

Aus dem Anatomischen Institut  
(Geschäftsführender Vorstand: Prof. Dr. Sievers)  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

**UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON 17 $\beta$ -ESTRADIOL AUF MECHANISCH  
INDUZIERTE APOPTOSE UND MATRIXDEGRADATION IN BOVINEN HYALINEN  
GELENKNORPELEXPLANTATEN**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von

**JAN IMGENBERG**

aus Herdecke

Kiel 2016

1. Berichtstatter: Prof. Dr. Bodo Kurz

2. Berichtstatter: Prof. Dr. Andreas Seekamp

Tag der mündlichen  
Prüfung: 07.02.2017

Meinen Eltern, die die Neugierde auf die Welt in mir geweckt haben, und der Stadtbücherei Witten-Stockum, die mir dazu das nötige Lesefutter geliefert hat

*In nature's infinite book of secrecy  
A little I can read*

– William Shakespeare, *Antony and Cleopatra* (Act 1, Scene 2)

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Seite</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	i
<b>Abbildungs- und Tabellenverzeichnis</b>	iv
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Problemstellung	1
1.2 Makroanatomie des Kniegelenks	1
1.3 Struktur und Funktion des hyalinen Gelenkknorpels	2
1.3.1 Struktur der extrazellulären Matrix	3
1.3.1.1 Kollagen-Netzwerk	3
1.3.1.2 Proteoglykan-Aggregate	4
1.3.2 Chondrozyten	6
1.3.3 Biomechanisches Modell des Gelenkknorpels	6
1.3.3.1 Biomechanischer Stellenwert der SFZ	7
1.4 Übersicht über die Osteoarthritis	8
1.4.1 Risikofaktoren	10
1.5 Reaktion des Gelenkknorpels auf mechanische Überlastung	11
1.5.1 Degradation der extrazellulären Matrix	11
1.5.2 Untergang von Chondrozyten	13
1.5.2.1 Nekrose	13
1.5.2.2 Apoptose	13
1.5.2.3 Marker des Apoptoseprozesses	14
1.5.2.4 Apoptose im überlasteten Gelenkknorpel	15
1.6 Geschlecht, Estrogene und Osteoarthritis	16
1.7 17 $\beta$ -Estradiol	17
1.7.1 Struktur und Synthese	17

1.7.2	Funktion	17
1.7.3	Rezeptoren	18
1.7.4	Estrogenrezeptoren im hyalinen Gelenkknorpel	19
1.8	Ziele und Fragestellung der Arbeit	20
<b>2.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1	Material	21
2.1.1	Chemikalien und Reagenzien	21
2.1.2	Materialien und Geräte	22
2.2	Das <i>In-vitro</i> -Modell mechanischer Läsion	23
2.2.1	Herstellung von Explantaten aus bovinem Gelenkknorpel	23
2.2.1.1	Explantate mit beschädigter Superficialzone	23
2.2.1.2	Explantate mit intakter Superficialzone	24
2.2.2	Kompression der Explantate	25
2.3	Kultur und Stimulation der Explantate	27
2.3.1	Kulturmedium für die Explantate	27
2.3.2	Stimulation mit 17 $\beta$ -Estradiol	27
2.3.3	Kostimulation mit 17 $\beta$ -Estradiol und Fulvestrant	28
2.4	Versuchsdurchführungen	29
2.4.1	Vorversuche zur Ermittlung wirksamer E2 Konzentrationen	29
2.4.2	Versuche mit Explantaten mit beschädigter Superficialzone	30
2.4.3	Versuche mit Explantaten mit intakter Superficialzone	31
2.4.4	Versuche zum Wirkmechanismus mit dem steroidal- Estrogen-Rezeptor-Inhibitor Fulvestrant	32
2.4.4.1	Vorversuch zur Prüfung der Toxizität	32
2.4.4.2	Versuche mit Kostimulation mit 17 $\beta$ -Estradiol und Fulvestrant	32

2.5	Fixieren, Einbetten und Färben der Explantate	33
2.5.1	Fixieren der Explantate mit Paraformaldehyd-Lösung	33
2.5.2	Einbetten der Explantate in Paraffin	33
2.5.3	Färben von Paraffinschnitten mit Mayer´s Hämalaunlösung	33
2.5.4	Färben von Paraffinschnitten mittels TUNEL-Assay-Kit	34
2.6	Lichtmikroskopische Ermittlung des Apoptoseindex in den gefärbten Schnittpräparaten	35
2.6.1	Untersuchung der mit Mayer´s Hämalaun-gefärbten Präparate	35
2.6.2	Untersuchung der mittels TUNEL-Assay gefärbten Präparate	36
2.7	Bestimmung der Konzentration von sulfatierten Glykosaminoglykanen in den Kulturüberständen	36
2.8	Statistische Auswertung der erhobenen Daten	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	39
3.1	Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf mechanisch induzierte Apoptose von Chondrozyten in Gelenkknorpel-explantaten	39
3.1.1	Vorversuche zur Ermittlung wirksamer Konzentrationen und Dosis-Wirkungs-Beziehungen von E2	39
3.1.2	Einfluss von E2 auf mechanisch induzierte Apoptose in Explantaten mit beschädigter SFZ	41
3.1.3	Einfluss von E2 auf mechanisch induzierte Apoptose in Explantaten mit intakter SFZ	43
3.1.4	Vergleich der Effekte von E2 auf mechanisch induzierte Apoptose in Explantaten mit intakter und beschädigter SFZ	45
3.1.5	Kontrolle der mittels Htx-Färbung gewonnenen Erkenntnisse zur Wirkung von E2 mittels TUNEL-Assay	47
3.1.6	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von 17 $\beta$ -Estradiol	49
3.1.6.1	Vorversuch zur Prüfung der Toxizität von Fulvestrant bezüglich Induktion von Apoptose	49
3.1.6.2	Einfluss von Fulvestrant auf den Effekt von E2 auf mechanisch induzierte Apoptose	51

3.2	Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf mechanisch induzierte Freisetzung sulfatierter Glykosaminoglykane aus Gelenknorpelimplantaten	53
3.2.1	Einfluss von E2 auf mechanisch induzierte sGAG-Freisetzung aus Explantaten mit beschädigter SFZ	53
3.2.2	Einfluss von E2 auf mechanisch induzierte sGAG-Freisetzung aus Explantaten mit intakter SFZ	55
3.2.3	Vergleich der Effekte von E2 auf mechanisch induzierte sGAG-Freisetzung aus Explantaten mit intakter und beschädigter SFZ	57
3.2.4	Untersuchungen zum Wirkmechanismus von 17 $\beta$ -Estradiol	59
3.2.4.1	Vorversuch zur Prüfung der Toxizität von Fulvestrant bezüglich der sGAG-Freisetzung	59
3.2.4.2	Einfluss von Fulvestrant auf den Effekt von E2 auf mechanisch induzierte sGAG-Freisetzung	61
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	63
4.1	Methodenkritik	63
4.1.1	Verwendetes Kompressionsmodell	63
4.1.2	Methoden zur Detektion apoptotischer Zellen	64
4.1.3	Nachweis der Matrixdegradation	66
4.1.4	Stimulation mit E2	67
4.2	Wirksame Konzentrationen und Dosis-Wirkungs-Beziehung	68
4.3	Einfluss von E2 auf die Apoptose nach Kompression	69
4.4	Einfluss von E2 auf die Matrixdegradation nach Kompression	70
4.5	Stellenwert der Superficialzone	71
4.6	Beteiligte Rezeptoren	73
4.7	Schlussbemerkungen und Ausblick	74
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	76
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	78

<b>Bildnachweis</b>	83
<b>Danksagung</b>	84
<b>Lebenslauf</b>	85



## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
ADAMTS	a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin type I motif
ANOVA	analysis of variance
AP-1	activator protein-1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
Art.	Articulatio
bez.	bezüglich
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Caspase	cystein-dependant aspartate directed protease
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
d.h.	das heißt
DHEA	Dehydroepiandrosteron
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
DMMB	1,9-Dimethylmethylenblau
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1	Estron
E2	17β-Estradiol
E3	Estriol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen responsive Elemente
et al.	et alii (und andere)
EZM	extrazelluläre Matrix
GAG	Glykosaminoglykan
GlcA	Glukuronsäure
GlcNAc	N-Acetylglucosamin
GPR30	G protein-coupled receptor 30
h	Stunde(n)
HBSS	Hanks' buffering salt solution

HCl	Salzsäure
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)Piperazin-1-Ethansulfonsäure
Htx	Mayer's Hämalaun-Lösung
i.d.R.	in der Regel
IL-1 $\beta$	Interleukin-1 $\beta$
IQR	interquartile range (Interquartilabstand)
kDA	Kilodalton
Lig.	Ligamentum
M	Molar
M.	Musculus
MAPK	mitogen activated protein kinase
Max	Maximum
mER	membrangebundener Estrogenrezeptor
Min	Minimum
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>3</sup>	Kubikmillimeter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MPa	Megapascal
Na <sub>2</sub> EDTA	DinatriumEDTA
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nER	nukleärer Estrogenrezeptor
nM	Nanomolar
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
OA	Osteoarthrose
PBE	phosphate buffered saline with EDTA
PBS	phosphate buffered saline
PI3K	Phosphatidylinositol 3-OH Kinase
PKA	Proteinkinase A
s	Sekunde
s	Sekunde

s.o.	siehe oben
s.u.	siehe unten
SD	standard deviation (Standardabweichung)
SER	Steroidaler Estrogen-Rezeptor Antagonist
SFZ	Superficialzone
sGAG	sulfatiertes Glykosaminoglykan
TdT	Terminal deoxynucleotide transferase
TUNEL	Terminal deoxynucleotide transferase mediated UTP nick end labeling
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer

# Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

<b>Abbildungen</b>	<b>Seite</b>
Abb. 1: Struktur und Verknüpfung von Molekülen der EZM	5
Abb. 2: Biomechanisches Modell des Gelenkknorpels	8
Abb. 3: Prozess der arthrotischen Zerstörung der Gelenkoberfläche	9
Abb. 4: Schematische Darstellung der verwendeten Druckkammer	26
Abb. 5: Zeitlicher Ablauf der Versuchsreihen	30
Abb. 6: Beispielfotos Htx gefärbter Schnitte hyaliner Knorpelpräparate	38
Abb. 7: Dosisfindung: Apoptoseindex	40
Abb. 8: Explantate mit beschädigter SFZ: Apoptoseindex	42
Abb. 9: Explantate mit intakter SFZ: Apoptoseindex	44
Abb. 10: Vergleich der Experimente mit intakter und beschädigter SFZ: Apoptoseindex	46
Abb. 11: Beispielfotos mittels TUNEL-Assay gefärbter Schnitte hyaliner Knorpelpräparate	47
Abb. 12: TUNEL-Assay: Apoptoseindex	48
Abb. 13: Behandlung mit Fulvestrant: Apoptoseindex	50
Abb. 14: Behandlung mit Fulvestrant und E2: Apoptoseindex	52
Abb. 15: Explantate mit beschädigter SFZ: sGAG-Freisetzung	54
Abb. 16: Explantate mit intakter SFZ: sGAG-Freisetzung	56
Abb. 17: Vergleich der Experimente mit intakter und beschädigter SFZ: sGAG-Freisetzung	58
Abb. 18: Behandlung mit Fulvestrant: sGAG-Freisetzung	60
Abb. 19: Behandlung mit E2 und Fulvestrant: sGAG-Freisetzung	62
<b>Tabellen</b>	<b>Seite</b>
Tab. 1: Risikofaktoren der Osteoarthritis	11
Tab. 2: Volumina und Feuchtgewichte von Explantaten	67

## 1. Einleitung

### 1.1 Problemstellung

Vor dem Hintergrund der zunehmenden Bedeutung der muskulo-skelettalen Erkrankungen, insbesondere der Osteoarthrose, als Herausforderung für die weltweiten Gesundheitssysteme steht die Biologie und Pathophysiologie des Gelenkknorpels seit längerem im Fokus intensiver Forschung. Eine wichtige Facette ist dabei die Rolle von Sexualhormonen im Kontext von Knorpelhomöostase und -erkrankung (Tankó et al., 2008; Claasen et al., 2011; Tanamas et al., 2011).

In dieser Arbeit soll der Einfluss des Sexualhormons  $17\beta$ -Estradiol<sup>1</sup> auf das hyaline Gelenkknorpelgewebe des Kniegelenks im Rahmen eines *In-vitro*-Modells mechanischer Überlastung des Gewebes untersucht werden.

Zur Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext erfolgen zunächst eine Skizze des Aufbaus und der Funktion des untersuchten Gelenks und ein Überblick über die Struktur und Funktion des hyalinen Gelenkknorpels sowie über das Krankheitsbild der Osteoarthrose. Dies soll dazu dienen, den Stellenwert der untersuchten Parameter im Kontext etablierter Modelle der Biomechanik des Gelenkknorpels und vor dem weiteren klinischen Hintergrund der Pathogenese der Osteoarthrose einordnen zu können. Im Anschluss an eine kurze Darstellung der Reaktion des Knorpelgewebes auf mechanische Überlastung und einen kurzen Überblick über Estradiol im Untersuchungskontext erfolgt dann in der Zusammenschau die Entwicklung der konkreten Fragestellungen, die mit Hilfe der in dieser Arbeit berichteten Untersuchungen beantwortet werden sollen.

### 1.2 Makroanatomie des Kniegelenks

Die in dieser Arbeit berichteten Untersuchungen wurden am Gelenkknorpel des patellaren Gleitlagers (*Facies patellaris femoris*) des Kniegelenks durchgeführt. Dabei diente der Knorpel ausgewachsener, ca. 2 Jahre alter weiblicher Hausrinder (*Bos taurus*) als Modell für den menschlichen Gelenkknorpel.

Beim Menschen ist das Kniegelenk das größte Gelenk des Bewegungsapparates,

---

<sup>1</sup>Aufgrund der Gebräuchlichkeit in der internationalen Literatur wird in dieser Arbeit die anglierte Schreibweise verwendet (Estradiol, Estrogene etc. statt Östradiol, Östrogene usw.)

## 1. Einleitung

---

das im Rahmen von aufrechtem Stand und Gang aufgrund seiner Position in der unteren Extremität auch eines der am stärksten belasteten Gelenke des menschlichen Körpers darstellt.

Bei den artikulierenden Knochen handelt es sich um Femur, Tibia und Patella. Dabei artikulieren die Gelenkflächen der Femurkondylen mit denen des Tibiaplateaus, sowie die Rückfläche der Patella mit dem femoropatellaren Gleitlager (*Facies patellaris femoris*) des Femurs. Die Gelenkkapsel weist mehrere Recessus als Bewegungsreserve auf und ist durch einige Bänder verstärkt. Die Stabilität wird hauptsächlich durch das mediale und laterale Seitenband sowie das vordere und hintere Kreuzband hergestellt. Die Patella ist als Sesambein in eine Sehnenverbindung zwischen Tibia und *M. Quadriceps femoris* eingebunden, die aus dem eigentlichen *Lig. patellae* und der Quadricepssehne gebildet wird. Die Funktion der verschiedenen beteiligten Strukturen besteht einerseits darin, im Gefüge des passiven Bewegungsapparates, also dem Verbundsystem aus Knochen, Bändern und Gelenken, eine ausreichende Stabilität zu gewährleisten, um die durch Gewicht, Haltung und Bewegung auftretenden Kräfte aufzunehmen und zu verteilen. Andererseits sollen sie Freiheitsgrade der Bewegung ermöglichen, die es erlauben, mit Hilfe der Muskulatur aktiv und zielgerichtet Haltungen einzunehmen und Handlungen auszuführen.

Die funktionellen Anforderungen an das Kniegelenk bestehen darin, das auf der unteren Extremität lastende Körpergewicht zu tragen sowie die vor allem im Rahmen des aufrechten Ganges notwendige Flexibilität der unteren Extremität zu gewährleisten. Dabei treten Flexions- und Extensions- sowie Rotations- und Translationsbewegungen der artikulierenden Gelenkstrukturen auf.

### 1.3 Struktur und Funktion des hyalinen Gelenkknorpels

Dem hyalinen Gelenkknorpel kommt im Rahmen der eingangs dargestellten Funktionen des Gelenks die Aufgabe zu, mechanische Belastungen aufzunehmen und weiterzugeben sowie ein Gleitlager für möglichst reibungsarme Bewegungen der artikulierenden Gelenkflächen gegeneinander zu bilden. Den dabei auftretenden starken Kompressions- und Scherkräften kann der gesunde Gelenkknorpel aufgrund

seiner hoch organisierten Mikroarchitektur widerstehen. Dies ist umso relevanter, da der Gelenkknorpel nicht über ein Perichondrium verfügt, das in anderen Knorpelgeweben Vorläuferzellen für die fortwährende Regeneration der Chondrozyten bereitstellt, und somit nicht oder nur sehr begrenzt regenerationsfähig ist.

### 1.3.1 Struktur der extrazellulären Matrix

Gelenkknorpel besteht zu über 90% seines Trockengewichts aus extrazellulärer Matrix (EZM), die hauptverantwortlich für die biomechanischen Eigenschaften und damit die Funktion des Gewebes ist (Knudson et al., 2001; Mow et al., 1984; Wilson et al., 2005; Wong et al., 2003). Lichtmikroskopisch kann die unmittelbar um die in Chondronen organisierten Zellen gelegene stärker basophile *territoriale* Matrix von der restlichen *interterritorialen* Matrix unterschieden werden. Ultrastrukturell besteht die EZM im wesentlichen aus einem Netzwerk aus Kollagenfibrillen und dazwischen verteilten Proteoglykanen.

#### 1.3.1.1 Kollagen-Netzwerk

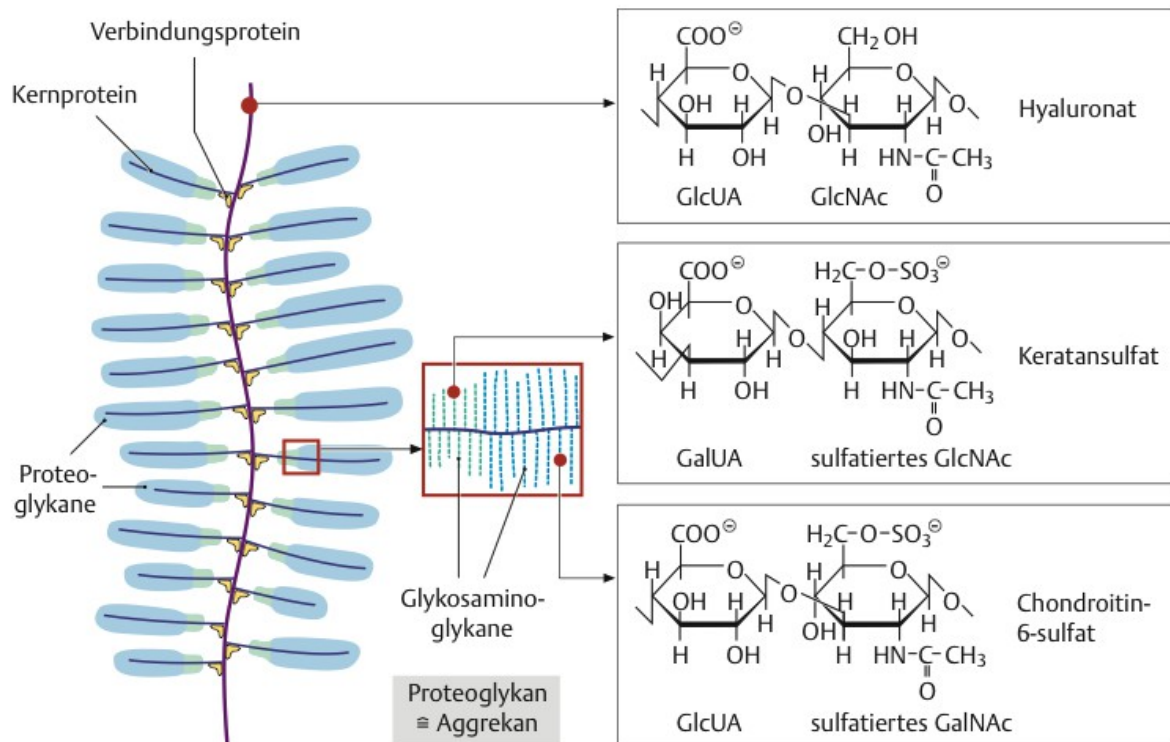
Verschiedene Kollagene machen etwa 50% des Trockengewichtes des hyalinen Gelenkknorpels aus (Mow et al., 1984). Das Hauptkollagen ist das fibrilläre Kollagen Typ II mit einem Anteil von 80-90% (Knudson et al., 2001), es finden sich jedoch auch Kollagene der Typen III, VI, IX, X, XI, XII und XIV sowie weitere assoziierte Proteine (Umlauf et al., 2010; Knudson et al., 2001; Hardingham et al., 1992). Die Kollagenfibrillen der interterritorialen Matrix bilden ein hochorganisiertes Netzwerk, indem sie arkadenartig zunächst senkrecht zur Knorpeloberfläche, dann bogenförmig parallel zur Oberfläche, und schließlich wieder senkrecht verlaufen. Anhand der Verlaufsrichtung der Kollagenfibrillen wird der hyaline Gelenkknorpel in vier Zonen unterteilt: an die am tiefsten gelegene Zone des kalzifizierten Knorpels schließt sich die Radiärzone mit senkrecht verlaufenden Fibrillen an, gefolgt von der Übergangszone und der Superficialzone mit parallel zur Oberfläche verlaufenden Kollagenfibrillen (Umlauf et al., 2010; Wilson et al., 2005; Wong et al., 2003)(vgl. auch Abb. 2).

### 1.3.1.2 Proteoglykan-Aggregate

In das Netzwerk aus Kollagenfibrillen sind große Aggregate aus Proteoglykanen eingelagert. Proteoglykane bestehen aus einem sogenannten Core-Protein mit kovalent gebundenen Glykosaminoglykan-Seitenketten, wobei es sich um i.d.R. sulfatierte Ketten aus repetitiven Disaccharid-Einheiten handelt (Hardingham et al., 1992). Das in der EZM des Gelenkknorpels vorherrschende Proteoglykan ist Aggrekan, das aus einem Kernprotein (Core-Protein) von ca. 230 kDa Molekulargewicht besteht, an das typischerweise mehr als einhundert Glykosaminoglykan-Seitenketten kovalent gebunden sind. Andere Proteoglykane, die im Gelenkknorpel in kleineren Mengen vorkommen, sind Syndekan, Glypican, Decorin, Biglycan, Fibromodulin, Lumican, Epiphycan sowie Perlecan (Knudson et al., 2001). Bei den Glykosaminoglykan-Seitenketten des Aggrekans handelt es sich überwiegend um Chondroitin-6-Sulfat, zu kleineren Anteilen kommt auch Chondroitin-4-Sulfat sowie Keratansulfat vor (Hardingham et al., 1992; Knudson et al., 2001). Aggrekan hat die Eigenschaft, mit einer Domäne seines Core-Proteins mit Hyaluronat, einem weiteren wichtigen Glykosaminoglykan (GAG), interagieren zu können. Hyaluronat ist ein großes Molekül, das aus den repetitiven Disacchariden Glukuronsäure (GlcA) und N-Acetylglucosamin (GlcNAc) besteht (Hardingham et al., 1992). Im Gegensatz zu anderen GAGs ist Hyaluronat weder sulfatiert noch an ein Core-Protein gebunden. Ein kleines Glykoprotein, das sog. Link-Protein, dient als Verbindungsprotein, über das die Aggrekan-Hyaluronat Bindung so stabilisiert wird, dass sie unter physiologischen Bedingungen nicht zu lösen ist (Knudson et al., 2001). Auf diese Weise entstehen große Multimere aus bis zu 50 Aggrekan-Molekülen, die an ein Hyaluronat-Molekül binden. Dies hat zur Folge, dass die Aggrekanmoleküle in der EZM fixiert sind. Hyaluronat seinerseits kann über den Membranrezeptor CD44, ebenfalls ein Proteoglykan, an die Zellmembran der Chondrozyten binden (Knudson et al., 2001; Hardingham et al., 1992).



## 1. Einleitung



**Abb. 1. Struktur und Verknüpfung von Molekülen der EZM**

Sulfatierte Glykosaminoglykane sind als Seitenketten mit einem Kernprotein zu Proteoglykanen verknüpft. Mengenmäßig handelt es sich hauptsächlich um Aggrekan dessen sGAGs Keratansulfat und Chondroitin-6-sulfat detailliert dargestellt sind. Die Proteoglykane sind ihrerseits über Verbindungsproteine an Hyaluronat gebunden, so dass große polyanionische Moleküle in der EZM des hyalinen Gelenkknorpels entstehen.

Durch die beschriebene Quervernetzung der beteiligten Proteoglykane entstehen riesige Aggregate aus miteinander verbundenen Molekülen, die aufgrund der funktionellen Gruppen ihrer sulfatierten GAG-Reste stark polyanionisch geladen sind. Diese in der EZM fixierten negativen Ladungen führen zu einem hohem Influx positiv geladener Ionen (Kationen), so dass deren Konzentration die in der umgebenden Synovialflüssigkeit des Gelenks überschreitet. Der resultierende osmotische Gradient hat einen Flüssigkeitseinstrom mit konsekutiver Schwellung des Gewebes zur Folge, wobei die Flüssigkeit zwischen 70-85% des Feuchtgewichts ausmacht und zu einem physiologischen Schwellungsdruck im Gewebe führt (Wilson et al., 2005; Mow et al., 1984).

### **1.3.2 Chondrozyten**

Die Zellen des hyalinen Gelenkknorpels machen nur etwa 5% des Volumens aus und sind in kleinen Gruppen isogener Zellen, den sog. Chondronen, zwischen den Kollagenfibrillen in die verschiedenen Zonen der EZM eingebettet (Knudson et al., 2001; Umlauf et al., 2010). Ihre zentrale Rolle liegt in ihrer Synthesefunktion für die Komponenten der EZM, wobei die Kollagenfibrillen mit einer Halbwertszeit von über 100 Jahren für Kollagen Typ II, nur sehr langsam, die Proteoglykan-Aggregate schneller umgesetzt werden (Knudson et al., 2001).

Den Chondrozyten selbst kommt praktisch keine mechanische Funktion zu, auf das Gewebe einwirkende Kräfte wirken allerdings durch Zell-Matrix-Kontakte, Änderungen des hydrostatischen Druckes und Flusses der interstitiellen Flüssigkeit auch auf die Zellen. Dies spiegelt sich in der Morphologie der Chondrozyten wieder. Die Zellen in der Superficialzone, die den stärksten Verformungen unter Belastung ausgesetzt ist (vgl. Abs. 1.3.3), haben dabei eine abgeflachte Form, während die Zellen der tieferen Radiär- und Übergangszonen eine eher abgerundete Form aufweisen. Diesen morphologischen Unterschieden entsprechen auch Unterschiede in der Syntheseleistung bzw. im Verhältnis von synthetisiertem Kollagen und Proteoglykanen (Wong et al., 2003). Die Chondrozyten interagieren über zahlreiche unterschiedliche Membranrezeptoren mit Komponenten der EZM und löslichen Liganden. Zur Diskussion der möglichen molekularen Mechanismen der Mechanotransduktion zwischen EZM und Chondrozyten siehe Wong et al., 2003.

### **1.3.3 Biomechanisches Modell des Gelenkknorpels**

In der beschriebenen Mikroarchitektur und biochemischen Zusammensetzung liegt der Schlüssel zum Verständnis der biomechanischen Eigenschaften des Gelenkknorpels. Ausgehend davon wurden Modelle entwickelt, die den Gelenkknorpel unter biomechanischen Gesichtspunkten als ein poro-elastisches, unter Schwellungsdruck stehendes, faserverstärktes Polster beschreiben, dessen mechanische Eigenschaften sich aus dem Zusammenspiel seiner einzelnen Elemente ergeben (Mow et al., 1984; Wong et al., 2003; Wilson et al., 2005). Den polyanionischen Proteoglykanen kommt dabei die Funktion zu, über den durch sie

## 1. Einleitung

---

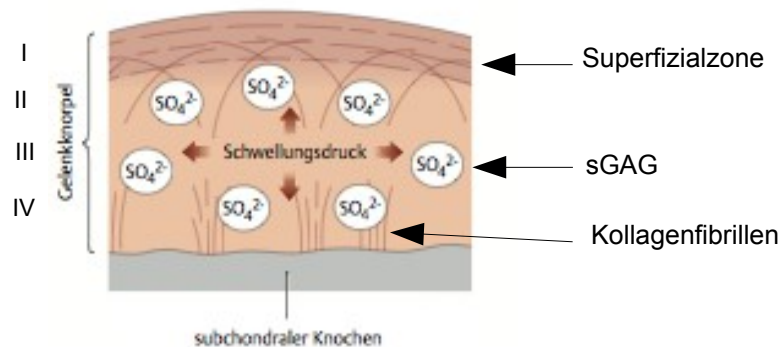
erzeugten osmotischen Gradienten den hydrostatischem Druck der interstitiellen Flüssigkeit aufrechtzuerhalten, der in vivo über 90% der auf den Knorpel wirkenden Kompressionskräfte trägt (Mow et al., 1984; Wong et al., 2003). Das Netzwerk aus Kollagenfibrillen hat einerseits die Funktion der räumlichen Stabilisierung der Proteoglykane und begrenzt deren räumliche Ausdehnung und fängt andererseits die bei Bewegungen der artikulierenden Gelenkflächen auftretenden Zug- und Scherkräfte ab (Mow et al., 1984; Wong et al., 2003).

### **1.3.3.1 Biomechanischer Stellenwert der SFZ**

Hierbei ist die Gliederung des Gelenkknorpels in verschiedene Zonen von Bedeutung. Reifer hyaliner Gelenkknorpel weist eine zonale Gliederung auf die aus der Superfizialzone, einer mittleren und tiefen Zone besteht. Dem entspricht die in Abschnitt 1.3.1.1 beschriebene zonale Gliederung des Netzwerkes aus Kollagenfibrillen mit seiner arkadenartigen Anordnung. Die einzelnen Zonen sind bei Belastung des Gelenks jeweils unterschiedlichen Belastungen durch Zug- und Druckkräfte ausgesetzt und es resultiert eine unterschiedlich ausgeprägte Deformation des Gewebes mit verschieden starkem Fluss der extrazellulären Flüssigkeit (Wong et al., 2003). Die Superfizialzone spielt dabei eine entscheidende Rolle. Die zur Gelenkoberfläche gelegenen ca. 100µm des Knorpelgewebes sind unter physiologischen Bedingungen den stärksten Kompressions- und Scherkräften ausgesetzt. Ihre parallel zur Oberfläche verlaufenden Kollagenfibrillen bilden ein membranartiges Netzwerk (Bevill et al., 2010) das die EZM stabilisiert und insbesondere parallel den zur Knorpeloberfläche auftretenden Scherkräften widerstehen kann. Die SFZ kann auf die auftretenden Kräfte mit einer ausgeprägten Deformation auf bis zu 50% ihrer Dicke reagieren, wobei die extrazelluläre Flüssigkeit mit starkem Fluss herausgedrückt wird (Wong et al., 2003; Buckley et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass die SFZ dabei die auftretenden Kräfte von direkt belasteten zu weniger belasteten Knorpelbereichen verteilt (Bevill et al., 2010). Durch ihre Konsolidierung dichtet sie die tiefer liegenden Zonen zur Oberfläche hin ab, so dass die extrazelluläre Flüssigkeit dort nicht herausströmen kann. Da der Fluss aus den tieferen Zonen durch den benachbarten Knorpel bzw. kalzifizierten

## 1. Einleitung

Knorpel zusätzlich sowohl nach lateral als auch zum subchondralen Knochen hin weitgehend verhindert wird, kann die Flüssigkeit nicht entweichen. Da Flüssigkeiten nicht komprimierbar sind, ergibt sich so das Resultat, dass die Kompressionskräfte vom hydrostatischen Druck getragen werden, während Chondrozyten und EZM vor Überlastung geschützt sind (Wong et al., 2003). Im Rahmen dieses Modells ist es leicht verständlich, dass Beschädigungen der Struktur des Gelenkknorpels, insbesondere der SFZ, unmittelbar deletäre Konsequenzen für seine Funktion als lasttragendes Element innerhalb des biomechanischen Systems 'Gelenk' haben.



### Abb. 2. Biomechanisches Modell des Gelenkknorpels

Schematische Ansicht des hyalinen Gelenkknorpels im Querschnitt mit Darstellung des Kollagennetzwerkes und der sulfatierten Glykosaminoglykane der EZM. Aufgrund der fixierten negativen Ladungen resultiert ein osmotischer Gradient in das Gewebe, der einen Schwellungsdruck zur Folge hat. Dieser trägt wesentlich zur mechanischen Stabilität des Gewebes bei.

Superficialzone des Knorpels dunkel hervorgehoben. sGAGs durch Sulfatgruppen symbolisiert. Arkadenartiger Verlauf der Kollagenfibrillen schematisch angedeutet. I-IV: Verlauf der Kollagenfibrillen mit verschiedenen Zonen. I: Tangentialzone, II: Übergangszone, III: Radiärzone, IV: Verknocherungszone des Knorpels (nicht farblich abgehoben). Chondrozyten nicht dargestellt.

### 1.4 Übersicht über die Osteoarthritis

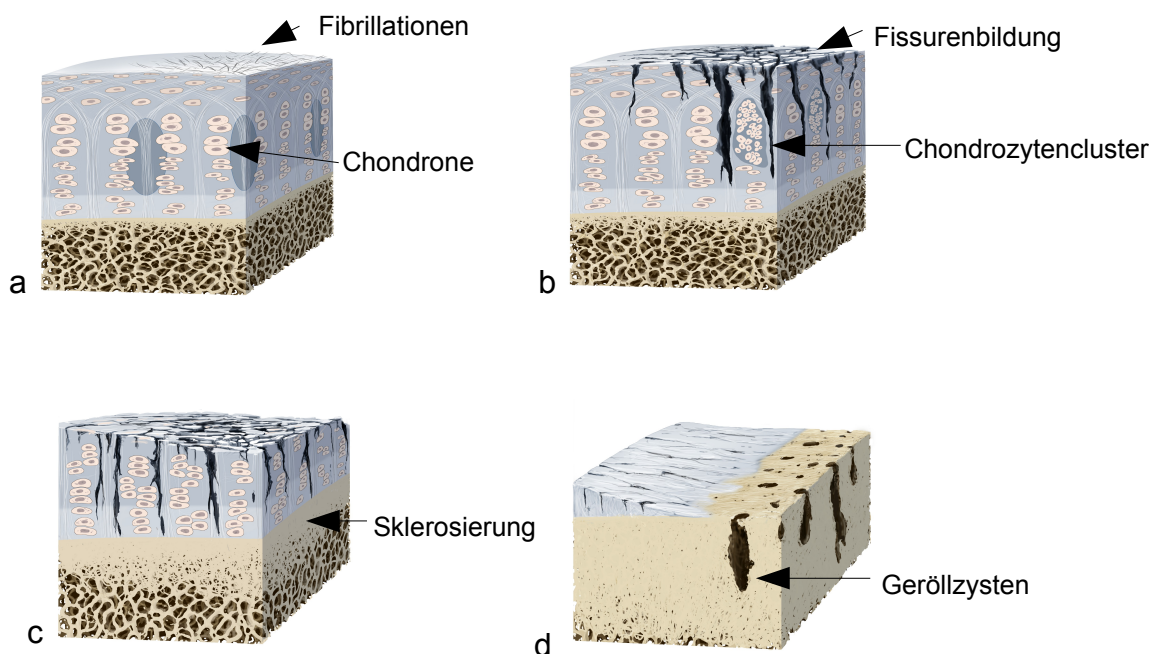
Bei der Osteoarthritis (OA) handelt es sich um eine progrediente Gelenkerkrankung, die zu einem zunehmenden Verlust der Gelenkfunktion führt und durch die klinische Symptomatik aus Gelenkschmerz, Steifigkeit und Bewegungseinschränkung gekennzeichnet ist. Nach aktuellem Verständnis handelt es sich eine Erkrankung des gesamten Gelenks, an der alle Gewebe bzw. Teilelemente beteiligt sind und die in

## 1. Einleitung

---

der Konsequenz einen Funktionsverlust des Gesamtsystems 'Gelenk' analog dem Organversagen innerer Organe zur Folge hat (Abramson et al., 2009; Arden et al., 2006; Nuki, 1999).

Zentral in der Pathophysiologie der OA ist die fortschreitende Zerstörung des Gelenkknorpels, die von einer Reihe charakteristischer Ab- und Umbauprozesse anderer Gelenkstrukturen begleitet wird (Umlauf et al., 2010; Abramson et al., 2009; Arden et al., 2006). Der Abbauprozess des Knorpels führt dabei von oberflächlichen Fibrillationen über fortschreitende Bildung tieferer Fissuren bis zum vollständigen Verlust des Gelenkknorpels, vgl. Abb. 3 (Garstang et al., 2006).



**Abb. 3. Prozess der arthrotischen Zerstörung der Gelenkoberfläche**

Die Zeichnungen a bis d zeigen den fortschreitenden Prozess der Zerstörung der Gelenkoberfläche im Rahmen der Osteoarthritis. In a ist gezeigt wie der Zerstörungsprozess mit oberflächlichen Fibrillationen seinen Ausgang nimmt. In b haben sich bereits tiefe Fissuren gebildet, es kommt zu einer zunehmenden Zerstörung der EZM Architektur. Cluster sich erneuter teilender Chondrozyten stellen einen frustranen Reparatursversuch dar. In c ist die Knorpeloberfläche bereits stark reduziert, es kommt aufgrund der nun verstärkten mechanischen Belastung zu einer Sklerosierung des subchondralen Knochens. In d ist der Knorpel schließlich fast vollständig verloren, der subchondrale Knochen ist sklerosiert mit zahlreichen eingebrochenen Geröllzysten.

## 1. Einleitung

---

Parallel dazu erfolgt die Zerstörung von Hilfsstrukturen wie Menisken, das Auftreten von Sklerosierung und zystenartigen Läsionen im subchondralen Knochen sowie die Neubildung von Osteophyten sowie Proliferation der Synovia als typische Merkmale eines arthrotischen Gelenks (Abramson et al., 2009). Die genaue Ätiologie und Pathophysiologie der OA ist zur Zeit noch nicht vollständig aufgeklärt. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei der OA nicht um ein einheitliches Krankheitsbild, sondern ätiologisch um verschiedene Entitäten mit gemeinsamer pathophysiologischer Endstrecke handelt (Garstang et al., 2006). Konzeptuell wird von einem Ungleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Stoffwechselwegen des Gelenkknorpels (Umlauf et al., 2010) oder, auf das ganze Gelenk bezogen, zwischen protektiven und Reparaturmechanismen auf der einen Seite und gelenkschädigenden Faktoren auf der anderen Seite ausgegangen (Nuki, 1999; Garstang et al., 2006).

### 1.4.1 Risikofaktoren

Durch epidemiologische Studien ist es gelungen, eine Reihe von Risikofaktoren zu identifizieren, die die Wahrscheinlichkeit arthrotischer Veränderungen eines Gelenks erhöhen. Davon ausgehend wurde ein Modell entwickelt, das die OA als Resultat eines Zusammenwirkens systemischer und lokaler Risikofaktoren begreift (Garstang et al., 2006; Arden et al., 2006). Systemische Risikofaktoren tragen in diesem Konzept zu einem Milieu bei, in dem Gelenke anfällig für arthrotische Veränderungen sind, indem sie die Balance zwischen protektiven und aggressiven Einflüssen zugunsten letzterer verändern. Die lokalen Risikofaktoren stellen v.a. Veränderungen in der Biomechanik dar, die die Fähigkeit des einzelnen Gelenks, den funktionellen Anforderungen gerecht zu werden, herabsetzen (vgl. Tbl. 1).

## 1. Einleitung

---

<b>Systemische Faktoren</b>	<b>Lokale biomechanische Faktoren</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Lebensalter</li><li>• Geschlecht und hormoneller Status</li><li>• Genetik</li><li>• Ethnizität</li><li>• Knochendichte</li><li>• Ernährung</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Traumata</li><li>• repetitive Gelenkbelastung</li><li>• Gelenkfehlstellungen</li><li>• Muskelschwäche</li><li>• Schwäche von Bandapparat und Hilfsstrukturen</li><li>• Leistungssport</li></ul>
	<ul style="list-style-type: none"><li>• Adipositas</li></ul>

**Tab. 1.** Risikofaktoren der Osteoarthrose (nach Garstang et al., 2006; Arden et al., 2006)

Während die systemischen Faktoren die allgemeine Anfälligkeit der Gelenke des Organismus für degenerative Veränderungen beeinflussen, spielen die lokalen Faktoren eine wichtige Rolle für die Lokalisation und Ausprägung der Osteoarthrose (Garstang et al., 2006; Arden et al., 2006). Im Rahmen dieser Arbeit wird der systemische Faktor 'hormoneller Effekte' im Rahmen eines *In-vitro*-Modells des lokalen Faktors der mechanischen Überlastung untersucht, für eine Diskussion sämtlicher Risikofaktoren vgl. Garstang et al., 2006 sowie Arden et al., 2006.

### 1.5 Reaktion des Gelenkknorpels auf mechanische Überlastung

Die Reaktion des Gelenkknorpels auf mechanische Überlastung ist in zahlreichen Studien an unterschiedlichen Modellen untersucht worden (Kurz et al., 2005). Während regelmäßige physiologische Belastung einen wichtigen Beitrag zur Aufrechterhaltung von Homöostase und Funktion des Knorpels leistet, führt die unphysiologische mechanische Überlastung zur teilweisen Zerstörung des Knorpels und damit zum Verlust der Fähigkeit, weiteren Belastungen adäquat standzuhalten (Kurz et al., 2005). Es konnten verschiedene Mechanismen, die zu der pathologischen Veränderung der Biomechanik des Knorpelgewebes beitragen, identifiziert werden.

#### 1.5.1 Degradation der extrazellulären Matrix

Infolge unphysiologisch starker mechanischer Belastung kommt es zu Schäden an der Struktur des Kollagennetzwerkes, wodurch die Widerstandsfähigkeit des Gewebes gegenüber Belastungen durch Zug- und Scherkräfte herabgesetzt wird. Es

## 1. Einleitung

---

kommt zur Ausbildung von Fissuren und zur makroskopischen Verformung und zum Anschwellen des betroffenen Gewebes, letzteres als Zeichen der elektrostatischen Abstoßung der nicht mehr durch die Kollagenfibrillen an der räumlichen Ausdehnung gehinderten Proteoglykane (Chen et al., 1999; Quinn et al., 1998; Kurz et al. 2001, Kurz et al., 2005). Gleichzeitig kommt es zu einer Abnahme des Glykosaminoglykangehaltes im Knorpelgewebe, was sich experimentell als GAG-Freisetzung in die verwendeten Kulturmedien darstellt, mit der Folge einer Abnahme der Belastbarkeit des betroffenen Gewebes durch Druckkräfte (Kurz et al., 2001; DiMicco et al., 2004; D’Lima et al., 2001a; Quinn et al., 2001; Lin et al., 2004).

Die beschriebenen Veränderungen werden in der Literatur einerseits als direkte Folgen des Einwirkens hoher mechanischer Kräfte interpretiert, wobei die Ruptur der Kollagenfibrillen, direkte mechanische Degradation der Proteoglykane sowie Verlust durch konvektiven Fluss für einen initial hohen GAG-Verlust verantwortlich gemacht wird (Loening et al., 2000; DiMicco et al., 2004; Quinn et al., 2001; Lin et al., 2004).

Andererseits wird eine längerfristige und experimentell modulierbare Degradation des Gewebes beobachtet (D’Lima et al., 2001a; Quinn et al., 2001), deren Ursache in einer veränderten Enzymaktivität im verletzten Gewebe zu suchen ist. In einer Reihe von Studien konnte nachgewiesen werden, dass eine Vielzahl von matrixabbauenden Enzymen nach mechanischer Überlastung im betroffenen Knorpelgewebe hochreguliert wird (Kurz et al., 2005). Im Fokus stehen dabei insbesondere die Gruppe der Matrix-Metalloproteinasen (MMPs), sowie die der ADAMTS-Proteinase (a disintegrin metalloproteinase with thrombospondin type I motif) (Murphy et al., 2005; Nagase et al., 2003). Beide gehören zu einer Enzym-Superfamilie von Endopeptidasen, deren aktives Zentrum durch ein zink-bindendes Motiv, das von Methionin gefolgt wird, gekennzeichnet ist (Murphy et al., 2005). Im Knorpelgewebe spielen MMPs eine wichtige Rolle beim Abbau von Kollagen II sowie Aggrecan, für die jeweils eine Reihe von Schnittstellen charakterisiert sind (Murphy et al., 2005; Murphy et al., 2008; Nagase et al., 2003). Verschiedene Mitglieder der ADAMTS-Familie können ebenfalls Aggrecan spalten, eine entscheidende Rolle spielen dabei die Aggrecanasen ADAMTS 4 (Aggrecanase 1) und ADAMTS 5 (Aggrecanase 2) (Murphy et al., 2005; Nagase et al., 2003; Murphy et al., 2008).



Im Zusammenhang mit mechanischer Überlastung konnte nachgewiesen werden, dass die Expression von MMP 1, MMP 2, MMP 3, MMP 8, MMP 9, MMP 13 sowie ADAMTS 5 (=Aggrecanase 1) im geschädigten Knorpelgewebe erhöht ist (Kurz et al., 2005; Lee et al., 2005; Pufe et al., 2004), ein Befund, der gut mit Untersuchungsergebnissen zur MMP-Expression in menschlichem arthrotisch verändertem Knorpelgewebe in Einklang zu bringen ist (Chubinskaya et al., 1999; Murphy et al., 2008).

### **1.5.2 Untergang von Chondrozyten**

Unphysiologische mechanische Belastung des Knorpelgewebes führt nicht nur zu Veränderungen in Metabolismus und Genexpression der Chondrozyten, mit der Folge eines Matrixabbaus, sondern auch zum Untergang der Zellen selbst. Sowohl Knorpelzellnekrose als auch -apoptose finden sich als Varianten des Zelltodes im geschädigten Gewebe (Kühn et al., 2004).

#### **1.5.2.1 Nekrose**

Bei der Nekrose handelt es um eine ungesteuerte, nicht-energieabhängige Form des Zelluntergangs als Reaktion auf letale Zellschädigung, bei der es zu einem zufälligen, unspezifischen Zellzerfall mit begleitender inflammatorischer Reaktion im umgebenden Gewebe kommt (Kühn et al., 2004). Nekrotischer Zelluntergang war nicht Gegenstand der Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit.

#### **1.5.2.2 Apoptose**

Bei der Apoptose hingegen handelt es sich um eine Form des programmierten Zelltodes, die durch energieabhängige, gesteuerte Reaktionskaskaden mit spezifischen morphologischen und biochemischen Veränderungen der betroffenen Zelle gekennzeichnet ist. Der zeitliche Verlauf ist dreiphasig und wird in Initiations-, Exekutions- und Degradationsphase eingeteilt. Die Dauer aller 3 Phasen wird mit 6-24 Stunden angegeben (Saraste et al., 2000). In der Initiationsphase wird der Apoptoseprozess durch verschiedene pro-apoptotische externe Stimuli ausgelöst und die intrazellulären apoptotischen biochemischen Pathways werden aktiviert.

## 1. Einleitung

---

Während der Exekutionsphase laufen die molekularen Mechanismen ab, die letztendlich zu den in der Degradationsphase nachweisbaren biochemischen und morphologischen Zeichen des abgelaufenen Apoptoseprozesses führen (Saraste et al., 2000). An zentraler Stelle im molekularen Mechanismus des Apoptoseprozesses steht das Caspase-System. Als Caspasen (Cystein-dependant aspartate directed proteases) wird eine Gruppe sich gegenseitig kaskadenartig aktivierender Proteasen bezeichnet, wobei zunächst Aktivatorcaspasen durch pro-apoptotische Stimuli aktiviert werden, um dann ihrerseits Effektorcaspasen zu aktivieren, die wichtige Strukturproteine der Zelle spalten und so zum Zelluntergang mit den zu beobachtenden typischen Markern der Apoptose führen (Saraste et al., 2000).

### **1.5.2.3 Marker des Apoptoseprozesses**

Initial schrumpft die Zelle und löst sich aus dem Zellverband bzw. der Verbindung mit der EZM (Saraste et al., 2000). Im Zellkern kommt es zunächst zu einer zunehmenden Kondensation des Chromatins, die nach variabler Dauer in ein Stadium übergeht, in dem der Zellkern entweder eine runde oder halbmondförmige stark kondensierte Morphologie aufweist oder stark kondensierte Zellkerne mit mehreren charakteristischen rundlichen Protrusionen („Nuclear blebbing“) vorliegen (Earnshaw, 1995; Dini et al., 1996). Die Chromosomen werden durch verschiedene DNAsen internucleosomal zerschnitten, wobei zunächst sowohl größere als auch kleinere Fragmente entstehen, die schließlich in die typischen ca. 180-200 bp langen doppelsträngigen Fragmente zerschnitten werden (Saraste et al., 2000; Dini et al., 1996). Dabei entstehen viele freie DNA-Termini, die neben 'blunt ends' auch 3'-OH Überhänge aufweisen (Saraste et al., 2000). Im weiteren Verlauf des Apoptoseprozesses zerlegt sich die gesamte Zelle in kleine membranumschlossene Vesikel (Apoptosekörperchen), die von der Zellmembran aussprossen und von den umliegenden Zellen des betreffenden Gewebes phagozytotisch abgebaut werden, ohne dass es zu einer inflammatorischen Reaktion mit Rekrutierung von Zellen des Immunsystems kommt (Saraste et al., 2000). Bleibt die Phagozytose durch umgebende Zellen aus, kommt es zu einem Prozess der sekundären Nekrose (Saraste et al., 2000).

### **1.5.2.4 Apoptose im überlasteten Gelenkknorpel**

In verschiedenen *In-vitro*-Modellen mechanisch verletzten oder überlasteten Gelenkknorpels wurde der apoptotische Zelluntergang als Merkmal des geschädigten Knorpelgewebes beschrieben (Loening et al., 2000; Chen et al., 2001; D'Lima et al., 2001a; D'Lima et al., 2001b; Kurz et al., 2004; Tew et al., 2000).

Je nach Modell zeigten sich dabei innerhalb einer Zeitspanne von wenigen Stunden bis zu einem Tag (Loening et al., 2000) die ersten apoptotischen Zellen mit einem kontinuierlichen Anstieg des Prozentsatzes apoptotischer Zellen über mehrere Tage bis zu einer Woche (Tew et al., 2000; Chen et al., 2001; D'Lima et al., 2001b). Auch in einem Tiermodell der OA (Kaninchen mit disseziertem vorderem Kreuzband) konnte eine signifikante Steigerung der Expression proapoptotischer Gene (Fas, Caspase 8) nachgewiesen werden (Robertson et al., 2006).

Als ursächlich kommen einerseits ein Verlust der Zell-Matrix-Interaktion insbesondere mit Kollagen II, aber auch Hylaluronan in Frage, bedingt sowohl durch die direkte mechanische Zerstörung der strukturellen Integrität des Gewebes als auch infolge der oben beschriebenen enzymatischen Abbauprozesse von Matrixmolekülen (Kühn et al., 2004). Des Weiteren finden sich erhöhte Spiegel proinflammatorischer Mediatoren wie IL-1 $\beta$  und reaktiver Sauerstoffspezies in mechanisch geschädigtem Knorpel, die zusammen mit einer erhöhten NO-Produktion zu einem proapoptotischen Milieu beitragen können (Kühn et al., 2004). Insgesamt sprechen die beschriebenen experimentellen Befunde für einen nach mechanischer Schädigung über längere Zeit ablaufenden Prozess fortschreitenden apoptotischen Zelluntergangs im Knorpelgewebe, der über die initialen Verletzungsfolgen hinaus die Regenerations- und Funktionsfähigkeit des Gewebes beeinträchtigt (Kühn et al., 2004). Da es sich hierbei, wie auch bei der enzymatischen Matrixdegradation, um einen auf molekularer Ebene regulierten und damit modulierbaren Prozess handelt, bietet sich hier ein interessanter Ansatzpunkt zur Erforschung potenziell chondroprotektiv wirkender Substanzen.

### **1.6 Geschlecht, Estrogene und Osteoarthrose**

Es besteht ein epidemiologischer Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem Risiko für eine OA, wobei Frauen von arthrotischen Veränderungen verschiedener Gelenke generell deutlich häufiger betroffen sind als Männer (Wluka et al., 2000; Oliveria et al., 1995; van Saase et al., 1989).

Im Hinblick auf die Rolle weiblicher Sexualhormone fällt insbesondere die enge Kopplung zwischen den Risikofaktoren Geschlecht und Alter auf. Generell steigt das OA-Risiko mit dem Lebensalter (Garstang et al., 2006; Arden et al., 2006), bei Männern und Frauen jedoch in unterschiedlicher Art und Weise. In mehreren großen Populationsstudien konnte gezeigt werden, dass das Risiko für die Entwicklung einer OA bei beiden Geschlechtern bis etwa zum 50. Lebensjahr vergleichbar hoch ist (Wluka et al., 2000; Oliveria et al., 1995; van Saase et al., 1989), bei jüngeren Frauen in einer Studie sogar niedriger als bei Männern der gleichen Altersgruppe war (Felson et al., 1998). Mit dem Klimakterium kommt es zu einer massiven Zunahme der Inzidenz bei Frauen im Vergleich zur männlichen Bevölkerung, was sich auch in den Daten zur Prävalenz in den jeweiligen Altersgruppen niederschlägt. Gleichzeitig steigen der Schweregrad und das Ausmaß der Generalisierung der Erkrankung im Vergleich zu Männern (Wluka et al., 2000; Oliveria et al., 1995; van Saase et al., 1989).

Die epidemiologische Datenlage legt einen Zusammenhang zwischen dem Absinken der Serumspiegel weiblicher Sexualhormone, speziell der Estrogene, im Klimakterium und der Pathogenese der OA nahe. Dies wird weiter erhärtet durch Studien zum OA-Risiko nach Hysterektomie sowie zu positiven Ergebnissen der Estrogen-Hormonersatztherapie im Klimakterium bezüglich der Prävention von klinischen, insbesondere radiologischen Markern der OA (Wluka et al., 2001; Hanna et al., 2004; Arden et al., 2006). In mehrjährigen Kohortenstudien an prä- und perimenopausalen Frauen konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass das Risiko des Neuauftretens radiologischer OA Kriterien bei den Teilnehmerinnen im niedrigsten Drittel der Serum-E2 Konzentrationen signifikant höher lag als bei denjenigen mit höheren Konzentrationen (Sowers et al., 2006).

Die Studienlage zur Rolle weiblicher Sexualhormone in der Pathogenese der OA ist

## 1. Einleitung

---

keinesfalls einheitlich, legt aber in ihrer Gesamtheit eine protektive Wirkung von Estrogenen auf den Gelenkknorpel (Wluka et al., 2001) sowie generell bezüglich der Inzidenz und Prävalenz der OA nahe (Wluka et al., 2000; Hanna et al., 2004; Roman-Blas et al., 2009; Tanamas et al., 2011).

### 1.7 17 $\beta$ -Estradiol

Eine wichtige Substanz aus der Gruppe der Estrogene, deren Wirkung auf das hyaline Knorpelgewebe im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurde, ist 17 $\beta$ -Estradiol.

#### 1.7.1 Struktur und Synthese

17 $\beta$ -Estradiol ist das potenteste und bei Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter bedeutendste Hormon aus der Gruppe der Estrogene, die neben E2 beim Menschen noch die Substanzen Estron (E1) und Estriol (E3) umfasst. Estrogene gehören zu den Steroidhormonen, die sich vom Sterangerüst des Cholesterins herleiten. Es handelt sich um C-18 Körper, die im Rahmen der Biosynthese von Steroidhormonen aus androgenen C-19 Vorläufern wie Androstendion oder DHEA gebildet werden (Nelson et al., 2001). Schlüsselenzym ist die Aromatase, die bei Frauen prämenopausal hauptsächlich glandulär, d.h. in den Granulosazellen der Ovarien lokalisiert ist (Nelson et al., 2001). Daneben wurde eine Aromatase-Expression in einer Vielzahl von peripheren Zelltypen und Geweben inklusive der für Gelenkstrukturen wesentlichen Osteoblasten und Chondrozyten nachgewiesen (Nelson et al., 2001; Takeuchi et al., 2007; Sasano et al., 1997), wobei Adipozyten und Hautfibroblasten die Hauptrolle zu spielen scheinen (Nelson et al., 2001). Die peripheren Synthesorte spielen mengenmäßig besonders bei Frauen nach dem Klimakterium sowie bei Männern eine Rolle (Nelson et al., 2001).

#### 1.7.2 Funktion

Die Funktion der Estrogene besteht in erster Linie in ihrer Rolle als weibliche Sexualhormone, die maßgeblich an der Ausbildung der primären und sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale sowie an der Zyklusregulation und Schwangerschaft beteiligt sind. Weitere Funktionen bestehen u.a. in der Beteiligung

## 1. Einleitung

---

an der Regulation des Knochenwachstums (Schluß der Epiphysenfugen), des Erhalts der Knochenmasse und der Stoffwechselregulation (Lipoproteinsynthese und Insulinwirkung) bei Frauen und Männern (Nelson et al., 2001).

### 1.7.3 Rezeptoren

Prinzipiell werden genomische von nicht-genomisch vermittelten E2-Effekten unterschieden, wobei eine Reihe von Rezeptoren beteiligt sind. Die genomischen Effekte beruhen auf der Expression E2-regulierter Gene und treten daher Stunden bis Tage nach einer E2-Stimulation auf, während die nicht-genomischen Effekte über schnellere Signalwege innerhalb von Sekunden bis Minuten vermittelt werden (Watson et al., 2007). Die Hauptwirkung von E2 erfolgt auf genomischem Weg über die Interaktion mit den nukleären Estrogenrezeptoren (nER) ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Aufgrund seiner Lipophilie kann das E2-Molekül die Zellmembran ungehindert passieren. Die Bindung an einen nER führt zu Dimerisierung des Rezeptors sowie zur Bindung an Estrogen-responsive Elemente (ERE) der DNA in den Promotorregionen E2-regulierter Gene (Zhang et al., 2006). Dies hat eine Transkriptionsaktivierung und damit Änderung der Genexpression zur Folge. Alternativ können ligandengebundene, aktivierte ER auch direkt mit anderen Transkriptionsfaktoren und Koaktivatoren wie z.B. AP-1 interagieren (Zhang et al., 2006). Neben den nER existieren eine Reihe von membrangebundenen Rezeptoren (mER), die intrazelluläre Signalkaskaden aktivieren und ihre Wirkung über wohlbekannte Proteinkinasen wie Proteinkinase A (PKA), MAP-Kinase (MAPK), Proteinkinase C (PKC) oder Phosphatidylinositol-3-OH-Kinase (PI3K) entfalten (Zhang et al., 2006). Zu diesen Rezeptoren zählen einerseits die bekannten ER $\alpha$  und ER $\beta$ , die auch membranassoziiert vorliegen können, sowie der in jüngerer Zeit beschriebene GPR30 (=7TMER) (Zhang et al., 2006; Watson et al., 2007). Die mER sind sowohl für schnelle, nicht-genomische E2-Effekte verantwortlich als auch für die längerfristige Transkriptionsaktivierung (Zhang et al., 2006). Des Weiteren existiert ein komplexes Cross-signalling zwischen mER- und nER-Signalwegen (Zhang et al., 2006).

### **1.7.4 Estrogenrezeptoren im hyalinen Gelenkknorpel**

Die klassischen Rezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  sind für verschiedene Wirbeltiermodelle (einschließlich Rinder) sowie menschliche Gelenk-Chondrozyten nachgewiesen (Ushiyama et al., 1999; Claasen et al., 2001). Ebenso ist das Vorhandensein von nicht-genomischen Signalwegen in humanen Chondrozyten belegt (Kinney et al., 2005). Es ist also davon auszugehen, dass das volle Spektrum an bekannten Wirkmechanismen (vgl. Zhang et al., 2006) für Effekte von E2 im hyalinen Gelenkknorpel zur Verfügung steht.

### **1.8 Ziele und Fragestellung der Arbeit**

Vor dem skizzierten Hintergrund soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit folgende Fragestellung bearbeitet werden: Hat E2 einen protektiven Effekt gegenüber Schäden der zellulären- und Matrix-Komponenten in einem *In-vitro*-Modell mechanischer Läsion von hyalinem Gelenkknorpelgewebe?

Dazu sollen im Einzelnen folgende Fragen beantwortet werden:

- Hat E2 eine antiapoptotische Wirkung auf die Chondrozyten nach Kompression des Gewebes?
- Führt die Inkubation mit E2 zu einer Reduktion der Matrixdegradation nach Kompression des Gewebes?
- Welchen Einfluss hat die biomechanisch bedeutsame SFZ auf etwaige zu beobachtende Effekte im Rahmen des Modells?
- Werden etwaige Effekte über die klassischen ER  $\alpha$  und  $\beta$  vermittelt?



## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Reagenzien

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
Amphotericin B *	PAA
ApopTag® Peroxidase in situ Detection Kit	Chemicon International
Aqua dest.	Eigene Herstellung
Chondroitin-Sulfat	Sigma
DePex®	Merck
DMEM	Biochrom
DMMB	PAA
17β-Estradiol	Sigma
Ethanol ≥99,8%	Roth
Fulvestrant	Sigma
Glycin	Roth
HBSS	PAA
HCl	Roth
HEPES	Biochrom
ITS Liquid Media Supplement	Sigma
L-Glutamin	PAA
Mayer´s Hämalaunlösung	Merck
MEM Non-essential amino-acid solution	Sigma
Methylbenzoat	Roth
N <sub>2</sub> (flüssig)	Air Liquide
NaCl	Merck
Na <sub>2</sub> EDTA	Merck
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Merck
NaOH	Roth
Na-Pyruvat	PAA
Paraformaldehyd	Merck
Paraplast (Paraffin)	Roth
PBS	PAA
Penicillin G *	PAA

## 2. Material und Methoden

---

Prolin	Sigma
Sterofundin® 1/1	Braun
Streptomycinsulfat *	PAA
Xylol	Roth
* Wirkstoffe des Fertigpräparates Antibiotic / Antimycotic	
	PAA

### 2.1.2 Materialien und Geräte

<b>Produkt</b>	<b>Hersteller</b>
12er Well-Platte	Greiner
96er-Mikrotiterplatte	Sarstedt
Biopsiestanzen 3mm	HEBU Medical
Deckgläser	Menzel-Gläser
Digitale Schieblehre	Digimatic
Eppendorf-Caps	Eppendorf
Infusionssystem Intrafix®	Braun
Inkubator BB 6220	Kendro Laboratory Products
Knochenbiopsiebohrer	H.C. Grosse
Knochenmeißel	Assmann
Mikroskop Axioskop 20	Zeiss
Mikrotom	Jung AG
Mikrotom RM 2165	Leica
Photometer Ultraspec IIE	Biochrom
Pipettenspitzen	Sarstedt
Plastibrand Einmalküvetten	Brand
Rüttler	GFL
Skalpelle	Braun
Ultraschallbad RK100	Bandelin
Vortexer MM1	Sarstedt
Waage	Sartorius
Wasserbad	Memmert

### **2.2 Das *In-vitro*-Modell mechanischer Läsion**

Das in dieser Untersuchung verwendete Modell mechanischer Gewebsschädigung des hyalinen Gelenkknorpels beruht auf der kontrollierten Kompression von Knorpelgewebeexplantaten definierter Geometrie mittels eines softwaregesteuerten Kompressions-Apparates.

#### **2.2.1 Herstellung von Explantaten aus bovinem Gelenkknorpel**

Für die Herstellung der Explantate wurde der hyaline Knorpel des Kniegelenks (*Art. genus*) von am Vortag geschlachteten ca. zweijährigen weiblichen Hausrindern (*Bos taurus*) verwendet. Es wurde darauf geachtet, dass grundsätzlich pro Experiment nur Material eines Kniegelenks verwendet wurde, um eventuelle störende Effekte durch interindividuelle Unterschiede im Gelenkknorpel verschiedener Rinder innerhalb eines Experimentes zu vermeiden. Wo dies aufgrund der benötigten Mengen nicht möglich war, wurden die Explantate den Versuchsgruppen randomisiert zugewiesen. Die gekühlt gelagerten, intakten Kniegelenke wurden von einem Schlachthof bezogen (Vion Food GmbH, Bad Bramstedt). Zunächst wurden die Gelenkflächen des distalen Femurs präpariert. Es wurde ausschließlich der hyaline Gelenkknorpel der *Facies patellaris femoris* verwendet. Für die verschiedenen Versuchsreihen wurden Explantate von 3mm Durchmesser und einer Dicke von ca. 1mm hergestellt. Je nach Fragestellung wiesen die Explantate eine intakte oder beschädigte Superficialzone (SFZ) auf. Herstellungsbedingt kam es bei der Dicke zu Schwankungen von einigen 1/10 Millimetern, die jeweils bei den Ergebnissen der einzelnen Versuchsreihen ausgewiesen sind.

##### **2.2.1.1 Explantate mit beschädigter Superficialzone**

Nach Präparation der Gelenkflächen wurde der Femur am Schaft in eine selbstkonstruierte Halterung eingespannt und auf dem Bohrtisch einer Tischbohrmaschine fixiert. Mit einem ins Bohrfutter eingespannten Knochenbiopsiebohrer (H.C. Grosse GmbH) wurden annähernd parallel zur Gelenkoberfläche der *Facies patellaris femoris* Knorpel-Knochen Zylinder von 10mm Durchmesser und 2-3 cm Länge gebohrt. Zur Kühlung des Bohrers wurde sterile

## 2. Material und Methoden

---

Sterofundin® 1/1-Lösung mit einem Infusionssystem appliziert. Die Bohrzylinder wurden dann mit einem Meißel aus dem distalen Femur herausgelöst. Nach dem Herauslösen der Bohrzylinder wurden sie einzeln in den mit HBSS-Pufferlösung mit Antibiotikazusatz gefüllten Vertiefungen einer 12er Well-Platte aufbewahrt. Als nächstes wurden die Zylinder mit nach oben orientierter Knorpeloberfläche in die Probenaufnahme eines Mikrotoms (Jung AG) eingespannt. Nun wurde zunächst genügend Knorpelgewebe abgetragen, bis eine plane Oberfläche entstand; je nach der ursprünglichen leichten Krümmung der Knorpeloberfläche des individuellen Bohrzylinders führte dies zu einem Abtrag von 60-90 µm, so dass die SFZ beschädigt wurde. Dann wurde eine Scheibe von 1 mm Dicke abgeschnitten, so dass nun Knorpelscheiben von 10 mm Durchmesser und 1 mm Dicke vorlagen. Aus diesen Scheiben wurden mit Hilfe einer Biopsiestanze (HEBU Medical) jeweils 4-5 Gewebsexplantate von 3 mm Durchmesser von Hand ausgestantzt. Die mittels digitaler Schieblehre (Digimatic) überprüfte Dicke der Explantate betrug 1 mm ± 0,1mm.

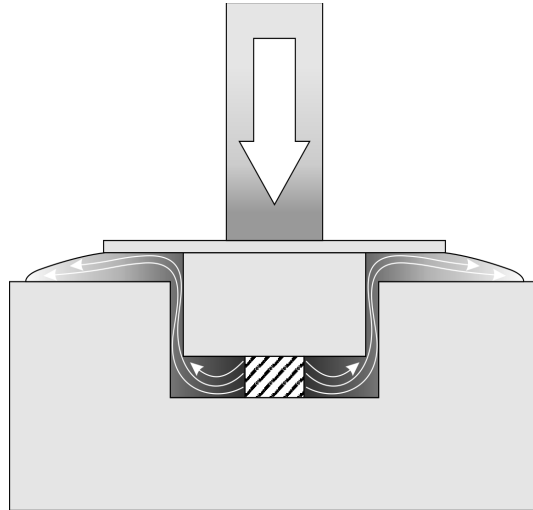
### 2.2.1.2 Explantate mit intakter Superficialzone

Nach Präparation der Gelenkflächen wurden mit einer Biopsiestanze (HEBU Medical) parallel zur Oberfläche der *Facies patellaris femoris* kleine Zylinder von 3mm Durchmesser aus dem Knorpel ausgestantzt. Dann wurden mit einem Skalpell von Hand Knorpelscheiben von ca. 1mm Dicke abgeschnitten, aus denen sich auf leichten Druck die vorher gestantzten Explantate herauslösten. Die Explantate wurden zunächst in HBSS-Pufferlösung mit Antibiotika gespült und danach mit einer digitalen Schieblehre (Digimatic) einzeln vermessen. Bei dieser Herstellungsmethode war es möglich, mit wesentlich weniger Aufwand größere Mengen Explantate zu gewinnen; durch den notwendigen Verzicht auf ein Mikrotom (es existiert kein Knochenzylinder, der eingespannt werden könnte) gab es eine etwas größere Varianz der Dicke, die zwischen 1 mm bis maximal 1,5 mm lag. Die Architektur der Superficialzone wurde nicht beschädigt.

### **2.2.2 Kompression der Explantate**

Bei dem verwendeten Kompressions-Apparat handelt es sich um einen durch einen Elektromotor auf und ab bewegten Stempel, dessen Steuerungseinheit an einen Desktop-Computer angeschlossen ist. Mit diesem Stempel kann Druck auf Explantate ausgeübt werden, die sich in einer flüssigkeitsgefüllten Vertiefung einer mit einem Deckel verschlossenen Kunststoffkammer befinden. Mittels Software wird die in einer bestimmten Zeit durch den Stempel zurückzulegende Strecke vorgegeben, als Nullpunkt wurde das Aufliegen des Stempels auf dem Deckel der Druckkammer eingestellt. Der bei der Kompression ausgeübte Druck wurde durch einen Sensor registriert. Eine detaillierte Beschreibung eines in den für diese Untersuchungen relevanten Teilen baugleichen Apparates findet sich in Frank et al., 2000. (Frank et al., 2000).

In den in dieser Arbeit beschriebenen Versuchen wurde jeweils ein einzelnes Explantat auf dem Boden der mit 500µl HBSS-Pufferlösung gefüllten Mulde der Druckkammer plaziert. Nachdem Dicke und Fläche des Explantats in die Steuerungssoftware eingegeben worden waren, erfolgte eine einmalige axiale Kompression um 50 % der Dicke des Explantats mit einer Vorschubgeschwindigkeit des Stempels von 2 mm/s (vgl. Abb. 4). Bei Erreichen der vorgegebenen Position wurde der Stempel für 10 s angehalten, dann wieder auf die Ausgangsposition zurückgefahren. Das komprimierte Explantat konnte dem Druck durch Deformation zu den Seiten hin frei ausweichen.



**Abb. 4. Schematische Darstellung der verwendeten Druckkammer**

*Darstellung im Querschnitt. Das schraffiert dargestellte Knorpelimplantat befindet sich in Kulturmedium in einem Kunststoffbehälter mit aufgelegtem Deckel (hellgrau). Über computergesteuerte Elektromotoren (nicht dargestellt) kann ein Stempel (breiter Pfeil) Druck auf den Deckel der Druckkammer und damit auf das Implantat ausüben. Vorschub und Geschwindigkeit werden entsprechend der Vorgaben für das Experiment festgelegt (50% der Implantatdicke mit 2mm/s Geschwindigkeit), der Druck wird über einen Sensor gemessen. Während der Kompression kann überflüssiges Kulturmedium lateral entweichen (schmale Pfeile).*

### 2.3 Kultur und Stimulation der Explantate

#### 2.3.1 Kulturmedium für Explantate

##### Kulturmedium für Explantate:

DMEM

10µl/ml HEPES

10µl/ml Na-Pyruvat

10µl/ml Prolin

10µl/ml P/A

10µl/ml MEM Non-essential amino-acid solution

10µl/ml ITS Liquid Media Supplement

20µl/ml L-Glutamin

Da in den geplanten Versuchsreihen die Effekte des Steroidhormons 17β-Estradiol untersucht werden sollten, wurde als Grundmedium für die Kultur der Explantate das oben aufgeführte serumfreie Kulturmedium verwendet, um Kontamination mit endogenen Estrogenen aus dem Serum zu vermeiden. Dieses Grundmedium wurde für die Inkubation in den jeweiligen Auswaschphasen der Versuchsreihen (s.u.) verwendet und für die Herstellung der verschiedenen Stimulationsmedien als Basis benutzt.

#### 2.3.2 Stimulation mit 17β-Estradiol

##### 17β-Estradiol-Lösung:

17β-Estradiol

Ethanol ≥99,8%

Die Stimulation der entsprechenden Versuchsgruppen mit 17β-Estradiol (E2) erfolgte zum in der Versuchsreihe für den Mediumwechsel vorgesehenen Zeitpunkt (s.u.). Für die Herstellung des E2-Stimulationsmediums wurde zunächst das E2 mittels Ultraschallbad und Vortexer in reinem Ethanol gelöst, so dass eine 10<sup>-1</sup> M 17β-Estradiol-Lösung entstand. Nun wurde diese Lösung über eine Verdünnungsreihe

## 2. Material und Methoden

---

bis auf drei Zehnerpotenzen über die im jeweiligen Versuch benötigte Molarität verdünnt. Als nächster Schritt wurde der Ansatz bis zur endgültigen Verdünnungsstufe in zwei Schritten mit Kulturgrundmedium (s.u.) verdünnt, um die Ethanolkonzentration im Versuchsansatz niedrig zu halten. Die endgültige Ethanolkonzentration im Stimulationsmedium betrug 1 µl/ml Medium. Eine entsprechende Menge Ethanol wurde beim Mediumwechsel dem Grundmedium der nicht mit E2 behandelten Versuchsgruppen zugesetzt, um den Ethanolzusatz als Störvariable auszuschließen.

### 2.3.3 Kostimulation mit 17β-Estradiol und Fulvestrant

#### Lösung mit E2 und Fulvestrant:

17β-Estradiol Lösung

Fulvestrant 99,8%

Ethanol ≥99,8%

Fulvestrant (syn. Faslodex, ICI-182,780), 7α-[9-(4,4,5,5,5-pentafluoro-pentylsulphanyl)nonyl]oestra-1,3,5(10)-triene-3,17βdiol, gehört zur Gruppe der steroidal reinen Estrogen-Rezeptor-Antagonisten (SER). Fulvestrant bindet kompetitiv an ER mit einer Affinität von 0,89 im Vergleich zu E2= 1 (Wakeling et al., 1992). Mehrere Mechanismen führen zur Hemmung der Estrogenwirkung in der Zelle. Erstens induziert die Bindung einen gesteigerten Abbau der Rezeptoren, zweitens hemmt sie die Dimerisierung der Fulvestrant-Rezeptorkomplexe als Voraussetzung für die Translokation in den Kern, und drittens führt sie zu einer verringerten Bindung der Rezeptorkomplexe an die Estrogen-responsiblen Elemente (ERE) der DNA und damit zu geringerer Transkriptionsaktivierung (Howell et al., 2000). Für die Stimulation der Explantate mit E2 und Fulvestrant wurde, wie bei der alleinigen 17β-Estradiol-Lösung, zunächst eine 10<sup>-1</sup> M 17β-Estradiol-Lösung in reinem Ethanol angesetzt und diese Lösung über eine Verdünnungsreihe bis auf drei Zehnerpotenzen über die im jeweiligen Versuch benötigte Molarität verdünnt. Parallel dazu wurde eine Verdünnung von Fulvestrant in reinem Ethanol hergestellt. Beide Lösungen wurden nun zusammen in mehreren Schritten mit Kulturgrundmedium-



## 2. Material und Methoden

---

Stammlösung verdünnt, bis ein Stimulationsmedium mit E2 und Fulvestrant (SER-Medium) in den in der Versuchsreihe benötigten Konzentrationen von E2 sowie 5 nM Fulvestrant hergestellt war. Wie bereits beschrieben, wurde den anderen Medien einer Versuchsreihe eine entsprechende Menge Ethanol zugesetzt.

### 2.4 Versuchsdurchführungen

#### 2.4.1 Vorversuche zur Ermittlung wirksamer E2 Konzentrationen

In diesen Versuchen wurden Explantate mit intakter Superfizialzone verwendet. Untersuchungsziel war zu ermitteln, ob sich im verwendeten Modell Effekte von E2 gegenüber mechanisch induzierten zellulären und extrazellulären Schäden feststellen lassen und gegebenenfalls zwischen welcher minimalen und gegebenenfalls maximalen Konzentration Effekte feststellbar sind. Ziel war insbesondere, die am besten wirksamste Konzentration für weitere Versuche mit größeren Stichproben zu ermitteln. Zielparameter waren Apoptoseindex und sGAG-Freisetzung in die Kulturüberstände. Die verwendeten Explantate wurden in einer 96er-Mikrotiterplatte in sechs Versuchsgruppen aufgeteilt und zunächst in einer Auswaschphase für 24 h in 200 µl Grundmedium pro Explantat inkubiert (Heraeus BB 6220, Kendro). Für den E2-Zusatz zum Kulturgrundmedium wurden Konzentrationen von  $10^{-9}$  M,  $10^{-11}$  M,  $10^{-13}$  M und  $10^{-15}$  M gewählt, die Inkubationszeit nach Kompression betrug 96 h. Nach der Auswaschphase wurde ein Mediumwechsel durchgeführt und dabei vier Gruppen (Kompression+E2  $10^{-9}$  M, Kompression+E2  $10^{-11}$  M, Kompression+E2  $10^{-13}$  M, Kompression+E2  $10^{-15}$  M) mit  $17\beta$ -Estradiol (E2) versetztem Medium in den angegebenen Konzentrationen stimuliert, sowie zwei Gruppen (Kompression, Kontrolle) in erneuertem Grundmedium belassen. Nach weiteren 24 h wurden die stimulierten und eine nicht-stimulierte Versuchsgruppe nach dem oben beschriebenen Protokoll komprimiert. 96 Stunden nach der Kompression wurde der Versuch beendet, indem die Explantate jeder Versuchsgruppe in Paraformaldehyd-Lösung fixiert wurden und die Kulturüberstände einzeln eingefroren wurden.

## 2. Material und Methoden

Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6	Tag 7
Herstellung der Explantate	Mediumwechsel Versuchsgruppen	Kompression	Inkubation	Inkubation	Inkubation	Inkubation Versuchsende

### Abb. 5. Zeitlicher Ablauf der Versuchsreihen

*Nach Herstellung der Explantate an Tag 1 wurden diese zunächst 24h im gleichen Kulturmedium inkubiert, bevor sie an Tag 2 in die verschiedenen Versuchsgruppen randomisiert wurden. Dabei erfolgte ein Mediumwechsel mit Zugabe der entsprechenden Stimulationsmedien zu den Versuchsgruppen. 24h später wurden an Tag 3 die dafür vorgesehenen Versuchsgruppen entsprechend dem Protokoll komprimiert. Nach 96h Inkubationszeit wurde an Tag 7 der Versuch durch Fixieren der Explantate und Einfrieren der Kulturüberstände beendet. Der zeitliche Ablauf gilt für alle Versuchsreihen entsprechend.*

### 2.4.2 Versuche mit Explantaten mit beschädigter Superficialzone

Diese Versuchsreihe erweitert die Fragestellung der vorhergehenden Versuchsreihe. Ziel war, anhand einer größeren Stichprobe die Hypothese zu überprüfen, dass 17 $\beta$ -Estradiol (E2) eine protektive Wirkung gegen mechanisch induzierte Schäden auch bei bereits vorgeschädigter Superficialzone ausübt. Zu diesem Zweck wurden wiederum die sGAG-Freisetzung in die Kulturüberstände als Parameter für die Matrixdestruktion sowie der Apoptoseindex als Parameter für zelluläre Schädigung als zu analysierende Variablen gewählt. Es wurden Explantate verwendet, die nach der Methode zur Herstellung von Gewebeexplantaten mit beschädigter Superficialzone hergestellt worden waren. Für den E2-Zusatz zum Kulturgrundmedium wurde eine Konzentration von  $10^{-11}$  M, als Inkubationszeit nach Kompression eine Zeitspanne von 96h gewählt. Die Herstellung des Stimulationsmediums erfolgte wie vorstehend beschrieben. Die verwendeten Explantate wurden in einer 96er-Mikrotiterplatte in vier Versuchsgruppen aufgeteilt und zunächst in einer Auswaschphase für 24 h in 200  $\mu$ l Grundmedium pro Explantat inkubiert. Als Inkubator diente das Modell Heraeus BB 6220 der Firma Kendro Laboratory Products mit einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Atmosphäre von 5%. Nach der 24h-Auswaschphase wurde das Medium erneuert und zwei Gruppen (Kompression+E2  $10^{-11}$  M, E2  $10^{-11}$  M) mit 17 $\beta$ -Estradiol (E2) versetztem Medium stimuliert sowie zwei Gruppen (Kompression, Kontrolle) in erneuertem Grundmedium belassen. Nach weiteren 24h wurde jeweils eine

## 2. Material und Methoden

---

stimulierte und eine nicht-stimulierte Versuchsgruppe (Kompression, Kompression+E2  $10^{-11}$  M) nach dem beschriebenen Protokoll komprimiert. 96h Stunden nach Kompression wurde der Versuch beendet, indem die Explantate jeder Versuchsgruppe in Paraformaldehyd-Lösung fixiert wurden und die Kulturüberstände einzeln eingefroren wurden.

### 2.4.3 Versuche mit Explantaten mit intakter Superficialzone

In dieser Versuchsreihe wurden Explantate verwendet, die nach der oben beschriebenen Methode zur Herstellung von Explantaten mit intakter Superficialzone gewonnen worden waren. Aufgrund der vereinfachten Herstellungsmethode war es möglich, mehr Explantate pro individuellem Kniegelenk zu gewinnen, wodurch sich insbesondere die Forderung, wegen der interindividuellen Unterschiede möglichst nur Explantate eines Kniegelenks zu verwenden, einfacher erfüllen ließ. Des Weiteren konnten nun die in den Vorversuchen zur Dosis-Wirkungs-Beziehung gefundenen Effekte an Explantaten mit intakter SFZ anhand einer wesentlich größeren Stichprobe überprüft und zu den Ergebnissen aus den Versuchen mit Explantaten mit beschädigter SFZ in Beziehung gesetzt werden. Die verwendeten Explantate wurden in einer 96er-Mikrotiterplatte in vier Versuchsgruppen aufgeteilt und zunächst in einer Auswaschphase für 24h in 200µl Grundmedium pro Explantat inkubiert. Als Inkubator diente das Modell Heraeus BB 6220 der Firma Kendro Laboratory Products mit einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Atmosphäre von 5%. Nach der 24 h-Auswaschphase wurde das Medium erneuert; zwei Gruppen (Kompression+E2  $10^{-11}$  M, E2  $10^{-11}$  M) wurden mit einem mit 17β-Estradiol versetzten Medium stimuliert sowie zwei Gruppen (Kompression, Kontrolle) in erneuertem Grundmedium belassen. Nach weiteren 24h wurde jeweils eine stimulierte und eine nicht-stimulierte Versuchsgruppe (Kompression, Kompression+E2  $10^{-11}$  M) nach dem beschriebenen Protokoll komprimiert. 96h Stunden nach Kompression wurde der Versuch beendet, indem die Explantate jeder Versuchsgruppe in Paraformaldehyd-Lösung fixiert wurden und die Kulturüberstände einzeln eingefroren wurden.

### **2.4.4 Versuche zum Wirkmechanismus mit dem steroidalen Estrogen-Rezeptor-Inhibitor Fulvestrant**

Durch Einsatz des selektiven steroidalen Estrogen-Rezeptor-Inhibitors Fulvestrant wurde die Hypothese überprüft, dass es sich bei den zu beobachtenden Effekten um ein Estrogenrezeptor-vermitteltes Geschehen handelt.

#### **2.4.4.1 Vorversuch zur Prüfung der Toxizität**

Ein Vorversuch mit einer mit Fulvestrant stimulierten Versuchsgruppe und einer Kontrollgruppe diente zum Ausschluss unerwünschter Effekte der verwendeten Fulvestrant-Lösung bezüglich der zu messenden Parameter 'Anteil apoptotischer Zellen' und 'sGAG-Freisetzung'. Die Explantate mit intakter SFZ wurden nach eintägiger Auswaschphase zufällig auf die Gruppen verteilt und nach einem Mediumwechsel für 96 Stunden mit 5 nM Fulvestrant-Lösung bzw. Grundmedium inkubiert. Anschliessend wurde der Versuch beendet, indem die Explantate jeder Versuchsgruppe in Paraformaldehyd-Lösung fixiert wurden und die Kulturüberstände einzeln eingefroren wurden.

#### **2.4.4.2 Versuche mit Ko-Stimulation mit 17 $\beta$ -Estradiol und Fulvestrant**

Für den E2-Zusatz zum Kulturgrundmedium wurde wie in der vorangegangenen Versuchsreihe eine Konzentration von  $10^{-11}$  M, als Inkubationszeit nach Kompression eine Zeitspanne von 96h gewählt. Die Herstellung des E2-Stimulationsmediums sowie des Inhibitor-Mediums erfolgte wie vorbeschrieben. Die verwendeten Explantate wurden in einer 96er-Mikrotiterplatte in fünf Versuchsgruppen aufgeteilt, (*Abb.*) und zunächst in einer Auswaschphase für 24h in 200 $\mu$ l Grundmedium pro Explantat inkubiert. Als Inkubator diente das Modell Heraeus BB 6220 der Firma Kendro Laboratory Products mit einer Temperatur von 37 °C und einem CO<sub>2</sub>-Gehalt der Atmosphäre von 5 %. Nach der 24 h Auswaschphase wurde das Medium erneuert und zwei Gruppen (Kompression+E2  $10^{-11}$  M, E2  $10^{-11}$  M) mit einem mit E2 versetzten Medium stimuliert, eine Gruppe mit SER-Medium (Kompression+E2  $10^{-11}$  M+ Fulvestrant 5 nM) behandelt, sowie zwei Gruppen (Kompression, Kontrolle) in erneuertem Grundmedium belassen.

## 2. Material und Methoden

---

Nach weiteren 24 h wurden jeweils eine mit E2-Medium stimulierte (Kompression+E2  $10^{-11}$  M), die mit SER-Medium stimulierte (Kompression+E2  $10^{-11}$  M+Fulvestrant 5 nM) sowie eine nicht-stimulierte Versuchsgruppe (Kompression) nach dem beschriebenen Protokoll komprimiert. 96 h Stunden nach Kompression wurde der Versuch beendet, indem die Explantate jeder Versuchsgruppe in Paraformaldehyd-Lösung fixiert wurden und die Kulturüberstände einzeln eingefroren wurden.

### 2.5 Fixieren, Einbetten und Färben der Explantate

#### 2.5.1 Fixieren der Explantate mit Paraformaldehyd-Lösung

Paraformaldehyd-Lösung:

0,01 M	PBS (Phosphate buffered saline)
4%	Paraformaldehyd
0,001 M	NaOH

Bei Versuchsende wurden die Explantate versuchsgruppenweise in jeweils einer Einbettkassette zusammengefasst und in einer frisch hergestellten 4%-Paraformaldehyd-Lösung fixiert.

#### 2.5.2 Einbetten der Explantate in Paraffin

Für die Paraffineinbettung wurden die Explantate zunächst fließend gewässert und danach mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %) entwässert. Dann wurden die Explantate 3x für 2-6 h mit Methylbenzoat behandelt, danach 3x bei 65 °C mit Paraplast behandelt (2-5 h, 12 h, 2-5 h) und schließlich in Blöcke gegossen und durch Abkühlen zum Erstarren gebracht.

#### 2.5.3 Färben von Paraffinschnitten mit Mayer's Hämalaunlösung

Für die lichtmikroskopische Untersuchung der Explantate wurden von den Blöcken mittels eines Mikrotoms (Leica RM 2165) Gewebeschnitte mit einer Dicke von 7 µm angefertigt und mit Mayer's Hämalaunlösung (Htx) gefärbt.

Um sie für die Färbung vorzubereiten, wurden die Gewebeschnitte zunächst für 3-5

## 2. Material und Methoden

---

min. in Xylol entparaffiniert und dann für jeweils 5 min. mit einer absteigenden Alkoholreihe (100 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, 50 %) sowie schließlich Aqua dest. gespült. Dann wurden die Schnitte für 7 min. mit Mayer's Hämalaunlösung behandelt und danach wiederum mit Aqua dest. gespült. Im Anschluss wurden die Schnitte für 1,5 min. mit 0,02 % HCl-Lösung behandelt, mit Aqua dest. gespült, sowie 10 min. in lauwarmem Leitungswasser gewässert. Zum Abschluss wurden die Gewebeschnitte jeweils 5 min. mit einer aufsteigenden Alkoholreihe (50 %, 70 %, 80 %, 90 %, 96 %, 100 %) sowie 3-5 min. mit Xylol behandelt und danach mit DePex<sup>®</sup> eingedeckelt.

### 2.5.4 Färben von Paraffinschnitten mittels TUNEL-Assay-Kit

Der TUNEL-Assay (Terminal deoxynucleotide transferase mediated UTP nick end labeling) ist eine enzymhistochemische Färbemethode, bei der die für den apoptotischen Zelluntergang typischen DNA-Strangbrüche lichtmikroskopisch dargestellt werden (Gavrieli et al., 1992). Dabei werden zunächst die im Zuge der DNA-Fragmentierung zahlreich entstehenden freien 3'-OH-Termini der DNA enzymatisch mittels TdT (terminal deoxynucleotide transferase) mit Digoxigenin-konjugierten Nukleotidtriphosphaten markiert. Diese bilden Oligomere, die von einem Anti-Digoxigenin-Antikörper gebunden werden, der mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt ist. Nach Zufügen eines Farbsubstrats kommt es durch enzymatische Umsetzung zu einer braunen Färbung der markierten Zellkerne. Hierbei färben sich jedoch neben apoptotischen Zellkernen in gewissem Umfang auch nekrotische Zellen (Grasl-Kraupp et al., 1995; Charriaut-Marlangue et al., 1995). Dies bedeutet, dass die Methode obschon als Apoptosenachweis konzipiert (Gavrieli et al., 1992), nicht als vollständig spezifisch anzusehen ist (bez. der Konsequenzen für die Interpretation der erhobenen Daten vgl. Abschnitt 4.1.2 der Diskussion). Intakte Kerne werden durch eine Gegenfärbung mit Methyl-Grün dargestellt. Für die Färbungen wurde das kommerziell erhältliche ApopTag<sup>®</sup> Peroxidase in situ Detection Kit der Firma Chemicon International verwendet. Die Färbung erfolgte mit den im Kit vorbereiteten Substraten nach Herstellerangaben.

### **2.6 Lichtmikroskopische Ermittlung des Apoptoseindex in den gefärbten Schnittpräparaten**

#### **2.6.1 Untersuchung der mit Mayer´s Hämalaun-gefärbten Präparate**

Die sich in Apoptose befindlichen Zellen wurden lichtmikroskopisch am mit Mayer´s Hämalaun (Htx) gefärbten Präparat anhand spezifischer zellmorphologischer Kriterien ermittelt. Zellen, die sich im Prozess des apoptotischen Zelluntergangs befinden, können verschiedene morphologische Charakteristika als Ausdruck der Veränderungen des Zellkerns aufweisen (Earnshaw, 1995; Dini et al., 1996). Für die Untersuchungen in der vorliegenden Arbeit wurde das Vorhandensein typischer Ausstülpungen des Zellkerns („Nuclear blebbing“) als sicheres histomorphologisches Apoptosemerkmal genutzt. Bei der lichtmikroskopischen Beurteilung der Gewebeschnitte (Axioskop 20, Zeiss) wurde die Anzahl der apoptotischen Zellen in drei zentralen Gesichtsfeldern pro Gewebeschnitt bei 400facher Vergrößerung gezählt (vgl. Abb. 6). Um die ermittelten Daten zu normieren und damit Schwankungen der Zelldichte zwischen einzelnen Explantaten eines Versuches sowie zwischen unabhängigen Wiederholungen des Versuches zu berücksichtigen, wurde ein Apoptoseindex gebildet, indem die Anzahl der apoptotischen Zellen prozentual auf die Gesamtzahl der Zellen in den untersuchten Gesichtsfeldern bezogen wurde. Da es aufgrund des „Confirmation-Bias“ bei einer offenen histologischen Beurteilung nahezu unvermeidlich zu Verzerrungen des Ergebnisses kommen würde, wurde die Zuordnung der Gewebeschnitte zu den einzelnen Versuchsgruppen gegenüber dem Untersucher vorab verblindet.

### 2.6.2 Untersuchung der mittels TUNEL-Assay gefärbten Präparate

Die Auswertung der TUNEL-gefärbten Gewebeschnitte erfolgte quantitativ nach derselben Vorgehensweise wie bei der Beurteilung der Htx-gefärbten Präparate. Die Anzahl TUNEL-positiver Chondrozyten wurde lichtmikroskopisch bei 400facher Vergrößerung in drei zentralen Gesichtsfeldern pro Schnitt ermittelt. Zur Normierung wurde die ermittelte Zellzahl ebenfalls auf die Gesamtzellzahl in den beurteilten Gesichtsfeldern bezogen. Auch hier erfolgte im Vorfeld der histologischen Untersuchung eine Verblindung bezüglich der Behandlung der verschiedenen Versuchsgruppen.

### 2.7 Bestimmung der Konzentration von sulfatierten Glykosaminoglykanen in den Kulturüberständen

DMMB-Lösung (Dimethylmethylenblau):

0,04 M      DMMB (*in Aqua dest.*)

0,2 M      Ethanol

0,04 M      NaCl

0,04 M      Glycin

0,1 M      HCl

(pH 3)

PBE-Lösung (Phosphate buffered saline with EDTA):

0,1 M      Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (*in Aqua dest.*)

0,01 M      Na<sub>2</sub>EDTA

(pH 6,5)

Als messbarer Parameter für die Untersuchung der Gewebsdestruktion wurde die Freisetzung von sulfatierten Glykosaminoglykanen (sGAGs) aus der extrazellulären Matrix der Explantate in die Kulturüberstände bestimmt. Dazu wurde der modifizierte Dimethylmethylenblau-Assay verwendet, der eine hohe Spezifität für sGAGs aufweist. 1,9-DMMB bildet einen optisch aktiven Komplex mit sulfatierten GAGs,



## 2. Material und Methoden

---

dessen Extinktion bei einer Wellenlänge von 525nm photometrisch bestimmt werden kann, um die höchste Spezifität für sGAGs zu erhalten (Farndale et al., 1986).

Das Prinzip des photometrischen Messverfahrens beruht auf dem Lambert-Beer'schen Gesetz:  $E = c \cdot d \cdot \epsilon_{\lambda}$ , wobei c: Konzentration des zu messenden Stoffes; d: Schichtdicke der durchstrahlten Küvette;  $\epsilon_{\lambda}$ : stoffspezifischer Extinktionskoeffizient bei Wellenlänge  $\lambda$ . Für die Bestimmung der sGAG-Freisetzung wurden die bei Beendigung der Versuche eingefrorenen Kulturüberstände aufgetaut und jeweils 10  $\mu$ l Überstand mit 90  $\mu$ l PBE-Pufferlösung verdünnt. Davon wurden 80  $\mu$ l mit 800  $\mu$ l DMMB-Lösung in eine Einmalküvette (Plastibrand, Brand GmbH) gegeben und die Extinktion bei einer Wellenlänge von 525 nm unmittelbar nach dem Vermischen photometrisch gemessen (Ultraspec IIE, Biochrom). Um absolute Werte der sGAG-Konzentration im Kulturüberstand zu erhalten, wurde durch Messen einer Verdünnungsreihe von Chondroitin-Sulfat eine Standardkurve der Extinktion konstruiert. Aus dem linearen Teil der Kurve konnten die Werte der GAG-Freisetzung in  $\mu$ g abgelesen werden. Diese Werte wurden sodann auf die Volumina der Explantate bezogen ( $\mu$ g/mm<sup>3</sup>), um Schwankungen der Dicke, und damit der Matrixmasse, der individuellen Explantate innerhalb des Toleranzbereiches der jeweiligen Experimente zu berücksichtigen.

### 2.8 Statistische Auswertung der erhobenen Daten

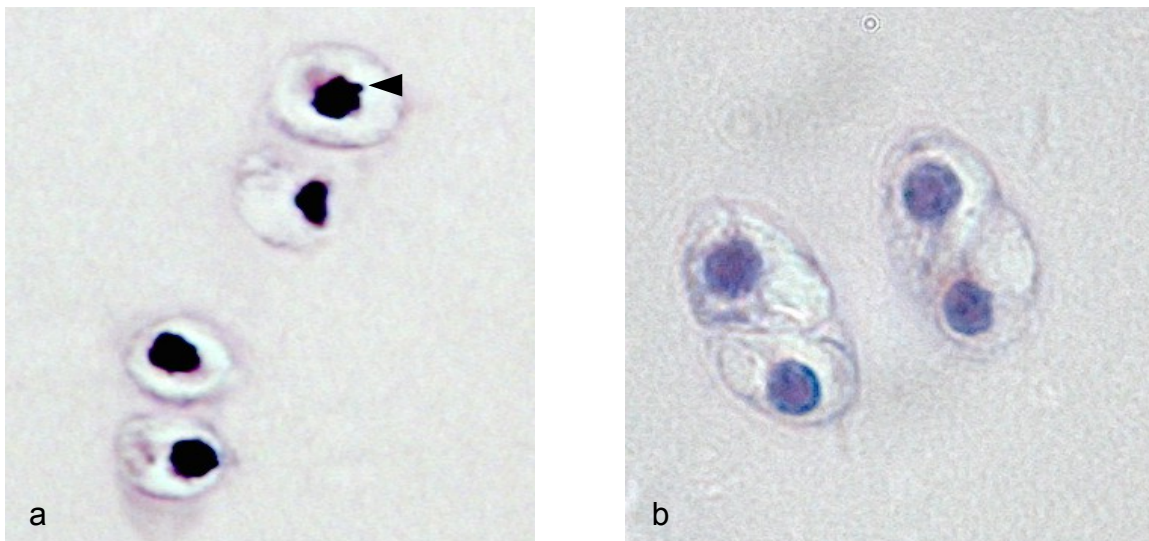
Für die statistische Analyse der erhobenen Daten wurde das Computerprogramm SPSS 17.0 (IBM) verwendet. Die in den verschiedenen Versuchsreihen gewonnenen Daten wurden zunächst in Form eines Box-Whisker-Plots nach Tukey graphisch aufbereitet, um Ausreißer zu identifizieren. Dabei wurden wie üblich definitionsgemäß diejenigen Fälle als Ausreißer gewertet, deren Werte jenseits des dreifachen Interquartilabstands (IQR) der betrachteten Verteilung lagen. So identifizierte Ausreißer wurden von der weiteren statistischen Analyse ausgeschlossen, da nachfolgend Verfahren angewendet wurden, die auf der Berechnung des arithmetischen Mittels beruhen und daher anfällig für Verzerrung durch Extremwerte sind. Ob und in welchem Umfang Ausreißer ausgeschlossen wurden, ist im Einzelnen bei den jeweiligen Ergebnissen der unterschiedlichen Versuche

## 2. Material und Methoden

---

angegeben. Anschließend wurden die Daten mittels deskriptiver und Inferenzstatistik ausgewertet. Als Maß der zentralen Tendenz wurde das arithmetische Mittel mit Standardfehler, als Streuungsmaße Minimum und Maximum sowie die Standardabweichung berechnet. Um festgestellte Differenzen hinsichtlich ihrer statistischen Signifikanz zu bewerten, wurde bei Vergleichen zwischen mehr als zwei Stichproben eine einfaktorische Varianzanalyse (ANOVA) mit Student-Newman-Keuls post-hoc-Test durchgeführt. Im Falle einer ungleichen Anzahl von Fällen in den zu vergleichenden Stichproben wurde das harmonische Mittel verwendet.

Bei Vergleichen zwischen zwei Stichproben wurde ein zweiseitiger T-Test berechnet. Statistische Signifikanz wurde bei allen Berechnungen bei Werten von  $p < 0,05$  angenommen. Werte von  $p < 0,001$  wurden als hochsignifikant angesehen.



**Abb. 6. Beispielfotos Htx gefärbter Schnitte hyaliner Knorpelpräparate**

*In a zeigen sich in allen abgebildeten Zellen verdichtete Kernstrukturen als Zeichen einer Kondensation des Chromatins, sowie in unterschiedlichem Ausmaß Kernausstülpungen („Nuclear blebbing“) als typisches Apoptosemerkmal. Der Pfeil markiert ein besonders deutliches Beispiel. In b sind zum Vergleich normale Chondrozyten mit lichtmikroskopisch intakter Kernstruktur abgebildet.*

### **3. Ergebnisse**

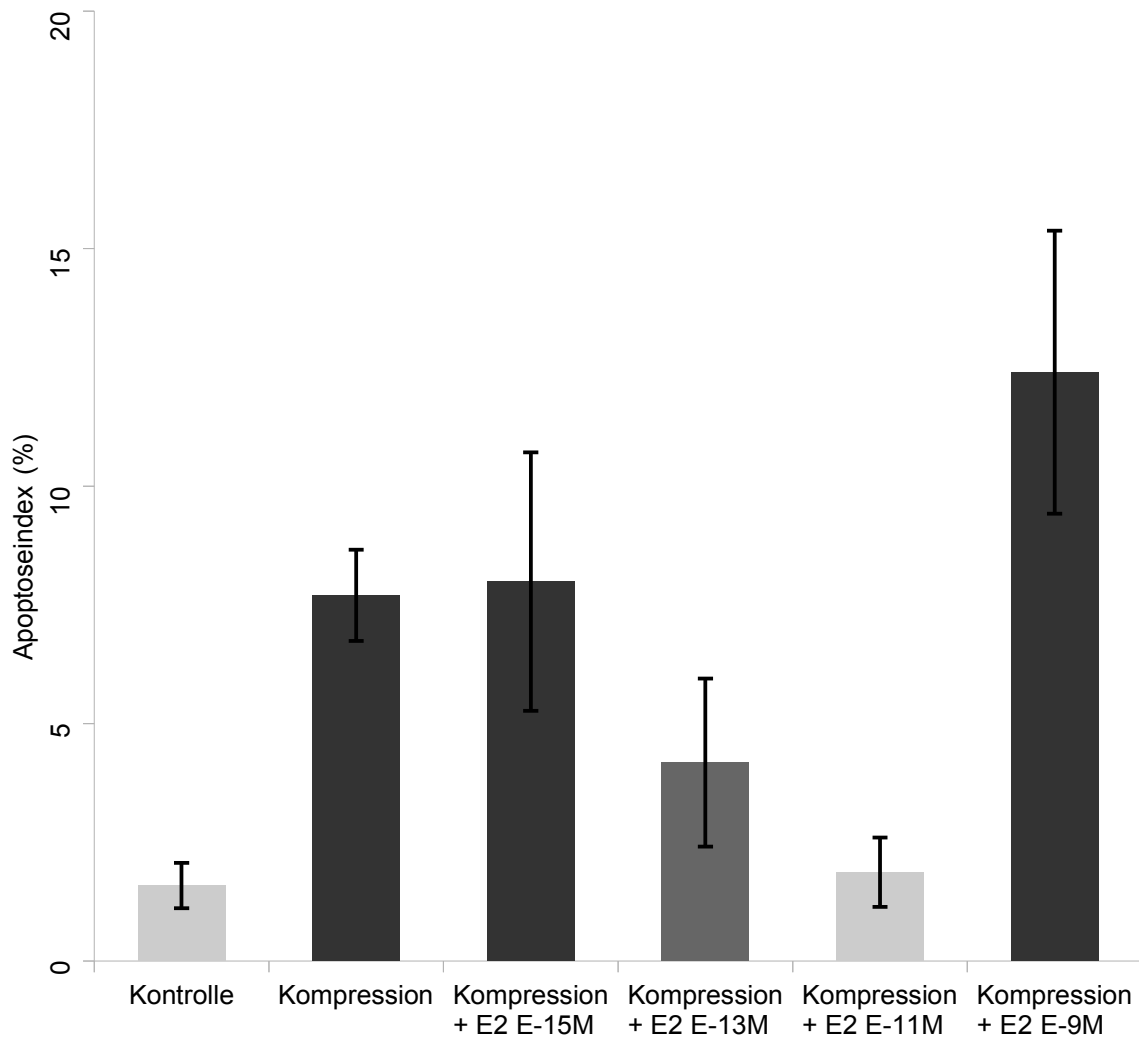
#### **3.1 Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf mechanisch induzierte Apoptose von Chondrozyten in Gelenkknorpelimplantaten**

##### **3.1.1 Vorversuche zur Ermittlung wirksamer Konzentrationen und Dosis-Wirkungs-Beziehungen von E2**

Es wurden insgesamt  $N = 58$  Explantate mit intakter Superficialzone aus 3 unabhängigen Experimenten untersucht, nachdem vorher 1 Fall mittels Tukey's Box-Whisker-Plot als Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen worden war. Die Dicke der Explantate betrug im arithmetischen Mittel 1,33 mm (Min: 1,00 mm; Max: 1,50 mm) mit einer Standardabweichung von 0,14 mm. Die bei der Kompression gemessenen Spitzendrücke betragen im arithmetischen Mittel 11,90 MPa (Min: 3,72 MPa; Max: 21,72 MPa) mit einer Standardabweichung von 4,43 MPa.

In der Auswertung mittels einfaktorieller ANOVA können die sechs Versuchsgruppen in drei sich statistisch signifikant unterscheidende Cluster aufgeteilt werden ( $p < 0,001$ ). Der erste Cluster wird von den beiden Gruppen mit den niedrigsten Apoptoseindices gebildet (Kontrolle und Kompression + E2  $10^{-11}$  M), der zweite von der vor der Kompression mit  $10^{-13}$  M E2 stimulierten Gruppe (Kompression + E2  $10^{-13}$  M) mit einem mittleren Apoptoseindex und der dritte Cluster von den drei Versuchsgruppen mit den höchsten Apoptoseindices in diesem Experiment (Kompression, Kompression + E2  $10^{-9}$  M, Kompression + E2  $10^{-15}$  M). Zusammengefasst zeigt sich eine U-förmige Relation der E2-Konzentration zu ihrer Wirksamkeit, wobei die Stimulation mit  $10^{-11}$  M E2 den Apoptoseindex auf das Niveau der Kontrollen senkt, während weder die höheren noch die niedrigeren E2-Konzentrationen einen signifikanten antiapoptotischen Effekt aufweisen.

### 3. Ergebnisse



#### Abb. 7. Dosisfindung: Apoptoseindex

Auswertung der histomorphologischen Analyse von Knorpelimplantaten an Htx-gefärbten Paraffinschnitten 96 Stunden nach Kompression. Anteil apoptotischer Zellen in %. Mittelwerte + Standardfehler (N = 58; aus 3 unabhängigen Experimenten). 3 in der ANOVA signifikant unterschiedliche Cluster in verschiedenen Graustufen dargestellt ( $p < 0,001$ ).

**Kontrolle** (n = 12): Mittelwert + Standardabweichung =  $1,59 \pm 1,65$ ;  
Standardfehler = 0,48; Minimum: 0,00; Maximum: 5,00.

**Kompression** (n = 12): Mittelwert + Standardabweichung =  $7,70 \pm 3,31$ ;  
Standardfehler = 0,96; Minimum: 4,00; Maximum: 14,58.

**Kompression + E2  $10^{-15}$  M** (n = 4): Mittelwert + Standardabweichung =  $7,99 \pm 5,44$ ;  
Standardfehler = 2,72; Minimum: 0,00; Maximum: 11,54.

**Kompression + E2  $10^{-13}$  M** (n = 8): Mittelwert + Standardabweichung =  $4,18 \pm 5,00$ ;  
Standardfehler = 1,77; Minimum: 0,00; Maximum: 12,00.

**Kompression + E2  $10^{-11}$  M** (n = 11): Mittelwert + Standardabweichung =  $1,87 \pm 2,42$ ;  
Standardfehler = 0,73; Minimum: 0,00; Maximum: 6,67.

**Kompression + E2  $10^{-9}$  M** (n = 11): Mittelwert + Standardabweichung =  $12,4 \pm 9,88$  ;  
Standardfehler = 2,98; Minimum: 0,00; Maximum: 31,03.

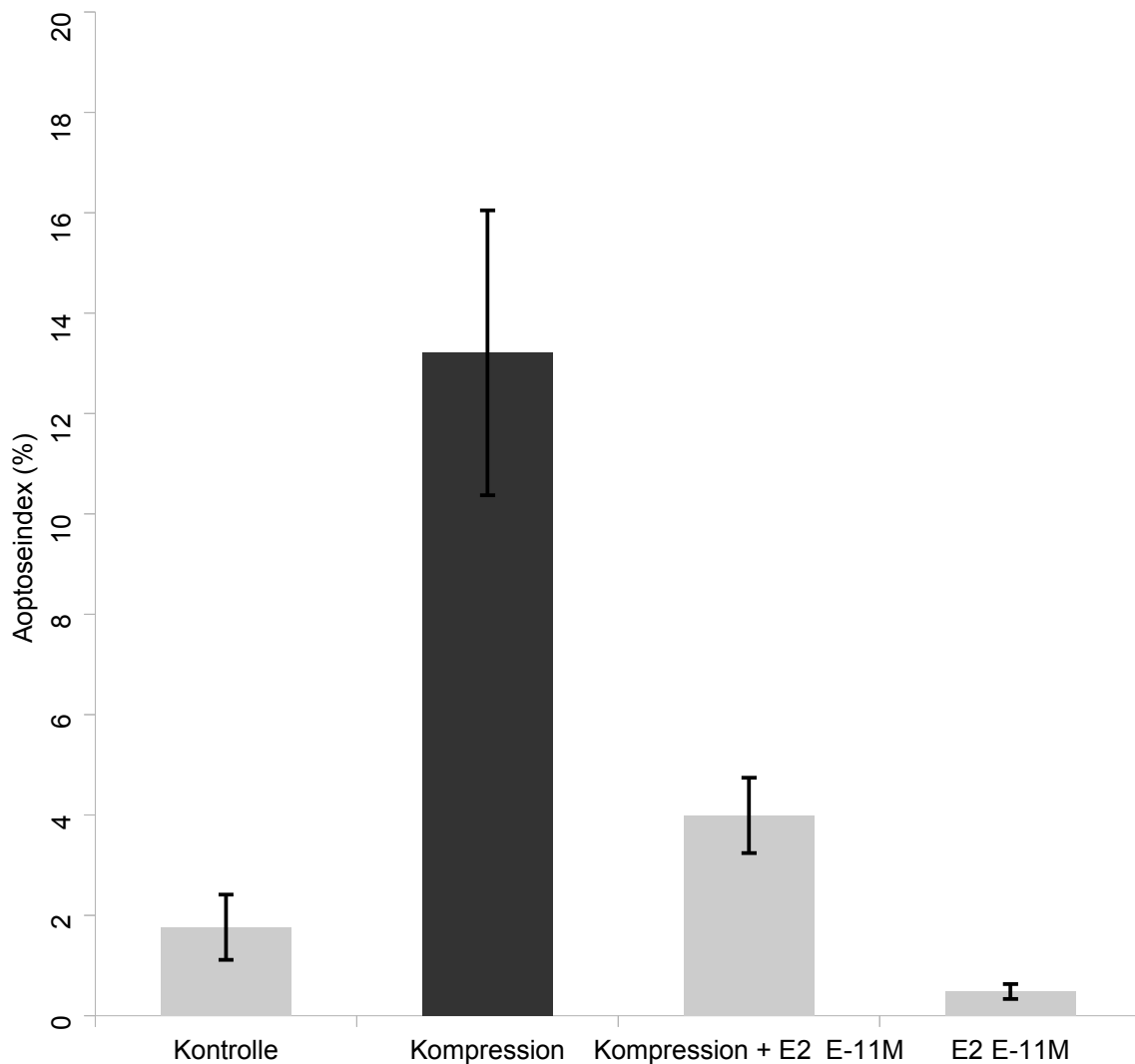
#### **3.1.2 Einfluss von E2 auf mechanisch induzierte Apoptose in Explantaten mit beschädigter SFZ**

Für die Untersuchungen an Explantaten mit beschädigter SFZ wurden insgesamt N = 114 Explantate aus fünf unabhängigen Experimenten untersucht. Die Dicke der Explantate betrug im arithmetischen Mittel 1,02 mm (Min: 0,86 mm; Max: 1,10 mm) mit einer Standardabweichung von 0,06 mm. Die bei der Kompression gemessenen Drücke betragen im arithmetischen Mittel 17,95 MPa (Min: 5,30 MPa; Max: 31,38 MPa) mit einer Standardabweichung von 7,22 MPa.

In der statistischen Auswertung zeigte sich wie in der vorangehenden Versuchsreihe eine statistisch hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) Erhöhung des Apoptoseindex in der ausschließlich komprimierten Versuchsgruppe ohne vorangehende Stimulation mit E2 (Kompression), gegenüber allen anderen Gruppen. Weitere statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen konnten nicht festgestellt werden. Zusammengefasst senkt die Stimulation mit E2 in der Konzentration  $10^{-11}$  M den Anteil durch Kompression induzierter apoptotischer Zellen bei Explantaten mit vorgeschädigter Superficialzone um ca. 70 % im Vergleich zu ausschließlich komprimierten Explantaten und damit auf das Niveau der nicht-komprimierten Kontrollen.

### 3. Ergebnisse

---



#### Abb. 8. Explantate mit beschädigter SFZ: Apoptoseindex

Auswertung der histomorphologischen Analyse von Knorpel-explantaten an Htx-gefärbten Paraffinschnitten 96 Stunden nach Kompression. Anteil apoptotischer Zellen in %. Mittelwerte + Standardfehler (N = 114; aus 5 unabhängigen Experimenten). 2 in der ANOVA signifikant unterschiedliche Cluster in verschiedenen Graustufen dargestellt ( $p < 0,001$ ).

**Kontrolle** (n = 28): Mittelwert + Standardabweichung =  $1,76 \pm 3,43$ ; Standardfehler = 0,65; Minimum: 0,00; Maximum: 15,38

**Kompression** (n = 28): Mittelwert + Standardabweichung =  $13,21 \pm 15,03$ ; Standardfehler = 2,84; Minimum: 0,00; Maximum: 62,50

**Kompression + E2  $10^{-11}$  M** (n = 29): Mittelwert + Standardabweichung =  $3,99 \pm 4,04$ ; Standardfehler = 0,75; Minimum: 0,00; Maximum: 11,21

**E2  $10^{-11}$  M** (n = 29): Mittelwert + Standardabweichung =  $0,48 \pm 0,81$ ; Standardfehler = 0,15; Minimum: 0,00; Maximum: 2,27

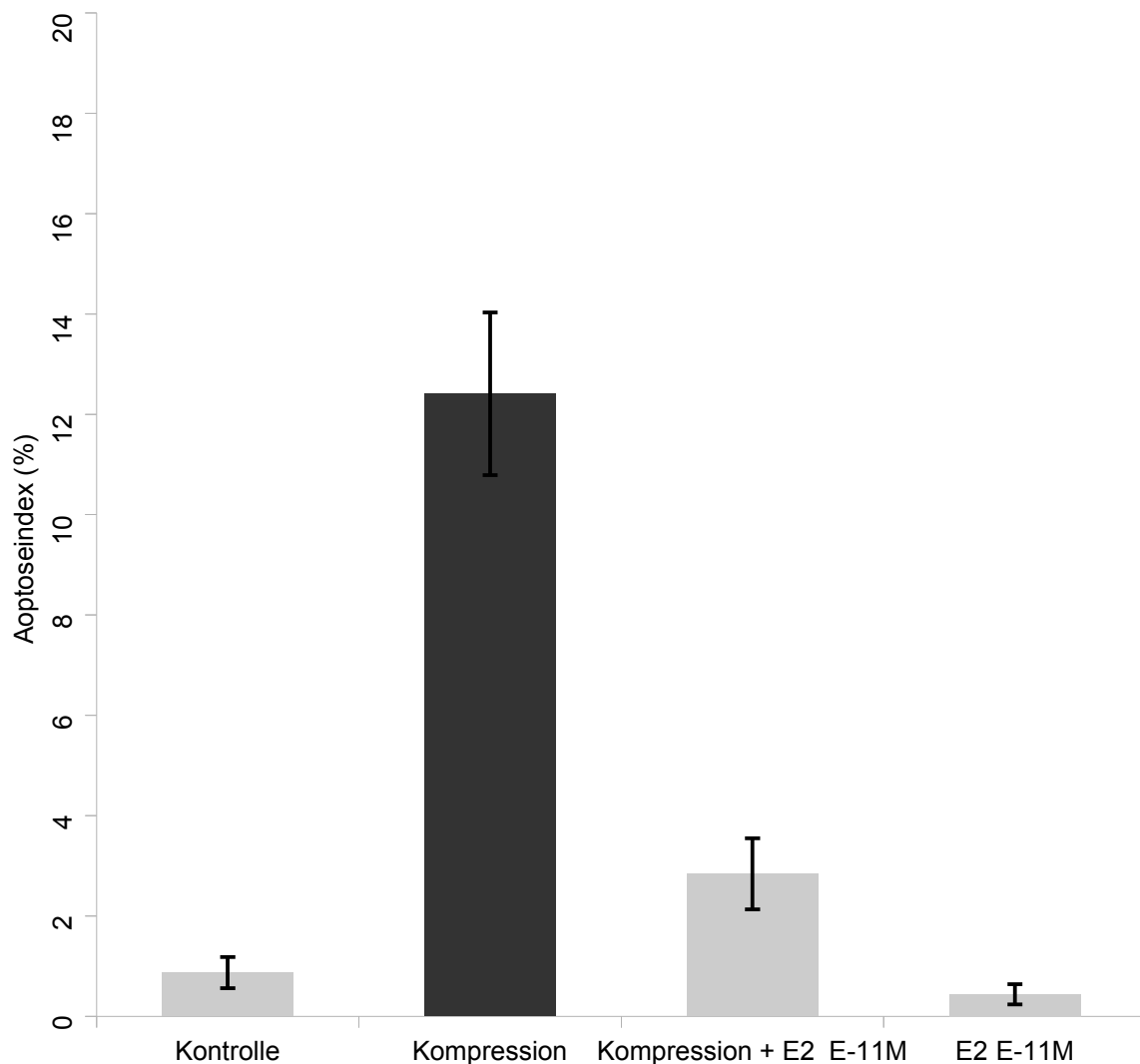
#### **3.1.3 Einfluss von E2 auf mechanisch induzierte Apoptose in Explantaten mit intakter SFZ**

In dieser Versuchsreihe wurden insgesamt N = 85 Explantate mit intakter SFZ aus fünf unabhängigen Experimenten untersucht. Zuvor waren im Zuge der statistischen Analyse der Daten 2 Fälle mittels Tukey's Box-Whisker-Plot als Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen worden. Die Dicke der Explantate betrug im arithmetischen Mittel 1,28 mm (Min: 1,00 mm; Max: 1,50 mm) mit einer Standardabweichung von 0,15 mm. Die bei der Kompression gemessenen Drücke betragen im arithmetischen Mittel 15,56 MPa (Min: 3,72 MPa; Max: 27,17 MPa) mit einer Standardabweichung von 6,56 MPa.

In der Auswertung mittels ANOVA mit Student-Newman-Keuls post-hoc-Test zeigte sich eine statistisch hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) Erhöhung des Apoptoseindex in der nicht-stimulierten, komprimierten Versuchsgruppe (Kompression) gegenüber allen anderen Gruppen. Die weiteren Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht statistisch signifikant. Bei der Untersuchung von unbeschädigtem Knorpelgewebe mit intakter SFZ senkt also die Stimulation mit E2 in der Konzentration  $10^{-11}$  M die durch Kompression induzierte Erhöhung des Apoptoseindex um ca. 77 % auf das Niveau der nicht-komprimierten Kontrollen.

### 3. Ergebnisse

---



#### **Abb. 9. Explantate mit intakter SFZ: Apoptoseindex**

Auswertung der histomorphologischen Analyse von Knorpelimplantaten an Htx-gefärbten Paraffinschnitten 96 Stunden nach Kompression. Anteil apoptotischer Zellen in %. Mittelwerte + Standardfehler (N = 85; aus 5 unabhängigen Experimenten). 2 in der ANOVA signifikant unterschiedliche Cluster in verschiedenen Graustufen dargestellt ( $p < 0,001$ ).

**Kontrolle** (n = 22): Mittelwert + Standardabweichung =  $0,87 \pm 1,45$ ; Standardfehler = 0,31; Minimum: 0,00; Maximum: 5,00

**Kompression** (n = 22): Mittelwert + Standardabweichung =  $12,41 \pm 7,59$ ; Standardfehler = 1,62; Minimum: 4,00; Maximum: 31,11

**Kompression + E2  $10^{-11}$  M** (n = 21): Mittelwert + Standardabweichung =  $2,84 \pm 3,26$ ; Standardfehler = 0,71; Minimum: 0,00; Maximum: 13,64

**E2  $10^{-11}$  M** (n = 20): Mittelwert + Standardabweichung =  $0,44 \pm 0,90$ ; Standardfehler = 0,20; Minimum: 0,00; Maximum: 3,28

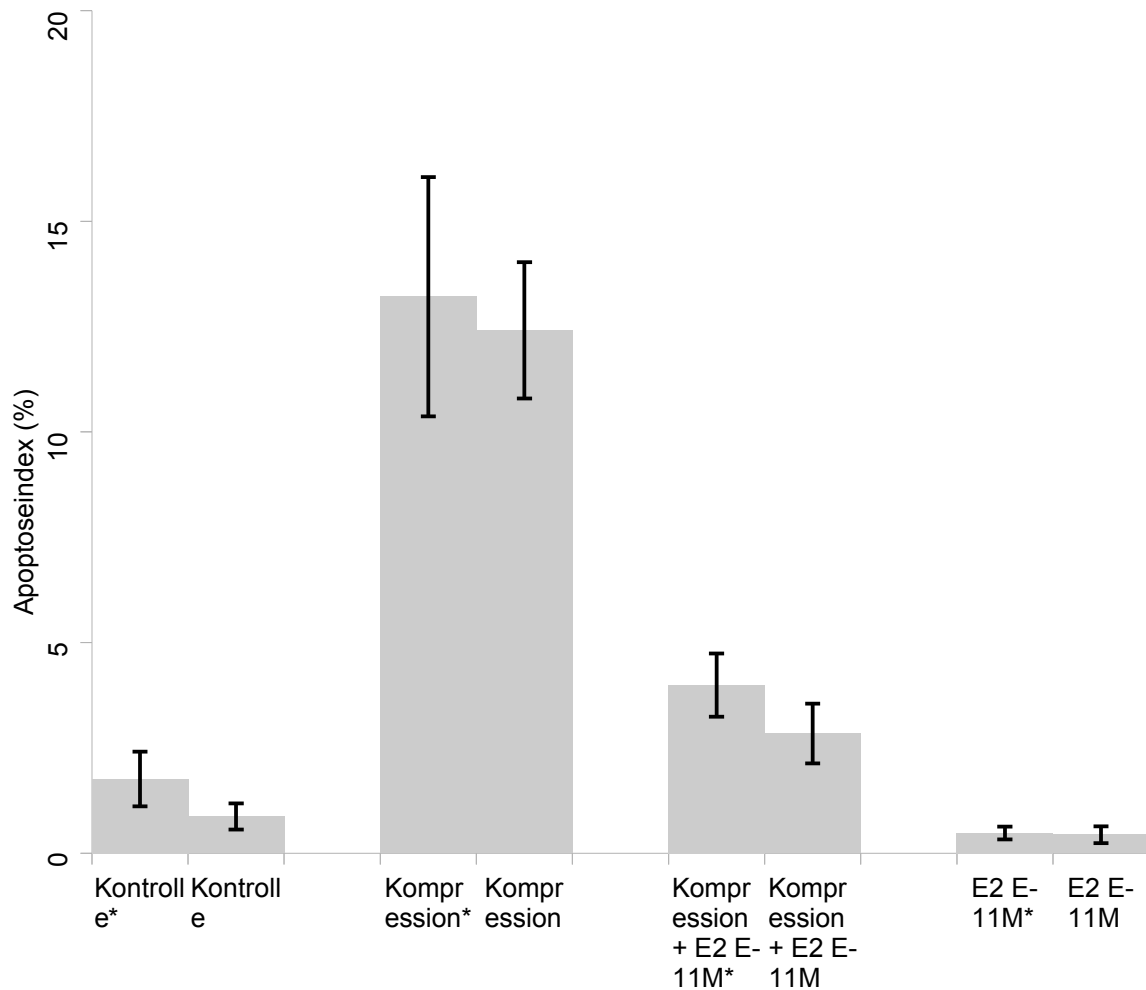


#### **3.1.4 Vergleich der Effekte von E2 auf mechanisch induzierte Apoptose in Explantaten mit intakter und beschädigter SFZ**

Zur genaueren Beurteilung des Einflusses der Knorpelarchitektur auf die Reaktion des Gewebes auf Kompression und die Wirksamkeit der Stimulation mit E2 werden nun die Ergebnisse der Versuche mit beschädigter und intakter Superficialzone gegenübergestellt. Es wurden insgesamt N = 199 Explantate aus den beiden vorangehenden Versuchsreihen in die vergleichende Betrachtung einbezogen, davon N = 85 mit intakter, und N = 114 mit beschädigter Superficialzone, aus insgesamt 10 unabhängigen Experimenten. Die jeweiligen Ergebnisse der entsprechenden Versuchsreihen wurden bereits berichtet. Um Differenzen zwischen den beiden Typen von Knorpel-explantaten bezüglich ihrer Signifikanz zu beurteilen, wurden zwischen den jeweils identisch behandelten Versuchsgruppen mit beschädigter und intakter Superficialzone zweiseitige T-Tests durchgeführt. Dabei ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen mit intakter und beschädigter Superficialzone bezüglich des Apoptoseindex.

### 3. Ergebnisse

---



**Abb. 10. Vergleich der Experimente mit intakter und beschädigter SFZ: Apoptoseindex**

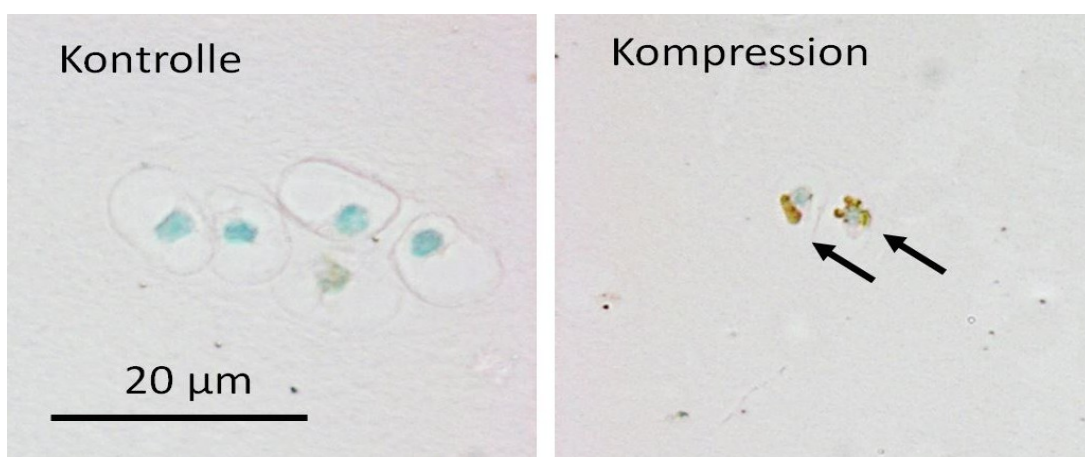
Auswertung der histomorphologischen Analyse von Knorpelexplantaten an Htx-gefärbten Paraffinschnitten 96 Stunden nach Kompression. Anteil apoptotischer Zellen in %. Mittelwerte + Standardfehler (N = 199; aus 10 unabhängigen Experimenten). Es liegen die Daten der Experimente aus den Abschnitten 3.1.2 und 3.1.3 zugrunde, die im Detail dort aufgeführt sind (vgl. Abb. 8 u. 9). Zwischen den jeweils identisch behandelten Versuchsgruppen mit beschädigter und intakter Superficialzone wurden zweiseitige T-Tests durchgeführt. Versuchsgruppen mit beschädigter SFZ sind mit Sternchen \* markiert. Es ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede.

### 3. Ergebnisse

---

#### 3.1.5 Kontrolle der mittels Htx-Färbung gewonnenen Erkenntnisse zur Wirkung von E2 mittels TUNEL-Assay

Für die Kontrolle mittels TUNEL-Assay wurden zwei zufällig ausgewählte Experimente verwendet, die bereits mittels Htx-Färbung histologisch untersucht worden waren. Die in diesen Experimenten verwendeten Explantate waren mit beschädigter Superficialzone hergestellt worden. Es wurden insgesamt  $N = 33$  Explantate aus 2 unabhängigen Experimenten untersucht. Die Dicke der Explantate betrug im arithmetischen Mittel 1,04 mm (Min: 0,91 mm; Max: 1,10 mm) mit einer Standardabweichung von 0,63 mm. Die bei der Kompression gemessenen Drücke betragen im arithmetischen Mittel 16,75 MPa (Min: 5,30 MPa; Max: 31,38 MPa) mit einer Standardabweichung von 8,11 MPa. In der zur Beurteilung der statistischen Signifikanz der berechneten ANOVA mit Student-Newman-Keuls post-hoc-Test zeigte sich eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Erhöhung des Anteils TUNEL-positiver Zellen in der lediglich komprimierten, nicht-stimulierten Versuchsgruppe (Kompression) gegenüber allen anderen Gruppen. Ansonsten gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den untersuchten Gruppen. Die Behandlung mit E2 in der Konzentration  $10^{-11}$  M senkt den Anteil durch Kompression induzierter apoptotischer Zellen auch bei histologischer Analyse mittels TUNEL-Färbung um 78 % im Vergleich zu ausschließlich komprimierten Explantaten auf das Niveau der nicht-komprimierten Kontrollen.

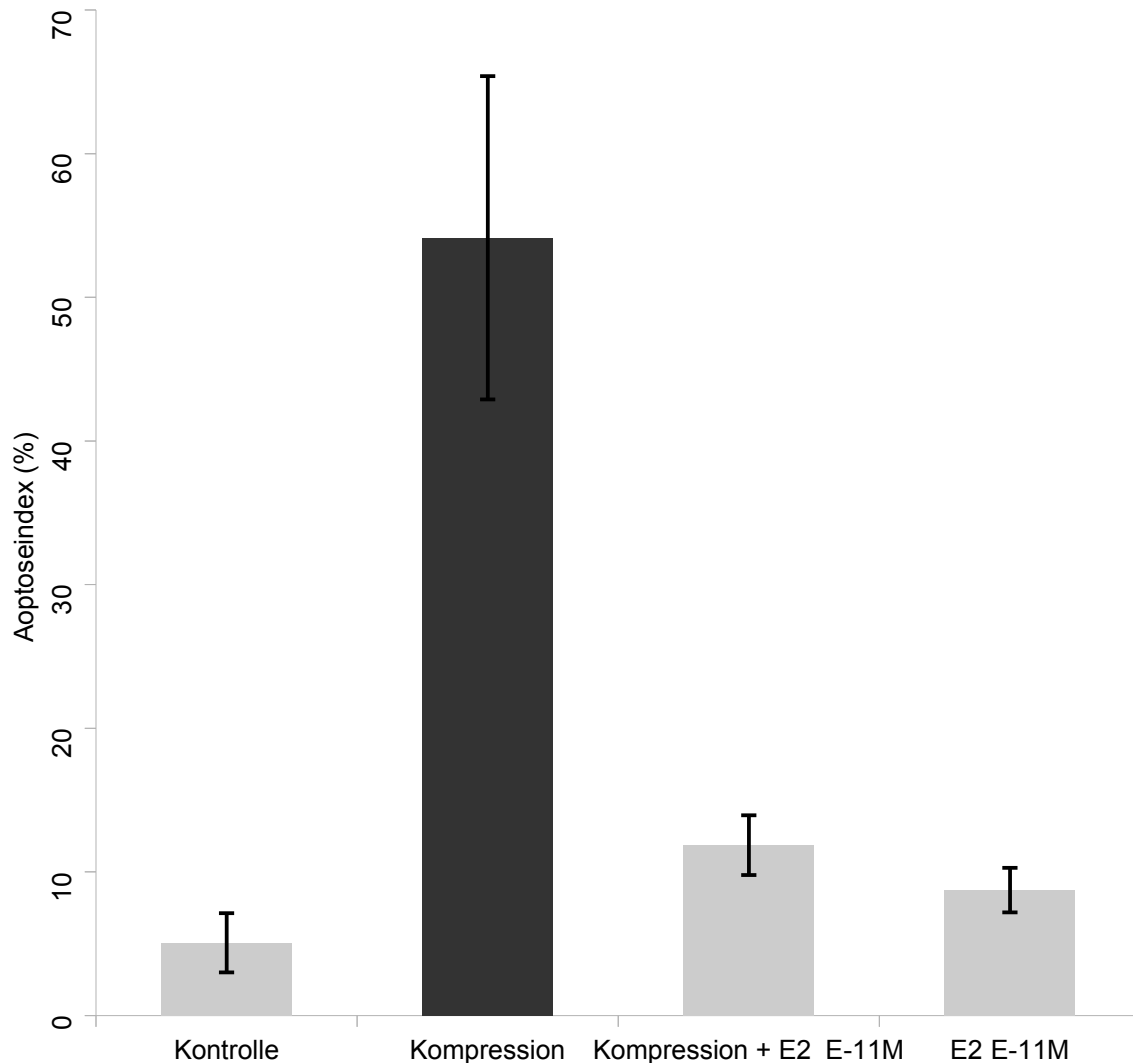


**Abb. 11. Beispielfotos mittels TUNEL-Assay gefärbter Schnitte hyaliner Knorpelpräparate**

*Links TUNEL-negative Zellen mit intakten Zellkernen, rechts TUNEL-positive Zellen mit aufgelöster Kernstruktur, die Pfeile markieren die braun angefärbten Kernfragmente.*

### 3. Ergebnisse

---



**Abb. 12. TUNEL-Assay: Apoptoseindex**

Auswertung der histomorphologischen Analyse von Knorpelimplantaten mit beschädigter SFZ an TUNEL-gefärbten Paraffinschnitten 96 Stunden nach Kompression. Anteil TUNEL-positiver Zellen in %. Mittelwerte + Standardfehler (N = 33; aus 2 unabhängigen Experimenten). 2 in der ANOVA signifikant unterschiedliche Cluster in verschiedenen Graustufen dargestellt ( $p < 0,05$ ).

**Kontrolle** (n = 6): Mittelwert + Standardabweichung =  $5,06 \pm 5,05$ ; Standardfehler = 2,06; Minimum: 0,00; Maximum: 13,22

**Kompression** (n = 9): Mittelwert + Standardabweichung =  $54,14 \pm 33,76$ ; Standardfehler = 11,25; Minimum: 6,25; Maximum: 94,29

**Kompression + E2  $10^{-11}$  M** (n = 10): Mittelwert + Standardabweichung =  $11,86 \pm 6,55$ ; Standardfehler = 2,07; Minimum: 1,64; Maximum: 21,90

**E2  $10^{-11}$  M** (n = 8): Mittelwert + Standardabweichung =  $8,73 \pm 4,40$ ; Standardfehler = 1,56; Minimum: 0,00; Maximum: 13,27

#### **3.1.6 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von 17 $\beta$ -Estradiol**

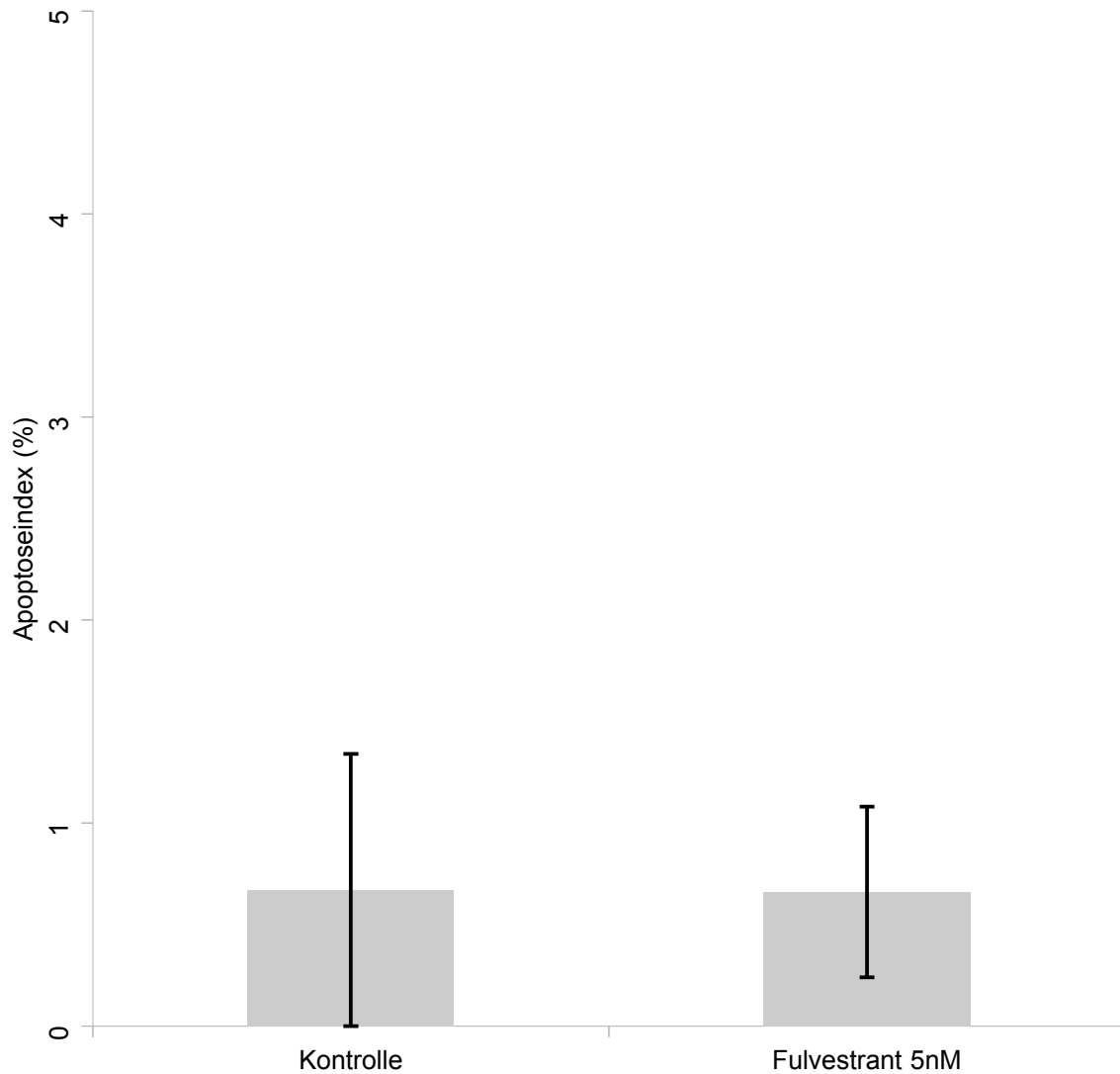
##### **3.1.6.1 Vorversuch zur Prüfung der Toxizität von Fulvestrant bezüglich Induktion von Apoptose**

In dem Vorversuch zum Ausschluß einer möglichen Toxizität oder anderer unerwarteter Einflüsse der verwendeten Fulvestrant-Lösung auf den Apoptoseindex wurden insgesamt N = 12 Explantate mit intakter SFZ verwendet. Die durchschnittliche Dicke der Explantate betrug 1,27 mm (Min: 1,04 mm, Max: 1,49 mm) mit einer Standardabweichung von 0,17 mm.

Ein zweiseitiger t-Test ergab keine signifikanten Differenzen ( $p = 0,98$ ) zwischen den beiden Gruppen. Die Stimulation mit der verwendeten 5 nM Fulvestrant-Lösung hat allein keinen Einfluss auf den Apoptoseindex, sie hat insbesondere keine toxischen Effekte, die selbst zu einer Erhöhung des Apoptoseindex führen.

### 3. Ergebnisse

---



**Abb. 13. Behandlung mit Fulvestrant: Apoptoseindex**

Auswertung der histomorphologischen Analyse von Knorpelexplantaten mit intakter SFZ an Htx-gefärbten Paraffinschnitten 96 Stunden nach Kompression. Anteil apoptotischer Zellen in %. Mittelwerte + Standardfehler (N = 12; aus 1 Experiment). Im zweiseitigen t-Test keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,98$ ).

**Kontrolle** (n = 6): Mittelwert + Standardabweichung =  $0,67 \pm 1,63$ ; Standardfehler = 0,67; Minimum: 0,00; Maximum: 4,00

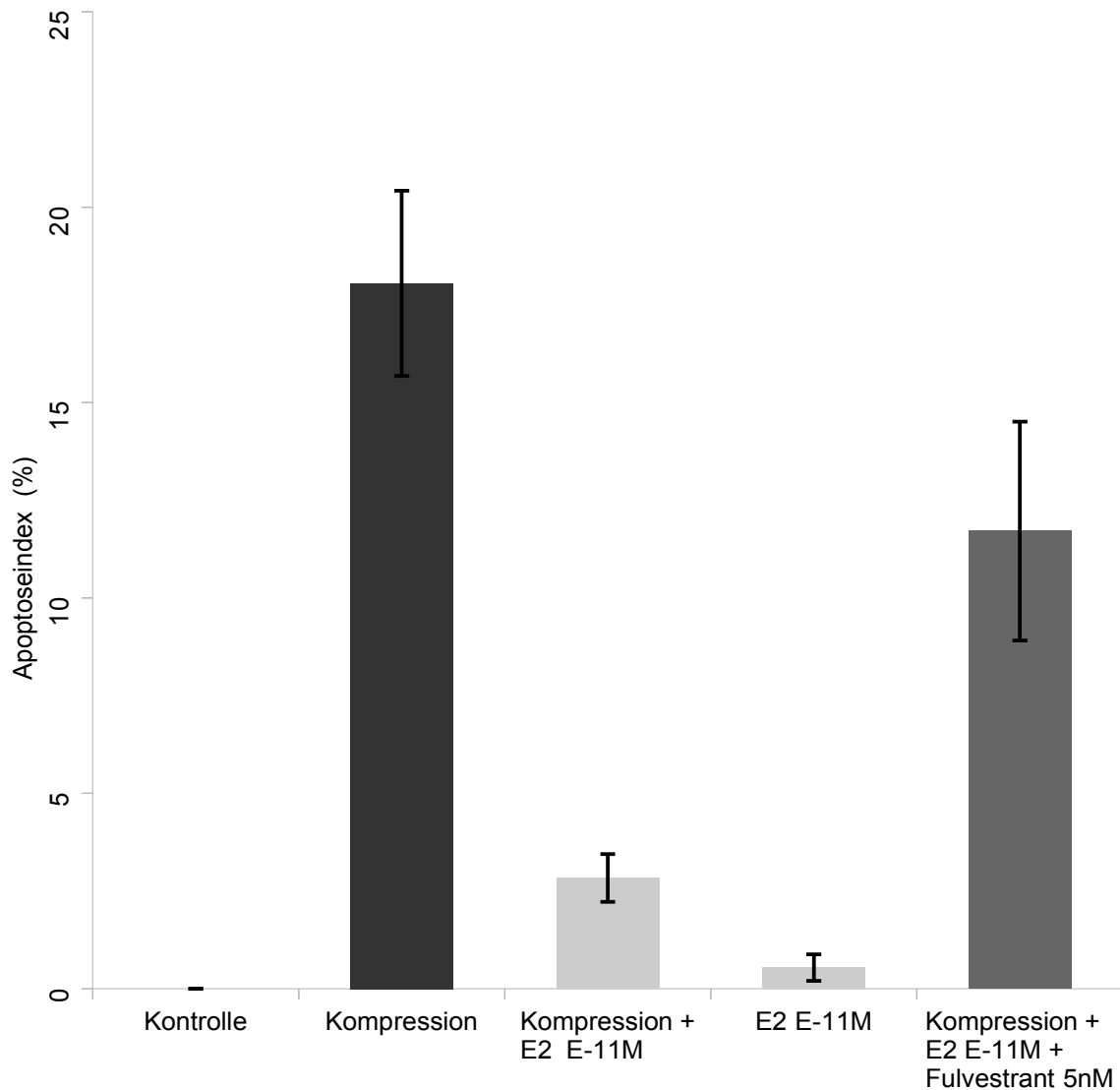
**Fulvestrant 5nM** (n = 6): Mittelwert + Standardabweichung =  $0,66 \pm 1,04$ ; Standardfehler = 0,42; Minimum: 0,00; Maximum: 2,38

#### **3.1.6.2 Einfluss von Fulvestrant auf den Effekt von E2 auf mechanisch induzierte Apoptose**

Die für die Untersuchung verwendeten Explantate sind nach der Methode zur Herstellung von Explantaten mit intakter Superficialzone hergestellt worden. Es wurden insgesamt  $N = 49$  Explantate aus zwei unabhängigen Experimenten untersucht, nachdem auch in dieser Versuchsreihe 1 Fall in der Auswertung als Ausreißer identifiziert und von der statistischen Analyse ausgeschlossen worden war. Die Dicke der Explantate betrug im arithmetischen Mittel 1,22 mm (Min: 1,01 mm; Max: 1,47 mm) mit einer Standardabweichung von 0,12 mm. Die bei der Kompression gemessenen Drücke betragen im arithmetischen Mittel 20,48 MPa (Min: 5,90 MPa; Max: 29,09 MPa) mit einer Standardabweichung von 5,84 MPa.

In der einfaktoriellen ANOVA mit Student-Newman-Keuls post-hoc-Test unterschied sich die lediglich komprimierte Versuchsgruppe (Kompression) statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) von allen anderen Versuchsgruppen. Gleiches gilt für die komprimierte und mit  $10^{-11}$  M E2 sowie 5nM Fulvestrant behandelte Gruppe (Kompression + E2  $10^{-11}$  M + Fulvestrant 5nM), die sich ebenfalls statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) von allen anderen Gruppen unterschied. Zusammenfassend zeigte sich eine teilweise Aufhebung des antiapoptotischen Effekts von E2 durch Zugabe von Fulvestrant, ohne jedoch das Apoptoseniveau ohne E2 ganz zu erreichen. Dies entspricht einer Reduktion um ca. 84% im Vergleich zu ausschließlich komprimierten Explantaten, die nach Zugabe von Fulvestrant nur noch ca. 35% beträgt.

### 3. Ergebnisse



#### Abb. 14. Behandlung mit Fulvestrant und E2: Apoptoseindex

Auswertung der histomorphologischen Analyse von Knorpelimplantaten mit intakter SFZ an Htx-gefärbten Paraffinschnitten 96 Stunden nach Kompression. Anteil apoptotischer Zellen in %. Mittelwerte + Standardfehler (N = 49; aus 2 unabhängigen Experimenten). 3 in der ANOVA signifikant unterschiedliche Cluster in verschiedenen Graustufen dargestellt ( $p < 0,05$ ).

**Kontrolle** (n = 10): Mittelwert + Standardabweichung =  $0,00 \pm 0,00$ ; Standardfehler = 0,00; Minimum: 0,00; Maximum: 0,00

**Kompression** (n = 10): Mittelwert + Standardabweichung =  $18,05 \pm 7,49$ ; Standardfehler = 2,37; Minimum: 6,06; Maximum: 31,11

**Kompression + E2  $10^{-11}$  M** (n = 9): Mittelwert + Standardabweichung =  $2,83 \pm 1,83$ ; Standardfehler = 0,61; Minimum: 0,00; Maximum: 5,88

**E2  $10^{-11}$  M** (n = 10): Mittelwert + Standardabweichung =  $0,54 \pm 1,06$ ; Standardfehler = 0,34; Minimum: 0,00; Maximum: 3,28

**Kompression + E2  $10^{-11}$  M + Fulvestrant 5 nM** (n = 10): Mittelwert + Standardabweichung =  $11,71 \pm 2,80$ ; Standardfehler = 2,80; Minimum: 1,33; Maximum: 31,43



### 3. Ergebnisse

---

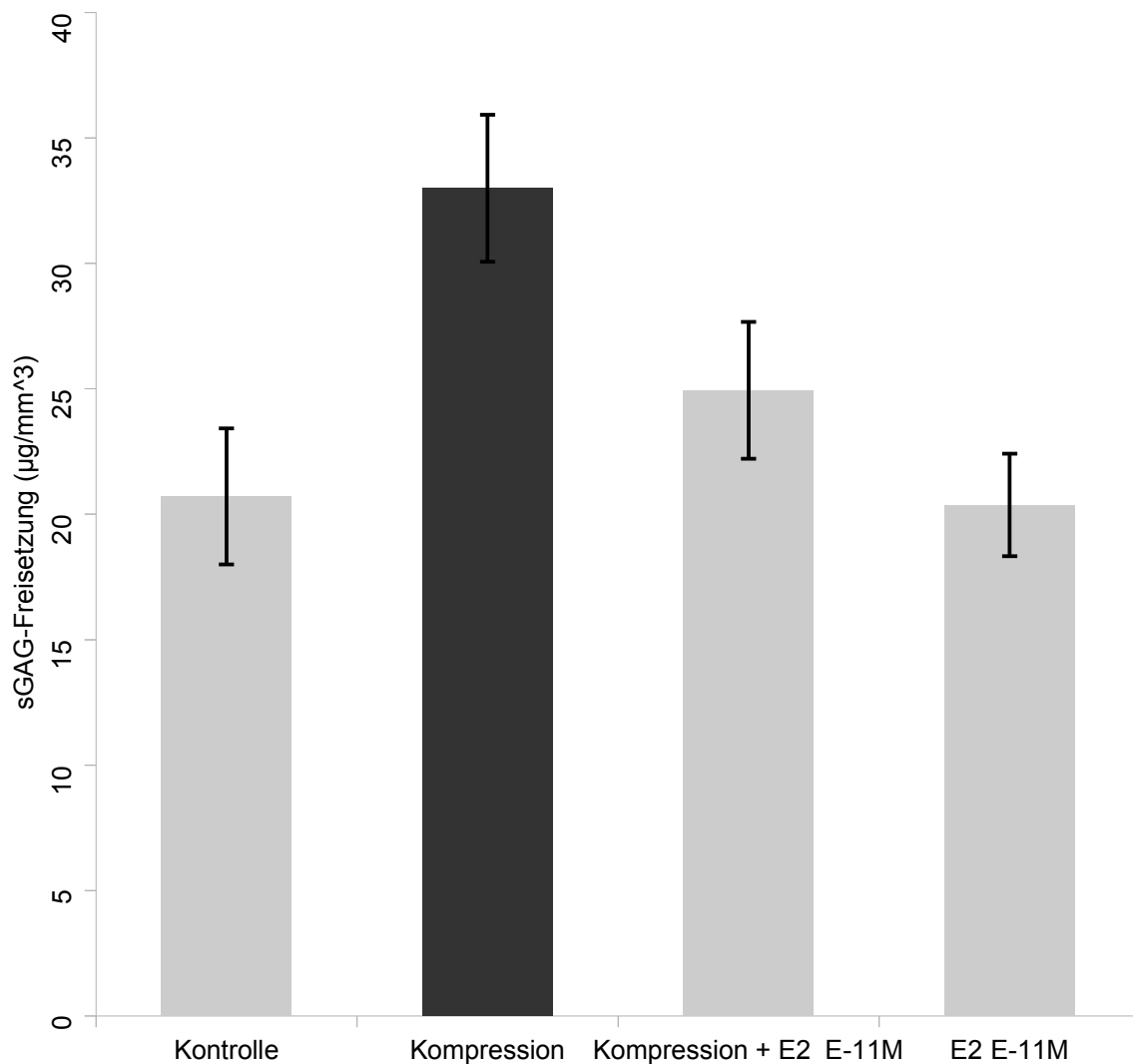
#### **3.2 Einfluss von 17 $\beta$ -Estradiol auf mechanisch induzierte Freisetzung sulfatierter Glykosaminoglykane aus Gelenknorpelimplantaten**

##### **3.2.1 Einfluss von E2 auf mechanisch induzierte sGAG-Freisetzung aus Implantaten mit beschädigter SFZ**

Es wurden die Kulturüberstände von insgesamt N = 114 Implantaten mit beschädigter SFZ aus fünf unabhängigen Experimenten untersucht. Die Dicke der Implantate betrug im arithmetischen Mittel 1,02 mm (Min: 0,86 mm; Max: 1,10 mm) mit einer Standardabweichung von 0,06 mm. Die bei der Kompression gemessenen Drücke betragen im arithmetischen Mittel 17,95 MPa (Min: 5,30 MPa; Max: 31,38 MPa) mit einer Standardabweichung von 7,22 MPa.

Das Ergebnis der berechneten ANOVA zeigt eine signifikant erhöhte ( $p < 0,05$ ) sGAG-Freisetzung aus den Implantaten der lediglich komprimierten, nicht mit E2 stimulierten Versuchsgruppe (Kompression) im Vergleich zu den drei anderen untersuchten Gruppen. Weitere signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen konnten nicht festgestellt werden. Die Behandlung mit  $10^{-11}$  M E2 hatte auf Implantate mit beschädigter SFZ den Effekt, dass es trotz mechanischer Kompression zu keiner signifikant über das Niveau der nicht-komprimierten Kontrollen erhöhten sGAG-Freisetzung aus den Implantaten kam. Relativ betrachtet betrug die Reduktion der sGAG-Freisetzung durch Zugabe von E2 ca. 24 % im Vergleich zu den ohne E2 komprimierten Implantaten.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 15. Explantate mit beschädigter SFZ: sGAG-Freisetzung**

Auswertung der fotometrischen Analyse der Kulturüberstände von Explantaten mit beschädigter SFZ 96 Stunden nach Kompression. sGAG-Freisetzung aus den Explantaten in  $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ . Mittelwerte + Standardfehler (N = 114; aus 5 unabhängigen Experimenten). 2 in der ANOVA signifikant unterschiedliche Cluster in verschiedenen Graustufen dargestellt ( $p < 0,05$ ).

**Kontrolle** (n = 28): Mittelwert + Standardabweichung =  $20,71 \pm 14,35$ ; Standardfehler = 2,71; Minimum: 2,58; Maximum: 59,37

**Kompression** (n = 28): Mittelwert + Standardabweichung =  $33,00 \pm 15,49$ ; Standardfehler = 2,93; Minimum: 7,05; Maximum: 76,87

**Kompression + E2  $10^{-11}$  M** (n = 29): Mittelwert + Standardabweichung =  $24,94 \pm 14,72$ ; Standardfehler = 2,73; Minimum: 8,28; Maximum: 71,18

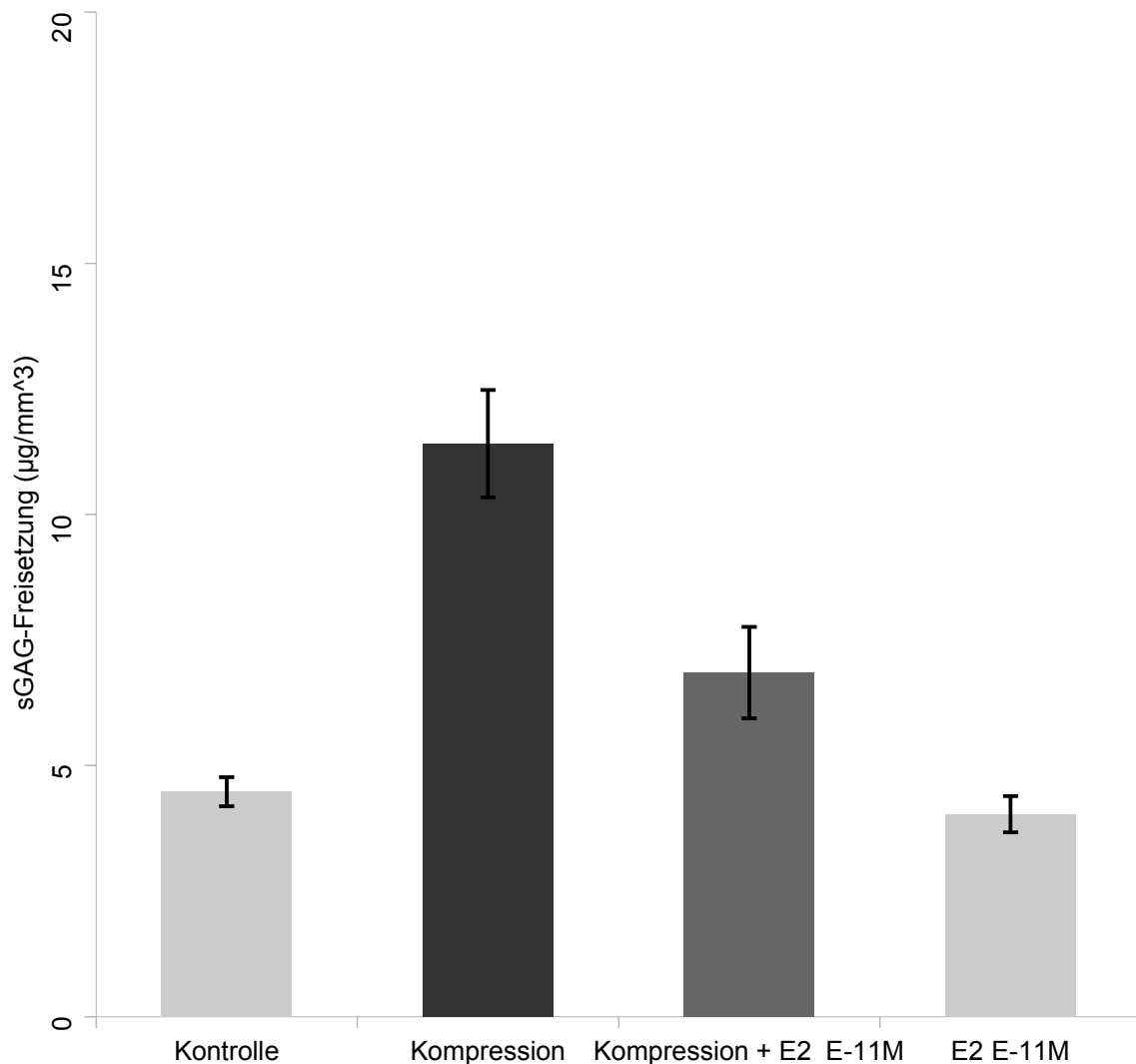
**E2  $10^{-11}$  M** (n = 29): Mittelwert + Standardabweichung =  $20,37 \pm 11,01$ ; Standardfehler = 2,04; Minimum: 9,05; Maximum: 56,00

#### **3.2.2 Einfluss von E2 auf mechanisch induzierte sGAG-Freisetzung aus Explantaten mit intakter SFZ**

Unter dieser Fragestellung wurden die Kulturüberstände der Explantate mit intakter SFZ untersucht. Für die Analyse der sGAG-Freisetzung wurden insgesamt  $N = 84$  Explantate aus fünf unabhängigen Experimenten untersucht, vorher waren 3 Fälle mittels Tukey's Box-Whisker-Plot als Ausreißer identifiziert und ausgeschlossen worden. Die Dicke der Explantate betrug im arithmetischen Mittel 1,28 mm (Min: 1,00 mm; Max: 1,50 mm) mit einer Standardabweichung von 0,15 mm. Die bei der Kompression gemessenen Drücke betragen im arithmetischen Mittel 15,78 MPa (Min: 3,72 MPa; Max: 27,17 MPa) mit einer Standardabweichung von 6,65 MPa.

In der ANOVA mit Student-Newman-Keuls post-hoc-Test zeigte sich eine signifikant erhöhte ( $p < 0,05$ ) sGAG-Freisetzung aus den Explantaten der nur komprimierten, nicht mit E2 stimulierten Gruppe (Kompression) im Vergleich zu den drei anderen untersuchten Gruppen. Weiterhin zeigte sich eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Differenz der sGAG-Freisetzung der komprimierten und mit E2 stimulierten Gruppe (Kompression + E2  $10^{-11}$  M) zu allen anderen Versuchsgruppen. Sonst gab es keine statistisch signifikanten Unterschiede. In der statistischen Auswertung zeigen sich also drei unterscheidbare Cluster, in absteigender Menge der sGAG-Freisetzung zunächst Kompression, dann Kompression + E2  $10^{-11}$  M sowie als letzter Cluster Kontrolle und E2  $10^{-11}$  M. Zusammengefasst führt die Stimulation mit E2  $10^{-11}$  M im untersuchten Läsionsmodell mit intakter SFZ zu einer signifikanten Reduktion der sGAG-Freisetzung um ca. 40 %, jedoch nicht bis ganz auf das Niveau der nicht-komprimierten Kontrollen.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 16. Explantate mit intakter SFZ: sGAG-Freisetzung**

Auswertung der fotometrischen Analyse der Kulturüberstände von Explantaten mit intakter SFZ 96 Stunden nach Kompression. sGAG-Freisetzung aus den Explantaten in µg/mm<sup>3</sup>. Mittelwerte + Standardfehler (N = 84; aus 5 unabhängigen Experimenten). 3 in der ANOVA signifikant unterschiedliche Cluster in verschiedenen Graustufen dargestellt (p < 0,05).

**Kontrolle** (n = 19): Mittelwert + Standardabweichung = 4,48 ± 1,28; Standardfehler = 0,29; Minimum: 3,86; Maximum: 5,10

**Kompression** (n = 22): Mittelwert + Standardabweichung = 11,41 ± 5,03; Standardfehler = 1,07; Minimum: 3,96; Maximum: 20,22

**Kompression + E2 10<sup>-11</sup> M** (n = 22): Mittelwert + Standardabweichung = 6,85 ± 4,26; Standardfehler = 0,91; Minimum: 0,16; Maximum: 16,85

**E2 10<sup>-11</sup> M** (n = 21): Mittelwert + Standardabweichung = 4,03 ± 1,67; Standardfehler = 0,36; Minimum: 1,59; Maximum: 8,03

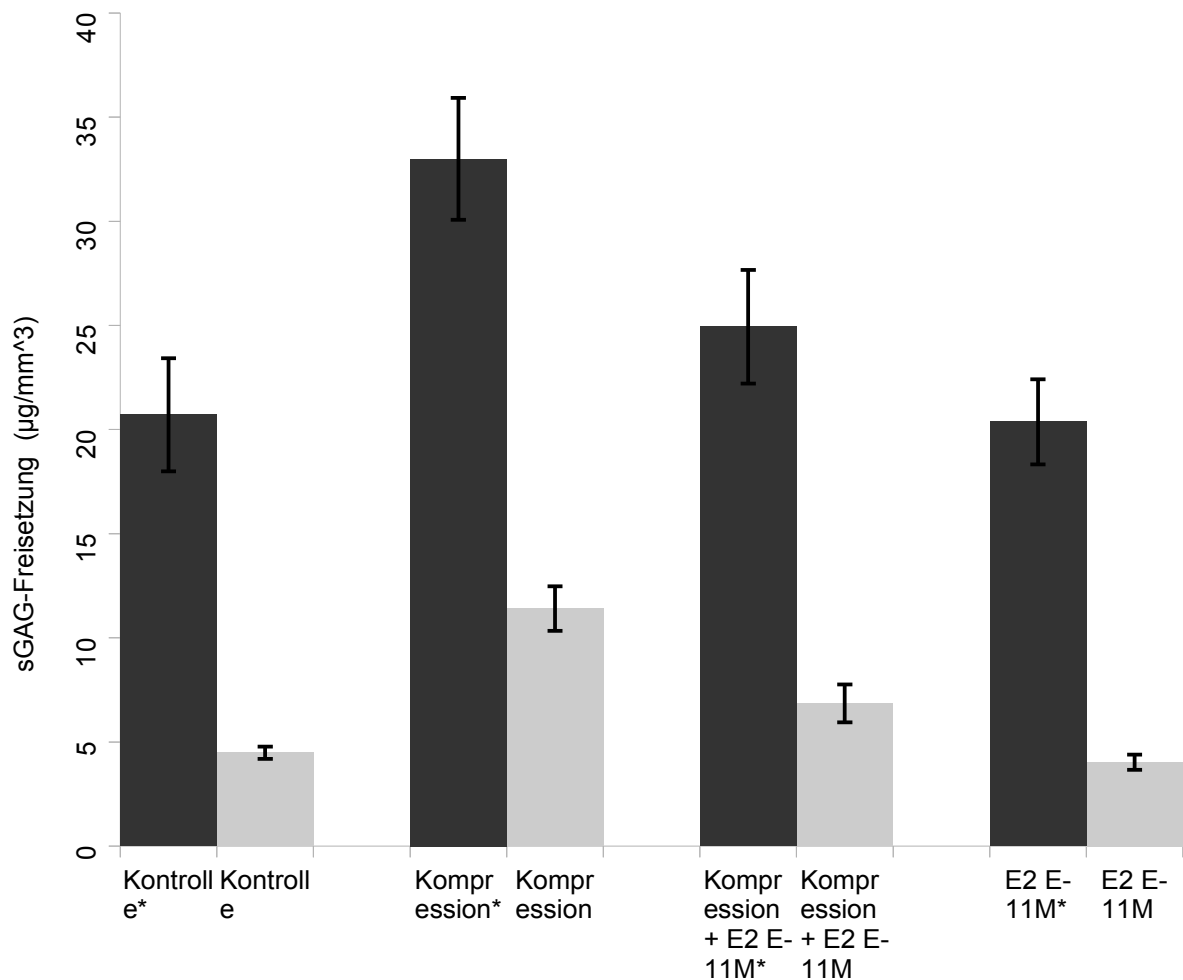
#### **3.2.3 Vergleich der Effekte von E2 auf mechanisch induzierte**

##### **sGAG-Freisetzung aus Explantaten mit intakter und beschädigter SFZ**

Zur besseren Beurteilung des Einflusses der Superficialzone auf die Reaktion des Knorpelgewebes auf Kompression und Stimulation mit E2 wurden die Ergebnisse der Versuche mit beschädigter (s.o.) und intakter (s.o.) Superficialzone gegenübergestellt. In die vergleichende Analyse der sGAG-Freisetzung wurden insgesamt N = 198 Explantate eingeschlossen, davon N = 84 mit intakter und N = 114 mit beschädigter Superficialzone.

Um Differenzen zwischen den beiden Typen von Knorpel-explantaten bezüglich ihrer Signifikanz beurteilen zu können, wurden jeweils zwischen den identisch behandelten Versuchsgruppen mit beschädigter und intakter Superficialzone zweiseitige T-Tests durchgeführt. Dabei ergaben sich statistisch hochsignifikante ( $p < 0,001$ ) Unterschiede zwischen sämtlichen Versuchsgruppen mit intakter und beschädigter Superficialzone bezüglich der sGAG-Freisetzung in das Kulturmedium. Die Intaktheit der Superficialzone hat somit einen statistisch signifikanten Einfluss auf das quantitative Ausmaß der sGAG-Freisetzung in allen untersuchten Versuchsgruppen.

### 3. Ergebnisse



**Abb. 17. Vergleich der Experimente mit intakter und beschädigter SFZ: sGAG-Freisetzung**  
Auswertung der fotometrischen Analyse der Kulturüberstände von Explantaten mit beschädigter SFZ 96 Stunden nach Kompression. sGAG-Freisetzung aus den Explantaten in  $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ . Mittelwerte + Standardfehler (N = 198; aus 10 unabhängigen Experimenten). Es liegen die Daten der Experimente aus den Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 zugrunde, die im Detail dort aufgeführt sind (vgl. Abb. 14 u. 15). Zwischen den jeweils identisch behandelten Versuchsgruppen mit beschädigter und intakter Superficialzone wurden zweiseitige T-Tests durchgeführt. Versuchsgruppen mit beschädigter SFZ sind mit Sternchen \* markiert. Die statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen sind in verschiedenen Graustufen dargestellt ( $p < 0,001$ ).

#### **3.2.4 Untersuchungen zum Wirkmechanismus von 17 $\beta$ -Estradiol**

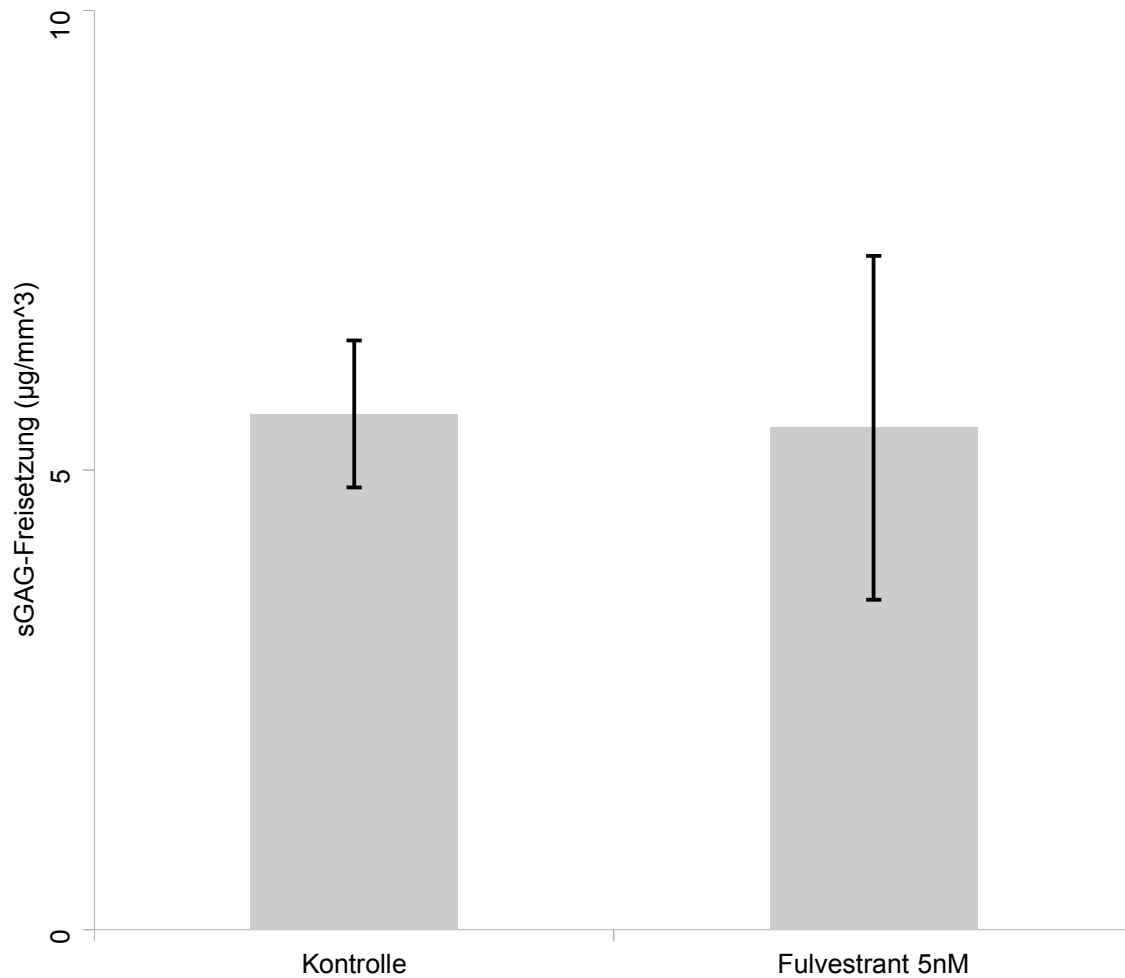
##### **3.2.4.1 Vorversuch zur Prüfung der Toxizität von Fulvestrant bezüglich der sGAG-Freisetzung**

Zum Ausschluss toxischer Effekte der verwendeten Fulvestrant-Lösung auf die sGAG-Freisetzung wurden die Kulturüberstände von insgesamt N = 12 Explantaten mit intakter SFZ untersucht. Die durchschnittliche Dicke der Explantate betrug 1,27 mm (Min: 1,04 mm, Max: 1,49 mm) mit einer Standardabweichung von 0,17 mm.

Ein zweiseitiger t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,94$ ) zwischen den beiden Gruppen. Die verwendete 5 nM Fulvestrant-Lösung hat keinen Einfluss auf die basale sGAG-Freisetzung.

### 3. Ergebnisse

---



**Abb 18. Behandlung mit Fulvestrant: sGAG-Freisetzung**

Auswertung der fotometrischen Analyse der Kulturüberstände von Explantaten mit beschädigter SFZ 96 Stunden nach Kompression. sGAG-Freisetzung aus den Explantaten in  $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ . Mittelwerte + Standardfehler (N = 12; aus 1 Experiment). Im zweiseitigen t-Test keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,94$ ).

**Kontrolle** (n = 6): Mittelwert + Standardabweichung =  $5,61 \pm 1,96$ ; Standardfehler = 0,80; Minimum: 3,83; Maximum: 9,20

**Fulvestrant 5nM** (n = 6): Mittelwert + Standardabweichung =  $5,46 \pm 4,59$ ; Standardfehler = 1,87; Minimum: 1,93; Maximum: 14,24



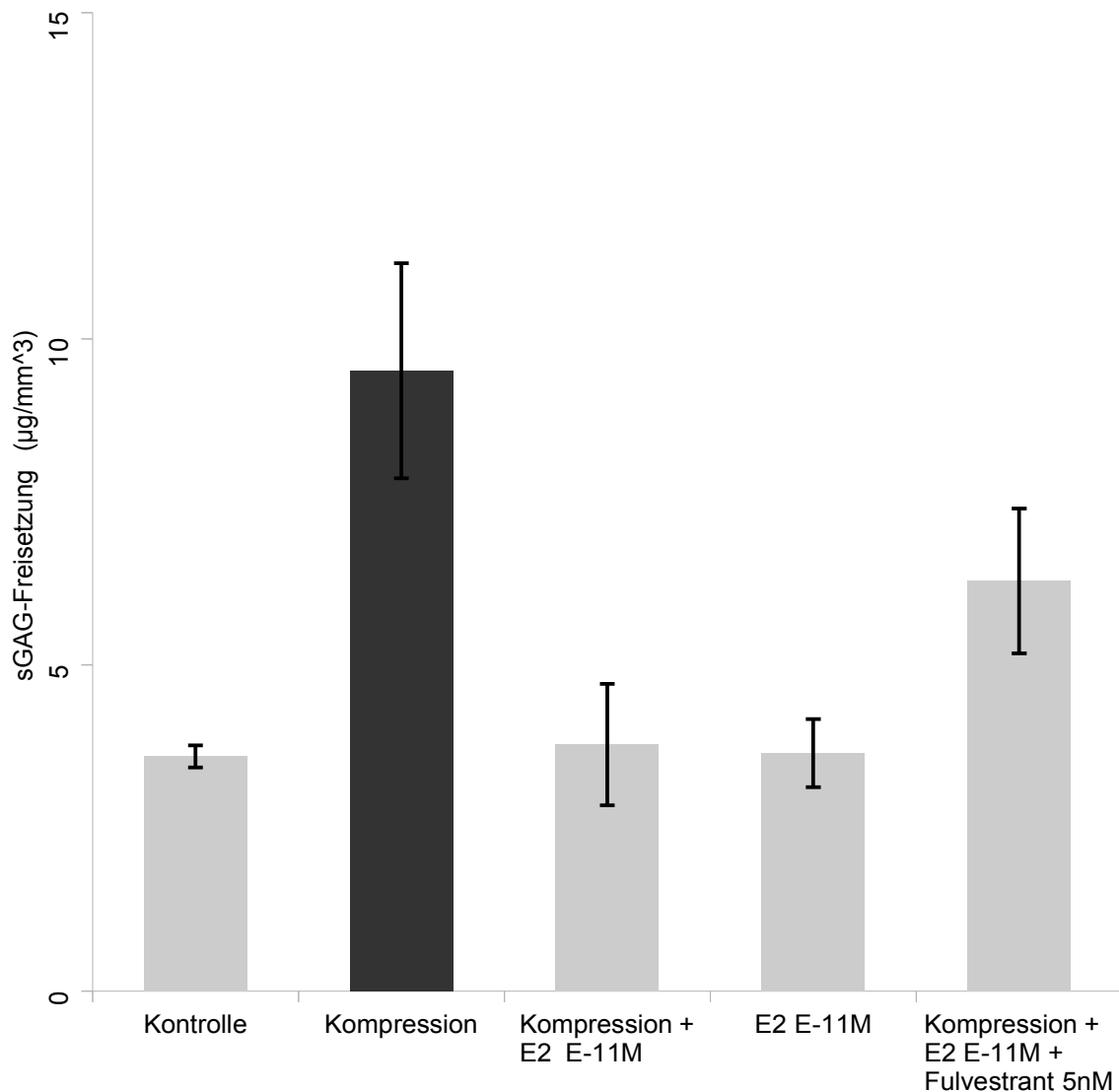
#### **3.2.4.2 Einfluss von Fulvestrant auf den Effekt von E2 auf mechanisch induzierte sGAG-Freisetzung**

Für die Untersuchung wurden die Kulturüberstände von Knorpelimplantaten mit intakter Superficialzone verwendet. Es wurden insgesamt N = 49 Implantate aus zwei unabhängigen Experimenten untersucht. In dieser Versuchsreihe wurde vorangehend 1 Fall als Ausreißer identifiziert und von der Analyse ausgeschlossen.

Die Dicke der Implantate betrug im arithmetischen Mittel 1,22 mm (Min: 1,01 mm; Max: 1,47 mm) mit einer Standardabweichung von 0,12 mm. Die bei der Kompression gemessenen Drücke betragen im arithmetischen Mittel 20,65 MPa (Min: 5,90 MPa; Max: 29,09 MPa) mit einer Standardabweichung von 5,81 MPa.

In der einfaktoriellen ANOVA mit Student-Newman-Keuls post-hoc-Test zeigte die nur komprimierte, nicht-stimulierte Versuchsgruppe (Kompression) eine statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) höhere sGAG-Freisetzung als alle anderen Versuchsgruppen. Die zusätzlich mit dem ER-Inhibitor Fulvestrant behandelte Gruppe (Kompression + E2  $10^{-11}$  M + Fulvestrant 5nM) zeigte im Vergleich zu der nicht mit Fulvestrant behandelten Gruppe Kompression + E2  $10^{-11}$  M eine höhere durchschnittliche sGAG-Freisetzung. Betrachtet man die Resultate aus der Perspektive der Reduktion der sGAG-Freisetzung im Vergleich zu den nur komprimierten Implantaten, so ergeben sich Werte von ca. 60 % bzw. 34 % geringerer sGAG-Freisetzung für die mit E2 bzw. mit E2 und Fulvestrant inkubierten Implantate. Die geringere Hemmung in der zusätzlich mit Fulvestrant behandelten Versuchsgruppe erreichte jedoch nicht das gewählte statistische Signifikanzniveau von  $p < 0,05$ . Für die sGAG-Freisetzung aus den Implantaten in das Kulturmedium kann auf Grundlage der vorliegenden Daten daher nicht von einer Aufhebung des Effektes von E2 ausgegangen werden.

### 3. Ergebnisse



#### Abb. 19. Behandlung mit E2 und Fulvestrant: sGAG-Freisetzung

Auswertung der fotometrischen Analyse der Kulturüberstände von Explantaten mit intakter SFZ 96 Stunden nach Kompression. sGAG-Freisetzung aus den Explantaten in  $\mu\text{g}/\text{mm}^3$ . Mittelwerte + Standardfehler (N = 49; aus 2 unabhängigen Experimenten). 2 in der ANOVA signifikant unterschiedliche Cluster in verschiedenen Graustufen dargestellt ( $p < 0,05$ ).

**Kontrolle** (N= 9): Mittelwert + Standardabweichung =  $3,60 \pm 0,51$ ; Standardfehler = 0,17; Minimum: 2,95; Maximum: 4,62

**Kompression** (N= 10): Mittelwert + Standardabweichung =  $9,51 \pm 5,21$ ; Standardfehler = 1,65; Minimum: 3,96; Maximum: 17,57

**Kompression + E2  $10^{-11}$  M** (N= 10): Mittelwert + Standardabweichung =  $3,78 \pm 2,93$ ; Standardfehler = 0,93; Minimum: 0,16; Maximum: 10,46

**E2  $10^{-11}$  M** (N= 10): Mittelwert + Standardabweichung =  $3,65 \pm 1,66$ ; Standardfehler = 0,52; Minimum: 1,59; Maximum: 5,85

**Kompression + E2  $10^{-11}$  M + Fulvestrant 5 nM** (N= 10): Mittelwert + Standardabweichung =  $6,29 \pm 3,51$ ; Standardfehler = 1,11; Minimum: 0,20; Maximum: 11,97

### 4. Diskussion

#### 4.1 Methodenkritik

##### 4.1.1 Verwendetes Kompressionsmodell

Das hier verwendete Modell untersucht Explantate aus isoliertem Knorpelgewebe. Dieses Vorgehen ist in der entsprechenden Forschung üblich (Loening et al., 2000; Kurz et al., 2004; Kurz et al., 2005), hat jedoch Konsequenzen die bei der Interpretation der Ergebnisse beachtet werden müssen. Erstens fehlen die unteren Knorpelzonen und der subchondrale Knochen und zweitens ist bei Kompression eines isolierten Explantates im Gegensatz zur Gesamtoberfläche des Gelenkes *In-vivo* ein lateraler Ausstrom der Flüssigkeit möglich. Es sind daher nicht alle Elemente des Standardmodells des hyalinen Gelenkknorpels (vgl. Abs. 1.3.3, Mow et al., 1984; Wong et al., 2003; Wilson et al., 2005) gegeben, was eine direkte Übertragung der Ergebnisse auf die Situation *In-vivo* erschwert. Hier sind Vergleiche mit den Ergebnissen anderer experimenteller Modelle, z.B. mit Erhalt des subchondralen Knochens in Zukunft notwendig.

Besondere Aufmerksamkeit verdient auch eine Einordnung der gemessenen Druckbelastungen. *In-vivo*-Langzeitmessungen im menschlichen Hüftgelenk (*Art. coxae*) haben gezeigt, dass der Gelenkknorpel bewegungsbedingt erheblichen physiologischen Druckbelastungen mit lokalen Druckspitzen von ca. 18 MPa und Druckraten von 46-107 MPa/sec ausgesetzt ist (Hodge et al., 1986). In *In-vitro*-Studien zeigten sich in diesem Bereich bereits z.T. erhebliche Schäden am Knorpelgewebe. Die experimentellen Daten aus der Literatur sind allerdings nicht ohne weiteres zu vergleichen, da die jeweiligen Versuchsprotokolle sich in Hinblick auf die Art der verwendeten Gewebepräparate sowie die Höhe, Zeitdauer, Häufigkeit und Geschwindigkeit des applizierten Druckes unterscheiden und verschiedene Modellspezies unterschiedlichen Alters verwendet wurden (Kurz et al., 2005). Loening et al. berichten bereits über eine signifikante Zunahme der Apoptoserate im Gewebe ab einem Druck von 4,5 MPa sowie über eine Degradation des Kollagen-Netzwerkes im Bereich von 7-12 MPa bei Verwendung von unreifem Kälberknorpel

(Loening et al., 2000). Zu einer Abnahme der Gesamtproteinbiosynthese kam es bei Drücken von 18-23 MPa (Kurz et al., 2001). Bei adulten Rindern sind die Drücke, die zur Auslösung einer signifikanten Zunahme von Apoptose im Gewebe notwendig sind, wesentlich höher und werden für eine einzelne Kompression in einer Studie mit 25-29 MPa angegeben (Kurz et al., 2004). Torzilli et al. geben für Rinder einen Schwellenwert für Kollagen-Netzwerkschäden und Zelluntergang von 15-25 MPa für eine einzelne Kompression an (Torzilli et al., 1999). Die in der vorliegenden Arbeit gemessenen Drücke, bei denen es bei einer einzelnen Kompression von adultem Rinderknorpel regelhaft zu signifikanter Apoptose und Matrixdegradation im Gewebe kam, lagen im arithmetischen Mittel bei 11,9-20,65 MPa. Bei aller gebotenen Vorsicht beim Vergleichen der verschiedenen experimentellen Ansätze liegen die hier gewonnenen Daten innerhalb der aus der Literatur zu erwartenden Bandbreite für mechanisch induzierte Knorpelschäden. Die gemessenen Druckwerte liegen allerdings nicht wesentlich außerhalb des physiologischen Bereichs für lokale Spitzenbelastungen in Gelenken (Hodge et al., 1986). Es ist jedoch zu beachten, dass neben den Absolutwerten des maximalen Drucks bei einer Kompression auch die Kompressionsgeschwindigkeit und damit der applizierte Druck pro Zeiteinheit eine wesentliche Rolle spielt (Kurz et al., 2001; Chen et al., 1999). Chen et al. haben für Schäden an der extrazellulären Matrix einen Schwellenwert von 30 MPa/sec gefunden. In der vorliegenden Arbeit traten bei einer Kompressionsgeschwindigkeit von 2 mm/sec und einer Kompression auf 50 % der ursprünglichen Dicke der Explantate Druckraten von durchschnittlich 47,6-82,6 MPa/sec auf.

### **4.1.2 Methoden zur Detektion apoptotischer Zellen**

Bei der Apoptose handelt es sich im Gegensatz zur Nekrose um einen kontrollierten und potenziell pharmakologisch modulierbaren bzw. präventablen Prozess des Zelluntergangs als Reaktion auf zunächst subletale Zellschäden (vgl. Einleitung).

Infolge mechanischer Läsionen durch unphysiologisch hohe Drücke auf die Knorpeloberfläche ist zuerst nekrotischer Zelluntergang nachweisbar, der verzögert von zunehmendem apoptotischem Zelluntergang gefolgt wird (Chen et al., 2001). Dies kann als ein Hinweis darauf gewertet werden, dass das unmittelbare

#### 4. Diskussion

---

mechanische Trauma zunächst in einer Reihe von Zellen direkte letale Zellschäden verursacht, während bei anderen zunächst subletal geschädigten Zellen, bei denen eine Reparatur der Zellschäden misslingt, ein Apoptoseprogramm in Gang gesetzt wird. Dies steht in Einklang mit Befunden von D'Lima et al., die in ihren Untersuchungen eine zeitverzögert einsetzende und pharmakologisch mit Apoptoseinhibitoren teilreversible Apoptose gefunden haben (D'Lima 2001a; D'Lima 2001b). Diese Reversibilität macht daher die apoptotische Reaktion des Knorpels und ihre Einflussfaktoren zum vielversprechenden Forschungsgegenstand.

Ungeachtet der konzeptionellen Unterschiede zwischen Apoptose und Nekrose gibt es sowohl bezüglich der biochemischen Pathways als auch morphologisch (z.B. sekundäre Nekrose) Überschneidungen, die eine genaue Zuordnung im Einzelfall erschweren können (Saraste et al., 2000). In dieser Arbeit wurden zwei Methoden zur Detektion apoptotischer Zellen eingesetzt. Hauptsächlich wurde die lichtmikroskopische Identifizierung von apoptotischen Kernausstülpungen („Nuclear blebbing“) am Htx-gefärbten Paraffinschnitt verwendet. Diese Methode hat den Vorteil, sich auf einen spezifischen morphologischen Marker des Apoptoseprozesses zu stützen (Saraste et al., 2000) und ist durch erfolgreiche Verwendung in vergleichbaren Studien gut etabliert (Kurz et al., 2004; Loening et al., 2000). Bei der Interpretation der gewonnenen Daten muss jedoch Folgendes beachtet werden: Es gibt Varianten des apoptotischen Zelluntergangs, bei denen kein „Nuclear blebbing“ auftritt (Earnshaw, 1995; Dini et al., 1996), außerdem stellen fixierte Paraffinschnitte selbstverständlich nur eine Momentaufnahme der im Gewebe ablaufenden Prozesse dar. Somit können insbesondere Zellen, die sich erst in der Initiations- bzw. Exekutionsphase befinden, nicht identifiziert werden. Es ist also davon auszugehen, dass der tatsächliche Anteil apoptotischer Zellen höher liegt als sich in den berichteten Daten widerspiegelt. Da den Schlußfolgerungen dieser Arbeit jedoch prozentuale Anteile, d.h. relative Zahlenangaben, zugrunde liegen, spielt diese Tatsache für die Validität der Ergebnisse keine Rolle, solange sie bei Vergleichen mit durch andere Methoden gewonnenen Daten beachtet wird.

Bei der zweiten Methode zur Detektion apoptotischer Zellen, dem TUNEL-Assay, haben die methodenbedingten Einschränkungen einen umgekehrten Effekt auf die

## 4. Diskussion

---

Interpretation der Ergebnisse. Obwohl das Markieren der 3'-OH-Termini von DNA-Fragmenten als spezifische Methode zur Detektion apoptotischer Zellen eingeführt wurde (Gavrieli et al., 1992), kommt es in verschiedenen Gewebetypen auch zur Darstellung eindeutig nekrotischer Zellen und damit falsch positiver Ergebnisse (Grasl-Kraupp et al., 1995; Charriaut-Marlangue et al., 1995). Bei den hier vorliegenden Daten muss also von einem methodenbedingten Überschätzen der tatsächlich vorhandenen apoptotischen Zellen ausgegangen werden. Nichtsdestotrotz ist die Kombination beider Methoden aufgrund ihrer unterschiedlichen Ansätze insbesondere zur gegenseitigen Verifizierung erhobener Daten geeignet.

### 4.1.3 Nachweis der Matrixdegradation

Ausgehend von der Kenntnis der Ultrastruktur des hyalinen Knorpels ist bei einer mechanischen Läsion mit einer Ruptur des Kollagen-Netzwerks und in der Folge mit vermehrtem Freisetzen von polyanionischen Glykosaminoglykanen in den Kulturüberstand zu rechnen (vgl. Biomechanik). Infolge einer mechanischen Läsion kommt es zunächst zu einer initialen GAG-Freisetzung infolge der direkten Zerstörung der Ultrastruktur sowie in den nächsten ca. 72 Stunden zu einer weiteren durch enzymatischen Abbau induzierten vermehrten GAG-Freisetzung in das Kulturmedium (DiMicco et al., 2004). Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde der DMMB-Assay nach Farndale et al., 1986, als Nachweis- und Quantifikationsmethode für die Matrixdegradation verwendet. Mithilfe des DMMB-Assays lassen sich sulfatierte GAGs spezifisch photometrisch nachweisen und durch Konstruktion einer geeigneten Standardkurve quantifizieren. Die Tatsache, dass keine nicht-sulfatierten Moleküle wie Hyaluronat detektiert werden, kann vernachlässigt werden, da Hyaluronat im Knorpelgewebe in der Regel mit Proteoglykan-Seitenketten mit sulfatierten GAGs vorliegt (Knudson et al., 2001; Hardingham et al., 1992). Kollagene bzw. ihre Spaltprodukte werden ebenfalls nicht direkt nachgewiesen, aber die Kenntnis der Ultrastruktur des Knorpels erlaubt es bei Vorliegen einer vermehrten sGAG-Freisetzung nach Kompression, Rückschlüsse auf eine Zerstörung des Kollagen-Netzwerkes zu ziehen, da dieses unter normalen Umständen die Proteoglykane im Gewebe fixiert (Mow et al., 1984; Wong et al., 2003). Eine

## 4. Diskussion

---

hypothetische Erhöhung der Biosynthese von Proteoglykanen als alternative Erklärung erhöhter sGAG- Mengen nach Kompression kann aufgrund gegenteiliger Erkenntnisse aus Experimenten mit einem vergleichbaren Kompressionsmodell als relevanter Faktor ausgeschlossen werden (Kurz et al., 2001; Torzilli et al., 1999). Aus dem Vorhergehenden ergibt sich, dass eine Quantifizierung der sGAG-Freisetzung eine geeignete Methode zur Beurteilung des Ausmaßes der Matrixdegradation darstellt. In dieser Arbeit wurde die freigesetzte Menge auf das Volumen des jeweiligen Explantats bezogen, da dieses bereits bei der Herstellung ermittelt wurde. Andere Studien verwenden das Feuchtgewicht der Explantate zur Standardisierung ihrer Ergebnisse (Loening et al., 2000; Kurz et al., 2001; Chen et al., 1999). Um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten, gibt die folgende Tabelle eine exemplarische Übersicht über Volumina und Feuchtgewichte einer zufälligen Stichprobe in dieser Studie verwendeter Explantate.

	Mittelwert	Standardfehler
Volumen (mm <sup>3</sup> )	8,29	0,75
Feuchtgewicht (mg)	8,47	0,99
Feuchtgewicht/Volumen (mg/mm <sup>3</sup> )	1,01	0,04

**Tab. 2.** Volumina und Feuchtgewichte von Explantaten. Mittelwerte + Standardfehler (n = 5).

### 4.1.4 Stimulation mit E2

Die Stimulation mit E2 erfolgte mit einer Ausnahme in allen Versuchsreihen mit einer Konzentration von  $10^{-11}$  M, entsprechend 0,0027 µg/l in einer alkoholischen Lösung. Um eine Kontamination mit exogenem E2 zu vermeiden, wurden durchgehend serumfreie Kulturmedien und Lösungsmittel verwendet. Der Nachweis der prinzipiellen biologischen Wirksamkeit der verwendeten Lösung erfolgte in einer anderen Studie aus der Arbeitsgruppe Kurz/Schünke am anatomischen Institut der CAU Kiel durch Stimulation von Estrogen-Rezeptor positiven Mamma-Karzinomzellen der MCF-7 Zelllinie (Ewald 2010). Die Auswahl erfolgte initial nach Literaturangaben zu wirksamen Konzentrationen in der experimentellen Arbeit mit

## 4. Diskussion

---

Rinderknorpel (Englert et al., 2006), und wurde dann im Rahmen einer Verdünnungsreihe mit anderen Konzentrationen verglichen (s.u., vgl. Abb. 7). Schallenberger et al. geben Konzentrationen von 0,002-0,006 µg/l E2 im zentralen Venenblut von Rindern während der Lutealphase des Zyklus an; die in dieser Arbeit verwendete Konzentration befindet sich also im Bereich der physiologischen Bandbreite (Schallenberger et al., 1985). Es muss jedoch beachtet werden, dass es sich um Serumkonzentrationen handelt; die physiologischen E2-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit von Rindern liegen wahrscheinlich niedriger. Beim Menschen liegen wesentlich höhere physiologische Konzentrationen vor. Für Frauen im reproduktionsfähigen Alter werden E2-Konzentrationen von 0,13-0,28 µg/l während des gesamten Zyklus angegeben (Diem et al., 1973). Für Frauen mit Knie-OA im Alter von durchschnittlich  $59 \pm 11$  (SD) Jahren werden Konzentrationen von durchschnittlich  $0,038 \pm 0,001$ (SD) µg/l im Serum und  $0,019 \pm 0,006$  (SD) µg/l in der Synovialflüssigkeit angegeben (Richette et al., 2007). Bei Vergleichen der vorliegenden Daten mit an humanem Material gewonnenen Daten müssen die unterschiedlichen Größenordnungen beachtet werden.

### 4.2 Wirksame Konzentrationen und Dosis-Wirkungs-Beziehung

In der ersten Versuchsreihe (vgl. Abs. 3.1.1) sollte zunächst eruiert werden, ob das verwendete Versuchsprotokoll geeignet ist, eine antiapoptotische Aktivität der verwendeten E2-Lösung im Rahmen des Kompressionsmodells nachzuweisen.

Es sollte einerseits getestet werden, ob die aufgrund von Literaturangaben und vorherigen Erfahrungen (Loening et al., 2000; Kurz et al., 2004) gewählten Parameter des Kompressionsmodells (50 % Kompression, 2 mm/sec Vorschub) hinreichend apoptotischen Zelluntergang induzieren, um etwaige Veränderungen durch Inkubation mit E2 mit ausreichendem Signifikanzniveau nachzuweisen. Mit einem Apoptoseindex von ca. 8 % apoptotischer Zellen nach Kompression, der signifikant über dem der Kontrollen lag (vgl. Abb. 7), erwies sich das Modell als geeignet. In den nachfolgenden Versuchen mit größeren Fallzahlen lag der Apoptoseindex mit ca. 11-13 % nach Kompression etwas höher (vgl. Abb. 10), der Unterschied war jedoch ohne statistische Signifikanz.



## 4. Diskussion

---

Andererseits sollte über eine Verdünnungsreihe eine Dosis-Wirkungs-Kurve für E2 konstruiert werden und die wirksamste Konzentration für weitere Versuchsreihen bestimmt werden. Es konnte in der Tat ein signifikanter antiapoptotischer Effekt des E2 nachgewiesen werden, wobei sich  $10^{-11}$  M als die wirksamste Konzentration herausstellte. Dies steht in Einklang mit Ergebnissen von Englert et al., die bei der Untersuchung der mechanischen Integrität von Knorpelgewebeblöcken von Rindern ebenfalls  $10^{-11}$  M als wirksamste Konzentration angeben (Englert et al., 2006). Ein weiteres interessantes Ergebnis dieser Versuche ist die U-förmige Dosis-Wirkungs-Kurve der verwendeten E2 Lösungen (vgl. Abb. 7). Während die am geringsten konzentrierte Lösung ( $10^{-15}$  M) keine Effekte zeigte, markiert  $10^{-13}$  M die untere Grenze der antiapoptotischen Wirksamkeit und  $10^{-11}$  M das Wirkmaximum. Die nächsthöhere getestete Konzentration von  $10^{-9}$  M hatte jedoch den gegenteiligen Effekt, der Anteil apoptotischer Zellen lag wieder im Bereich der nur komprimierten Explantate. Vergleichbar geformte Dosis-Wirkungs-Kurven sind in der Literatur für eine Reihe von Untersuchungen wie z.B. zur Zelladhäsion von Endothelzellen in Kultur oder zum Wachstum Estrogen-sensibler Tumorzellen für E2 und Phytoestrogene beschrieben (Calabrese 2001).

### 4.3 Einfluss von E2 auf die Apoptose nach Kompression

Die beiden großen Versuchsreihen zum Effekt von E2 auf den Anteil apoptotischer Zellen nach Kompression zeigen eine deutliche antiapoptotische Wirkung des Estradiols (vgl. Abb. 8 und Abb. 9). Sowohl bei Explantaten mit intakter als auch mit beschädigter SFZ kommt es infolge der Stimulation mit E2 zu einer Reduktion des apoptotischen Zelluntergangs nach Kompression um ca. 77 % bzw. 70 %. Damit wird in beiden Versuchsreihen das Niveau der nicht-komprimierten Kontrollen erreicht, zu denen kein signifikanter Unterschied mehr besteht. Dieses Resultat bestätigt sich auch bei Überprüfung der am Htx-gefärbten Präparat erhobenen Daten mittels TUNEL-Assay. Die jeweiligen methodenbedingten Beschränkungen (s.o.) zeigen sich deutlich in unterschiedlich hohen Anteilen apoptotischer Zellen je nach Nachweismethode (vgl. Abb. 10 u. Abb. 11) mit durchschnittlich etwa 7-9fach höheren Werten bei Verwendung des TUNEL-Assays. Der statistische

## 4. Diskussion

---

Zusammenhang einer signifikanten Reduktion der Apoptose durch E2 ist jedoch bei beiden Nachweismethoden derselbe.

Der Nachweis dieser direkten Wirkung auf die zelluläre Komponente im Knorpelgewebe fügt sich als weiterer Baustein in das sich entwickelnde Arbeitsmodell der chondroprotektiven Wirkung von E2 ein (vgl. Tankó et al., 2008). Von besonderem Interesse ist dabei, dass in unserem Modell der Nachweis einer hormonellen Chondroprotektion gegenüber mechanisch verursachten Läsionen gelungen ist. Mechanische Über- und Fehlbelastung in Folge von Traumata, Achsfehlstellungen, Adipositas oder Tätigkeiten mit repetitiven belastenden Bewegungsmustern stellt einen wichtigen Risikofaktor für die Entwicklung einer OA dar (Garstang et al., 2006; Arden et al., 2006). Epidemiologische, klinische und experimentelle Studien weisen zudem auf eine wichtige Rolle von insbesondere peri- und postmenopausalem Estrogenmangel bei Frauen in der Pathogenese der OA hin (van Saase et al., 1989; Oliveria et al., 1995; Wluka et al., 2000; Hanna et al., 2004; Sowers et al., 2006; Roman-Blas et al., 2009). Auch wenn eine direkte Übertragung der *in vitro* an isoliertem hyalinem Knorpelgewebe gewonnenen Erkenntnisse auf die *In-vivo*-Situation im „Organ Gelenk“ mit Schwierigkeiten behaftet ist, können die vorliegenden Daten zu einem besseren Verständnis dieser klinischen Zusammenhänge beitragen.

### 4.4 Einfluss von E2 auf die Matrixdegradation nach Kompression

In den Versuchsreihen zur Matrixdegradation nach mechanischer Läsion zeigt sich wie erwartet und in der Literatur beschrieben (Loening et al., 2000; Kurz et al., 2001; D'Lima et al., 2001a; DiMicco et al., 2004) eine signifikante Erhöhung der sGAG-Freisetzung in die Kulturüberstände. Eine Inkubation mit E2 führt sowohl bei Explantaten mit intakter als auch mit beschädigter SFZ (vgl. Abs. 4.5) zu einer signifikanten Reduktion der sGAG-Freisetzung nach Kompression um ca. 40 % bzw. 24 % im Vergleich zu den nicht mit E2 behandelten komprimierten Explantaten.

Hiermit ist ein eindeutiger Nachweis einer protektiven Wirkung von E2 gegenüber Matrixdegradation nach mechanischer Läsion von Knorpelgewebe gelungen. Unklar bleibt aktuell, wann und wie E2 in den Prozess der Matrixdegradation eingreift. In

#### 4. Diskussion

---

einer Studie zu den Mechanismen der sGAG-Freisetzung nach mechanischer Läsion wurde die Wirkung von verschiedenen Inhibitoren von MMPs bzw. Aggrecanasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten untersucht (DiMicco et al., 2004). Die sGAG-Freisetzung innerhalb der ersten 24 Stunden ließ sich nicht pharmakologisch beeinflussen, was darauf schließen lässt, dass es sich hierbei um den rein mechanisch vermittelten Effekt der Zerstörung der Ultrastruktur des Gewebes handelt. In der Periode von 24-72 Stunden nach Kompression gelang jedoch eine Hemmung der GAG-Freisetzung mittels des MMP Inhibitors CGS27023A (DiMicco et al., 2004). Übertragen auf die vorliegende Studie liegt die Vermutung nahe, dass die nach 72 Stunden zu beobachtende Wirkung von E2 auf einer Hemmung des enzymatisch vermittelten Proteoglykan-Abbaus beruht, sei es durch Hemmung vorhandener MMPs im Gewebe oder, aufgrund der vielfältigen genomischen Wirkungen von E2 wahrscheinlicher, der Hemmung der Proteinbiosynthese von MMPs. Es werden jedoch in Zukunft weitere Studien zur Prüfung dieser Hypothesen nötig sein.

Ob ein kausaler Zusammenhang zwischen der antiapoptotischen Wirkung des E2 und der Hemmung der Matrixdegradation besteht, lässt sich anhand der vorliegenden Daten nicht eindeutig beantworten. D'Lima et al. haben jedoch in Untersuchungen mit einem Caspaseinhibitor sowohl weniger Apoptose als auch geringere sGAG-Freisetzung im Knorpelgewebe nach mechanischer Läsion beobachtet (D'Lima et al., 2001a). Dies lässt den Schluss zu, dass die Matrixdegradation infolge mechanischer Läsion zumindest teilweise mit der Zellvitalität im Gewebe zusammenhängt. Überträgt man diese Erkenntnisse auf das vorliegende Modell, so liegt der Schluss nahe, dass auch hier die antiapoptotische Aktivität des E2 zumindest für einen noch zu quantifizierenden Teil der beobachteten protektiven Effekte gegenüber der Matrixdegradation verantwortlich ist.

#### **4.5 Stellenwert der Superficialzone**

Die Superficialzone leistet im biomechanischen Modell des hyalinen Gelenkknorpels einen entscheidenden Beitrag zur Funktion des Gewebes, indem sie aufgrund ihrer hohen Flexibilität und Verformbarkeit (Buckley et al., 2010; Wong et al., 2003; Bevil

#### 4. Diskussion

---

et al., 2010) bei mechanischer Belastung der Gelenkfläche die auftretenden Kräfte verteilt und für eine Abdichtung der tiefer gelegenen Knorpelzonen verantwortlich ist (vgl. Abs. 1.3.3). Dies hat eine Begrenzung des Flüssigkeitsstromes und somit eine Retention von Flüssigkeit im Gewebe zur Folge, was aufgrund der Nicht-Komprimierbarkeit von Flüssigkeiten einen wichtigen Beitrag zur Funktion des Knorpels als elastisches Druckpolster im Gelenk leistet (Wong et al., 2003). Diese herausgehobene Funktion und die Tatsache, dass die Intaktheit der SFZ im Zuge von Fibrillationen und Fissurenbildung frühzeitig in der Pathogenese der OA gestört ist (Garstang et al., 2006), begründen das besondere Augenmerk auf ihren Stellenwert bezüglich der in dieser Arbeit untersuchten Parameter. Die diesbezüglichen Ergebnisse sind insofern bemerkenswert, als dass die Intaktheit der SFZ konträr zu ihrer oben erläuterten herausragenden Stellung im biomechanischen Modell keinen besonderen Einfluss auf die Wirkung von E2 im Rahmen des verwendeten Läsionsmodells hat.

Bezüglich der antiapoptotischen Wirkung von E2 zeigten sich keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen Gruppen von Explantaten, die mit intakter und solchen, die mit beschädigter SFZ komprimiert worden waren. Das Verhalten der beiden Kategorien von Explantaten war, was die Apoptoserate betrifft, in allen Versuchsreihen identisch (vgl. Abb. 10), d.h. sowohl die Größenordnung des apoptotischen Zelluntergangs als auch die antiapoptotische Wirksamkeit von E2 sind im untersuchten Läsionsmodell unabhängig von der Intaktheit der Knorpelarchitektur der Superficialzone.

Bezüglich der protektiven Wirkung von E2 gegenüber der Matrixdegradation nach Kompression war der protektive Effekt sowohl in Versuchsreihen mit Explantaten mit intakter als auch mit beschädigter SFZ gleichermaßen nachweisbar. Bei beschädigten Explantaten kam es jedoch insgesamt in allen Versuchsgruppen der jeweiligen Experimente zu einer signifikant höheren sGAG-Freisetzung als bei intakten Explantaten. Der protektive Effekt von E2 ist also in gleicher Weise, jedoch auf einem quantitativ insgesamt höheren Ausgangsniveau der sGAG-Freisetzung nachweisbar. Dieses Ergebnis erklärt sich vor dem Hintergrund der bereits diskutierten Funktion der Ultrastruktur des Knorpels (vgl. Abs. 1.3.3), insbesondere

## 4. Diskussion

---

der Fähigkeit des Kollagenetzwerkes, die aufgrund der elektrostatischen Abstoßung auseinanderstrebenden Proteoglykane vor Ort zu fixieren. Bei Beschädigung der SFZ wird auch das Kollagenetzwerk beschädigt, daher kommt es erwartungsgemäß in allen Versuchsgruppen mit beschädigter SFZ zu einem erhöhten Niveau der sGAG-Freisetzung.

Der fehlende Einfluss der SFZ auf die Apoptoserate ist weniger gut erklärbar. Eine Hypothese wäre, dass im verwendeten Läsionsmodell der laterale Fluss der Gewebsflüssigkeit aus den Explantaten im Gegensatz zur *In-vivo*-Situation ungehindert erfolgen konnte (vgl. Abs. 2.2.2 und Abs.1.3.3). Eine abdichtende Wirkung der SFZ konnte in dieser Situation nicht den Effekt haben, dass Flüssigkeit im Gewebe zurückgehalten wird, und daher auch nicht dazu beitragen, dass die Kompressionskräfte von der Flüssigkeitssäule getragen werden.

### 4.6. Beteiligte Rezeptoren

Es sind eine Reihe von molekularen Mechanismen für das Signalling von E2 beschrieben. Hierbei sind einerseits die klassischen Estrogen-Rezeptoren ER  $\alpha$  und  $\beta$ , mit cytosolischer oder membranständiger Lokalisation, sowie GP30 als weiterer membranständiger Rezeptortyp beschrieben (Roman-Blas et al. 2009). Hiervon ausgehend existieren verschiedene intrazelluläre Pathways die zu genomischen und nicht-genomischen Wirkungen des E2 führen können. Als zentrale second-messenger sind PI3K/MAPK sowie PLC/PKC identifiziert worden (Tankó et al., 2008; Roman-Blas et al. 2009).

In den Experimenten mit Ko-Inkubation mit E2 und dem SERM Fulvestrant zeigte sich eine signifikante teilweise Aufhebung des antiapoptotischen Effekts von E2, im Falle der sGAG-Freisetzung zeigte sich ein ähnlicher Befund, jedoch ohne statistische Signifikanz. Es kann daher als belegt gelten, dass die klassischen ER  $\alpha$  und  $\beta$  an der antiapoptotischen Wirkung des E2 beteiligt sind, für den protektiven Effekt gegenüber der Matrixdegradation kann dies aufgrund der vorliegenden Daten nicht angenommen werden. Es bleibt derzeit unklar ob diese Ergebnisse aufgrund der Beteiligung weiterer Estrogenrezeptoren wie z.B. GP30 zustande kommen, oder ob z.B. längere Inkubationsphasen mit Fulvestrant zu einer vollständigen Aufhebung

der E2-Effekte in beiden Fällen führen würden.

Eine genauere Differenzierung der intrazellulären molekularen Mechanismen ist ebenfalls außerhalb der Reichweite der zu den möglichen Signalwegen durchgeführten Experimente. Einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen böten z.B. Untersuchungen zur Rolle der Proteinkinase-C mit entsprechenden Inhibitoren, wie bereits von Kinney et al. Für eine andere Fragestellung an hyalinen Gelenkknorpelzellen etabliert (Kinney et al., 2005)

### **4.7 Schlussbemerkungen und Ausblick**

Zum Abschluss der vorliegenden Arbeit sollen die Ergebnisse nochmals kurz im Lichte der eingangs formulierten Zielsetzung und detaillierten Fragestellungen (vgl. Abs. 1.8) beleuchtet werden, und ein kurzer Ausblick auf weitere Forschungsthemen die sich aus den Ergebnissen ergeben, erfolgen.

Sowohl hinsichtlich der Hypothese eines antiapoptotischen Effektes von E2, als auch bezüglich der Hypothese einer Verringerung der Matrixdegradation ist mit den dargestellten Versuchsreihen ein eindeutiger, statistisch signifikanter Nachweis eines protektiven Effektes von E2 gegenüber Schäden der zellulären- und Matrix-Komponenten nach mechanischer Läsion von hyalinem Gelenkknorpelgewebe gelungen. Das zentrale Ziel der vorliegenden Arbeit konnte damit erreicht werden. Die Frage ob es sich hierbei um unabhängige oder zusammenhängende Effekte handelt wurde nicht bearbeitet, hier bietet z.B. die Arbeit von D'Lima et al. einen interessanten Ansatz für weitere Forschung zum möglichen verbindenden Element beider Effekte, die einen Effekt eines Caspaseinhibitors sowohl auf Apoptose als auch GAG-Freisetzung nach mechanischer Läsion nachgewiesen haben (D'Lima et al., 2001a).

Zu den überraschendsten Ergebnissen der vorliegenden Arbeit gehört der weitgehend fehlende Einfluss der SFZ auf die zu beobachtenden Effekte. Bis auf eine niedrigere sGAG-Freisetzung bei intakter SFZ ist kein weiterer Einfluss festzustellen. Dies steht zunächst im Widerspruch zu Ergebnissen anderer Forschungsgruppen über das Modell des hyalinen Gelenkknorpels. Hier wäre in Zukunft ein Vergleich mit Läsionsmodellen ohne ungehinderten lateralen Fluss

#### 4. Diskussion

---

notwendig, um festzustellen welche Ergebnisse modellbedingt sind, und welche die Verhältnisse *In-vivo* am ehesten widerspiegeln (vgl. Abs. 4.5). Festzuhalten bleibt, dass die protektive Wirkung von E2 nicht von der Intaktheit der SFZ abhängig ist, was den zukünftigen Einsatz von Estrogenen oder SERMs bei bereits vorhandenen Knorpelläsionen möglich erscheinen lässt.

Hinsichtlich der antiapoptotischen Wirkung des E2 ist im verwendeten Modell der Nachweis einer Beteiligung der klassischen Estrogenrezeptoren ER  $\alpha$  und  $\beta$  gelungen, auch wenn sich nicht alle beobachteten Estrogen-Effekte vollständig auf die Stimulation dieser Rezeptoren zurückführen liessen. Die matrixprotektive Wirkung des E2 liess sich nicht eindeutig auf eine Aktivierung der klassischen Rezeptoren zurückführen, es gibt jedoch Hinweise auf eine mögliche Beteiligung. Insgesamt kann hinsichtlich der Aufklärung der molekularen Mechanismen von einem ersten Schritt gesprochen werden, zur weiteren Differenzierung der beteiligten Rezeptoren und intrazellulären Pathways bieten sich im verwendeten Modell vielfältige zukünftige Ansatzpunkte (vgl. Abs. 4.6).

Zusammengefasst können die eingangs als Erkenntnisziele der vorliegenden Arbeit formulierten Fragestellungen als im wesentlichen beantwortet gelten (vgl. Abs. 1.8).

### 5. Zusammenfassung

Muskulo-skelettale Erkrankungen, insbesondere die Osteoarthrose, stellen eine zunehmende Herausforderung für die weltweiten Gesundheitssysteme dar. Die Biologie und Pathophysiologie des Gelenkknorpels ist daher seit längerem Gegenstand intensiver Forschung. Eine wichtige Facette ist dabei die Rolle von Sexualhormonen im Kontext von Knorpelhomöostase und -erkrankung. Vor dem Hintergrund zunehmender experimenteller und klinischer Evidenz einer protektiven Rolle von Estrogenen gegenüber Gelenksarthrose sollte in dieser Arbeit speziell die Hypothese eines protektiven Effektes von E2 gegenüber Schäden der zellulären- und Matrix-Komponenten in einem *In-vitro*-Modell mechanischer Überlastung von hyalinem Gelenkknorpelgewebe untersucht werden. Besonderes Augenmerk galt dabei dem Stellenwert der Superficialzone (SFZ). Diese ca. 100 µm dicke obere Knorpelschicht leistet im biomechanischen Modell des hyalinen Gelenkknorpels einen entscheidenden Beitrag zur Funktion des Gewebes, indem sie aufgrund ihrer hohen Flexibilität und Verformbarkeit bei mechanischer Belastung der Gelenkfläche die auftretenden Kräfte verteilt und für eine Abdichtung der tiefer gelegenen Knorpelzonen verantwortlich ist. Die daraus resultierende Retention von Flüssigkeit im Gewebe trägt aufgrund der Nicht-Komprimierbarkeit von Flüssigkeiten entscheidend zur Funktion des Knorpels als elastisches Druckpolster im Gelenk bei. Diese herausgehobene Funktion und die Tatsache, dass die Intaktheit der SFZ im Zuge von Fibrillationen und Fissurenbildung frühzeitig in der Pathogenese der OA gestört ist, begründen das besondere Augenmerk auf ihren Einfluss auf die in dieser Arbeit untersuchten Parameter. In einem weiteren Schritt sollte eine mögliche Beteiligung der klassischen Estrogenrezeptoren an den beobachteten Effekten untersucht werden. Ca. 1 mm dicke Explantate aus dem hyalinen Gelenkknorpel adulter Rinder wurden nach 24 h Vorinkubation mit E2 in physiologischer Konzentration einer einmaligen Kompression um 50 % ihrer Dicke mit einer Geschwindigkeit von 2 mm/s ausgesetzt. Dies geschah mit Explantaten mit und ohne intakte SFZ. In weiteren Versuchsreihen wurde zusätzlich der selektive Estrogenrezeptor-Antagonist Fulvestrant zugesetzt. Anschließend wurden als



## 5. Zusammenfassung

---

Parameter für zelluläre bzw. Matrixschäden erstens der Anteil apoptotischer Zellen lichtmikroskopisch, sowie zweitens die Höhe der sGAG-Freisetzung in die Kulturüberstände fotometrisch beurteilt. Sowohl hinsichtlich der Hypothese eines antiapoptotischen Effektes von E2, als auch bezüglich der Hypothese einer Verringerung der Matrixdegradation ist mit den dargestellten Versuchsreihen ein eindeutiger, statistisch signifikanter Nachweis eines protektiven Effektes von E2 gegenüber Schäden der zellulären- und Matrix-Komponenten nach mechanischer Läsion von hyalinem Gelenkknorpelgewebe gelungen. Inkubation mit E2 führt zu einer signifikant geringeren (70-77 %) Apoptoserate und ebenso signifikant geringeren (24-40 %) Freisetzung von sGAGs aus der Matrix nach einer einmaligen mechanischen Läsion des hyalinen Gelenkknorpels. Damit wird für beide Parameter das Niveau der nicht-komprimierten Kontrollen erreicht, zu denen kein signifikanter Unterschied mehr besteht. Das Fehlen der SFZ führt zu keinen signifikant anderen Ergebnissen, lediglich die absolute Höhe der sGAG-Freisetzung erhöht sich. Inkubation mit Fulvestrant führt zu einer teilweisen Aufhebung der o.g. Effekte von E2. Daraus lässt sich folgern, dass die protektive Wirkung von E2 nicht von der Intaktheit der SFZ abhängig ist. Bezüglich der molekularen Mechanismen zeigen sich in den Untersuchungen mit Fulvestrant Belege für eine Beteiligung der klassischen Estrogenrezeptoren  $ER\alpha$  und  $\beta$ , eine vollständige Aufklärung der für die beobachteten Effekte verantwortlichen Pathways liefern die durchgeführten Experimente jedoch nicht. Die Tatsache, dass in unserem Modell der Nachweis einer hormonellen Chondroprotektion gegenüber mechanisch verursachten Läsionen gelungen ist, fügt sich als weiterer Baustein in das sich entwickelnde Arbeitsmodell der chondroprotektiven Wirkung von E2 ein. Auch wenn eine direkte Übertragung der *in vitro* an isoliertem hyalinem Knorpelgewebe gewonnen Erkenntnisse auf die *In-vivo*-Situation mit Schwierigkeiten behaftet ist, können die vorliegenden Daten zu einem besseren Verständnis auch der klinischen Zusammenhänge beitragen und lassen eine zukünftige chondroprotektive Anwendung von E2 oder Estrogenrezeptor-Agonisten auch bei bereits arthrotisch geschädigtem Knorpel möglich erscheinen. Zur weiteren Differenzierung der beteiligten Rezeptoren und intrazellulären Pathways bieten sich im verwendeten Modell vielfältige zukünftige Ansatzpunkte.

## 6. Literaturverzeichnis

Abramson SB, Attur M: **Developments in the scientific understanding of osteoarthritis.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**:227 (doi: 10.1186/ar2655).

Arden N, Nevitt MC: **Osteoarthritis: Epidemiology.** *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2006, **20**:3-25.

Bevill SL, Thambyah A, Broom ND: **New insights into the role of the superficial tangential zone in influencing the microstructural response of articular cartilage to compression.** *Osteoarthritis Cartilage* 2010, **18**:1310-1318.

Buckley MR, Bergou AJ, Fouchard J, Bonassar LJ, Cohen I: **High resolution spatial mapping of shear properties in cartilage.** *J Biomechanics* 2010, **43**:796-800.

Calabrese EJ: **Estrogen and related compounds: biphasic dose responses.** *Crit Rev Toxicol* 2001, **4-5**:503-515.

Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y: **A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis.** *NeuroReport* 1995, **7**:61-64

Chen CT, Burton-Wurster N, Borden C, Hueffer K, Bloom SE, Lust G: **Chondrocyte necrosis and apoptosis in impact damaged articular cartilage.** *J Orthop Res* 2001, **19**:703-711.

Chen CT, Burton-Wurster N, Lust G, Bank RA, Tekoppele JM: **Compositional and metabolic changes in damaged cartilage are peak-stress, stress-Rate, and loading-duration dependent.** *J Orthop Res* 1999, **17**:870-879.

Chubinskaya S, Kuettner KE, Cole AA: **Expression of matrix metalloproteinases in normal and damaged articular cartilage from human knee and ankle joints.** *Lab Invest* 1999, **79**:1669-1677

Claassen H, Hassenpflug J, Schünke M, Sierralta W, Thole H Kurz B: **Immunohistochemical detection of estrogen receptor  $\alpha$  in articular chondrocytes from cows, pigs and humans: in situ and in vitro results.** *Ann Anat* 2001, **183**:223-227.

Claassen H, Schicht M, Paulsen F: **Impact of sex hormones, insulin, growth factors and peptides on cartilage health and disease.** *Prog Histochem Cytochem* 2011, **45**:239-293.

D'Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW Jr., Lotz MK: **Impact of mechanical trauma on matrix and cells.** *Clin Orthop Relat Res* 2001a, **391**:90-99.

## 6. Literaturverzeichnis

---

D´Lima DD, Hashimoto S, Chen PC, Colwell CW, Lotz MK: **Human chondrocyte apoptosis in response to mechanical injury.** *Osteoarthritis Cartilage* 2001b, **9**:712-719.

Diem K, Lentner C: **Wissenschaftliche Tabellen – Documenta Geigy.** *Geigy Pharmazeutika, Wehr (Baden)* 1973, 7. Auflage, 2. Nachdruck.

DiMicco MA, Patwari P, Siparsky PN, Kumar S, Pratta MA, Lark MW, Kim YJ, Grodzinsky AJ: **Mechanisms and kinetics of glycosaminoglycan release following in vitro cartilage injury.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:840-848.

Dini L, Coppola S, Ruzittu MT, Ghibelli L: **Multiple pathways for apoptotic nuclear fragmentation.** *Exp Cell Res* 1996, **223**:340-347.

Earnshaw WC: **Nuclear changes in apoptosis.** *Curr Opin Cell Biol* 1995, **7**:337-343.

Englert C, Blunk T, Fierbeck J, Kaiser J, Stosiek W, Angele P, Hammer J, Straub RH: **Steroid hormones strongly support bovine articular cartilage integration in the absence of interleukin-1 $\beta$ .** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:3890-3897.

Ewald K: **Untersuchungen zum Einfluss von 17 Beta-Estradiol auf die von proinflammatorischen Zytokinen induzierte Schädigung des weiblichen Rinder-Meniskus.** *Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel* 2010. S.19-20;S.47.

Farndale RW, Buttle DJ, Barrett A: **Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue.** *Biochim Biophys Acta* 1986, **883**:173-177.

Felson DT, Zhang Y: **An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention.** *Arthritis Rheum* 1998, **41**:1343-1355.

Frank EH, Jin M, Loening AM, Levenston ME, Grodzinsky AJ: **A versatile shear and compression apparatus for mechanical stimulation of tissue culture explants.** *J Biomech* 2000, **33**:1523-1527.

Garstang SV, Stitik TP: **Osteoarthritis: epidemiology, risk factors, and pathophysiology.** *Am J Phys Med Rehabil* 2006, **85(Suppl)**:2-11.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA: **Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear dna fragmentation.** *J Cell Biol* 1992, **119**:493-501.

## 6. Literaturverzeichnis

---

- Grasl-Kraupp B, Ruttkay-Nedecky B, Koudelka H, Bukowska K, Bursch W, Schulte-Hermann R: **In situ detection of fragmented DNA (TUNEL assay) fails to discriminate among apoptosis, necrosis, and autolytic cell death: a cautionary note.** *Hepatology* 1995, **21**: 1465-1468
- Hanna FS, Wluka AE, Bell RJ, Davis SR, Cicuttini FM: **Osteoarthritis and the postmenopausal woman: epidemiological, magnetic resonance imaging, and radiological findings.** *Semin Arthritis Rheum* 2004, **34**:631-636.
- Hardingham TE, Fosang AJ: **Proteoglycans: many forms and functions.** *FASEB J* 1992, **6**:861-870. *J Orthop Res* 2001, **19**:1140-1146.
- Hodge WA, Fijan RS, Carlson KL, Burgess RG, Harris WH, Mann RW: **Contact pressures in the human hip joint measured in vivo.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1986, **83**:2879-2883.
- Howell A, Osborne CK, Morris C, Wakeling AE: **ICI 182,780 (Faslodex™) Development of a novel „pure“ antiestrogen.** *CANCER* 2000, **89**:817-825. *J Orthop Res* 2001, **19**:1140-6.
- Kinney RC, Schwartz Z, Week K, Lotz MK, Boyan BD: **Human articular chondrocytes exhibit sexual dimorphism in their responses to 17 $\beta$ -estradiol.** *Osteoarthritis Cartilage* 2005, **13**:330-337.
- Knudson CB, Knudson W: **Cartilage proteoglycans.** *Semin Cell Dev Biol* 2001, **12**:69-78.
- Kühn K, D'Lima DD, Hashimoto S, Lotz M: **Cell death in cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**:1-16.
- Kurz B, Jin M, Patwari P, Cheng DM, Lark MW, Grodzinsky AJ: **Biosynthetic response and mechanical properties of articular cartilage after injurious compression.** *J Orthop Res* 2001, **19**:1140-1146.
- Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ, Schünke M: **Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury.** *Ann Anat* 2005, **187**:473-85.
- Kurz B, Lemke AK, Kehn M, Domm C, Patwari P, Frank EH, Grodzinsky AJ, Schünke M: **Influence of tissue maturation and antioxidants on the apoptotic response of articular cartilage after injurious compression.** *Arthritis Rheum* 2004, **50**:123-130.
- Lee JH, Fitzgerald JB, DiMicco MA, Grodzinsky AJ: **Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression.** *Arthritis Rheum* 2005, **52**:2386-2395.

## 6. Literaturverzeichnis

---

Lin PM, Chen CC, Torzilli PA: **Increased stromelysin-1 (MMP-3), proteoglycan degradation (3B3- and 7D4) and collagen damage in cyclically load-injured articular cartilage.** *Osteoarthritis Cartilage* 2004, **12**:485-496.

Loening AM, Jan IE, Levenston ME, Badger AM, Frank EH, Kurz B, Nuttall ME, Hung HH, Blake SM, Grodzinsky AJ, Lark MW: **Injurious mechanical compression of bovine articular cartilage induces chondrocyte apoptosis.** *Arch Biochem Biophys* 2000, **381**:205-212.

Mow VC, Holmes MH, Lai WM: **Fluid transport and mechanical properties of articular cartilage: a review.** *J Biomechanics* 1984, **17**:377-394.

Murphy G, Lee MH: **What are the roles of metalloproteinases in cartilage and bone damage?** *Ann Rheum Dis* 2005, **64**:iv44-iv47 (doi:10.1136/ard.2005.042465).

Murphy G, Nagase H: Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair? *Nat Clin Pract Rheumatol* 2008, **4**:128-135.

Nagase H, Kashiwagi M: **Aggrecanases and cartilage matrix degradation.** *Arthritis Res Ther* 2003, **5**:94-103.

Nelson LR, Bulun SE: **Estrogen production and action.** *J Am Acad Dermatol* 2001, **45**:116-124.

Nuki G: **Osteoarthritis: a problem of joint failure.** *Z Rheumatol* 1999, **58**:142-147.

Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM: **Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization.** *Arthritis Rheum* 1995, **38**:1134-1141.

Pufe T, Lemke A, Kurz B, Petersen W, Tillmann B, Grodzinsky AJ, Mentlein R: **Mechanical overload induces VEGF in cartilage discs via hypoxia-inducible factor.** *Am J Pathol* 2004, **164**:185-192.

Quinn TM, Allen RG, Schalet BJ, Perumbuli P, Hunziker EB: **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**:242-249.

Quinn TM, Grodzinsky AJ, Hunziker EB, Sandy JD: **Effects of injurious compression on matrix turnover around individual cells in calf articular cartilage explants.** *J Orthop Res* 1998, **16**:490-499.

Richette P, Laborde K, Boutron C, Bardin T, Corvol MT, Savouret JF: **Correlation between serum and synovial fluid estrogen concentrations: comment on the article by sowers et al.** *Arthritis Rheum* 2007, **6**:698.

## 6. Literaturverzeichnis

---

Robertson CM, Pennock AT, Harwood FL, Pomerleau AC, Allen RT, Amiel D: **Characterization of pro-apoptotic and matrix-degradative gene expression following induction of osteoarthritis in mature and aged rabbits.** *Osteoarthritis Cartilage* 2006, **14**:471-476.

Roman-Blas JA, Castañeda S, Largo R, Herrero-Beaumont G: **Osteoarthritis associated with estrogen deficiency.** *Arthritis Res Ther* 2009, **11**:241 (doi:10.1186/ar2791)

Saraste A, Pulkki K: **Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis.** 2000, *Cardiovasc Res* **45**:528-537.

Sasano H, Uzuki M, Sawai T, Nagura H, Matsunaga G, Kashimoto O, Harada N: **Aromatase in Human Bone Tissue.** *J Bone Miner Res* 1997, **12**:1416-1423.

Schallenberger E, Schöndorfer AM, Walters DL: **Gonadotrophins and ovarian steroids in cattle. I. Pulsatile changes of concentrations in the jugular vein throughout the oestrous cycle.** *Acta Endocrinologica* 1985, **108**:312-321.

Sowers MF, McConnel D, Jannausch M, Buyuktur AG, Hochberg M, Jamadar DA: **Estradiol and its metabolites and their association with knee osteoarthritis.** *Arthritis Rheum* 2006, **54**:2481-2487.

Takeuchi S, Mukai N, Tateishi T, Miyakawa S: **Production of sex steroid hormones from DHEA in articular chondrocyte (sic!) of rats.** *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007, **293**:410-415.

Tanamas SK, Wijethilake P, Wluka AE, Davies-Tuck ML, Urquhart DM, Wang Y, Cicuttini FM: **Sex hormones and structural changes in osteoarthritis: a systematic review.** *Maturitas* 2011, **69**:141-156.

Tankó LB, Søndergaard BC, Oestergaard S, Karlsdal MA, Christiansen C: **An update review of cellular mechanisms conferring the indirect and direct effects of estrogen on articular cartilage.** *Climacteric* 2008, **11**:4-16.

Tew SR, Kwan APL, Hann A, Thomson BM, Archer CW: **The reactions of articular cartilage to experimental wounding. Role of apoptosis.** *Arthritis Rheum* 2000, **43**:215-225.

Torzilli PA, Grigiene R, Borrelli JJr, Helfet DL: **Effect of impact load on articular cartilage: cell metabolism and viability, and matrix water content.** *J Biomech Eng* 1999, **121**:433-441.

Umlauf D, Frank S, Pap T, Bertrand J: **Cartilage biology, pathology, and repair.** *Cell Mol Life Sci* 2010, **67**:4197-4211.

## 6. Literaturverzeichnis

---

Ushiyama T, Ueyama H, Inoue K, Ohkubo I, Hukuda S: **Expression of genes for estrogen receptors and in human articular chondrocytes.** *Osteoarthritis Cartilage* 1999, **7**:560–566.

van Saase JL, van Romunde LK, Cats A, Vandenbroucke JP, Valkenburg HA: **Epidemiology of osteoarthritis: zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a dutch population with that in 10 other populations.** *Ann Rheum Dis* 1989, **48**:271-280.

Wakeling AE, Bowler J: **ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential.** *J Biochem Molec Biol* 1992, **43**:173-177.

Watson CS, Alyea RA, Jeng YJ, Kochukov MY: **Nongenomic actions of low concentration estrogens and xenoestrogens on multiple tissues.** *Mol Cell Endocrinol* 2007, **274**:1-7.

Wilson W, van Donkelaar CC, van Rietbergen B, Huiskes R: **A fibril-reinforced poroviscoelastic swelling model for articular cartilage.** *J Biomechanics* 2005, **38**:1195-1204.

Wluka AE, Cicuttini FM, Spector TD: **Menopause, oestrogens and arthritis.** *Maturitas* 2000, **35**:183-199.

Wluka AE, Davis SR, Bailey M, Stuckey SL, Cicuttini FM: **Users of oestrogen replacement therapy have more knee cartilage than non-users.** *Ann Rheum Dis* 2001, **60**:332-336.

Wong M, Carter DR: **Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective.** *Bone* 2003, **33**:1-13.

Zhang D, Trudeau VL: **Integration of membrane and nuclear estrogen receptor signaling.** *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 2006, **144**:306-315.

### **Bildnachweis**

Für das Überlassen der den Abbildungen 1,2 und 3 zugrundeliegenden Zeichnungen danke ich dem Georg Thieme Verlag, die Modifikationen erfolgten durch mich.

## Danksagung

Mein Dank geht an Prof. Bodo Kurz und Prof. Michael Schünke für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung des Promotionsthemas sowie die vielfältige freundliche Unterstützung während der Forschungszeit. Danken möchte ich meinen Kolleginnen und Kollegen sowie allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Anatomischen Instituts für Gespräche, Austausch, Hilfe, Kaffee und Kuchen. Insbesondere herzlich danken möchte ich Rita Kirsch und Frank Lichte für hervorragende technische Unterstützung und Hilfe, die weit über das normale beruflich zu erwartende Maß hinausging. Bettina Schröder danke ich für ihre logistische Unterstützung und Ingrid Offermann für Hilfe bei administrativen Fragen und allem und jedem vom Bleistift über den Kopierer bis zum Taschenrechner.

Otfried Frandsen danke ich insbesondere für seine Unterstützung bei allen Anliegen zu Computern und Technik und Clemens Franke für seine Hilfe bei den Zeichnungen und Grafiken. Prof. Rolf Mentlein möchte ich danken für einige kurze, aber umso aufschlussreichere Gespräche zur Arbeit mit Estrogenen und PD Dr. Martina Böttner für zahlreiche Gespräche und ihre unkomplizierte Hilfe. Prof. AJ Grodzinsky habe ich zu danken für seine freundlichen Kommentare zur Publikation meiner Daten und Dr. Elliott Frank für technische Ferndiagnostik und Hilfe zu Beginn des Projekts, als sie am dringendsten nötig war. Meinen ehemaligen KommilitonInnen und jetzigen KollegInnen Birte Lang sowie Jan und Miriam Oelbe danke ich für ihre Freundschaft und Unterstützung während des Studiums sowie die Gespräche über Freud und Leid unserer jeweiligen Dissertationsprojekte. Ebenso danke ich meiner Schwester Anne, ohne deren beruhigendes Zureden ich nie die ärztliche Prüfung bestanden hätte. Dass ich ohne meine Eltern nicht da wäre, wo ich bin, versteht sich von selbst.

*Wenn nun das Ganze Euch wohl gefallen hat, so klatscht Beifall, und entlasst uns alle mit Dank nach Hause*

*(Gaius Octavius zugeschrieben – Sueton, Caesar Octavianus Augustus)*



## **Lebenslauf**

Name Jan Michael Imgenberg

Geburtsdatum/-ort 17.06.1981 in Herdecke

Familienstand ledig

## **Schullaufbahn**

1987-2000 Grundschule und Gymnasium in Witten

1997-1998 Gibson-City-Melvin-Sibley-Highschool in Gibson City, Illinois, USA

## **Zivildienst**

08/2000-06/2001 Bodelschwingh-Haus des Diakonischen Werkes Dortmund

## **Ausbildung und Studium**

10/2001-03/2004 Studium der Soziologie in Marburg und Berlin

10/2003-09/2006 Ausbildung am Institut für Phytotherapie und Heilpraktikerschule in Berlin

10/2006-10/2012 Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität in Kiel

10/2012 Erteilung der ärztlichen Approbation

## **Berufstätigkeit**

04/2013 Chirurgischer Assistenzarzt am Klinikum Nordfriesland, Husum

## **Publikationen/Abstracts/Poster**

Imgenberg J, Schünke M, Grodzinsky AJ, Kurz B: 17 $\beta$ -Estradiol reduces apoptosis and extracellular matrix degeneration after injurious compression of bovine articular cartilage explants. *56<sup>th</sup> Trans Orthop Res Soc* 2010, New Orleans, March 6-9.

Hufeland M, Schünke M, Grodzinsky AJ, Imgenberg J, Kurz B: Response of mature meniscal tissue to a single injurious compression and interleukin-1 in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 2013, 21:209-216.

Imgenberg J, Rolaufts B, Grodzinsky AJ, Schünke M, Kurz B: Estrogen reduces mechanical injury-related cell death and proteoglycan degradation in mature articular cartilage independent of the presence of the superficial zone tissue. *Osteoarthritis Cartilage* 2013, 21(11):1738-45.