

Vergleich von bovinen Knorpelzell-Inflammodellen mit dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades (Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Sarah Kurth

aus Euskirchen

2025

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Frank A. Schildberg
2. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope

Tag der mündlichen Prüfung: 04.08.2025

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie

Ich widme diese Arbeit meiner Familie, für ihre Liebe, ihren unerschütterlichen Glauben an mich und ihre Unterstützung in allen Lebenslagen.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
1. Einleitung	10
1.1 Aufbau von Gelenkknorpel	10
1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren	13
1.3 Pathogenese der Arthrose	16
1.4 Rolle von IL-1 β	18
1.5 <i>In-vitro</i> Inflammationsmodelle	19
1.6 Fragestellung	22
2. Material und Methoden	23
2.1 Material	23
2.1.1 Instrumente	23
2.1.2 Reagenzien	24
2.1.3 Puffer und Lösungen	26
2.2 Experimenteller Aufbau	28
2.3 Zellisolierung	29
2.4 Subkultur konfluenter Monolayer	30
2.5 Pellet-Kultur	31
2.6 IL-1 β	31
2.7 Analysen	31
2.8 Biochemische Analysen	32
2.8.1 DNA-Quantifizierung	32
2.8.2 GAG-Quantifizierung	32
2.8.3 Hydroxyprolin-Assay	33
2.8.4 IL-6 ELISA	33
2.8.5 NO-Analyse	34
2.9 RNA-Extraktion und mRNA-Expressionsanalyse	34
2.9.1 RNA-Extraktion	34
2.9.2 Reverse Transkription	35
2.9.3 TaqMan RT-PCR	35
2.10 Histologie	36
2.10.1 Safranin O/Fast Green Färbung	36

2.11 Statistik	36
3. Ergebnisse	38
3.1 Anabole Marker	38
3.2 Dedifferenzierung	47
3.3 Katabole Marker	50
3.4 Inflammation	53
4. Diskussion	59
4.1 Anabole Marker und Dedifferenzierung	59
4.2 Katabole Marker	66
4.3 Inflammation	70
4.4 Sind derzeit gebräuchliche <i>in-vitro</i> Modelle vergleichbar?	78
4.5 Was braucht es zur Standardisierung?	84
4.6 Translation in die klinische Anwendung	85
4.7 Limitationen	86
5. Zusammenfassung	88
6. Abbildungsverzeichnis	89
7. Tabellenverzeichnis	91
8. Literaturverzeichnis	92
9. Erklärung zum Eigenanteil	102
10. Danksagung	103

Abkürzungsverzeichnis

ACT	Autologe Chondrozytentransplantation
ADAMTS	A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs
BMI	Body Mass Index
BSA	Bovine Serum Albumin
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
COX-2	Cyclooxygenase 2
CT	Cycle Threshold
DAMP	Danger-associated molecular patterns
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecoo's Modified Eagle Medium
DMMB	1,9-Dimethyl-Methylen Blau
(c)DNA	(komplementäre) Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DPBS	Dulbecoo's phosphate buffered saline
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EZM	Extrazellulärmatrix
FBS	Fetal Bovine Serum
g	Erdschwerebeschleunigung
(s)GAG	(sulfatiertes) Glykosaminoglykan
GEDA	Gesundheit in Deutschland aktuell
ICRS	International Cartilage Research Society

I κ B	Inhibitor of NF- κ B
IL-1 β	Interleukin-1 beta
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
kDa	Kilodalton (atomare Masseneinheit)
KI	Konfidenzintervall
M, μ M	Molar, Mikromolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
ml, μ l	Milliliter, Mikroliter
NaOH	Natriumhydroxid
NED	N-1-Naphtylethylendiamindihydrochlorid
NF- κ B	Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂ ⁻	Nitrit
(i)NOS	(induzierbare) Stickstoffmonoxid-Synthase
PBS	Phosphate buffered saline
(RT-)PCR	(Real Time-)Polymerase Chain Reaction
PDL	Population Doubling Level
PGE2	Prostaglandin E2
PRG-4	Proteoglykan 4
P/S	Penicillin Streptomycin
(m)RNA	(Messenger-) Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Sox-9	SRY-box transcription factor 9
TIMP-1	Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1-Genexpression
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
U	Unit

1. Einleitung

1.1 Aufbau von Gelenkknorpel

Der menschliche Körper weist verschiedene Arten an Knorpel auf. In der Ohrmuschel oder im Respirationstrakt findet sich beispielsweise Knorpel vom elastischen Typ, während die Bandscheiben und Menisken aus Faserknorpel aufgebaut sind. Hyaliner Knorpel, auch Gelenkknorpel genannt, bedeckt die Gelenk-bildenden Enden der Knochen. Hyaliner Knorpel übernimmt wichtige Funktionen: er hält hohen mechanischen Kräften bei geringer Reibung stand und erleichtert somit die Bewegung (Emans und Peterson L. 2014), dient als Stoßdämpfer und reduziert die auf den subchondralen Knochen einwirkenden Kräfte (Bhosale und Richardson 2008). Gelenkknorpel hat eine arkadenartige Struktur. Die Extrazellulärmatrix (EZM) besteht aus Wasser (65-80 %), Kollagenen (12-21 %), Proteoglykanen (6-10 %) und anderen Glykoproteinen (2-3,5 %) (Caron et al. 2014). Kollagen Typ 2 hat mit ca. 90 % den größten Anteilen an den Kollagenen und zählt zu den Hauptbestandteilen hyalinen Knorpels. Des Weiteren enthält er die Kollagene 4, 9, 10 und 11 sowie Aggrecan und Hyaluronan. Aggrecan ist ein Proteoglykan mit einem zentralen Protein, an welches kovalent Glykosaminoglykane (GAG) gebunden sind, vor allem Keratansulfat und Chondroitinsulfat. Hyaluronan wiederum ist ein Polymer aus Disaccharid-Einheiten, welches an Aggrecan gebunden vorliegt. Die negativen Ladungen der GAG führen zur gegenseitigen Abstoßung, was in einem expandierten Zustand der Matrix resultiert (Emans und Peterson L. 2014). So kann diese als Wasserspeicher dienen. Bei Beanspruchung wird Wasser abgegeben und in Ruhe wieder aufgenommen. Dies ist ein wesentlicher Grund für die Elastizität (Armiento et al. 2019) und Verformbarkeit (Bhosale und Richardson 2008) des Gelenkknorpels. Hyaliner Knorpel enthält nur wenige Zellen. Dabei handelt es sich um spezielle Zellen, sogenannte Chondrozyten, die nur 1-5 % des gesamten Matrixvolumens ausmachen. Die Zellkommunikation erfolgt über die EZM, da die Zellen untereinander keine Zell-Zell-Kontakte aufweisen. Eine weitere Besonderheit der Chondrozyten ist, dass sie die einzigen Zellen im menschlichen Körper sind, die ihre eigene Matrix produzieren. Gelenkknorpel verfügt weder über Blut- oder Lymphgefäße noch über eine Innervierung. Die Ernährung des Gewebes findet über Diffusion aus der Synovialflüssigkeit im Gelenkspalt und dem subchondralen Knochen

statt. Zudem herrscht im Knorpel eine geringe Sauerstoffkonzentration von 1-6 % (Huang et al. 2019), sodass die Chondrozyten einen anaeroben Stoffwechsel aufweisen. Daraus resultiert die limitierte Regenerationsfähigkeit des Knorpels (Emans und Peterson L. 2014).

Gelenkknorpel besteht aus insgesamt vier Zonen: die oberflächliche Zone, die Übergangszone, die tiefe (oder mittlere) Zone und die verkalkte Knorpelzone (siehe Abbildung 1). Der Aufbau und die Funktionen der Knorpelzonen wurden häufig in der Literatur beschrieben (Armiento et al. 2019, Bhosale und Richardson 2008 oder Caron et al. 2014). Die oberflächliche Zone ist die dünnste Zone. Die Zellen liegen hier parallel zur Gelenkoberfläche. Sie weist einen hohen Gehalt an Kollagen und einen niedrigen Gehalt an Proteoglykanen im Vergleich zu den anderen Zonen auf. Zudem ist sie die Zone mit dem höchsten Wassergehalt (80 %). Die Kollagenfibrillen sind ebenfalls parallel angeordnet und sorgen damit für eine hohe Zug- und Scherfestigkeit. Zudem verteilen sie die Last gleichmäßig auf die Oberfläche und schützen damit die tiefer gelegenen Zonen. Die oberflächliche Zone ist mit Lubricin bedeckt und verleiht den Gelenkflächen damit eine gute Gleitfähigkeit gegeneinander. Außerdem stellt sie eine Schutzschicht vor dem körpereigenen Immunsystem dar, indem sie als Filter für Makromoleküle dient. Die Übergangszone hat eine geringere Zelldichte und die Kollagenfasern und Zellen sind hier willkürlich angeordnet. Die Konzentration an Aggrecan ist in dieser Zone höher, sodass Druckkräften besser standgehalten werden kann. In der tiefen Zone sind die Zellen radial in Säulen angeordnet. Es ist die zellärmste Zone. Die Kollagenfibrillen stehen senkrecht zur Gelenkoberfläche und weisen hier von allen Zonen den größten Durchmesser auf. Damit bieten sie den größten Widerstand und somit Schutz vor Druckkräften. Auch der Gehalt an Proteoglykanen ist hier am höchsten. Der Übergang zur vierten Zone wird „Tidemark“ genannt und kennzeichnet den Beginn des weniger belastbaren subchondralen Knochens. An der Tidemark werden Scherkräfte in Druckkräfte umgewandelt und auf den Knochen übertragen. In der verkalkten Knorpelzone, welche dem subchondralen Knochen unmittelbar aufliegt, liegen nur wenige Zellen in einer verkalkten Matrix vor. Diese Zone verankert die Kollagenfibrillen mit dem subchondralen Knochen. Der Wassergehalt beträgt nur noch 65 %. Die Stoffwechselaktivität der Chondrozyten ist sehr gering und die Zellen weisen einen hypertrophen Phänotyp auf. Das hier synthetisierte Kollagen 10 dient der Knorpelmineralisierung.

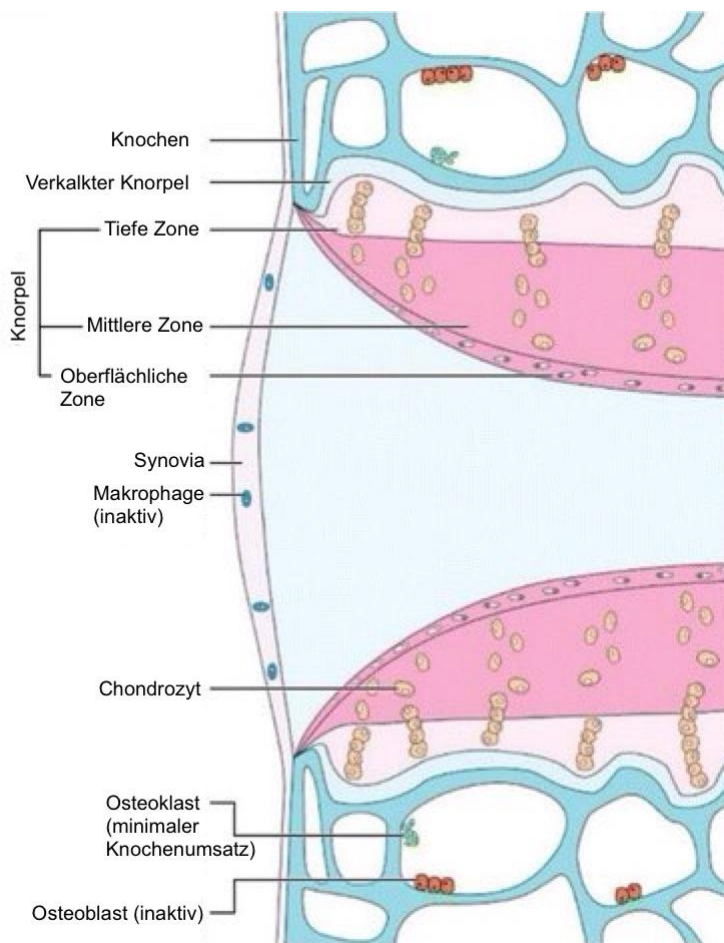


Abb. 1: Aufbau gesunden Gelenkknorpels. Modifiziert nach Kuyinu et al. 2016.

Echte Gelenke (Diarthrosen) sind eine bewegliche Verbindung zwischen Knochen. Sie bestehen aus Gelenkkörpern (Knochen), die mit Gelenkknorpel überzogen sind, einem Gelenkspalt mit Gelenkflüssigkeit (Synovia) und einer umgebenden Gelenkkapsel, welche einen abgeschlossenen Hohlraum, die Gelenkhöhle, bildet (siehe Abbildung 2). Die äußere Schicht der Kapsel besteht aus Bindegewebe, die innere Schicht, die Synovialmembran, produziert die Synovia. Die Kapsel kann z.T. durch Kapselbänder verstärkt sein. Weitere Hilfsstrukturen von Gelenken sind beispielsweise Bänder, Schleimbeutel oder Gelenkzwischenscheiben.

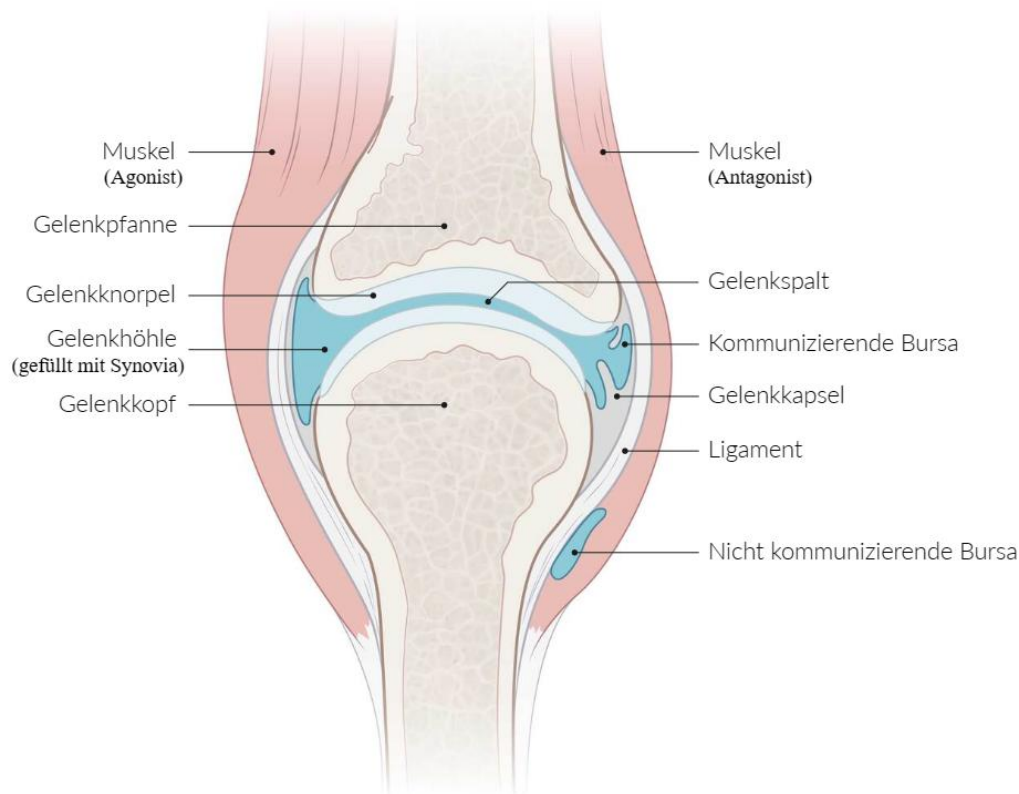


Abb. 2: Aufbau eines echten Gelenks. Modifiziert nach AMBOSS SE 2024.

1.2 Epidemiologie und Risikofaktoren

Arthrose zählt zu den häufigsten chronischen Erkrankungen. Frauen sind hiervon häufiger betroffen als Männer. In der Studie *Gesundheit in Deutschland aktuell* (GEDA) von 2019/2020 waren im Durchschnitt 21,6 % (95 %-Konfidenzintervall (KI) 20,5-22,7) der Frauen und 12,4 % (95 %-KI 11,5-13,4) der Männer betroffen. Mit dem Alter steigt auch die Prävalenz. So waren Frauen ≥ 80 Jahren zu 47,3 % (95 %-KI 42,4-52,1) und Männern ≥ 80 Jahren zu 31,6 % (95 %-KI 26,7-36,9) betroffen. Zudem wurde bei Frauen ein Bildungsgradient in Bezug auf Arthrose festgestellt. Frauen mit niedrigem Bildungsniveau litten deutlich häufiger unter Arthrose als Frauen mit hohem Bildungsniveau. Dies könnte mit der beruflichen Situation und schwerer körperlicher Arbeit zusammenhängen (Heidemann et al. 2021). Die Patienten suchen einen Arzt allerdings erst dann auf, wenn bereits Symptome wie Schmerzen oder Unbeweglichkeit vorliegen. Im Röntgen fallen Veränderungen wie ein verschmälertes Gelenkspalt, subchondrale Sklerose, Geröllzysten

und Osteophytenbildung auf. Der Diagnose voraus gehen aber bereits Jahre unbemerkter, langsamer Degeneration und Umbauprozesse (Kuyinu et al. 2016).

Das Alter zählt zu den größten Risikofaktoren. Im Alter nimmt die anabole Aktivität der Chondrozyten ab und die Expression Seneszenz-assoziiierter Enzyme zu. Die EZM verändert sich. So verliert Aggrecan an Größe und die Kollagenvernetzung steigt. Diese strukturellen Veränderungen führen zur Ausdünnung des Gelenkknorpels und zur weiteren Abnahme der ohnehin schon geringen Reparaturfähigkeit (Matsushita und Kuroda 2014). Mit jeder Lebensdekade steigt das Risiko für Arthrose. In der *Framingham Osteoarthritis Study* von Felson et al. 1997 betrug das Risiko für 30-40-Jährige an Arthrose zu erkranken 12,9 % und für >80-Jährige 43,7 %. Eine Vielzahl weiterer Faktoren führt zum Zusammenbruch der Homöostase und einer erniedrigten Belastungsschwelle der Chondrozyten. Zu diesen Faktoren zählen z.B. Akkumulation von Desoxyribonukleinsäure (DNA)-Schäden, somatische Mutationen, Abnahme der Telomerlänge, Schäden an Proteinen und Lipiden, mitochondriale Dysfunktion und oxidativer Stress. Die mitochondriale Dysfunktion begünstigt die Entstehung von Krankheiten wie Arthrose. Es kommt zur Abnahme mitochondrialer Masse, DNA und Proteinen. Auch die Genexpression antioxidativer Faktoren wird herunterreguliert, sodass es zu einem Ungleichgewicht zwischen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und antioxidativen Faktoren kommt. ROS greifen in Signalwege ein, indem posttranslationale Modifizierungen an reaktiven Cysteinen stattfinden. Diese dysregulierten Signalwege und die veränderte synthetische Aktivität, der sogenannte Seneszenz-assoziierte sekretorische Phänotyp, resultieren in vermehrter Produktion von Matrixmetalloproteinasen (MMP) und proinflammatorischer Zytokine wie bspw. Interleukin-6 (IL-6). Das proinflammatorische Milieu erhöht das Risiko für Arthrose. Durch den Verlust der Fähigkeit zur Autophagie kommt es letztendlich zum Zelltod und Entstehung der Arthrose (Goldring und Otero 2011; He et al. 2020; Loeser et al. 2016).

Auch Adipositas (Body Mass Index (BMI) $>30 \text{ kg/m}^2$) begünstigt die Entstehung der Arthrose. Zum einen stellt das höhere Körpergewicht eine mechanische Belastung für die Gelenke dar. Beim Gehen wirkt das drei- bis sechsfache des Körpergewichts auf die Gelenke der unteren Extremitäten ein. Zum anderen hat Fettgewebe selbst eine endokrine Funktion und ist oft mit dem metabolischen Syndrom assoziiert. Im Alter steigt

der Anteil an viszeralem Fettgewebe und mit ihm der Gehalt an Adipozyten und Makrophagen. Fettgewebe sezerniert Adipokine, welche dafür sorgen, dass bei adipösen Patienten durchgehend geringgradig erhöhte Entzündungswerte vorliegen. Es wird ein direkter Einfluss auf die Knorpelhomöostase vermutet. Im Gelenk führt dieser Stimulus zur Synthese von Zytokinen, MMPs und Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS). Zusätzlich wurden erhöhte Spiegel an freien Fettsäuren, Hyperglykämie und oxidativer Stress beobachtet, die zur Destruktion der Knorpelmatrix führen können. Adipositas stellt in allen Altersgruppen einen Risikofaktor dar (Goldring und Otero 2011; He et al. 2020; Loeser et al. 2016). Lokale Fettpolster wie der Hoffa-Fettkörper (Corpus adiposum infrapatellare) wachsen im Laufe des Lebens. Aufgrund seiner Nähe zum Gelenk wäre es denkbar, dass dieser ebenfalls zur Entstehung der Arthrose beiträgt. Allerdings wurde in *in-vitro* Studien bisher eher ein protektiver Effekt beobachtet (Loeser et al. 2016).

Traumata, ob einmalig oder wiederholte Mikrotraumata, führen zu Gelenkinstabilität, intraartikulären Frakturen und abnormen Belastungsvektoren und schädigen so den Gelenkknorpel. Aufgrund der nur bedingten Reparaturfähigkeit der Chondrozyten erhöht dies das Risiko für bzw. führt häufig zu einer posttraumatischen Arthrose. Zeitlich betrachtet entwickelt sich diese schneller als die altersbedingten degenerativen Veränderungen. Durch das Trauma und die einwirkenden Kräfte kommt es zusätzlich zu einem direkten Verlust an Zellen durch Nekrose und Apoptose. Als Folge darauf steigt die Synthese an ROS und NOS, was den Knorpel zusätzlich schädigt. Die Chondrozyten wechseln von einer anabolen in eine katabole Stoffwechsellage. Es werden beispielsweise vermehrt degradierende Enzyme, wie MMPs, und Entzündungsmediatoren sezerniert (Haseeb und Haqqi 2013; He et al. 2020; Matsushita und Kuroda 2014). Auch Überlastung bzw. Überbeanspruchung kann zur Gelenkdestruktion beitragen. Insbesondere Personen, die Sportarten mit Gewichtheben oder schwere körperliche Arbeit mit häufigem Heben schwerer Lasten oder langem Stehen ausüben, sind gefährdet (He et al. 2020).

Die genetische Prädisposition stellt ebenfalls einen Risikofaktor dar. Arthrose ist eine multifaktorielle, polygene Erkrankung, die von genetischen und umweltbedingten Faktoren beeinflusst werden kann. In Studien mit Zwillingen konnten 39-78 % genetischen Faktoren zugeschrieben werden (He et al. 2020). Das weibliche Geschlecht ist aufgrund

hormoneller Faktoren und Ernährung häufiger von Arthrose betroffen (Heidemann et al. 2021; Loeser et al. 2016).

Letztendlich kann nicht immer ein Hauptrisikofaktor als Ursache der Arthrose ausgemacht werden. Es ist ein individuelles Zusammenspiel aller genannten Risikofaktoren. Arthrose ist eine multifaktorielle Erkrankung und das Ergebnis vieler Veränderungen in der Knorpelhomöostase.

1.3 Pathogenese der Arthrose

Der genaue Pathomechanismus, der zur Entstehung der Arthrose führt, ist nicht vollständig bekannt. Es wird allgemein angenommen, dass ein komplexes Zusammenspiel aus inflammatorischen, metabolischen und mechanischen Faktoren besteht. Hierbei begrenzt sich der Prozess nicht allein auf die Chondrozyten, sondern auf alle Gelenk-bildenden Gewebe (He et al. 2020).

Die Synovialitis spielt eine entscheidende Rolle. Sie ist sowohl in frühen als auch in späten Stadien der Erkrankung vorhanden. In Studien zu Verletzungen des vorderen Kreuzbandes konnte gezeigt werden, dass in der Frühphase der Erkrankung die Entzündungsmarker in der Synovialflüssigkeit höher konzentriert sind als im Serum. Die Entzündungsreaktion lässt sich bereits vor einem radiologischen Nachweis der Arthrose feststellen (Goldring und Otero 2011). Die Synovialmembran, welche bei der Synovialitis betroffen ist, kann in zwei Schichten unterteilt werden: eine innere und äußere Schicht. Die innere Schicht besteht hauptsächlich aus Synovialmakrophagen und Synovialfibroblasten, die äußere Schicht v.a. aus verschiedenen Arten von Bindegewebe. Die Zellen der inneren Schicht spielen für die Aufrechterhaltung der Gelenkhomöostase eine wichtige Rolle. So sind die ortsständigen Synovialmakrophagen beispielsweise in die Immunantwort des Gelenks involviert (Nozawa-Inoue et al. 2003; Zhao et al. 2023). Beim Prozess der Arthrose gerät die Homöostase aus dem Gleichgewicht. Es kommt zu einem Ungleichgewicht zwischen anabolen und katabolen Prozessen (Haseeb und Haqqi 2013). Die Makrophagen liegen in ihrer Anzahl vermehrt vor. Dies geschieht durch eine komplexe Interaktion der verschiedenen Gelenkzellen (Chondrozyten, Fibroblasten, Lymphozyten). Lösliche Abbauprodukte des Knorpels, Fibronectin, Adipokine und weitere Moleküle lösen

als sogenannte „danger-associated molecular patterns“ (DAMPs) die Aktivierung der Makrophagen über deren Toll-like-Rezeptoren (TLR) aus (Zhao et al. 2023). Die Makrophagen produzieren dann u.a. die Entzündungsmediatoren Interleukin-1 beta (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α). Die parakrin-autokrine Sekretion von IL-1 β führt zur Produktion von MMPs durch Chondrozyten und Synovialfibroblasten (Sellam und Berenbaum 2010). MMPs sind zinkabhängige Endopeptidasen, welche an Prozessen des Gewebeumbaus und -reparaturen, sowohl unter physiologischen als auch unter pathophysiologischen Bedingungen beteiligt sind. Im Rahmen einer Arthrose bauen diese Enzyme die Knorpelmatrix ab und führen dadurch zu Knorpelschäden. Hier von besonderer Bedeutung sind die MMP-3 und MMP-13. MMP-3 aktiviert zudem andere MMPs proteolytisch und führt damit den Knorpelabbau voran (Honsawek et al. 2013). Makrophagen sind somit wesentlich an der Induktion der MMPs beteiligt (Sellam und Berenbaum 2010). Gleichzeitig sinkt die Konzentration von Kollagen 2 und Aggrecan. Der verletzte Knorpel sondert lösliche Matrixabbauprodukte ab, welche dann erneut die TLR auf Makrophagen aktivieren und somit den Entzündungsprozess aufrechterhalten und die Knorpelverletzung verschlimmern (Zhao et al. 2023). Die Prozesse führen auch im subchondralen Knochen zu Veränderungen. Durch die Degeneration des Knorpels fehlt dessen stoßdämpfende Wirkung. Der subchondrale Knochen wird anfänglich dünner und poröser. Im weiteren Verlauf kommt es durch IL-1 β -getriggerte Umbauprozesse zu einer Zunahme der Dicke des Knochens. Dadurch verändern sich auch die mechanischen Eigenschaften des subchondralen Knochens. So lässt er sich z.B. unter Belastung leichter verformen (Hu et al. 2021). Die Umbauprozesse breiten sich über die kalzifizierende Knorpelzone hinaus aus. Subchondrale Zystenbildung und Osteophyten sind weitere Folgen. (Kuyinu et al. 2016).

Basierend auf zahlreichen *in-vitro* Experimenten zu mechanischer Belastung besteht außerdem die allgemeine Annahme, dass statische Kompression das Kollagennetzwerk beschädigen und zum Abbau von Proteoglykanen führen kann. Umgekehrt fördert dynamische zyklische Kompression den Matrixaufbau (Goldring und Otero 2011). Der Gelenkknorpel braucht eine repetitive Belastung zur Aufrechterhaltung der Knorpelhomöostase. Sich abwechselnde Kompression und Relaxation bedingen einen passiven Flüssigkeitsstrom und tragen damit zur Ernährung des Knorpels bei (O'Hara et al. 1990). Fehlende Belastung ist somit schädlich, eine Überbelastung aber auch. Die

mechanische Überbeanspruchung des Gelenks verschiebt das Gleichgewicht zugunsten kataboler Prozesse. In *in-vitro* Studien wurden erhöhte Konzentrationen von Stickstoffmonoxid (NO), Prostaglandin E2 (PGE2), IL-1 β und TNF- α gefunden. Auch von möglichen mitochondrialen Dysfunktionen wurde berichtet. All dies wiederum führt im Verlauf zu Knorpeldefekten, Ausdünnung der Knorpelschicht und subchondraler Sklerose und fördert somit den Progress der Arthrose (Goldring und Otero 2011; He et al. 2020). Die Chondrozyten reagieren auf die abnorme mechanische Belastung. Neben den Synoviozyten synthetisieren auch die Chondrozyten IL-1 β und den dazugehörigen Rezeptor, wodurch es zu einer IL-1 β -induzierten Genexpression von MMPs und weiteren katabolen Genen kommt. Chondrozyten sind somit wahrscheinlich auch an der Initiierung und dem Fortschreiten der Arthrose beteiligt (Goldring und Otero 2011).

1.4 Rolle von IL-1 β

IL-1 β und TNF- α werden als Hauptakteure in der Pathogenese der Arthrose diskutiert (Haseeb und Haqqi 2013). Die beiden proinflammatorischen Zytokine werden u.a. von synovialen Makrophagen, aber auch von Chondrozyten selbst sezerniert. Beide Zytokine nehmen Einfluss auf diverse Zellvorgänge (siehe Abbildung 3), indem sie die Synthese zahlreicher Faktoren regulieren: So wird die PGE2 - Konzentration durch Induktion der Cyclooxygenase-2 (COX-2), der mikrosomalen PGE-Synthase-1 und der löslichen Phospholipase A2 erhöht, die NO - Konzentration durch Induktion der NOS gesteigert und Einfluss auf die Synthese weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und Interleukin-8 (IL-8) genommen. MMPs werden vermehrt exprimiert. TNF- α induziert zudem die A Disintegrin And Metalloproteinase with ThromboSpondin motifs (ADAMTS) - Familie, Enzyme die Aggrecan abbauen, während IL-1 β bevorzugt ADAMTS-4 induziert (Goldring und Otero 2011). Einige dieser Faktoren wirken synergistisch miteinander und verstärken so die Entzündungsreaktion, bzw. halten diese aufrecht. Außerdem wird die Expression von Kollagen 2 und Proteoglykanen gehemmt. Den Zytokinen wird auch Einflussnahme auf die Apoptose zugeschrieben, indem mehr proapoptotische Proteine synthetisiert werden. (Goldring und Otero 2011; Haseeb und Haqqi 2013). In dieser Arbeit soll der Fokus auf IL-1 β liegen. IL-1 β und der entsprechende Rezeptor werden in der Synovialmembran nahe von makroskopisch sichtbaren Knorpelläsionen überexprimiert,

was zu einer gesteigerten Empfindlichkeit auf IL-1 β in diesen Arealen führt. Physiologische, im Gesunden auftretende IL-1 β -Konzentrationen im Gelenk liegen bei bis zu 0,020 ng/ml. Bei Arthrose konnten IL-1 β -Konzentrationen von 0,021 bis 0,146 ng/ml im Gelenk nachgewiesen werden (Haseeb und Haqqi 2013; McNulty et al. 2013).

Ein zentraler Signalweg, über den IL-1 β seine Wirkungen vermittelt, ist der des Nuclear factor „kappa-light-chain-enhancer“ of activated B-cells (NF- κ B). In inaktiver Form liegt NF- κ B als Dimer gebunden an seinen Inhibitor of NF- κ B (I κ B) im Zytoplasma vor. IL-1 β führt zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors, indem es die Phosphorylierung und dadurch den Abbau des Inhibitors vermittelt. Als aktivierter Transkriptionsfaktor gelangt NF- κ B in den Zellkern und reguliert dort die Expression von inflammatorischen Proteinen und Proteinen der Immunantwort und Apoptose (Haseeb und Haqqi 2013; Jimi et al. 2019).

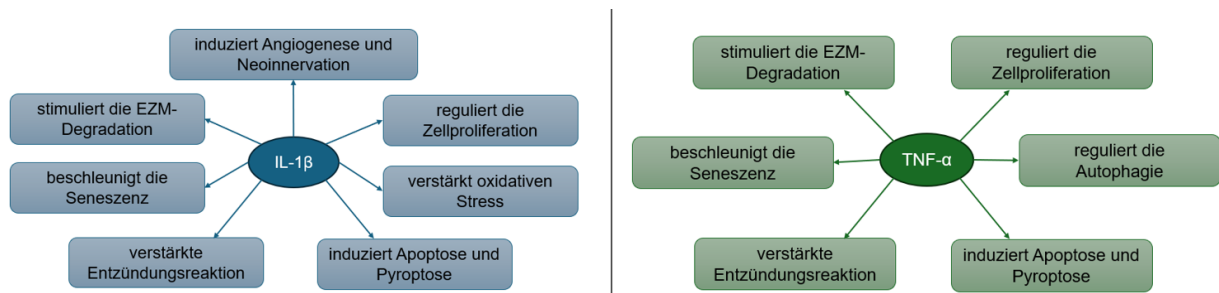


Abb. 3: Einfluss von IL-1 β und TNF- α auf diverse Zellvorgänge. Modifiziert nach Wang et al. 2020.

1.5 *In-vitro* Inflammationsmodelle

Um potenzielle Medikamente und Therapien gegen Arthrose zu testen, bedient man sich an zahlreichen Arthrose-Modellen. Hierbei wird zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-Modellen unterschieden. Bei *in-vivo*-Modellen handelt es sich um Tiermodelle. Bei den Versuchstieren wird auf unterschiedlichste Weise Arthrose induziert und anschließend die neue Therapie getestet. Es gibt zahlreiche Modelle, sowohl mit Großtieren als auch mit Kleintieren. Derzeit gibt es jedoch noch kein Modell, welches die menschliche Arthrose vollständig abbildet. Es werden immer nur bestimmte Merkmale der Ätiologie oder

Pathogenese wiedergegeben (Cope et al. 2019; He et al. 2020). Im Gegensatz dazu handelt es sich bei *in-vitro*-Inflammationsmodellen um Modelle auf Zellebene. Sie haben *in-vivo*-Modellen gegenüber nicht nur den Vorteil, dass sie kostengünstiger sind, sondern auch dass sie nach dem 3R-Prinzip Tierversuche vermeiden. Die Ziele dieses Prinzips sind es, Tierversuche zu vermeiden (Replacing), die Anzahl zu reduzieren (Reducing) und das Leiden der Tiere minimal zu halten (Refining). Bevor Therapien an lebenden Tieren durchgeführt werden, sollte ihre Wirkung auf zellulärer Ebene bekannt sein. Hierfür sind *in-vitro*-Modelle besonders geeignet.

Es gibt verschiedene Möglichkeiten für *in-vitro*-Inflammationsmodelle. Monolayer stellen die einfachste Art der Zellkultur dar. Die Zellen wachsen auf einer Glas- oder Plastikoberfläche. Monolayer bieten die Möglichkeit, Chondrozyten unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen zu analysieren. Sie haben eine hohe Reproduzierbarkeit. Allerdings stellt der Monolayer nur eine 2-D-Kultur dar, da die Zellen nur entlang der Oberfläche wachsen und ähnelt damit den realen Bedingungen in einem Gelenk nur begrenzt. Außerdem kommt es häufig zur Dedifferenzierung der Chondrozyten, u.a. der Abnahme der Kollagen 2- und Aggrecan-Expression, sowie der gesteigerten Expression von Hypertrophie- und Mineralisierungsmarkern (Cope et al. 2019; He et al. 2020).

Neben dem oben genannten 2-D-Modell gibt es auch 3-D-Modelle, z.B. die Sphäroidkultur, auch Pelletkultur genannt, oder der Einsatz von Biomaterialgerüsten (Scaffolds). Diese haben ein höheres chondrogenes Potenzial als die 2-D-Kultur, da hier ein 3-D-Wachstum möglich ist. Für Sphäroidkulturen sind viele Zellen erforderlich. Die Zellen werden zu einem Sphäroid zentrifugiert, doch erst wenn sie neue EZM gebildet haben, findet wieder eine Zellinteraktion statt. Beim Einsatz von Scaffolds trennt ein biologisches Gerüst die Zellen voneinander, sodass auch hier zunächst keine Zellinteraktion möglich ist. Beide Modelle berücksichtigen jedoch nur Chondrozyten. Mit diesen Modellen können die Auswirkungen von Zytokinstimulation, physischen Verletzungen und mechanischer Belastung analysiert werden (Cope et al. 2019; He et al. 2020).

Gewebeexplantate stellen eine Sonderform der *in-vitro*-Modelle dar. Hierfür werden Gewebeproben entnommen, aber nicht mehr weiterverarbeitet. Die natürliche Umgebung

bleibt erhalten. So kann Knorpel als ganzes Gewebe untersucht werden. Häufig werden osteochondrale Explantate entnommen. In Studien zeigte sich die Kultur von osteochondralen Explantaten mit einer erhöhten Vitalität der Chondrozyten vorteilhaft gegenüber der getrennten Kultur. Der Spender und der Ort der Entnahme beeinflussen die Eigenschaften und die Qualität der Explantate maßgeblich (Cope et al. 2019; He et al. 2020).

Mikrophysiologische Systeme gehören zu den neueren *in-vitro*-Modellen. Sie ermöglichen die Interaktion und Kommunikation zwischen möglichst allen im Gelenk vorhandenen Zellen und bieten dabei jedem Zelltyp eine möglichst physiologische Mikroumgebung. Die Kommunikation findet per Diffusion oder Mikrofluidik statt. Diese neue Methode bietet 3-D-Kulturbedingungen, dynamische Gewebekommunikation und Echtzeit-Analysen (He et al. 2020).

Durch Modifikation bzw. Weiterentwicklung geläufiger Modelle kann die (patho)physiologische Situation im Gelenk imitiert werden. Ossendorff et al. 2018 kombinierten die Sphäroidkultur mit einem Bioreaktor, um die mechanische Belastung im Kniegelenk zu simulieren. Dynamische Kompression und Scherkräfte stellten die natürlichen Gegebenheiten im Kniegelenk unter Belastung nach. Mechanische Belastung ist von großer Bedeutung für die Ernährung und Regeneration der Chondrozyten. Aufgrund der mangelnden Gefäßversorgung des Knorpels findet die Ernährung über einen passiven Flüssigkeitsstrom der Synovialflüssigkeit statt, welcher durch sich abwechselnde Kompression und Relaxation des Gelenks zustande kommt (O'Hara et al. 1990).

Bei einem genaueren Blick in die Literatur fällt auf, dass trotz der vorhandenen hohen Anzahl an verschiedenen *in-vitro* Modellen kein standardisiertes *in-vitro*-Inflammationsmodell verwendet wird. Dies erschwert die Vergleichbarkeit der Studien. Fragen nach der Wirksamkeit einer Therapie können nur schwer beantwortet werden, wenn das inflammatorische Milieu durch unterschiedlich hohe Konzentrationen an IL-1 β hervorgerufen wird oder das inflammatorische Milieu mit Zytokinen einer anderen Spezies induziert wird. Dies wirft neue Fragen auf: Ist die Therapie schlicht unwirksam oder sind die Zellen durch unphysiologisch hohe Konzentrationen des Zytokins bereits so geschädigt, dass ihre Regenerationsfähigkeit bereits ausgeschöpft ist? Außerdem fällt

auf, dass die Zellen und das verwendete Zytokin nicht immer homolog zueinander verwendet werden. Einige Autoren geben den Ursprung des Zytokins in ihren Publikationen nicht an. Auch das erschwert eine Vergleichbarkeit und die Translation in die Klinik. Hierbei ist anzunehmen, dass Rezeptor und Zytokin der gleichen Spezies nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip wahrscheinlich besser zueinander passen als Rezeptor und Zytokin unterschiedlicher Spezies.

1.6 Fragestellung

Um eine erfolgreiche Therapie gegen Arthrose zu finden, bedarf es zuerst eines geeigneten Inflammodells. Wir stellten die Hypothese auf, dass die Konzentration an IL-1 β zur Induktion der Arthrose hoch genug sein sollte, um messbare Veränderungen zu beobachten und zeitgleich so gering wie möglich gehalten werden sollte, damit sie nahe der realen Konzentration im Gelenk liegt. Die Auswirkungen von IL-1 β dieser Konzentration auf den Knorpel sollten bekannt sein, um mögliche Einflüsse einer Therapie auf die Gen- und Proteinexpression klar messen zu können. Außerdem wollen wir zeigen, dass auch der homologe Gebrauch von Zellen und Zytokin entscheidend ist. In dieser Studie soll ein standardisiertes *in-vitro*-Inflammodell der Arthrose entwickelt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Instrumente

96er Multiwellplatte, V-Boden	greiner bio-one, Kremsmünster, AT
96er Multiwellplatte	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US
96er Multiwellplatte, weiß	SARSTEDT AG & Co KG, Nümbrecht, DE
384er Multiwellplatte	NIPPON Genetics EUROPE, Düren, DE
Analysenwaage	Mettler, Schwerzenbach, CH
CO ₂ -Inkubator	Memmert, Schwabach, DE
Hämozytometer	NanoEntek, Seoul, KR
Laminar Sicherheitswerkbank	ScanLab, Puchheim, DE
Magnetrührer	Velp Scientifica, Brianz, IT
Mikrotom	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US
Mikroskop Eclipse TS100	Nikon, Chiyonda, Tokio, JP
Mikroskop IX81	OLYMPUS, Shinjuku, Präfektur Tokio, JP
NanoPhotometer®	IMPLEN, Westlake Village, Kalifornien, US
pH-Meter	Mettler, Schwerzenbach, CH
Paraffin-Karussell	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US
Paraffin-Strecktisch	Medax, Langwedel, DE
Quant Studio 5 Real-Time PCR System	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, US

Spinner Flask	Corning
Spark® Multimode Microplate Reader	Tecan Trading AG, Männedorf, CH
Taumelschüttler	Biometra, Jena, DE
Thermocycler	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, US
TissueLyser II	Qiagen, Hilden, DE
Vortex V-1 plus	Lab4You, Duisburg, DE
Zellkulturflaschen, 175 cm ²	greiner bio-one, Kremsmünster, AT
Zellsieb 40µm	greiner bio-one, Kremsmünster, AT
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf, Hamburg, DE
Zentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg, DE

2.1.2 Reagenzien

1-Bromo-3-chloropropan	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
1-Propanol	Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, US
4-(Dimethylamino)benzaldehyd	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
6-Aminocaproinsäure	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
Bisbenzimid (Hoechst 33258)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US
BSA	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
Chloramin T Trihydrat	Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, US
Chondroitinsulfat	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
Collagenase Typ II (285 U/mg)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, US
DMEM high glucose	Gibco, Waltham, Massachusetts, US
DMMB (1,9-Dimethyl-Methylen Blau)	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
DPBS	Gibco, Waltham, Massachusetts, US

DEPC-behandeltes Wasser	Invitrogen, Carlsbad, US
Do-It-Yourself-ELISA-Kit	Kingfisher Biotech, Saint Paul, US
ELISA Accessory Pack (3,3',5,5'- Tetramethylbenzidin-Substrat, Stopplösung)	Bio-Techne, Minneapolis, Minnesota, US
Entellan	Merck, Darmstadt, DE
Essigsäure	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
Ethanol absolut	AppliChem, Darmstadt, DE
Fast Green FCF	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
FBS SUPERIOR stabil®	Bio&SELL, Feucht, DE
Glycin	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
Griess Reagenzsystem	Promega, Madison, Wisconsin, US
Hämatoxylinlösung A nach Weigert	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Hämatoxylinlösung B nach Weigert	Carl Roth, Karlsruhe, DE
HEPES PUFFERAN®	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Interleukin-1 β , bovin rekombinant	Invitrogen, Carlsbad, US
Interleukin-1 β , human rekombinant	Pepro Tech, Hamburg, DE
Kalbsthymus-DNA	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
L-Ascorbinsäure	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
L-Glutamin	Gibco, Waltham, Massachusetts, US
L-Prolin	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
MEM NEAA (nicht-essenzielle Aminosäuren)	Gibco, Waltham, Massachusetts, US
Natriumacetat-Trihydrat	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
Natriumchlorid	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Natronlauge	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Paraffin	Leica Biosystems, Wetzlar, DE
Pen Strep	Gibco, Waltham, Massachusetts, US
Perchlorsäure	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
Polyacrylträger	Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, US
Pronase E	Merck, Darmstadt, DE

Proteinase K Lösung	Invitrogen, Carlsbad, US
Rinderalbumin	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
RNeasy MINI Kit	Qiagen, Hilden, DE
RNase-freies Wasser	Invitrogen, Carlsbad, US
Safranin O	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
Salzsäure	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase (HRP)	Biomol, Hamburg, DE
TaqMan™ Genexpressions-Mastermix	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, US
TaqMan™ Reagenzien für Reverse Transkription	Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, US
TRI-Reagent	Molecular Research Center, Cincinnati, Ohio, US
Tris-EDTA Pufferlösung	SIGMA-ALDRICH, Taufkirchen, DE
Trypan blau	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Trypsin-EDTA 0,5%	Gibco, Waltham, Massachusetts, US
Xylol	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Zitronensäure	AppliChem, Darmstadt, DE

2.1.3 Puffer und Lösungen

Chondrozyten-Wachstumsmedium

Das Chondrozyten-Wachstumsmedium bestand aus Dulbeco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S), 1 % L-Glutamin, 60 µg/ml L-Ascorbinsäure, 40 µg/ml L-Prolin, 1 % gelöste, nicht-essenzielle Aminosäuren, sowie 6-Aminocapronsäure.

Diethylpyrocarbonat (DEPC)-behandeltes Wasser

DEPC-behandeltes Wasser ist Nuklease-frei, das heißt es enthält keine Endo- oder Exonukleasen, wie Desoxyribonukleasen (DNasen) oder Ribonukleasen (RNasen) und eignet sich daher für Analysen mit Ribonukleinsäure (RNA).

DMEM in der Zellkultur

DMEM high glucose wurde HEPES (1 M), 10 % FBS, 1 % P/S und 1 % L-Glutamin hinzugefügt.

Fast Green

Die Stammlösung (1 %) bestand aus 1 g Fast Green und 100 ml destilliertem Wasser. Die Arbeitslösung (0,02 %), setzte sich aus 2 ml Stammlösung, 97,9 ml destilliertem Wasser und 100 µl Eisessig zusammen.

Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS)

PBS ist eine phosphatgepufferte Kochsalzlösung, die für Waschvorgänge bei der Isolierung der Chondrozyten aus Fesselgelenken oder bei der Subkultur verwendet wurde. Sie ist Kalzium- und Magnesium-frei. Bei der Isolierung der bovinen Knorpelzellen wurde 10 % P/S hinzugefügt, bei normalen Waschvorgängen in der Subkultur hingegen nur 1 % P/S.

TRI-Reagent®

TRI Reagent wurde zur Gesamt-RNA-Isolierung verwendet. Es beinhaltet Phenol und Guanidin-Thiocyanat in einer Monophaselösung und erleichtert die sofortige Hemmung der RNase-Aktivität.

TaqMan™ Reagenzien für reverse Transkription

Das Reaktionsgemisch für die reverse Transkription bestand aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Komponenten. 20 µl Reaktionsgemisch beinhaltete 2,0 µl 10x TaqMan RT Puffer, 4,4 µl Magnesiumchlorid, 4,0 µl DesoxyNTPs-Mischung und 1,0 µl Random-Hexamer-Primer als nicht-enzymatische Komponenten und 0,4 µl RNase Inhibitor (20 U/µl) und 0,5 µl MultiScribe™ rekombinante reverse Transkriptase (50 U/µl)

als enzymatische Komponenten. Die reverse Transkriptase stammte aus dem Moloney-Maus-Leukämievirus.

2.2 Experimenteller Aufbau

Der im Experiment verwendete Gelenkknorpel wurde aus bovinen Fesselgelenken isoliert. Die Donoren waren 4-6 Monate alte Kälber, welche durch einen regionalen Metzger geschlachtet wurden. Die Tiere starben dabei nicht zu Forschungszwecken, sondern dienten der Lebensmittelproduktion. Die Fesselgelenke fielen als Abfallprodukt an. Nach erfolgter Zellisolation und anschließender Zellexpansion bis Passage 3 wurden die Chondrozyten in Pelletkultur verbracht und eine Woche im „free swell“ zur Redifferenzierung belassen. Die Chondrozyten wurden für die anschließende 14-tägige Zytokin-Stimulation in zehn Gruppen mit unterschiedlichen in der Literatur verwendeten Konzentrationen aufgeteilt (siehe Tabelle 1). Hierbei wurden humanes und bovines IL-1 β unterschieden. Während der Stimulation mit IL-1 β fand jeden zweiten Tag ein Medium-Wechsel statt. Insgesamt wurde das Experiment viermal auf gleiche Art und Weise wiederholt, jeweils mit unterschiedlichen Donoren. Nach Beendigung der IL-1 β -Stimulation wurden die Pellets für nachfolgende Analysen verarbeitet (siehe auch Abbildung 4).

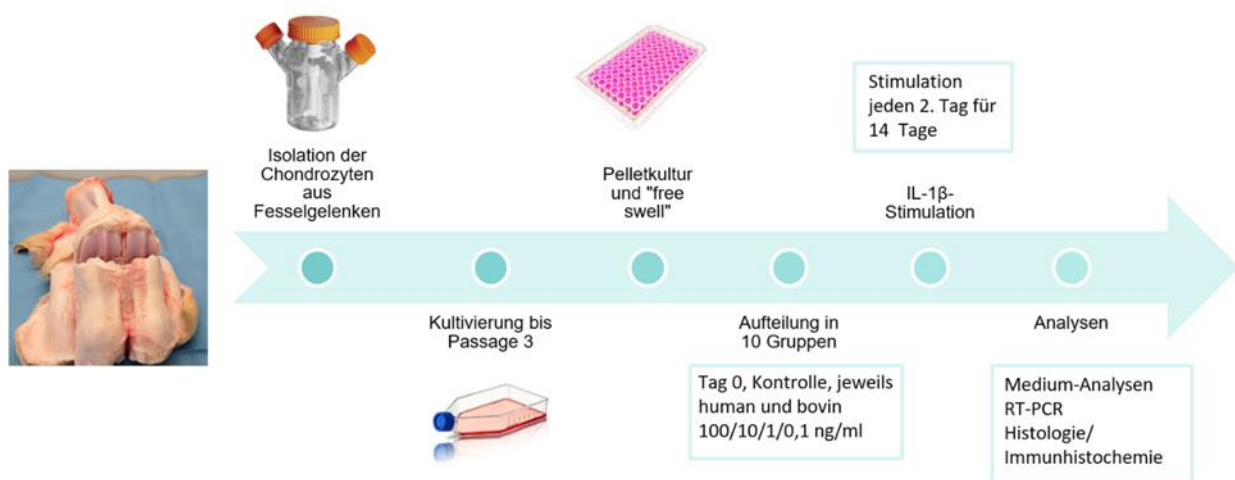


Abb. 4: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus. Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

Tab. 1: Auflistung der experimentellen Gruppen.

Herkunft IL-1 β	Human					Bovin				
Gruppen (ng/ml)	Tag 0	Kontrolle	0,1	1	10	100	0,1	1	10	100

2.3 Zellisolierung

Zuerst erfolgte die Säuberung der bovinen Fesselgelenke von grobem Schmutz. Anschließend wurde die Haut entfernt, ohne die Gelenkkapsel zu beschädigen. Unter sterilen Bedingungen wurde die Gelenkkapsel eröffnet und Knorpelstückchen von 9-25 mm² Größe geerntet. Diese überführte man in ein Falcon-Röhrchen mit 30 ml PBS-P/S 10 %. Nach Ermittlung des Gewichts wurden die extrahierten Knorpelstückchen in eine Spinner Flask überführt und zweimal mit 60 ml PBS-P/S 10 % für 15 Minuten gewaschen. Danach folgte der Vorverdau mit Pronase (0,1 %) in DMEM für 105 Minuten bei 37 °C, 5 % Kohlenstoffdioxid (CO₂) und 95 % Luftfeuchtigkeit. Daran anschließend wurden die Knorpelstückchen 3-mal mit 100 ml PBS-P/S 1 % gewaschen und über Nacht (14 Stunden) mit 600 U/ml Collagenase II in DMEM bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Zur entstandenen Zellsuspension wurden 10 ml FBS hinzugegeben (finale Konzentration 10 % FBS). Anschließend wurde die Zellsuspension aus der Spinner Flask in neue Falcon-Röhrchen überführt und über ein 40 μ m Zellsieb filtriert. Die Suspension wurde bei 565 G (1830 U/min) und 4 °C für sieben Minuten zentrifugiert. Darauf folgten zwei weitere Waschschrte und Zentrifugation mit 25 ml DMEM 10% FBS. Die isolierten Chondrozyten wurden mit 10 ml DMEM 10 % FBS resuspendiert und mit dem Hämozytometer gezählt. Dazu vermischte man 20 μ l Zellsuspension mit 20 μ l Trypan Blau, gab die Mischung auf eine Neubauer-Zählkammer und zählte die Chondrozyten mit dem Mikroskop. $2,5 \cdot 10^6$ Chondrozyten wurden mit 25 ml DMEM 10 % FBS in eine T175 Kulturflasche für Kultur und Passage ausgesät (ca. 100.000 Zellen/ml).

2.4 Subkultur konfluenter Monolayer

Die Subkultur erfolgte ab einer erreichten Konfluenz der Chondrozyten von 80-90 %. Das Medium wurde abgesaugt und die adhärenenten Chondrozyten mit PBS-P/S 1 % gewaschen, um Rückstände von Serum oder Calcium zu entfernen, welche die Wirkung von Trypsin inhibieren würden. 12 ml/Flasche Collagenase II (300 U/ml) gelöst in PBS-P/S 1 % wurde hinzugegeben und für 15-30 Minuten inkubiert. 1,2 ml/Flasche Trypsin (0,5 %) wurde hinzugefügt und für weitere 15 Minuten inkubiert. Die Zellsuspension wurde in Falcon-Röhrchen transferiert und mit DMEM 10% FBS die Wirkung des Trypsins gestoppt. Bei 565 G (1830 U/min) und 4 °C wurde für sieben Minuten zentrifugiert, der Überstand abgesaugt, die Zellen mit DMEM 10 % FBS gewaschen. Der Vorgang wurde zwei weitere Male wiederholt, wobei beim letzten Mal das Resuspendieren mit 20 ml DMEM 10 % FBS stattfand. Die Zellen wurden mit dem Hämozytometer gezählt und das entsprechende Volumen an Suspension mit $2,5 \cdot 10^6$ Zellen in T175 Kulturflaschen gesät. Die Kultivierung erfolgte erneut bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Bei einer Konfluenz von 80-90 % erfolgte die nächste Subkultur, bis Passage 3 erreicht wurde. Die Kultivierung von Passage 0 zu Passage 3 dauerte ca. drei Wochen. Der Medium-Wechsel fand alle zwei Tage statt. In Abbildung 5 sind expandierte Chondrozyten der Passage 2 exemplarisch dargestellt. Um eine ausreichende Anzahl an Chondrozyten zu erhalten und die Situation einer klinischen autologen Chondrozytentransplantation (ACT) zu simulieren erfolgte die Zellexpansion bis Passage 3 (Population Doubling Level (PDL) von 2,3-4,6; im Median 2,7). Bei längerer Passage verlieren Chondrozyten den für sie typischen Phänotyp (Vanlauwe et al. 2014).

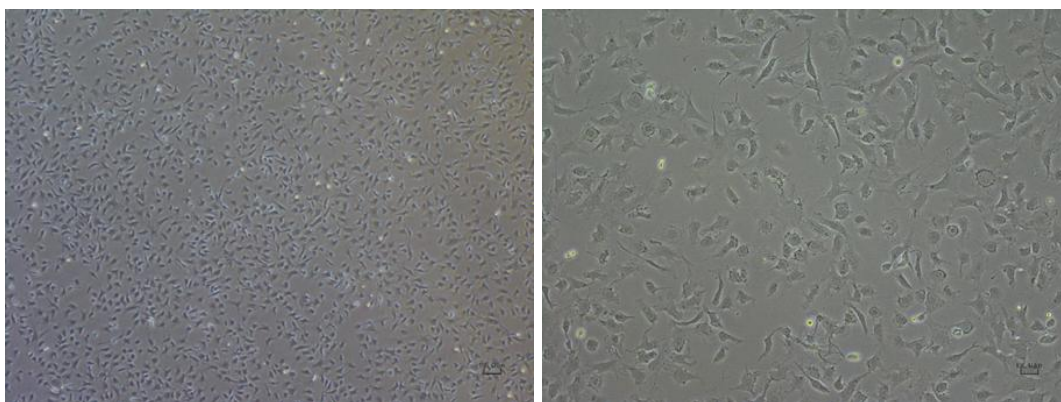


Abb. 5: Expandierte Chondrozyten, Monolayer, Passage 2, 10-fache (links) und 20-fache (rechts) Vergrößerung.

2.5 Pellet-Kultur

$2,5 \cdot 10^5$ Chondrozyten wurden in die v-förmigen Vertiefungen einer 96er-Multiwellplatte mit zellabweisender Oberfläche plattiert. Mit Chondrozyten-Wachstumsmedium wurde das Volumen pro Well auf 100 μ l aufgefüllt. Anschließend wurde bei 500 g (1929 U/min) fünf Minuten zentrifugiert und pelletiert. Die ausplattierten Chondrozyten wurden eine Woche im „free swell“ belassen, das heißt alle zwei Tage wurde das Chondrozyten-Wachstumsmedium ausgetauscht. Für Tag 0 wurde Medium für biochemische Untersuchungen, sowie Pellets für GAG -Quantifizierung, Collagen/DNA-Quantifizierung, RNA-Extraktion und Histologie gesammelt.

2.6 IL-1 β

Nach einer Woche im „free swell“ wurden die Pellets in 10 Gruppen aufgeteilt: Tag 0, Kontrolle, 0,1, 1, 10, 100 ng/ml humanes IL-1 β und 0,1, 1, 10, 100 ng/ml bovines IL-1 β . Bei der Aufteilung der Gruppen wurde auf die strikte räumliche Trennung, das heißt separate 96er-Multiwellplatten, der humanen und bovinen Versuchsgruppen geachtet, um Kontaminationen zu vermeiden. Das humane und bovine IL-1 β wurden als Stammlösung der Konzentration 10 μ g/ml, in PBS und 0,1 % Bovine Serum Albumin (BSA) bzw. 1% BSA, bei -80°C gelagert. Bei dem humanen IL-1 β handelte es sich um ein rekombinantes Protein, hergestellt durch E. coli. Es hatte ein Molekulargewicht von 17,3 kDa und bestand aus 153 Aminosäuren. Das bovine IL-1 β war ebenfalls ein rekombinantes Protein, welches durch den Hefepilz *Pichia pastoris* hergestellt wurde. Dieses bestand aus 114-266 Aminosäure, bei einem Molekulargewicht von 17,7 kDa. Zu jedem Medium-Wechsel wurden die Interleukine frisch aufgetaut und dem Chondrozyten-Wachstumsmedium hinzugefügt. Über eine Verdünnungsreihe erhielt man die Konzentrationen (0,1, 1, 10, 100 ng/ml). Bei jedem Wechsel wurde das komplette Medium gesammelt und bei -80 °C gelagert.

2.7 Analysen

Nach zwei Wochen IL-1 β -Stimulation war das Experiment beendet. Die gewonnenen Proben wurden entsprechend ihrer weiteren Verwendung gelagert.

2.8 Biochemische Analysen

Für die Quantifizierung von GAG, DNA und Collagen wurden die ausgewählten Proben (n=2 pro Gruppe und Experiment; je Triplikate) in 2 ml Eppendorf-Röhrchen überführt. Es wurden 500 µl Proteinase K hinzugegeben (0,5 mg/ml) und zur Verdauung über Nacht bei 56 °C inkubiert. Darauf folgte die Hitzeinaktivierung der Proteinase K für zehn Minuten bei 95 °C. Die Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -20 °C gelagert. Das gesammelte Medium wurde bei -80 °C gelagert und vor Verwendung nicht weiterverarbeitet.

2.8.1 DNA-Quantifizierung

Die DNA-Quantifizierung wurde mittels Hoechst 33528-Spektrofluorometrie durchgeführt. Die Bindung von Bisbenzimid an die kleine Furche der DNA führt zu einer Verstärkung der Fluoreszenz. Die Fluoreszenz von Bisbenzimid steht in Relation zum AT-Gehalt der DNA. Für die Erstellung einer Standardkurve wurde Kalbsthymus-DNA-Stammlösung verwendet, da diese in ihren Eigenschaften der bovinen Chondrozyten-DNA sehr ähnelt. Kalbsthymus-DNA ist doppelsträngig, hochpolymerisiert und hat einen Adenin-Thymin (AT)-Gehalt von ca. 60 % (Guanin-Cytosin (GC)-Gehalt ca. 40 %). Die Stammlösung wurde mit Dulbecoo's phosphate buffered saline (DPBS) seriell verdünnt: 2000/1000/500/250/125/62,5 ng/ml pro Well. DPBS hat eine hohe Salzkonzentration und reduziert somit mögliche Fluoreszenz-Interaktionen. Diese führt zur Dissoziation von DNA-bindenden Proteinen und erleichtert somit die Bindung von Bisbenzimid an die DNA. Pro Well wurden 40 µl Proteinase K-verdaute Probe oder Standard, sowie 160 µl Assay-Solution hinzugegeben. Nach einer 20-minütigen, lichtgeschützten Reaktionszeit erfolgte die Fluoreszenzmessung mittels Spark® Multimode Microplate Reader bei 360 nm Anregung und 465 nm Fluoreszenzemission.

2.8.2 GAG-Quantifizierung

Die GAG-Quantifizierung wurde für das gesammelte Medium und die Proteinase-K-verdauten Pellets mittels der 1,9-Dimethyl-Methylen Blau (DMMB)-Analyse durchgeführt. DMMB bindet an sulfatierte Glykosaminoglykane und macht diese sicht- und messbar.

Die Standardkurve wurde aus einer Chondroitinsulfat-Stammlösung und PBS hergestellt und seriell verdünnt: 2,5/1,25/0,625/0,3125/0,156/0,078 µg/Well einer 96er-Multiwellplatte. 50 µl Standard oder Probe wurden in jede Vertiefung gegeben und 200 µl DMMB-Farblösung hinzugefügt. Die Messung mit dem Spark® Multimode Microplate Reader fand bei 535 nm statt.

2.8.3 Hydroxyprolin-Assay

Hydroxyprolin ist Hauptbestandteil des Kollagens und stabilisiert dessen helikale Struktur. Die Messung des Hydroxyprolin-Gehalts einer Probe gibt Auskunft über deren Kollagengehalt. Für die Bestimmung des Hydroxyprolin-Gehalts wurden die Proteinase K-verdauten Proben über Nacht der sauren Hydrolyse mit Natriumhydroxid (NaOH) 4 M zugeführt. Am Folgetag erfolgte die Neutralisation mit Zitronensäure 1,4 M. Die Standardkurve wurde aus Hydroxyprolin (100 µg/ml) und destilliertem Wasser hergestellt und seriell verdünnt: 100/50/25/12,5/6,25/3,13/1,56/0 µg/ml pro Well einer 96er-Multiwellplatte. 35 µl Standard oder Probe wurden in jedes Well gegeben. Anschließend reagierte das freigesetzte Hydroxyprolin jeder Vertiefung mit Chloramin T. Das Oxidationsprodukt bildete nach Zugabe von 4-(Dimethylamino) Benzaldehyd eine gelb- bis rötliche Verbindung, dessen Absorption bei 570 nm gemessen wurde.

2.8.4 IL-6 ELISA

Die Abgabe von IL-6 ins Medium wurde mithilfe des bovinen IL-6 Do-It-Yourself Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Kit ermittelt. Der Capture-Antikörper wurde auf die 96er-Multiwellplatte aufgetragen und über Nacht inkubiert. 100 µl Standard oder Probe wurden in jedes Well gegeben und inkubiert. Nach viermaliger Waschung wurde der Detektionsantikörper hinzugefügt und inkubiert. Gleiches galt für die Zugabe von Streptavidin-HRP, gefolgt von TMB-Substratlösung. Nach Hinzufügen der Stopplösung wurde die Absorption bei 450 nm gemessen.

2.8.5 NO-Analyse

Die Nitritkonzentration im Medium wurde mittels Griess Reagenzsystem ermittelt. Dieses beinhaltete einen Nitrit-Standard, Sulfanilamid- und N-1-Naphtylethylendiamindihydrochlorid (NED) - Lösung. Nitrit (NO_2^-) ist eins von zwei primären, stabilen und nicht-flüchtigen Abbauprodukten des NO. Die Nitrit-Standardkurve wurde aus 100 μM Stammlösung und Chondrozyten-Wachstumsmedium hergestellt und seriell verdünnt: 100/50/25/12,5/6,25/3,13/1,56/0 μM je Well einer 96er-Multiwellplatte. 50 μl Standard oder Probe wurden in Duplikaten in die Vertiefungen pipettiert und nacheinander auf Raumtemperatur erwärmte Sulfanilamid- und NED-Lösung hinzugegeben. Eine violett- bis magentafarbene Verfärbung der Proben zeigte sich im Messbereich der NO-Konzentration. Die Extinktion wurde bei 520-550 nm gemessen.

2.9 RNA-Extraktion und mRNA-Expressionsanalyse

2.9.1 RNA-Extraktion

Je Experiment und Gruppe wurden zwölf Pellets für die RNA-Extraktion vorgesehen. Je vier Pellets wurden in ein 2 ml Eppendorf-Röhrchen mit 1 ml TRI Reagent (RNA-Isolierungsreagenz) und 5 μl Polyacrylträger überführt. Diese wurden anschließend mit dem Tissue Lyser System bei 30 Hz für fünf bis zehn Minuten homogenisiert. Die Proben wurden bei -80°C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Bromochloropropan (100 μl) wurde zur Phasentrennung verwendet. Nach dem Zentrifugieren überführte man die klare, flüssige, RNA-haltige obere Phase in neue Röhrchen und gab das gleiche Volumen an 70 %igem Ethanol hinzu. Die RNA-Isolation wurde mit dem Qiagen RNeasy MINI Kit über Säulen durchgeführt. Dieses enthielt die benötigten Säulen, spezifische RW1-Waschpuffer, RPE-Waschpuffer und RNase freies Wasser. Die Proben wurden mehrmals gewaschen, bevor die RNA mittels RNase-freiem Wasser aus den Säulen gelöst und zeitnah auf Eis gestellt wurden. Mit dem NanoDrop®-System wurde die Qualität der isolierten RNA analysiert. Bei 260 nm wurden Nukleinsäuren, bei 280 nm Proteine und bei 230 nm Phenolatabsorption gemessen. Eine gute RNA-Qualität erhielt man bei $A_{260}/A_{280} > 1,9$ und $A_{260}/A_{230} > 1,0$.

2.9.2 Reverse Transkription

Unter reverser Transkription versteht man das Umschreiben von RNA in cDNA. Hierfür wurden die TaqMan™ Reagenzien für die Reverse Transkription verwendet. Diese wurden zusammen mit dem entsprechenden Volumen von 1 µg RNA in ein 200 µl Röhrchen gegeben. Das finale Reaktionsvolumen betrug 20 µl. Für die reverse Transkription wurde der Thermocycler mit folgenden Einstellungen verwendet: zehn Minuten bei 25 °C für die Primer-Inkubation, 30 Minuten bei 48 °C für die reverse Transkription und fünf Minuten bei 95 °C zur Inaktivierung. Um im Folgenden vergleichbare Polymerase Chain Reaction (PCR)-Ergebnisse zu erhalten, wurden die cDNA-Konzentrationen angeglichen, indem ggf. Tris-EDTA-Puffer hinzugefügt wurde. Die cDNA wurde bis zur Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert.

2.9.3 TaqMan RT-PCR

Die Real Time-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) wurde mit Quant Studio 6 Flex Real Time PCR-System auf einer transparenten 384er Multiwellplatte durchgeführt. Das Reaktionsvolumen betrug 10 µl, 2 µl cDNA und 8 µl Master Mix, bestehend aus TaqMan Master Mix, Primern, Sonden und DEPC-Wasser. Es wurde die Genexpression von bovinem Kollagen 1, Kollagen 2, cartilage oligomeric matrix protein (COMP), Proteoglykan 4 (PRG-4), Aggrekan, MMP-3, MMP-13, IL-6 und IL-8 in Relation zur Genexpression des eukaryotisch ribosomalen Housekeeping-Gens 18S gemessen. Die RT-PCR begann mit einer 10-minütigen Aktivierungsphase der DNA-Polymerase bei 95 °C. Es folgten 40 Zyklen von 15 Sekunden bei 95°C zur Dissoziation und eine Minute bei 60 °C für die Primer-Anlagerung und Synthese des DNA-Stranges. Es wurde die Comparative Cycle Threshold (CT) Methode gewählt. Der gemessene CT-Wert wurde zum CT-Wert des Housekeeping Gens normalisiert (ΔCT) und dieser anschließend zum Tag 0 ($\Delta\Delta CT$). Die relative mRNA-Expression wurde mit der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ errechnet und für eine bessere Visualisierung mit dem natürlichen Logarithmus normalisiert.

2.10 Histologie

Die Pellets für die Histologie (n=4 je Gruppe) wurden in 70 %igem Methanol fixiert und bei 4 °C bis zur Färbung und Analyse gelagert. Zur Fixierung in Paraffin wurden die Pellets in ein Paraffin-Karussell überführt und für 24 Stunden in den Schritten 70 % Ethanol, 96 % Ethanol, 100 % Ethanol, Xylol und Paraffin belassen. Nach erfolgter Einbettung wurden die Pellets mit dem Mikrotom 5 µm dick geschnitten. Die Paraffinschnitte wurden auf Objektträger überführt und bis zur Färbung aufbewahrt.

2.10.1 Safranin O/Fast Green Färbung

Die Safranin O/Fast Green Färbung eignet sich besonders für die Darstellung der extrazellulären Matrix-Beschaffenheit. Sie unterscheidet zwischen Proteoglykan- (rot) und Kollagen-reichem (grün) Gewebe. Zuerst erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung der Paraffin-Schnitte. Dafür wurden die Schnitte auf einem Paraffin-Strecktisch auf 60 °C erwärmt und anschließend für mehrere Minuten in Xylol, Ethanol absolut, 96 %, 70 % und 50 % Ethanol belassen. Nach Abspülen mit destilliertem Wasser erfolgte die Färbung der Zellkerne für zehn Minuten in Weigerts Hämatoxylin, mit anschließendem Bläuen in Leitungswasser. Es folgte erneutes Abspülen mit destilliertem Wasser und sechs Minuten in Fast Green zur Färbung des Kollagens, gefolgt von 20 Sekunden in 1 % Essigsäure zur Differenzierung. Anschließend wurden die Schnitte für zehn Minuten mit Safranin O gefärbt (Proteoglykane). Zuletzt erfolgten Schritte zur Dehydrierung über 70 % und 96 % Ethanol (15 Sekunden), Ethanol absolut (zwei Minuten) und Xylol (zwei Minuten). Die gefärbten Paraffin-Schnitte wurden mit Entellan (Schnelleindeckmittel) und Deckgläsern abgedeckt und für 48 Stunden getrocknet, bevor sie mikroskopiert wurden.

2.11 Statistik

Zur statistischen Auswertung wurde die Software SPSS (Version 2.0, IBM, Armonk) verwendet. Der Mann-Whitney U-Test wurde als nichtparametrischer Test angewandt. Als statistisch signifikant wurden p-Werte < 0,05 definiert. Die Diagramme wurden mit der Software GraphPad PRISM 9 dargestellt. Auf die Daten der Genexpression wurde der

natürliche Logarithmus angewandt, um eine Abweichung zu vermeiden; sie wurden als Boxplots dargestellt.

3. Ergebnisse

3.1 Anabole Marker

Kollagen Typ 2 ist eine der Hauptkomponenten hyalinen Knorpels. Die Genexpression von Kollagen Typ 2 wurde mittels RT-PCR für Tag 4 und Tag 14 ermittelt (siehe Abbildung 6). Im Allgemeinen zeigte sich eine im Vergleich zur Kontrolle (0 ng/ml) signifikant verringerte Genexpression in nahezu allen experimentellen Gruppen; mit Ausnahme der Konzentration 0,1 ng/ml für humanes und bovines IL-1 β an Tag 4. Ein signifikanter Unterschied zwischen den humanen und bovinen Gruppen zeigte sich nicht. Die Betrachtung der verschiedenen Konzentrationen in der humanen Verdünnungsreihe an Tag 4 zeigte signifikante Unterschiede in der Genexpression für 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml verglichen mit 0,1 ng/ml IL-1 β (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert). In der bovinen Verdünnungsreihe stellte sich lediglich der Unterschied in der Genexpression von 100 ng/ml verglichen mit 0,1 ng/ml als statistisch signifikant heraus. Für Tag 14 ergab der Vergleich der verschiedenen Konzentrationen innerhalb der Gruppen des humanen und bovinen Zytokins keine statistisch signifikanten Unterschiede in der Genexpression von Kollagen Typ 2 (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

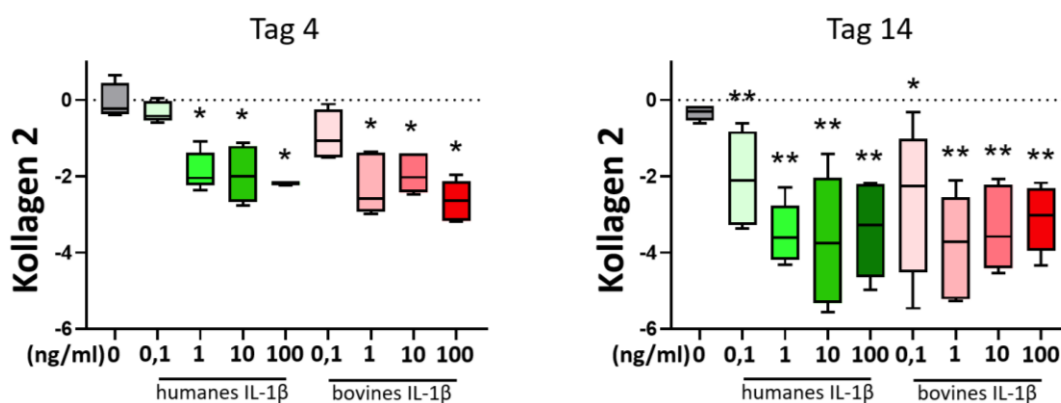


Abb. 6: Genexpression des anabolen Markers Kollagen 2. Zum frühen (Tag 4) und späten Zeitpunkt (Tag 14) unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Gezeigt sind Daten der Experimente 3 und 4. Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Nach Anwendung des natürlichen Logarithmus wurden die Daten in Boxplots dargestellt. Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet. *p < 0,05. **p < 0,01. IL-1 β , Interleukin-1 β . Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

Es wurde außerdem eine quantitative Kollagenanalyse der Pellets durchgeführt. Hierbei handelte es sich um eine Analyse des Gesamtkollagengehalts, das heißt, es wurde nicht zwischen Kollagen Typ 1 und Kollagen Typ 2 differenziert. Zudem wurde der DNA-Gehalt der Chondrozyten bestimmt. Der DNA-Gehalt der Kontrolle lag im Mittel bei $0,822 \pm 0,152$ µg/ml. Keine der experimentellen Gruppen zeigte einen signifikant unterschiedlichen DNA-Gehalt im Vergleich zur Kontrolle. Es ließ sich ebenfalls kein Unterschied zwischen Stimulation mit humanem oder bovinem IL-1 β feststellen (siehe Abbildung 7A). Ein ähnliches Muster ergab sich bei der Betrachtung des Kollagen/DNA-Verhältnisses. Hier zeigten sich weder im Vergleich zur Kontrolle noch zwischen den humanen und bovinen Gruppen signifikante Unterschiede. Es ließen sich der Verdünnungsreihe folgend geringere Mengen an Kollagen in den Pellets beobachten, die mit höheren Konzentrationen an IL-1 β stimuliert wurden. Dies war jedoch nicht statistisch signifikant. Diese Beobachtung wurde sowohl für die Stimulation mit humanem als auch mit bovinem IL-1 β gemacht (siehe Abbildung 7B).

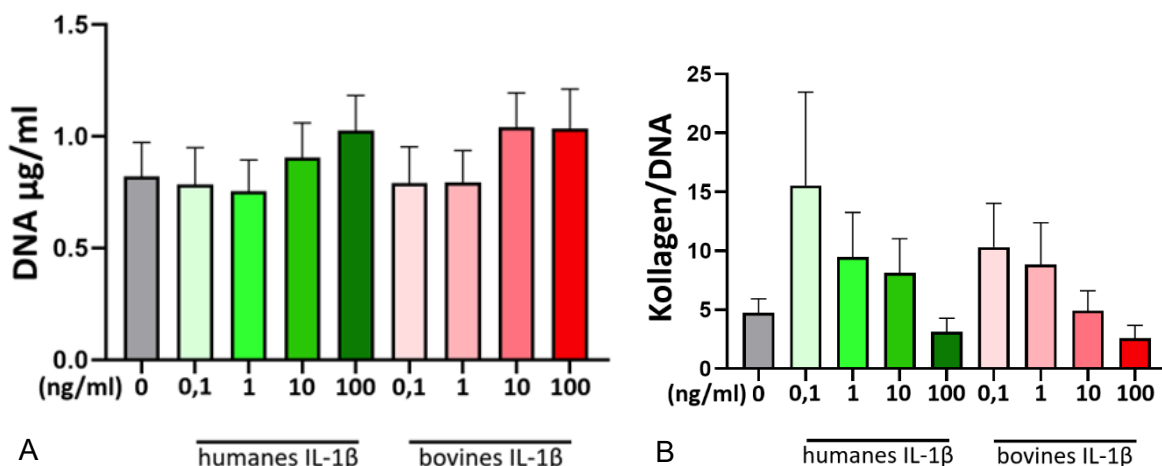


Abb. 7: A): DNA-Gehalt unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). B): Kollagen/DNA unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler von 4 Donoren (Experiment 1 bis 4). DNA, Desoxyribonukleinsäure. IL-1 β , Interleukin-1 β .

GAG sind Bestandteil der extrazellulären Matrix. Ihr Gehalt am Pellet wurde analysiert. Im Allgemeinen zeigte sich unter Einfluss von IL-1 β ein signifikant verringerter GAG-Gehalt der Knorpel pellets. Bovines IL-1 β führte in jeder Konzentration zur signifikanten GAG-

Reduktion. Bei den mit humanem IL-1 β stimulierten Chondrozyten zeigte die niedrigste Konzentration an IL-1 β keinen Einfluss auf den GAG-Gehalt (siehe Abbildung 8).

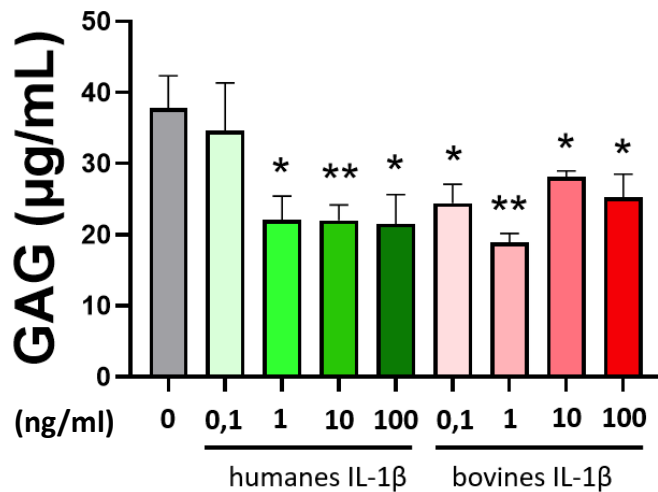


Abb. 8: GAG-Gehalt der Knorpelpellets unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler von 4 Donoren (Experiment 1 bis 4). Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet, * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$ GAG, Glykosaminoglykane. IL-1 β , Interleukin-1 β . Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

Aggrecan ist ein Proteoglykan der extrazellulären Knorpelmatrix. Es bildet zusammen mit Hyaluronsäure ein Aggregat, welches aufgrund seiner stark negativen Ladung eine hohe Wasserbindungskapazität aufweist und somit eine stoßdämpfende Funktion im hyalinen Gelenkknorpel übernimmt. Die Genexpression von Aggrecan wurde analysiert (siehe Abbildung 9). An Tag 4 korrelierte die Verdünnungsreihe von IL-1 β mit der Genexpression. Hohe Konzentrationen führten zu einer stärker verminderten Genexpression, sowohl für humanes als auch bovines IL-1 β . Signifikante Unterschiede zur Kontrolle (0 ng/ml) waren in den humanen Gruppen bei Konzentrationen von 0,1 ng/ml und 1 ng/ml (0,1 ng/ml: $p = 0,036$, 1 ng/ml: $p = 0,036$) und in der bovinen Gruppe bei 1 ng/ml IL-1 β ($p = 0,036$) zu beobachten. Zwischen humanem und bovinem Interleukin gab es keinen signifikanten Unterschied. Innerhalb der humanen Verdünnungsreihe waren die Unterschiede in der Genexpression bei 100 ng/ml und 10 ng/ml IL-1 β jeweils verglichen mit 1 ng/ml und 0,1 ng/ml IL-1 β signifikant. Innerhalb der bovinen Verdünnungsreihe waren signifikante Unterschiede zwischen den Konzentrationen 100 ng/ml verglichen mit 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml zu beobachten (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung

markiert). Zum späten Zeitpunkt waren die Effekte der Verdünnung in der Genexpression von Aggrecan nicht mehr zu sehen (siehe Abbildung 9). Die Stimulation mit humanem IL-1 β führte in allen Konzentrationen zu einer verminderten Genexpression, welche mit Ausnahme für 1 ng/ml auch alle signifikant im Vergleich zur Kontrolle waren. Die Stimulation mit bovinem IL-1 β ließ nur für 100 ng/ml eine signifikant verringerte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle erkennen. Untereinander unterschieden sich humanes und bovines IL-1 β in ihrer Wirkung auf die Genexpression von Aggrecan in den niedrigen Konzentrationen 0,1 ng/ml und 1 ng/ml signifikant voneinander (0,1 ng/ml: $p = 0,029$, 1 ng/ml: $p = 0,029$). Zwischen den Konzentrationen der humanen Verdünnungsreihe zeigten sich keine statistisch relevanten Unterschiede in der Genexpression von Aggrecan, jedoch in der bovinen Verdünnungsreihe. Hier waren die Unterschiede in der Expression nach Stimulation mit 100 ng/ml verglichen mit 0,1 ng/ml und 1 ng/ml IL-1 β , sowie nach Stimulation mit 10 ng/ml verglichen mit 0,1 ng/ml IL-1 β signifikant (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

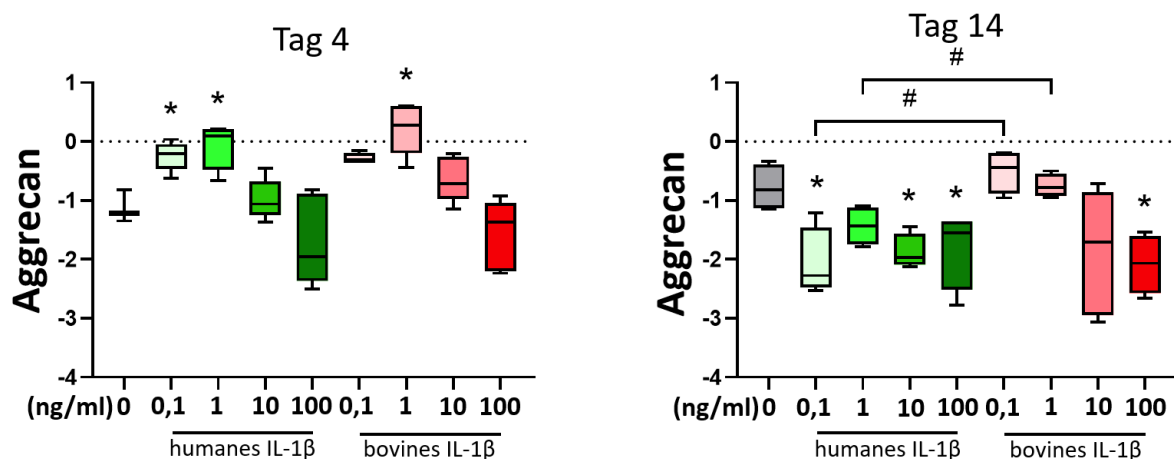


Abb. 9: Genexpression des anabolen Markers Aggrecan. Zum frühen (Tag 4) und späten Zeitpunkt (Tag 14) unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Gezeigt sind Daten der Experimente 3 und 4. Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Nach Anwendung des natürlichen Logarithmus wurden die Daten in Boxplots dargestellt. Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β durch #. * $p < 0,05$. # $p < 0,05$. IL-1 β , Interleukin-1 β . Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

COMP ist ein Proteoglykan, welches im hyalinen Knorpel für die Querverbindung der Kollagen Typ 2-Fibrillen zuständig ist. An Tag 4 war eine gesteigerte Genexpression an COMP im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten. Es zeigte sich in den humanen Gruppen der IL-1 β -Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml ein signifikanter Anstieg der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle (1 ng/ml: $p = 0,016$, 10 ng/ml: $p = 0,032$), ebenso in den bovinen Gruppen der Konzentrationen 0,1 ng/ml und 1 ng/ml (0,1 ng/ml: $p = 0,029$, 1 ng/ml: $p = 0,016$). Ein signifikanter Unterschied zwischen humanem und bovinem IL-1 β ließ sich nur bei 100 ng/ml ($p = 0,032$) feststellen. Es kam zu einer stärkeren Abnahme der Genexpression nach Zugabe des bovinen IL- β im Vergleich zum humanen IL-1 β (siehe Abbildung 10). Der Vergleich der verschiedenen Konzentrationen der humanen Verdünnungsreihe zeigte signifikante Unterschiede in der Genexpression von COMP nach Stimulation von 1 ng/ml verglichen mit 0,1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β . Innerhalb der Gruppen der bovinen Verdünnungsreihe war die Expression nach Stimulation mit 100 ng/ml im Vergleich zu 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml IL-1 β signifikant geringer. Gleiches galt für die Genexpression nach Stimulation mit 10 ng/ml verglichen mit 1 ng/ml IL-1 β (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert). An Tag 14 ließ sich die noch zuvor beobachtete gesteigerte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr nachweisen (siehe Abbildung 10). Lediglich bei 1 ng/ml bovinem IL-1 β und 10 ng/ml humanem IL-1 β blieb eine verstärkte Genexpression im Vergleich zur Kontrolle bestehen. In diesen beiden Konzentrationen unterschieden sich auch die humanen und bovinen Gruppen jeweils signifikant voneinander (1 ng/ml: $p = 0,019$, 10 ng/ml: $p = 0,016$). Zu diesem Zeitpunkt war innerhalb der humanen Verdünnungsreihe die Genexpression nach Stimulation mit 10 ng/ml im Vergleich zu den anderen Konzentrationen signifikant höher. Ein ähnliches Bild zeigte sich innerhalb der bovinen Verdünnungsreihe nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-1 β . Der Vergleich von 10 ng/ml mit 0,1 ng/ml IL-1 β stellte sich ebenfalls als signifikant heraus (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

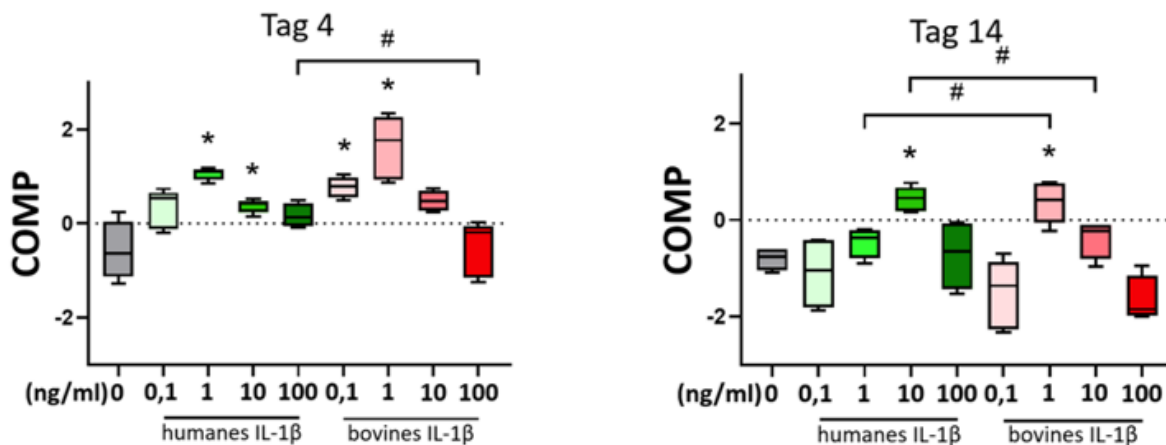


Abb. 10: Genexpression des anabolen Markers COMP. Zum frühen (Tag 4) und späten Zeitpunkt (Tag 14) unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Gezeigt sind Daten der Experimente 3 und 4. Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Nach Anwendung des natürlichen Logarithmus wurden die Daten in Boxplots dargestellt. Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β durch #. *p < 0,05. #p < 0,05. IL-1 β , Interleukin-1 β . COMP, Cartilage oligomeric matrix protein. Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

PRG-4, auch Lubricin genannt, ist ein Proteoglykan, welches den Muzinen zuzuordnen ist. Es befindet sich auf der Oberfläche hyalinen Knorpels sowie in der Synovialflüssigkeit. PRG-4 ist für die Lubrifikation im Gelenk und damit für die Gleitfähigkeit von Gelenkflächen gegeneinander zuständig. An Tag 4 zeigte sich ein heterogenes Bild in der Genexpression von PRG-4. Außer bei der Stimulation mit 1 ng/ml bovinem IL-1 β ($p = 0,032$) zeigte sich keine Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle (siehe Abbildung 11). In der humanen Verdünnungsreihe war die Genexpression nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β im Vergleich zu den übrigen Konzentrationen signifikant verringert. Gleiches galt für die bovine Verdünnungsreihe. Hier zeigte sich zudem die Genexpression nach Stimulation mit 10 ng/ml verglichen mit 1 ng/ml IL-1 β als signifikant verringert (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert). Die Genexpression an Tag 14 bei Pellets die mit bovinem IL-1 β stimuliert wurden, zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle vor allem für die Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml als signifikant vermindert (10 ng/ml: $p = 0,029$, 100 ng/ml: $p = 0,029$). In den Gruppen mit humanem IL-1 β war die Verringerung der Genexpression im Vergleich weniger stark ausgeprägt, wobei nur für 100 ng/ml ein signifikanter Unterschied zu sehen war ($p = 0,029$). Die Wirkung von humanem und

bovinem Interleukin unterschied sich in den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml signifikant voneinander (10 ng/ml: $p = 0,016$, 100 ng/ml: $p = 0,029$) (siehe Abbildung 11). Innerhalb der humanen Verdünnungsreihe zeigte sich eine signifikant verringerte Genexpression nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β verglichen mit 10 ng/ml. Die übrigen Konzentrationen waren in ihrem Effekt auf die Genexpression nicht weiter statistisch signifikant zueinander. Anders war es bei der bovinen Verdünnungsreihe. Nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β war die Genexpression von PRG-4 im Vergleich zu den anderen Konzentrationen signifikant verringert. Die Wirkung von 10 ng/ml verglichen mit 1 ng/ml IL-1 β zeigte ebenfalls eine signifikant verringerte Genexpression nach Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

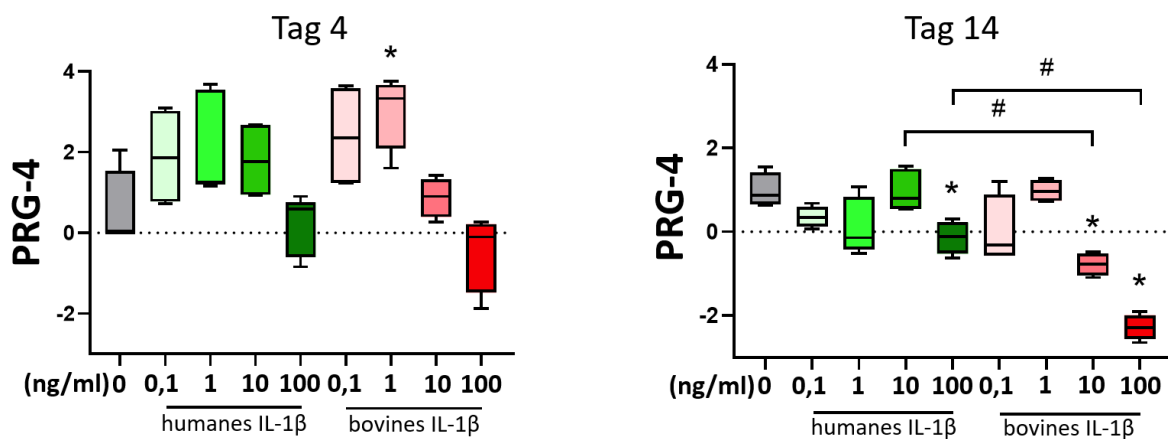


Abb. 11: Genexpression des anabolen Markers PRG-4. Zum frühen (Tag 4) und späten Zeitpunkt (Tag 14) unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Gezeigt sind Daten der Experimente 3 und 4. Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Nach Anwendung des natürlichen Logarithmus wurden die Daten in Boxplots dargestellt. Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β durch #. * $p < 0,05$. # $p < 0,05$. IL-1 β , Interleukin-1 β . PRG-4, Proteoglykan-4. Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

Histologische Beurteilung

Die EZM von hyalinem Knorpel besteht aus Kollagenen und Proteoglykanen (Caron et al. 2014). In der Safranin O/Fast Green Färbung wurden Proteoglykane rot und Kollagen grün angefärbt (siehe Abbildung 12). In der Kontrolle zeigte sich eine deutlich rötliche Färbung, die in der Verdünnungsreihe von IL-1 β bei höherer Konzentration in ihrer Intensität abnahm. Dies galt sowohl für Stimulation mit humanem als auch mit bovinem

IL-1 β (siehe Abbildung 13). Ein Verlust an rötlicher Färbung entsprach einem Verlust bzw. einer reduzierten Einlagerung an Proteoglykanen, was sich mit der reduzierten Genexpression anaboler Marker deckt. Abbildung 14 zeigt eine Gegenüberstellung der Pellets nach Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β .



Abb. 12: SafraninO/Fast Green-Färbung von gesundem, bovinem Gelenkknorpel. Maßstab 100 μ m und 200 μ m.

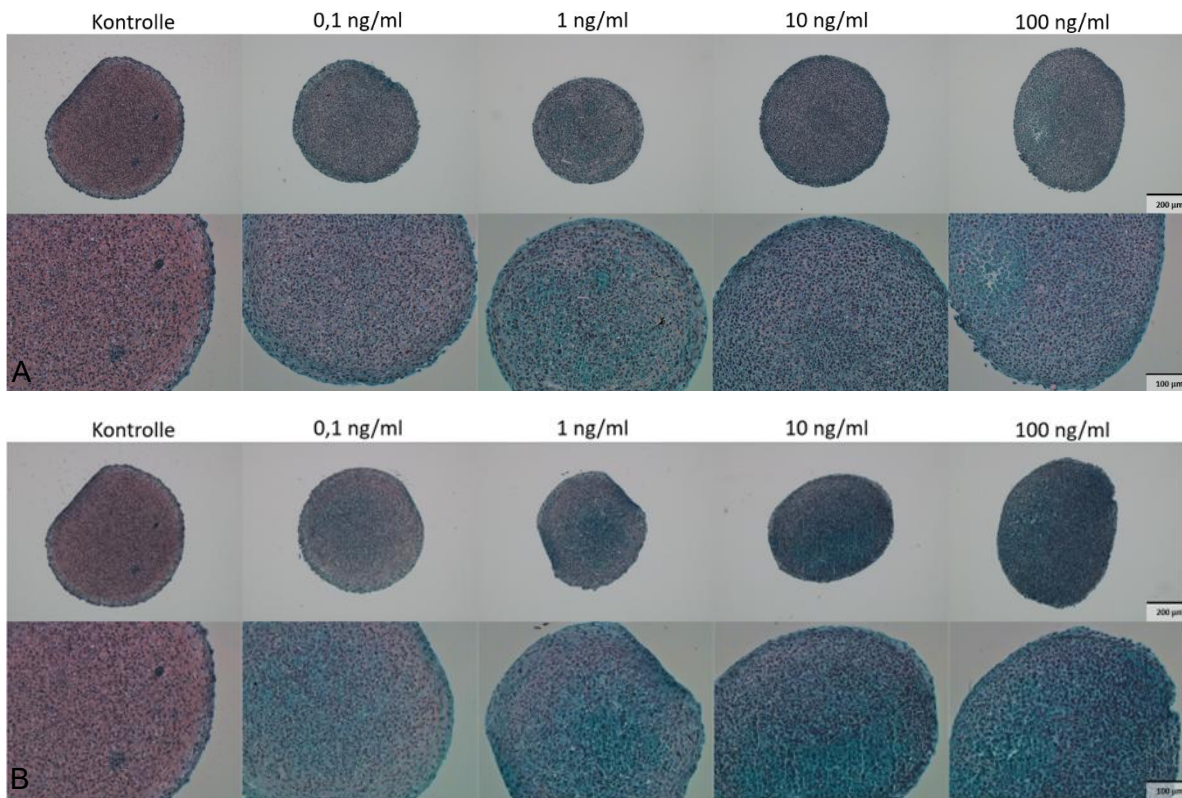


Abb. 13: Safranin O/Fast Green-Färbung der Pellets nach 14-tägigem Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Exemplarisch ist Experiment 2 dargestellt. Gegenüberstellung von Kontrolle mit humanen (A) bzw. bovinen Gruppen (B). Maßstab 100 μ m und 200 μ m. Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

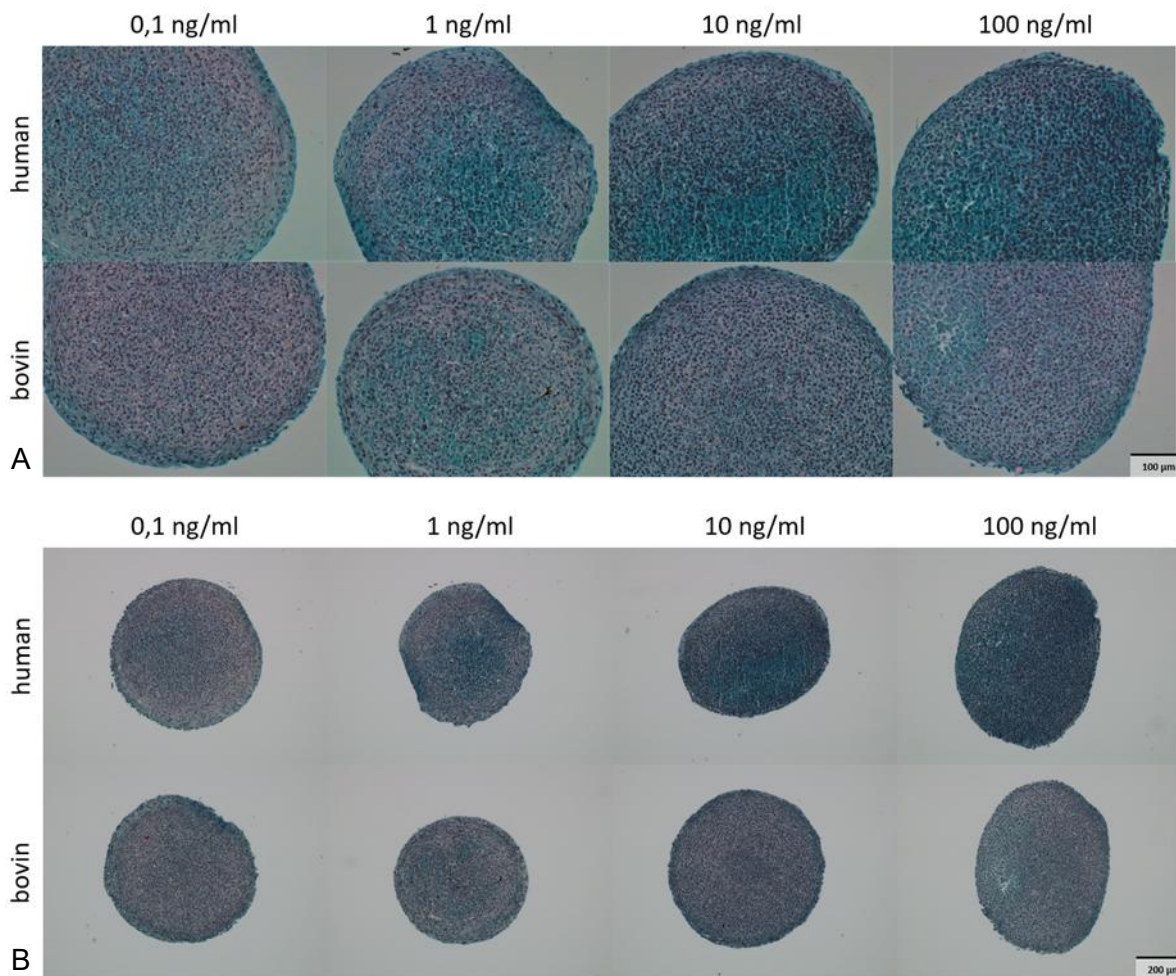


Abb. 14: Gegenüberstellung von humanen und bovinen Gruppen zur besseren Vergleichbarkeit. Safranin O/Fast Green-Färbung der Pellets nach 14-tägigem Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Exemplarisch ist Experiment 2 dargestellt. Maßstab 100 μ m (A) und 200 μ m (B). Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

3.2 Dedifferenzierung

Kollagen Typ 1 zählt ebenso wie GAG im Medium zu den Markern der Dedifferenzierung. Die Kollagen Typ 1-Genexpression an Tag 4 war verglichen mit der Kontrolle generell herunterreguliert. Insbesondere nach Stimulation mit 10 ng/ml ($p = 0,029$) und 100 ng/ml ($p = 0,016$) bovinem IL-1 β war dieser Unterschied signifikant. Die Wirkung von 100 ng/ml bovinem IL-1 β war verglichen mit dem humanen IL-1 β gleicher Konzentration signifikant stärker ($p = 0,032$). In den anderen Konzentrationen unterschieden sich humanes und bovines IL-1 β zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant in ihrer Wirkung auf die Genexpression (siehe Abbildung 15). Bei der humanen Verdünnungsreihe war die Genexpression nach

Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β verglichen mit 1 ng/ml und 0,1 ng/ml signifikant verringert. Innerhalb der bovinen Verdünnungsreihe führte die Stimulation mit 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β im Vergleich zur Stimulation mit 0,1 ng/ml und 1 ng/ml IL-1 β zu einer signifikant verringerten Genexpression von Kollagen Typ 1 (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert). An Tag 14 gab es in der Wirkung der beiden Interleukine zueinander keinen Unterschied mehr. Die Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle blieben zwar signifikant, jedoch war die negative Regulierung nicht mehr ganz so deutlich ausgeprägt (siehe Abbildung 15). Bei Betrachtung der Verdünnungsreihen fiel auf, dass sowohl bei der humanen als auch bei der bovinen die Genexpression nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β verglichen mit 0,1 ng/ml IL-1 β signifikant verringert war. In der humanen Verdünnungsreihe war zusätzlich nach Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β eine verringerte Kollagen Typ 1-Expression verglichen mit 0,1 ng/ml und 1 ng/ml IL-1 β zu beobachten. In der bovinen Verdünnungsreihe zeigte sich die Genexpression nach 100 ng/ml IL-1 β -Stimulation ebenfalls signifikant verringert, verglichen mit Stimulation mit 1 ng/ml IL-1 β (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

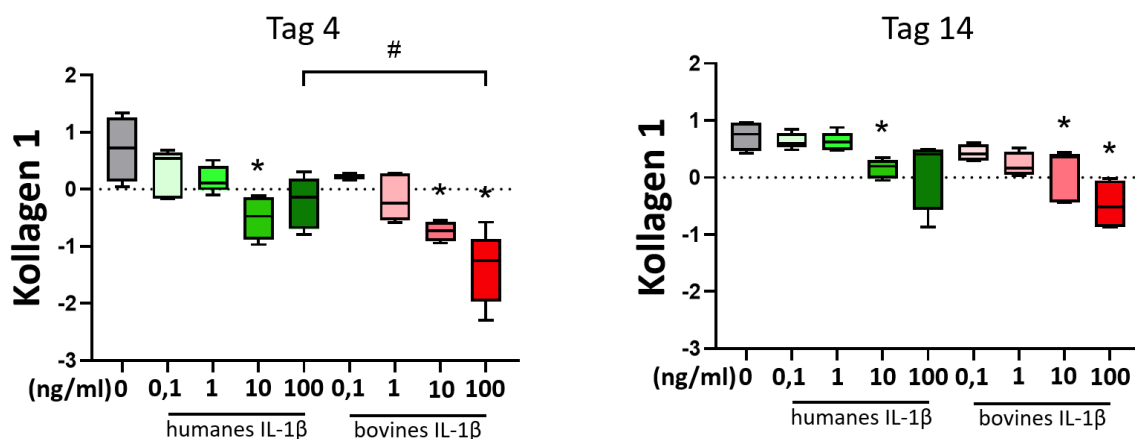


Abb. 15: Genexpression von Kollagen Typ 1. Zum frühen (Tag 4) und späten Zeitpunkt (Tag 14) unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Gezeigt sind Daten der Experimente 3 und 4. Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Nach Anwendung des natürlichen Logarithmus wurden die Daten in Boxplots dargestellt. Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β durch #. *p < 0,05. #p < 0,05. IL-1 β , Interleukin-1 β .

Es wurde die GAG-Konzentration in μ g/ml im Medium über 14 Tage hinweg analysiert. Zu keinem Zeitpunkt zeigten sich relevante Unterschiede verglichen mit der Kontrolle oder

zwischen dem humanem und bovinem IL-1 β (siehe Abbildung 16). In der kumulativen Analyse des GAG-Gehalts im Medium über 14 Tage hinweg zeigte sich in allen experimentellen Gruppen eine Abgabe von 30-40 $\mu\text{g/ml}$ GAG ins Medium (siehe Abbildung 17).

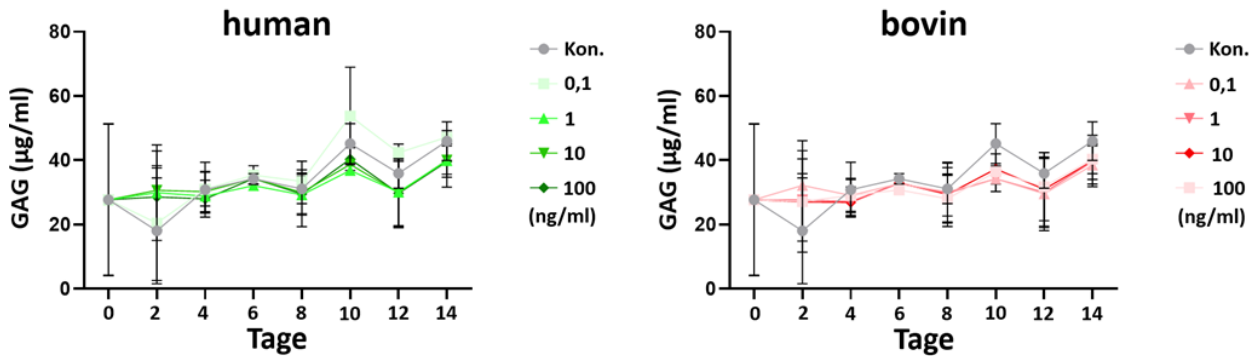


Abb. 16: GAG-Ausschüttung boviner Chondrozyten im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler von 2 Donoren (Experiment 1 und 2). GAG, Glykosaminoglykane. Kon., Kontrolle.

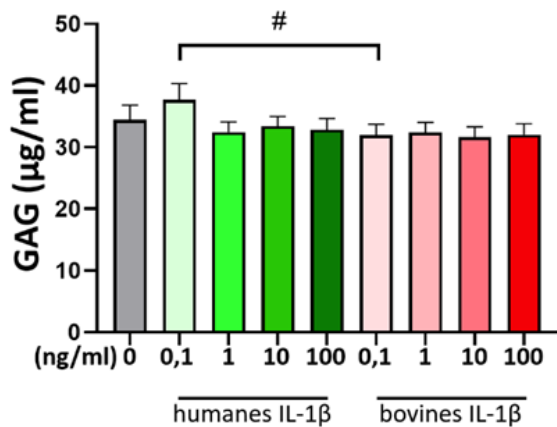


Abb. 17: Kumulative GAG-Ausschüttung boviner Chondrozyten in das umgebende Medium nach 14-tägigen Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler von 2 Donoren (Experiment 1 und 2). Signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β sind durch # gekennzeichnet. #p < 0,05. IL-1 β , Interleukin-1 β . GAG, Glykosaminoglykane.

3.3 Katabole Marker

Zu den katabolen Markern zählen die Matrixmetalloproteinasen MMP-3 und MMP-13. Dabei handelt es sich um Metalloproteinasen aus der Gruppe der Zink-abhängigen Endopeptidasen. Diese Enzyme sind maßgeblich am Abbau der Extrazellulärmatrix des hyalinen Knorpels beteiligt. Es wurde die Genexpression dieser Enzyme analysiert. An Tag 4 führte die Stimulation mit IL-1 β konzentrationsabhängig zu einer erhöhten Genexpression von MMP-3: je höher die Konzentration an IL-1 β , desto höher die Expression von MMP-3. Die vermehrte Genexpression stellte sich verglichen mit der Kontrollgruppe in allen experimentellen Gruppen als signifikant heraus. Zudem waren signifikante Unterschiede zwischen humanem und bovinem IL-1 β für die Konzentrationen 0,1 ng/ml, 1 ng/ml und 10 ng/ml zu beobachten (0,1 ng/ml: $p = 0,032$, 1 ng/ml: $p = 0,004$, 10 ng/ml: $p = 0,01$). Die Genexpression in den bovinen Gruppen war allgemein stärker und bereits bei einer niedrigeren Schwellenkonzentration von 1 ng/ml erhöht als in den humanen Gruppen (siehe Abbildung 18). Auch der Vergleich der Genexpression innerhalb einer Gruppe führte zu statistisch signifikanten Unterschieden. Innerhalb der humanen Gruppe zeigten alle Konzentrationen zueinander signifikante Unterschiede in der Genexpression von MMP-3. In der bovinen Gruppe zeigten alle Konzentrationen zueinander signifikante Unterschiede, außer die beiden hohen Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert). Die Genexpression von MMP-3 an Tag 14 war vergleichbar mit der an Tag 4. Vor allem in den Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml unterschieden sich die Genexpressionsmuster der Pellets. Der Effekt von 1 ng/ml bovinem IL-1 β auf die MMP-3-Genexpression war signifikant höher als der Effekt von humanem IL-1 β ($p = 0,016$), bei 10 ng/ml sogar deutlich signifikant höher ($p = 0,004$) (siehe Abbildung 18). Die Unterschiede in der Genexpression einer Verdünnungsreihe waren hier ebenfalls signifikant zueinander. Beim Vergleich der humanen Verdünnungsreihe zeigte lediglich der Sprung von 0,1 ng/ml auf 1 ng/ml IL-1 β keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Genexpression von MMP-3. In der bovinen Verdünnungsreihe zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Hier war lediglich der Unterschied nach Stimulation mit 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β nicht statistisch signifikant (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

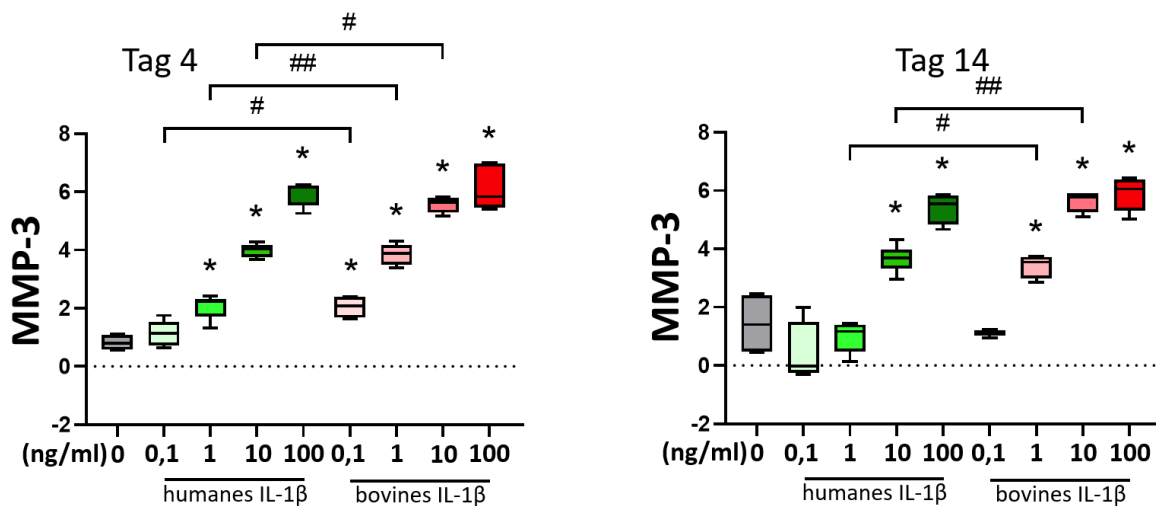


Abb. 18: Genexpression des katabolen Markers MMP-3. Zum frühen (Tag 4) und späten Zeitpunkt (Tag 14) unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Gezeigt sind Daten der Experimente 3 und 4. Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Nach Anwendung des natürlichen Logarithmus wurden die Daten in Boxplots dargestellt. Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β durch #. * $p < 0,05$. # $p < 0,05$. ## $p < 0,01$. IL-1 β , Interleukin-1 β . MMP-3, Matrixmetalloproteinase-3. Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

Bei dem katabolen Marker MMP-13 zeigte sich zu beiden Zeitpunkten ein ähnliches Bild. Stimulation mit IL-1 β , sowohl humanen als auch bovinen Ursprungs, führte im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einer erhöhten Genexpression. Auch spiegelte sich die Verdünnung in den Ergebnissen wider: in Gruppen höherer Konzentration an IL-1 β war eine stärker erhöhte Genexpression an MMP-13 festzustellen. Zu beobachten war auch, dass an Tag 14 in den bovinen Gruppen bei den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml eine fast gleich stark erhöhte Genexpression erreicht wurde. Signifikante Unterschiede zwischen dem Effekt von humanem und bovinem IL-1 β auf bovine Chondrozyten fanden sich an Tag 4 bei einer Konzentration von 0,1 ng/ml IL-1 β ($p = 0,032$) und an Tag 14 bei 1 ng/ml ($p = 0,029$) (siehe Abbildung 19). Bei genauerer Betrachtung der humanen Verdünnungsreihe an Tag 4 zeigte sich ausschließlich beim Vergleich von 1 ng/ml mit 10 ng/ml IL-1 β kein statistisch signifikanter Unterschied in der Genexpression von MMP-13. Alle anderen humanen Gruppen waren zueinander signifikant. Beim Vergleich der Genexpression innerhalb der bovinen Gruppen ergab sich nur zwischen den Konzentrationen 0,1 ng/ml und 10 ng/ml IL-1 β und 1 ng/ml und 10 ng/ml IL-1 β ein

signifikanter Unterschied in der Genexpression. An Tag 14 ergab der Vergleich der beiden hohen und der beiden niedrigen Konzentrationen in der humanen Gruppe keinen statistisch signifikanten Unterschied in der Genexpression. Der Vergleich der restlichen Konzentrationen untereinander führte zu signifikanten Unterschieden. Bei Betrachtung der unterschiedlichen Konzentrationen in der bovinen Gruppe ergaben sich aufgrund der fast gleich stark erhöhten Genexpression bei den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml keine signifikanten Unterschiede. Hier war lediglich die Genexpression im Vergleich zu 0,1 ng/ml signifikant unterschiedlich (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

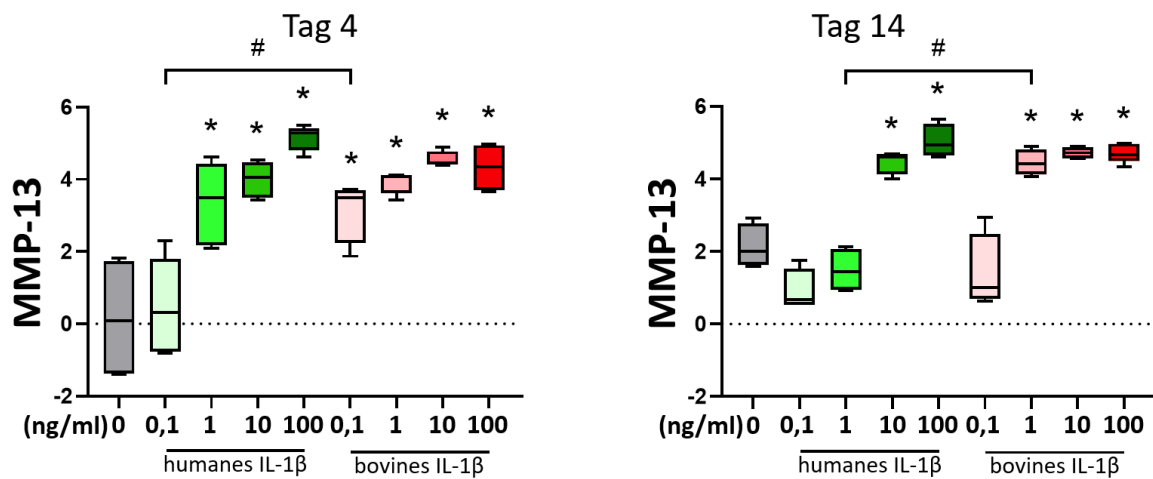


Abb. 19: Genexpression des katabolen Markers MMP-13. Zum frühen (Tag 4) und späten Zeitpunkt (Tag 14) unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Gezeigt sind Daten der Experimente 3 und 4. Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Nach Anwendung des natürlichen Logarithmus wurden die Daten in Boxplots dargestellt. Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β durch #. * $p < 0,05$. # $p < 0,05$. IL-1 β , Interleukin-1 β . MMP-13, Matrixmetalloproteinase-13. Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

3.4 Inflammation

Im verwendeten Modell dient die NO-Freisetzung ins umgebende Medium als Inflammationsmarker. Über 14 Tage hinweg wurde das Medium der Pellets gesammelt und die NO-Konzentration bestimmt (siehe Abbildung 20 A). Spitzenkonzentrationen an NO im Medium wurden an Tag 2 erreicht, weshalb in der weiteren Betrachtung der Fokus auf Tag 2 gelegt wurde. Die Pellets, die mit 0,1 ng/ml und 1 ng/ml humanem IL-1 β stimuliert wurden zeigten keine signifikanten Unterschiede in der NO-Abgabe ins Medium im Vergleich zur Kontrolle. In den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml ließen sich hingegen hochsignifikante Unterschiede (10 ng/ml: $26,33 \pm 6,08 \mu\text{M}$, $p < 0,001$; 100 ng/ml: $47,53 \pm 10,69 \mu\text{M}$, $p < 0,001$) feststellen. Die NO-Konzentration im Medium stieg in diesen Gruppen, verglichen mit der Kontrolle, deutlich an. Nach Stimulation mit bovinem IL-1 β war bereits ab einer Konzentration von 1 ng/ml ein signifikanter Unterschied ($14,66 \pm 2,59 \mu\text{M}$, $p = 0,002$) in der NO-Abgabe der Pellets festzustellen. Der Unterschied in der NO-Abgabe bei 10 ng/ml und 100 ng/ml (10 ng/ml: $40,43 \pm 7,87 \mu\text{M}$, $p < 0,001$; 100 ng/ml: $48,14 \pm 10,09 \mu\text{M}$, $p < 0,001$) war ebenfalls hochsignifikant. Auch hier stieg die Konzentration im Vergleich zur Kontrolle an. Generell galt, je stärker die Stimulation mit IL-1 β , desto höher die NO-Abgabe ins Medium. Es gab einen signifikanten Unterschied im Effekt von humanem und bovinem IL-1 β ; bei der Stimulation mit bovinem IL-1 β reichte bereits eine Konzentration von 1 ng/ml aus ($p = 0,038$), um einen signifikanten Effekt zu sehen, bei humanem IL-1 β nicht (siehe Abbildung 20 B). Bei Betrachtung der humanen Verdünnungsreihe stellten sich die Effekte von 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β auf die NO-Ausschüttung verglichen mit 0,1 ng/ml und 1 ng/ml als signifikant erhöht heraus. Innerhalb der bovinen Verdünnungsreihe führte lediglich der Vergleich in der NO-Ausschüttung von 100 ng/ml IL-1 β und 10 ng/ml IL-1 β zu keinem statistisch signifikanten Unterschied (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

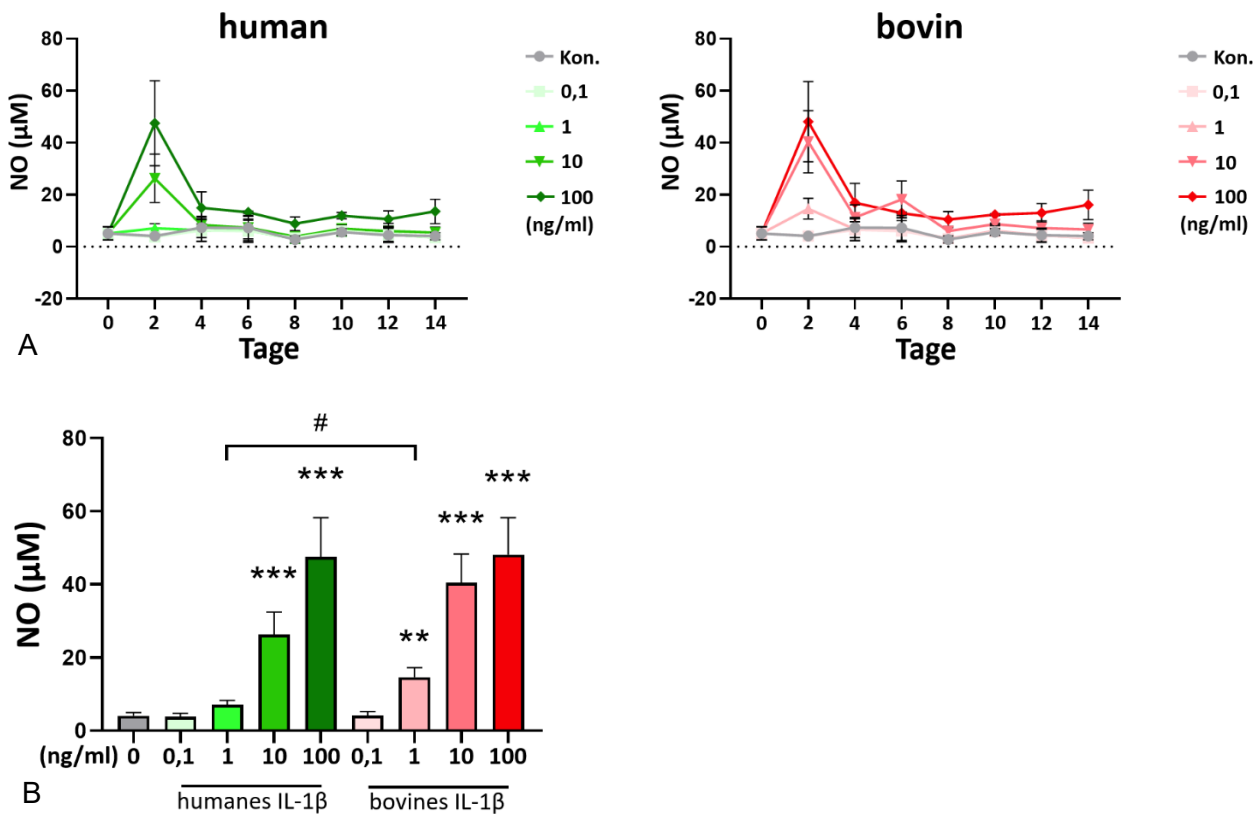


Abb. 20: A) NO-Ausschüttung. Im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml), sowie B) selektive Betrachtung von Tag 2. Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler von 4 Donoren (Experiment 1 bis 4). Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β durch #. * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. *** $p < 0,001$. # $p < 0,05$. NO, Stickstoffmonoxid. Kon., Kontrolle. IL-1 β , Interleukin-1 β . Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

IL-6 ist ein Entzündungsmediator und Botenstoff des Immunsystems, der insbesondere von Monozyten und Makrophagen synthetisiert wird. Es gehört zur Gruppe der proinflammatorischen Zytokine. Die IL-6-Konzentration im Medium wurde ebenfalls über mehrere Tage hinweg bestimmt. An Tag 6 wurden Spitzenkonzentrationen an IL-6 im Medium erreicht, weshalb dieser Tag selektiv genauer betrachtet wurde. Die Pellets der Kontrollgruppe, sowie der beiden Gruppen 0,1 ng/ml zeigten keine bis eine sehr geringe Ausschüttung an IL-6. In allen anderen Gruppen waren signifikant höhere IL-6-Abgaben ins Medium zu beobachten, wobei auch hier stärkere Stimulation mit IL-1 β zu vermehrter IL-6-Abgabe führte. Insgesamt war die Ausschüttung an IL-6 nach Stimulation mit

bovinem IL-1 β stärker ausgeprägt als nach Stimulation mit humanem IL-1 β . In den Konzentrationen 1 ng/ml und 10 ng/ml war der stärkere Effekt von bovinem IL-1 β gegenüber humanem IL-1 β signifikant (1 ng/ml: $p = 0,029$, 10 ng/ml: $p = 0,029$) (siehe Abbildung 21). Der Vergleich der Konzentrationen aus der humanen Verdünnungsreihe miteinander zeigte signifikante Unterschiede in der IL-6 Ausschüttung in jeder möglichen Kombination. Innerhalb der bovinen Verdünnungsreihe stellte sich lediglich die Zytokin-Ausschüttung nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β verglichen mit 10 ng/ml IL-1 β als nicht statistisch signifikant heraus (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

Die beschriebenen Beobachtungen in der IL-6-Ausschüttung korrelierten mit den Beobachtungen in der Genexpression von IL-6. Je stärker die Stimulation mit IL-1 β , desto stärker der Anstieg in der Genexpression. Signifikante Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe fanden sich sowohl an Tag 4 als auch an Tag 14 nach Stimulation mit 10 ng/ml und 100 ng/ml humanem (Tag 4: 10 ng/ml: $p = 0,016$; 100 ng/ml: $p = 0,016$; Tag 14: 10 ng/ml: $p = 0,029$; 100 ng/ml: $p = 0,01$) und 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml bovinem IL-1 β (Tag 4 und 14: 1 ng/ml: $p = 0,016$; 10 ng/ml: $p = 0,016$; 100 ng/ml: $p = 0,016$). Nach 2 Wochen Stimulation zeigte sich ein signifikanter Unterschied in den Gruppen mit der Konzentration 1 ng/ml ($p = 0,016$). Die Genexpression in der bovinen Gruppe war deutlich erhöht im Vergleich zur humanen Gruppe (siehe Abbildung 22). Die Betrachtung der humanen Verdünnungsreihe an Tag 4 ergab eine signifikant erhöhte Genexpression an IL-6 nach Stimulation mit 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β verglichen mit den Konzentrationen 0,1 ng/ml und 1 ng/ml. Innerhalb der bovinen Verdünnungsreihe zeigte sich eine erhöhte Genexpression nach Stimulation mit 10 ng/ml und 100 ng/ml IL-1 β verglichen mit 0,1 ng/ml IL-1 β . Zum späten Zeitpunkt stellte sich in der humanen Verdünnungsreihe lediglich der Vergleich von 0,1 ng/ml und 1 ng/ml IL-1 β als nicht statistisch signifikant heraus, während es in der bovinen Verdünnungsreihe der Vergleich von 10 ng/ml und 100 ng/ml war. In beiden Verdünnungsreihen waren die übrigen Konzentrationen in ihrem Effekt auf die Genexpression von IL-6 signifikant unterschiedlich zueinander (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

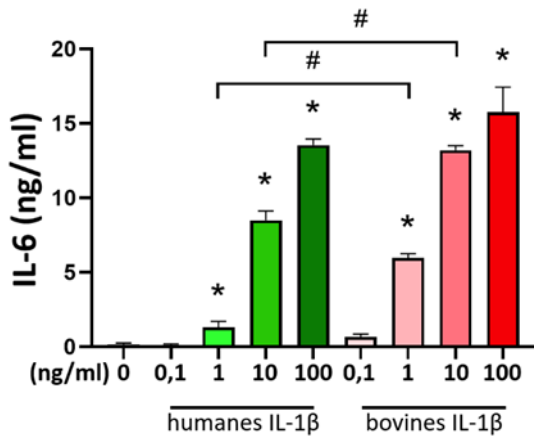


Abb. 21: IL-6-Ausschüttung in das umgebende Medium an Tag 6 unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Die Kontrolle wurde in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Dargestellt ist der Mittelwert $\pm$ Standardfehler von 2 Donoren (Experiment 1 und 4). Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle wurden durch * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β durch #. * $p < 0,05$. # $p < 0,05$. IL-6, Interleukin-6. IL-1 β , Interleukin-1 β . Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

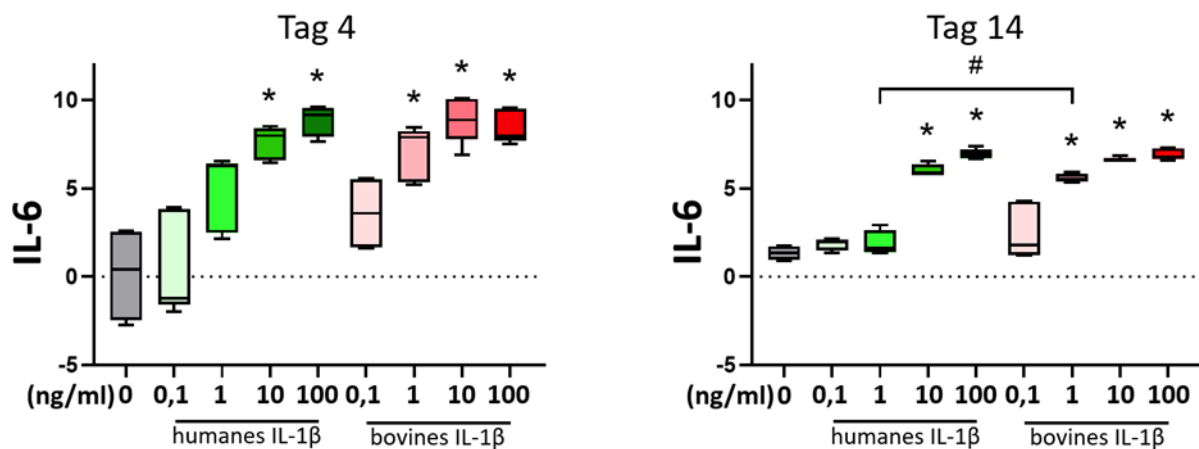


Abb. 22: Genexpression des inflammatorischen Markers IL-6. Zum frühen (Tag 4) und späten Zeitpunkt (Tag 14) unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Gezeigt sind Daten der Experimente 3 und 4. Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Nach Anwendung des natürlichen Logarithmus wurden die Daten in Boxplots dargestellt. Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β durch #. * $p < 0,05$. # $p < 0,05$. IL-1 β , Interleukin-1 β . IL-6, Interleukin-6. Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

Als weiterer Marker der Inflammation wurde die Genexpression von IL-8 untersucht. Bei diesem Zytokin handelt es sich um einen lokalen Entzündungsmediator, der insbesondere von Monozyten synthetisiert wird. In seiner Funktion als Entzündungsmediator stimuliert IL-8 neutrophile Granulozyten und rekrutiert weitere Entzündungszellen. Zum frühen Zeitpunkt an Tag 4 war die Genexpression nach Stimulation mit bovinem IL-1 β in den Gruppen 1 ng/ml und 10 ng/ml im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöht (1 ng/ml: $p = 0,036$, 10 ng/ml: $p = 0,036$). Das bovine IL-1 β zeigte in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml und 100 ng/ml signifikant stärkere Effekte als das humane IL-1 β (1 ng/ml: $p = 0,036$, 10 ng/ml: $p = 0,016$, 100 ng/ml: $p = 0,029$) (siehe Abbildung 23). Bei Betrachtung der humanen Verdünnungsreihe stellte sich nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-1 β die Genexpression von IL-8 als signifikant erhöht, verglichen mit 0,1 ng/ml und 10 ng/ml IL-1 β heraus. Die übrigen Konzentrationen zeigten in ihrer Wirkung auf die Genexpression einen Trend zueinander. Höhere Konzentrationen führten zu gesteigerter Genexpression. Innerhalb der bovinen Verdünnungsreihe stellte sich nur der Vergleich von 10 ng/ml und 100 ng/ml als nicht statistisch signifikant heraus. Die übrigen Konzentrationen waren in ihrer Wirkung auf die Genexpression signifikant unterschiedlich zueinander (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert). An Tag 14 war die Genexpression im Vergleich zur Kontrolle in allen Gruppen, mit Ausnahme von 0,1 ng/ml humanem IL-1 β , signifikant erhöht. Stimulation mit 0,1 ng/ml humanem IL-1 β führte zu keiner Expression von IL-8. Vergleichbar mit Tag 4 führte die Stimulation mit bovinem IL-1 β zu signifikant stärkeren Effekten als die Stimulation mit humanem IL-1 β . Der Unterschied war bei der Konzentration von 10 ng/ml signifikant ($p = 0,004$) (siehe Abbildung 23). Innerhalb der humanen Verdünnungsreihe war jede Konzentration in ihrem Effekt auf die Genexpression von IL-8 signifikant unterschiedlich zu den anderen. Ein vergleichbares Bild zeigte sich bei Betrachtung der bovinen Verdünnungsreihe: Lediglich die Stimulation mit 0,1 ng/ml und 1 ng/ml IL-1 β führten in ihrer Wirkung auf die Genexpression zu statistisch nicht signifikanten Unterschieden (aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht in der Abbildung markiert).

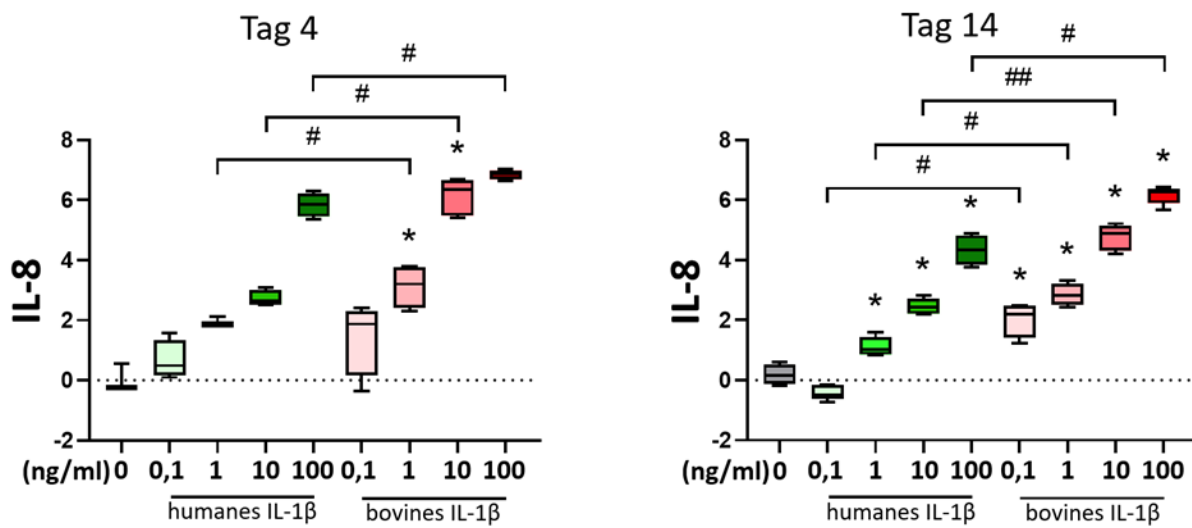


Abb. 23: Genexpression des inflammatorischen Markers IL-8. Zum frühen (Tag 4) und späten Zeitpunkt (Tag 14) unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). Gezeigt sind Daten der Experimente 3 und 4. Die Kontrolle ist in Grau dargestellt, humane Gruppen in Grün und bovine Gruppen in Rot. Nach Anwendung des natürlichen Logarithmus wurden die Daten in Boxplots dargestellt. Signifikanzen im Vergleich zur Kontrolle sind durch * gekennzeichnet, signifikante Unterschiede zwischen Stimulation mit humanem und bovinem IL-1 β durch #. *p < 0,05. #p < 0,05. ##p < 0,01. IL-1 β , Interleukin-1 β . IL-8, Interleukin-8. Modifiziert nach Ossendorff et al. 2024.

4. Diskussion

In diesem Projekt wurden die Effekte von unterschiedlichen Konzentrationen (0,1-100 ng/ml) an humanem und bovinem IL-1 β in einem bovinen *in-vitro* Inflammationsmodell aufgearbeitet. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger negativer Effekt auf die Chondrogenese. Der Einsatz von homologem IL-1 β führte zu stärkeren Effekten, wobei die Schwellenkonzentration für statistisch signifikante Effekte bei katabolen und inflammatorischen Markern bei 1 ng/ml IL-1 β lag.

In den folgenden Abschnitten 4.1 bis 4.3 werden die in dieser Dissertation erarbeiteten Daten mit anderen *in-vitro* Modellen verglichen. Eine Übersicht zu den mit dieser Dissertation verglichenen Modellen ist in den Tabellen 2 bis 7 zu finden. Dabei sind homologe Modelle in den Tabellen 2 und 3, heterologe Modelle in Tabelle 4 und Modelle mit IL-1 β unbekannten Ursprungs in den Tabellen 5 bis 7 aufgeführt.

4.1 Anabole Marker und Dedifferenzierung

Kollagen Typ 2, einer der Hauptbestandteile hyalinen Knorpels, war nach Stimulation mit IL-1 β sowohl zum frühen als auch zum späten Zeitpunkt in seiner Genexpression vermindert. Die Analyse des Kollagen/DNA-Verhältnisses brachte jedoch keine signifikanten Veränderungen nach IL-1 β -Stimulation hervor. Die Genexpression der Proteoglykane zeigte eine leichte Verringerung. Diese war vor allem bei höheren Konzentrationen an IL-1 β zu beobachten. Der Verlust an Proteoglykanen zeigte sich auch in histologischen Analysen. Die Safranin O/Fast Green Färbung ergab einen konzentrationsabhängigen Verlust an Proteoglykanen. Die Veränderungen der anabolen Marker präsentierten sich größtenteils Zytokin-unabhängig. Kollagen Typ 1, ein Marker für die Dedifferenzierung, wurde durch die Zytokinstimulation nicht vermehrt exprimiert. Auch die sGAG-Freisetzung in den Überstand kann als Zeichen der Dedifferenzierung interpretieren werden. Diese blieb über 14 Tage hinweg unverändert.

Verwendung von homologem IL-1 β

Eine frühere Studie (Lv et al. 2019), welche rekombinantes bovines IL-1 β der Konzentrationen 1-25 ng/ml nutzte um bovine Knorpel-Explantate zu stimulieren, zeigte

nach acht Tagen Stimulation einen kumulativen sGAG-Verlust von > 90 % für die Konzentrationen 10 ng/ml und 25 ng/ml IL-1 β . Bei einer Konzentration von 1 ng/ml betrug der kumulative sGAG-Verlust etwa 50 %. Diese Konzentration von 1 ng/ml wurde hier für alle weiteren Analysen verwendet. In der Safranin O-Färbung konnten sie eine deutliche Abnahme an Proteoglykanen, vom Rand in Richtung Zentrum beobachten. In unserer Studie mit Knorpelpellets konnte hingegen kein signifikanter kumulativer sGAG-Verlust festgestellt werden. Auch stellte sich der Proteoglykanverlust in der Safranin O/Fast Green Färbung eher diffus dar. Lv et al. 2019 stellten zudem eine um den Faktor 2,33 reduzierte Genexpression für Aggrecan bei einer Konzentration von 1 ng/ml IL-1 β fest. Für die gleiche Konzentration konnten sie aber keine veränderte Kollagen 2-Genexpression nachweisen. Insgesamt konnte in der Studie nur ein minimaler Kollagen-Verlust gezeigt werden. Auswirkungen auf die Kollagen- und GAG-Syntheserate *in situ* hatte IL-1 β der Konzentration 1 ng/ml nicht (siehe Tabelle 2). Bei uns stellte sich die Genexpression andersherum dar: Die Kollagen 2 Genexpression war für 1 ng/ml IL-1 β zum frühen und späten Zeitpunkt verringert, während Aggrecan zum frühen Zeitpunkt eher vermehrt und zum späten Zeitpunkt ohne signifikanten Unterschied verglichen mit der Kontrolle exprimiert wurde. Bei dem von uns beobachteten Anstieg in der Genexpression von Aggrecan zum frühen Zeitpunkt könnte es sich möglicherweise um einen kompensatorischen Gegenregulationsmechanismus auf den inflammatorischen Stimulus hin handeln. Einen Kollagen-Verlust und einen Einfluss auf die Kollagen- und GAG-Syntheserate konnten auch wir für keine Konzentration feststellen.

Eine andere Studie, welche humane Knorpel-Explantate und rekombinantes humanes IL-1 β der Konzentration 1 ng/ml verwendete, zeigte dass die kumulative sGAG-Freisetzung über 7 Tage Stimulation hinweg zunahm. Die Safranin O Färbung von Tag 7 bestätigte zudem einen Proteoglykanverlust (Hwang et al. 2021) (siehe Tabelle 2).

McNulty et al. 2013 nutzten in ihrer Studie Knorpel-Explantate vom Schwein und stimulierten diese für 24 Stunden mit rekombinant hergestelltem IL-1 β vom Schwein in einem Bereich von 0,01-10 ng/ml. Sie beobachteten ab einer Konzentration von 0,1 ng/ml IL-1 β eine signifikant gesteigerte Freisetzung an sGAG im Vergleich zur Kontrolle sowie eine stetige Steigerung bei Konzentrationserhöhung (siehe Tabelle 3).

In der Studie von Tao et al. 2021 wurden Chondrozyten der Maus mit 1-20 ng/ml rekombinant hergestelltem IL-1 β der Maus stimuliert. Sie zeigten bei steigender Zytokin-Konzentration eine Abnahme der Kollagen Typ 2-Proteinexpression nach 24 Stunden. Bei einer IL-1 β -Konzentration von 5 ng/ml kam es über 48 Stunden hinweg zu einer kontinuierlichen Abnahme der Proteinexpression (siehe Tabelle 3). Die bei uns durchgeführte Genexpressionsanalyse für Kollagen Typ 2 zeigte ein ähnliches Muster bei steigender Zytokin-Konzentration sowohl nach vier als auch nach 14 Tagen.

Tab. 2: Homologe Modelle (1/2)

Spezies	Autor	Modell	Konzentration	Passage	Dauer	Fazit zu IL-1β
Bovin	Lv et al. 2019	Monolayer + rekombinant bovin IL-1 β ; Explantate	1, 10, 25 ng/ml	unbekannt	Bis zu 8 Tage	Stimulation mit 1 ng/ml IL-1 β führt zur Abnahme an Proteoglykanen, reduzierten Genexpression an Aggrecan und zu einer gesteigerten Genexpression kataboler Marker
Human	Žigon-Branc et al. 2018	Sphäroid + rekombinant humane IL-1 β	1 ng/ml	Passage 1-3	24 Stunden	IL-1 β steigert die Genexpression kataboler Marker und führt zur Freisetzung inflammatorischer Marker
Human	Chen et al. 2019	Monolayer + rekombinant humane IL-1 β	10 ng/ml	Passage 1-3	24 Stunden	IL-1 β steigert die Genexpression kataboler Marker und führt zur Freisetzung inflammatorischer Marker
Human	Sakata et al. 2020	Zelllinie, Monolayer + rekombinant humane IL-1 β	0,01 ng/ml	Passage 5	4, 20 Stunden	IL-1 β steigert die Genexpression kataboler und inflammatorischer Marker
Human	Hwang et al. 2021	Monolayer + rekombinant humane IL-1 β ; Explantate	1 ng/ml	Passage 1	Bis zu 7 Tage	Proteoglykanverlust
Human	Sakata et al. 2022	Zelllinie; Monolayer + rekombinant humane IL-1 β	0,01 ng/ml	Passage 5	30 Minuten, 24 Stunden	IL-1 β steigert die Proteinexpression inflammatorischer Marker

Tab. 3: Homologe Modelle (2/2)

Spezies	Autor	Modell	Konzentration	Passage	Dauer	Fazit zu IL-1β
Porcin	McNulty et al. 2013	Explantate + rekombinant porcines IL-1 β	0,01, 0,1, 1, 10 ng/ml	/	24 Stunden	Mit zunehmender Konzentration an IL-1 β steigt die sGAG-Freisetzung, die Freisetzung inflammatorischer Marker, sowie die Genexpression kataboler Marker an; signifikante Effekte erst ab 1 ng/ml
Porcin	Tabeian et al. 2019	3-D-Konstrukte aus Faserknorpel + rekombinant porcines IL-1 β	0,1, 1, 10 ng/ml	unbekannt	6, 24 Stunden	Gesteigerte Gen- und Proteinexpression kataboler Marker ab 10 ng/ml
Ratte	Xu et al. 2022	Monolayer + rekombinant IL-1 β der Ratte	10 ng/ml	Passage 3	24 Stunden	Gesteigerte Proteinexpression an MMP-13, sowie Freisetzung inflammatorischer Marker ins Medium
Maus	Tao et al. 2021	Monolayer + rekombinant IL-1 β der Maus	1, 5, 10, 20 ng/ml	unpassagiert	24 Stunden	Mit zunehmender IL-1 β -Konzentration sinkt die Kollagen 2-Proteinexpression, während die Proteinexpression kataboler Marker steigt
Pferd	Jeremiasse et al. 2020	Monolayer + rekombinant IL-1 β und TNF- α vom Pferd	10 ng/ml	Passage 2	3, 7 Tage	Gesteigerte Proteinexpression kataboler Marker

Verwendung von IL-1 β mit unbekanntem Ursprung

In der Arbeit von Mohanraj et al. 2018 wurden bovine Chondrozyten mit 1-10 ng/ml IL-1 β stimuliert, dessen Ursprung nicht ersichtlich war (siehe Tabelle 5). Nach sechs Tagen Stimulation konnte bei den 3-D-Knorpelkonstrukten ein konzentrationsabhängiger GAG-Verlust beobachtet werden, welcher auch histologisch in der Alcian Blau-Färbung sichtbar wurde. Entsprechend stieg die GAG-Freisetzung in den Überstand über die Zeit hinweg an. Einen Verlust an Proteoglykanen im Knorpelpellet und damit auch an GAG konnten wir unsererseits in der Safranin O/Fast Green-Färbung zeigen. Eine signifikant gesteigerte GAG-Freisetzung über 14 Tage hinweg konnten wir nicht feststellen. Zudem beobachteten Mohanraj et al. 2018 eine leichte Abnahme des Gesamtkollagengehalts im Knorpelkonstrukt bei Stimulation mit 5 und 10 ng/ml IL-1 β . Eine leichte, jedoch nicht signifikante, Abnahme des Gesamtkollagengehalts konnten auch wir bei Stimulation mit höheren Konzentrationen an IL-1 β sehen.

In den folgenden drei Studien (Fan et al. 2006; Kunisch et al. 2016; Zhu et al. 2022) wurden jeweils humane Chondrozyten für 24 Stunden mit 10 ng/ml IL-1 β stimuliert. Die Kollagen 2-Genexpression war jeweils deutlich reduziert (siehe Tabellen 5 und 6). Zhu et al. 2022 untersuchten zusätzlich die Aggrecan-Genexpression sowie die Proteinexpression genannter Marker. Diese präsentierten sich ebenfalls reduziert. Wir beobachteten ein ähnliches Verhalten der Genexpressionen von Kollagen 2 und Aggrecan. Zudem analysierten Kunisch et al. 2016 die Kollagen 1-Genexpression. Diese war um den Faktor 5,7 gesteigert. In unserer Arbeit stellten wir keine solche Dedifferenzierung fest. Wir nutzten Chondrozyten der Passage 3 mit einem Population Doubling Level im Median von 2,7 für die Bildung von Pellets (250.000 Zellen/Pellet). Dies ist ein eher geringes Verdopplungslevel, was für eine geringe Dedifferenzierung spricht und erklärt, warum wir keine gesteigerte Kollagen 1-Genexpression beobachteten.

Ziادلou et al. 2019 stimulierten Arthrose-vorgeschädigte humane Knorpelpellets für 72 Stunden mit 1 ng/ml IL-1 β und TNF- α unbekannten Ursprungs. Sie stellten in der Safranin O-Färbung einen GAG-Verlust fest und spezifizierten diesen mit einer immunhistochemischen Aggrecan-Färbung. Sie sahen zudem ein reduziertes GAG/DNA-Verhältnis (siehe Tabelle 6). Wir sahen ebenfalls bei so geringer Konzentration einen

GAG-Verlust der Knorpelpellets in der Färbung, obwohl wir im Gegensatz zu Ziadlou et al. 2019 gesunde Chondrozyten stimulierten.

In der Arbeit von Frischholz et al. 2020 wurden Knorpelpellets vom Schwein mit 1 und 10 ng/ml IL-1 β unbekannten Ursprungs über 14 Tage hinweg stimuliert (siehe Tabelle 7). Bei 10 ng/ml IL-1 β ließen sich ein reduziertes GAG/DNA- und Kollagen/DNA-Verhältnis beobachten. Stimulation mit 1 ng/ml zeigte keinen Effekt. Die Kollagen 2-Genexpression war nach 14 Tagen Zytokin-Stimulation unverändert. In unserer Arbeit ließ sich eine leichte (nicht signifikante) konzentrationsabhängige Abnahme des Kollagen/DNA-Verhältnisses beobachten. Der GAG-Gehalt der Knorpelpellets zeigte sich in allen Konzentrationen signifikant verringert, mit Ausnahme der Gruppe 0,1 ng/ml humanes IL-1 β . Im Gegensatz zu Frischholz et al. 2020 präsentierte sich die Kollagen 2-Genexpression nach 14 Tagen und in allen Gruppen und Konzentrationen reduziert. Grund für diesen Unterschied könnte der verwendete Schweineknorpel sein. Wir verwendeten ausschließlich Rinderknorpel. Zudem ist der Ursprung des IL-1 β unbekannt. Möglicherweise wurde hier eine Spezies verwendet, die dem Schwein weniger ähnlich ist als der Mensch dem Rind. Somit wäre die Spezifität von IL-1 β und IL-1-Rezeptor nur gering ausgeprägt. Außerdem beobachteten Frischholz et al. 2020 nach Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β eine erhöhte Kollagen 1-Genexpression, welche sich durch eine immunhistochemische Färbung bestätigte. Wir beobachteten nach 14-tägiger Zytokinstimulation keine gesteigerte Genexpression von Kollagen 1. Eine mögliche Erklärung könnte die Tatsache sein, dass Frischholz et al. 2020 den Chondrozyten keine Zeit zur Redifferenzierung gaben. In einer parallelen Versuchsreihe mit 7-tägiger Phase der Redifferenzierung vor Versuchsbeginn beobachteten sie keine signifikant gesteigerte Kollagen 1-Genexpression. In unserem Versuchsaufbau war eine einwöchige Phase der Redifferenzierung vor Start der experimentellen Bedingungen vorhanden.

Wu et al. 2021 induzierten bei Chondrozyten der Ratte ein inflammatorisches Milieu mit 10 ng/ml IL-1 β unbekannten Ursprungs. Nach 7 Tagen präsentierte sich die Kollagen 2-Expression auf Gen- und Proteinniveau reduziert (siehe Tabelle 7). Wir sahen eine ähnliche Entwicklung der Genexpression von Kollagen 2.

Eine andere Studie (Arias et al. 2019) untersuchte den Effekt von 10 ng/ml IL-1 β auf Chondrozyten von Hasen. Auch hier war nicht ersichtlich, welchen Ursprung das

verwendete Zytokin hatte. Nach 24 Stunden wurde hier eine verringerte Kollagen 2-Genexpression, aber eine unveränderte Proteinexpression beobachtet (siehe Tabelle 7). Es ist bekannt, dass es eine gewisse Zeit braucht, bis Veränderung des mRNA-Levels das Protein-Level erreichen. Außerdem beinhaltet dieser Weg einige Regulationspunkte, an welchen die Proteinbiosynthese beeinflusst werden kann.

Die Arbeit von Rotter Sopasakis et al. 2019 beschäftigte sich mit Knorpelpellets von Pferden, welche 72 Stunden mit 5 ng/ml IL-1 β stimuliert wurden, dessen Ursprung nicht ersichtlich war. Es zeigte sich eine deutlich reduzierte Genexpression von Kollagen 2 und Aggrecan, während die von COMP unverändert war (siehe Tabelle 7). Wir sahen nach vier Tagen eine reduzierte Kollagen 2-Genexpression. Für Aggrecan beobachteten wir an Tag 4 eine unveränderte Genexpression. Die COMP mRNA-Level waren hingegen leicht erhöht. Bei COMP handelt es sich um ein komplexes Protein zur Quervernetzung von Kollagen 2. COMP ist ein Marker für die chondrogene Differenzierung, welcher sogar noch vor Kollagen 2 in seiner Genexpression herunter reguliert wird. Solange noch eine Kollagen 2-Genexpression vorhanden ist, kann die Synthese von COMP wieder aufgenommen werden (Zaucke et al. 2001). Möglicherweise lassen sich die leicht erhöhten mRNA-Level von COMP an Tag 4 mit einer Wiederaufnahme der Genexpression nach erfolgter Redifferenzierung in der einwöchigen Phase des free swell erklären. Zusätzlich untersuchten Rotter Sopasakis et al. 2019 die Genexpression von Kollagen 1 und beobachteten, wie wir, keine Veränderung, was für eine erfolgte Redifferenzierung spricht.

4.2 Katabole Marker

Die Genexpressionsanalyse für die katabolen Marker MMP-3 und MMP-13 ergab eine konzentrationsabhängige statistisch signifikante Steigerung der Genexpression verglichen mit der Kontrollgruppe. Hierbei zeigte der homologe Einsatz von Zytokin und Chondrozyten im Vergleich zum heterologen Einsatz stärkere Effekte. Bei MMP-3 war dies zu beiden untersuchten Zeitpunkten (Tag 4 und Tag 14) bei der Konzentration von 1 ng/ml IL-1 β der Fall, bei MMP-13 zum späten Zeitpunkt ebenfalls.

Verwendung von homologem IL-1 β

Lv et al. 2019 verwendeten bovine Chondrozyten und IL-1 β ebenfalls homolog (siehe Tabelle 2). Bei einer Konzentration von 1 ng/ml konnte nach 48 Stunden Stimulation für MMP-3 eine gesteigerte Genexpression um einen Faktor von ca. 189 und für MMP-13 von ca. 41 gezeigt werden. Dies deckt sich mit unserer Beobachtung einer gesteigerten Genexpression von MMP-3 und MMP-13. Lv et al. 2019 analysierten die Genexpression weiterer katabole Marker, ADAMTS-4 und ADAMTS-5. Hierbei handelt es sich um Enzyme, die Aggrecan abbauen und somit die EZM degradieren (Mead und Apte 2018; Stanton et al. 2005). Diese wurden nach IL-1 β -Stimulation auch verstärkt exprimiert (Lv et al. 2019), was die katabolen Effekte von IL-1 β nochmal bestätigt.

Žigon-Branc et al. 2018 zeigten in ihrer Studie nach 24-stündiger Stimulation mit verschiedenen Inflammationsinduktoren auf humane Chondrozyten, dass 1 ng/ml rekombinant hergestelltes humanes IL-1 β zu signifikant gesteigerten mRNA-Leveln an MMP-1 und MMP-13 führten (siehe Tabelle 2).

Chen et al. 2019 stimulierten humane Chondrozyten für 24 Stunden mit 10 ng/ml rekombinant humanem IL-1 β . Am Ende der Stimulation beobachteten sie eine signifikante Erhöhung von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 im Medium (siehe Tabelle 2). Wir sahen eine Erhöhung der Genexpression von MMP-3 und MMP-13 an unseren Messzeitpunkten Tag 4 und Tag 14. Zusätzlich stellten Chen et al. 2019 eine Erhöhung der mRNA- und Protein-Level von ADAMTS-4 und ADAMTS-5 fest.

Eine weitere Studie untersuchte den Effekt von 0,01 ng/ml rekombinant humanem IL-1 β auf eine humane Knorpelzelllinie (Sakata et al. 2020). Nach vier Stunden zeigten sich die mRNA-Level von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 erhöht, nach 20 Stunden ließ sich dies auch auf Proteinniveau nachweisen (siehe Tabelle 2). In der Literatur wurde bisher nur selten eine so niedrige Konzentration an IL-1 β verwendet. Die Arbeit von Sakata et al. 2020 ist nach unserem Kenntnisstand die Einzige, die bei dieser Konzentration von 0,01 ng/ml IL-1 β katabole Effekte beobachtete.

Im Gegensatz zu Sakata et al. 2020 beobachteten McNulty et al. 2013 bei dieser IL-1 β -Konzentration keine gesteigerte MMP-Aktivität. Sie nutzten Chondrozyten und IL-1 β vom Schwein, wobei sie in einem Bereich von 0,01-10 ng/ml IL-1 β für 24 Stunden stimulierten

(siehe Tabelle 3). Vergleichbar zu unseren Ergebnissen sahen sie auch erst ab einer Konzentration von 1 ng/ml IL-1 β signifikante Effekte.

Tabeian et al. 2019 untersuchten Faserknorpel aus dem Kiefergelenk von Schweinen und stimulierten mit dazu homologem IL-1 β . Faserknorpel hat einen höheren Kollagen Typ 1-Anteil als der hier verwendete hyaline Knorpel (Armiento et al. 2019). Analysen der Genexpression von Tabeian et al. 2019 zeigten, dass im Faserknorpel nach 10 ng/ml IL-1 β -Stimulation (24 Stunden) verstärkt MMP-13 exprimiert wurde. Eine immunhistochemische Färbung für MMP-13 bestätigte dies. Gleiches galt für die Genexpression von ADAMTS-4 und ADAMTS-5. Allerdings sahen sie im gleichen Zeitraum bei einer Stimulation von 1 ng/ml IL-1 β noch keine signifikante Änderung (siehe Tabelle 3). Möglicherweise liegt dies an der hier verwendeten Knorpelart. Andere bereits genannte Arbeiten und auch wir nutzten hyalinen Knorpel und sahen signifikante Effekte bei 1 ng/ml IL-1 β .

In der Arbeit von Tao et al. 2021 wurden verschiedene Konzentrationen (1-20 ng/ml) an IL-1 β der Maus auf Chondrozyten der Maus getestet. Bei einer Messung nach 24 Stunden wurde bei steigender IL-1 β -Konzentration eine zunehmende Proteinexpression von MMP-3 beobachtet. Für MMP-13 sah man ein Maximum der Expression bei einer IL-1 β -Konzentration von 5 ng/ml und danach einen leichten Abfall. Über 48 Stunden Stimulation hinweg zeigte sich bei einer verwendeten Konzentration von 5 ng/ml IL-1 β ein stetiger Anstieg in der Proteinexpression von MMP-3. Bei MMP-13 stieg die Proteinexpression bei 5 ng/ml IL-1 β innerhalb der ersten 24 Stunden an, nahm nach 48 Stunden jedoch wieder leicht ab (siehe Tabelle 3).

Xu et al. 2022 stimulierten Chondrozyten der Ratte lediglich mit einer Konzentration von 10 ng/ml IL-1 β der Ratte. Dabei konnten sie eine verstärkte Proteinexpression an MMP-13 feststellen (siehe Tabelle 3).

Auch Jeremiasse et al. 2020 nutzten 10 ng/ml IL-1 β in ihrem homologen Modell mit Chondrozyten vom Pferd. In Kombination mit 10 ng/ml TNF- α wurde auch hier eine gesteigerte Proteinexpression an MMP-3 und MMP-13 festgestellt (siehe Tabelle 3). In den zuletzt genannten Arbeiten wurde jeweils nur eine Konzentration an IL-1 β getestet, welche über der bei uns beobachteten Schwellenkonzentration von 1 ng/ml liegt. Hier

kann also keine Aussage zu Unterschieden der Schwellenkonzentration bei verschiedenen Spezies getroffen werden.

Verwendung von heterologem IL-1 β

Ding et al. 2013 nutzen in ihrer Arbeit Chondrozyten von Hasen und stimulierten diese für 24 Stunden mit 10 ng/ml rekombinant humanem IL-1 β . Es ließen sich sowohl gesteigerte mRNA-Level als auch eine gesteigerte Proteinexpression für MMP-1, MMP-3 und MMP-13 beobachten (siehe Tabelle 4). Sie verwendeten im Gegensatz zu uns nur eine Konzentration und stimulierten kürzer. Wir sahen bei uns für die Konzentration 10 ng/ml zum frühen und späten Zeitpunkt gesteigerte mRNA-Level. Zum frühen Zeitpunkt war dies bei uns auch schon für 1 ng/ml IL-1 β der Fall.

Tab. 4: Heterologe Modelle

Spezies	Autor	Modell	Konzentration	Passage	Dauer	Fazit zu IL-1 β
Hase	Ding et al. 2013	Monolayer + rekombinant humane s IL-1 β	10 ng/ml	Passage 2-4	24 Stunden	Gesteigerte Gen- und Proteinexpression kataboler Marker

Verwendung von IL-1 β mit unbekanntem Ursprung

In der Studie von Mohanraj et al. 2018 wurden bovine Chondrozyten mit IL-1 β unbekannten Ursprungs verwendet. Die 3-D-Knorpelkonstrukte wurden sechs Tage lang mit 1-10 ng/ml IL-1 β stimuliert. Die MMP-Aktivität im Überstand wurde am dritten und sechsten Tag gemessen, wobei ein konzentrationsabhängiger Anstieg in der Aktivität beobachtet wurde (siehe Tabelle 5). Wir beobachteten ein vergleichbares Verhalten der MMPs bereits in der Genexpression.

In drei Studien (Kunisch et al. 2016; Sun et al. 2015; Zhu et al. 2022) wurden humane Chondrozyten mit 10 ng/ml IL-1 β unbekannten Ursprungs über 24 Stunden hinweg stimuliert. Sun et al. 2015 zeigten eine gesteigerte MMP-1- und MMP-13-, sowie eine verminderte Tissue Inhibitor of MetalloProteinase-1-Genexpression (TIMP-1). In der später veröffentlichten Studie von Kunisch et al. 2016 wurde der Effekt von IL-1 β auf Einzelzellniveau und in einer Zellpopulation untersucht. Auf Zellpopulationsebene konnte hier gezeigt werden, dass 10 ng/ml IL-1 β allein oder in Kombination mit 10 ng/ml TNF- α

zu gesteigerten mRNA-Leveln an MMP-1 und MMP-3 und zu erniedrigten Leveln an TIMP-1 führten. Auf Einzelzellniveau führte die alleinige Stimulation mit einem einzelnen Zytokin prozentual gesehen zu stärkeren Effekten auf MMP-1 und MMP-3 als die Kombination beider Zytokine. Auch hier wurde nur mit einer hohen Konzentration getestet. Zhu et al. 2022 beobachteten eine deutlich erhöhte Genexpression von MMP-3 und MMP-13 und ebenso von ADAMTS-4 und ADAMTS-5 (siehe Tabelle 6).

In einer anderen Arbeit, in der der Ursprung des Zytokins ebenfalls nicht ersichtlich war, konnte MMP-13 nach 14-tägiger Stimulation von Chondrozyten des Schweins mit 10 ng/ml IL-1 β durch eine immunhistochemische Färbung nachgewiesen werden. Für eine Konzentration von 1 ng/ml IL-1 β war dies nicht der Fall (Frischholz et al. 2020) (siehe Tabelle 7). Möglicherweise liegt dies am Ursprung des IL-1 β . Vielleicht wurde hier eine Spezies verwendet, die dem Schwein wenig ähnlich ist. Somit wäre die Spezifität von IL-1 β und IL-1-Rezeptor nur sehr gering ausgeprägt, weshalb die Färbung bei 1 ng/ml IL-1 β ausblieb.

Auch bei der Arbeit von Genemaras et al. 2016 war der Ursprung des verwendeten IL-1 β nicht ersichtlich. Die verwendeten Chondrozyten stammten vom Schwein. Sie zeigten durch Messung der Micro-RNA miR27b indirekt, dass nach Stimulation mit 10 ng/ml IL-1 β MMP-13 herauf reguliert wurde (siehe Tabelle 6). Bei miR27b handelte es sich um einen direkten Regulator von MMP-13; liegt die Micro-RNA verringert vor, steigt der Anteil an MMP-13 (Akhtar et al. 2010).

4.3 Inflammation

Im verwendeten Modell wurde die NO-Freisetzung ins umgebende Medium als Inflammationsmarker betrachtet. Die stärkste Freisetzung war am zweiten Tag zu beobachten. Die Abgabe an NO nahm mit steigender IL-1 β -Konzentration zu, wobei die Stimulation mit bovinem IL-1 β bereits bei einer geringeren Konzentration signifikante Effekte erzeugte. Die Freisetzung von IL-6 ins umgebende Medium wurde am sechsten Tag gemessen. Auch hier wurde eine konzentrationsabhängig gesteigerte Freisetzung beobachtet. Die Stimulation mit bovinem IL-1 β führte im Vergleich zum humanem IL-1 β zu messbar mehr IL-6-Freisetzung. Die Beobachtungen korrelierten mit der IL-6-

Genexpression. Hier zeigte sich ein ähnliches Muster. Die Genexpression von IL-8 verdeutlichte den stärkeren Effekt des bovinen IL-1 β erneut. Die Genexpression stieg mit steigender Zytokinkonzentration an. Nach 14 Tagen Stimulation zeigte bovines IL-1 β in jeder Konzentration eine signifikant höhere Genexpression als humanes IL-1 β .

Verwendung von homologem IL-1 β

In der Arbeit von Chen et al. 2019 wurden humane Chondrozyten mit 10 ng/ml humanem rekombinant hergestellten IL-1 β stimuliert (siehe Tabelle 2). Nach 24 Stunden war die NO-Konzentration im umgebenden Medium im Vergleich zur Kontrolle etwa doppelt so hoch. Die iNOS wird nach Stimulation mit Zytokinen induziert und kann große Mengen an NO im nano- bis micromolaren Bereich synthetisieren (Ahmad et al. 2020). Ihre mRNA- und Protein-Level stiegen unter Stimulation mit IL-1 β ebenfalls signifikant an. Wir beobachteten nach 48 Stunden ebenfalls eine gesteigerte NO-Abgabe. Hier führte der homologe Gebrauch von Knorpelzellen und Zytokin bereits bei einer Konzentration von 1 ng/ml IL-1 β zu einem Anstieg um mehr als das Doppelte der Kontrollgruppe. Wie auch wir, beobachteten Chen et al. 2019 zudem einen Anstieg der IL-6-Konzentration im Medium. Sie untersuchten außerdem weitere Entzündungsmarker, die in unserer Arbeit nicht betrachtet wurden. Die TNF- α -Freisetzung nahm unter IL-1 β -Stimulation deutlich zu, ebenfalls die Freisetzung von PGE₂. Die COX-2, welche an der Synthese von PGE₂ beteiligt ist, lag auf mRNA- und Protein-Niveau ebenfalls vermehrt vor.

In einer anderen Studie (Žigon-Branc et al. 2018) wurden Chondrozyten und IL-1 β ebenfalls homolog verwendet; beides war humanen Ursprungs. Nach 24 Stunden Stimulation mit 1 ng/ml IL-1 β wurden erhöhte Konzentrationen an IL-6 und IL-8 im Medium nachgewiesen (siehe Tabelle 2). Für die gleiche Konzentration an IL-1 β konnten wir nach 6 Tagen auch einen erhöhten IL-6-Spiegel nachweisen, sowohl beim homologen als auch beim heterologen Gebrauch von Zytokin und Knorpelzellen. Beim homologen Gebrauch war die Konzentration an IL-6 im Medium jedoch signifikant höher.

Sakata et al. 2020 untersuchten in einer ersten Studie mit einer humanen Knorpelzelllinie (CC-2550) den Einfluss von 0,01 ng/ml humanem rekombinanten IL-1 β auf die Genexpression von IL-6 und TNF- α . Nach vier Stunden Stimulation lagen von beiden Zytokinen gesteigerte mRNA-Level vor. In einer zweiten Studie wurden dann die

Proteinexpression untersucht, welche ebenfalls gesteigert war (Sakata et al. 2022) (siehe Tabelle 2). Die niedrigste Konzentration an IL-1 β , die wir zum Stimulieren nutzen, lag bei 0,1 ng/ml. Bei dieser Konzentration sahen wir noch keine Effekte auf die Genexpression oder Freisetzung von IL-6, sondern erst bei 1 ng/ml. Möglicherweise liegt dieser Unterschied darin begründet, dass wir primäre Chondrozyten nutzten. Diese mussten zuerst isoliert werden, bevor sie expandiert werden konnten. Ein weiterer Unterschied liegt in der verwendeten Passage. Wir nutzen Passage 3, während Sakata et al. 2020 und Sakata et al. 2022 jeweils die fünfte Passage nutzten. Bei längerer Passage verlieren die Knorpelzellen ihren klassischen Phänotyp; es kommt zu einer Dedifferenzierung (Vanlauwe et al. 2014). Die Passage als Maß für die Dedifferenzierung zu betrachten, birgt eine Kontroverse. Im Rahmen der ACT ist die Passage 3 die letzte noch erlaubte Passage, da darüber hinaus der klassische Phänotyp der Chondrozyten verloren geht (Vanlauwe et al. 2014). Wang et al. 2013 verglichen Passage 0, also unpassagiierte Chondrozyten, mit Passage 3 und stellten ein größeres chondrogenes Potential bei unpassagiierten Chondrozyten fest. Ossendorff et al. 2018 nutzten die dritte Passage und stellten eine Dedifferenzierung fest. Sie gaben ein Population Doubling Level von 5-7 an. In unserer Arbeit wurde ebenfalls Passage 3 genutzt, jedoch lag unserer Population Doubling Level im Median bei 2,7 und wir sahen keine Kollagen 1-Expression als Zeichen der Dedifferenzierung. Je höher das PDL, desto höher auch der Grad der Dedifferenzierung. Da die gleiche Passage nicht zwangsläufig das gleiche PDL hat, sollte das PDL zusätzlich angegeben werden, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Eine weitere Studie (McNulty et al. 2013), die mit Konzentrationen in diesem Bereich arbeitete, nutzte Knorpelimplantate vom Schwein und stimulierte diese für 24 Stunden mit rekombinantem IL-1 β (0,01-10 ng/ml) vom Schwein. Die NO-Freisetzung stieg konzentrationsabhängig an, eine signifikant gesteigerte NO-Freisetzung im Vergleich zur Kontrolle war allerdings erst ab einer Konzentration von 1 ng/ml IL-1 β zu beobachten (siehe Tabelle 3). Diese Beobachtung deckt sich mit der Unseren.

In der Studie von Xu et al. 2022 wurden Chondrozyten der Ratte mit 10 ng/ml rekombinanten IL-1 β der Ratte stimuliert. Nach 24 Stunden wurde eine gesteigerte Freisetzung an IL-6 und TNF- α ins Medium beobachtet (siehe Tabelle 3). Ein ähnliches Verhalten von IL-6 im Medium beobachteten wir am sechsten Tag.

Verwendung von IL-1 β mit unbekanntem Ursprung

Mohanraj et al. 2018 stimulierten bovine 3-D-Knorpelkonstrukte mit 1-10 ng/ml IL-1 β unbekannten Ursprungs über sechs Tage hinweg. Am dritten Tag war die NO-Ausschüttung höher als am sechsten Tag. Zu beiden Zeitpunkten wurde eine konzentrationsabhängig steigende Abgabe beobachtet, welche bereits bei der niedrigsten IL-1 β -Konzentration signifikant höher als bei der Kontrolle war (siehe Tabelle 5). Wir konnten ebenfalls früh einen Anstieg in der NO-Freisetzung, mit anschließend raschen Abfall beobachten.

In zwei anderen Studien (Sun et al. 2015; Zhu et al. 2022) wurden humane Chondrozyten 24 Stunden lang mit 10 ng/ml IL-1 β stimuliert. Der Ursprung des jeweils verwendeten Zytokins war nicht ersichtlich. Beide konnten gesteigerte mRNA- und Proteinlevel für die iNOS nachweisen. Zhu et al. 2022 beobachteten zudem eine gesteigerte NO-Konzentration im umgebenden Medium. Sie stellten auch eine erhöhte Gen- und Proteinexpression weiterer Entzündungsmarker, wie IL-6, IL-8, TNF- α und COX-2, fest. Passend zur erhöhten COX-2-Expression war auch die PGE2-Konzentration im Medium erhöht (siehe Tabelle 6). Wir konnten ebenfalls die gesteigerte NO-Freisetzung sowie die erhöhte IL-6- und IL-8-Genexpression beobachten. Dies galt sowohl für den homologen als auch den heterologen Gebrauch von Knorpelzellen und Zytokin.

López-Armada et al. 2006 und Caramés et al. 2008 untersuchten den Effekt von 5 ng/ml IL-1 β unbekannten Ursprungs auf humane Chondrozyten (siehe Tabelle 5). Nach zwei Tagen beobachteten López-Armada et al. 2006 eine signifikant gesteigerte NO- sowie PGE2-Freisetzung. Wir sahen das gleiche Verhalten für NO. Caramés et al. 2008 beobachteten bereits nach 24 Stunden eine deutlich erhöhte Abgabe von PGE2 ins Medium.

Vaamonde-García et al. 2012 nutzten ebenfalls 5 ng/ml IL-1 β unbekannten Ursprungs und stimulierten damit humane Chondrozyten. Nach vier Stunden beobachteten sie bereits eine gesteigerte Genexpression an IL-8. Nach acht Stunden war die Proteinexpression bereits signifikant erhöht. Nach neun Stunden zeigte sich die IL-8-Konzentration im Medium erhöht, was nach 18 Stunden ebenfalls der Fall war (siehe Tabelle 5). Wir haben uns die Effekte von IL-1 β über einen deutlich längeren Zeitraum

hinweg angeschaut. Zu unserem frühen Zeitpunkt (Tag 4) war die IL-8-Genexpression ebenfalls erhöht.

In der Studie von Fan et al. 2007 wurden zunächst die mRNA-Level von IL-6 und IL-1 β *in-vivo* in humanem Knorpel gemessen. Dabei stellten sie fest, dass sich die mRNA-Level der beiden Zytokine im gesunden Knorpel und im Knorpel verschiedener Arthrostadien nicht signifikant voneinander unterschieden. Generell wurden diese nur sehr gering exprimiert. Im *in-vitro* Modell mit humanen Chondrozyten und 0,01-10 ng/ml IL-1 β unbekannten Ursprungs untersuchten sie dann die Genexpression nach vier Tagen Zytokinstimulation. Die Genexpression von IL-6 war bereits bei 0,01 ng/ml IL-1 β signifikant erhöht und stieg konzentrationsabhängig noch weiter an (siehe Tabelle 5). Nach unserem Kenntnisstand sind die Studien von Fan et al. 2007, Sakata et al. 2020 und Sakata et al. 2022 die einzigen, die bei dieser Konzentration inflammatorische Effekte beobachtete. Die IL-1 β -Genexpression zeigte erst bei 0,1 ng/ml eine signifikante Steigerung und stieg konzentrationsabhängig ebenfalls weiter an. Wir untersuchten die Genexpression von IL-6 ebenfalls an Tag 4. Bei homologem Gebrauch von Zytokin und Knorpelzelle war eine gesteigerte Genexpression ab 1 ng/ml IL-1 β zu beobachten, bei heterologem Gebrauch erst bei 10 ng/ml. Der Unterschied in der IL-6-Expression lässt sich vielleicht damit erklären, dass der Knorpel zwar makroskopisch unauffällig war, die Patienten im Schnitt aber mit 62 Jahren verstorben waren und im Zuge dessen die Chondrozyten in den letzten Lebenstagen nicht mehr so gut versorgt wurden. Ein gewisser Gelenkverschleiß wird zudem vorhanden gewesen sein wird, auch wenn dieser noch nicht stark ausgeprägt war. Die Chondrozyten reagierten möglicherweise sensibler auf die IL-1 β -Stimulation aufgrund des Nährstoffmangels.

Arias et al. 2019 untersuchten in ihrer Studie die Auswirkungen von 10 ng/ml IL-1 β auf Chondrozyten von Hasen. Der Ursprung des Zytokins war hier nicht ersichtlich. Sie beobachteten nach 24 Stunden Stimulation einen Anstieg der NO-Ausschüttung. Diese stieg von 8 auf 22 μ M an (siehe Tabelle 7). Wir konnten nach 48 Stunden Stimulation mit 10 ng/ml bovinem IL-1 β sogar Anstiege auf etwa 40 μ M und bei 100 ng/ml IL-1 β auf fast 50 μ M NO feststellen. 10 ng/ml humanes IL-1 β führte nach 48 Stunden zu einem Messwert von etwa 26 μ M NO. Dies liegt im gemessenen Bereich von Arias et al. 2019.

Dies führt zu der Vermutung, dass Arias et al. 2019 IL-1 β und Chondrozyten von unterschiedlichen Spezies verwendet haben.

Tab. 5: Unbekannte Modelle (1/3)

Spezies	Autor	Modell	Konzentration	Passage	Dauer	Fazit zu IL-1β
Bovin	Mohanraj et al. 2018	3-D-Konstrukt + IL-1 β unbekannten Ursprungs	1, 5, 10 ng/ml	unpassagiert	6 Tage	Zunehmender Verlust an GAG bei steigender IL-1 β -Konzentration, Abnahme des Gesamtkollagengehalts; konzentrationsabhängiger Anstieg der MMP-Aktivität; frühe NO-Freisetzung mit anschließend raschem Abfall
Human	Fan et al. 2006	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	10 ng/ml	unpassagiert	24 Stunden	Reduzierte Kollagen 2-Genexpression
Human	López-Armada et al. 2006	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	0,5, 5, 50 ng/ml	Passage 1	6, 12, 24, 72 Stunden	Gesteigerte Freisetzung inflammatorischer Marker ins Medium
Human	Fan et al. 2007	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	0,01, 0,1, 1 10 ng/ml	unpassagiert	4 Tage	Genexpression des inflammatorischen Markers IL-6 bei 0,01 ng/ml IL-1 β erhöht
Human	Caramés et al. 2008	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	5 ng/ml	Passage 1	24 Stunden	Gesteigerte Freisetzung inflammatorischer Marker ins Medium
Human	Vaamonde-García et al. 2012	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	0,5, 1,5, 5 ng/ml	Passage 1	4, 6, 8, 9, 18 Stunden	Gesteigerte Gen- und Proteinexpression sowie Freisetzung von IL-8

Tab. 6: Unbekannte Modelle (2/3)

Spezies	Autor	Modell	Konzentration	Passage	Dauer	Fazit zu IL-1β
Human	Sun et al. 2015	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	10 ng/ml	Passage 1-3	24 Stunden	Gesteigerte Genexpression kataboler Marker, sowie Gen- und Proteinexpression der iNOS
Human	Kunisch et al. 2016	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	10 ng/ml	unbekannt	24 Stunden	Reduzierte Kollagen 2-Genexpression, gesteigerte Genexpression an Kollagen 1 und katabolen Markern
Human	Ziادلou et al. 2019	Pellet + IL-1 β und TNF- α unbekannten Ursprungs	1 ng/ml	Passage 3	3 Tage	Aggrecan-Verlust, reduziertes GAG/DNA-Verhältnis
Human	Zhu et al. 2022	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	10 ng/ml	unbekannt	24 Stunden	Reduzierte Kollagen 2- und Aggrecan- Gen- und Proteinexpression, gesteigerte Genexpression kataboler Marker; gesteigerte Gen- und Proteinexpression inflammatorischer Marker
Porcin	Genemaras et al. 2016	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	10, 20 ng/ml	Passage 1-3	8, 16, 24 Stunden	Indirekter Nachweis für eine gesteigerte Genexpression von MMP-13 durch Messung von Micro-RNA miR27b

Tab. 7: Unbekannte Modelle (3/3)

Spezies	Autor	Modell	Konzentration	Passage	Dauer	Fazit zu IL-1 β
Porcin	Frischholz et al. 2020	Pellet + IL-1 β unbekannten Ursprungs	1, 10 ng/ml	Passage 1	14 Tage	Reduzierte GAG/DNA- und Kollagen/DNA-Verhältnisse durch 10 ng/ml IL-1 β , gesteigerte Kollagen 1-Genexpression bei Überspringen der Redifferenzierungsphase, gesteigerte Proteinexpression kataboler Marker
Ratte	Wu et al. 2021	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	10 ng/ml	Passage 1-2	7 Tage	Reduzierte Kollagen 2-Gen- und Proteinexpression
Hase	Arias et al. 2019	Monolayer + IL-1 β unbekannten Ursprungs	10 ng/ml	Passage 2	24 Stunden	Reduzierte Kollagen 2-Genexpression bei unveränderter Proteinexpression; gesteigerte NO-Freisetzung
Pferd	Rotter Sopaskis et al. 2019	Pellet + IL-1 β unbekannten Ursprungs	5 ng/ml	unbekannt	72 Stunden	Reduzierte Genexpression von Kollagen 2 und Aggrecan, keine Veränderung bei COMP und Kollagen 1

4.4 Sind derzeitige gebräuchliche *in-vitro* Modelle vergleichbar?

Gemäß der durchgeführten Literaturrecherche machten nur wenige Autoren in ihren wissenschaftlichen Publikationen Angaben zum Ursprung oder zur Herkunft des verwendeten Zytokins, sei es IL-1 β , TNF- α oder ein anderes (Chen et al. 2019; Ding et al. 2013; Hwang et al. 2021; Jeremiasse et al. 2020; Lv et al. 2019; McNulty et al. 2013; Sakata et al. 2020; Sakata et al. 2022; Tabeian et al. 2019; Tao et al. 2021; Tan et al. 2021; Xu et al. 2022; Žigon-Branc et al. 2018). Häufig wird zwar die Herstellerfirma angegeben, welche das Zytokin verkauft, aber auf dessen Websites werden Zytokine verschiedensten Ursprungs angeboten, sodass ein Rückschluss nicht möglich ist.

Ein weiterer Faktor, der die Vergleichbarkeit erschwert, ist die uneinheitliche Verwendung an IL-1 β -Konzentrationen. In der Literatur fanden sich IL-1 β -Konzentrationen in einem Bereich von 0,01-50 ng/ml, was eine sehr große Spannbreite darstellt. Am häufigsten wurden 10 ng/ml verwendet.

Hinzu kommt, dass die Dauer der Stimulation ebenfalls stark variiert. Die kürzeste Stimulation der hier benannten Paper betrug 30 Minuten (Sakata et al. 2022), während eine der längsten Stimulationen 14 Tage (Frischholz et al. 2020) andauerte. Eine der häufigsten gewählten Stimulationsdauern betrug 24 Stunden. Es ist schwierig bei einer solchen Spannbreite Vergleiche zu ziehen. Nach mehreren Tagen kann bereits eine Gewöhnung an das inflammatorische Milieu stattgefunden haben, sodass die Chondrozyten weniger stark darauf reagieren, als sie es nach wenigen Stunden getan haben. Als Beispiel lässt sich hier die Freisetzung von NO ins umgebende Medium nennen. Wir beobachteten einen Anstieg der Freisetzung bis Tag 2 und einen anschließenden Abfall. Nach 14-tägiger Stimulation wurde fast in allen Gruppen ähnlich viel NO freigesetzt wie in der Kontrollgruppe. Es fand eine Gewöhnung statt. Im Zusammenhang damit stehen auch die unterschiedlichen Analyse-Zeitpunkte. Die Analysen werden meist dann durchgeführt, wenn die experimentellen Bedingungen beendet sind. Das heißt auch diese variieren zwischen 30 Minuten und 14 Tagen und sind damit schwer zu vergleichen.

Auch bei Betrachtung der verwendeten Zellen fallen einige Unterschiede auf, die die Vergleichbarkeit erschweren. Es gibt Studien die, wie auch diese Arbeit, Knorpel von Jungtieren verwendeten. Dieser Knorpel ist noch weitgehend unbeschädigt und wird durch die Zytokinstimulation erstmals einem inflammatorischen Milieu ausgesetzt. Die Autoren bestimmen durch die gewählte Zytokinkonzentration und Stimulationsdauer somit selbst das Ausmaß der Inflammation. Bei einem Großteil der Studien mit humanem Knorpel wurde dieser von Patienten bezogen, die aufgrund fortgeschrittener Arthrose einen Gelenkersatz erhielten. Die Chondrozyten wurden aus Bereichen isoliert, die makroskopisch frei von Läsionen waren. Makroskopisch scheint dieser Knorpel also unversehrt, auf mikroskopischer oder zellulärer Ebene ist dies jedoch unklar. Der Knorpel befand sich schließlich im selben Gelenk und bezog die gleiche Synovialflüssigkeit. Die Zellen waren also bereits einem inflammatorischen Milieu ausgesetzt; die Dauer ist jedoch

unklar. Eine Gewöhnung kann schon stattgefunden haben, sodass bei Stimulation unter experimentellen Bedingungen unklar ist, welche Effekte auf die Vorschädigung und welche auf die aktuelle Stimulation zurückzuführen sind. Möglicherweise kommt es aber auch zur Addition der Effekte. Andere Studien nutzten bewusst Arthrose-vorgeschädigten Knorpel (Ziadlou et al. 2019; Žigon-Branc et al. 2018). In diesen Fällen ist es wichtig, das Ausmaß der Arthrose zu kennen; hierfür bietet sich die Klassifikation der International Cartilage Research Society (ICRS) an. Diese teilt Knorpelschäden anhand des Grads der Schädigung, der Größe des Defekts und der Lokalisation ein. Arthrose-vorgeschädigter Knorpel unterscheidet sich auf nukleärer und zytoplasmatischer Ebene von gesundem Knorpel. Zellorganellen, wie Mitochondrien und Golgi-Apparat, sind verringert, es werden vermehrt Vakuolen eingelagert und das Chromatin liegt marginalisiert vor. Marginalisiertes Chromatin ist ein Merkmal für Apoptose. Stimulation mit IL-1 β verstärkt die Marginalisierung des Chromatins sogar noch (Pascarelli et al. 2015). Die hier genannten Unterschiede beziehen sich alle auf die Verwendung primärer Chondrozyten. Es gibt aber auch Studien, in denen Knorpelzelllinien verwendet wurden (Joung et al. 2021; Sakata et al. 2020; Sakata et al. 2022). Sie sollen primäre Zellen möglichst genau in ihren Funktionen und Merkmalen repräsentieren. Zelllinien sind im Allgemeinen kostengünstig, einfach zu handhaben und liefern aufgrund immortalisierter Zellen einen unbegrenzten Zellvorrat. Es handelt sich um eine reine Zellpopulation, die reproduzierbare Ergebnisse liefert. Zudem werden Tierversuche vermieden und ethische Bedenken weitestgehend umgangen. Die Zellen sind jedoch gentechnisch verändert und es besteht die Gefahr, dass sich mit der Zeit ihr Phänotyp, ihre Funktion und ihre Reaktionsfähigkeit auf Stimuli verändern. Wiederholtes Passagieren kann zu Gendrift und damit einhergehend genotypischen und phänotypischen Veränderungen führen. Der Gebrauch von Zelllinien für bestimmte Fragestellungen ist kritisch zu überdenken, da primäre Zellen möglicherweise nicht adäquat genug repräsentiert werden. Erfolgreich eingesetzt werden Zelllinien z.B. bereits in der Impfstoffherstellung oder Antikörperproduktion (Kaur und Dufour 2012).

Ein weiterer wesentlicher Unterschied stellt die Verwendung von 2-D und 3-D *in-vitro* Modellen dar. Nach erfolgter Isolierung der Knorpelzellen und anschließender Kultivierung kommt es zu einem Prozess der Dedifferenzierung. Das heißt, es findet keine Expression von Molekülen der EZM statt, wie z.B. von GAG, Kollagen 2 oder Aggrecan. Die

Chondrozyten nehmen mit der Zeit einen fibroblastischen Phänotyp an, welcher durch eine Kollagen 1-Expression charakterisiert ist (Caron et al. 2012).

Für die Phase der Redifferenzierung gibt es 2-D- und 3-D-Modelle, welche jeweils ihre Vor- und Nachteile haben. 2-D-Modelle, wie der Monolayer oder die Co-Kultivierung, sind günstig zu produzieren. Aus einer einzelnen Probe können eine Vielzahl an weiteren Zellen gewonnen werden. Von Vorteil ist auch die gleichmäßige Verteilung von Nährstoffen und Wachstumsfaktoren aus dem Medium. Die Co-Kultivierung ermöglicht sogar Zell-Zell-Interaktionen, welche wichtig für die Regulierung von Zell- und Gewebephysiologie sind. Auf der anderen Seite können mit 2-D-Modellen maximal ein bis zwei Gewebebestandteile gleichzeitig isoliert werden. Da Knorpel nur eine geringe Zelldichte hat, ist es zudem wichtig, dass genügend Chondrozyten vorhanden sind, um zuverlässige Experimente durchführen zu können. Ein weiterer Nachteil von Monolayern ist, dass Wachstum hier nur entlang der Oberfläche möglich ist. Es findet kein dreidimensionales Wachstum statt, wie es physiologisch unter *in-vivo*-Bedingungen der Fall wäre. Bei der Co-Kultivierung kann es vorkommen, dass die unterschiedlichen Zelltypen auch unterschiedliche Kulturbedingungen brauchen. In solchen Fällen kann es zu Änderungen des Phänotyps kommen (Cope et al. 2019). Chondrozyten verlieren in der 2-D-Kultur ihre Fähigkeit Proteoglykane zu bilden und ihre Morphologie verändert sich. Sie nehmen einen länglichen, Fibroblasten-ähnlichen Phänotyp an. Außerdem exprimieren die Chondrozyten vermehrt proinflammatorische und nur wenig antiinflammatorische Zytokine (Tan et al. 2021). Es kommt zu einer gesteigerten Genexpression von hypertrophen Markern wie Kollagen 10 und Ausbildung eines hypertrophen Phänotyps (Caron et al. 2012). 2-D-Modelle eignen sich also zur Expansion von Chondrozyten.

3-D-Modelle wie die Pelletkultur oder Explantate ermöglichen die Kultivierung verschiedener Zelltypen sowie Zellkommunikation bzw. Zell-Zell-Interaktionen (Cope et al. 2019). Das Zellwachstum erfolgt in kugelförmigen Aggregaten in einer Matrix und ermöglicht damit ein Wachstum in alle Richtungen (Cope et al. 2019; Tan et al. 2021). Die 3-D-Modelle kommen dadurch näher an die physiologischen Bedingungen heran als die 2-D-Modelle. Zudem erfolgt eine Induktion der Genexpression von chondrogenen Markern wie Kollagen 2, Aggrecan und SRY-box transcription factor 9 (Sox-9), einem Hauptregulator der Chondrogenese (Caron et al. 2012; Tan et al. 2021). Die Expression

von hypertrophen Markern ist nur sehr gering ausgeprägt (Caron et al. 2012). Es werden zudem signifikant mehr antiinflammatorische und weniger proinflammatorische Zytokine exprimiert als unter 2-D-Bedingungen (Tan et al. 2021). Bei den Explantaten bleiben die Zellen in ihrer natürlichen Umgebung (He et al. 2020). Dies ermöglicht die Beobachtung von natürlichen Prozessen in der EZM. Zudem sind sie kostengünstig und leicht zu beschaffen (Cope et al. 2019). Vries-van Melle et al. 2012 verglichen chondrale mit osteochondralen Explantaten. Nach vier Wochen Kultur zeigten die osteochondralen Explantate zwar geringere Konzentrationen an Kollagen 2 und Aggrecan als zu Beginn, aber dennoch mehr als die reinen chondralen Explantate. Die osteochondralen Explantate sind repräsentativer, da sie näher an die Bedingungen im Gelenk heranreichen. Unter realen Bedingungen betreffen arthrotische Veränderungen nicht nur den Knorpel, sondern auch weitere Gewebearten des Gelenks. Es wurden aber in beiden Gruppen keine Anzeichen für Hypertrophie gefunden. Nachteilig bei Explantaten im Speziellen ist, dass die Qualität und die Eigenschaften vom Ort der Entnahme und dem Spender abhängen (He et al. 2020). Außerdem liefern Explantate nur eine limitierte Anzahl an Zellen pro Quelle. Die Zellen am Rand sind häufig abgestorben (Cope et al. 2019). Von Nachteil bei 3-D-Modellen im Allgemeinen ist ihre im Vergleich zu 2-D-Modellen teurere Produktion. Die Proliferationsrate scheint unter 3-D-Bedingungen verglichen mit 2-D-Bedingungen abzunehmen. Die strukturelle Festigkeit des Zellkonstrukts hängt letztendlich von der gewählten Matrix ab (Cope et al. 2019). Tan et al. 2021 testeten drei unterschiedliche Härtegrade an 3-D-Matrizen und stellten fest, dass der mittlere Härtegrad den stärksten chondrogenen Effekt aufweist. Zusammenfassend ist zu sagen, dass 3-D-Modelle durch ihr größeres chondrogenes Potential besser für die Redifferenzierung der Chondrozyten geeignet sind als 2-D-Modelle (Caron et al. 2012). Außerdem bieten 3-D-Modelle eine genauere physiologische Mikro-Umgebung als es 2-D-Modelle können. 2-D-Modelle eignen sich aufgrund der Ausbildung eines hypertrophen Phänotyps gut zur Expansion der Chondrozyten, haben mit den physiologischen Bedingungen im Gelenk jedoch wenig gemein. Daher wurde sich in dieser Arbeit auch für die Pelletkultur als ein 3-D-Modell entschieden.

Ein weiterer Sachverhalt, der die Vergleichbarkeit verschiedener Modelle erschwert ist die Verwendung von Chondrozyten unterschiedlicher Spezies. Es werden Kleintiere, wie Ratte, Maus, Hase oder Meerschweinchen, von Großtieren, wie Hund, Schwein, Rind

oder Pferd, oder dem Menschen unterschieden. Die Eigenschaften des Knorpels verschiedener Spezies unterscheiden sich anatomisch und histologisch voneinander. Zu den Vorteilen des Knorpels von Kleintieren gehören die kostengünstige und leichte Beschaffung sowie schnelle Verfügbarkeit. Kleintiere haben eine kürzere Lebenszeit und dadurch bedingt eine schnellere Reproduktionszeit. Zudem sind Kleintiere leichter zu halten und unterzubringen. Von Nachteil sind jedoch die geringere Größe und dadurch bedingt kleinere Gewebeproben. Die Größe bedingt auch die anatomischen und histologischen Unterschiede im Vergleich zum Menschen. Der Entstehungsprozess der Arthrose läuft bei Kleintieren schneller ab als beim Menschen, was auf die kürzere Lebenszeit zurückzuführen ist (Cope et al. 2019; McCoy 2015).

Großtiere sind dem Menschen anatomisch betrachtet ähnlicher (Cope et al. 2019; McCoy 2015). Ihre Gelenke sind größer und der Knorpel ist dicker als bei Kleintieren. Außerdem besteht hier die Möglichkeit mehrfach Proben zu entnehmen und Bildgebung, arthroskopische Interventionen sowie ein postoperatives Management durchzuführen. Großtiere generieren somit mehr relevante Daten (McCoy 2015). Da Großtiere durchschnittlich deutlich älter werden als Kleintiere, läuft die Arthrose-Progression langsamer ab und ist dem Menschen damit ähnlicher (Cope et al. 2019; McCoy 2015). Therapeutische Interventionen müssen für die behördliche Zulassung häufig an Großtieren getestet werden (McCoy 2015). Allerdings ist die Handhabung und Unterbringung von Großtieren teurer als bei Kleintieren. (Cope et al. 2019; McCoy 2015). Die größere anatomische und histologische Ähnlichkeit ermöglicht es, eine genauere Vorhersage darüber zu treffen, wie der Mensch auf eine therapeutische Intervention ansprechen könnte. Allerdings führt der langsamere Krankheitsprozess auch dazu, dass *in-vivo* Experimente zeitaufwendiger sind und die Tiere länger untergebracht werden müssen. Daher ist es wichtig bereits vor Antragstellung bei der Ethikkommission eine genaue Vorstellung von Ablauf und Umsetzung des Experiments zu haben, um ein unnötiges Leiden der Tiere und überflüssige Experimente zu verhindern. Nichtsdestotrotz überwiegen die Vorteile der Großtier-Modelle gegenüber den Nachteilen. Wir verwendeten in unserem Versuch Rinderknorpel aus Fesselgelenken. Vor allem der Knorpel der bovinen Patella ähnelt in seiner Dicke, seiner Zellularität und seinem Aufbau der Knorpelzonen dem Knorpel der menschlichen Femurkondylen (Cope et al. 2019; McCoy 2015). Hargrave-Thomas et al. 2013 maßen eine durchschnittliche Knorpeldicke

der bovinen Patella von 2,1 mm und der humanen Femurkondyle von durchschnittlich 2,2 mm. Die Knorpeldicke ist also fast identisch. Weiterhin stellten Hargrave-Thomas et al. 2013 bei einem vergleichbaren Grad der Knorpelschädigung einen ähnlichen Verlust an Proteoglykanen in der Safranin O-Färbung bei Mensch und Rind fest. Zudem sind die Menisken von Mensch und Rind biomechanisch gesehen sehr ähnlich. Zusätzlich von Vorteil ist die Tatsache, dass das komplette bovine Genom entschlüsselt wurde. Der Knorpel des bovinen Tibiaplateaus hingegen ist dünner und zellreicher als der des Menschen. Die Knorpelzonen im Plateau unterscheiden sich in ihrer Dicke von den Zonen im humanem Tibiaplateau (Cope et al. 2019; McCoy 2015). Hier sei zu beachten, dass sich der Rinderknorpel aus Fesselgelenken von Knorpel des Kniegelenks unterscheiden könnte.

4.5 Was braucht es zur Standardisierung?

Um ein standardisiertes *in-vitro* Inflammationsmodell der frühen Arthrose mit IL-1 β zu entwickeln, müssen einige Faktoren beachtet werden. Zuerst einmal ist auf eine homologe Verwendung von Chondrozyten und dem proinflammatorischen Zytokin IL-1 β zu achten. Sofern kein menschlicher Knorpel verwendet wird, sollte das Modell Knorpel nutzen, der dem humanen Knorpel sehr ähnlich ist, um eine hohe Aussagekraft zu haben. Als nächstes sollte darauf geachtet werden, dass kein vorgeschädigter Knorpel genutzt wird, sondern gesunder Knorpel, um sicher zu gehen, dass vorab keine Gewöhnung an ein inflammatorisches Milieu stattgefunden hat. Wir empfehlen die Wahl eines 3-D-Modells, wie beispielsweise einer Sphäroidkultur. Diese bilden die physiologischen Bedingungen besser ab als es ein 2-D-Modell kann. Große Bedeutung hat zudem die gewählte IL-1 β -Konzentration. Nach unserer sorgfältigen Aufarbeitung und Analyse von IL-1 β -Konzentrationen im Bereich von 0,1-100 ng/ml empfehlen wir bei einem homologen Gebrauch von bovinen Knorpelzellen und Zytokin eine IL-1 β -Konzentration von 1-10 ng/ml. Diese zeigte besonders bei katabolen und inflammatorischen Markern signifikante Effekte im Vergleich zur Kontrolle sowie zu der heterologen Verwendung von Knorpel und Zytokin. Da boviner Knorpel dem humanem sehr ähnlich ist, vermuten wir vergleichbare Effekte bei Verwendung von humanem Knorpel und Zytokin. Als letztes benötigt es einer auf die Fragestellung angepassten Stimulationsdauer. Um frühe Veränderungen in der

Gen- und Proteinexpression zu untersuchen, reichen wenige Tage aus; um langfristige Veränderungen auf den Knorpel zu untersuchen empfehlen wir mindestens zwei Wochen Stimulation. Im Zusammenhang damit stehen auch die Analysezeitpunkte. Um Veränderungen über die Zeit festzustellen bzw. einen Verlauf zu beurteilen, braucht es mindestens einen frühen und einen späten Analysezeitpunkt.

4.6 Translation in die klinische Anwendung

Bislang konnte kein krankheitsmodifizierender Therapieerfolg für die Arthrose erzielt werden. Dies hängt damit zusammen, dass die Pathomechanismen noch nicht vollständig geklärt sind. Es braucht daher ein standardisiertes *in-vitro* Inflammationsmodell, um die Pathomechanismen der Arthrose weiter aufzuklären. Dabei ist darauf zu achten, Knorpelzellen und proinflammatorisches Zytokin homolog und in der niedrigsten noch effektiven Konzentration zu verwenden. Nur so können annähernd vergleichbare Bedingungen zu den pathophysiologisch ablaufenden Vorgängen im Gelenk erreicht werden. Bei Verwendung zu hoher Zytokinkonzentrationen können die Chondrozyten schon so geschädigt sein, dass sie auf potenzielle therapeutische Interventionen gar nicht mehr ansprechen können. Das in dieser Arbeit vorgestellte *in-vitro* Modell kann dafür genutzt werden, neuartige Medikamente und Therapiemethoden auf ihre Zeit-Dosis-Kinetik im inflammatorischen Milieu hin zu testen. Das Modell eignet sich nicht nur zur Arthrose-Forschung, sondern kann auch auf andere inflammatorische Gelenkerkrankungen, wie z.B. die rheumatoide Arthritis übertragen werden. Zur Natur des Knorpels gehört die mechanische Belastung. Diese beeinflusst die Stoffwechselaktivität der Chondrozyten und damit die Matrix (Grodzinsky et al. 2000; Sun 2010). Die EZM wird an die Gegebenheiten angepasst. Chowdhury et al. 2001 zeigten, dass dynamische Kompression die IL-1 β -induzierte NO- und PGE2-Synthese hemmt. Fu et al. 2019 beobachteten diesen Effekt ebenfalls. Außerdem stellten sie eine Verminderung der sGAG-Freisetzung ins Medium unter Druck- und Zugbelastung fest. Mechanische Belastung wirkt also dem inflammatorischen Stimulus entgegen. Zudem unterstützt sie die Chondrogenese, indem die Expression anaboler Marker herauf und die Expression kataboler Marker herunterreguliert wird (Ossendorff et al. 2018). Ein nächster Schritt in Richtung klinische Anwendung wäre die Kombination aus *in-vitro*

Inflammationsmodell und mechanischer Belastung. Diese kann durch einen sogenannten gelenkspezifischen Bioreaktor umgesetzt werden. Ein Bioreaktor simuliert die natürlichen Gegebenheiten im Kniegelenk (Wimmer et al. 2004). Ein wichtiger nächster Schritt stellt die Überführung des *in-vitro* Tiermodells auf ein humanes *in-vitro* Modell dar. Dies wird benötigt, um das Verhalten des menschlichen Knorpels auf eine therapeutische Intervention zu testen. Im weiteren Verlauf folgt die Translation des *in-vitro* Tiermodells auf ein *in-vivo* Tiermodell. Ein ideales Tiermodell müsste Folgendes erfüllen: Das Tier sollte dem Menschen in Bezug auf Anatomie, Histologie und Biomechanik sehr ähneln. Die Arthrose muss zuverlässig mit dem gleichen Induktionsverfahren ausgelöst werden, das heißt es muss reliabel sein (Cope et al. 2019; Lampropoulou-Adamidou et al. 2014). Die Induktion muss zudem in einem angemessenen Zeitraum ablaufen. Die Arthrose sollte ähnliche Krankheitsmerkmale aufweisen wie beim Menschen und es ermöglichen, alle Krankheitsstadien zu untersuchen bzw. mit Medikamenten und Interventionen zu therapieren. Das Tier muss groß genug sein, um genügend Tests durchzuführen, die Haltung darf aber auch nicht zu teuer sein (Cope et al. 2019). Um einen menschlichen Patienten möglichst getreu zu imitieren, sollte es in ein vergleichbares Alter kommen (Lampropoulou-Adamidou et al. 2014). Cope et al. 2019 schlägt hierfür Hunde, Ziegen, Schweine oder Rinder vor. Je nach zu testender Therapie kann dann zwischen den drei möglichen Vorgehensweisen zur Artrose-Induktion gewählt werden: natürliche entstanden, chirurgisch induziert oder durch Injektion chondrotoxischer Substanzen (Teeple et al. 2013).

4.7 Limitationen

Wir verwendeten ein *in-vitro* Modell der frühen Arthrose, welches ausreichend war, um die Effekte von IL-1 β auf die Chondrogenese zu untersuchen. Es ist allgemein bekannt, dass die Arthrose *in-vivo* sehr viel komplexer ist. Es handelt sich um einen multifaktoriellen Prozess mit immunologischer Komponente. Im arthrotischen Knorpel kommt es zu einer gestörten Homöostase, an der pro- und antiinflammatorische Zytokine, Chemokine, Wachstumsfaktoren und Differenzierungsfaktoren beteiligt sind. Wir haben unseren Fokus auf das proinflammatorische Zytokin IL-1 β gelegt. Dem Stadium einer aktivierten Arthrose geht zudem ein langjähriger Entstehungsprozess voraus. Wir haben uns in dieser Arbeit

auf eine 14-tägige Stimulation beschränkt. Verglichen mit dem langjährigen Entstehungsprozess ist dies ein sehr kurzer Zeitraum, verglichen mit der Literatur ist dies jedoch sehr lang. Wir expandierten die Chondrozyten bis zur 3. Passage und ließen sie anschließend eine Woche redifferenzieren. Die Passage kann einen Einfluss auf die Zellen nehmen, weshalb weitere Studien mit unterschiedlichen Passagen sinnvoll wären. Weiterhin entsprach die Kultivierungsumgebung nicht der natürlichen Umgebung von Chondrozyten. Es herrschte ein O₂-Gehalt von 21 % sowie ein CO₂-Gehalt von 5 %. Unter realen Bedingungen sind Chondrozyten im Gelenk einer anaeroben Umgebung mit 1-6 % O₂-Gehalt ausgesetzt (Huang et al. 2019). Ein weiterer limitierender Faktor sind die verwendeten IL-1 β -Konzentrationen. Bei fortgeschrittener Arthrose liegt eine IL-1 β -Konzentration von 0,021-0,146 ng/ml (Hopkins et al. 1988; Kahle et al. 1992; McNulty et al. 2013; Westacott et al. 1990) im humanen Gelenk vor. In dieser Arbeit wurden IL-1 β -Konzentration von 0,1-100 ng/ml auf ihren Effekt getestet. Damit lag nur eine Konzentration im Bereich, wie sie auch unter pathologischen Bedingungen im Gelenk vorkommt. Wir nutzten Rinderknorpel aus Fesselgelenken. Die beobachteten Effekte sollten in einem humanen Modell verifiziert werden.

5. Zusammenfassung

In-vitro Inflammationsmodelle werden häufig verwendet, um neue Therapieansätze der Arthrose auf ihre Wirksamkeit zu testen. Insbesondere das proinflammatorische Zytokin IL-1 β ist hierbei von großem Interesse, da ihm eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der Arthrose zugeschrieben wird. In der Literatur werden jedoch eine Vielzahl an unterschiedlichen Modellen beschrieben, die sich in der Konzentration und der Herkunft des rekombinant hergestellten Zytokins unterscheiden. In dieser Studie werden die Effekte unterschiedlicher Konzentrationen an rekombinant produziertem humanem und bovinem IL-1 β auf bovine primäre Chondrozyten untersucht. Hierfür wurden bovine artikuläre Chondrozyten aus Fesselgelenken isoliert und in Pelletkultur verbracht. 14 Tage lang wurden die Chondrozyten entweder mit humanem oder bovinem IL-1 β in unterschiedlichen Konzentrationen (0,1 ng/ml - 100 ng/ml) stimuliert. Im Anschluss wurde die Genexpression anaboler, Dedifferenzierungs-, kataboler und inflammatorischer Marker analysiert, das umgebende Medium auf die inflammatorischen Marker NO und IL-6 untersucht und die Auswirkungen auf das Gewebe durch Messung des DNA-, GAG- und Gesamtkollagen-Gehalts quantifiziert. Zur histologischen Beurteilung wurde eine Safranin O/Fast Green-Färbung angefertigt. Es zeigte sich, dass Simulation mit IL-1 β im Allgemeinen in einer verminderten Expression anaboler Marker resultierte, während die Genexpression kataboler und inflammatorischer Marker signifikant anstieg. Die Veränderungen in der Genexpression ließen sich mit den erhöhten Entzündungsmarkern im Medium übereinbringen. Dieser insgesamt negative Einfluss auf die Chondrogenese stellte sich als konzentrationsabhängig heraus: je höher die Konzentrationen an IL-1 β , desto stärker die beobachteten Effekte. Die Schwellenkonzentration für nachweisbare Effekte verglichen mit der Kontrolle unterschieden sich zwischen den Ansätzen mit humanem und bovinen IL-1 β . Die homologe Verwendung von Zytokin und Chondrozyten zeigte die stärksten Effekte. Dies ist besonders im Bereich der niedrigen Konzentrationen entscheidend. Die Standardisierung des chondralen Inflammationsmodells ist für die Vergleichbarkeit von Therapien und die Aussagekraft über ihre Wirksamkeit notwendig.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Aufbau gesunden Gelenkknorpels.....	12
Abbildung 2: Aufbau eines echten Gelenks.	13
Abbildung 3: Einfluss von IL-1 β und TNF- α auf diverse Zellvorgänge.	19
Abbildung 4: Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus.	28
Abbildung 5: Expandierte Chondrozyten, Monolayer, Passage 2, 10-fache (links) und 20-fache (rechts) Vergrößerung.	30
Abbildung 6: Genexpression des anabolen Markers Kollagen 2.....	38
Abbildung 7: A): DNA-Gehalt unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml). B): Kollagen/DNA unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml).	39
Abbildung 8: GAG-Gehalt der Knorpelpellets unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml).	40
Abbildung 9: Genexpression des anabolen Markers Aggrecan.....	41
Abbildung 10: Genexpression des anabolen Markers COMP.	43
Abbildung 11: Genexpression des anabolen Markers PRG-4.	44
Abbildung 12: SafraninO/Fast Green-Färbung von gesundem, bovinem Gelenkknorpel.	45
Abbildung 13: Safranin O/Fast Green-Färbung der Pellets nach 14-tägigen Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml).....	46
Abbildung 14: Gegenüberstellung von humanen und bovinen Gruppen zur besseren Vergleichbarkeit. Safranin O/Fast Green-Färbung der Pellets nach 14-tägigem Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml).....	47
Abbildung 15: Genexpression von Kollagen Typ 1.	48
Abbildung 16: GAG-Ausschüttung boviner Chondrozyten im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml).	49
Abbildung 17: Kumulative GAG-Ausschüttung boviner Chondrozyten in das umgebende Medium nach 14-tägigem Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml).	49
Abbildung 18: Genexpression des katabolen Markers MMP-3.	51
Abbildung 19: Genexpression des katabolen Markers MMP-13.	52
Abbildung 20: A) NO-Ausschüttung. Im zeitlichen Verlauf unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml), sowie B) selektive Betrachtung von Tag 2.....	54

Abbildung 21: IL-6-Ausschüttung in das umgebende Medium an Tag 6 unter Einfluss von IL-1 β (0,1 ng/ml-100 ng/ml).....	56
Abbildung 22: Genexpression des inflammatorischen Markers IL-6.	56
Abbildung 23: Genexpression des inflammatorischen Markers IL-8.	58

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auflistung der experimentellen Gruppen.	29
Tabelle 2: Homologe Modelle (1/2)	62
Tabelle 3: Homologe Modelle (2/2)	63
Tabelle 4: Heterologe Modelle	69
Tabelle 5: Unbekannte Modelle (1/3)	76
Tabelle 6: Unbekannte Modelle (2/3)	77
Tabelle 7: Unbekannte Modelle (3/3)	78

8. Literaturverzeichnis

- Ahmad, Nashrah; Ansari, Mohammad Y.; Haqqi, Tariq M. (2020): Role of iNOS in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. In: *Journal of cellular physiology* 235 (10), S. 6366–6376. DOI: 10.1002/jcp.29607.
- Akhtar, Nahid; Rasheed, Zafar; Ramamurthy, Sangeetha; Anbazhagan, Arivarasu N.; Voss, Frank R.; Haqqi, Tariq M. (2010): MicroRNA-27b regulates the expression of matrix metalloproteinase 13 in human osteoarthritis chondrocytes. In: *Arthritis and rheumatism* 62 (5), S. 1361–1371. DOI: 10.1002/art.27329.
- AMBOSS SE (2024): Aufbau von Diarthrosen (echte Gelenke). Kapitel: Allgemeine Anatomie. Online verfügbar unter <https://next.amboss.com/de/article/s60tmS?q=echtes+gelenk&m=qHaCrN#kLcmB10>, zuletzt aktualisiert am 24.07.2024, zuletzt geprüft am 01.03.2025.
- Arias, Consuelo; Saavedra, Nicolás; Saavedra, Kathleen; Alvear, Marysol; Cuevas, Alejandro; Stuchi Maria-Engler, Silvya et al. (2019): Propolis Reduces the Expression of Autophagy-Related Proteins in Chondrocytes under Interleukin-1 β Stimulus. In: *International journal of molecular sciences* 20 (15). DOI: 10.3390/ijms20153768.
- Armiento, Angela R.; Alini, Mauro; Stoddart, Martin J. (2019): Articular fibrocartilage - Why does hyaline cartilage fail to repair? In: *Advanced drug delivery reviews* 146, S. 289–305. DOI: 10.1016/j.addr.2018.12.015.
- Bhosale, Abhijit M.; Richardson, James B. (2008): Articular cartilage: structure, injuries and review of management. In: *British medical bulletin* 87, S. 77–95. DOI: 10.1093/bmb/ldn025.
- Caramés, B.; López-Armada, M. J.; Cillero-Pastor, B.; Lires-Dean, M.; Vaamonde, C.; Galdo, F.; Blanco, F. J. (2008): Differential effects of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta on cell death in human articular chondrocytes. In: *Osteoarthritis and cartilage* 16 (6), S. 715–722. DOI: 10.1016/j.joca.2007.10.006.
- Caron, M. M. J.; Emans, P. J.; Coolen, M. M. E.; Voss, L.; Surtel, D. A. M.; Cremers, A. et al. (2012): Redifferentiation of dedifferentiated human articular chondrocytes: comparison of 2D and 3D cultures. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 20 (10), S. 1170–1178. DOI: 10.1016/j.joca.2012.06.016.

Caron, M. M. J.; Welting, T. J. M.; van Rhijn, L. W.; Emans, P. J. (2014): Targeting Inflammatory Processes for Optimization of Cartilage Homeostasis and Repair Techniques. In: Pieter J. Emans und Lars Peterson (Hg.): *Developing Insights in Cartilage Repair*. London: Springer London, S. 43–63.

Chen, Xinxin; Zhang, Chengyong; Wang, Xiao; Huo, Shousong (2019): Juglanin inhibits IL-1 β -induced inflammation in human chondrocytes. In: *Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology* 47 (1), S. 3614–3620. DOI: 10.1080/21691401.2019.1657877.

Chowdhury, T. T.; Bader, D. L.; Lee, D. A. (2001): Dynamic compression inhibits the synthesis of nitric oxide and PGE(2) by IL-1 β -stimulated chondrocytes cultured in agarose constructs. In: *Biochemical and biophysical research communications* 285 (5), S. 1168–1174. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5311.

Cope, P. J.; Ourradi, K.; Li, Y.; Sharif, M. (2019): Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 27 (2), S. 230–239. DOI: 10.1016/j.joca.2018.09.016.

Ding, Qianhai; Zhong, Huiming; Qi, Yiyi; Cheng, Ye; Li, Weijun; Yan, Shigui; Wang, Xianghua (2013): Anti-arthritic effects of crocin in interleukin-1 β -treated articular chondrocytes and cartilage in a rabbit osteoarthritic model. In: *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]* 62 (1), S. 17–25. DOI: 10.1007/s00011-012-0546-3.

Emans, P. J.; Peterson L. (2014): General Introduction. In: Pieter J. Emans und Lars Peterson (Hg.): *Developing Insights in Cartilage Repair*. London: Springer London, S. 3–18.

Fan, Zhiyong; Söder, Stephan; Oehler, Stephan; Fundel, Katrin; Aigner, Thomas (2007): Activation of interleukin-1 signaling cascades in normal and osteoarthritic articular cartilage. In: *The American journal of pathology* 171 (3), S. 938–946. DOI: 10.2353/ajpath.2007.061083.

Fan, Zhiyong; Yang, Huiqing; Bau, Brigitte; Söder, Stephan; Aigner, Thomas (2006): Role of mitogen-activated protein kinases and NF κ B on IL-1 β -induced effects on collagen type II, MMP-1 and 13 mRNA expression in normal articular human

chondrocytes. In: *Rheumatology international* 26 (10), S. 900–903. DOI: 10.1007/s00296-006-0114-7.

Felson, D. T.; Zhang, Y.; Hannan, M. T.; Naimark, A.; Weissman, B.; Aliabadi, P.; Levy, D. (1997): Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study. In: *Arthritis and rheumatism* 40 (4), S. 728–733. DOI: 10.1002/art.1780400420.

Frischholz, Sebastian; Berberich, Oliver; Böck, Thomas; Meffert, Rainer H.; Blunk, Torsten (2020): Resveratrol counteracts IL-1 β -mediated impairment of extracellular matrix deposition in 3D articular chondrocyte constructs. In: *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* 14 (7), S. 897–908. DOI: 10.1002/term.3031.

Fu, S.; Thompson, C. L.; Ali, A.; Wang, W.; Chapple, J. P.; Mitchison, H. M. et al. (2019): Mechanical loading inhibits cartilage inflammatory signalling via an HDAC6 and IFT-dependent mechanism regulating primary cilia elongation. In: *Osteoarthritis and Cartilage* 27 (7), S. 1064–1074. DOI: 10.1016/j.joca.2019.03.003.

Genemaras, Amaris A.; Ennis, Hayley; Kaplan, Lee; Huang, Chun-Yuh (2016): Inflammatory cytokines induce specific time- and concentration-dependent MicroRNA release by chondrocytes, synoviocytes, and meniscus cells. In: *Journal of Orthopaedic Research®* 34 (5), S. 779–790. DOI: 10.1002/jor.23086.

Goldring, Mary B.; Otero, Miguel (2011): Inflammation in osteoarthritis. In: *Current opinion in rheumatology* 23 (5), S. 471–478. DOI: 10.1097/BOR.0b013e328349c2b1.

Grodzinsky, A. J.; Levenston, M. E.; Jin, M.; Frank, E. H. (2000): Cartilage tissue remodeling in response to mechanical forces. In: *Annual review of biomedical engineering* 2, S. 691–713. DOI: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.691.

Hargrave-Thomas, E. J.; Thambyah, A.; McGlashan, S. R.; Broom, N. D. (2013): The bovine patella as a model of early osteoarthritis. In: *Journal of anatomy* 223 (6), S. 651–664. DOI: 10.1111/joa.12115.

Haseeb, Abdul; Haqqi, Tariq M. (2013): Immunopathogenesis of osteoarthritis. In: *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* 146 (3), S. 185–196. DOI: 10.1016/j.clim.2012.12.011.

He, Yuchen; Li, Zhong; Alexander, Peter G.; Ocasio-Nieves, Brian D.; Yocum, Lauren; Lin, Hang; Tuan, Rocky S. (2020): Pathogenesis of Osteoarthritis: Risk Factors, Regulatory Pathways in Chondrocytes, and Experimental Models. In: *Biology* 9 (8), S. 194. DOI: 10.3390/biology9080194.

Heidemann, Christin; Scheidt-Nave, Christa; Beyer, Ann-Kristin; Baumert, Jens; Thamm, Roma; Maier, Birga et al. (2021): Gesundheitliche Lage von Erwachsenen in Deutschland – Ergebnisse zu ausgewählten Indikatoren der Studie GEDA 2019/2020-EHIS. Unter Mitarbeit von Robert Koch-Institut.

Honsawek, Sittisak; Malila, Somkiat; Yuktanandana, Pongsak; Tanavalee, Aree; Deepaisarnsakul, Benjamad; Parvizi, Javad (2013): Association of MMP-3 (-1612 5A/6A) polymorphism with knee osteoarthritis in Thai population. In: *Rheumatology international* 33 (2), S. 435–439. DOI: 10.1007/s00296-012-2371-y.

Hopkins, S. J.; Humphreys, M.; Jayson, M. I. (1988): Cytokines in synovial fluid. I. The presence of biologically active and immunoreactive IL-1. In: *Clinical and experimental immunology* 72 (3), S. 422–427. Online verfügbar unter <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3262460/>.

Hu, Wenhui; Chen, Yueqi; Dou, Ce; Dong, Shiwu (2021): Microenvironment in subchondral bone: predominant regulator for the treatment of osteoarthritis. In: *Annals of the rheumatic diseases* 80 (4), S. 413–422. DOI: 10.1136/annrheumdis-2020-218089.

Huang, Xiaobin; Zhong, Leilei; Hendriks, Jan; Post, Janine N.; Karperien, Marcel (2019): Different response of human chondrocytes from healthy looking areas and damaged regions to IL1 β stimulation under different oxygen tension. In: *Journal of Orthopaedic Research*® 37 (1), S. 84–93. DOI: 10.1002/jor.24142.

Hwang, Hyun Sook; Lee, Mi Hyun; Go, Dong Jin; Kim, Hyun Ah (2021): Norepinephrine modulates IL-1 β -induced catabolic response of human chondrocytes. In: *BMC musculoskeletal disorders* 22 (1), S. 724. DOI: 10.1186/s12891-021-04598-7.

Jeremiasse, Bernadette; Matta, Csaba; Fellows, Christopher R.; Boockock, David J.; Smith, Julia R.; Liddell, Susan et al. (2020): Alterations in the chondrocyte surfaceome in response to pro-inflammatory cytokines. In: *BMC molecular and cell biology* 21 (1), S. 47. DOI: 10.1186/s12860-020-00288-9.

Jimi, Eijiro; Fei, Huang; Nakatomi, Chihiro (2019): NF- κ B Signaling Regulates Physiological and Pathological Chondrogenesis. In: *International journal of molecular sciences* 20 (24). DOI: 10.3390/ijms20246275.

Joung, Soyeong; Yoon, Dong Suk; Cho, Sehee; Ko, Eun Ae; Lee, Kyoung Mi; Park, Kwang Hwan et al. (2021): Downregulation of MicroRNA-495 Alleviates IL-1 β Responses among Chondrocytes by Preventing SOX9 Reduction. In: *Yonsei medical journal* 62 (7), S. 650–659. DOI: 10.3349/ymj.2021.62.7.650.

Kahle, P.; Saal, J. G.; Schaudt, K.; Zacher, J.; Fritz, P.; Pawelec, G. (1992): Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. In: *Annals of the rheumatic diseases* 51 (6), S. 731–734. DOI: 10.1136/ard.51.6.731.

Kaur, Gurvinder; Dufour, Jannette M. (2012): Cell lines: Valuable tools or useless artifacts. In: *Spermatogenesis* 2 (1), S. 1–5. DOI: 10.4161/spmg.19885.

Kunisch, Elke; Kinne, Raimund W.; Alsalameh, Rayya J.; Alsalameh, Saifeddin (2016): Pro-inflammatory IL-1 β and/or TNF- α up-regulate matrix metalloproteases-1 and -3 mRNA in chondrocyte subpopulations potentially pathogenic in osteoarthritis: in situ hybridization studies on a single cell level. In: *International journal of rheumatic diseases* 19 (6), S. 557–566. DOI: 10.1111/1756-185X.12431.

Kuyinu, Emmanuel L.; Narayanan, Ganesh; Nair, Lakshmi S.; Laurencin, Cato T. (2016): Animal models of osteoarthritis: classification, update, and measurement of outcomes. In: *Journal of orthopaedic surgery and research* 11, S. 19. DOI: 10.1186/s13018-016-0346-5.

Lampropoulou-Adamidou, Kalliopi; Lelovas, Pavlos; Karadimas, Eleftherios V.; Liakou, Chrysoula; Triantafillopoulos, Ioannis K.; Dontas, Ismene; Papaioannou, Nikolaos A. (2014): Useful animal models for the research of osteoarthritis. In: *European journal of orthopaedic surgery & traumatology : orthopedie traumatologie* 24 (3), S. 263–271. DOI: 10.1007/s00590-013-1205-2.

Loeser, Richard F.; Collins, John A.; Diekman, Brian O. (2016): Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis. In: *Nat Rev Rheumatol* 12 (7), S. 412–420. DOI: 10.1038/nrrheum.2016.65.

- López-Armada, M. J.; Caramés, B.; Lires-Deán, M.; Cillero-Pastor, B.; Ruiz-Romero, C.; Galdo, F.; Blanco, F. J. (2006): Cytokines, tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta, differentially regulate apoptosis in osteoarthritis cultured human chondrocytes. In: *Osteoarthritis and cartilage* 14 (7), S. 660–669. DOI: 10.1016/j.joca.2006.01.005.
- Ly, Mengxi; Zhou, Yilu; Polson, Shawn W.; Wan, Leo Q.; Wang, Meiqing; Han, Lin et al. (2019): Identification of Chondrocyte Genes and Signaling Pathways in Response to Acute Joint Inflammation. In: *Scientific reports* 9 (1), S. 93. DOI: 10.1038/s41598-018-36500-2.
- Matsushita, T.; Kuroda, R. (2014): Osteoarthritis: Molecular Mechanisms and Treatments. In: Pieter J. Emans und Lars Peterson (Hg.): *Developing Insights in Cartilage Repair*. London: Springer London, S. 65–77.
- McCoy, A. M. (2015): Animal Models of Osteoarthritis: Comparisons and Key Considerations. In: *Veterinary pathology* 52 (5), S. 803–818. DOI: 10.1177/0300985815588611.
- McNulty, Amy L.; Rothfus, Nicole E.; Leddy, Holly A.; Guilak, Farshid (2013): Synovial fluid concentrations and relative potency of interleukin-1 alpha and beta in cartilage and meniscus degradation. In: *Journal of Orthopaedic Research®* 31 (7), S. 1039–1045. DOI: 10.1002/jor.22334.
- Mead, Timothy J.; Apte, Suneel S. (2018): ADAMTS proteins in human disorders. In: *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology* 71-72, S. 225–239. DOI: 10.1016/j.matbio.2018.06.002.
- Mohanraj, Bhavana; Huang, Alice H.; Yeger-McKeever, Meira J.; Schmidt, Megan J.; Dodge, George R.; Mauck, Robert L. (2018): Chondrocyte and mesenchymal stem cell derived engineered cartilage exhibits differential sensitivity to pro-inflammatory cytokines. In: *Journal of Orthopaedic Research®* 36 (11), S. 2901–2910. DOI: 10.1002/jor.24061.
- Nozawa-Inoue, Kayoko; Amizuka, Norio; Ikeda, Nobuyuki; Suzuki, Akiko; Kawano, Yoshiro; Maeda, Takeyasu (2003): Synovial membrane in the temporomandibular joint--its morphology, function and development. In: *Archives of histology and cytology* 66 (4), S. 289–306. DOI: 10.1679/aohc.66.289.

O'Hara, B. P.; Urban, J. P.; Maroudas, A. (1990): Influence of cyclic loading on the nutrition of articular cartilage. In: *Annals of the rheumatic diseases* 49 (7), S. 536–539. DOI: 10.1136/ard.49.7.536.

Ossendorff, Robert; Grad, Sibylle; Stoddart, Martin J.; Alini, Mauro; Schmal, Hagen; Südkamp, Norbert; Salzmann, Gian M. (2018): Autologous Chondrocyte Implantation in Osteoarthritic Surroundings: TNF α and Its Inhibition by Adalimumab in a Knee-Specific Bioreactor. In: *The American journal of sports medicine* 46 (2), S. 431–440. DOI: 10.1177/0363546517737497.

Ossendorff, Robert; Kurth, Sarah; Wang, Su; Jaenisch, Max; Assaf, Elio; Scheidt, Sebastian et al. (2024): Comparison of Concentration- and Homology-Dependent Effects of the Proinflammatory Cytokine Interleukin-1 β (IL-1 β) in a Bovine Chondrocyte Inflammation Model. In: *Cells* 14 (1). DOI: 10.3390/cells14010030.

Pascarelli, Nicola Antonio; Collodel, Giulia; Moretti, Elena; Cheleschi, Sara; Fioravanti, Antonella (2015): Changes in Ultrastructure and Cytoskeletal Aspects of Human Normal and Osteoarthritic Chondrocytes Exposed to Interleukin-1 β and Cyclical Hydrostatic Pressure. In: *International journal of molecular sciences* 16 (11), S. 26019–26034. DOI: 10.3390/ijms161125936.

Rotter Sopasakis, Victoria; Wickelgren, Ruth; Sukonina, Valentina; Brantsing, Camilla; Svala, Emilia; Hansson, Elisabeth et al. (2019): Elevated Glucose Levels Preserve Glucose Uptake, Hyaluronan Production, and Low Glutamate Release Following Interleukin-1 β Stimulation of Differentiated Chondrocytes. In: *Cartilage* 10 (4), S. 491–503. DOI: 10.1177/1947603518770256.

Sakata, Shuzo; Kunitatsu, Ryo; Tsuka, Yuji; Nakatani, Ayaka; Gunji, Hidemi; Yanoshita, Makoto et al. (2022): High-frequency near-infrared diode laser irradiation suppresses IL-1 β -induced inflammatory cytokine expression and NF- κ B signaling pathways in human primary chondrocytes. In: *Lasers in medical science* 37 (2), S. 1193–1201. DOI: 10.1007/s10103-021-03371-5.

Sakata, Shuzo; Kunitatsu, Ryo; Tsuka, Yuji; Nakatani, Ayaka; Hiraki, Tomoka; Gunji, Hidemi et al. (2020): High-Frequency Near-Infrared Diode Laser Irradiation Attenuates IL-1 β -Induced Expression of Inflammatory Cytokines and Matrix Metalloproteinases in

Human Primary Chondrocytes. In: *Journal of clinical medicine* 9 (3). DOI: 10.3390/jcm9030881.

Sellam, Jérémie; Berenbaum, Francis (2010): The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. In: *Nat Rev Rheumatol* 6 (11), S. 625–635. DOI: 10.1038/nrrheum.2010.159.

Stanton, Heather; Rogerson, Fraser M.; East, Charlotte J.; Golub, Suzanne B.; Lawlor, Kate E.; Meeker, Clare T. et al. (2005): ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro. In: *Nature* 434 (7033), S. 648–652. DOI: 10.1038/nature03417.

Sun, Hui B. (2010): Mechanical loading, cartilage degradation, and arthritis. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1211, S. 37–50. DOI: 10.1111/j.1749-6632.2010.05808.x.

Sun, Yujie; Zhou, Lugang; Lv, Dongmei; Liu, Hongzhi; He, Tian; Wang, Xin (2015): Poly(ADP-ribose) polymerase 1 inhibition prevents interleukin-1 β -induced inflammation in human osteoarthritic chondrocytes. In: *Acta biochimica et biophysica Sinica* 47 (6), S. 422–430. DOI: 10.1093/abbs/gmv033.

Tabeian, Hessam; Betti, Beatriz F.; Dos Santos Cirqueira, Cinthya; Vries, Teun J. de; Lobbezoo, Frank; Linde, Anouk V. ter et al. (2019): IL-1 β Damages Fibrocartilage and Upregulates MMP-13 Expression in Fibrochondrocytes in the Condyle of the Temporomandibular Joint. In: *International journal of molecular sciences* 20 (9). DOI: 10.3390/ijms20092260.

Tan, ShihJye; Fang, William; Vangsness, C. Thomas; Han, Bo (2021): Influence of Cellular Microenvironment on Human Articular Chondrocyte Cell Signaling. In: *Cartilage* 13 (2_suppl), 935S-946S. DOI: 10.1177/1947603520941219.

Tao, Tenghui; Luo, Danni; Gao, Chenghao; Liu, Hui; Lei, Zehua; Liu, Wenbin et al. (2021): Src Homology 2 Domain-Containing Protein Tyrosine Phosphatase Promotes Inflammation and Accelerates Osteoarthritis by Activating β -Catenin. In: *Frontiers in cell and developmental biology* 9, S. 646386. DOI: 10.3389/fcell.2021.646386.

Teeple, Erin; Jay, Gregory D.; Elsaid, Khaled A.; Fleming, Braden C. (2013): Animal models of osteoarthritis: challenges of model selection and analysis. In: *AAPS J* 15 (2), S. 438–446. DOI: 10.1208/s12248-013-9454-x.

Vaamonde-García, Carlos; Riveiro-Naveira, Romina R.; Valcárcel-Ares, Marta N.; Hermida-Carballo, Laura; Blanco, Francisco J.; López-Armada, María J. (2012): Mitochondrial dysfunction increases inflammatory responsiveness to cytokines in normal human chondrocytes. In: *Arthritis and rheumatism* 64 (9), S. 2927–2936. DOI: 10.1002/art.34508.

Vanlauwe, J.; Jelic, M.; Limbourg, M. J.; Luyten, F. P. (2014): Characterized Chondrocyte Implantation Challenges Current Paradigms for the Treatment of Symptomatic Joint Surface Lesions. In: Pieter J. Emans und Lars Peterson (Hg.): *Developing Insights in Cartilage Repair*. London: Springer London, S. 187–209.

Vries-van Melle, Marloes L. de; Mandl, Erik W.; Kops, Nicole; Koevoet, Wendy J. L. M.; Verhaar, Jan A. N.; van Osch, Gerjo J. V. M. (2012): An osteochondral culture model to study mechanisms involved in articular cartilage repair. In: *Tissue engineering. Part C, Methods* 18 (1), S. 45–53. DOI: 10.1089/ten.TEC.2011.0339.

Wang, Ning; Grad, Sibylle; Stoddart, Martin J.; Niemeyer, Philipp; Südkamp, Norbert P.; Pestka, Jan et al. (2013): Bioreactor-Induced Chondrocyte Maturation Is Dependent on Cell Passage and Onset of Loading. In: *Cartilage* 4 (2), S. 165–176. DOI: 10.1177/1947603512471345.

Wang, Yongjie; Che, Mingxue; Xin, Jingguo; Zheng, Zhi; Li, Jiangbi; Zhang, Shaokun (2020): The role of IL-1 β and TNF- α in intervertebral disc degeneration. In: *Biomedicine & Pharmacotherapy* 131, S. 110660. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.110660.

Westacott, C. I.; Whicher, J. T.; Barnes, I. C.; Thompson, D.; Swan, A. J.; Dieppe, P. A. (1990): Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. In: *Annals of the rheumatic diseases* 49 (9), S. 676–681. DOI: 10.1136/ard.49.9.676.

Wimmer, Markus A.; Grad, Sibylle; Kaup, Thomas; Hänni, Markus; Schneider, Erich; Gogolewski, Sylwester; Alini, Mauro (2004): Tribology approach to the engineering and study of articular cartilage. In: *Tissue engineering* 10 (9-10), S. 1436–1445. DOI: 10.1089/ten.2004.10.1436.

Wu, Jianxiong; Zhang, Hongjun; Deng, Rulin; Xing, Lifeng; Hu, Mingwu; Fu, Xiaoling (2021): Interleukin-1 β promotes cartilage degeneration by regulating forkhead box protein O4 and type II collagen. In: *Molecular medicine reports* 24 (5). DOI: 10.3892/mmr.2021.12453.

Xu, Fang; Zhao, Liang-Jun; Liao, Ting; Li, Zhao-Cong; Wang, Lei-Lei; Lin, Pan-Yu et al. (2022): Ononin ameliorates inflammation and cartilage degradation in rat chondrocytes with IL-1 β -induced osteoarthritis by downregulating the MAPK and NF- κ B pathways. In: *BMC complementary medicine and therapies* 22 (1), S. 25. DOI: 10.1186/s12906-022-03504-5.

Zaucke, F.; Dinser, R.; Maurer, P.; Paulsson, M. (2001): Cartilage oligomeric matrix protein (COMP) and collagen IX are sensitive markers for the differentiation state of articular primary chondrocytes. In: *The Biochemical journal* 358 (Pt 1), S. 17–24. DOI: 10.1042/0264-6021:3580017.

Zhao, Kun; Ruan, Jiaqi; Nie, Liuyan; Ye, Xiangming; Li, Juebao (2023): Effects of synovial macrophages in osteoarthritis. In: *Frontiers in immunology* 14, S. 1164137. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1164137.

Zhu, Weidong; Zhang, Yi; Li, Yueshan; Wu, Hao (2022): Glaucocalyxin A Attenuates IL-1 β -Induced Inflammatory Response and Cartilage Degradation in Osteoarthritis Chondrocytes via Inhibiting the Activation of NF- κ B Signaling Pathway. In: *Disease markers* 2022, S. 6516246. DOI: 10.1155/2022/6516246.

Ziadlou, Reihane; Barbero, Andrea; Stoddart, Martin J.; Wirth, Michael; Li, Zhen; Martin, Ivan et al. (2019): Regulation of Inflammatory Response in Human Osteoarthritic Chondrocytes by Novel Herbal Small Molecules. In: *International journal of molecular sciences* 20 (22). DOI: 10.3390/ijms20225745.

Žigon-Branc, Sara; Barlič, Ariana; Knežević, Miomir; Jeras, Matjaž; Vunjak-Novakovic, Gordana (2018): Testing the potency of anti-TNF- α and anti-IL-1 β drugs using spheroid cultures of human osteoarthritic chondrocytes and donor-matched chondrogenically differentiated mesenchymal stem cells. In: *Biotechnology progress* 34 (4), S. 1045–1058. DOI: 10.1002/btpr.2629.

9. Erklärung zum Eigenanteil

Die Arbeit wurde im Forschungslabor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Unfallchirurgie unter der Leitung von Prof. Dr. Frank A. Schildberg durchgeführt. Die Planung der wissenschaftlichen Arbeit erfolgte durch Prof. Dr. Frank A. Schildberg und Dr. Robert Ossendorff. An der experimentellen Durchführung und Datenerhebung waren neben mir Prof. Dr. Frank A. Schildberg, Dr. Robert Ossendorff und Herr Werner Masson beteiligt. Histologische Präparate wurden teilweise in der Histologieplattform des Exzellenzclusters ImmunoSensation² erstellt und von mir, Prof. Dr. Frank A. Schildberg und Dr. Robert Ossendorff ausgewertet. Die statistische Auswertung erfolgte eigenständig nach Anleitung durch Prof. Dr. Frank A. Schildberg und Dr. med. Robert Ossendorff. Die Ergebnisse wurden gemeinsam von mir, Prof. Dr. rer. nat. Frank A. Schildberg und Dr. med. Robert Ossendorff interpretiert und diskutiert. In ausgewählten Fällen wurden Daten mit Herrn Su Wang, PD Dr. Max Jaenisch, Dr. Elio Assaf, PD Dr. Sebastian Scheidt, PD Dr. Kristian Welle, Prof. Dr. Christof Burger, Prof. Dr. Dieter C. Wirtz und PD Dr. Andreas C. Strauss diskutiert, analysiert und in den klinischen Kontext eingeordnet.

Ich versichere, die Dissertation selbstständig verfasst zu haben und keine weiteren als die genannten Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater, Prof. Dr. rer. nat. Frank A. Schildberg, und meinem Betreuer, Dr. med. Robert Ossendorff, für ihre fachliche Expertise, ihre wertvollen Hinweise und ihre unermüdliche Unterstützung während des gesamten Forschungsprozesses.

Ich danke auch meinen Kolleginnen und Kollegen des Forschungslabors, insbesondere Werner Masson, für seine Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei praktischen Fragen während des experimentellen Prozesses.

Ein herzliches Dankeschön geht an meine Familie und Freunde, die mir während dieser Zeit stets zur Seite standen und nie müde wurden mir ihre Unterstützung zu zeigen.