toter

Zellen bei Inkubation mit 150 ng/ml CNN2 (Kontrollgruppe 1) von 10,24 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,05 %. Standardabweichung: 2,77 %), bei 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) von 14,42 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,79 %. Standardabweichung: 2,38 %) detektiert.

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen konnte zwischen der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) ein signifikanter Unterschied zugunsten der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) festgestellt werden. Hierbei zeigte sich in Versuchsgruppe 1 ein um 5,34 % geringerer Anteil toter Zellen als in Versuchsgruppe 2 (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,039$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 0,15 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (t-Test: $p = 0,926$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 4,03 % signifikant geringerer Anteil toter Zellen (t-Test: $p = 0,008$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 5,49 % signifikant größer als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (t-Test: $p = 0,022$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 1,31 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,536$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 4,18 % signifikant geringer als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (t-Test: $p = 0,009$).

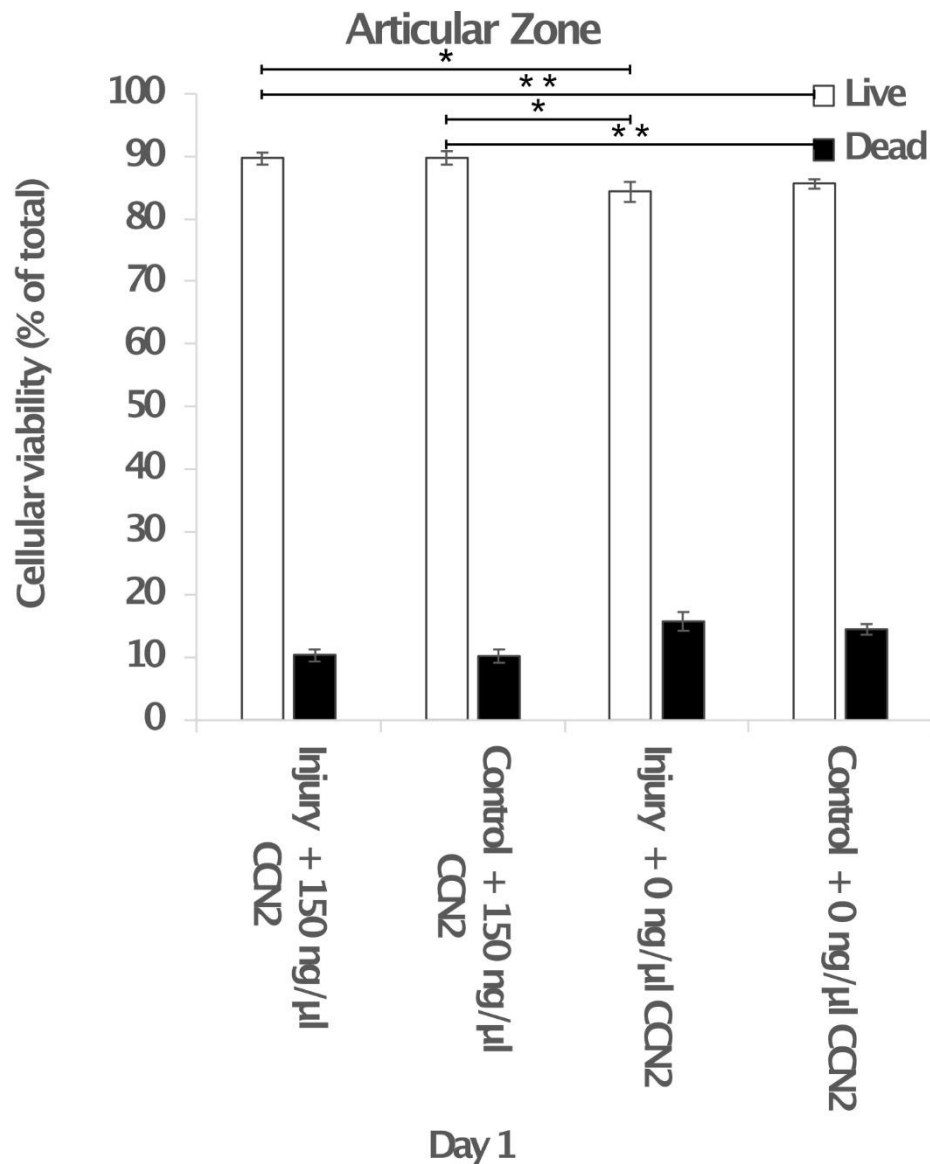


Abbildung 41: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

In der Mitte der Knorpel-Disc sowie an der Schneidefläche zeigten sich ähnliche Ergebnisse. In der mittleren Fläche wurde nach Injury und Inkubation über einen Tag mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) ein Mittelwert des Anteils toter Zellen von 9,86 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,98 %. Standardabweichung: 2,77 %), nach Injury und 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) von 21,22 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,61 %. Standardabweichung: 10,82 %) gemessen. In den Kontrollgruppen lag der Mittelwert des Anteils toter

Zellen bei Inkubation mit 150 ng/ml CNN2 bei 10,20 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,89 %. Standardabweichung: 2,35 %) und mit 0 ng/ml bei 13,82 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,78 %. Standardabweichung: 2,34 %).

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen konnte zwischen der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) ein signifikanter Unterschied zugunsten der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) festgestellt werden. Hierbei zeigte sich in Versuchsgruppe 1 ein um 11,36 % geringerer Anteil toter Zellen als in Versuchsgruppe 2 (t-Test: $p = 0,034$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 0,34 % geringer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 1,000$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 3,96 % signifikant geringerer Anteil toter Zellen (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,030$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 11,02 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, t-Test: $p = 0,053$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 7,40 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (t-Test: $p = 0,400$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 3,62 % signifikant geringer als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,034$).

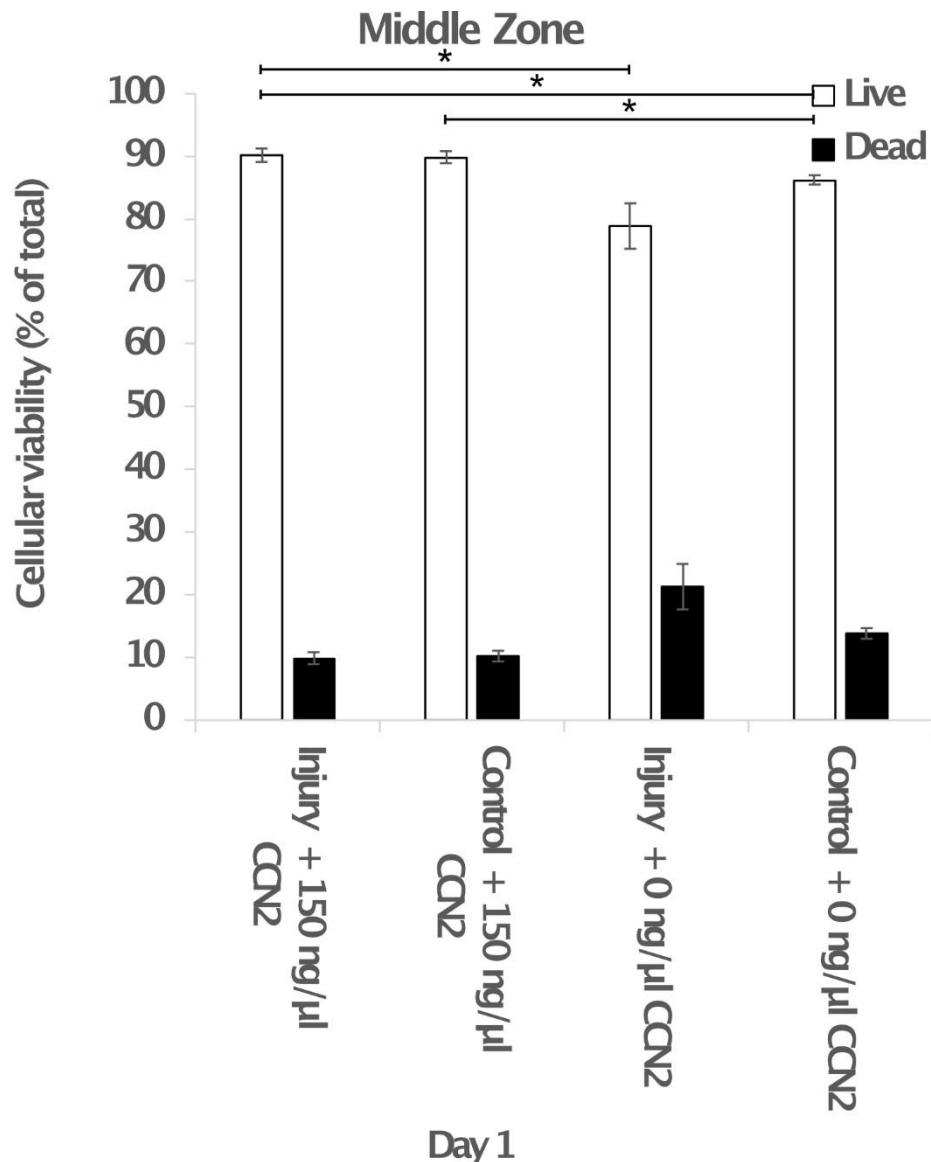


Abbildung 42: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

An der Schneidefläche betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen nach Injury und Inkubation über einen Tag mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) 13,41 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,49 %. Standardabweichung: 4,22 %), nach Injury und 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) 21,21 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,61 %. Standardabweichung: 10,82 %). In den Kontrollgruppen lag der Mittelwert des Anteils toter Zellen bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) bei 12,64 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,46 %.

Standardabweichung: 3,86 %) und mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) bei 13,30 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,02 %. Standardabweichung: 3,05 %).

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen konnte zwischen der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es zeigte sich in Versuchsgruppe 1 ein um 7,81 % geringer Anteil toter Zellen als in Versuchsgruppe 2 (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,284$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,194$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 0,77 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,284$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,779$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 0,11 % größerer Anteil (statistisch nicht signifikant) toter Zellen (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,284$, t-Test: $p = 0,954$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 8,57 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,284$, t-Test: $p = 0,082$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 7,92 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,284$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,216$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 0,66 % geringer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,284$, t-Test: $p = 0,727$).

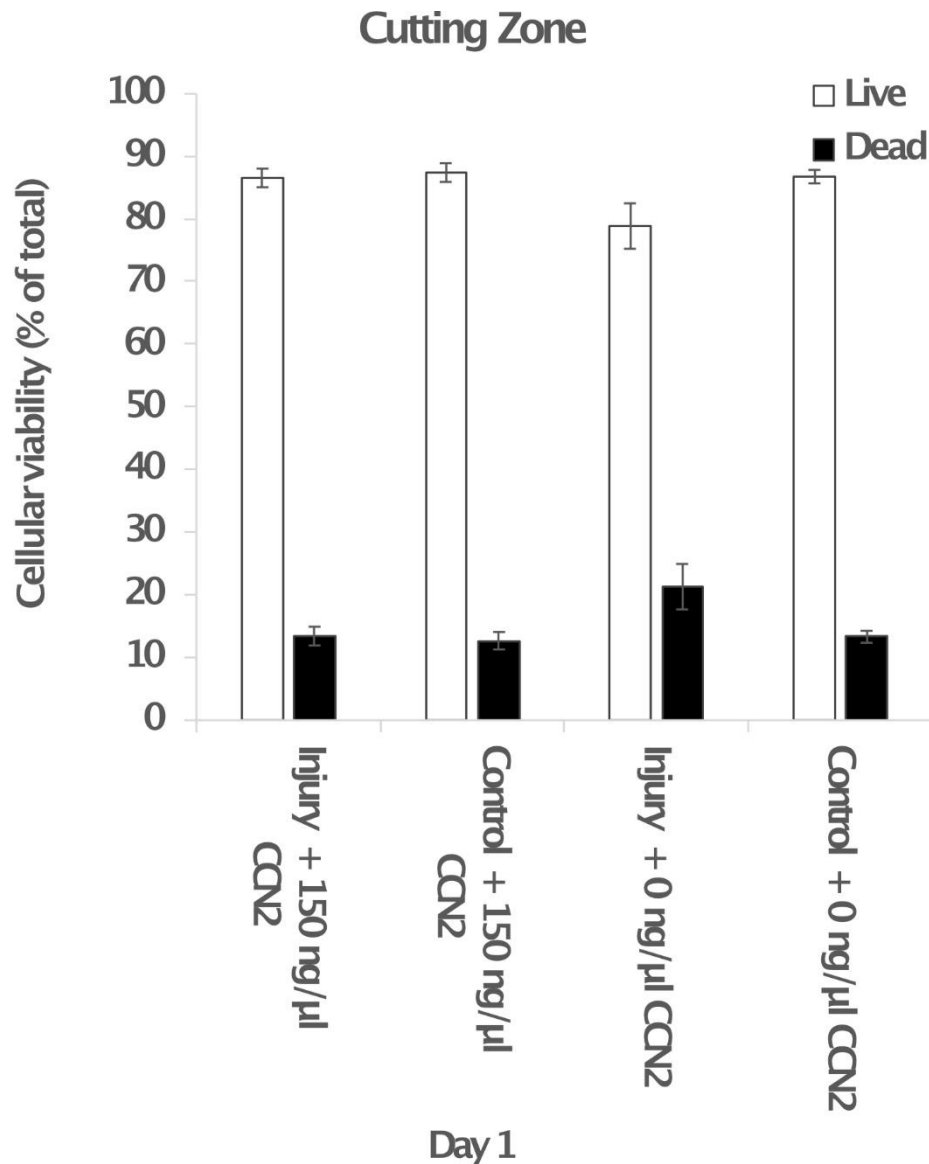


Abbildung 43: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Unter Wirkung von CCN2 konnte ein statistisch signifikanter Einfluss auf den Anteil toter Zellen nach Kompressionstrauma nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich der beiden Injury-Versuchsgruppen mit 150 ng/ml CCN2 beziehungsweise 0 ng/ml CCN2 in der Gesamtübersicht der drei Knorpelstadien zeigte sich, dass nach 65% Kompression und einem Tag Inkubationszeit der Anteil toter Zellen in der Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 um

6,39 % niedriger war als in der Gruppe, die nach Injury mit 0 ng/ml CCN2 inkubiert wurde.

Weitere statistisch signifikante Unterschiede finden sich zwischen der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2, der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2 sowie unter den Kontrollgruppen mit 150 ng/ml CCN2 und 0 ng/ml CCN2. Im Vergleich von Injury mit 150 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2 betrug die statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen 2,63 % in der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2. Im Vergleich zwischen Injury mit 0 ng/ml CCN2 und Kontrolle ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 betrug die statistisch signifikante Differenz und damit die Reduktion des Anteils toter Zellen, 6,58 % in der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2. Bei Betrachtung der Differenz der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2 zeigte sich auch hier eine statistisch signifikante Verminderung des Anteils toter Zellen um 2,82 % in der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2.

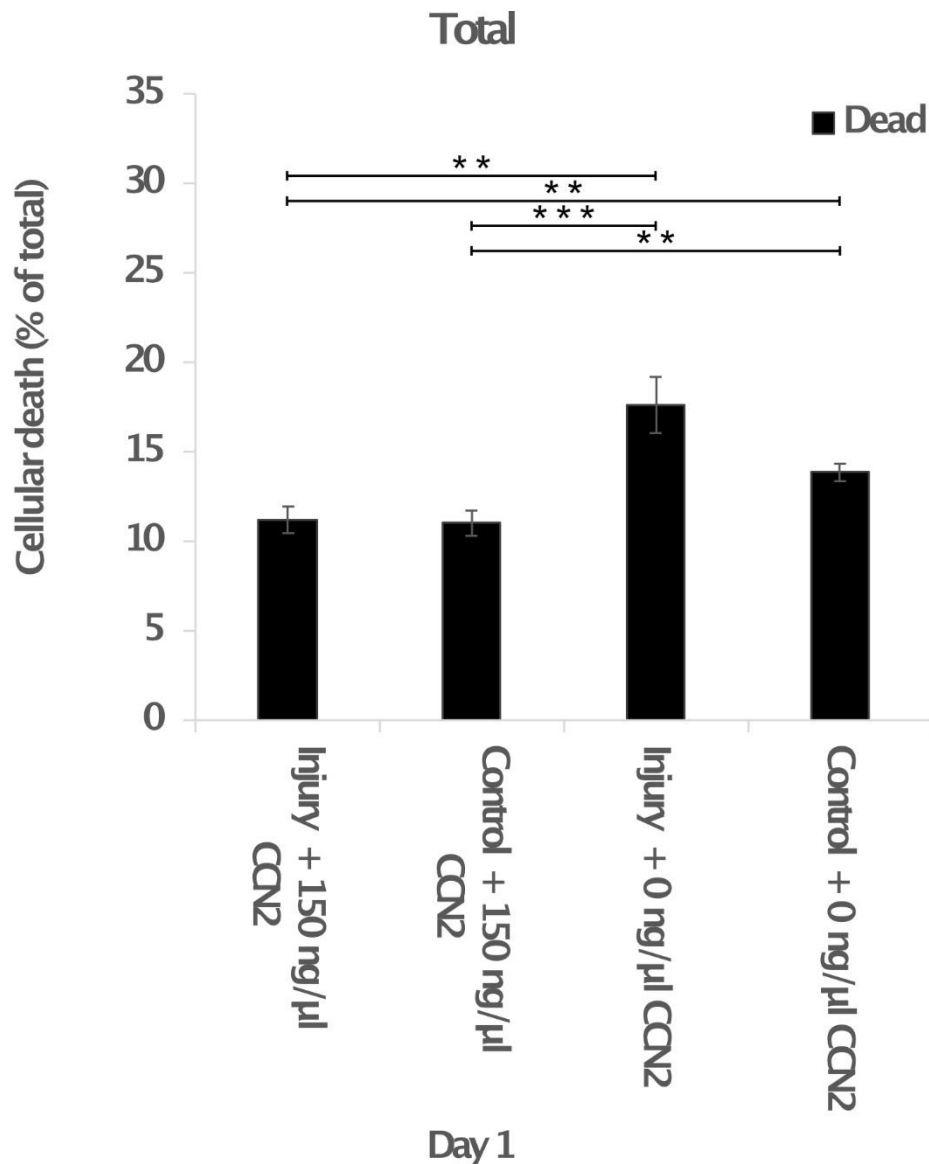


Abbildung 44: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelstadien bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Bei Betrachtung der einzelnen Schichten des Knorpels zeigte sich an der ehemaligen Gelenkfläche ein statistisch signifikanter Unterschied und damit Reduktion des Anteils toter Zellen, zwischen den Injury-Versuchsgruppen mit 0 ng/ml CCN2 und 150 ng/ml CCN2 von 5,34 % in der Gruppe mit 150 ng/ml CCN2. Im Vergleich von Injury mit 150 ng/ml CCN2 und Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2 betrug die statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen 4,03 % in der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2. Im Vergleich zwischen Injury

mit 0 ng/ml CCN2 und Kontrolle ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 betrug die statistisch signifikante Differenz und damit Reduktion des Anteils toter Zellen, 5,49 % in der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2. Bei Betrachtung der Differenz der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2 zeigte sich auch hier eine statistisch signifikante Verminderung des Anteils toter Zellen um 4,18% in der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2.

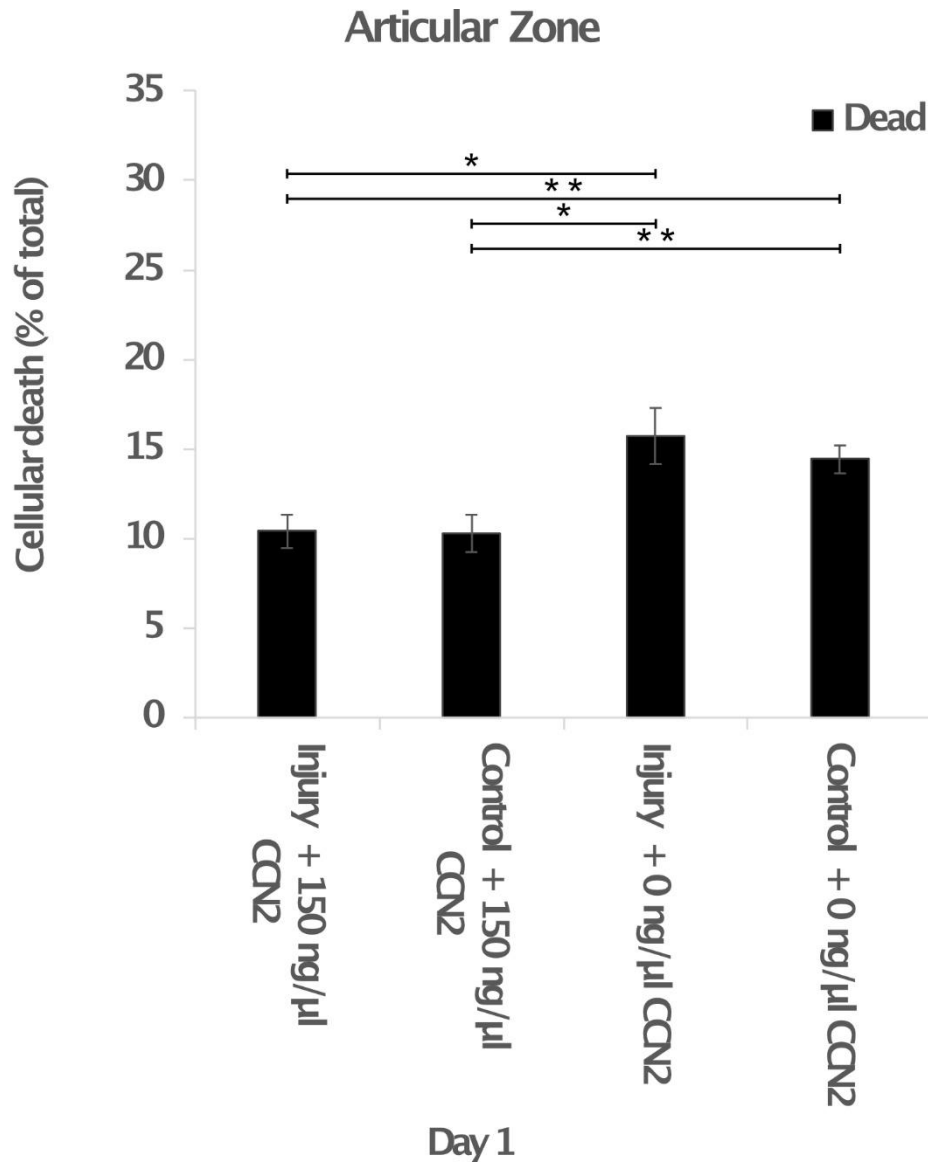


Abbildung 45: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

In der mittleren Zone war der Anteil toter Zellen in der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 um statistisch signifikante 11,36 % niedriger als in der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2. Im Vergleich von Injury mit 150 ng/ml CCN2 und Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2 betrug die statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen 3,96 % in der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2. Die Reduktion des Anteils toter Zellen zwischen Injury mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2 betrug 11,02 % zugunsten der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2, war aber statistisch nicht signifikant, zwischen Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2 und Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2 statistisch signifikante 3,62 % zugunsten der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2.

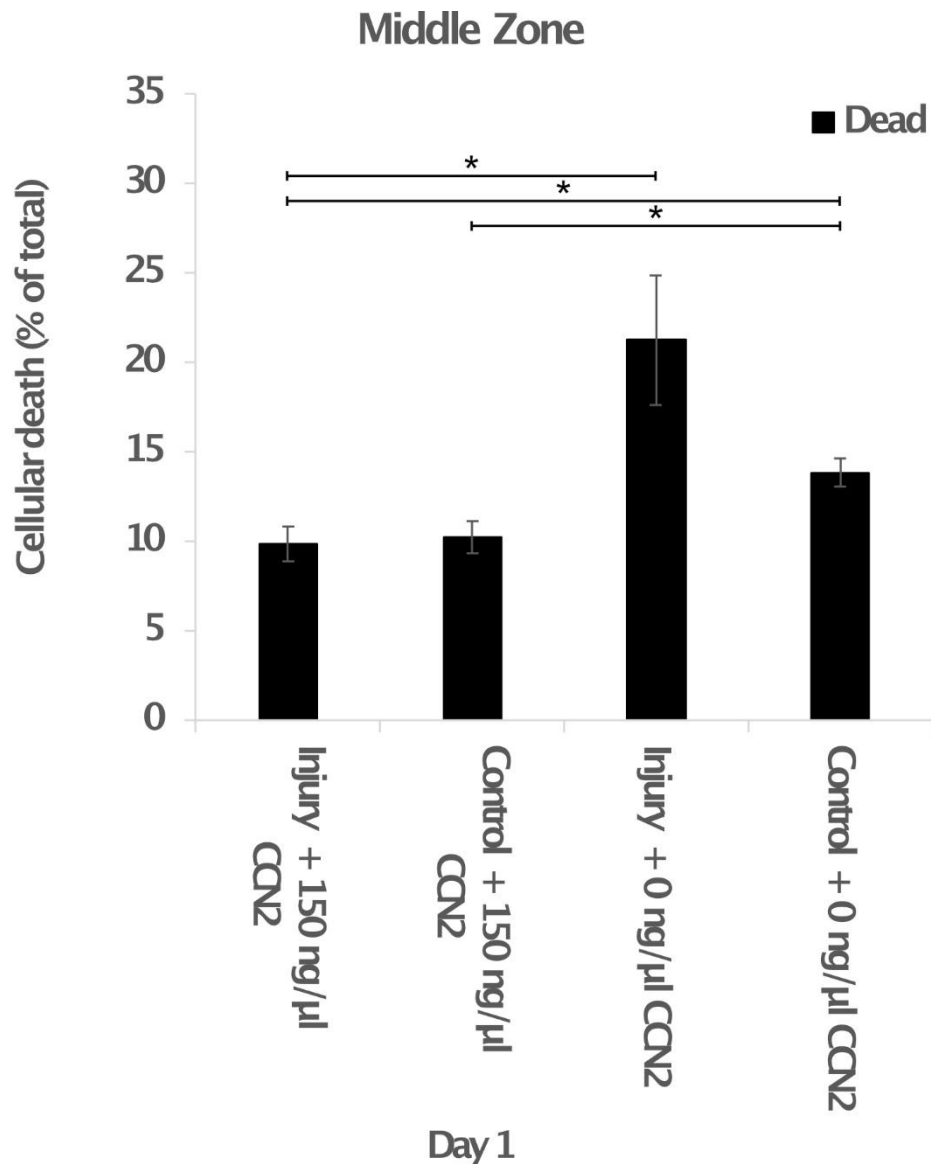


Abbildung 46: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

An der Schneidefläche kam es durch den Einfluss von CCN2 zu keiner signifikanten Verminderung des Anteils toter Zellen.

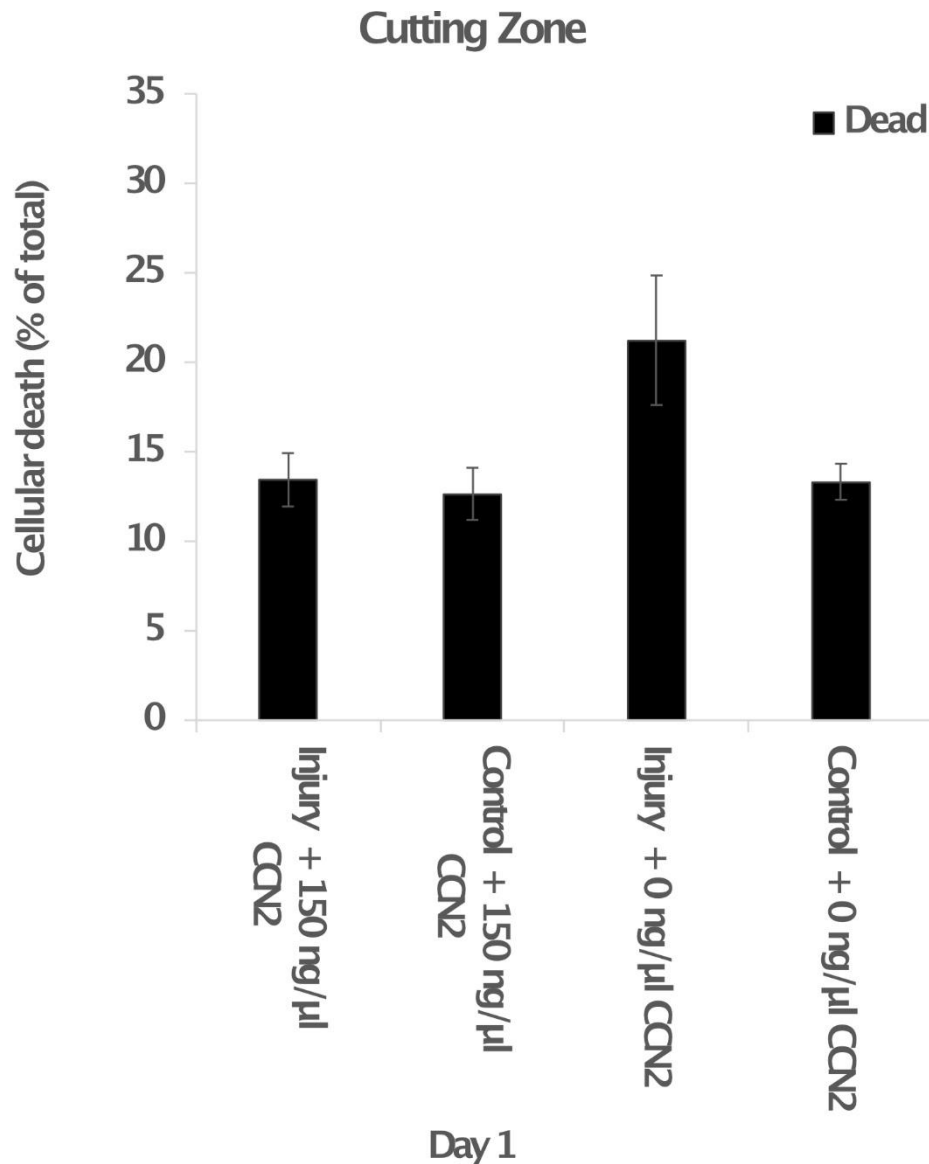


Abbildung 47: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Nach Injury und Inkubationszeit von einem Tag zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 und der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und damit eine signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen bei Einsatz von CCN2, mit Ausnahme der Schneidefläche.

3.4.3. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 bei drei Tagen Inkubationszeit mit Hilfe des Live-Dead-Assays

Die Herstellung der 300 µm Knorpel-Discs erfolgte, wie in 2.2.2 beschrieben. Die Ausübung des Kompressionstraumas, die Inkubation und die anschließende Live-Dead-Färbung mit Fluoreszenzmikroskopie erfolgte, wie in 2.5.2, 2.4.5, 2.3.2, 2.3.4 beziehungsweise 2.5.3 aufgeführt. Die Daten wurden mit Excel ausgewertet. Es wurde makroskopisch guter Knorpel zu Beginn ohne, im Verlauf mit Charakterisierung der SCSO genutzt. Es wurden im Verlauf nur Knorpel-Discs mit S- und DS-SCSO ausgesucht und für die Experimente genutzt. Es wurden 2 Versuchsgruppen und 2 Kontrollgruppen gebildet:

Versuchsgruppe 1: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 3 Tage mit 150 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 1: Kein Injury, Inkubationsdauer 3 Tage mit 150 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 2: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 3 Tage mit 0 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 2: Kein Injury, Inkubationsdauer 3 Tage mit 0 ng/ml CCN2

Für den Versuchsansatz wurden Proben von 5 Gewebespendern gewonnen, alle gingen in die Auswertung ein. Die Gesamtanzahl der hergestellten Knorpel-Discs betrug 37. In die Auswertung gingen 34 Proben ein, 1 Probe konnten aus zeitlichen Gründen nicht mittels Live-Dead-Färbung gemessen werden, 2 Knorpel-Discs wiesen in ihrer Oberfläche Risse auf und mussten ausgeschlossen werden. Versuchsgruppe 1 beinhaltete davon 10 Knorpel-Discs, davon wurden 9 in die Auswertung eingeschlossen, 1 Knorpel-Disc wiesen in der Oberfläche Risse auf und musste deshalb ausgeschlossen werden. Kontrollgruppe 1 bestand aus 9 Knorpel-Discs, davon wurden 8 in die Wertung eingeschlossen, 1 Probe konnten aus zeitlichen Gründen nicht mittels Live-Dead-Färbung gemessen werden. Versuchsgruppe 2 beinhaltete 10 Knorpel-Discs, davon wurden alle in die Auswertung eingeschlossen. Kontrollgruppe 2 bestand aus 8 Knorpel-Discs, davon wurden 7 in die Auswertung eingeschlossen, 1 Knorpel-Disc wies in der Oberfläche Risse auf und musste deshalb ausgeschlossen werden.

Tabelle 24: Übersicht aller für das Experiment vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Alle Discs	Zeitlich nicht geschafft	Risse in der Disc	Oberflächenstörung	Fehlende Calcein-Aufnahme	Genutzte Discs
VG 1	10	0	1	0	0	9
KG 1	9	1	0	0	0	8
VG 2	10	0	0	0	0	10
KG 2	8	0	1	0	0	7
Gesamt	37	1	2	0	0	34

Tabelle 25: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen aller genutzten Discs inklusive Standardfehler und Standardabweichung mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Durchschnittliche Disc-Höhe [μm]	Standardfehler	Standardabweichung
VG 1	163,64	14,67	44,02
KG 1	186,35	12,11	34,24
VG 2	157,22	11,66	36,88
KG 2	176,75	16,66	44,08
Gesamt	169,80	7,11	41,47

Nach Kompression der Knorpel-Discs um 65 % der Ausgangshöhe wurden drei Tage nach Injury mittels Fluoreszenzmikroskopie der Mittelwert des Anteils lebender und toter Zellen in den jeweiligen Versuchsgruppen bestimmt, ebenso bei den Kontrollgruppen. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen betrug der

Mittelwert des Anteils toter Zellen in der Gesamtübersicht der drei Knorpelstadien in der Gruppe mit Injury und Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) 11,90 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,98 %. Standardabweichung: 5,07 %), bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) 18,92 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,25 %. Standardabweichung: 6,85 %). Bei Betrachtung der Gruppen ohne Injury zeigte sich bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) ein Anteil toter Zellen von 9,55 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,75 %. Standardabweichung: 3,66 %), bei 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) 15,20 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,49 %. Standardabweichung: 6,81 %).

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen konnte zwischen der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) ein signifikanter Unterschied zugunsten der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) festgestellt werden. Hierbei zeigte sich in Versuchsgruppe 1 ein um 7,02 % geringerer Anteil toter Zellen als in Versuchsgruppe 2 (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 2,35 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,119$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 3,30 % geringerer Anteil (statistisch nicht signifikant) toter Zellen (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,067$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 9,37 % signifikant größer als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 3,72 % signifikant größer als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,038$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen

um 5,65 % signifikant geringer als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,003$).

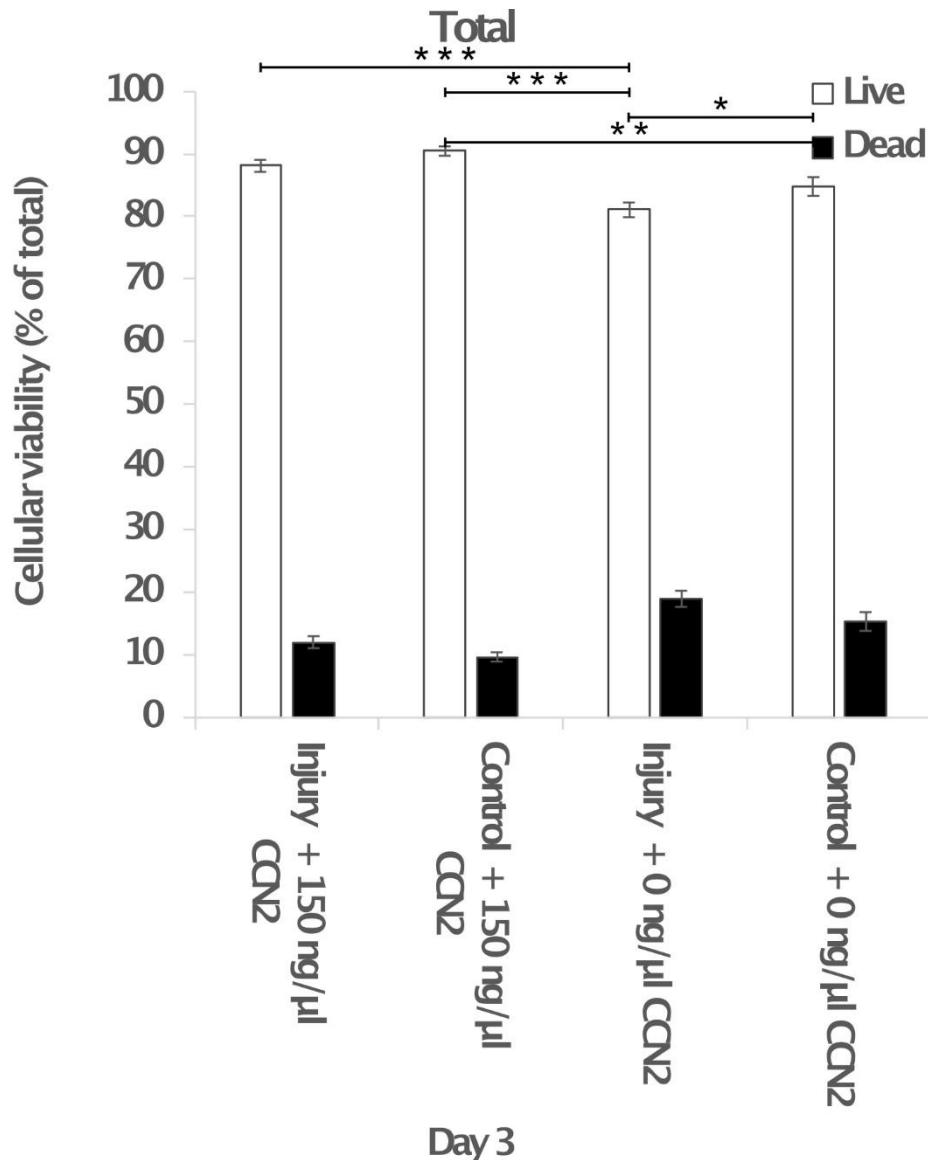


Abbildung 48: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpeleneben bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Bei Betrachtung der drei einzelnen Knorpeleneben (ehemalige Gelenkfläche, mittlere Fläche und Schneidefläche) betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen in der Gelenkfläche nach Injury und Inkubation über drei Tage mit 150

ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) 10,16 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,90 %. Standardabweichung: 2,70 %), nach Injury und 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) 18,19 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,75 %. Standardabweichung: 5,54 %). In den Kontrollgruppen wurde ein Anteil toter Zellen bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) von 7,75 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,31 %. Standardabweichung: 3,72 %), bei 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) von 12,46 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,81 %. Standardabweichung: 4,80 %) detektiert.

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen der jeweiligen Gruppen, so war der Anteil toter Zellen in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) um 8,03 % signifikant geringer als in der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) (ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$, t-Test: $p = 0,002$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 2,41 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,293$, t-Test: $p = 0,168$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 2,30 % geringerer Anteil (statistisch nicht signifikant) toter Zellen (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,332$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,525$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 10,44 % signifikant größer als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Holm-Sidak): $p < 0,001$, t-Test: $p < 0,001$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 5,73 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,018$, t-Test: $p = 0,055$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 4,71 % geringer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,059$, t-Test: $p = 0,068$).

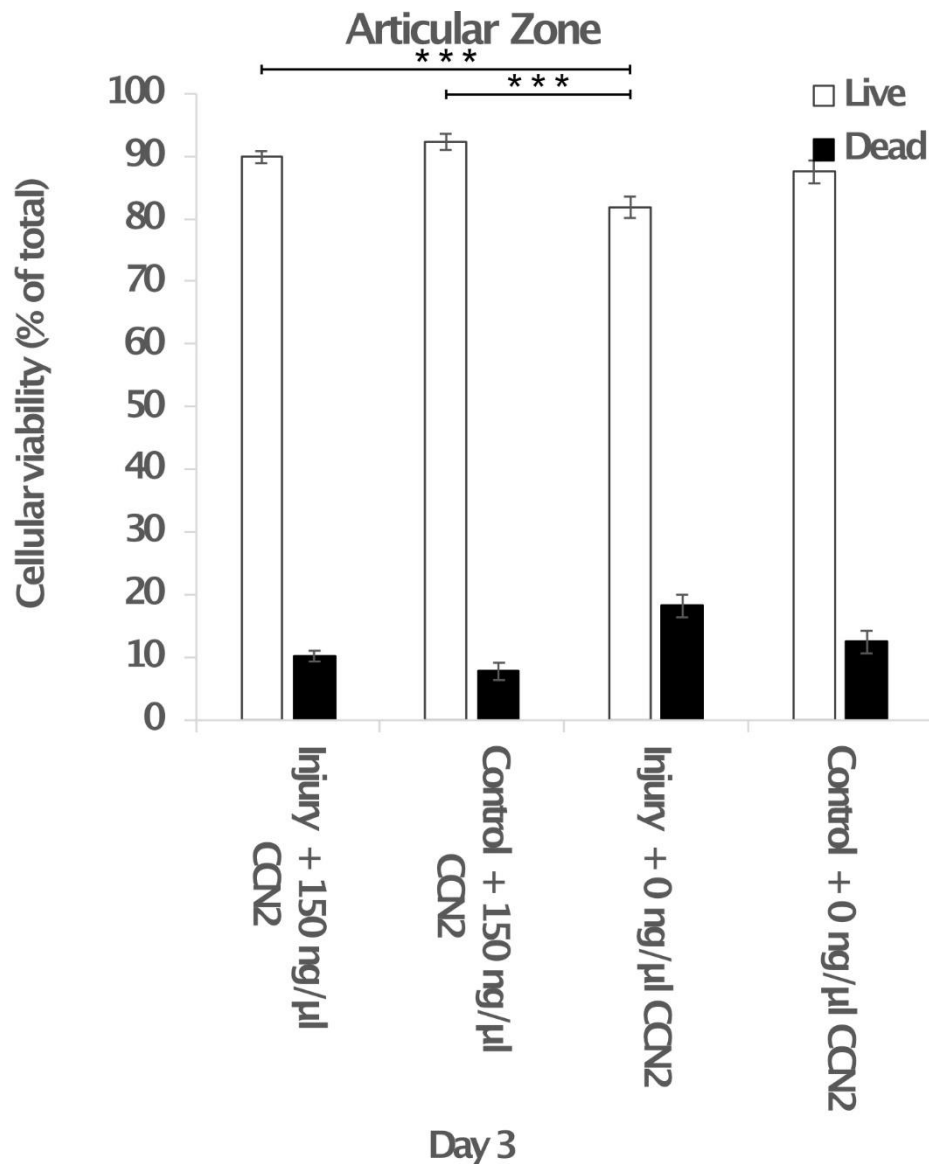


Abbildung 49: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

In der Mitte der Knorpel-Disc sowie an der Schneidefläche zeigten sich ähnliche Ergebnisse. In der mittleren Fläche wurde nach Injury und Inkubation über drei Tage mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) ein Mittelwert des Anteils toter Zellen von 9,86 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,87 %. Standardabweichung: 2,61 %), nach Injury und 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) von 18,10 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,07 %. Standardabweichung: 6,56 %) gemessen. In den Kontrollgruppen lag der Mittelwert des Anteils toter

Zellen bei Inkubation mit 150 ng/ml CNN2 (Kontrollgruppe 1) bei 9,39 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,13 %. Standardabweichung: 3,18 %) und mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) bei 13,98 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,80 %. Standardabweichung: 4,75 %).

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen der jeweiligen Gruppen, so war der Anteil toter Zellen in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) um 8,24 % signifikant geringer als in der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 0,47 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (t-Test: $p = 0,758$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 4,12 % geringerer Anteil (statistisch nicht signifikant) toter Zellen (t-Test: $p = 0,058$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 8,71 % signifikant größer als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,002$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 4,11 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,262$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 4,59 % geringer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, t-Test: $p = 0,059$).

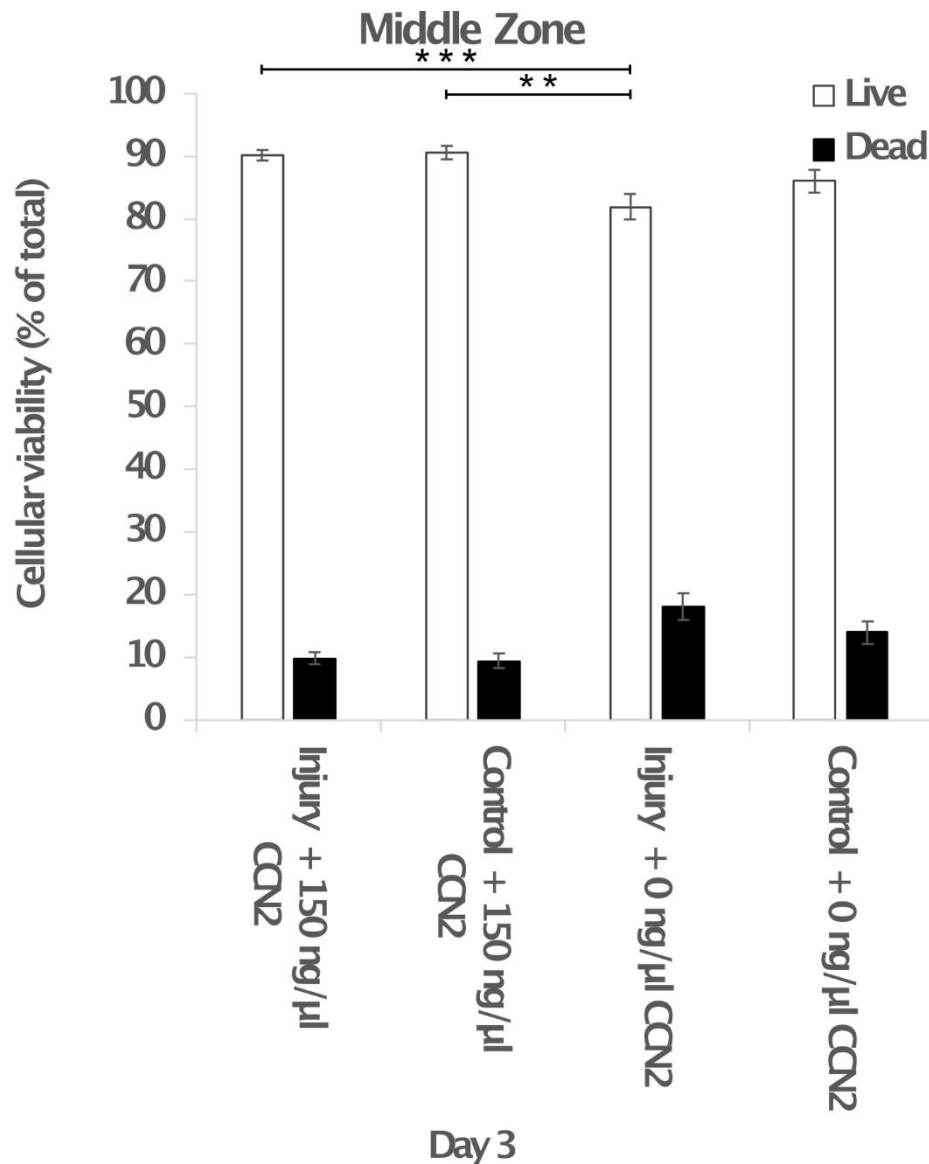


Abbildung 50: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

An der Schneidefläche betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen nach Injury und Inkubation über drei Tage mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) 15,69 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,14 %. Standardabweichung: 6,43 %) nach Injury und 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) 20,47 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,51 %. Standardabweichung: 7,95 %). In den Kontrollgruppen lag der Mittelwert des Anteils toter Zellen bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) bei 11,52 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,07 %.

Standardabweichung: 3,01 %) und mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) bei 19,15 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,13 %. Standardabweichung: 8,29 %).

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen konnte zwischen der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es zeigte sich in Versuchsgruppe 1 ein um 4,78 % geringerer Anteil toter Zellen als in Versuchsgruppe 2 (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, t-Test: $p = 0,194$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 4,17 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (t-Test: $p = 0,136$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 3,46 % geringerer Anteil (statistisch nicht signifikant) toter Zellen (t-Test: $p = 0,394$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 8,95 % signifikant größer als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, t-Test: $p = 0,012$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 1,32 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (t-Test: $p = 0,761$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 7,63 % signifikant geringer als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (t-Test: $p = 0,042$).

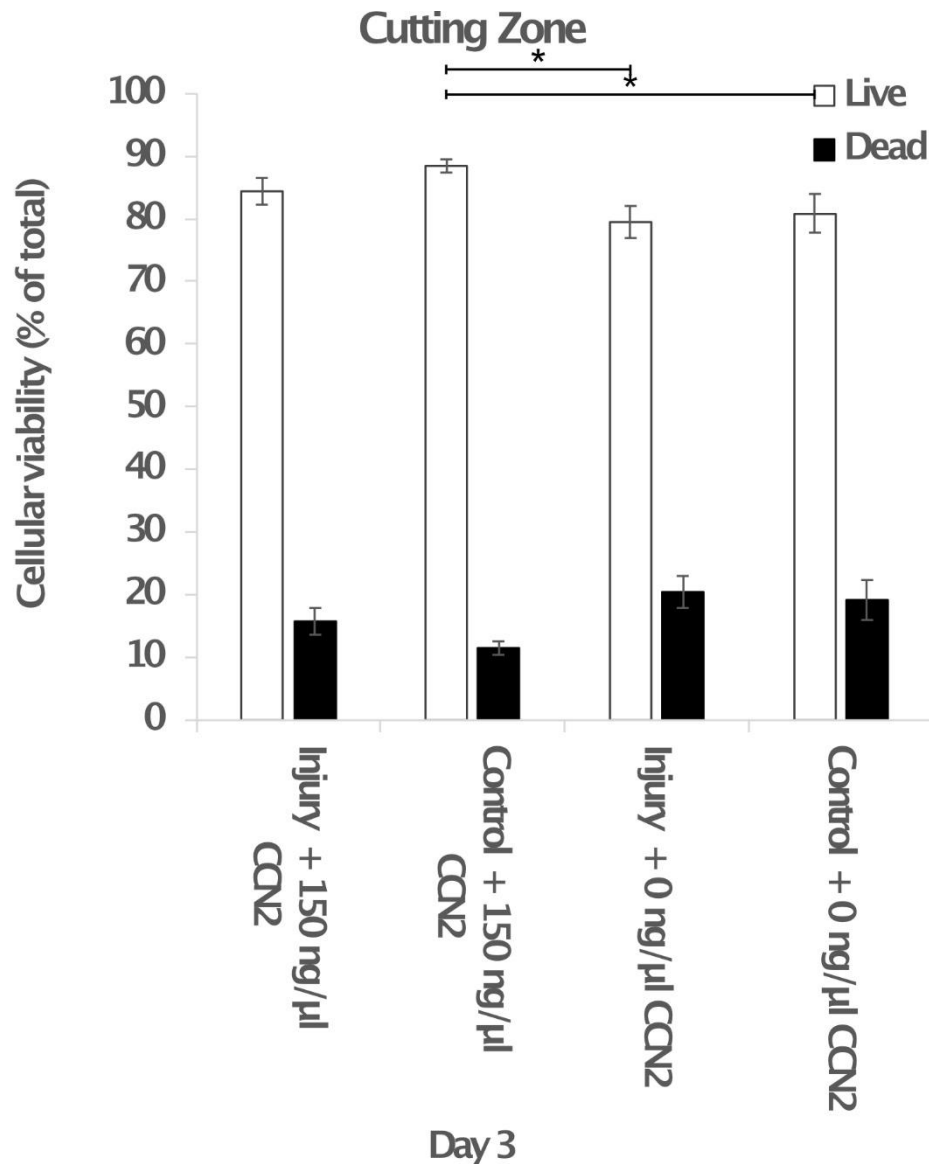


Abbildung 51: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Unter Wirkung von CCN2 konnte ein statistisch signifikanter Einfluss auf den Anteil toter Zellen nach Kompressionstrauma nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich der beiden Injury-Versuchsgruppen mit 150 ng/ml CCN2 beziehungsweise 0 ng/ml CCN2 in der Gesamtübersicht der drei Knorpelstadien war zu erkennen, dass nach 65 % Kompression und drei Tagen Inkubationszeit der Anteil toter Zellen in der Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 um 7,02 % niedriger war als in der Gruppe, die mit 0 ng/ml CCN2 inkubiert wurde.

Weitere statistisch signifikante Unterschiede fanden sich zwischen der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2 sowie zwischen der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2. Im Vergleich zwischen Injury mit 0 ng/ml CCN2 und Kontrolle ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 betrug die statistisch signifikante Differenz und damit die Reduktion des Anteils toter Zellen, 9,37 % in der Kontrollgruppe ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2. Bei Betrachtung der Differenz der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2 zeigte sich auch hier eine statistisch signifikante Verminderung des Anteils toter Zellen um 3,72 % in der Kontrollgruppe ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2. Im Vergleich beider Kontrollgruppen fiel auf, dass der Anteil toter Zellen in der Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 um 5,65 % signifikant geringer war als in der Gruppe mit 0 ng/ml CCN2.

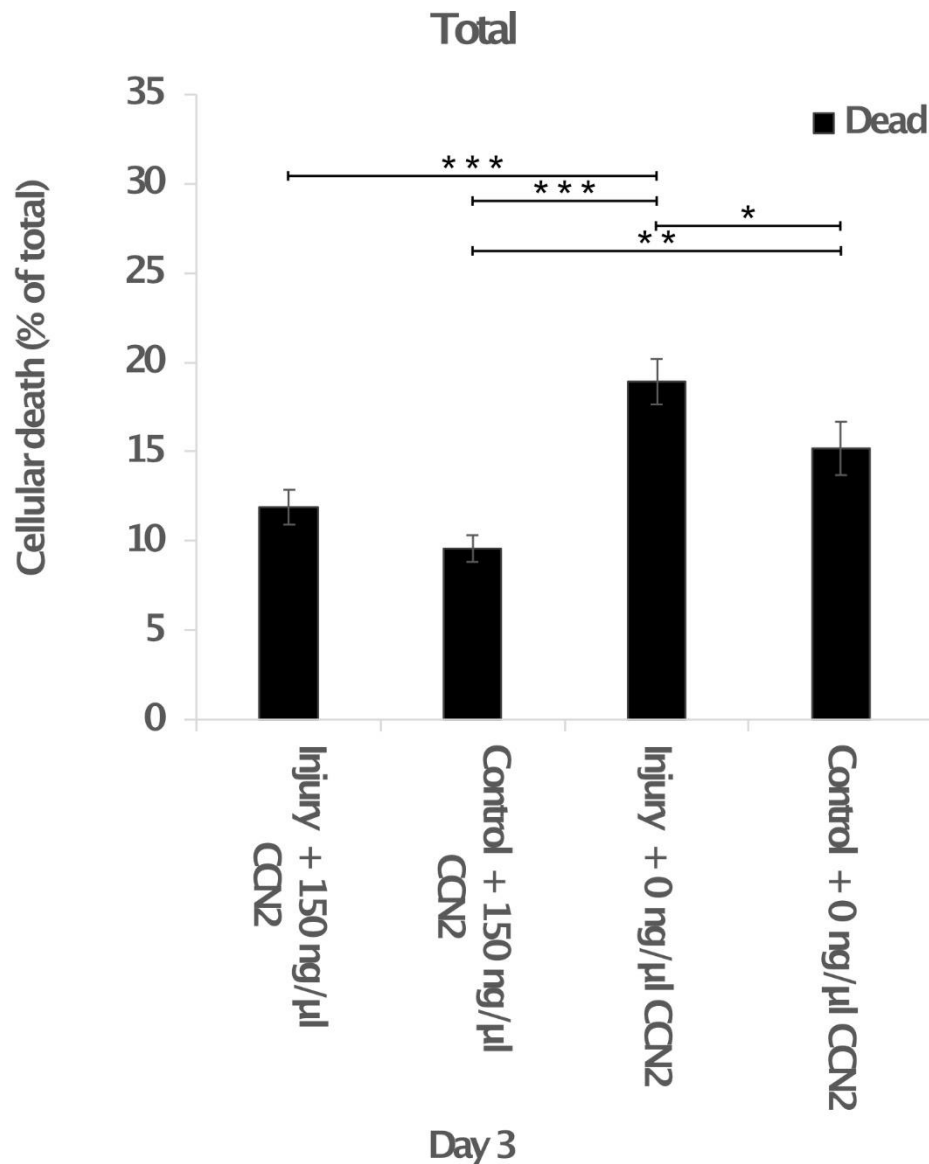


Abbildung 52: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelbenen bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Bei Betrachtung der einzelnen Schichten des Knorpels zeigte sich an der ehemaligen Gelenkfläche ein statistisch signifikanter Unterschied und damit Reduktion des Anteils toter Zellen, zwischen den Injury-Versuchsgruppen mit 150 ng/ml CCN2 und 0 ng/ml CCN2 von 8,03 % in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2. Im Vergleich zwischen Injury mit 0 ng/ml CCN2 und Kontrolle ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 betrug die statistisch signifikante Differenz und

damit Reduktion des Anteils toter Zellen, 10,44 % in der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2.

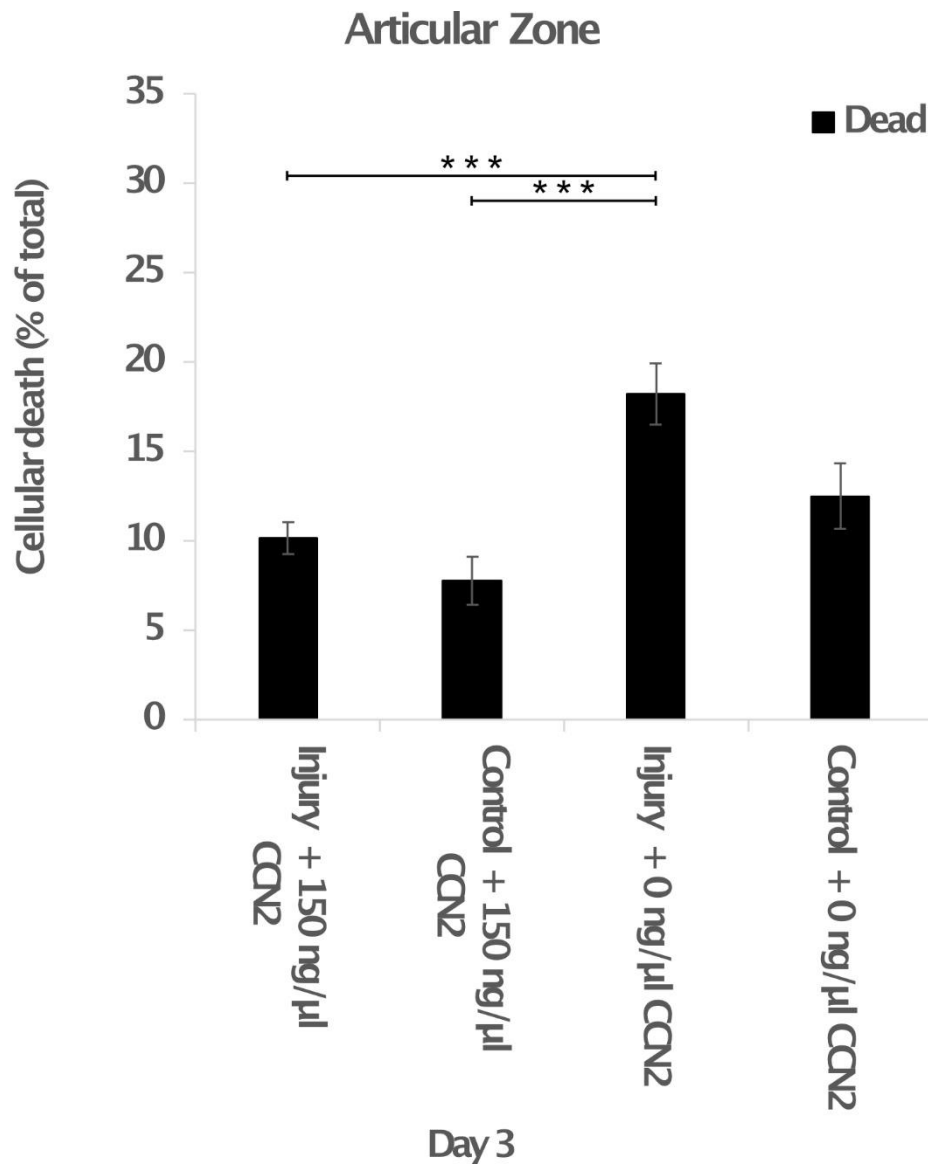


Abbildung 53: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

In der mittleren Zone war der Anteil toter Zellen in der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 um statistisch signifikante 8,24 % niedriger als in der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2. Die signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen zwischen

Injury mit 0 ng/ml CCN2 und Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2 betrug 8,71 % zugunsten der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2.

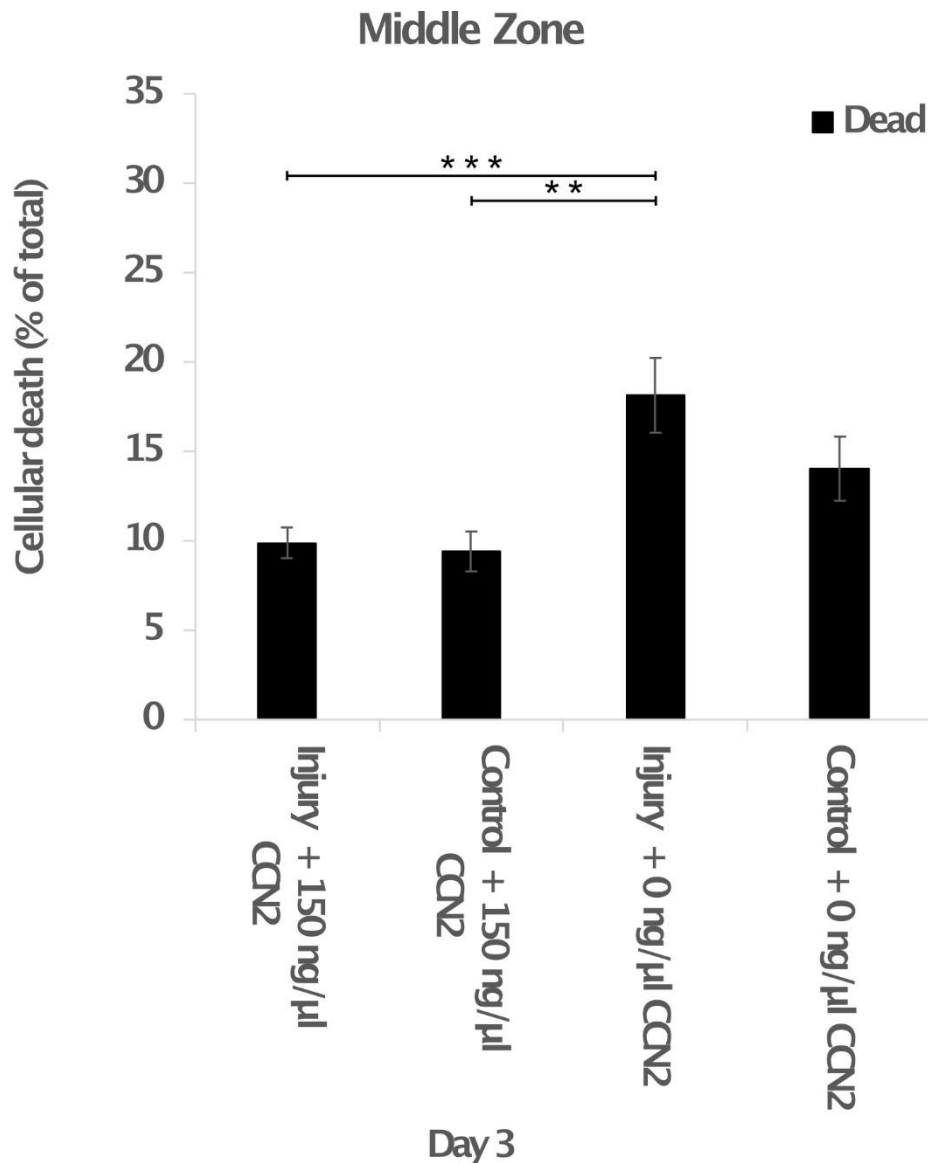


Abbildung 54: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

An der Schneidefläche kam es zu keiner signifikanten Verminderung des Anteils toter Zellen im Vergleich der Gruppen mit Injury und 150 ng/ml CCN2 zur Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2, die Differenz betrug 4,78 % zugunsten der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2. Der Unterschied zwischen der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2 war

statistisch signifikant und betrug 8,95 % zugunsten der Gruppe mit 150 ng/ml CCN2.

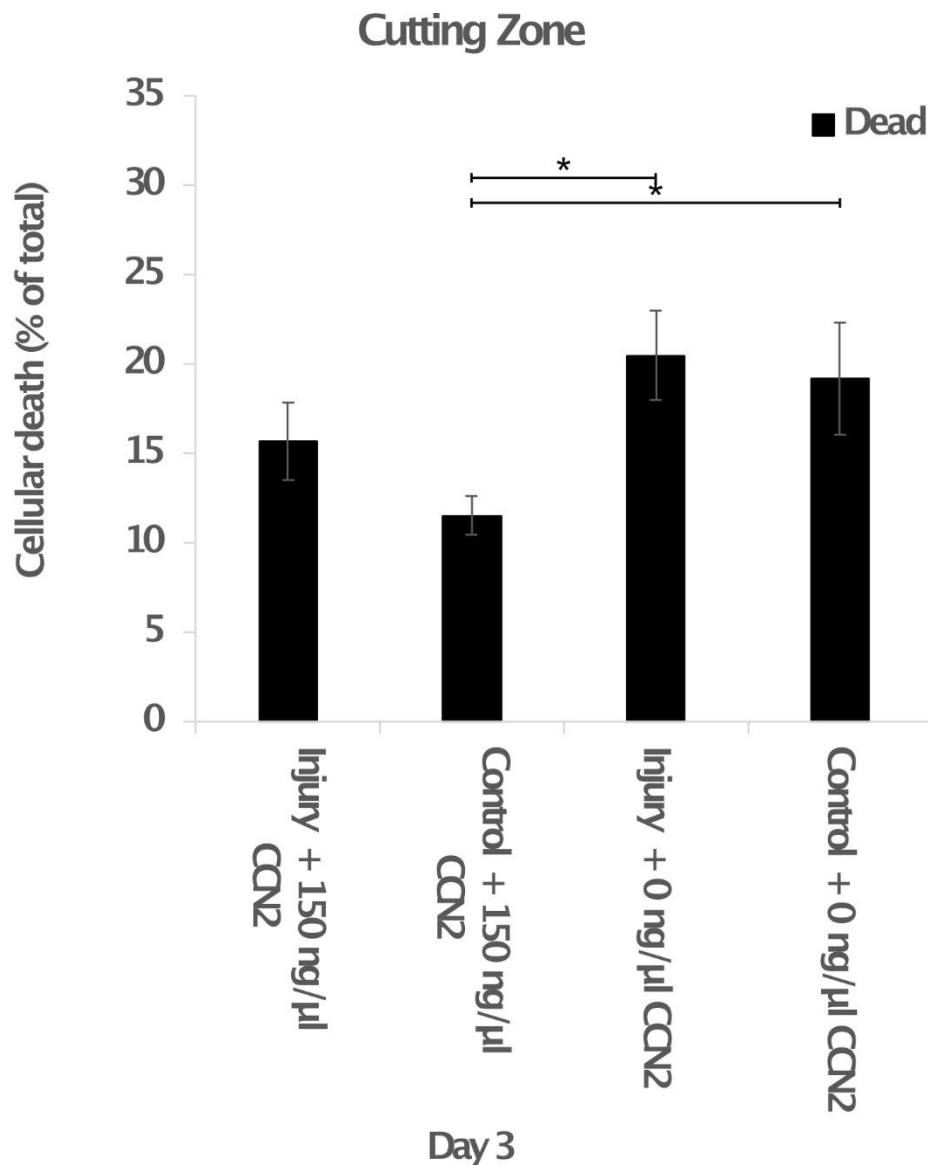


Abbildung 55: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Nach Injury und Inkubationszeit von drei Tagen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 und der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und damit eine signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen bei Einsatz von CCN2, mit Ausnahme der Schneidefläche.

3.4.4. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 bei vier Tagen Inkubationszeit mit Hilfe des Live-Dead-Assays

Die Herstellung der 300 µm Knorpel-Discs erfolgte, wie in 2.2.2 beschrieben. Die Ausübung des Kompressionstraumas, die Inkubation und die anschließende Live-Dead-Färbung mit Fluoreszenzmikroskopie erfolgte, wie in 2.5.2, 2.4.5, 2.3.2, 2.3.4 beziehungsweise 2.5.3 aufgeführt. Die Daten wurden mit Excel ausgewertet. Es wurde makroskopisch guter Knorpel zu Beginn ohne, im Verlauf mit Charakterisierung der SCSO genutzt. Es wurden im Verlauf nur Knorpel-Discs mit S- und DS-SCSO ausgesucht und für die Experimente genutzt. Es wurden 2 Versuchsgruppen und 2 Kontrollgruppen gebildet:

Versuchsgruppe 1: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 4 Tage mit 150 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 1: Kein Injury, Inkubationsdauer 4 Tage mit 150 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 2: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 4 Tage mit 0 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 2: Kein Injury, Inkubationsdauer 4 Tage mit 0 ng/ml CCN2

Für den Versuchsansatz wurden Proben von 5 Gewebespendern gewonnen. 1 kompletter Patient mit 7 Knorpel-Discs musste wegen fehlender Calcein-Aufnahme in allen Gruppen ausgeschlossen werden, 4 Gewebespende gingen in die Auswertung ein. Die Gesamtanzahl der hergestellten Knorpel-Discs betrug 44. In die Auswertung gingen 32 Proben ein, 4 Knorpel-Discs wiesen in ihrer Oberfläche Risse auf, 1 Disc Oberflächenstörungen, 7 Proben eines Gewebespenders mussten aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme bei der Live-Dead-Färbung ausgeschlossen werden. Versuchsgruppe 1 beinhaltete davon 13 Knorpel-Discs, davon wurden 9 in die Auswertung eingeschlossen, 2 Knorpel-Discs wiesen in der Oberfläche Risse auf, 2 Knorpel-Discs mussten aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden. Kontrollgruppe 1 bestand aus 10 Knorpel-Discs, davon wurden 7 in die Wertung eingeschlossen, 1 Knorpel-Discs wiesen in ihrer Oberfläche Risse auf, 2 Proben mussten aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme bei der Live-Dead-Färbung ausgeschlossen werden. Versuchsgruppe 2 beinhaltete 11 Knorpel-

Discs, davon wurden 9 in die Auswertung eingeschlossen, 2 Knorpel-Disc musste aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden. Kontrollgruppe 2 bestand aus 10 Knorpel-Discs, davon wurden 7 in die Auswertung eingeschlossen, 1 Knorpel-Disc wies in der Oberfläche Risse, 1 Knorpel-Disc Oberflächenstörungen auf, 1 Knorpel-Disc musste aufgrund fehlender Calcein-Aufnahme ausgeschlossen werden.

Tabelle 26: Übersicht aller für das Experiment vorgesehenen Discs, der genutzten Discs sowie der Ausschlusskriterien mit einer Inkubationszeit von vier Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Alle Discs	Zeitlich nicht geschafft	Risse in der Disc	Oberflächenstörung	Fehlende Calcein-Aufnahme	Genutzte Discs
VG 1	13	0	2	0	2	9
KG 1	10	0	1	0	2	7
VG 2	11	0	0	0	2	9
KG 2	10	0	1	1	1	7
Gesamt	44	0	4	1	7	32

Tabelle 27: Übersicht der durchschnittlichen Disc-Höhen aller genutzten Discs inklusive Standardfehler und Standardabweichung mit einer Inkubationszeit von vier Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Durchschnittliche Disc-Höhe [μm]	Standardfehler	Standardabweichung
VG 1	187,15	12,55	37,64
KG 1	167,96	11,19	29,60
VG 2	157,16	16,01	48,04
KG 2	183,58	17,13	45,33
Gesamt	173,73	7,59	42,96

Nach Kompression der Knorpel-Discs um 65 % der Ausgangshöhe wurden vier Tage nach Injury mittels Fluoreszenzmikroskopie der Mittelwert des Anteils lebender und toter Zellen in den jeweiligen Versuchsgruppen bestimmt, ebenso bei den jeweiligen Kontrollgruppen. Nach einer Inkubationszeit von vier Tagen betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen in der Gesamtübersicht der drei Knorpelstadien in der Gruppe mit Injury und Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) 14,69 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,52 %. Standardabweichung: 7,90 %), bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) 21,36 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,15 %. Standardabweichung: 5,95 %). Bei Betrachtung der Gruppen ohne Injury zeigte sich bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) ein Anteil toter Zellen von 11,96 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,63 %. Standardabweichung: 2,88 %), bei 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) von 14,89 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,52 %. Standardabweichung: 6,99 %).

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen konnte zwischen der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) ein signifikanter Unterschied zugunsten der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) festgestellt werden. Hierbei zeigte sich in Versuchsgruppe 1 ein um 6,67 % geringerer Anteil toter

Zellen als in Versuchsgruppe 2 (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 2,73 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,493$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 0,19 % geringerer Anteil toter Zellen (statistisch nicht signifikant) (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,678$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 9,40 % signifikant größer als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p < 0,001$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 6,48 % signifikant größer als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,001$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 2,92 % geringer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,392$).

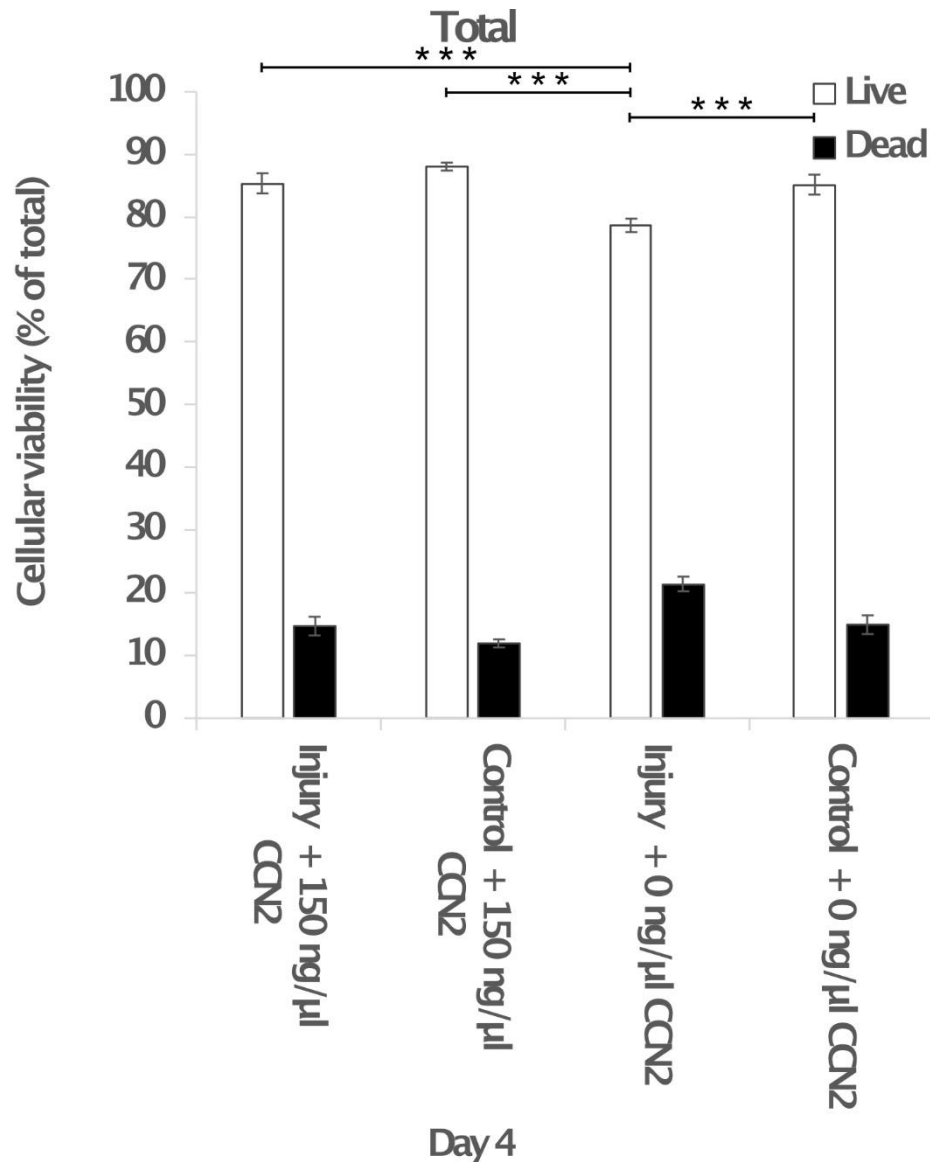


Abbildung 56: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelbenen bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Bei Betrachtung der drei einzelnen Knorpelbenen (ehemalige Gelenkfläche, mittlere Fläche und Schneidefläche) betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellen in der Gelenkfläche nach Injury und Inkubation über vier Tage mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) 12,26 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,52 %. Standardabweichung: 4,56 %), nach Injury und 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) 21,71 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,57 %. Standardabweichung: 7,71 %).

In den Kontrollgruppen wurde ein Anteil toter Zellen bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) von 11,27 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,81 %. Standardabweichung: 2,15 %), bei 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) von 12,76 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,17 %. Standardabweichung: 5,73 %) detektiert.

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen konnte zwischen der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) ein signifikanter Unterschied zugunsten der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) festgestellt werden. Hierbei zeigte sich in Versuchsgruppe 1 ein um 9,45 % geringerer Anteil toter Zellen als in Versuchsgruppe 2 (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, t-Test: $p = 0,009$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 0,99 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (t-Test, $p = 0,627$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 0,49 % geringerer Anteil toter Zellen (statistisch nicht signifikant) (t-Test: $p = 0,861$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 10,44 % signifikant größer als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Dunn's-Test): $p < 0,05$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,003$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 8,95 % signifikant größer als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,020$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 1,48 % geringer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Dunn's-Test): $p > 0,05$, t-Test: $p = 0,564$).

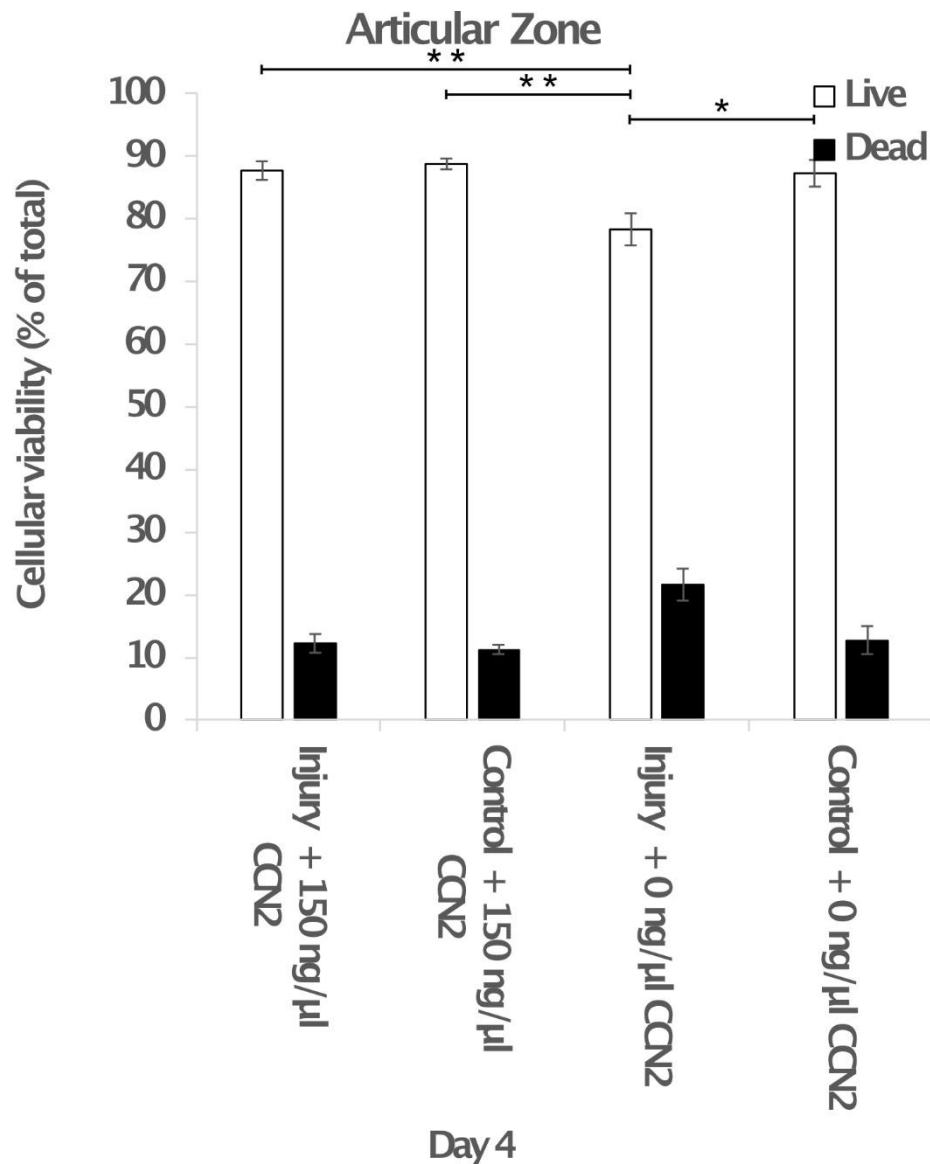


Abbildung 57: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

In der Mitte der Knorpel-Disc sowie an der Schneidefläche zeigten sich ähnliche Ergebnisse. In der mittleren Fläche wurde nach Injury und Inkubation über vier Tage mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) ein Mittelwert des Anteils toter Zellen von 11,82 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,84 %, Standardabweichung: 5,52 %), nach Injury und 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) von 20,59 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,89 %, Standardabweichung: 5,66 %) gemessen. In den Kontrollgruppen lag der Mittelwert des Anteils toter

Zellen bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) bei 11,02 % (Standardfehler des Mittelwerts: 0,80 %. Standardabweichung: 2,12 %) und mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) bei 13,79 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,16 %. Standardabweichung: 5,71 %).

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen konnte zwischen der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) ein signifikanter Unterschied zugunsten der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) festgestellt werden. Hierbei zeigte sich in Versuchsgruppe 1 ein um 8,77 % geringerer Anteil toter Zellen als in Versuchsgruppe 2 (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,002$, t-Test: $p = 0,006$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 0,80 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,773$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,672$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 1,97 % geringerer Anteil toter Zellen (statistisch nicht signifikant) (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,478$, t-Test: $p = 0,526$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 9,57 % signifikant größer als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,002$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,004$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 6,80 % signifikant größer als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,019$, t-Test: $p = 0,043$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 2,76 % geringer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Holm-Sidak): $p = 0,349$, t-Test: $p = 0,288$).

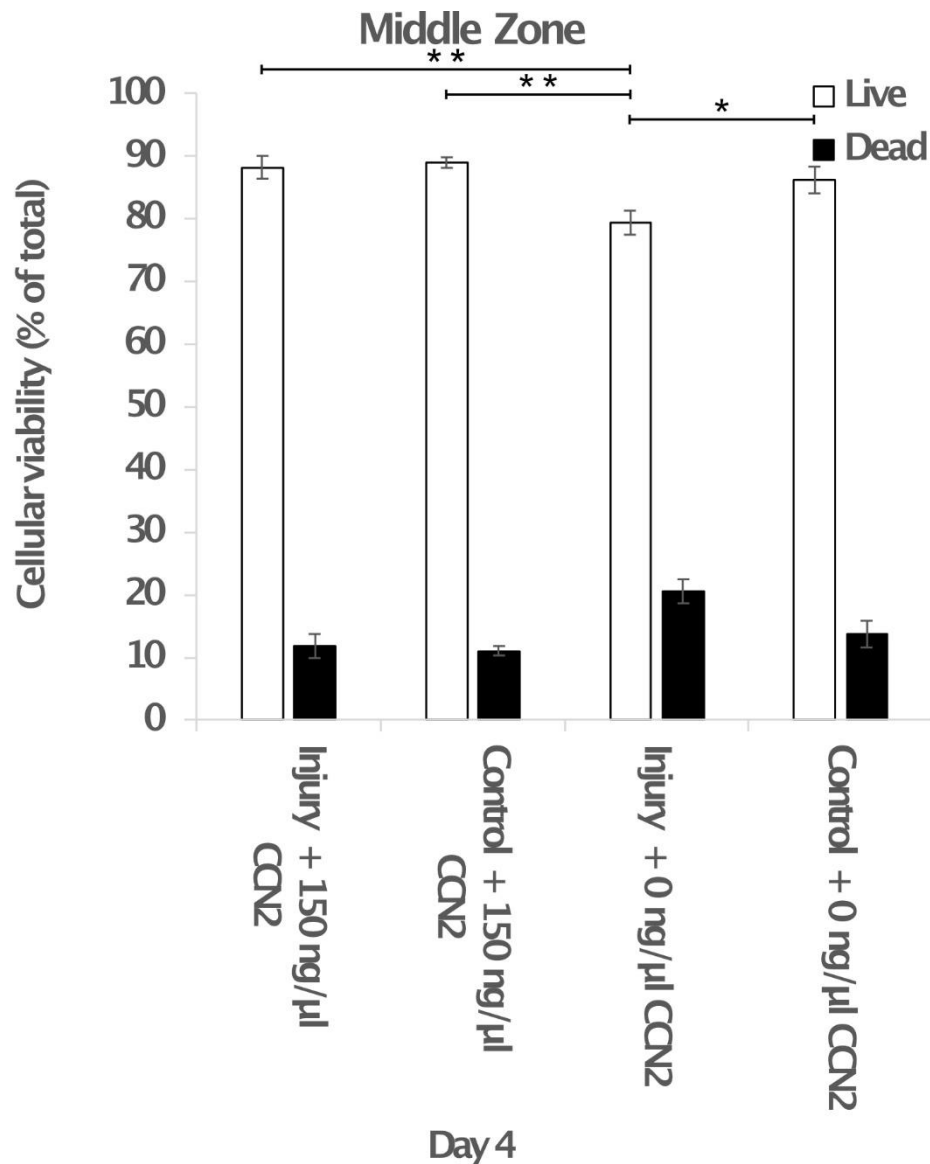


Abbildung 58: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

An der Schneidefläche betrug der Mittelwert des Anteils toter Zellennach Injury und Inkubation über vier Tage mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) 19,99 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,22 %. Standardabweichung: 9,67 %), nach Injury und 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) 21,80 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,24 %. Standardabweichung: 3,72 %). In den Kontrollgruppen lag der Mittelwert des Anteils toter Zellen bei Inkubation mit 150 ng/ml CNN2 (Kontrollgruppe 1) bei 13,59 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,30 %.

Standardabweichung: 3,44 %) und mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) bei 18,12 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,04 %. Standardabweichung: 8,06 %).

Im Vergleich der Mittelwerte der Anteile toter Zellen konnte zwischen der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Es zeigte sich in Versuchsgruppe 1 ein um 1,81 % geringerer Anteil toter Zellen als in Versuchsgruppe 2 (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,055$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,289$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1) um 6,40 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,055$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,112$). Im Vergleich zwischen Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) und Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) zeigte sich in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 ein um 1,87 % größerer Anteil toter Zellen (statistisch nicht signifikant) (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,055$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p = 0,751$). Bei der Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) war der Anteil toter Zellen um 8,20 % signifikant größer als bei der Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) (t-Test: $p < 0,001$). Der Anteil toter Zellen war bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) um 3,68 % größer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,055$, t-Test: $p = 0,275$). Bei Inkubation ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 1) war der Anteil toter Zellen um 4,53 % geringer (statistisch nicht signifikant) als bei Inkubation ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Kontrollgruppe 2) (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks): $p = 0,055$, t-Test: $p = 0,230$).

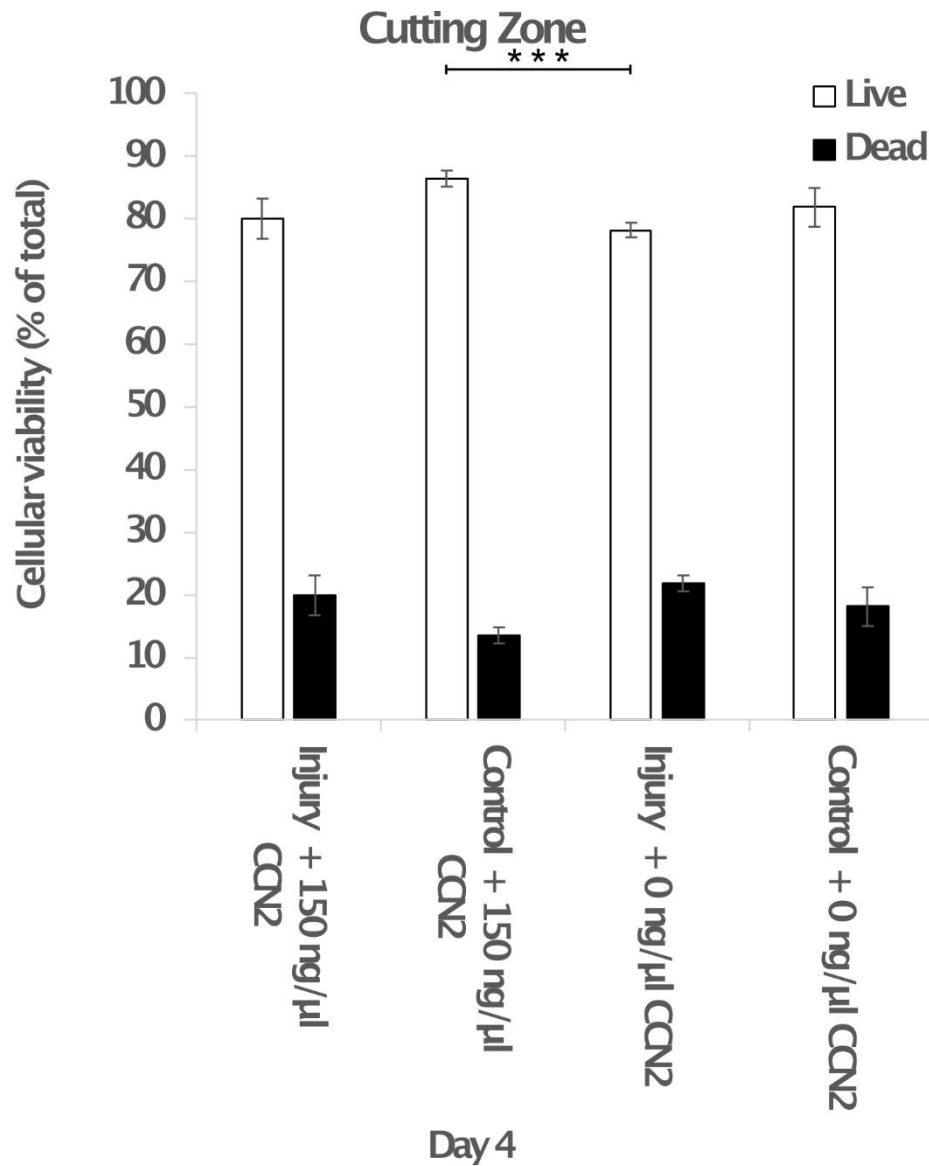


Abbildung 59: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Unter Wirkung von CCN2 konnte ein statistisch signifikanter Einfluss auf den Anteil toter Zellen nach Kompressionstrauma nachgewiesen werden. Im direkten Vergleich der beiden Injury-Versuchsgruppen mit 150 ng/ml CCN2 beziehungsweise 0 ng/ml CCN2 in der Gesamtübersicht der drei Knorpelstadien zeigte sich, dass nach 65% Kompression und vier Tagen Inkubationszeit der Anteil toter Zellen in der Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 um 6,67 % signifikant niedriger war als in der Gruppe, die nach Injury mit 0 ng/ml CCN2 inkubiert wurde. Weitere statistisch signifikante Unterschiede fanden sich zwischen der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2 sowie zwischen der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2. Im Vergleich zwischen Injury mit 0 ng/ml CCN2 und Kontrolle ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 betrug die statistisch signifikante Differenz und damit die Reduktion des Anteils toter Zellen, 9,40 % in der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2. Bei Betrachtung der Differenz der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2 zeigte sich auch hier eine statistisch signifikante Verminderung des Anteils toter Zellen um 6,48 % in der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2.

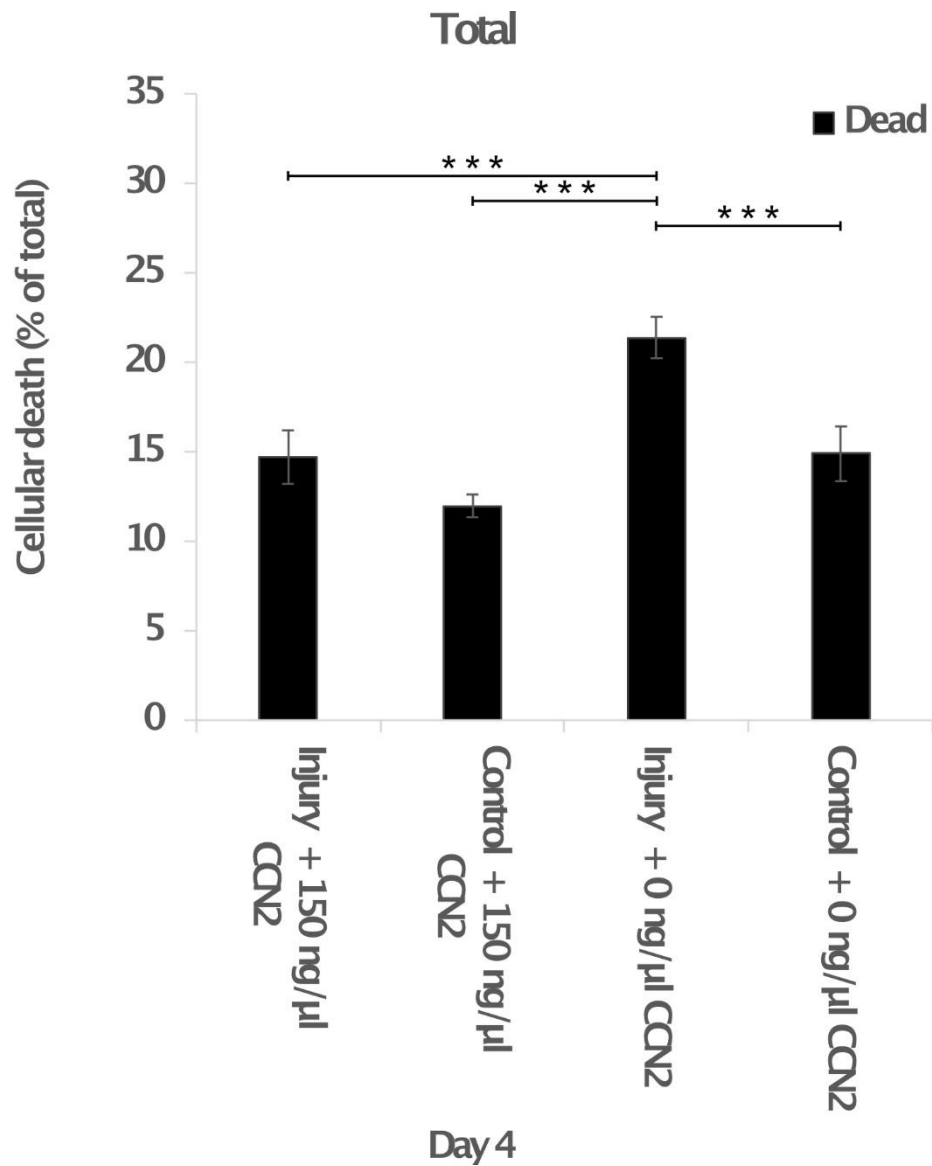


Abbildung 60: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Summe aller drei Knorpelbenen bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Bei Betrachtung der einzelnen Schichten des Knorpels zeigte sich an der ehemaligen Gelenkfläche ein statistisch signifikanter Unterschied und damit Reduktion des Anteils toter Zellen, zwischen den Injury-Versuchsgruppen mit 0 ng/ml CCN2 und 150 ng/ml CCN2 von 9,45 % in der Gruppe mit 150 ng/ml CCN2. Im Vergleich zwischen Injury mit 0 ng/ml CCN2 und Kontrolle ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 betrug die statistisch signifikante Differenz und damit Reduktion des Anteils toter Zellen, 10,44 % in der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2. Bei Betrachtung der Differenz der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2 zeigte sich auch hier eine statistisch signifikante Verminderung des Anteils toter Zellen um 8,96 % in der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2.

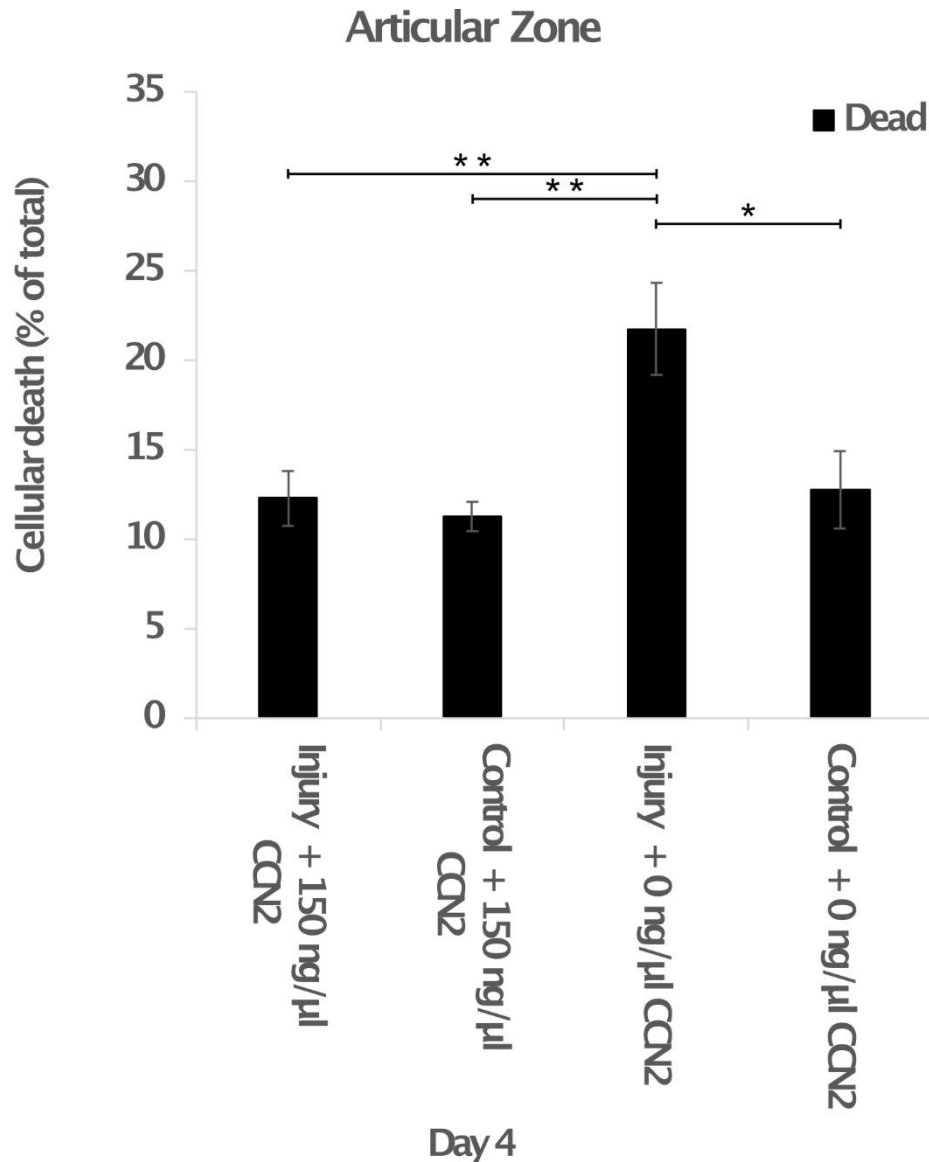


Abbildung 61: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der ehemaligen Gelenkfläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

In der mittleren Zone war der Anteil toter Zellen in der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 um statistisch signifikante 8,77 % niedriger als in der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2. Die signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen zwischen Injury mit 0 ng/ml CCN2 und Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2 betrug 9,57 % zugunsten der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2, zwischen Injury mit 0 ng/ml CCN2 und Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2 statistisch signifikante 6,80 % zugunsten der Kontrollgruppe mit 0 ng/ml CCN2.

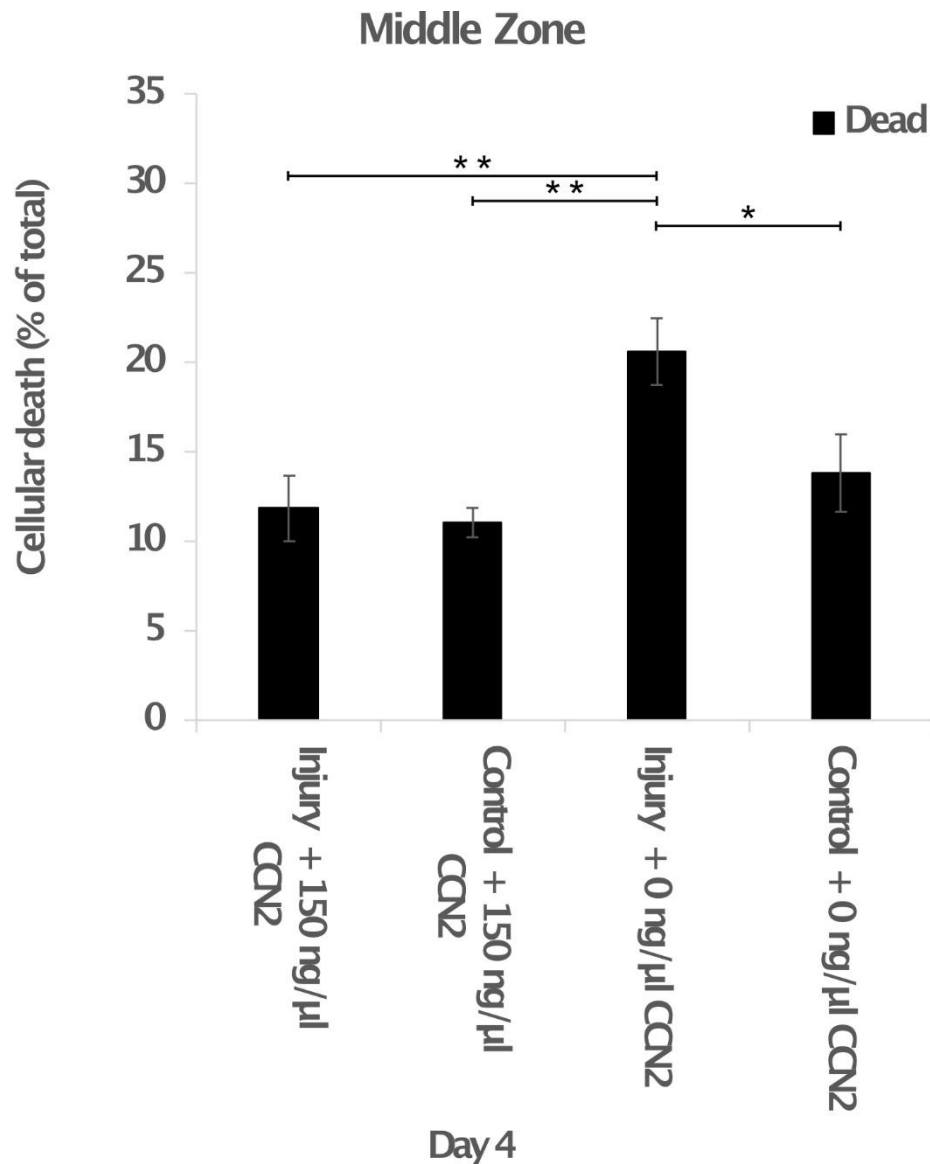


Abbildung 62: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der mittleren Zone bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

An der Schneidefläche kam es zu einer signifikanten Verminderung des Anteils toter Zellen zwischen der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2, die Differenz betrug 8,21 % zugunsten der Kontrollgruppe mit 150 ng/ml CCN2.

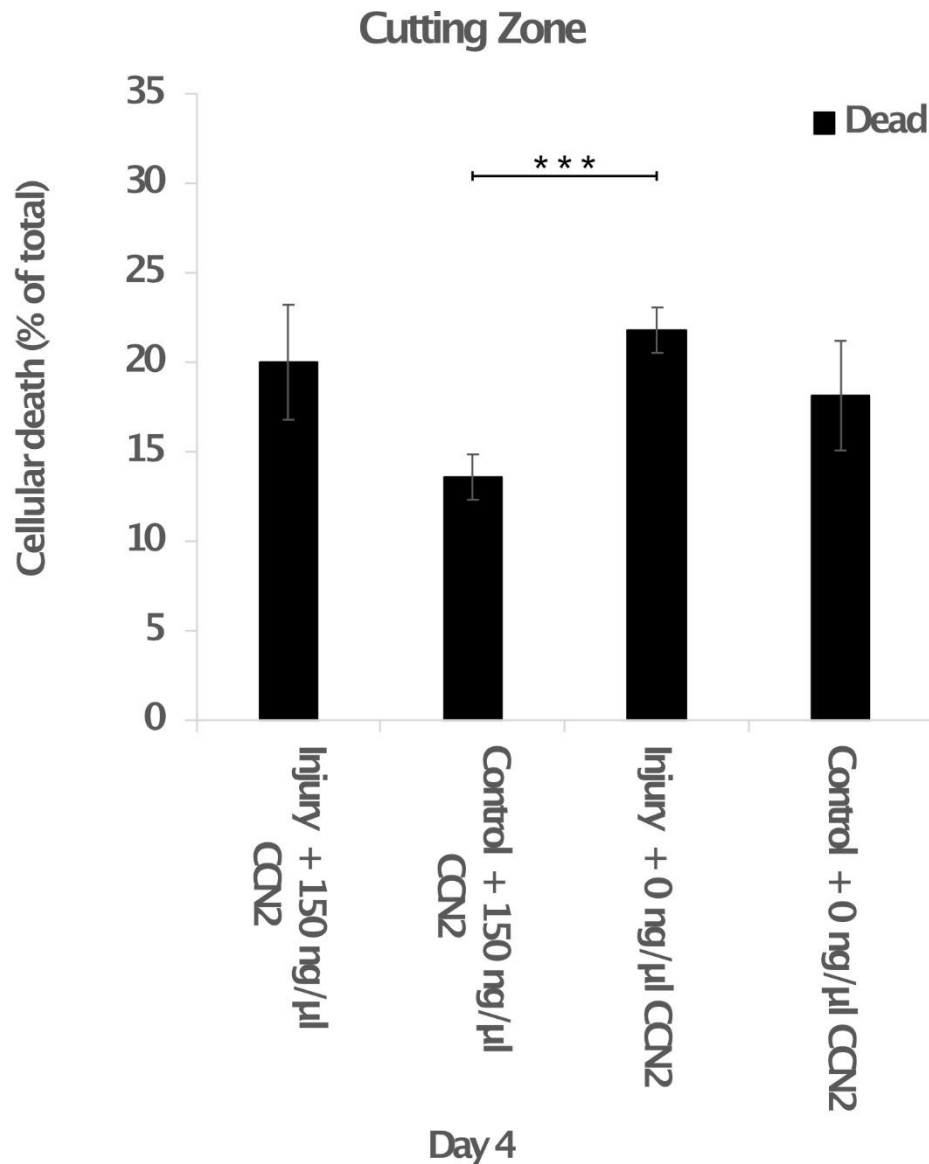


Abbildung 63: Darstellung der Ergebnisse der Live-Dead-Färbung in der Schneidefläche bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Nach Injury und Inkubationszeit von vier Tagen zeigte sich ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 und der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und damit eine signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen bei Einsatz von CCN2, mit Ausnahme der Scheidefläche.

3.4.5. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 nach einem Tag Inkubationszeit mit Hilfe des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Die Herstellung der 300 µm Knorpel-Discs erfolgte, wie in 2.2.2 beschrieben. Die Ausübung des Kompressionstraumas, die Inkubation und die anschließende DMMB-Assay erfolgte, wie in 2.5.1, 2.5.2, 2.2.2, 2.3.3, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.5, 2.6 beziehungsweise 3.2 aufgeführt. Die Daten wurden mit Excel ausgewertet. Es wurde makroskopisch guter Knorpel zu Beginn ohne, im Verlauf mit Charakterisierung der SCSO genutzt. Es wurden im Verlauf nur Knorpel-Discs mit S- und DS-SCSO ausgesucht und für die Experimente genutzt. Es wurden 2 Versuchsgruppen und 2 Kontrollgruppen gebildet:

Versuchsgruppe 1: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 1 Tag mit 150 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 1: Kein Injury, Inkubationsdauer 1 Tag mit 150 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 2: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 1 Tag mit 0 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 2: Kein Injury, Inkubationsdauer 1 Tag mit 0 ng/ml CCN2

Für den Versuchsansatz wurden Proben von 2 Gewebespendern gewonnen. Alle Gewebespenden gingen in die Auswertung ein. Die Gesamtanzahl der hergestellten Knorpel-Discs betrug 16. In die Auswertung gingen alle Proben ein. Versuchsgruppe 1, Kontrollgruppe 1, Versuchsgruppe 2 und Kontrollgruppe 2 beinhalteten davon jeweils 4 Knorpel-Discs.

Tabelle 28: Übersicht aller für das DMMB-Assay vorgesehenen und genutzten Discs mit einer Inkubationszeit von einem Tag. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Alle Discs	Genutzte Discs
VG 1	4	4
KG 1	4	4
VG 2	4	4
KG 2	4	4
Gesamt	16	16

Nach Kompression der Knorpel-Discs um 65 % der Ausgangshöhe wurde ein Tag nach Injury mittels DMMB-Assay der Gehalt an GAG in den 300 µm Knorpel-Discs sowie der Gehalt an GAG im Medium und damit Verlust an GAGs aus der Disc in das Medium, der Versuchs- und Kontrollgruppen bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von einem Tag betrug der Verlust an GAG in der Gruppe mit Injury und Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 12,82 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,24 %. Standardabweichung: 6,48 %), bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 16,30 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,77 %. Standardabweichung: 5,54 %). Bei Betrachtung der Gruppen ohne Injury zeigte sich bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 ein Anteil toter Zellen von 13,63 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,65 %. Standardabweichung: 3,31 %), bei 0 ng/ml CCN2 16,72 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,72 %. Standardabweichung: 5,45 %).

Die Unterschiede des Verlustes an GAGs zwischen den Versuchsgruppen waren statistisch nicht signifikant (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks); $p = 0,758$, t-Tests: $p > 0,05$)

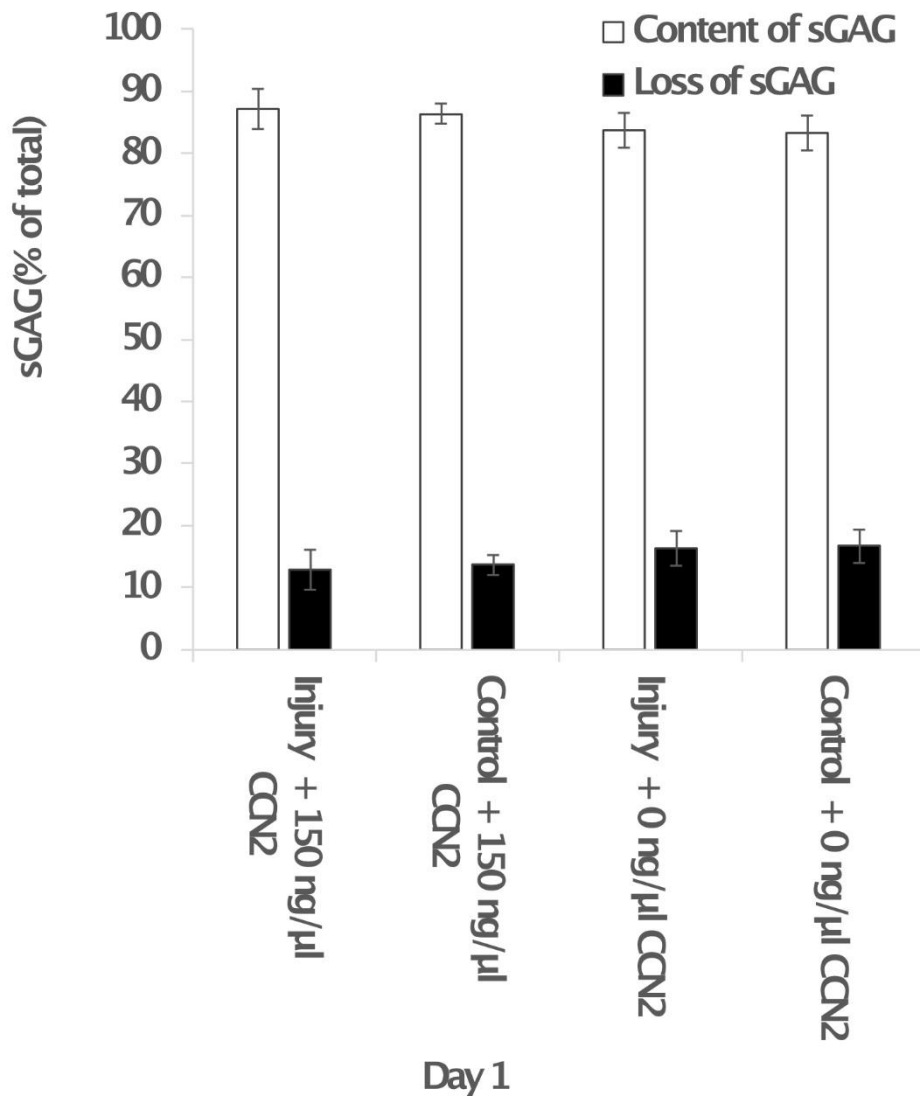


Abbildung 64: Darstellung der Ergebnisse des DMMB-Assays bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

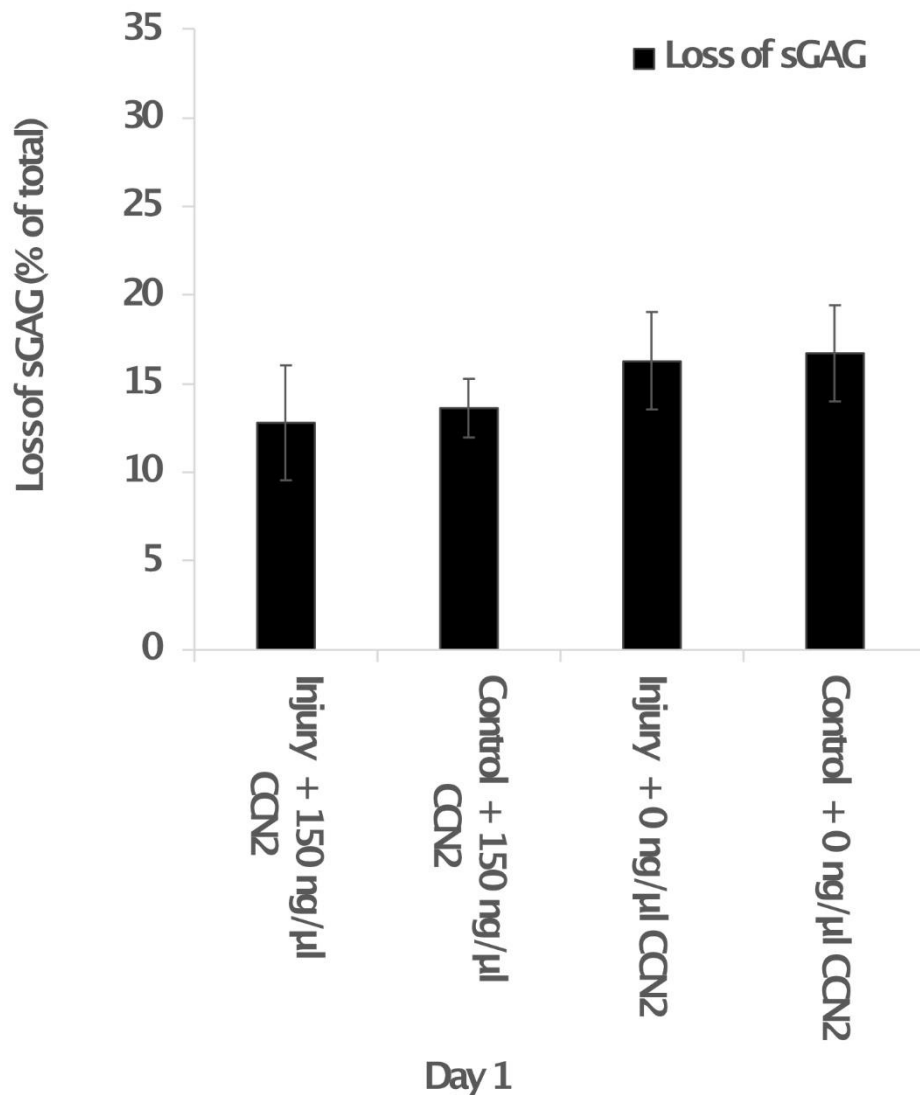


Abbildung 65: Darstellung des Verlustes an sulfatierten GAG bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von einem Tag mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Nach Injury und Inkubationszeit von einem Tag zeigte sich ein kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 und der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und damit keine signifikante Reduktion des Verlusts an GAG bei Einsatz von CCN2.

3.4.6. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 nach drei Tagen Inkubationszeit mit Hilfe des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Die Herstellung der 300 µm Knorpel-Discs erfolgte, wie in 2.2.2 beschrieben. Die Ausübung des Kompressionstraumas, die Inkubation und die anschließende DMMB-Assay erfolgte, wie in 2.5.1, 2.5.2, 2.2.2, 2.3.3, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.5, 2.6 beziehungsweise 3.2 aufgeführt. Die Daten wurden mit Excel ausgewertet. Es wurde makroskopisch guter Knorpel zu Beginn ohne, im Verlauf mit Charakterisierung der SCSO genutzt. Es wurden im Verlauf nur Knorpel-Discs mit S- und DS-SCSO ausgesucht und für die Experimente genutzt. Es wurden 2 Versuchsgruppen und 2 Kontrollgruppen gebildet:

Versuchsgruppe 1: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 3 Tage mit 150 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 1: Kein Injury, Inkubationsdauer 3 Tage mit 150 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 2: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 3 Tage mit 0 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 2: Kein Injury, Inkubationsdauer 3 Tage mit 0 ng/ml CCN2

Für den Versuchsansatz wurden Proben von 3 Gewebespendern gewonnen. Alle Gewebespenden gingen in die Auswertung ein. Die Gesamtanzahl der hergestellten Knorpel-Discs betrug 42. In die Auswertung gingen alle Proben ein. Versuchsgruppe 1 und Kontrollgruppe 1 beinhalteten davon jeweils 12 Knorpel-Discs, Versuchsgruppe 2 und Kontrollgruppe 2 jeweils 9 Knorpel-Discs.

Tabelle 29: Übersicht aller für das DMMB-Assay vorgesehenen und genutzten Discs mit einer Inkubationszeit von drei Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Alle Discs	Genutzte Discs
VG 1	12	12
KG 1	12	12
VG 2	9	9
KG 2	9	9
Gesamt	42	42

Nach Kompression der Knorpel-Discs um 65 % der Ausgangshöhe wurde drei Tage nach Injury mittels DMMB-Assay der Gehalt an GAG in den 300 µm Knorpel-Discs sowie der Gehalt an GAG im Medium und damit Verlust an GAGs aus der Disc in das Medium, der Versuchs- und Kontrollgruppen bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von drei Tagen betrug der Verlust an GAG in der Gruppe mit Injury und Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 15,11 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,67 %. Standardabweichung: 5,78 %), bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 14,14 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,86 %. Standardabweichung: 5,58 %). Bei Betrachtung der Gruppen ohne Injury zeigte sich bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 ein Anteil toter Zellen von 14,89 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,31 %. Standardabweichung: 4,53 %), bei 0 ng/ml CCN2 12,36 % (Standardfehler des Mittelwerts: 1,45 %. Standardabweichung: 4,35 %).

Die Unterschiede des Verlustes an GAGs zwischen den Versuchsgruppen waren statistisch nicht signifikant (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks); $p = 0,662$, t-Tests: $p > 0,05$).

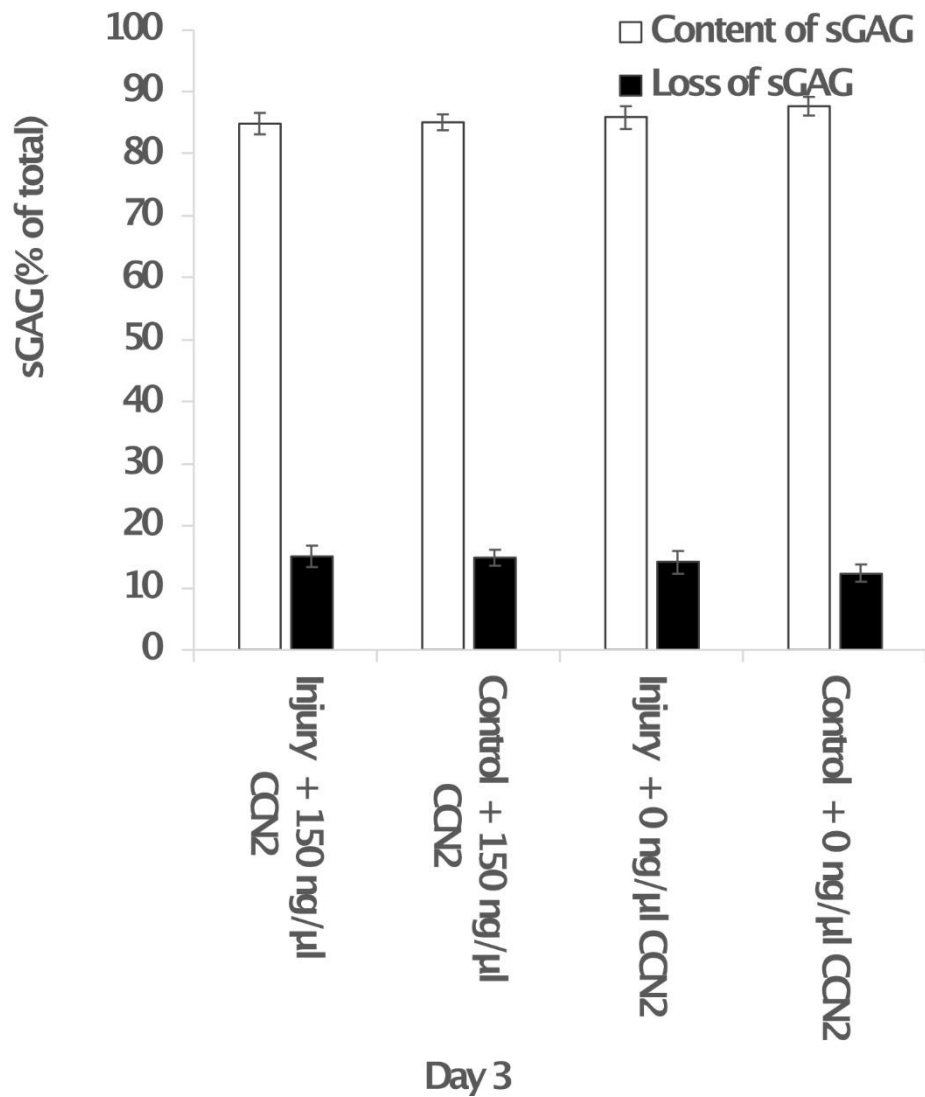


Abbildung 66: Darstellung der Ergebnisse des DMMB-Assays bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

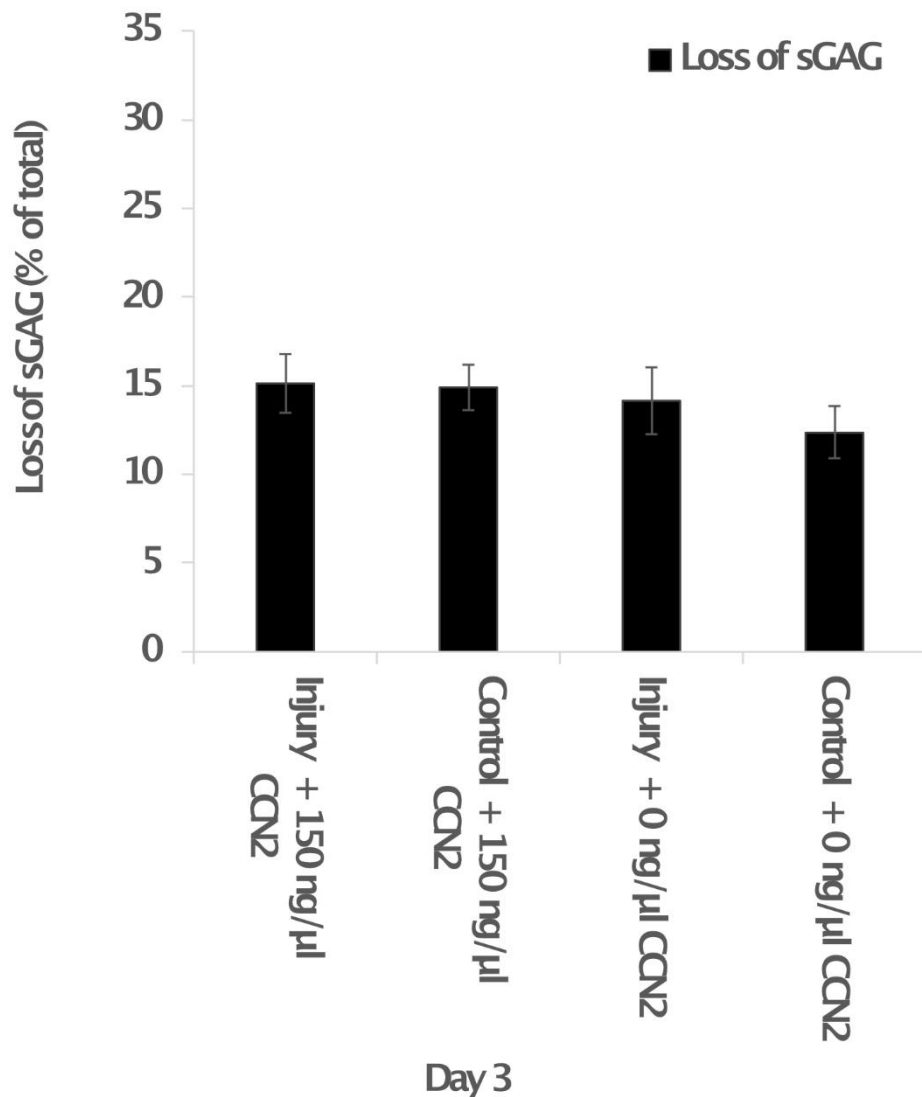


Abbildung 67: Darstellung des Verlustes an sulfatierten GAG bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von drei Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Nach Injury und Inkubationszeit von drei Tagen zeigte sich ein kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 und der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und damit keine signifikante Reduktion des Verlusts an GAG bei Einsatz von CCN2.

3.4.7. Einfluss des Kompressionstraumas auf Knorpel-Discs mit und ohne Zugabe von CCN2 nach vier Tagen Inkubationszeit mit Hilfe des 1,9-Dimethyl-Methylene Blue zinc chloride double salt (Taylor's Blue)-Assays

Die Herstellung der 300 µm Knorpel-Discs erfolgte, wie in 2.2.2 beschrieben. Die Ausübung des Kompressionstraumas, die Inkubation und die anschließende DMMB-Assay erfolgte, wie in 2.5.1, 2.5.2, 2.2.2, 2.3.3, 2.4.1, 2.4.2, 2.4.5, 2.6 beziehungsweise 3.2 aufgeführt. Die Daten wurden mit Excel ausgewertet.

Es wurde makroskopisch guter Knorpel zu Beginn ohne, im Verlauf mit Charakterisierung der SCSO genutzt. Es wurden im Verlauf nur Knorpel-Discs mit S- und DS-SCSO ausgesucht und für die Experimente genutzt. Es wurden 2 Versuchsgruppen und 2 Kontrollgruppen gebildet:

Versuchsgruppe 1: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 4 Tage mit 150 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 1: Kein Injury, Inkubationsdauer 4 Tage mit 150 ng/ml CCN2

Versuchsgruppe 2: Injury mit 65 %, Inkubationsdauer 4 Tage mit 0 ng/ml CCN2

Kontrollgruppe 2: Kein Injury, Inkubationsdauer 4 Tage mit 0 ng/ml CCN2

Für den Versuchsansatz wurden Proben von 5 Gewebespendern gewonnen. Alle Gewebespenden gingen in die Auswertung ein. Die Gesamtanzahl der hergestellten Knorpel-Discs betrug 55. In die Auswertung gingen alle Proben ein. Versuchsgruppe 1 beinhaltet davon 15 Knorpel-Discs, Kontrollgruppe 1 14 Knorpel-Discs, Versuchsgruppe 2 und Kontrollgruppe 2 jeweils 13 Knorpel-Discs.

Tabelle 30: Übersicht aller für das DMMB-Assay vorgesehenen und genutzten Discs mit einer Inkubationszeit von vier Tagen. Versuchsgruppe: VG. Kontrollgruppe: KG.

	Alle Discs	Genutzte Discs
VG 1	15	15
KG 1	14	14
VG 2	13	13
KG 2	13	13
Gesamt	55	55

Nach Kompression der Knorpel-Discs um 65 % der Ausgangshöhe wurde vier Tage nach Injury mittels DMMB-Assay der Gehalt an GAG in den 300 µm Knorpel-Discs sowie der Gehalt an GAG im Medium und damit Verlust an GAGs aus der Disc in das Medium, der Versuchs- und Kontrollgruppen bestimmt. Nach einer Inkubationszeit von vier Tagen betrug der Verlust an GAG in der Gruppe mit Injury und Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 22,55 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,17 %. Standardabweichung: 8,41 %), bei Injury mit 0 ng/ml CCN2 19,44 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,16 %. Standardabweichung: 7,78 %). Bei Betrachtung der Gruppen ohne Injury zeigte sich bei Inkubation mit 150 ng/ml CCN2 ein Anteil toter Zellen von 23,19 % (Standardfehler des Mittelwerts: 3,01 %. Standardabweichung: 11,24 %), bei 0 ng/ml CCN2 22,62 % (Standardfehler des Mittelwerts: 2,98 %. Standardabweichung: 10,76 %).

Die Unterschiede des Verlustes an GAGs zwischen den Versuchsgruppen waren statistisch nicht signifikant (ANOVA (Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks); $p = 0,805$, Mann-Whitney-Rank-Sum-Test: $p > 0,05$)

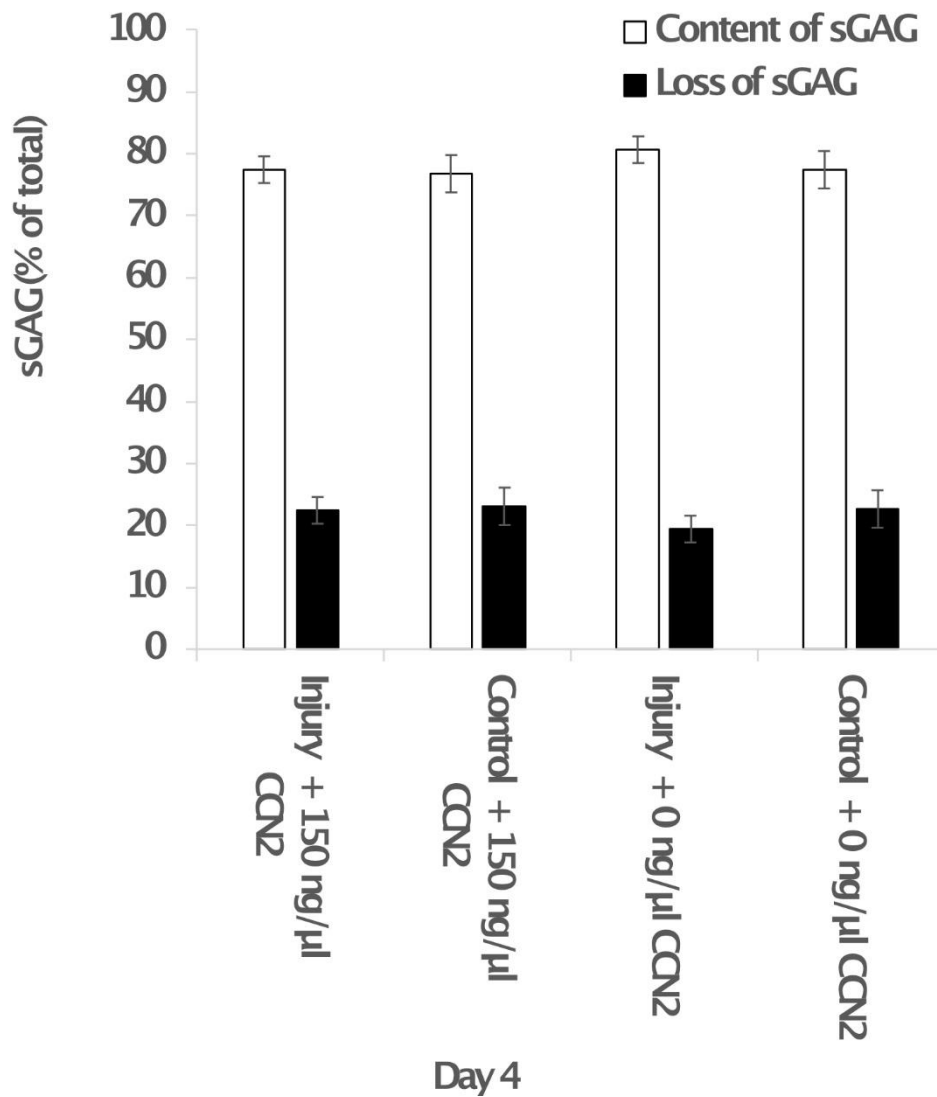


Abbildung 68: Darstellung der Ergebnisse des DMMB-Assays bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

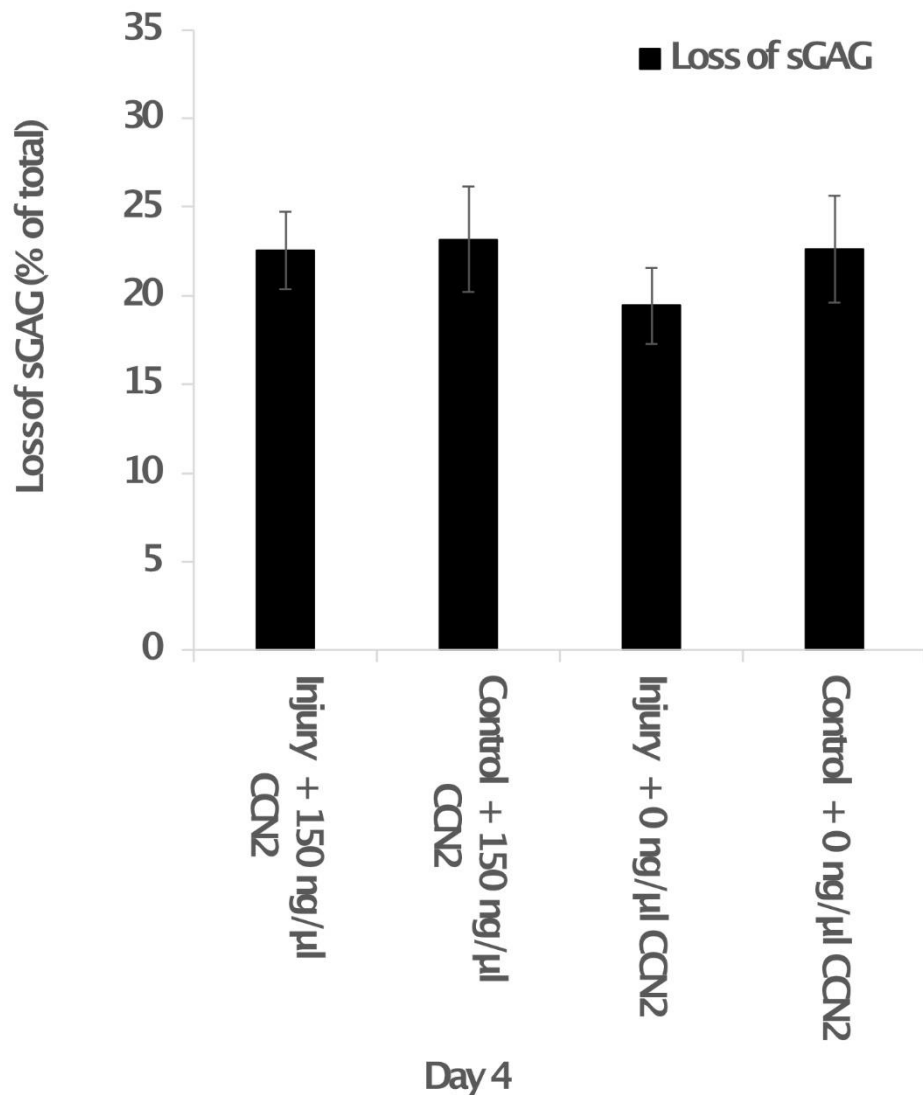


Abbildung 69: Darstellung des Verlustes an sulfatierten GAG bei den Versuchsgruppen 1 und 2 sowie Kontrollgruppen 1 und 2 und einer Inkubationsdauer von vier Tagen mit und ohne 150 ng/ml CCN2.

Nach Injury und Inkubationszeit von vier Tagen zeigte sich ein kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen der Injury-Gruppe mit 150 ng/ml CCN2 und der Injury-Gruppe mit 0 ng/ml CCN2 und damit keine signifikante Reduktion des Verlusts an GAG bei Einsatz von CCN2.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des Kompressionstraumas auf humane Knorpelimplantate sowie die Auswirkungen von CCN2 auf humane Knorpelimplantate mit und ohne Kompressionstrauma untersucht. Als Messparameter wurden die Viability und der Anteil toter Zellen in den Knorpelimplantaten sowie der Verlust an GAG definiert und gemessen. In Vorexperimenten war der Einfluss des Kompressionstraumas auf Rinderknorpel erforscht worden [88, 90].

Das Patientenkollektiv bestand aus 66 Gewebespendern mit einer Geschlechterverteilung von 51,52 % Frauen und 48,48 % Männer. Das Durchschnittsalter aller Probanden lag bei 66,06 Jahren, das der weiblichen Gewebespenden bei 68,77 und das der männlichen bei 63,19 Jahren. Das minimale Alter betrug 50, das maximale Alter zum Zeitpunkt der Prothesenimplantation 88 Jahre. Die homogene Geschlechterverteilung passt nicht ideal zur epidemiologischen Lage mit einer höheren Lebenszeitprävalenz der OA für Frauen (2012: 27,8 %) im Vergleich zu den Männern (2012: 19,7 %). Die Altersverteilung passt gut zu den epidemiologischen Daten der Bundesrepublik Deutschland mit einem deutlichen Anstieg ab 65 Jahren bei beiden Geschlechtern [50, 51].

In der vorliegenden Studie wurde die superfizielle Schicht der humanen Knorpelimplantate einer Kompressionsbelastung ausgesetzt und im Verlauf mit dem Protein CCN2 inkubiert, um erstmals die Frage zu beantworten, wie sich der Anteil toter Zellen und der Verlust an GAG sowohl im Hinblick auf die Kompression als auch das CCN2 verhält. CCN2 interagiert direkt mit FGF-2 und ist über sein CT-Module in der Lage, die durch FGF-2 ausgelöste Phosphorylierung und damit Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1/2, p38 und JNK zu vermindern. Dies führt über eine Hemmung der MMP-9 und -13 vermutlich zu einem verminderten Zelltod, zu einem verminderten Abbau der EZM sowie zu einer geringeren Zellproliferation und damit Clusterbildung [101, 117, 123, 127, 136, 137]. CCN2 ist also vermutlich in der Lage, die katabolen Effekte von FGF-2 zu antagonisieren. Mehr noch, CCN2 ist in der Lage, die

DNA- und Proteoglykan-Synthese zu steigern und somit Reparaturvorgänge einzuleiten [101, 142-144].

Zunächst wurde das Injury-Kompressionsmodell an die humanen Knorpel-Explantate angepasst und die Frage beantwortet, welche die geeignete Dicke der Knorpel-Discs nach Kompressionstrauma im Vergleich zur Kontrollgruppe war und welche Kompressionsstärke bei humanen Kniegelenksexplantaten zu einem guten Verhältnis zwischen vitalen und toten Chondrozyten nach Kompressionstrauma im Vergleich zur Kontrollgruppe führte.

Die Schichtdicke wurde lediglich als optische Einschätzung erfasst. Hier zeigte sich, dass die 300 µm messenden Discs gut für die Experimente geeignet war. Folglich wurden nur 300 µm messende Knorpel-Discs für die Experimente hergestellt, da diese Schicht besonders anfällig für Kompressionstrauma ist [90].

Dann wurde die Kompressionsstärke untersucht. Die Knorpel-Discs wurden um 50 beziehungsweise 65 % ihrer Ausgangshöhe komprimiert und nach einem und drei Tagen Inkubationszeit die Viability und der Anteil toter Zellen gemessen. Es zeigte sich ein signifikant höherer Anteil toter Zellen sowohl bei 50 als auch bei 65 % Kompression der SZ der humanen Knorpel-Explantate im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im direkten Vergleich der beiden Kompressionen zeigte sich an Tag 1 ein Anteil toter Zellen von 9,41 % bei 65 % Kompression im Vergleich zu 50 % Kompression, an Tag 3 um 10,86 %. Somit entschieden wir uns für eine Kompression der Knorpeldiscs um 65 %.

Anschließend wurde mit den Experimenten mit CCN2 begonnen. Zunächst wurde die Frage geklärt, welche Konzentration von CCN2 den Anteil toter Zellen sowie den Verlust an sulfatierten GAG im Vergleich zur Kontrollgruppe am besten vermindert. Die Knorpel-Discs wurden einer Kompression von 65 % ausgesetzt und danach für drei Tage inkubiert, mit einer CCN2-Konzentration von 0 ng/ml bis zu einer Konzentration von 200 ng/ml in 50 ng/ml-Schritten. Bei 150 ng/ml zeigte sich die maximale Reduktion des Anteils toter Zellen, in Zahlen um 10,40 %, im Vergleich zur Gruppe ohne CCN2 (0 ng/ml). Der größte

Effekt von CCN2 konnte in der mittleren Zone gemessen werden, hier reduzierten die 150 ng/ml den Anteil toter Zellen um 11,47 %, dicht gefolgt von der ehemaligen Gelenkfläche mit einer Reduktion um 10,96 %. In der Schneidefläche war der Effekt am geringsten, hier zeigte sich eine Verminderung des Anteils toter Zellen um 8,76 %. Bei den Messungen des GAG-Verlustes zeigten sich keine statistisch signifikanten Differenzen.

Im Verlauf wurde die optimale CCN2-Konzentration genutzt, um die Frage zu beantworten, bei welcher Inkubationszeit (ein, drei oder vier Tage) sowie auf welche Schicht der 300 µm Knorpel-Disc der größte Effekt von CCN2 nach Injury im Vergleich zu den Gruppen ohne CCN2 nachweisbar ist und ob das CCN2 auch einen Effekt auf die Kontrollgruppe ohne Kompressionstrauma hat. Die Knorpel-Discs wurden einer Kompression von 65 % (Versuchsgruppen 1 und 2) oder keiner Kompression ausgesetzt (Kontrollgruppen 1 und 2) und danach für einen, drei sowie vier Tage mit einer CCN2-Konzentration von 150 ng/ml (Versuchsgruppe 1, Kontrollgruppe 1) sowie 0 ng/ml (Versuchsgruppe 2, Kontrollgruppe 2) inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden die Viabilität, der Anteil toter Zellen sowie der Verlust von GAG aus den Knorpel-Discs in das Kulturmedium gemessen. Dabei konnte nach einem Tag Inkubationszeit ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Inkubation mit CCN2 und der Reduktion des Anteils toter Zellen sowohl nach Injury als auch ohne Injury nachgewiesen werden. Nach einem Tag Inkubationszeit zeigte sich in der Gesamtübersicht der drei Knorpel-Ebenen eine statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) im Vergleich zur Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2), in Zahlen von 6,39. Zudem konnte eine statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen in der Kontrollgruppe 1 ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 im Vergleich zur Kontrollgruppe 2 ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 von 2,82 % nachgewiesen werden. Auch in den einzelnen Knorpel-Ebenen zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) im Vergleich zur Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2) sowie in der Kontrollgruppe 1 ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 im Vergleich zur

Kontrollgruppe 2 ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2, mit Ausnahme der Schneidefläche. An der ehemaligen Gelenkfläche konnte eine Reduktion des Anteils toter Zellen von 5,34 % (Versuchsgruppe 1 zu Versuchsgruppe 2) sowie 4,18 % (Kontrollgruppe 1 zu Kontrollgruppe 2) nachgewiesen werden, in der mittleren Zone von 11,36 % (Versuchsgruppe 1 zu Versuchsgruppe 2) sowie 3,62 % (Kontrollgruppe 1 zu Kontrollgruppe 2).

Nach drei Tagen Inkubationszeit konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Inkubation mit CCN2 und der Reduktion des Anteils toter Zellen sowohl nach Injury als teilweise auch ohne Injury nachgewiesen werden. Nach drei Tagen Inkubationszeit zeigte sich in der Gesamtübersicht der drei Knorpelenebenen eine statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) im Vergleich zur Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2), in Zahlen von 7,02. Zudem konnte eine statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen in der Kontrollgruppe 1 ohne Injury mit 150 ng/ml CCN2 im Vergleich zur Kontrollgruppe 2 ohne Injury mit 0 ng/ml CCN2 von 5,65 % nachgewiesen werden. Auch in den einzelnen Knorpelenebenen zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) im Vergleich zur Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2), mit Ausnahme der Schneidefläche. An der ehemaligen Gelenkfläche konnte eine Reduktion des Anteils toter Zellen von 8,03 % (Versuchsgruppe 1 zu Versuchsgruppe 2) nachgewiesen werden, in der mittleren Zone von 8,24 % (Versuchsgruppe 1 zu Versuchsgruppe 2). Im Vergleich der Gruppen ohne Injury (Kontrollgruppe 1 mit 150 ng/ml CCN2 und Kontrollgruppe 2 mit 0 ng/ml CCN2) konnte lediglich an der Schneidefläche ein statistisch signifikanter Effekt auf den Anteil toter Zellen von 7,63 % zugunsten der Gruppe mit CCN2 gezeigt werden.

Nach vier Tagen Inkubationszeit konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Inkubation mit CCN2 und der Reduktion des Anteils toter Zellen nach Injury nachgewiesen werden. Nach vier Tagen Inkubationszeit zeigte sich in der Gesamtübersicht der drei Knorpelenebenen eine

statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) im Vergleich zur Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2), in Zahlen von 6,67 %. Auch in den einzelnen Knorpelstadien zeigte sich eine statistisch signifikante Reduktion des Anteils toter Zellen in der Gruppe Injury mit 150 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 1) im Vergleich zur Gruppe Injury mit 0 ng/ml CCN2 (Versuchsgruppe 2), mit Ausnahme der Schneidefläche. An der ehemaligen Gelenkfläche konnte eine Reduktion des Anteils toter Zellen von 9,45 % (Versuchsgruppe 1 zu Versuchsgruppe 2) nachgewiesen werden, in der mittleren Zone von 8,77 % (Versuchsgruppe 1 zu Versuchsgruppe 2). Im Vergleich der Gruppen ohne Injury waren die Unterschiede an Tag 4 statistisch nicht signifikant.

Bei den Messungen des GAG-Verlustes an Tag 1, 3 und 4 zeigten sich keine statistisch signifikanten Differenzen.

In [90] konnte bereits der Einfluss von Kompressionstraumata auf unreifen Knorpel von Rinderkälbern gezeigt werden. Hier fielen in der extrem weichen superfiziellen Schicht Oberflächenzerreißen, Verdichtung der SZ, biomechanische und biochemische Beeinträchtigungen auf. Zu den biomechanischen Beeinträchtigungen zählten Verlust an Steifigkeit sowie ein nicht mehr messbares Elastizitätsmodul (Kompressionssteifigkeit). Auch Bereiche, die intakt erschienen, wiesen strukturelle Schäden auf. Zu den biochemischen Beeinträchtigungen zählte der sekundäre Verlust an GAG ohne eine nachweisbare Post-Trauma-Synthesesteigerung [90].

Zelltod scheint ein relevanter Faktor der OA-Entstehung sowie der OA-Progression zu sein [52, 183-185]. Apoptose kommt in Knorpel mit OA deutlich häufiger vor als in gesundem Knorpel [52, 183-188]. Darüber hinaus scheint es einen direkten Bezug zwischen Knorpelschädigung beziehungsweise Ausprägung der OA und der Anzahl der apoptotischen Chondrozyten zu geben [52, 186]. Apoptose und Verlust an ECM sind miteinander assoziiert und der Apoptose scheint der Verlust der ECM voranzugehen [52, 96, 183, 186, 188, 189]. Dazu passt auch, dass eine vermehrte Expression von Collagenase Chondrozyten für Apoptose anfällig macht. Demgegenüber steht eine Studie,

die gezeigt hat, dass die Dysfunktion der lebenden Chondrozyten, nicht der Zelltod als solches, zu Knorpelschäden sowie Degeneration durch katabole Prozesse nach Trauma führt [52, 96, 190]. Die Frage, ob der Zelltod ein Auslöser oder eine Folge der OA ist, ist nicht endgültig zu beantworten und wird in der Literatur kontrovers diskutiert [52, 191].

Kompressionstrauma führt zu einem signifikanten Zelltod, sowohl durch Apoptose [52, 91, 169, 172] als auch durch Nekrose [52, 172, 173]. Betrachtet man die Zeitachse, so kommt es direkt nach dem Trauma in der superfiziellen Schicht zunächst hauptsächlich zu einer Nekrose der Chondrozyten mit konsekutiv geringem Apoptoseanteil, im Verlauf dann zunehmend zur Apoptose. Zudem korreliert der Zelltod positiv mit der Dauer der Belastung [52, 172], die Art des Zelltodes (Apoptose versus Nekrose) mit der Belastungsstärke. Je größer die Belastung, desto höher der Nekroseanteil [52, 174]. Die Apoptose geht mit Verlust an Extrazellulärmatrixproteinen wie GAG, Aggrecan und Kollagen Typ II einher [52, 169, 170]. Belastung von Knorpelgewebe führt aber nicht immer zu Apoptose und Verlust an Makromolekülen. Je nach Intensität kann die Belastung des Knorpels Zelltod induzieren, aber auch zu Zellproliferation führen [52, 192]. Je nach Art der Belastung kann es zum Verlust oder zur vermehrten Expression von Matrixproteinen kommen. Hydrostatischer Druck führt zur vermehrten Expression von Aggrecan und Kollagen Typ II, während Scherkräfte eher zu einer verminderten Expression führen [52, 170].

Apoptose der Chondrozyten geht mit einem Anstieg der Phosphorylierung der MAP-Kinasen JNK, ERK 1/2 und p38 MAPK einher. Auch der mitochondriale Signalweg scheint die Apoptose der Chondrozyten zu induzieren. Hemmt man die MAP-Kinasen vor der Belastung, wird deren Phosphorylierung und damit Aktivierung und auch die Apoptose reduziert [52, 193, 194]. Insbesondere der Zelltod durch Apoptose scheint durch Hemmung der MAP-Kinasen regulierbar.

Eine mögliche Fehlerquelle sind Zelltod bei der Herstellung, insbesondere schräg angeschnittene Knorpel-Discs sowie Risse an der Oberfläche durch die Präparation sowie das Kompressionstrauma [88, 90]. Um diesem Fehler

vorzubeugen, wurde die Präparation standardisiert vorgenommen und Knorpel-Discs mit Rissen beziehungsweise Oberflächenstörungen konsequent aus der Wertung ausgeschlossen. Zusätzlich wurde die Zeit zwischen Gewebeentnahme und Verarbeitung standardisiert und die Verarbeitung, die Experimente und die Messungen immer zur möglichst gleichen Zeit durchgeführt. So wurden alle Knorpelproben am Tag nach Explantation in zu Knorpel-Discs verarbeitet und die Charakterisierung mittels Calcein durchgeführt und dann für einen weiteren Tag inkubiert, um den Fehler durch die Präparation möglichst gering zu halten. Am Folgetag erfolgte die Verteilung in die verschiedenen Versuchsgruppen und Ausübung des Kompressionstraumas sowie die Anlage der Zellkultur. Es war also davon auszugehen, dass die erhobenen Daten durch die standardisierte Verarbeitungsprozesse und strenge Einhaltung der Inkubationszeiten des stets im Inkubator gelagerten Gewebes qualitativ profitierten.

Eine strukturierte Analyse des Einflusses des Kompressionstraumas und damit der Simulation der PTOA-Entstehung ist sinnvoll, um erste Anhalte zu gewinnen, wie sich humaner Knorpel zu Beginn der OA-Entstehung verhält. In der vorliegenden Studie wurden dazu Proben aus makroskopisch gutem, glattem Knorpel gewonnen und einer Charakterisierung nach [6, 17, 96, 97] unterzogen. Da zur Simulation der PTOA-Entstehung nach [90] möglichst gesunder Knorpel als Ausgangsmaterial ausgewählt werden musste, wurden gemäß den Ergebnissen von [6, 17, 23, 96, 97] primär die als gesund angesehene SCSO S [6, 17, 23, 96, 97] ausgewählt und verwendet. Da die Knorpelproben aus Resektaten bei Endoprothesen gewonnen wurden und die Endoprothesenversorgung erst bei fortgeschrittener Gonarthrose indiziert ist [49-51, 57, 102, 195-197], waren makroskopisch gesunder Knorpel und S-SCSO sehr selten. Aus diesem Grund entschieden wir uns, auch die zur beginnenden OA zählende Organisationsform DS [6, 17, 23, 96, 97] als gesunden Knorpel einzustufen und in die Experimente miteinzubeziehen. Insbesondere S- und DS-SCSO sind besonders empfindlich für eine durch FGF-2-Stimulation ausgelöste Proliferation und somit Verlust der

Oberflächenorganisation [17]. FGF-2 scheint insbesondere in der OA-Entstehung aus gesundem Knorpel eine entscheidende Rolle zu spielen.

FGF-2 (auch basic FGF genannt) wird endogen im Knorpelgewebe hergestellt und bindet an Perlecan. Perlecan ist ein Heparansulfat-Proteoglykan und Bestandteil der ECM, das das gebundene FGF-2 absondern kann. Bei Belastung wird das an Perlecan gebundene FGF-2 freigesetzt [133-135, 138]. FGF-2 führt über den FGFR-1 zu diesen katabolen Prozessen. Neben der Proliferation durch Stimulation von FGFR-1 wird die Aktivität von abbauenden Enzymen der Knorpelmatrix gesteigert, es kommt zur Hemmung der Produktion der ECM und Proteoglykan-Synthese [117, 127, 136, 137]. Betrachtet man diesen Mechanismus genauer, führt die Aktivierung von FGFR-1 durch FGF-2 zur Aktivierung verschiedener Signalwege, wie PKC δ , NF κ B, Ras-Raf-MAPK und PI3K/Akt zu einer Hochregulation von MMP-13. Beim Ras-Raf-MAPK-Signalweg müssen dazu alle 3 MAPK-Untergruppen (ERK, JNK und p38 aktiviert werden) [127]. Die Bindung des CT-Module von CCN2 an FGF-2 führt zu einer verminderten Aktivierung des FGFR-1, was zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung des Ras-Raf-MAPK-Signalweg mit den MAPK ERK, JNK und p38 führt und in der Folge zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung von MMP-13. Zusätzlich wird die Proliferation der Chondrozyten durch Hemmung des FGFR-1 gehemmt. Folglich scheint das CT-module ein Regulator der FGF-2- und damit der Knorpelhomöostase zu sein [123]. Dies deckt sich mit den Ergebnissen unserer Studie mittels Live-Dead-Assay, in der es durch Einsatz von CCN2 zu einer signifikanten Reduktion des Anteils toter Zellen, am ehesten durch die Hemmung der MAP-Kinasen und MMP-13 [52, 123, 193, 194], kommt. Insgesamt scheint CCN2 Faktoren der OA-Entstehung nach Trauma zu hemmen, nicht aber die Arthroseentstehung selbst. Die Frage, wodurch der Zelltod nach Kompressionstrauma im Verlauf der Inkubationszeit genau ausgelöst wird und welcher Mechanismus genau zu einer Hemmung des Zelltodes führt, konnte mittels der durchgeführten Studie nicht geklärt werden. Hier sind weitere Experimente notwendig, um den genauen molekularen Mechanismus zu verstehen. Hier sollten RT-PCR- und Western-Blot-Untersuchungen durchgeführt werden, um insbesondere die

Expression und Quantität der MAP-Kinasen ERK, JNK und p38 sowie der Matrix-Metallo-Proteinasen nachzuweisen [123, 127].

Wie oben beschrieben, sind GAG Polysaccharide, die aus sich wiederholenden Disacchariden bestehen. PG sind Proteine, an die ein oder mehrere GAG - Ketten kovalent gebunden haben. Dies führt zu einer hohen Ladungsdichte und darüber zu einem hohen osmotischen Schwelldruck. Die PG der Matrix üben diesen Schwelldruck auf die nicht ausdehnbaren Kollagenfasern und damit das Netzwerk aus Kollagen aus. Dies führt zur Widerstandsfähigkeit, der Widerstandskraft gegen Kompression bei minimaler Verformung sowie der geringen Reibung der Gelenkoberfläche im Knorpel [20]. Nach Kompressionstrauma kommt es zu einem Verlust von sulfatierten GAG aus der superfiziellen Schicht des Gelenkknorpels. Der Verlust setzt nicht direkt nach dem Kompressionstrauma, sondern erst im Verlauf ein und könnte zur Entstehung einer sekundären, PTOA führen [90]. Wie oben bereits erwähnt, wird FGF-2 endogen im Knorpelgewebe hergestellt und bindet an Perlecan. Perlecan kann das gebundene FGF-2 absondern. Bei Belastung wird das an Perlecan gebundene FGF-2 freigesetzt [133-135, 138]. FGF-2 führt durch Bindung an den FGFR1 zu katabolen Effekten in humanem Gelenkknorpel. Durch die Bindung und Aktivierung von FGF-2 an den FGFR1 kommt es zur Hochregulation und damit vermehrten Produktion Matrix-abbauender Enzyme, Hemmung der Ansammlung von Matrixproteinen sowie der Proteoglykan-Synthese sowie Clusterbildung der Chondrozyten. In Experimenten konnte nachgewiesen werden, dass es bei der belastungsinduzierten Freisetzung von FGF-2 zur Aktivierung von ERK und damit des ERK-Signalweges und zur vermehrten Produktion von Matrix-Metalloproteinasen, Gewebeinhibitor der Metalloproteinase 1 sowie Glykoprotein 38 kommt [133, 135, 138]. Betrachtet man den Mechanismus genauer, so führt die Bindung von FGF-2 an den FGFR1 zur Phosphorylierung des Rezeptors, die wiederum den Ras- und den PKC δ -Signalweg aktiviert. Dies führt zur Aktivierung der Raf-MEK1/2-ERK1/2-Kaskade, die über die Regulation der Genexpression MMP-13 und ADAMTS-5 hochreguliert und Aggrecan supprimiert [138, 198]. Zudem führt PKC δ zur Aktivierung aller drei MAPK-Untergruppen ERK, p38 sowie JNK, die über den

Transkriptionsfaktor ELK-1 zur Aktivierung von MMP-13 führen und so zur Degradierung von Knorpelgewebe führen [127, 138, 141, 199]. Wie oben beschrieben, führt die Bindung des CT-Module von CCN2 an FGF-2 zu einer verminderten Aktivierung des FGFR-1, was zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung des Ras-Raf-MAPK-Signalweg mit den MAPK ERK, JNK und p38 führt und in der Folge zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung von MMP-13 [123]. Folglich sollte es durch die Hemmung von FGF-2 durch CCN2 und damit die verminderte Bindung und Aktivierung von FGFR-1 auch zur Suppression der Expression von ADAMTS-5 kommen und die Expression von Aggrecan gesteigert werden [171, 172]. In der Folge sollte so die Degradierung des Knorpelgewebes gehemmt werden [127, 138, 141, 199]. Aber es gibt auch gegensätzliche Berichte in der Literatur. In [53] konnte gezeigt werden, dass der Verlust an GAG zwar durch eine Substanz beeinflussbar war, aber andere degenerationshemmende Substanzen keinen Einfluss auf den Verlust an GAG hatten. Vielmehr war der GAG-Verlust durch passives Ausschwemmen erklärbar [53]. Aus diesem Grund führten wir nach Injury die Messung des Verlustes an sulfatierten GAG in das Kulturmedium durch. Um den Messfehler möglichst gering zu halten, wurden die Discs nach dem Schneiden für einen Tag inkubiert und das Medium verworfen, um den Fehler des GAG-Verlustes durch Schneiden auszugleichen. Zudem wurden die Proben zweimal gemessen und der Mittelwert der Extinktionen gebildet. In unseren Experimenten zeigte sich hier keine statistisch signifikanten Unterschiede bezüglich des Verlustes an sulfatierten GAG an Tag 1, 3 und 4 nach Trauma. An Tag 1 war eine Tendenz erkennbar, dass bei Inkubation mit CCN2 der Verlust an GAG in das Kulturmedium insgesamt niedriger war als in der Gruppe ohne CCN2. An Tag 3 und 4 war diese Tendenz nicht mehr erkennbar, was eventuell für einen frühen Effekt von CCN2 auf den Abbau der ECM sowie auf die Knorpelhomöostase spricht [123]. Möglicherweise ist die ausgeübte Kompression auf den Knorpel zwar ausreichend für einen signifikanten Zelltod, aber nicht ausreichend für einen adäquaten Verlust an sulfatierten GAG, möglicherweise auch im Verhältnis zum Verlust über die große Schneidefläche an der Unterseite der Knorpel-Discs. Es

sind weitere Experimente notwendig, um die Kompression zu erhöhen und über PCR- und Western-Blot-Untersuchungen den Einfluss von CCN2 auf die molekularen Signalwege nachzuvollziehen.

Wie oben bereits erwähnt, führt FGF-2 insbesondere bei S- und DS-SCSO zur Proliferation und somit Verlust der Oberflächenorganisation [17], gerade bei gesundem Knorpel und in sehr frühen Stadien der OA [6, 17, 23, 96, 97]. Somit bietet insbesondere das CT-Module von CCN2 als möglicher Regulator der Knorpelhomöostase und Modulator des FGF-2-Signalweges mit Regulation der Chondrozyten-Proliferation und Inhibition der Synthese von Matrix-Metallo-Proteinasen [123] die Möglichkeit, in frühen Stadien der Osteoarthritis eine mögliche therapeutische Option zu bieten. Für die Zukunft wäre es sicherlich interessant, den Effekt von CCN2 auch in späteren Stadien der OA, beispielsweise bei SC und BC sowie im D-Stadium [6, 17, 23, 96, 97] zu ermitteln, da Patienten oft erst im Verlauf der Arthroseerkrankung und mit zunehmendem Alter symptomatisch werden [50, 51, 57, 58, 102, 200]. Hier sind weiterführende Experimente mittels Live-Dead-Assay sowie RT-PCR und Western Blot notwendig, um die Effektivität der Wirkung von CCN2 auf den Zelltod sowie den FGF-2-Signalweg mit Expression und Quantität der MAP-Kinasen und der Matrix-Metallo-Proteinasen [123, 127] bei fortgeschrittenen Stadien der OA zu erforschen.

5. Zusammenfassung

Arthrose (OA) ist eine bis heute nicht vollständig verstandene degenerative Gelenkerkrankung, die das gesamte Gelenk, also den Gelenkknorpel und die umgebenden Strukturen und Gewebe betrifft [4, 27-30] und für die aufgrund des fehlenden Verständnisses nur unzureichende therapeutische Optionen zur Verfügung stehen. Insbesondere biologische Therapien zur Prävention sowie zur kausalen Therapie stehen momentan noch nicht zur Verfügung [50, 102]. Nach (Kompressions-)Trauma kommt es im Knorpelgewebe zu einem signifikanten Zelltod durch Apoptose [52, 91, 169, 172] und Nekrose [52, 172, 173], wobei direkt nach dem Trauma Nekrose dominiert und im Verlauf die Apoptose überwiegt [52, 172, 174]. Außerdem kommt es zum Verlust an Matrixbestandteilen, insbesondere sulfatierten Glykosaminoglykanen, Aggrecan sowie Kollagen Typ II. Dieser Verlust der Makromoleküle geht mit der Apoptose einher [90, 169, 170, 172]. Zelltod scheint ein relevanter Faktor der OA-Entstehung sowie der OA-Progression zu sein [52, 183-185]. FGF-2 (auch basic FGF genannt) wird endogen im Knorpelgewebe hergestellt und bindet an Perlecan, ein PG und Bestandteil der ECM, das das gebundene FGF-2 bei Belastung freisetzt [133-135, 138]. Neben der Regulation der Apoptose durch FGF-2 kommt es durch die Bindung und Aktivierung von FGF-2 an den FGFR1 über den Ras- und den PKC δ -Signalweg zu katabolen Prozessen im humanen Gelenkknorpel, wie vermehrte Produktion Matrix-abbauender Enzyme, Hemmung der Ansammlung von Matrixproteinen sowie der Proteoglykansynthese sowie Clusterbildung der Chondrozyten [117, 127, 133, 135-138, 198].

CCN2 ist über die Bindung des CT-Module von CCN2 an FGF-2 in der Lage, die Aktivierung von FGFR-1 zu hemmen, was zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung des Ras-Raf-MAPK-Signalweg mit den MAPK ERK, JNK und p38 führt und in der Folge zu einer verminderten Phosphorylierung und Aktivierung von MMP-13. Zusätzlich wird die Proliferation der Chondrozyten durch Hemmung des FGFR-1 gehemmt. Folglich scheint das CT-module ein Regulator der FGF-2- und damit der Knorpelhomöostase zu sein [123]. Demzufolge sollte es durch die Hemmung der Aktivierung des FGFR-1

über die Hemmung der MAP-Kinasen sowie des PKC δ -Signalweges zu einer Reduktion der Apoptose [52, 193, 194], verminderten Clusterbildung der Chondrozyten [133, 135, 138] sowie über die Hemmung von MMP-13 [123], ADAMTS-5 und vermehrten Expression von Aggrecan [171, 172] zu einer verminderten Degradierung des Knorpelgewebes kommen [127, 138, 141, 199].

In der vorliegenden Arbeit konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der posttraumatischen Inkubation mit CCN2 und der Reduktion des Anteils toter Zellen nachgewiesen werden. Inkubiert man Knorpel-Discs der Superficial Zone (SZ) nach einem Kompressionstrauma mit CCN2, führt dies in den untersuchten Zeiträumen zu einer signifikanten Reduktion des Anteils toter Zellen. Die Ergebnisse legen einen direkten Zusammenhang zwischen dem Einfluss des CCN2 auf die oben beschriebenen Signalwege und der Reduktion des Anteils toter Zellen nahe. Weitere Untersuchungen bezüglich der Art des Zelltodes (Nekrose versus Apoptose) sowie RT-PCR- und Western-Blot-Untersuchungen sind notwendig, um den Einfluss auf die Signalwege durch CCN2 zu beweisen. Beim posttraumatischen Verlust an Matrixproteinen konnte nur eine Tendenz, aber kein signifikanter Zusammenhang nachgewiesen werden. Hier sind weitere Experimente, eventuell mit höherer Kompressionsbelastung, notwendig, um diesen Sachverhalt weiter zu untersuchen.

Mit der vorliegenden Arbeit konnten wir einen Beitrag zum besseren Verständnis der Pathophysiologie der OA und der resultierenden Gewebeerstörung leisten und einen Grundstein für weiterführende Forschung und möglicher Therapieansätze legen. Wir konzentrierten uns in der vorliegenden Arbeit auf humanen Kniegelenksknorpel, genauer auf die weiche SZ möglichst gesunden Knorpels der distalen Femurkondylen nach Kniegelenks-Totalendoprothesen, da diese Schicht vulnerabel für Kompressionstrauma [90] und früh im Krankheitsverlauf der OA betroffen ist [4].

6. Literaturverzeichnis

1. Schmidt, W., *Bewegungssystem – Grundlagen*, in *Duale Reihe Anatomie*. 2017, Georg Thieme Verlag.
2. Wurzinger, L.J., *Kniegelenk (Articulatio genus)*, in *Duale Reihe Anatomie*, G. Aumüller, et al., Editors. 2017, Georg Thieme Verlag. p. 363-379.
3. Greene, G.W., et al., *Adaptive mechanically controlled lubrication mechanism found in articular joints*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(13): p. 5255-9.
4. Loeser, R.F., et al., *Osteoarthritis: a disease of the joint as an organ*. Arthritis Rheum, 2012. **64**(6): p. 1697-707.
5. Kuettner, K.E., M.B. Aydelotte, and E.J. Thonar, *Articular cartilage matrix and structure: a minireview*. J Rheumatol Suppl, 1991. **27**: p. 46-8.
6. Rolaufts, B., et al., *Distinct horizontal patterns in the spatial organization of superficial zone chondrocytes of human joints*. J Struct Biol, 2008. **162**(2): p. 335-44.
7. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Taschenlehrbuch Histologie*. 6 ed. 2019, Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag. 784.
8. Aigner, T., et al., *Mechanisms of disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis--structure, chaos and senescence*. Nat Clin Pract Rheumatol, 2007. **3**(7): p. 391-9.
9. Aigner, T., et al., *Independent expression of fibril-forming collagens I, II, and III in chondrocytes of human osteoarthritic cartilage*. J Clin Invest, 1993. **91**(3): p. 829-37.
10. Eyre, D.R., et al., *Biosynthesis of collagen and other matrix proteins by articular cartilage in experimental osteoarthrosis*. Biochem J, 1980. **188**(3): p. 823-37.
11. Eyre, D.R., M.A. Weis, and J.J. Wu, *Articular cartilage collagen: an irreplaceable framework?* Eur Cell Mater, 2006. **12**: p. 57-63.
12. Hermansson, M., et al., *Proteomic analysis of articular cartilage shows increased type II collagen synthesis in osteoarthritis and expression of inhibin betaA (activin A), a regulatory molecule for chondrocytes*. J Biol Chem, 2004. **279**(42): p. 43514-21.
13. Williamson, A.K., A.C. Chen, and R.L. Sah, *Compressive properties and function-composition relationships of developing bovine articular cartilage*. J Orthop Res, 2001. **19**(6): p. 1113-21.
14. Egler, A., *Matrixmetalloproteasen 1, 2, 3, 9, 13 - und Kollagen Typ VI - mRNA-Expression humaner Chondrozyten in verschiedenen räumlichen Organisationsformen*. 2017. p. 24.
15. Poole, C.A., M.H. Flint, and B.W. Beaumont, *Chondrons in cartilage: ultrastructural analysis of the pericellular microenvironment in adult human articular cartilages*. J Orthop Res, 1987. **5**(4): p. 509-22.
16. Zhang, Z., et al., *A proteomic approach for identification and localization of the pericellular components of chondrocytes*. Histochem Cell Biol, 2011. **136**(2): p. 153-62.

17. Felka, T., et al., *Loss of spatial organization and destruction of the pericellular matrix in early osteoarthritis in vivo and in a novel in vitro methodology*. Osteoarthritis Cartilage, 2016. **24**(7): p. 1200-9.
18. Alexopoulos, L.G., L.A. Setton, and F. Guilak, *The biomechanical role of the chondrocyte pericellular matrix in articular cartilage*. Acta Biomater, 2005. **1**(3): p. 317-25.
19. Lüllmann-Rauch, R. and E. Asan, *Die Bindegewebe im eigentlichen Sinn*, in *Taschenlehrbuch Histologie*, R. Lüllmann-Rauch and E. Asan, Editors. 2019, Georg Thieme Verlag.
20. Mourão, P.A., *Proteoglycans, glycosaminoglycans and sulfated polysaccharides from connective tissues*. Mem Inst Oswaldo Cruz, 1991. **86 Suppl 3**: p. 13-22.
21. Jadin, K.D., et al., *Three-dimensional (3-D) imaging of chondrocytes in articular cartilage: growth-associated changes in cell organization*. Biomaterials, 2007. **28**(2): p. 230-9.
22. Wong, M., et al., *Zone-specific cell biosynthetic activity in mature bovine articular cartilage: a new method using confocal microscopic stereology and quantitative autoradiography*. J Orthop Res, 1996. **14**(3): p. 424-32.
23. Rolaufts, B., et al., *Proliferative remodeling of the spatial organization of human superficial chondrocytes distant from focal early osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(2): p. 489-98.
24. Klein, T.J., et al., *Depth-dependent biomechanical and biochemical properties of fetal, newborn, and tissue-engineered articular cartilage*. J Biomech, 2007. **40**(1): p. 182-90.
25. Venn, M. and A. Maroudas, *Chemical composition and swelling of normal and osteoarthrotic femoral head cartilage. I. Chemical composition*. Ann Rheum Dis, 1977. **36**(2): p. 121-9.
26. Jay, G.D., et al., *Homology of lubricin and superficial zone protein (SZP): products of megakaryocyte stimulating factor (MSF) gene expression by human synovial fibroblasts and articular chondrocytes localized to chromosome 1q25*. J Orthop Res, 2001. **19**(4): p. 677-87.
27. Schumacher, B.L., et al., *A novel proteoglycan synthesized and secreted by chondrocytes of the superficial zone of articular cartilage*. Arch Biochem Biophys, 1994. **311**(1): p. 144-52.
28. Poole, A.R., et al., *Cartilage macromolecules and the calcification of cartilage matrix*. Anat Rec, 1989. **224**(2): p. 167-79.
29. Clynes, M.A., et al., *Impact of osteoarthritis on activities of daily living: does joint site matter?* Aging Clin Exp Res, 2019.
30. Favero, M., et al., *Early knee osteoarthritis*. RMD Open, 2015. **1**(Suppl 1): p. e000062.
31. Litwic, A., et al., *Epidemiology and burden of osteoarthritis*. Br Med Bull, 2013. **105**: p. 185-99.
32. Alliston, T., et al., *Bone marrow lesions in osteoarthritis: What lies beneath*. J Orthop Res, 2018. **36**(7): p. 1818-1825.
33. Burr, D.B., *The importance of subchondral bone in osteoarthrosis*. Curr Opin Rheumatol, 1998. **10**(3): p. 256-62.
34. Burr, D.B., *The importance of subchondral bone in the progression of osteoarthritis*. J Rheumatol Suppl, 2004. **70**: p. 77-80.

35. Burr, D.B. and M.A. Gallant, *Bone remodelling in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2012. **8**(11): p. 665-73.
36. Findlay, D.M., *Vascular pathology and osteoarthritis*. Rheumatology (Oxford), 2007. **46**(12): p. 1763-8.
37. Findlay, D.M. and G.J. Atkins, *Osteoblast-chondrocyte interactions in osteoarthritis*. Curr Osteoporos Rep, 2014. **12**(1): p. 127-34.
38. Goldring, S.R. and M.B. Goldring, *Changes in the osteochondral unit during osteoarthritis: structure, function and cartilage-bone crosstalk*. Nat Rev Rheumatol, 2016. **12**(11): p. 632-644.
39. Hu, X., et al., *Cdc42 Is Essential for Both Articular Cartilage Degeneration and Subchondral Bone Deterioration in Experimental Osteoarthritis*. J Bone Miner Res, 2018. **33**(5): p. 945-958.
40. Lories, R.J. and F.P. Luyten, *The bone-cartilage unit in osteoarthritis*. Nat Rev Rheumatol, 2011. **7**(1): p. 43-9.
41. Mazur, C.M., et al., *Osteocyte dysfunction promotes osteoarthritis through MMP13-dependent suppression of subchondral bone homeostasis*. Bone Res, 2019. **7**: p. 34.
42. Pan, J., et al., *Elevated cross-talk between subchondral bone and cartilage in osteoarthritic joints*. Bone, 2012. **51**(2): p. 212-7.
43. Su, W., et al., *Angiogenesis stimulated by elevated PDGF-BB in subchondral bone contributes to osteoarthritis development*. JCI Insight, 2020. **5**(8).
44. Zhang, L., et al., *Enhancement of subchondral bone quality by alendronate administration for the reduction of cartilage degeneration in the early phase of experimental osteoarthritis*. Clin Exp Med, 2011. **11**(4): p. 235-43.
45. Zhen, G., et al., *Inhibition of TGF- β signaling in mesenchymal stem cells of subchondral bone attenuates osteoarthritis*. Nat Med, 2013. **19**(6): p. 704-12.
46. Lawrence, R.C., et al., *Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part II*. Arthritis Rheum, 2008. **58**(1): p. 26-35.
47. Lespasio, M.J., et al., *Knee Osteoarthritis: A Primer*. Perm J, 2017. **21**: p. 16-183.
48. Mody, G.M. and P.M. Brooks, *Improving musculoskeletal health: global issues*. Best Pract Res Clin Rheumatol, 2012. **26**(2): p. 237-49.
49. Chu, C.R., M.B. Millis, and S.A. Olson, *Osteoarthritis: From Palliation to Prevention: AOA Critical Issues*. J Bone Joint Surg Am, 2014. **96**(15): p. e130.
50. Robert Koch-Institut. *Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 54*. 2013 [cited 2019 Dec 12]; Available from: https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsT/arthrose.pdf?__blob=publicationFile.
51. Robert Koch-Institut. *Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie »Gesundheit in Deutschland aktuell 2012«. Beiträge zur Gesundheitsberichterstattung des Bundes*. 2014 [cited 2019 Dec 12]; Available from:

- https://www.rki.de/DE/Content/Gesundheitsmonitoring/Gesundheitsberichterstattung/GBEDownloadsB/GEDA12.pdf?__blob=publicationFile.
52. Charlier, E., et al., *Insights on Molecular Mechanisms of Chondrocytes Death in Osteoarthritis*. Int J Mol Sci, 2016. **17**(12).
 53. DiMicco, M.A., et al., *Mechanisms and kinetics of glycosaminoglycan release following in vitro cartilage injury*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(3): p. 840-8.
 54. Behrens, F., E.L. Kraft, and T.R. Oegema, Jr., *Biochemical changes in articular cartilage after joint immobilization by casting or external fixation*. J Orthop Res, 1989. **7**(3): p. 335-43.
 55. Slowman, S.D. and K.D. Brandt, *Composition and glycosaminoglycan metabolism of articular cartilage from habitually loaded and habitually unloaded sites*. Arthritis Rheum, 1986. **29**(1): p. 88-94.
 56. Blagojevic, M., et al., *Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis*. Osteoarthritis Cartilage, 2010. **18**(1): p. 24-33.
 57. Felson, D.T., et al., *Osteoarthritis: new insights. Part 1: the disease and its risk factors*. Ann Intern Med, 2000. **133**(8): p. 635-46.
 58. Felson, D.T. and Y. Zhang, *An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(8): p. 1343-55.
 59. Manninen, P., et al., *Overweight, gender and knee osteoarthritis*. Int J Obes Relat Metab Disord, 1996. **20**(6): p. 595-7.
 60. Messier, S.P., et al., *Exercise and dietary weight loss in overweight and obese older adults with knee osteoarthritis: the Arthritis, Diet, and Activity Promotion Trial*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(5): p. 1501-10.
 61. Jordan, J.M., et al., *The impact of arthritis in rural populations*. Arthritis Care Res, 1995. **8**(4): p. 242-50.
 62. Cooper, C., et al., *Individual risk factors for hip osteoarthritis: obesity, hip injury, and physical activity*. Am J Epidemiol, 1998. **147**(6): p. 516-22.
 63. Lohmander, L.S., et al., *Incidence of severe knee and hip osteoarthritis in relation to different measures of body mass: a population-based prospective cohort study*. Ann Rheum Dis, 2009. **68**(4): p. 490-6.
 64. Coggon, D., et al., *Occupational physical activities and osteoarthritis of the knee*. Arthritis Rheum, 2000. **43**(7): p. 1443-9.
 65. Jensen, L.K., *Knee osteoarthritis: influence of work involving heavy lifting, kneeling, climbing stairs or ladders, or kneeling/squatting combined with heavy lifting*. Occup Environ Med, 2008. **65**(2): p. 72-89.
 66. Jensen, L.K., *Hip osteoarthritis: influence of work with heavy lifting, climbing stairs or ladders, or combining kneeling/squatting with heavy lifting*. Occup Environ Med, 2008. **65**(1): p. 6-19.
 67. Lievense, A., et al., *Influence of work on the development of osteoarthritis of the hip: a systematic review*. J Rheumatol, 2001. **28**(11): p. 2520-8.
 68. Sandmark, H., C. Hogstedt, and E. Vingard, *Primary osteoarthrosis of the knee in men and women as a result of lifelong physical load from work*. Scand J Work Environ Health, 2000. **26**(1): p. 20-5.

69. Walker-Bone, K. and K.T. Palmer, *Musculoskeletal disorders in farmers and farm workers*. *Occup Med (Lond)*, 2002. **52**(8): p. 441-50.
70. Brandt, K.D., et al., *Osteoarthritic changes in canine articular cartilage, subchondral bone, and synovium fifty-four months after transection of the anterior cruciate ligament*. *Arthritis Rheum*, 1991. **34**(12): p. 1560-70.
71. Murphy, S.B., R. Ganz, and M.E. Muller, *The prognosis in untreated dysplasia of the hip. A study of radiographic factors that predict the outcome*. *J Bone Joint Surg Am*, 1995. **77**(7): p. 985-9.
72. Papalia, R., et al., *Meniscectomy as a risk factor for knee osteoarthritis: a systematic review*. *Br Med Bull*, 2011. **99**: p. 89-106.
73. Slemenda, C., et al., *Quadriceps weakness and osteoarthritis of the knee*. *Ann Intern Med*, 1997. **127**(2): p. 97-104.
74. Slemenda, C., et al., *Reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women?* *Arthritis Rheum*, 1998. **41**(11): p. 1951-9.
75. Gelber, A.C., et al., *Joint injury in young adults and risk for subsequent knee and hip osteoarthritis*. *Ann Intern Med*, 2000. **133**(5): p. 321-8.
76. Roos, E.M., *Joint injury causes knee osteoarthritis in young adults*. *Curr Opin Rheumatol*, 2005. **17**(2): p. 195-200.
77. Khella, C.M., et al., *An Evidence-Based Systematic Review of Human Knee Post-Traumatic Osteoarthritis (PTOA): Timeline of Clinical Presentation and Disease Markers, Comparison of Knee Joint PTOA Models and Early Disease Implications*. *Int J Mol Sci*, 2021. **22**(4).
78. Lohmander, L.S., et al., *Stromelysin, tissue inhibitor of metalloproteinases and proteoglycan fragments in human knee joint fluid after injury*. *J Rheumatol*, 1993. **20**(8): p. 1362-8.
79. Lohmander, L.S., L.A. Hoerrner, and M.W. Lark, *Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 1993. **36**(2): p. 181-9.
80. Lohmander, L.S., et al., *Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 1999. **42**(3): p. 534-44.
81. Walakovits, L.A., et al., *Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury*. *Arthritis Rheum*, 1992. **35**(1): p. 35-42.
82. Fosang, A.J., K. Last, and R.A. Maciewicz, *Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis. Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent*. *J Clin Invest*, 1996. **98**(10): p. 2292-9.
83. Lohmander, L.S., P.J. Neame, and J.D. Sandy, *The structure of aggrecan fragments in human synovial fluid. Evidence that aggrecanase mediates cartilage degradation in inflammatory joint disease, joint injury, and osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 1993. **36**(9): p. 1214-22.
84. Sandy, J.D. and C. Verscharen, *Analysis of aggrecan in human knee cartilage and synovial fluid indicates that aggrecanase (ADAMTS) activity is responsible for the catabolic turnover and loss of whole aggrecan whereas other protease activity is required for C-terminal processing in vivo*. *Biochem J*, 2001. **358**(Pt 3): p. 615-26.

85. Gebhard, P.M., et al., *Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a general shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes*. J Orthop Res, 2003. **21**(1): p. 96-101.
86. Martin, I., et al., *Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints*. Osteoarthritis Cartilage, 2001. **9**(2): p. 112-8.
87. Bauer, M. and R.W. Jackson, *Chondral lesions of the femoral condyles: a system of arthroscopic classification*. Arthroscopy, 1988. **4**(2): p. 97-102.
88. Rolaufts, B., et al., *Stress-vs-time signals allow the prediction of structurally catastrophic events during fracturing of immature cartilage and predetermine the biomechanical, biochemical, and structural impairment*. J Struct Biol, 2013. **183**(3): p. 501-511.
89. Ewers, B.J., et al., *The extent of matrix damage and chondrocyte death in mechanically traumatized articular cartilage explants depends on rate of loading*. J Orthop Res, 2001. **19**(5): p. 779-84.
90. Rolaufts, B., et al., *Vulnerability of the superficial zone of immature articular cartilage to compressive injury*. Arthritis Rheum, 2010. **62**(10): p. 3016-27.
91. Loening, A.M., et al., *Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis*. Arch Biochem Biophys, 2000. **381**(2): p. 205-12.
92. Chen, C.T., et al., *Time, stress, and location dependent chondrocyte death and collagen damage in cyclically loaded articular cartilage*. J Orthop Res, 2003. **21**(5): p. 888-98.
93. Repo, R.U. and J.B. Finlay, *Survival of articular cartilage after controlled impact*. J Bone Joint Surg Am, 1977. **59**(8): p. 1068-76.
94. Schinagl, R.M., et al., *Depth-dependent confined compression modulus of full-thickness bovine articular cartilage*. J Orthop Res, 1997. **15**(4): p. 499-506.
95. Muehleman, C., et al., *Prevalence of degenerative morphological changes in the joints of the lower extremity*. Osteoarthritis Cartilage, 1997. **5**(1): p. 23-37.
96. Aicher, W.K. and B. Rolaufts, *The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis*. Ann Rheum Dis, 2014. **73**(4): p. 645-53.
97. Rolaufts, B., et al., *Onset of preclinical osteoarthritis: the angular spatial organization permits early diagnosis*. Arthritis Rheum, 2011. **63**(6): p. 1637-47.
98. Gardner, D.L., D.M. Salter, and K. Oates, *Advances in the microscopy of osteoarthritis*. Microsc Res Tech, 1997. **37**(4): p. 245-70.
99. Poole, C.A., A. Matsuoka, and J.R. Schofield, *Chondrons from articular cartilage. III. Morphologic changes in the cellular microenvironment of chondrons isolated from osteoarthritic cartilage*. Arthritis Rheum, 1991. **34**(1): p. 22-35.

100. Shlopov, B.V., M.L. Gumanovskaya, and K.A. Hasty, *Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(1): p. 195-205.
101. Itoh, S., et al., *CCN family member 2/connective tissue growth factor (CCN2/CTGF) has anti-aging effects that protect articular cartilage from age-related degenerative changes*. *PLoS One*, 2013. **8**(8): p. e71156.
102. Felson, D.T., et al., *Osteoarthritis: new insights. Part 2: treatment approaches*. *Ann Intern Med*, 2000. **133**(9): p. 726-37.
103. Kurz, B., et al., *Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression*. *J Orthop Res*, 2001. **19**(6): p. 1140-6.
104. D'Lima, D.D., et al., *Impact of mechanical trauma on matrix and cells*. *Clin Orthop Relat Res*, 2001(391 Suppl): p. S90-9.
105. Quinn, T.M., et al., *Matrix and cell injury due to sub-impact loading of adult bovine articular cartilage explants: effects of strain rate and peak stress*. *J Orthop Res*, 2001. **19**(2): p. 242-9.
106. Quinn, T.M., et al., *Effects of injurious compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants*. *J Orthop Res*, 1998. **16**(4): p. 490-9.
107. Torzilli, P.A., et al., *Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content*. *J Biomech Eng*, 1999. **121**(5): p. 433-41.
108. Farquhar, T., et al., *Swelling and fibronectin accumulation in articular cartilage explants after cyclical impact*. *J Orthop Res*, 1996. **14**(3): p. 417-23.
109. Patwari, P., et al., *In vitro models for investigation of the effects of acute mechanical injury on cartilage*. *Clin Orthop Relat Res*, 2001(391 Suppl): p. S61-71.
110. Furukawa, T., et al., *Biochemical studies on repair cartilage resurfacing experimental defects in the rabbit knee*. *J Bone Joint Surg Am*, 1980. **62**(1): p. 79-89.
111. Brittberg, M., et al., *Articular cartilage engineering with autologous chondrocyte transplantation. A review of recent developments*. *J Bone Joint Surg Am*, 2003. **85-A Suppl 3**: p. 109-15.
112. Nehrer, S., M. Spector, and T. Minas, *Histologic analysis of tissue after failed cartilage repair procedures*. *Clin Orthop Relat Res*, 1999(365): p. 149-62.
113. Davis, M.A., et al., *The association of knee injury and obesity with unilateral and bilateral osteoarthritis of the knee*. *Am J Epidemiol*, 1989. **130**(2): p. 278-88.
114. Morel, V. and T.M. Quinn, *Cartilage injury by ramp compression near the gel diffusion rate*. *J Orthop Res*, 2004. **22**(1): p. 145-51.
115. Hunziker, E.B., T.M. Quinn, and H.J. Hauselmann, *Quantitative structural organization of normal adult human articular cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2002. **10**(7): p. 564-72.
116. Buckley, M.R., et al., *Mapping the depth dependence of shear properties in articular cartilage*. *J Biomech*, 2008. **41**(11): p. 2430-7.

117. Chong, K.W., et al., *Fibroblast growth factor 2 drives changes in gene expression following injury to murine cartilage in vitro and in vivo*. *Arthritis Rheum*, 2013. **65**(9): p. 2346-55.
118. Gruber, J., et al., *Induction of interleukin-1 in articular cartilage by explantation and cutting*. *Arthritis Rheum*, 2004. **50**(8): p. 2539-46.
119. Dell'Accio, F., et al., *Activation of WNT and BMP signaling in adult human articular cartilage following mechanical injury*. *Arthritis Res Ther*, 2006. **8**(5): p. R139.
120. Dell'Accio, F., et al., *Identification of the molecular response of articular cartilage to injury, by microarray screening: Wnt-16 expression and signaling after injury and in osteoarthritis*. *Arthritis Rheum*, 2008. **58**(5): p. 1410-21.
121. Yun, Y.R., et al., *Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration*. *J Tissue Eng*, 2010. **2010**: p. 218142.
122. Itoh, N. and D.M. Ornitz, *Evolution of the Fgf and Fgfr gene families*. *Trends Genet*, 2004. **20**(11): p. 563-9.
123. Nishida, T., et al., *Effect of CCN2 on FGF2-induced proliferation and MMP9 and MMP13 productions by chondrocytes*. *Endocrinology*, 2011. **152**(11): p. 4232-41.
124. Ornitz, D.M., *FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development*. *Bioessays*, 2000. **22**(2): p. 108-12.
125. Ornitz, D.M. and N. Itoh, *Fibroblast growth factors*. *Genome Biol*, 2001. **2**(3): p. Reviews3005.
126. Bohlen, P., et al., *Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1984. **81**(17): p. 5364-8.
127. Ellman, M.B., et al., *Biological impact of the fibroblast growth factor family on articular cartilage and intervertebral disc homeostasis*. *Gene*, 2008. **420**(1): p. 82-9.
128. Lobb, R.R., J.W. Harper, and J.W. Fett, *Purification of heparin-binding growth factors*. *Anal Biochem*, 1986. **154**(1): p. 1-14.
129. Boehme, K.A. and B. Rolaufts, *Onset and Progression of Human Osteoarthritis-Can Growth Factors, Inflammatory Cytokines, or Differential miRNA Expression Concomitantly Induce Proliferation, ECM Degradation, and Inflammation in Articular Cartilage?* *Int J Mol Sci*, 2018. **19**(8).
130. Li, X., et al., *Species-specific biological effects of FGF-2 in articular cartilage: implication for distinct roles within the FGF receptor family*. *J Cell Biochem*, 2012. **113**(7): p. 2532-42.
131. Yan, D., et al., *Fibroblast growth factor receptor 1 is principally responsible for fibroblast growth factor 2-induced catabolic activities in human articular chondrocytes*. *Arthritis Res Ther*, 2011. **13**(4): p. R130.
132. Johnson, D.E. and L.T. Williams, *Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family*. *Adv Cancer Res*, 1993. **60**: p. 1-41.
133. Vincent, T., et al., *Basic FGF mediates an immediate response of articular cartilage to mechanical injury*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(12): p. 8259-64.

134. Vincent, T. and J. Saklatvala, *Basic fibroblast growth factor: an extracellular mechanotransducer in articular cartilage?* Biochem Soc Trans, 2006. **34**(Pt 3): p. 456-7.
135. Vincent, T.L., et al., *FGF-2 is bound to perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage, where it acts as a chondrocyte mechanotransducer.* Osteoarthritis Cartilage, 2007. **15**(7): p. 752-63.
136. Vincent, T.L., *Fibroblast growth factor 2: good or bad guy in the joint?*, in *Arthritis Res Ther.* 2011: England. p. 127.
137. Weng, T., et al., *Genetic inhibition of fibroblast growth factor receptor 1 in knee cartilage attenuates the degeneration of articular cartilage in adult mice.* Arthritis Rheum, 2012. **64**(12): p. 3982-92.
138. Ellman, M.B., et al., *Fibroblast growth factor control of cartilage homeostasis.* J Cell Biochem, 2013. **114**(4): p. 735-42.
139. Davidson, D., et al., *Fibroblast growth factor (FGF) 18 signals through FGF receptor 3 to promote chondrogenesis.* J Biol Chem, 2005. **280**(21): p. 20509-15.
140. Goldring, M.B., et al., *Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis.* Eur Cell Mater, 2011. **21**: p. 202-20.
141. Im, H.J., et al., *Basic fibroblast growth factor stimulates matrix metalloproteinase-13 via the molecular cross-talk between the mitogen-activated protein kinases and protein kinase Cdelta pathways in human adult articular chondrocytes.* J Biol Chem, 2007. **282**(15): p. 11110-21.
142. Kubota, S. and M. Takigawa, *Role of CCN2/CTGF/Hcs24 in bone growth.* Int Rev Cytol, 2007. **257**: p. 1-41.
143. Kubota, S. and M. Takigawa, *The role of CCN2 in cartilage and bone development.* J Cell Commun Signal, 2011. **5**(3): p. 209-17.
144. Nishida, T., et al., *Regeneration of defects in articular cartilage in rat knee joints by CCN2 (connective tissue growth factor).* J Bone Miner Res, 2004. **19**(8): p. 1308-19.
145. Gao, R. and D.R. Brigstock, *Connective tissue growth factor (CCN2) induces adhesion of rat activated hepatic stellate cells by binding of its C-terminal domain to integrin alpha(v)beta(3) and heparan sulfate proteoglycan.* J Biol Chem, 2004. **279**(10): p. 8848-55.
146. Nishida, T., et al., *CTGF/Hcs24, hypertrophic chondrocyte-specific gene product, interacts with perlecan in regulating the proliferation and differentiation of chondrocytes.* J Cell Physiol, 2003. **196**(2): p. 265-75.
147. Hashimoto, G., et al., *Matrix metalloproteinases cleave connective tissue growth factor and reactivate angiogenic activity of vascular endothelial growth factor 165.* J Biol Chem, 2002. **277**(39): p. 36288-95.
148. Hoshijima, M., et al., *CT domain of CCN2/CTGF directly interacts with fibronectin and enhances cell adhesion of chondrocytes through integrin alpha5beta1.* FEBS Lett, 2006. **580**(5): p. 1376-82.
149. Jun, J.I. and L.F. Lau, *Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets.* Nat Rev Drug Discov, 2011. **10**(12): p. 945-63.
150. Lau, L.F. and S.C. Lam, *The CCN family of angiogenic regulators: the integrin connection.* Exp Cell Res, 1999. **248**(1): p. 44-57.

151. Aoyama, E., et al., *N-terminal domains of CCN family 2/connective tissue growth factor bind to aggrecan*. *Biochem J*, 2009. **420**(3): p. 413-20.
152. Galluzzi, L., et al., *Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012*. *Cell Death Differ*, 2012. **19**(1): p. 107-20.
153. Vanden Berghe, T., et al., *Molecular crosstalk between apoptosis, necroptosis, and survival signaling*. *Mol Cell Oncol*, 2015. **2**(4): p. e975093.
154. Pérez, H.E., et al., *Chondroptosis: an immunohistochemical study of apoptosis and Golgi complex in chondrocytes from human osteoarthritic cartilage*. *Apoptosis*, 2005. **10**(5): p. 1105-10.
155. Roach, H.I., T. Aigner, and J.B. Kouri, *Chondroptosis: a variant of apoptotic cell death in chondrocytes?* *Apoptosis*, 2004. **9**(3): p. 265-77.
156. Gibson, G., *Active role of chondrocyte apoptosis in endochondral ossification*. *Microsc Res Tech*, 1998. **43**(2): p. 191-204.
157. Norbury, C.J. and I.D. Hickson, *Cellular responses to DNA damage*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2001. **41**: p. 367-401.
158. Elmore, S., *Apoptosis: a review of programmed cell death*. *Toxicol Pathol*, 2007. **35**(4): p. 495-516.
159. Lamkanfi, M., et al., *Alice in caspase land. A phylogenetic analysis of caspases from worm to man*. *Cell Death Differ*, 2002. **9**(4): p. 358-61.
160. Enari, M., et al., *A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD*. *Nature*, 1998. **391**(6662): p. 43-50.
161. Fadok, V.A., et al., *Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages*. *J Immunol*, 1992. **148**(7): p. 2207-16.
162. Mandal, D., et al., *Caspase 3 regulates phosphatidylserine externalization and phagocytosis of oxidatively stressed erythrocytes*. *FEBS Lett*, 2002. **513**(2-3): p. 184-8.
163. Mariño, G. and G. Kroemer, *Mechanisms of apoptotic phosphatidylserine exposure*. *Cell Res*, 2013. **23**(11): p. 1247-8.
164. Porter, A.G. and R.U. Jänicke, *Emerging roles of caspase-3 in apoptosis*. *Cell Death Differ*, 1999. **6**(2): p. 99-104.
165. Boivin, W.A., et al., *Intracellular versus extracellular granzyme B in immunity and disease: challenging the dogma*. *Lab Invest*, 2009. **89**(11): p. 1195-220.
166. Lieberman, J., *The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal*. *Nat Rev Immunol*, 2003. **3**(5): p. 361-70.
167. Saito, S., et al., *Granzyme B induces apoptosis of chondrocytes with natural killer cell-like cytotoxicity in rheumatoid arthritis*. *J Rheumatol*, 2008. **35**(10): p. 1932-43.
168. Kummer, J.A., et al., *Expression of granzymes A and B in synovial tissue from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis*. *Clin Immunol Immunopathol*, 1994. **73**(1): p. 88-95.
169. D'Lima, D.D., et al., *Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2001. **9**(8): p. 712-9.

170. Smith, R.L., D.R. Carter, and D.J. Schurman, *Pressure and shear differentially alter human articular chondrocyte metabolism: a review*. Clin Orthop Relat Res, 2004(427 Suppl): p. S89-95.
171. Roach, H.I. and N.M. Clarke, *Physiological cell death of chondrocytes in vivo is not confined to apoptosis. New observations on the mammalian growth plate*. J Bone Joint Surg Br, 2000. **82**(4): p. 601-13.
172. Chen, C.T., et al., *Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage*. J Orthop Res, 2001. **19**(4): p. 703-11.
173. Lucchinetti, E., et al., *Cartilage viability after repetitive loading: a preliminary report*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(1): p. 71-81.
174. Stolberg-Stolberg, J.A., et al., *Effects of cartilage impact with and without fracture on chondrocyte viability and the release of inflammatory markers*. J Orthop Res, 2013. **31**(8): p. 1283-92.
175. Buckley, M.R., et al., *High-resolution spatial mapping of shear properties in cartilage*. J Biomech, 2010. **43**(4): p. 796-800.
176. Chen, A.C., et al., *Depth- and strain-dependent mechanical and electromechanical properties of full-thickness bovine articular cartilage in confined compression*. J Biomech, 2001. **34**(1): p. 1-12.
177. Chen, S.S., et al., *Depth-dependent compressive properties of normal aged human femoral head articular cartilage: relationship to fixed charge density*. Osteoarthritis Cartilage, 2001. **9**(6): p. 561-9.
178. Grodzinsky, A.J., *Electromechanical and physicochemical properties of connective tissue*. Crit Rev Biomed Eng, 1983. **9**(2): p. 133-99.
179. Kurz, B., et al., *Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury*. Ann Anat, 2005. **187**(5-6): p. 473-85.
180. Lee, J.H., et al., *Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression*. Arthritis Rheum, 2005. **52**(8): p. 2386-95.
181. Sui, Y., et al., *Mechanical injury potentiates proteoglycan catabolism induced by interleukin-6 with soluble interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha in immature bovine and adult human articular cartilage*. Arthritis Rheum, 2009. **60**(10): p. 2985-96.
182. Chevalier, X., F. Eymard, and P. Richette, *Biologic agents in osteoarthritis: hopes and disappointments*. Nat Rev Rheumatol, 2013. **9**(7): p. 400-10.
183. Blanco, F.J., et al., *Osteoarthritis chondrocytes die by apoptosis. A possible pathway for osteoarthritis pathology*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(2): p. 284-9.
184. Héraud, F., A. Héraud, and M.F. Harmand, *Apoptosis in normal and osteoarthritic human articular cartilage*. Ann Rheum Dis, 2000. **59**(12): p. 959-65.
185. Sharif, M., et al., *Increased apoptosis in human osteoarthritic cartilage corresponds to reduced cell density and expression of caspase-3*. Arthritis Rheum, 2004. **50**(2): p. 507-15.
186. Hashimoto, S., et al., *Linkage of chondrocyte apoptosis and cartilage degradation in human osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 1998. **41**(9): p. 1632-8.

187. Hwang, H.S. and H.A. Kim, *Chondrocyte Apoptosis in the Pathogenesis of Osteoarthritis*. Int J Mol Sci, 2015. **16**(11): p. 26035-54.
188. Kim, H.A., et al., *Apoptotic chondrocyte death in human osteoarthritis*. J Rheumatol, 2000. **27**(2): p. 455-62.
189. Thomas, C.M., et al., *Chondrocyte death by apoptosis is associated with cartilage matrix degradation*. Osteoarthritis Cartilage, 2007. **15**(1): p. 27-34.
190. Zhang, M., et al., *Induced superficial chondrocyte death reduces catabolic cartilage damage in murine posttraumatic osteoarthritis*. J Clin Invest, 2016. **126**(8): p. 2893-902.
191. Zamli, Z. and M. Sharif, *Chondrocyte apoptosis: a cause or consequence of osteoarthritis?* Int J Rheum Dis, 2011. **14**(2): p. 159-66.
192. Sun, K., et al., *The effect of mechanical stretch stress on the differentiation and apoptosis of human growth plate chondrocytes*. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 2017. **53**(2): p. 141-148.
193. Kong, D., et al., *Static mechanical stress induces apoptosis in rat endplate chondrocytes through MAPK and mitochondria-dependent caspase activation signaling pathways*. PLoS One, 2013. **8**(7): p. e69403.
194. Takebe, K., et al., *Regulation of p38 MAPK phosphorylation inhibits chondrocyte apoptosis in response to heat stress or mechanical stress*. Int J Mol Med, 2011. **27**(3): p. 329-35.
195. Hiligsmann, M., et al., *Health economics in the field of osteoarthritis: an expert's consensus paper from the European Society for Clinical and Economic Aspects of Osteoporosis and Osteoarthritis (ESCEO)*. Semin Arthritis Rheum, 2013. **43**(3): p. 303-13.
196. Nelson, A.E., *Osteoarthritis year in review 2017: clinical*. Osteoarthritis Cartilage, 2018. **26**(3): p. 319-325.
197. Neuprez, A., et al., *Total joint replacement improves pain, functional quality of life, and health utilities in patients with late-stage knee and hip osteoarthritis for up to 5 years*. Clin Rheumatol, 2020. **39**(3): p. 861-871.
198. Yan, D., D. Chen, and H.J. Im, *Fibroblast growth factor-2 promotes catabolism via FGFR1-Ras-Raf-MEK1/2-ERK1/2 axis that coordinates with the PKC δ pathway in human articular chondrocytes*. J Cell Biochem, 2012. **113**(9): p. 2856-65.
199. Muddasani, P., et al., *Basic fibroblast growth factor activates the MAPK and NFkappaB pathways that converge on Elk-1 to control production of matrix metalloproteinase-13 by human adult articular chondrocytes*. J Biol Chem, 2007. **282**(43): p. 31409-21.
200. Felson, D.T., *Epidemiology of hip and knee osteoarthritis*. Epidemiol Rev, 1988. **10**: p. 1-28.

7. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen; Abteilung Siegfried-Weller-Institut an der Universität Tübingen von Maximilian Holweg unter Betreuung von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte durch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch die Labormitglieder Frau Andrea Egler, Frau Marina Danalache und Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs eigenständig von mir durchgeführt.

Die Datenerhebung sowie statistische Auswertung wurden nach Anleitung durch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs eigenständig von mir durchgeführt.

Ich versichere, das Manuskript selbständig nach Anleitung durch Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Bernd Rolauffs verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 22.06.2022

Maximilian Holweg

Danksagung

Zur erfolgreichen Fertigstellung einer Doktorarbeit gehören neben den persönlichen Faktoren Fleiß, Ehrgeiz, Motivation und Stringenz vor allem ein gutes Team. Ich möchte mich bei den Menschen bedanken, die mir bei dieser Arbeit geholfen und zur Seite gestanden haben.

Mein größter Dank gilt meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Bernd Rolauffs, der mir mit diesem Projekt und seiner Hilfe und Geduld nicht nur das Arbeiten im Labor nähergebracht hat, sondern mir auch darüber hinaus den Spaß an einer wissenschaftlichen Tätigkeit, an Kongressen, Vorträgen und Posterpräsentationen vermitteln konnte. Zudem wurde die Arbeit trotz seines Rufs als W3-Professor für Knorpelforschung an die Universitätsklinik Freiburg und seinem Wechsel mit unermüdlicher Motivation betreut. Eine der größten Freuden war es, an der Gestaltung und Einrichtung des neuen Labors in Freiburg maßgeblich beteiligt zu sein und die neuen Mitarbeiter und Studenten mit dem bisherigen Stand der Forschung vertraut zu machen und im Verlauf in regem Austausch zu stehen.

Weiterhin möchte ich der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen für ihre finanzielle Unterstützung, den Operateuren der BGU Tübingen sowie der Winghofer Klinik in Rottenburg sowie dem Sekretariat der BGU Tübingen, Frau Wehing, sowie der Winghofer Klinik in Rottenburg für die Gewinnung der Knorpelproben und der großartigen Organisation danken. Mein besonderer Dank gilt den Patientinnen und Patienten, die mit ihrer Einwilligung in die Gewebespende sowie in die wissenschaftliche Nutzung des Gewebes die Forschung überhaupt erst ermöglicht haben.

Danken möchte ich auch dem IZKF-Promotionskolleg für die persönliche Förderung, die Seminare und Workshops sowie die finanzielle Unterstützung.

Wie bereits erwähnt, eine solche Arbeit wäre ohne ein gutes Team nicht möglich gewesen. Ich danke Andrea Egler, Marina Danalache, Tatiana Uynuk-Ool und Florian Bonaire für die gute Einarbeitung und Unterstützung im Rahmen meines Projektes. Ich danke auch Rosa Riester aus dem Labor der Orthopädischen Universitätsklinik sowie dem Labor Klein und der Klinik für

Anästhesiologie für die Benutzung des Fluoreszenzmikroskopes und weiteren Labormitarbeitern, die mich bei dieser Arbeit unterstützt haben. Auch danken möchte ich meinem aktuellen Team, die Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie des Universitätsklinikums Tübingen, die mich immer wieder motiviert haben, die Promotion fertigzustellen. Ich danke meinem Chefarzt Herrn Prof. Dr. Jörg Fuchs, meinem leitenden Oberarzt Herrn Dr. Hans-Joachim Kirschner, den Oberärztinnen und Oberärzten Frau PD Dr. Verena Ellerkamp, Herrn PD Dr. Justus Lieber, Herrn Dr. Tobias Luithle, Herrn Dr. Andreas Schmidt und Herrn Prof. Dr. Steven Warmann, dem Facharzt Herrn Dr. Cristian Urla sowie den Assistenzärztinnen und Assistenzärzten Frau Dr. Seher Cavdar, Herrn Dr. Markus Dietzel, Herrn Dr. Benjamin Mayer, Herrn Dr. Joel Niethammer, Herrn Simon Scherer, Herrn Matthias Schunn, Herrn Dr. Dr. Christoph Slavetinsky und Herrn Dr. Benedikt Richard Wagner.

Zuletzt möchte ich meiner Familie, besonders meinen Eltern und meinen Freunden für die Unterstützung danken, nie die Hoffnung und Motivation zu verlieren und diese Arbeit erfolgreich abzuschließen. Mein besonderer Dank gilt hier meine Freunden Herrn Simon Diepold, Herrn Philipp Müller sowie insbesondere Herrn Dr. David Heister für die Freundschaft, Motivation und Unterstützung und Herrn Dominik Wahl für seine vielen Anmerkungen, Kommentare und Vorschläge.