

**Zelluläre pharmakodynamische Effekte eines
standardisierten Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol®)
bei Patienten mit schwerer Osteoarthritis**



DISSERTATION

zur Erlangung
des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Steffen Jeßberger
aus Collenberg

Würzburg 2016

Eingereicht am:

bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

3. Prüfer:

des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Datum des öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung von

Frau Professor Dr. Petra Högger

am Lehrstuhl für Pharmazeutische Chemie
des Instituts für Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

*„Wer sich Steine zurechtlegen kann,
über die er stolpert, hat Erfolg in den Naturwissenschaften.“*

(Erwin Chargaff)

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits an folgenden Stellen veröffentlicht:

Posterbeitrag:

Jessberger, S., Högger, P.

Effects of an orally administered pine bark extract (Pycnogenol®) on expression of osteoarthritis marker genes.

ChemSystM, Würzburg 2014

Danksagung

An dieser Stelle gilt mein herzlichster Dank allen, die zum Entstehen und Gelingen der vorliegenden wissenschaftlichen Arbeit beigetragen haben.

Zuallererst gilt dieser Dank Frau Prof. Dr. P. Högger für das Ermöglichen des Erstellens der Arbeit in ihrem Arbeitskreis. Vielen Dank für das Anvertrauen dieses interessanten, vielseitigen Themas, die tolle Betreuung und das jederzeit offene Ohr, aber auch die Möglichkeit, mich selbst umfassend in die unterschiedlichen Projekte einbringen zu dürfen.

Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Lothar Seefried, Frau Jasmin Baumann und Frau Ursula Hellwich aus dem König-Ludwig-Haus in Würzburg für die allzeit tolle Zusammenarbeit während der klinischen Studie danken, die u.a. zur Bearbeitung der Fragestellungen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde.

Folgenden Personen bzw. Firmen gilt ebenso mein Dank:

- Herrn Prof. Dr. D. M. Salter für die Möglichkeit, im Western General Hospital in Edinburgh, die Isolierung von Chondrozyten aus humanem Knorpel zu erlernen und zusätzlich Herrn Dr. Asim Azfer für die hierbei tatkräftige Unterstützung.
- Herrn Prof. Dr. N. Schütze aus dem König-Ludwig-Haus in Würzburg für das Bereitstellen der Chondrozytenzelllinie TC28.
- Frau Prof. Dr. C. Förster aus dem Universitätsklinikum in Würzburg für die Möglichkeit, das von ihr entwickelte cEND-Blut-Hirn-Schranken-Modell verwenden zu dürfen und zusätzlich Frau Dr. M. Burek für die theoretische und Frau E. Wilkens für die praktische Hilfe im Rahmen der Experimente.
- Frau L. Schaaf, Frau M. Mulek, Herrn M. Haas und Herrn Dr. F. Vollmers für die zahlreichen Diskussionen über technische Fragestellungen und die Hilfe bei der Einarbeitung in die Zellkultur, real-time PCR sowie HPLC.
- Frau L. Schaaf, Frau L. Volpp und Herrn M. Haas für die tolle Zeit während der Studentenbetreuung im Fach Klinische Pharmazie.
- Der Firma Horphag Research (Genf, Schweiz) für das Bereitstellen der Studienmedikation und für die finanzielle Unterstützung der Projekte.
- Dem ganzen Arbeitskreis in wechselnder Zusammensetzung, in dem das Arbeitsklima stets toll und konstruktiv war. Ein besonderer Dank gilt hierbei

Frau Roswitha Scheblein, die uns Doktoranden bei unseren alltäglichen Laborarbeiten immer tatkräftig unterstützt.

- Dem alljährlich fleißig trainierenden ChemCup-Team, in wechselnder Zusammensetzung, für die Ablenkung und Abwechslung vom Alltag.
- Meiner Familie für die stetige Unterstützung während meiner Schul-, Studiums- und Promotionszeit. Meiner Frau Anne für die regen Diskussionen, die Unterstützung, auch wenn mal etwas nicht wie gewünscht geklappt hat, und für die viele Geduld. Meiner Mutter Rosemarie, meiner Schwiegermutter Karin und meiner Frau für das Korrekturlesen der Arbeit und meiner Großcousine Petra für das Überblicken englischer Texte.
- Herrn Apotheker R. Bertsch für das Anfertigen der übersichtlichen Kniegelenksskizze und der Bereitstellung dieser für das vorliegende Werk.

Inhaltsverzeichnis

A	Einleitung.....	2
1	Charakterisierung von Osteoarthritis und des standardisierten Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol®).....	4
1.1	Epidemiologie, Risikofaktoren für Osteoarthritis und Pathogenese der Erkrankung.....	4
1.2	Möglichkeiten zur standardisierten Erfassung der Symptome im Rahmen von Osteoarthritis.....	7
1.3	Aktuelle Therapieoptionen im Rahmen der Osteoarthritis-Behandlung.....	9
1.4	Herkunft, Zusammensetzung und Pharmakokinetik von Pycnogenol®	19
1.5	Klinische Effekte von Pycnogenol® und vergleichbarer Produkte bei Osteoarthritis.....	21
2	Zelluläre Vorgänge im Knorpelgewebe bei Osteoarthritis.....	30
2.1	Knorpelhomöostase im gesunden Kniegelenk und Veränderungen während Osteoarthritis	30
2.2	Aufbau und Metabolismus des Collagen-Netzwerks im gesunden Knorpelgewebe und bei Osteoarthritis	43
2.3	Auf- und Abbau der EZM mit Fokus auf den Aggrecan-Stoffwechsel und dessen Bedeutung im Rahmen von Osteoarthritis	49
2.4	Die Rolle von Leptin in der Knorpelhomöostase und der Pathogenese von Osteoarthritis	53
3	Zielsetzung der Arbeit.....	57
B	Allgemeiner Teil	60
1	Pharmakodynamische Effekte eines standardisierten Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol®) bei Osteoarthritis.....	62
1.1	Klinische Studie zur Ermittlung der Wirkung von Pycnogenol® bei fortgeschrittener Gonarthrose	62

1.2	Auswirkung der Einnahme des standardisierten Kiefernrintenextraktes auf die Symptomatik der Gonarthrose.....	65
1.2.1	Erfassung der Symptome im Rahmen der Osteoarthritis-Studie	65
1.2.2	Ergebnisse der WOMAC-Score-Erfassung	65
1.2.3	Diskussion	69
1.3	Effekte von Pycnogenol® auf die Genexpression im Knorpelgewebe	72
1.3.1	Prinzip der Quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) und analytisches Vorgehen nach standardisierten Leitlinien	72
1.3.2	Primerentwurf und Primerkonzentrationstests	78
1.3.3	Housekeeping-Gen-Validierung	81
1.3.4	Effizienzbestimmung	85
1.3.5	Ergebnisse der qPCR-Untersuchungen	86
1.3.6	Diskussion	91
1.4	Direkter Einfluss von Pycnogenol® auf die Konzentration von Markern der Knorpelhomöostase in Serum und Synovialflüssigkeit.....	99
1.4.1	Effekte von Pycnogenol® nach dreiwöchiger Einnahme auf die Konzentration von diversen Markern der Knorpelhomöostase im Serum	99
1.4.2	Einfluss des standardisierten Kiefernrintenextraktes auf die Konzentration von Markern in der Synovialflüssigkeit	102
1.4.3	Diskussion der Resultate der Konzentrationsbestimmung in Serum und Synovialflüssigkeit	109
1.5	Beobachtete Korrelationen.....	119
1.5.1	Korrelationen zwischen Konzentrationen von Markern der Knorpelhomöostase in diversen Spezimen	119
1.5.2	Korrelationen zwischen Markerkonzentrationen und Konzentrationen wichtiger Inhaltsstoffe von Pycnogenol® im Serum und den Blutzellen	121

1.5.3 Korrelationen zwischen Markerkonzentrationen und Konzentrationen wichtiger Inhaltsstoffe von Pycnogenol® in der Synovialflüssigkeit	123
1.5.4 Zusammenhänge zwischen der Genexpression im Knorpel und Konzentrationen von Abbaumarkern in der Synovialflüssigkeit	125
1.5.5 Diskussion der ermittelten Korrelationen	127
1.6 <i>Ex-vivo</i> -Effekte von Serum nach Pycnogenol®-Einnahme auf humane primäre Chondrozyten.....	134
1.6.1 Prinzip und Aufbau der Versuchsdurchführung	134
1.6.2 Ergebnisse	136
1.6.3 Diskussion der <i>ex-vivo</i> -Versuche mit Serum	142
1.7 <i>Ex-vivo</i> -Effekte von Synovialflüssigkeit nach Einnahme des standardisierten Kiefernrintenextraktes auf die immortalisierte Chondrozytenzelllinie TC28	148
1.7.1 Prinzip und Aufbau des <i>ex-vivo</i> -Versuches	148
1.7.2 Einfluss der Zellviabilität auf die Ergebnisse der <i>ex-vivo</i> -Versuche mit Synovialflüssigkeit	149
1.7.3 Ergebnisse der <i>ex-vivo</i> -Versuche mit Synovialflüssigkeit	151
1.7.4 Diskussion	154
2 Simulierung des Verhaltens ausgewählter Bestandteile von Pycnogenol® und eines Metaboliten an der Blut-Hirn-Schranke mit Hilfe eines <i>in-vitro</i> -Modells	158
2.1 Effekte von Polyphenolen auf das Gehirn	158
2.2 Physiologie der humanen Blut-Hirn-Schranke.....	163
2.3 Ausgewählte Modelle zur Untersuchung der Blut-Hirn-Schrankengängigkeit von Arzneistoffen	166
2.4 cEND- <i>in-vitro</i> -Modell für die Analyse der Aufnahme von ausgewählten Bestandteilen von Pycnogenol® und dessen Metaboliten in das Gehirn ..	172
2.5 Ergebnisse der cEND-Modell-Versuche.....	173

2.6 Diskussion.....	179
C Experimenteller Teil.....	192
1 Pharmakodynamische Effekte eines standardisierten Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol®) bei Osteoarthritis.....	194
1.1 Reagenzien und Chemikalien	194
1.1.1 Verwendete Reagenzien und Chemikalien in der Zellkultur	194
1.1.2 Spezielle Reagenzien und Chemikalien zur Durchführung von ELISAs	194
1.1.3 Reagenzien und Chemikalien für RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und quantitative real-time PCR	195
1.2 Geräte und Materialien.....	195
1.2.1 Verwendete Geräte und Materialien in der Zellkultur	195
1.2.2 Spezielle Geräte und Materialien für die Durchführung von ELISAs	196
1.2.3 Geräte und Materialien für die RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und qPCR	197
1.3 Häufig verwendete Lösungen.....	197
1.4 Zellkulturmedien.....	198
1.5 Randomisiert-kontrollierte Studie zur Ermittlung der pharmakodynamischen Effekte von Pycnogenol® bei Patienten mit schwerer Knie-Osteoarthritis	199
1.6 Isolierung von primären Chondrozyten aus humanem Kniegelenkknorpel.....	201
1.7 Genexpressionsanalysen mittels quantitativer real-time PCR zur Ermittlung der Pycnogenol®-Effekte auf Genebene.....	205
1.7.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese	205
1.7.2 Primer-Design	206
1.7.3 Auswertung von qPCR-Daten	207

1.7.4 Primer-Konzentrationstest	209
1.7.5 Housekeeping-Genvalidierung	213
1.7.6 Probenvermessung	213
1.8 Bestimmung der Konzentration ausgewählter Marker der Knorpelhomöostase in Serum, Synovialflüssigkeit und Zellkulturüberständen.....	216
1.8.1 Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP-3)	216
1.8.2 Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP-13)	217
1.8.3 Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP-1)	219
1.8.4 ADAMTS-5	220
1.8.5 ADAMTS-4	221
1.8.6 Leptin	222
1.8.7 Lösliches CD163 (sCD163)	223
1.8.8 Sulfatierte Glucosaminglykane (sGAG) über den Dimethylmethylenblau (DMMB)-Assay	224
1.8.9 Humanes C-Telopeptid (CTX-II) und Helix-Peptid (Helix-II) von Typ-II-Collagen	226
1.9 <i>Ex-vivo</i> -Versuche mit Serum.....	228
1.10 <i>Ex-vivo</i> -Versuche mit Synovialflüssigkeit	230
1.10.1 Auftauen von immortalisierten Zellen	230
1.10.2 Passagieren von TC28-Zellen	230
1.10.3 Einfrieren von Zellen der Chondrozyten-Zelllinie TC28	231
1.10.4 Vitalitätstest der Zelllinie TC28 mittels MTT-Assay	231
1.10.5 Prinzip der Bestimmung	232
1.11 Statistische Methoden.....	233
2 Bestimmung der Aufnahme ausgewählter Bestandteile von Pycnogenol [®] und eines Metaboliten in das Gehirn mit Hilfe eines cEND- <i>in-vitro</i> -Modells .	234
2.1 Spezielle Reagenzien und Chemikalien	234

2.2	Geräte und Materialien.....	234
2.3	HPLC-Anlage und verwendete Fließmittel	235
2.4	Vorbereitung des murinen cEND- <i>in-vitro</i> -Modells	235
2.5	Verwendete Lösungen	236
2.6	Durchführung der Transport-Experimente.....	237
2.7	Flüssig-Flüssig-Extraktion	238
2.8	HPLC-Methoden zur Bestimmung der Stoffkonzentrationen in den apikalen und basolateralen Kammern.....	239
2.8.1	Validierung der HPLC-Methoden	240
2.9	Statistische Methoden.....	256
D	Tabellarischer Anhang	260
1	Pharmakodynamische Effekte eines standardisierten Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol®) bei Osteoarthritis.....	262
1.1	Konzentration und Reinheit verwendeter RNA-Proben für die cDNA- Synthese nach Isolierung aus Chondrozyten	262
1.2	Ergebnisse Primerkonzentrationstest.....	263
1.2.1	C _t -Werte des Primerkonzentrationstests für MMP-13	263
1.2.2	C _t -Werte des Primerkonzentrationstests für Leptin	263
1.2.3	C _t -Werte des Primerkonzentrationstests für ADAMTS-5	264
1.2.4	C _t -Werte des Primerkonzentrationstests für IL-1 β	265
1.2.5	C _t -Werte des Primerkonzentrationstests für MMP-1	265
1.2.6	C _t -Werte des Primerkonzentrationstests für MMP-3	266
1.2.7	C _t -Werte des Primerkonzentrationstests für Cathepsin K	267
1.3	Housekeeping-Genvalidierung	268
1.4	Effizienzbestimmung	269
1.5	Genexpressionsuntersuchung.....	270
1.5.1	MMP-13	270

1.5.2 Leptin	271
1.5.3 IL-1 β	272
1.5.4 ADAMTS-5	273
1.5.5 MMP-1	274
1.5.6 MMP-3	275
1.5.7 Cathepsin K	276
1.6 Konzentrationen von Entzündungsmarkern im Serum und in der Synovialflüssigkeit	277
1.6.1 Konzentrationsentwicklungen diverser Marker im Serum	277
1.6.2 Konzentration von Markern der Knorpelhomöostase in der Synovialflüssigkeit der Teilnehmer der Osteoarthritis-Studie	285
1.6.3 Konzentration von Abbauprodukten in der Synovialflüssigkeit der Probanden	286
1.7 <i>Ex-vivo</i> -Untersuchungen	287
1.7.1 <i>Ex-vivo</i> -Versuche mit Serum und humanen primären Chondrozyten bzw. TC28-Zellen	287
1.7.2 <i>Ex-vivo</i> -Versuche mit Synovialflüssigkeit und TC28-Zellen	295
2 Ergebnisse der Transportversuche mit dem cEND- <i>in-vitro</i> -Modell.....	297
2.1 Metabolit M1	297
2.1.1 Ergebnisse der Versuche über 10 min	297
2.1.2 Ergebnisse der Versuche über 30 min	297
2.1.3 Ergebnisse der Versuche über 60 min	298
2.2 Ergebnisse für (+)-Catechin nach 30 min.....	298
2.3 Ergebnisse für Protocatechusäure	298
2.3.1 Ergebnisse der Versuche über 30 min	298
2.3.2 Ergebnisse der Versuche über 60 min	299
E Zusammenfassung	302

F	Abkürzungsverzeichnis.....	310
G	Literaturverzeichnis	316

1 Charakterisierung von Osteoarthritis und des standardisierten Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol[®])

1.1 Epidemiologie, Risikofaktoren für Osteoarthritis und Pathogenese der Erkrankung

Osteoarthritis (OA) ist eine der weltweit am häufigsten vorkommenden Gelenkerkrankungen und zählt zu den führenden Gründen für eine Invalidität in den Industrienationen [1]. In Deutschland erkranken, laut Ergebnis der Studie zur Gesundheit Erwachsener in Deutschland (DEGS1), im Laufe des Lebens 20,2 % der Bevölkerung an dieser degenerativen Gelenkerkrankung [2]. Die weibliche Gruppe der 18- bis 79-Jährigen ist dabei signifikant häufiger betroffen als die Gruppe der Männer der gleichen Altersgruppe (22,3 % vs. 18,1 %). Abgesehen vom weiblichen Geschlecht als Risikofaktor sieht man auch eine signifikant zunehmende Prävalenz der Erkrankung mit steigendem Alter. Leiden bei den 18-29 jährigen Frauen lediglich 1,6 % unter Osteoarthritis, sind es im Alter von 70-79 Jahren 49,9 %. Bei den Männern zeigt sich eine ähnliche Entwicklung im Alter mit einer Zunahme von 1,8 % auf 33,3 %. Global betrachtet, sprechen Cross et al. aktuell von einer Kniegelenksosteoarthritis-Prävalenz von 3,8 %, die höher bei Frauen (4,8 %) als bei Männern (2,8 %) ist [3]. Ab einem Alter von 50 Jahren steigen die Fallzahlen stark an. Trotz zunehmender Alterung der Gesellschaft und der wachsenden Zahl adipöser Menschen, ließ sich keine Steigerung der Knieosteoarthritisprävalenz in den letzten 20 Jahren (1990 bis 2010) feststellen (jeweils im Mittel 3,8 %). Jedoch hat die Anzahl der Lebensjahre, die in Arbeitsunfähigkeit auf Grund der Erkrankung verbracht werden, sehr stark von 10,5 Millionen (1990) auf 17,1 Millionen (2010) zugenommen. Daran kann man das Problem erahnen, das in Zukunft auf die weltweiten Gesundheitssysteme zukommen wird, wenn die Generation des „Babybooms“ älter wird [4]. Am höchsten war die Prävalenz im Jahre 2010 unter den Gutverdienern im Asien-Pazifik-Raum gefolgt von Ozeanien und Nordafrika bzw. dem Mittleren Osten. Aus vielen Gebieten der Welt sind jedoch keine verlässlichen Daten verfügbar.

Die Erfassung der Gesamtkosten der Erkrankung Osteoarthritis gestaltet sich schwierig, da diese eine Summe aus direkten, indirekten und intangiblen Kosten sind. In den USA z.B. sollen diese, jährlich steigend, zwischen 1 % und 2,5 % des Bruttosozialproduktes betragen [4, 5]. Davon nehmen die Kosten für Gelenkersatzoperationen mit 22,6 Milliarden \$ einen großen Posten ein, ebenso die indirekten Kosten durch Arbeitsunfähigkeit mit 3,4-13,2 Milliarden \$ pro Jahr. Die Schätzungen für das Jahr 2030 durch die WHO fallen noch pessimistischer aus. Mobasher schätzt, dass im Jahre 2030 ca. 20 % der erwachsenen Bevölkerung in Westeuropa und Nordamerika von OA betroffen sein wird und bezeichnet die Erkrankung als eine der größten ökonomischen Belastungen der Zukunft [6].

Die genaue Ursache der Erkrankung ist bisher nicht geklärt. Steigendes Alter und Adipositas gelten als relevante Risikofaktoren [6, 7], genauso wie weibliches Geschlecht und genetische Veranlagung [2, 4]. Im Rahmen der vererbten Form sind Mutationen in Genen, die mit der Bildung der extrazellulären Matrix (EZM) in Verbindung stehen, z.B. das Typ-II-Collagen-Gen COL2A1, von besonderer Bedeutung [8, 9]. Ein genauer Mechanismus ist bis heute nicht belegt, jedoch gilt es als sicher, dass nicht ein einzelner Gendefekt alleine für das klinische Bild der Erkrankung verantwortlich sein kann. Zusätzlich zu den vorab genannten Merkmalen zählen Sportverletzungen [10] und gewisse berufliche Tätigkeiten, z.B. schweres Heben, zu den weiteren Faktoren, die das Risiko für die Entwicklung von OA erhöhen [11]. Der Einfluss von Sport und Bewegung und ob dieser generell als positiv oder negativ zu bewerten ist, wird bislang kontrovers diskutiert. Roos et al. zeigten bei Patienten mit hohem Risiko für OA eine Verbesserung der viskoelastischen Fähigkeiten des Knorpelgewebes unter moderater Bewegung, welche sich auch durch eine Symptomlinderung bemerkbar machte [12]. Dies spricht laut Autoren auch dafür, dass eine OA durch gemäßigt Training hinausgezögert oder gar verhindert werden kann. Für einige Sportarten ist im Gegensatz dazu eine Erhöhung des Osteoarthritisrisikos bestätigt, z.B. für Football oder Fussball, v.a. nach mehrmaligen Verletzungen besonders beanspruchter Gelenkstrukturen [4]. Es wird jedoch gleichzeitig ein erhöhtes Erkrankungsrisiko in Hinblick auf schwach ausgebildete Muskelstrukturen in Folge

mangelnden Trainings diskutiert. Ebenso widersprüchlich sind die Daten zu protektiven Effekten durch Einnahme von Nahrungssupplementen [4].

Im Zentrum der Pathogenese von OA steht eine progressive Knorpelzerstörung mit Gelenkspaltverengung in der Folge, aber auch eine Synovitis, subchondrale Knochenumgestaltung und Osteophytenbildung [13]. Dies zieht die klassische Symptomatik, geprägt durch Schmerzen, Steifigkeit und Einschränkungen der Funktionalität betroffener Gelenke, nach sich [14, 15]. Hinzu kommen Schwellungen und gelegentlich auftretende lokale Erwärmungen [6]. Die Lebensqualität der Erkrankten ist zum Teil stark eingeschränkt [16]. Die Symptomatik variiert stark zwischen einzelnen Individuen. Betroffen sind meist die gewichtstragenden Gelenke wie Knie oder Hüfte, jedoch kann generell jedes Gelenk erkrankt sein [6]. Ausgelöst wird das klinische Bild durch eine progredient verlaufende Knorpelzerstörung, die durch aktuelle Therapieoptionen nicht aufgehalten bzw. wieder rückgängig gemacht werden kann (Einleitung A, Kap. 1.3). Hinzu kommt meist eine Entzündung des Synoviums in der frühen sowie späten Phase der Erkrankung, die das Entzündungsgeschehen im Knorpelgewebe und dessen Abbau zusätzlich fördert. Durch gegenseitige Stimulation der Gewebe zur Freisetzung von proteolytischen Enzymen entsteht ein Teufelskreis (Einleitung A, Kap. 2.1).

Ein ursächliches Einschreiten in die Pathogenese der OA ist erforderlich, um den Krankheitsfortgang aufzuhalten. Um Effekte von Therapieoptionen bewerten und miteinander vergleichen zu können, bedarf es valider Instrumente. Diese sollen im Folgenden beschrieben werden.

1.2 Möglichkeiten zur standardisierten Erfassung der Symptome im Rahmen von Osteoarthritis

Im Rahmen der Osteoarthritis-Forschung haben sich zwei Methoden zur Bewertung der klinischen Symptomatik durchgesetzt: der Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC)-Score und der Lequesne-Index.

Der Lequesne-Index untergliedert sich in drei Bereiche zur Erfassung unterschiedlicher Dimensionen des Gesundheitszustandes von Patienten [17]. Der 1. Abschnitt befasst sich mit Fragen zu Schmerzen und Beschwerden, z.B. beim Gehen oder im Rahmen der nächtlichen Bettruhe. Im 2. Teil wird die max. Gehstrecke erfasst und im 3. Abschnitt die Fähigkeiten zur Bewältigung von Alltagsaktivitäten, z.B. ob ein Patient in ein Auto einsteigen und daraus aussteigen kann. Der ursprünglich entwickelte Index wurde um eine Frage zur sexuellen Aktivität bei sexuell aktiven Frauen ergänzt [18]. In Teil 1 und 2 der aktuellen Version können jeweils 0-8 Punkte und im 3. Teil 0-10 Punkte vergeben werden. Je schwerer der Erkrankungsgrad, desto höher die Punktzahl, die max. 26 Punkte betragen kann.

Der als valide eingestufte WOMAC-Score hat sich, im Vergleich zum Lequesne-Index, v.a. hierzulande als verlässlicher in der Erfassung von Symptomen erwiesen [19]. In der klinischen Studie, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, fand der WOMAC-Score in seiner Langfassung Verwendung. Dieses Instrument ist ein Satz standardisierter Fragebögen zur Ermittlung des Gesundheitszustandes von Patienten mit Knie- und Hüftgelenks-Osteoarthritis. Die Fragebögen untergliedern sich in Bereiche zur Erfassung der Schmerzen im Rahmen der Erkrankung (fünf Elemente, 0-20 Punkte, WOMAC-A), der Gelenksteifigkeit (zwei Elemente, 0-8 Punkte, WOMAC-B) und der physischen Funktion (17 Elemente, 0-68 Punkte, WOMAC-C) des betroffenen Gelenkes [20]. Bei jeder Frage können 0 Punkte (bester Zustand, z.B. keine Schmerzen) bis 4 Punkte (schlechtester Zustand, z.B. sehr starke Schmerzen) auf einer Likert-Skala vergeben werden. Für die Beurteilung der Funktionalität des Gelenkes gibt es inzwischen eine standardisierte Kurzform der ursprünglichen Fassung, die nur noch acht der 17 Ausgangsteile enthält, jedoch gut dazu geeignet ist, in klinischen

Studien die Effekte einer Therapie zu ermitteln [21]. Alle Unterpunkte werden dann zum Gesamtindex zusammengefügt, der im Idealfall 0 Punkte beträgt. Dies würde bedeuten, dass der Patient keine Symptome hat. Im Maximalfall sind 96 Punkte möglich. Je mehr Punkte ermittelt werden, desto stärker ist die Erkrankung ausgeprägt. Mit Hilfe dieses Instruments sollten in unseren Untersuchungen mögliche Unterschiede in der Symptomatik der Patienten nach Pycnogenol®-Einnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe erkannt werden. Zusätzlich kann das Wissen über WOMAC-Score und Lequesne-Index eingesetzt werden, um an Hand von Studienergebnisse aktuelle Therapieoptionen zu bewerten. Welche Behandlungsoptionen eingesetzt werden und welche Ideen in der Vergangenheit verworfen werden mussten, soll im Folgenden näher beleuchtet werden. Ein Verständnis der Ursachen und des Verlaufes der Erkrankung ist dabei essentiell (Einleitung A, Kap. 2), um sinnvolle Therapieansätze zu generieren. Ebenso ist dies wichtig, um die genauen Mechanismen von Therapieoptionen, die schon symptomatische Linderung bei Patienten in klinischen Studien verschaffen konnten, zu untersuchen.

1.3 Aktuelle Therapieoptionen im Rahmen der Osteoarthritis-Behandlung

Die hohe Prävalenz der Erkrankung und die damit verbundenen hohen Kosten stellen, wie erwähnt, ein zunehmend großes Problem für die Gesundheitssysteme der ganzen Welt dar (Einleitung A, Kap. 1.1). Die betroffenen Patienten haben, v.a. im fortgeschrittenen Stadium der Erkrankung, einen hohen Leidensdruck. Da eine kurative Behandlung von Osteoarthritis derzeit nicht möglich ist, steht die Verbesserung der individuellen Symptomatik im Vordergrund der Betreuung. Um den aktuellen Stand der Wissenschaft für praktizierende Ärzte zusammenzufassen, werden regelmäßig Leitlinien diverser Gesellschaften herausgegeben, die Empfehlungen für die Therapie des Erkrankungsbildes enthalten. Die Therapieoptionen werden durch Angabe verschiedener Evidenzgrade bewertet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die jeweils aktuellen Leitlinien der „Osteoarthritis Research Society International“ (OARSI) [22, 23], des „American College of Rheumatology“ (ACR) [24] und des „National Institute for Health and Clinical Excellence“ (NICE) berücksichtigt [15]. Zusätzlich wurden Empfehlungen des „National Institutes of Health“ (NIH) einbezogen [4, 25].

Die klassischen Symptome einer Gonarthrose sind, wie bereits beschrieben, Schmerzen, Steifigkeit und Schwellung im betroffenen Gelenk, welche, je nach Schweregrad, die Lebensqualität der Patienten stark beeinträchtigen können. Um eine Funktionalität des betroffenen Gelenks und, damit einhergehend, eine Mobilität der Betroffenen möglichst lange aufrechtzuerhalten, steht eine Verbesserung dieser Symptomatik im Vordergrund jeglicher Therapieansätze, da eine Heilung aktuell nicht möglich ist [15]. Zusätzlich zu einer Pharmakotherapie gibt es auch nichtmedikamentöse Ansätze, die dem Patienten eine Linderung der Symptome verschaffen können (Abbildung 1). Dazu zählen z.B. physiotherapeutische Ansätze, Akupunktur, Wassergymnastik und lokale Hitzeapplikationen. Eine Empfehlung für eine spezielle Anwendung kann, auf Grund des Mangels an verlässlichen, vergleichenden Studien nicht gegeben werden. Lediglich für einige Untergruppen von Patienten werden jeweils diverse Sportaktivitäten als angemessen beurteilt [23].

Ein wichtiger Ansatz in der Behandlung übergewichtiger Patienten ist eine Gewichtsreduktion, um die mechanische Belastung des Stützapparates und die Plasmakonzentrationen relevanter Marker, wie z.B. Leptin, zu reduzieren. Diese Empfehlung wird übereinstimmend in allen Leitlinien gegeben (Zusammenhänge siehe Einleitung A, Kap. 2.4). Mechanische Hilfen, wie Gehstock oder Krücken, werden bei Patienten mit Knie-OA als hilfreich erachtet [23].

Nicht-medikamentöse Maßnahmen	Medikamentöse Therapie	Operative Maßnahmen
<ul style="list-style-type: none">• Physiotherapie• Wassergymnastik<ul style="list-style-type: none">• Krafttraining• Akupunktur<ul style="list-style-type: none">• lokale Wärmebehandlung• Balneotherapie<ul style="list-style-type: none">• Abbau von Übergewicht• Gehhilfen	<ul style="list-style-type: none">• Paracetamol• NSAID ± PPI• Glucocorticoide (lokal)• Hyaluronsäure (lokal), Glucosamin, Chondroitinsulfat<ul style="list-style-type: none">• pflanzliche Therapeutika• andere	<ul style="list-style-type: none">• Arthroskopie<ul style="list-style-type: none">• Autologe Chondrozyten-Transplantation• Einsatz einer Endoprothese

Abbildung 1: Die drei Säulen des Osteoarthritis-Managements. NSAID= non-steroidal antiinflammatory drugs; PPI= Protonenpumpeninhibitor

Im Zentrum der medikamentösen Empfehlungen zahlreicher Fachgesellschaften steht die Behandlung der Patienten mit nichtsteroidalen antientzündlichen Wirkstoffen (non-steroidal antiinflammatory drugs, NSAIDs) zur Schmerzreduktion und Eindämmung von Entzündungsherden [14, 15, 22-24]. Bevor ein NSAID angewendet wird, sollte zunächst eine symptomatische Behandlung mit Paracetamol bis zu einer Tageshöchstdosis von 4000 mg versucht werden [24]. Der Wirkstoff hat jedoch nur moderate Effekte auf die Schmerzen im Kniegelenk und keinen Effekt auf Gelenksteifigkeit und -beweglichkeit [22]. Es zeigte sich auch in neueren klinischen Studien, dass ein wichtiger Vorteil von Paracetamol, nämlich das geringere Auftreten von gastrointestinalen (GIT) Nebenwirkungen, ab einer Dosis von mehr als 3000 mg pro Tag, an Bedeutung verliert. Toxische Effekte auf die Leber müssen zusätzlich mit in Betracht gezogen werden. Eine Aussage zu

Langzeiteffektivität und -sicherheit solch hoher Dosen kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht getroffen werden. In allen Empfehlungen zur Therapie sind neben den oralen NSAID-Präparaten auch topisch angewendete NSAIDs enthalten. Diese sollen möglichst frühzeitig in die Therapie mit einbezogen werden. Sie zeigen zwar schwächere Effekte als systemisch verabreichte NSAIDs, im Vergleich zu diesen allerdings auch deutlich weniger Nebenwirkungen [23]. Eine zusätzliche Anwendung solcher Präparate neben einer oralen Paracetamol- oder NSAID-Therapie kann dazu beitragen, die Menge an oral eingenommenen Präparaten zu reduzieren. Dies ist sehr wichtig, da oral verabreichte NSAIDs, v.a. im Rahmen einer Langzeittherapie, starke kardiovaskuläre und gastrointestinale Nebenwirkungen zeigen [26]. Um die Nebenwirkungen im Gastrointestinaltrakt zu vermeiden, wird ein Einsatz von Protonenpumpeninhibitoren (PPI), z.B. Pantoprazol, zusätzlich zur NSAID-Langzeitgabe, speziell zur Verhinderung von Magen- und Dünndarmgeschwüren, empfohlen. Andere Arzneistoffe zum Schutz der Magenschleimhaut, wie z.B. Misoprostol oder die Gruppe der H₂-Antihistaminika, sind ebenso zur Prävention dieser Nebenwirkungen geeignet. Da sie den PPIs jedoch, in Hinblick auf die Rate verhinderter Geschwüre, statistisch signifikant unterlegen sind, sollten diese nur bei einer Kontraindikation gegen PPIs verordnet werden [26]. Auch wenn die Gruppe der PPIs generell als sicher eingestuft wird und die zunächst befürchtete Senkung der Vitamin B₁₂-Plasmaspiegel bis jetzt noch nicht bestätigt werden konnte, ist das Vorkommen ambulant erworbener Pneumonien statistisch signifikant erhöht im Vergleich zu Placebo [27]. Deshalb ist der unkritische Einsatz dieser Präparate nicht ratsam und die aktuelle OARSI Leitlinie empfiehlt deren Verwendung nur noch bei Patienten mit relevanten Komorbiditäten [23].

Trotz der vielfältigen unerwünschten Arzneimittelwirkungen (UAW) der NSAIDs stehen diese im Vordergrund der Empfehlungen vieler Leitlinien, da es noch keine strukturmodifizierenden Arzneistoffe gibt, die den Knorpelverlust im Verlauf der Erkrankung Osteoarthritis aufhalten bzw. neuen Knorpel aufbauen können. Eine generelle Empfehlung für einen Wirkstoff kann nicht gegeben werden, es scheinen alle ähnlich effektiv und sicher zu sein. Die Entscheidung sollte patientenindividuell erfolgen [14]. Selektive Cyclooxygenase (COX)-2-Inhibitoren, wie Celecoxib und

Etoricoxib, gelten als ähnlich sicher und effektiv, sollten jedoch bei kardiovaskulären Risikopatienten nicht angewendet werden. Diese Gruppe von Arzneistoffen, aus welcher auf Grund kardiovaskulärer UAW einige Vertreter vom Markt genommen wurden, zeigt auch UAW auf den Gastrointestinaltrakt und sollte deshalb bei Hochrisikopatienten in Kombination mit PPIs eingenommen werden [26]. In dieser Kombination scheinen selektive COX-2-Inhibitoren das beste Sicherheitsprofil aller NSAIDs zu besitzen. Ein neuer Inhibitor (Licofelon, Merckle Biotech (Teva Gruppe)), der neben der Prostaglandin- auch die Leukotrien-Synthese hemmt, ist in der Pipeline (Klinische Phase III). Damit erhofft sich der Entwickler des Wirkstoffs geringere GIT-Nebenwirkungsraten, da vor allem die reflektorisch erhöhte Leukotriensynthese, nach Hemmung der PG-Synthese durch COX-2-Hemmer, für die Gastrototoxizität verantwortlich gemacht wird [28]. Ob diese Erwartung dann auch erfüllt werden kann, wird sicherlich erst in der breiten Anwendung (Klinische Phase IV) am Patienten offenbar.

Neben der Klasse der NSAIDs und Paracetamol werden in allen Leitlinien intraartikuläre Injektionen von antientzündlich wirksamen Glucocorticoiden (GC) empfohlen. Diese Anwendung erscheint in Hinblick auf die Veränderungen im Knorpelgewebe im Rahmen des Verlaufes einer Kniegelenksarthrose durchaus sinnvoll (Einleitung A, Kap. 2.1). Das antiinflammatorische Potential dieser Substanzen konnte schon mehrfach nachgewiesen werden, u.a. von Huebner et al. in einem Tierversuch mit 18 weißen neuseeländischen Kaninchen [29]. Hierbei zeigte Dexamethason einen hemmenden Effekt auf die Expression von Interleukin (IL)-1 β und einen Trend zur Senkung der Matrix-Metalloproteinase (MMP)-3-Expression im Synovium. Daraus leiteten die Autoren einen antiinflammatorischen und chondroprotektiven Effekt des Arzneistoffes ab. Die intraartikuläre Anwendung von GC wurde zunächst im Rahmen der Rheumatoiden Arthritis (RA)-Behandlung praktiziert und erst 1958 in die Behandlung von Osteoarthritis aufgenommen [30]. Bellamy et al. konnten in ihrem Review einen signifikanten positiven Effekt auf Schmerzen und Allgemeinempfinden im Vergleich zu Placebo zeigen, jedoch bewerteten sie diese Effekte als schnell eintretend und nur kurz anhaltend (im Bereich von einer bis drei Wochen). Langzeiteffekte, über mehr als ein Jahr hinweg, konnten nicht bestätigt werden [22]. Deshalb werden maximal

vier GC-Injektionen jährlich im Rahmen der Behandlung von Hüftgelenksarthrose empfohlen [31]. Häufigere Anwendungen zeigten keine positiven Wirkungen sondern erhöhten das Risiko für katabole Effekte auf das betroffene Knorpelgewebe. Für die Kniegelenksarthrose kann diese Empfehlung vermutlich übernommen werden. In Bezug auf die Funktionalität der Gelenke zeigte sich keine Beeinflussung. Eine vergleichende Studie mehrerer GCs ermittelte Vorteile von Triamcinolonacetonid gegenüber Betamethason in Hinblick auf die Schmerzreduktion, aber auf Grund des Fehlens weiterer Studien machen die Autoren keine Aussage zur Bevorzugung eines Präparates [30]. GC-Injektionen sind, insgesamt gesehen, zur kurzfristigen Symptomverbesserung sinnvoll, v.a. bei der Behandlung von Patienten, die zuvor nur ungenügend auf eine Therapie mit NSAIDs angesprochen haben.

Eine vom Wirkmechanismus weitere sinnvolle Option zur Therapie der Osteoarthritis sind Antikörper gegen spezielle Zytokine, die den Erkrankungsprozess fördern, z.B. IL-1 β und Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) (Einleitung A, Kap. 2.1). Solche Antikörper werden schon in einer weiteren Erkrankung des rheumatischen Formenkreises, der Rheumatoiden Arthritis (RA), erfolgreich zur Behandlung eingesetzt. Jiang et al. konnten an 472 Patienten zeigen, dass ein Interleukin-1-Rezeptorantagonist (IL-1Ra) das Fortschreiten der Erkrankung RA stoppen kann [32]. Sie berichteten von einer signifikanten Reduktion von Erosionen und von der Verlangsamung der Gelenkspaltverengung, welches beides Marker für die Schwere des Erkrankungsverlaufs sind, durch alle drei eingesetzten Konzentrationen. Daraus könnte man ableiten, dass ein Einsatz dieser Antikörper, im Rahmen von Osteoarthritis, welche auch zum rheumatischen Formenkreis zählt, allerdings eine degenerative Erkrankung und keine vorwiegend entzündliche darstellt, ebenso sinnvoll ist. Erste Tierversuche lieferten dafür auch Hinweise. Fernandes et al. transferierten Gene mit der Information für IL-1Ras via intraartikulärer Plasmidinjektion in die Kniegelenke von Kaninchen mit Osteoarthritis und bewirkten damit einen langanhaltenden reduzierenden Effekt auf Knorpelläsionen [33]. Am Beispiel dieser IL-1Ras zeigten dann Chevalier et al. allerdings die begrenzte Übertragbarkeit von Tierversuchsergebnissen auf den Menschen [34]. Die Forschergruppe setzte Anakinra[®], einen IL-1Ra, in

Konzentrationen von 50 mg bzw. 150 mg im Vergleich zu Placebo im Rahmen der Therapie von Kniegelenks-OA, auch als Gonarthrose bezeichnet, ein. Die Studie umfasste insgesamt 170 Patienten. Es wurden keine signifikanten Verbesserungen der WOMAC-Scores (Einleitung A, Kap. 1.2) durch die Anakinra[®]-Therapie offenbar. Als einzig positives Fazit konnten die Forscher festhalten, dass der Antikörper gut toleriert wurde. Auf Grund solch negativer Studienergebnisse hat die Therapie mit Antikörpern noch nicht Einzug in die gängigen Leitlinien gefunden. Im Bereich der TNF- α -Antikörper konnten kleine Erfolge erzielt werden [35]. Fioravanti et al. testeten Infliximab an zehn Personen mit einer speziellen Form von Osteoarthritis, der erosiven Hand-OA, gegen Placebo über 12 Monate. Die Patienten bekamen einmal monatlich Infliximab in das betroffene Handgelenk und zum Vergleich eine salinische Lösung als Placebo in das andere Handgelenk injiziert. Nach sechs Monaten war bereits eine Tendenz zur Besserung der spontanen Schmerzsymptomatik erkennbar, nach 12 Monaten war diese Verbesserung statistisch signifikant. Generell wurde der Antikörper gut vertragen und es konnte zusätzlich eine nicht signifikante Verbesserung der Läsionen gezeigt werden. Die Aussagekraft dieser Studie ist jedoch, auf Grund der geringen Patientenzahl und der kurzen Anwendungsdauer, begrenzt. Ein weiteres Zielmolekül klinischer Studien ist der nervale Wachstumsfaktor (Nerve growth factor, NGF), der das Wachstum sensorischer Neuronen reguliert und somit u.a. das Schmerzempfinden steigert. Lane et al. untersuchten die Effekte von Tanezumab, einem monoklonalen Antikörper gegen diesen Wachstumsfaktor, an 450 Patienten mit moderater bis schwerer Gonarthrose gegen Placebo [36]. Die Verumgruppen erhielten verschiedene Konzentrationen des Antikörpers über zwei Injektionen im Abstand von acht Wochen. Es konnte eine signifikante Verbesserung der Knieschmerzen, Gelenksteifigkeit und Funktionalität der Gelenke, ermittelt durch den WOMAC-Score (Einleitung A, Kap. 1.2), gezeigt werden, welche auch acht Wochen nach der letzten Gabe noch anhielt. In dieser Studie schien der Antikörper gut verträglich zu sein und es zeigten sich lediglich Kopfschmerzen, Parästhesien und obere Atemwegsinfektionen als UAW. Allerdings wurde der Einsatz von Tanezumab später mit der Entstehung von Osteonekrosen in Verbindung gebracht und daher das Produkt zwischenzeitlich

vom Markt genommen. Inzwischen ist der Antikörper, zumindest für die klinische Forschung, wieder freigegeben und es kann getestet werden, ob er die gezeigten Verbesserungen dauerhaft und ohne schwere UAW zeigen kann.

Insgesamt betrachtet ist der Stellenwert der Therapie von Osteoarthritis mit Antikörpern, im Vergleich zur Therapie der Rheumatoiden Arthritis, aber gering. Die Strategie, mit Antikörpern gegen MMPs ins Krankheitsgeschehen einzugreifen, was auf Grund der Pathogenese sinnvoll wäre (Einleitung A, Kap. 2.1), war zunächst ebenso wenig erfolgreich in klinischen Studien wie die meisten anderen Antikörper-Therapieversuche [16]. Nebenwirkungen am Bewegungsapparat, zusammengefasst als muskuloskeletales Syndrom bezeichnet, führten zum Scheitern der Modellsustanzen [37, 38]. Untersuchungen mit multiplen MMP-Inhibitoren sollen weitere Aufschlüsse darüber geben, ob dieser Wirkansatz erfolgversprechend sein kann. Gleichzeitig läuft die Forschung an hochselektiven MMP13-Inhibitoren, die in Tierversuchen durchaus gute Ergebnisse lieferten [39]. Ein komplettes Ausschalten einzelner Proteine scheint aber auf Grund deren Aufgaben im gesunden Knorpelgewebe und in der normalen Entwicklung nicht sinnvoll zu sein [40] (Einleitung A, Kap. 2.1). Die beschriebenen UAW der Breitspektrum-Inhibitoren waren durch die vollständige Ausschaltung der Enzyme erklärbar, auch wenn das exakte Protein, dessen Ausschalten diese UAW bedingt hat, nicht bekannt ist [41]. Die Nebenwirkung war dosis- und zeitabhängig in Hinblick auf die Einnahme des MMP-Inhibitors und auch reversibel nach dem Absetzen [37]. Auf Grund dessen fand kein Präparat der 2. Generation an Inhibitoren klinische Anwendung. Die erste Generation scheiterte zuvor an einer mangelnden oralen Bioverfügbarkeit [42]. Es bleibt insgesamt festzuhalten, dass bis heute kein MMP-Inhibitor eine Zulassung für OA besitzt.

Die Bewertung der Wirksamkeit und des Nutzens einer weiteren Gruppe von Substanzen, den sogenannten „Symptomatic Slow Acting Drugs for Osteoarthritis“ (SYSADOAS), fällt sehr unterschiedlich aus. Die Hyaluronsäure (hyaluronic acid, HA), ein natürlicher Bestandteil der Synovialflüssigkeit (SF), deren Konzentration im Rahmen von OA in der Synovialflüssigkeit erniedrigt ist, gehört zu dieser Gruppe. Die HA wird intraartikulär ins betroffene Gelenk injiziert und soll dort die Viskosität der Synovialflüssigkeit positiv beeinflussen, sodass ein idealer

„Schmiereffekt“ zu Stande kommt [14]. Bellamy et al. konnten zwar in einem Review eine signifikante Verbesserung der Schmerzsymptome und der Funktionalität der Gelenke bei unveränderter Gelenksteifigkeit beobachten, jedoch resultierten die Publikationen auch in einem asymmetrischen „funnel-plot“, welcher ein Hinweis für einen Publikationsbias ist [43]. Nach Elimination der von Sponsoren gesteuerten und dem ausschließlichen Einschluss hochqualitativer Studien, war die Schmerzreduktion nicht mehr signifikant verschieden im Vergleich zu Placebo. Im Vergleich zu intraartikulär verabreichten GC, zeigte sich ein später eintretender Effekt mit längerer Wirkdauer bis zu 12 Wochen. Die Verträglichkeit der Therapie ist zwar gut, aber nicht zuletzt aufgrund des hohen Preises raten die meisten Fachgesellschaften von der Anwendung von HA im Rahmen der Osteoarthritis-Therapie ab [15, 24]. Weitere Substanzen, die in diese Gruppe von Therapeutika fallen, sind das Glucosamin, als Sulfat oder Hydrochlorid vorliegend, und das Chondroitinsulfat. Die Datenlage ist sehr widersprüchlich, was dazu führt, dass keine Einnahmempfehlungen ausgesprochen werden [14, 15, 22] bzw. sogar durch die Fachgesellschaften von einer Einnahme abgeraten wird [24]. Zum Beispiel zeigten Fransen et al. eine signifikant geringere Gelenkspaltverengung nach Einnahme von 1500 mg Glucosaminsulfat und 800 mg Chondroitinsulfat pro Tag in Kombination über zwei Jahre im Vergleich zu Placebo [44]. An der Studie nahmen 605 Personen mit Knie-OA teil. Eine signifikante Schmerzreduktion konnte dabei nicht festgestellt werden und die Einzelsubstanzen waren ineffektiv. Martel-Pelletier et al. erfassten bei 600 Patienten mit Gonarthrose einen signifikant geringeren Knorpelverlust nach Einnahme der Kombination von Glucosamin und Chondroitinsulfat über 24 Monate im Vergleich zu keiner Einnahme [45]. Im Gegensatz zu diesen positiven Ergebnissen konnten Sawitzke et al. innerhalb der Auswertung der Zwei-Jahres-Ergebnisse der Glucosamin/Chondroitin Arthritis Interventionsstudie (GAIT) keine signifikanten Verbesserungen der WOMAC-Schmerzscores nach Einnahme der Einzelsubstanzen bzw. der Kombination durch 662 Patienten feststellen [46]. Ebenso konnten Kent-Kwoh et al. keine Verbesserung des WOMAC-Schmerzwertes (201 Studienteilnehmer) nach 24-wöchiger Einnahme von 1500 mg Glucosamin pro Tag beobachten [47]. Hierbei zeigte sich auch kein

struktureller Nutzen dieser Substanzen, da kein signifikanter Effekt auf Knorpel- und subchondrale Knochenläsionen gemessen werden konnte. Trotz der Studienlage ist der Einsatz dieser beiden Substanzen weit verbreitet [48].

Für die Anwendung von Collagenhydrolysaten gibt es noch keine ausreichende Evidenz [49]. Van Vijven et al. schildern in ihrem Review nicht signifikante Verbesserungen von Schmerzen, Gelenksteifigkeit und -funktionalität. In Hinblick auf die Schmerzreduktion, wird von einem ähnlichen Effekt wie bei Paracetamol berichtet. Allerdings ist dieser bei Paracetamol, im Gegensatz zu Collagenhydrolysaten, durch mehrere hochwertige Studien belegt. Henrotin et al. beschreiben den Effekt von Collagenhydrolysaten als moderat positiv, sehen die Datenlage aber auch als zu dünn an [50]. Im großen Ganzen betrachtet, kann eine abschließende Bewertung zur Gruppe der SYSADOAS, infolge dieser widersprüchlichen Studienergebnisse, nicht getroffen werden. Die Bioverfügbarkeit nach oraler Einnahme der diversen Präparate, die für eine Wirksamkeit essentiell ist, scheint jedoch gegeben [51]. Auch eine Anreicherung im Gelenk wird diskutiert. Weitere Untersuchungen hierzu sind jedoch nötig.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es noch keine medikamentöse Option gibt, die in das ursächliche Geschehen der Osteoarthritis-Pathogenese eingreifen kann. Lediglich symptomatische Therapien sind möglich, auch wenn diese z.T. stark mit UAW behaftet bzw. nicht bewiesenermaßen wirksam sind. Auf Grund dessen sind viele Osteoarthritis-Patienten auf der Suche nach wirksamen und nebenwirkungsarmen Alternativen. Pflanzliche Präparate können hierbei eine wirksame Ausweichlösung darstellen und werden umfangreich erforscht (Einleitung A, Kap. 1.5), da der Markt für solche Präparate, auf Grund der hohen Osteoarthritis-Prävalenz weltweit, sehr lukrativ ist (Einleitung A, Kap. 1.1). Ziel aller Ansätze ist es, die Schmerzen des Patienten möglichst stark zu reduzieren und die Funktionalität des Gelenkes zu verbessern. Insgesamt wird eine Steigerung der Lebensqualität angestrebt und das nicht auf Kosten von Toxizitäten in Folge der Arzneimitteltherapie [25].

Auf die operativen Maßnahmen im Rahmen der Gonarthrosebehandlung soll hier nicht umfassend eingegangen werden. Generell gilt der Einsatz einer Endoprothese als Mittel der letzten Wahl bei schweren Formen der Erkrankung,

aber auch weniger radikale Eingriffe sind gängige Praxis. Im Laufe der klinischen Studie, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, fand die Methodik des Kniegelenkersatzes Anwendung (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.1). Hierbei wurde das betroffene Gelenk der Patienten durch ein künstliches Gelenk ausgetauscht. Dieses Verfahren gehört inzwischen weltweit zu den Routineeingriffen in orthopädischen Kliniken.

1.4 Herkunft, Zusammensetzung und Pharmakokinetik von Pycnogenol[®]

Pycnogenol[®] ist der Handelsname eines pflanzlichen Nahrungsergänzungsmittels, welches einen Pflanzenextrakt enthält, der durch ein patentiertes Verfahren der Firma Horphag Research (Genf, Schweiz) aus der Rinde der Strandkiefer *Pinus pinaster* (Piniengewächs; Pinaceae) gewonnen wird. Diese Baumart wird lediglich in der Gascogne im Südwesten Frankreichs kultiviert [52]. Im amerikanischen Arzneibuch USP 37 findet sich eine Monographie zu diesem Extrakt im Abschnitt „Dietary Supplements“ unter „Maritime Pine Extract“. Danach muss der Extrakt auf getrockneter Basis einen Gehalt von 65–75 % an Procyanidinen aufweisen, um nach den Arzneibuchkriterien akzeptiert zu werden [53]. Pirasteh identifizierte mittels ¹H-NMR-Spektroskopie bereits 1988 die wichtigsten Inhaltsstoffe des Rindenextraktes [54]. Chen et al. bestätigten später mit ihrer durchgeführten Fingerabdruckanalyse des Extraktes mit Hilfe der USP-HPLC-Methode u.a. die Inhaltsstoffe Kaffeesäure, Ferulasäure, (+)-Catechin (Abbildung 2) und Taxifolin, neben weiteren Stoffen [55]. Außer den ursprünglich im Extrakt vorhandenen Stoffen wurden auch Metabolite gefunden, die bioaktiv sind. Düweler et al. entdeckten δ -(3,4-Dihydroxyphenyl)- γ -valerolacton (Abbildung 2), auch als Metabolit M1 bezeichnet, und den Metaboliten M2, δ -(3-Methoxy-4-hydroxyphenyl)- γ -valerolacton, nachweisbar im menschlichen Urin nach Einnahme des Rindenextraktes [56].

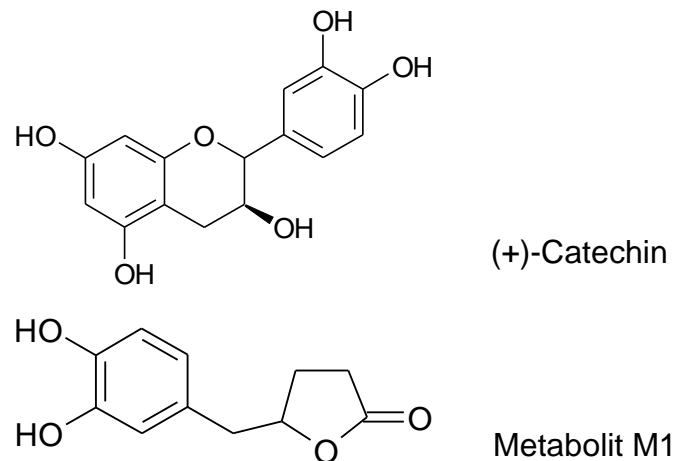


Abbildung 2: Strukturformeln des Pycnogenol®-Inhaltsstoffes (+)-Catechin und dessen Metaboliten M1.

Beides sind Metabolite von (+)-Catechin, die *in-vivo* durch Bakterienaktivität im Darm entstehen. Der Metabolit M1 wurde ebenso von Li et al. in Urin und Plasma von Menschen, nach Einnahme von grünem Tee, identifiziert [57]. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Pharmakokinetik des standardisierten Kiefernrintenextraktes schon umfassend untersucht. Dabei entdeckten Grimm et al. neben (+)-Catechin, Kaffeesäure, Ferulasäure, Taxifolin und dem M1 noch zehn weitere, bis dahin unbekannte Stoffe, im Serum von Probanden nach einmaliger (300 mg, n= 11) bzw. mehrfacher Einnahme (200 mg tgl. über fünf Tage, n= 5) von Pycnogenol® [58]. Der Metabolit M1 erreichte dabei seinen maximalen Plasmaspiegel 10 h nach Einnahme der Einzeldosis. Die Plasmakonzentration war hierbei vergleichbar mit der im Steady State nach Mehrfachgabe ($c_{\text{einfach}} = 3,59 \text{ ng/mL}$ vs. $c_{\text{mehrfach}} = 3,01 \text{ ng/mL}$). Zur weiteren Aufklärung der Pharmakokinetik des Kiefernrintenextraktes untersuchte unsere Gruppe die Plasmaproteinbindung mehrerer ausgewählter Bestandteile von Pycnogenol® und zweier Metabolite [59]. Dabei ergaben sich die höchsten Bindungen für (+)-Catechin und Taxifolin. Die Metabolite M1 und M2 wurden quantitativ am geringsten an die Plasmaproteine gebunden. Weiterhin zeigten Kurlbaum et al., dass sich die Inhaltsstoffe des Extraktes in die Erythrozyten verteilen [60]. Eine erleichterte Aufnahme, vermutlich via GLUT-1-Transporter, sorgte dabei für eine Anreicherung z.B. des M1 in den roten Blutzellen. Inzwischen gelang es unserer Gruppe auch, mittels einer hochsensitiven Methode, geringste

Mengen der Bestandteile des Extraktes in humanen Blutzellen nachzuweisen [61]. Eine Probenvorbereitung via QuEChERS-Technik und eine darauf folgende Analytik mit LC-MS/MS bilden die Grundpfeiler dieses Verfahrens. Dies soll in Zukunft dazu beitragen, die Verteilung und den Metabolismus der Inhaltsstoffe von Pycnogenol[®] bzw. von Polyphenolen generell im Körper besser zu verstehen. Diese Methode fand auch Anwendung, um die Konzentrationen an Inhaltsstoffen in den Blutzellen der Probanden der Osteoarthritis-Studie zu bestimmen (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.1, [62]). Eine Aufnahme und die Verteilung der einzelnen Bestandteile im Körper sind notwendig, damit diese die vielfältigen positiven Effekte bewirken können. Der Metabolit M1 wird im Körper weiter verstoffwechselt. In einem metabolomischen Ansatz entdeckten Múlek et al. v.a. Glutathion (GSH)-Konjugate in Blutzellen [63]. Zusätzlich, zu dem bereits von Kurlbaum et al. entdecken M1-GSH-Addukt, entdeckten die Forscher ein M1-S-GSH- und ein M1-N-GSH-Addukt [60]. Ergänzend wurden eine ringoffene und eine methylierte Form des Metaboliten M1 gefunden, was insgesamt auf einen extensiven Metabolismus dessen in Zellen schließen lässt. Die Bioaktivität dieser Metabolite muss noch bestimmt werden.

1.5 Klinische Effekte von Pycnogenol[®] und vergleichbarer Produkte bei Osteoarthritis

Wenn man die aktuellen Optionen der Osteoarthritis-Therapie betrachtet, dann wird schnell ersichtlich, dass es keine ideale Behandlung gibt, die strukturmodifizierend in den Erkrankungsprozess eingreifen und somit den Verlauf der Erkrankung stoppen bzw. die Schäden heilen kann (Einleitung A, Kap. 1.3). Da selbst die symptomatische Behandlung auf Grund von Ineffektivität und/oder UAW meist nicht zufriedenstellend ist, wird der Suche nach Alternativen und Therapiezusätzen viel Aufmerksamkeit geschenkt [64]. Dabei treten pflanzliche Präparate bzw. Nahrungsergänzungsmittel immer mehr in den Fokus der Wissenschaft, aber auch der breiten Öffentlichkeit. Etwa 47 % der Erwachsenen nutzen Nahrungsergänzungsmittel bereits als Zusatz zur Therapie von OA [48]. Im Zentrum der Pathogenese von Osteoarthritis steht der Knorpelabbau und in den meisten Fällen ein damit einhergehender Entzündungsprozess (Einleitung A,

Kap. 2.1). Dieser Entzündungsprozess wird durch reaktive Sauerstoffspezies (reactive oxygen species, ROS) gefördert. Die Gruppe der Polyphenole gilt als antioxidativ und antiinflammatorisch wirksame Substanzklasse, deren Effekte bei diversen Erkrankungen Bestandteil zahlreicher Forschungsberichte sind [65]. Auch im Rahmen der Osteoarthritis-therapie werden die Wirkungen von Polyphenolen aus verschiedenen Quellen ausgiebig erforscht, hauptsächlich *in-vitro*, aber auch *in-vivo*.

Gegenstand vieler Untersuchungen ist bzw. war die Polyphenolfraction aus grünem Tee und deren antioxidative und antiinflammatorischen Wirkungen [66-69]. Haqqi et al. testeten deren Effekte auf die Collagen-induzierte Osteoarthritis in Mäusen, indem sie das Stoffgemisch dem Trinkwasser der Nager zusetzten [68]. Beim Vergleich mit der Kontrollgruppe, die die Polyphenole nicht im Trinkwasser hatte, zeigte sich eine signifikante Reduktion der Inzidenz von Arthritis von 84-100 % auf 33-50 %. Ebenso zeigte sich beim Western-Blot eine deutliche Reduktion der Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2), von Interferon- γ und TNF- α im Knorpelgewebe der mit Verum getränkten Mäuse. Dies könnte, laut Autoren, ein Hinweis auf einen präventiven Effekt von grünem Tee auf OA sein, welcher sich in weiteren Ergebnissen dieser Forschergruppe bestätigte [69, 70]. Dabei wurden die Effekte des Hauptbestandteils der Polyphenolfraction des grünen Tees, dem Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), in Konzentrationen von 10–100 $\mu\text{mol/L}$ auf die Genexpression von humanen Chondrozyten nach Stimulation mit 5 ng/mL IL-1 β untersucht [69]. Es zeigte sich eine Reduktion der NO-Produktion und der Expression von IL-6, IL-8 und TNF- α , vermutlich durch Hemmung der Aktivierung der NF- κB (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells)- und der JNK (c-Jun N-terminale Kinasen)-Signalwege. Daraus lässt sich schließen, dass EGCG einen protektiven Effekt im Rahmen der Osteoarthritis-Pathogenese haben könnte, da IL-1 β als zentrales Zytokin im Entzündungsgeschehen betrachtet wird (Einleitung A, Kap. 2.1). Oliviero et al. untersuchten die Effekte von EGCG *in-vitro* an zwei verschiedenen Zelllinien [71]. Die Forschergruppe verwendete Calciumpyrophosphatkristalle als Entzündungsstimulus, da diese in erhöhter Konzentration in der Synovialflüssigkeit von OA-Patienten vorliegen und als Auslöser einer Synovitis diskutiert werden. In ihren

Versuchen konnten sie, nach Behandlung mit EGCG, eine Reduktion der Ausschüttung von IL-8 und Chemokinligand 2 (CCL2) aus fibroblastenähnlichen Synoviozyten (FLS) und ebenso eine reduzierte Expression von IL-1 β und TGF- β in THP-1-Zellen beweisen. Beide Beobachtungen deuten auf eine anti-inflammatorische Wirkung des EGCG hin. Eine ähnliche Untersuchung führten Peng et al. mit dem Kiefernriindenextrakt Pycnogenol[®] durch, nur dass diese Gruppe als Entzündungsstimulus keine Calciumpyrophosphatkristalle, sondern Natriumuratkristalle (MSU-Kristalle) verwendete, die das entzündliche Geschehen im Rahmen einer Gichtarthritis auslösen [72]. Eine Inkubation mit 100 μ g/mL Pycnogenol[®] zeigte hier eine signifikante Reduktion der MSU-kristallvermittelten COX-2-, IL-8- und iNOS-Expression in primären humanen Chondrozyten und eine verminderte Synthese von COX-2 und IL-8 in synovialen Fibroblasten. Ein positiver Effekt des Kiefernriindenextraktes auf diese spezielle Art der Arthritis scheint deshalb möglich, auch wenn die eingesetzten Konzentrationen deutlich über den physiologisch erreichbaren Plasmaspiegeln lagen und andere kritische Punkte zu beachten sind (Einleitung A, Kap. 3).

Standardisierte Extrakte aus der Teufelskralle (*Harpagophytum procumbens*) werden schon lange zur Behandlung rheumatischer Erkrankungen angewendet. Auch bei Osteoarthritis scheint eine Wirkung vorhanden zu sein. Als Leitsubstanz des Extraktes dient Harpagosid, ein Iridoidglykosid. Chantre et al. zeigten die Nicht-Unterlegenheit von 435 mg des Extraktes sechs Mal täglich, im Vergleich zu 100 mg Diacerhein, einem Anthrachinonderivat, pro Tag, bei Einnahme über vier Monate [73]. Es zeigten sich bei den 122 Patienten keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf spontane Schmerzen oder den Verlauf der OA, bewertet durch den Lequesne-Index. Zudem war das Teufelskrallenpräparat signifikant besser verträglich als der IL-1-Inhibitor Diacerhein und die Patienten benötigten signifikant weniger Notfallanalgetika unter Einnahme des Extraktes. Auf Grund weiterer positiver Studien bewerteten Chrubasik et al. in ihrem Review die Evidenz für eine Effektivität des Extraktes ab einer Einnahme von mehr als 50 mg Harpagosid pro Tag als stark [74]. Besonders hoben die Autoren die gute Verträglichkeit im Vergleich zu NSAIDs hervor, bei nicht unterlegener Wirksamkeit. Um dem Wirkmechanismus näher zu kommen, untersuchten Fiebich et al. die

Effekte des Extraktes auf primäre humane Chondrozyten nach LPS-Stimulation [75]. Sie zeigten einen hemmenden Effekt auf die Freisetzung von TNF- α , IL-1 β , IL-6 und PGE₂. Desweiteren konnte eine Expressionssenkung von COX-2, IL-6 und TNF- α gezeigt werden. Long et al. bewerteten die Evidenz für einen symptomlindernden Effekt durch Einnahme von Teufelskrallenextrakt als vielversprechend, v.a. bei milden bis moderaten Formen von OA [76]. Akhtar und Haqqi sprechen ebenso von einem denkbaren schmerzreduzierenden Effekt [48]. Ein standardisierter Extrakt aus der Teufelskrallenwurzel kann also durchaus für Patienten mit Osteoarthritis als Zusatztherapie empfohlen werden, v.a. auch wegen der Senkung des Analgetikagebrauchs.

Ein einzelner Pflanzeninhaltsstoff, der schon vor mehreren Jahrtausenden gegen rheumatische Erkrankungen eingesetzt wurde, ist das aus der Gelbwurz (*Curcuma longa*) stammende Curcumin, das heutzutage v.a. als Gewürz Verwendung findet. Dieses offenbarte in *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen antioxidative, antiinflammatorische, antiseptische und tumorprotektive Wirkungen [77]. In kultivierten Chondrozyten zeigten sich zusätzlich antikatabole Effekte, u.a. durch Hemmung der Bildung von MMP-1, -3, -9 und -13. Allerdings gilt es bei diesen Ergebnissen zu bedenken, dass sehr hohe Konzentrationen eingesetzt wurden, die auf Grund der schlechten Löslichkeit und der damit verbundenen geringen oralen Bioverfügbarkeit *in-vivo* kaum erreicht werden dürften [6]. Zudem ist die Unbedenklichkeit von Curcumin bei diesen hohen Konzentrationen noch nicht belegt worden. Somit stellt Curcumin zwar eine interessante Option dar, jedoch müssen weitere Untersuchungen die positiven Effekte bestätigen und sollten gleichzeitig keine toxischen Wirkungen zu erkennen geben.

Die gesundheitsfördernde Wirkung von Resveratrol, einem Polyphenol, das v.a. in Trauben und Rotwein enthalten ist, wird schon seit langem diskutiert, besonders in Hinblick auf Herz-Kreislauf-Erkrankungen. Im et al. untersuchten dessen Effekte auf eine humane Chondrozytenzelllinie *in-vitro* und auf Knorpelimplantate *ex-vivo* [78]. Dabei ermittelte die Forschergruppe eine Verbesserung der Zellviabilität nach Inkubation mit Resveratrol. Weitere chondroprotektive Effekte konnten durch die Hemmung der IL-1 β -induzierten Bildung der knorpelzerstörenden Enzyme MMP-13, ADAMTS-4 und -5 über Inhibition des NF- κ B- und des MAPK (mitogen-

activated protein-Kinase)-Signalwegs beobachtet werden. Mobasheri bestätigte diese antiinflammatorischen Effekte in einem Review [6]. Jedoch liegen für Resveratrol noch keine randomisiert-kontrollierten klinischen Studien vor, die den positiven Effekt bei OA untermauern. Nach Untersuchungen der Forschungsgruppe des Review-Autors wären auch synergistische Effekte durch Kombination von Curcumin mit Resveratrol denkbar.

Jensen et al. testeten die Wirkungen eines polyphenolreichen Fruchtkonzentrates, durch tägliche Einnahme über 12 Wochen, an 14 Teilnehmern in Hinblick auf Schmerzen, Gelenkbeweglichkeit und Alltagsbewältigung [79]. Es zeigte sich eine signifikante Verbesserung aller Endpunkte, inklusive Steigerung des antioxidativen Status im Blut, im Vergleich zum Ausgangswert. Lediglich der CRP-Wert nahm nur tendenziell, und nicht signifikant, ab. Die Studie war nicht placebokontrolliert und deshalb schwierig auf andere Patientengruppen übertragbar.

Eine tägliche Einnahme von Vitamin D, welches als Nahrungsergänzungsmittel vertrieben wird, findet schon seit einiger Zeit in der Osteoporoseprophylaxe bzw. -behandlung Anwendung. Auf Grund des stärkenden Effektes auf die Knochenstruktur, liegt die Vermutung nahe, dass ein Einsatz im Rahmen der Osteoarthritis-therapie ebenso sinnvoll sein könnte, da auch hier, v.a. im späteren Verlauf der Erkrankung, subchondrale Knochenbereiche betroffen sein können (Einleitung A, Kap. 2.1). Eine klare Evidenz für die Effektivität von Vitamin D fehlt jedoch. McAlindon et al. konnten in einer Studie mit 146 Gonarthrosepatienten, die zwei Jahre lang 2000 Internationale Einheiten (I.E.) Vitamin D oder Placebo pro Tag einnahmen, keine positiven Auswirkungen auf den WOMAC-Schmerzwert und den Knorpelverlust feststellen [80]. Bei beiden Parametern zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Verum- und Placebogruppe. Ein Einsatz von Vitamin D bei Osteoarthritis kann also nach derzeitigem Stand der Wissenschaft nicht empfohlen werden.

Als vielversprechende Präparate werden Avocado-Sojabohnen-Extrakte bezeichnet. Long et al. sprechen in ihrem Review von guter Evidenz, dass die Extrakte mildernd auf OA-Symptome wirken könnten [76]. Ebenso ist von einer Reduktion des Analgetikagebrauchs die Rede.

Ein natürliches, mineralstoffreiches Nahrungsergänzungsmittel aus Seetang (Aquamin[®]) wurde durch Frestedt et al. an 70 Patienten mit moderater bis schwerer Gonarthrose über 12 Wochen getestet [81]. Es wurde eine tägliche Dosis von 2400 mg Aquamin[®] mit 1500 mg Glucosaminsulfat täglich bzw. der Kombination aus beidem und Placebo verglichen und die Effekte auf WOMAC-Schmerzwerte und 6-Minuten-Gehstrecke bestimmt. Die Einzelsubstanzen zeigten eine signifikante Verbesserung des Schmerzscores, aber überraschenderweise nicht die Kombination aus beiden. Eine Verbesserung der 6-Minuten-Gehstrecke wurde nicht ersichtlich. Der leicht positive Effekt von Aquamin[®] kann nicht über das antioxidative Potential erklärt werden, da O'Callaghan et al. keine antioxidative Wirkung des Seetangpräparates feststellen konnten [82]. In den Untersuchungen der Forschergruppe zeigte Enzogenol[®], ein Rindenextrakt aus der neuseeländischen Kiefer *Pinus radiata*, ein mildes antioxidatives Potential und Sunphenon[®], ein Extrakt aus grünem Tee, einen starken antioxidativen Effekt. Enzogenol[®] könnte dem in dieser Arbeit untersuchten Kiefernridenextrakt Pycnogenol[®] in der Zusammensetzung, und damit vermutlich auch in den Eigenschaften, recht ähnlich sein. Eine Ableitung des antioxidativen Potentials daraus ist dennoch recht schwierig, da die Bestimmung dessen sehr unterschiedlich durchgeführt werden kann und die Verfahren sehr variable Ergebnisse liefern [82].

Die Wirkungen des pflanzlichen Nahrungsergänzungsmittels Pycnogenol[®] auf Symptome und den Analgetikagebrauch im Rahmen der Erkrankung Osteoarthritis beim Menschen wurden, neben *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuchen, bereits in drei klinischen Studien untersucht [83-85]. Hierbei waren jeweils nur leichte bis moderate Verlaufsformen der Erkrankung (Grad I-II nach Kellgren und Lawrence) eingeschlossen, die mittels Röntgenuntersuchung ermittelt wurden [86].

Farid et al. untersuchten die Effekte des standardisierten Kiefernridenextraktes in einer randomisierten, doppelt-verblindeten, placebokontrollierten Interventionsstudie im Parallelgruppendesign an 37 Probanden. 19 davon erhielten das Verum Pycnogenol[®] in einer Tagesdosis von 150 mg, aufgeteilt auf drei Einzeldosen zu je 50 mg morgens, mittags und abends über drei Monate. 18 Kontrollpatienten erhielten ein identisch aussehendes Placebo drei Mal täglich über den

Studienzeitraum [83]. Studienendpunkte waren der Verbrauch an nicht-steroidalen, antiinflammatorisch wirksamen Substanzen (NSAIDs) und die Entwicklung des WOMAC-Osteoarthritis Index (Einleitung A, Kap. 1.2), der monatlich evaluiert wurde. Im Kontext der Studie konnte eine signifikante Senkung des zusammengesetzten WOMAC-Scores durch Pycnogenol[®]-Einnahme nachgewiesen werden. Diese Reduktion beruhte vor allem auf der Verbesserung der Gelenkfunktionalität, da bei der Gelenksteifigkeit keine signifikante Verbesserung erreicht werden konnte. Ein analgetikaeinsparender Effekt unter Einnahme des standardisierten Kiefernrintenextraktes wurde im Vergleich zur Placebokontrollgruppe, die vermehrt Gebrauch von NSAIDs und selektiven Cyclooxygenase-2 (COX-2)-Inhibitoren machte, offenbar [83]. Ebenso reduzierte sich durch Pycnogenol[®] die Anzahl der Tage, an denen ein Analgetikum eingenommen wurde.

Die randomisierte, placebo-kontrollierte und doppelt-verblindete Interventionsstudie von Cisár et al. umfasste 100 Patienten, die entweder drei Mal täglich je 50 mg Pycnogenol[®] zu den Mahlzeiten (50 Probanden) oder analog Placebo (50 Probanden), für drei Monate, einnahmen [84]. Es konnte eine statistisch signifikante Senkung ($p < 0,05$) des WOMAC-Schmerz-Index in der Pycnogenol[®]-Gruppe im Vergleich zur Ausgangslage nach 8, 12 und 14 Wochen gezeigt werden. Der Unterschied zur Placebogruppe war nur nach 8 Wochen marginal signifikant ($p = 0,08$). Die Gelenksteifigkeit verbesserte sich, bezogen auf die Ausgangslage, statistisch signifikant nach 8, 12 und 14 Wochen. Im Vergleich zur Placebo-Gruppe war die Differenz nach 8 und 12 Wochen statistisch signifikant. Die physische Gelenkfunktion besserte sich signifikant nach 8, 12 und 14 Wochen, in Relation zum Ausgangspunkt, unter Pycnogenol[®]-Einnahme. Der Unterschied zu Placebo war nie signifikant. Der zusammengesetzte WOMAC-Index zeigte nach 6, 8 und 12 Wochen signifikante Verbesserungen unter Pycnogenol[®]-Einnahme in Bezug zu Placebo. Die Differenz zur Ausgangspunktzahl war nur nach 8 Wochen statistisch signifikant. Die Beurteilung der Schmerzen via visueller Analogskala zeigte ab 8 Wochen einen signifikanten Unterschied zur Ausgangslage unter Pycnogenol[®]. Der Unterschied zu Placebo war zu keinem Zeitpunkt signifikant. 38 % der Patienten der Pycnogenol[®]-Gruppe konnten ihren

Analgetika-Verbrauch während des Studienverlaufs reduzieren, in der Placebo-Gruppe gelang dies nur 8 % der Teilnehmer. Zusätzlich mussten 10 % der Gruppe die Dosis erhöhen. Die Autoren machten den, im Vergleich zum standardisierten Kiefernriindenextrakt, ausbleibenden Effekt unter Placebo für den stärkeren Analgetikakonsum mitverantwortlich. Generell sehen sie gute Hinweise für ein antiinflammatorisches Wirkprofil von Pycnogenol® bei milden Gonarthroseformen. Belcaro et al. schlossen 156 Patienten in ihre doppel-blindete, placebo-kontrollierte Interventionsstudie mit ein [85]. 77 Personen erhielten je 50 mg Pycnogenol® nach dem Frühstück und nach dem Abendessen über einen Zeitraum von drei Monaten. Die anderen 79 Teilnehmer bekamen nach gleichem Einnahmeschema ein identisch aussehendes Placebo. Der WOMAC-Schmerzindex wurde unter Einnahme des standardisierten Kiefernriindenextraktes signifikant von 17,3 auf 7,7 Punkte gesenkt. Ebenso signifikant verbesserte sich die Gelenksteifigkeit von 6,6 auf 3,1 Punkte. Der Funktionalitätswert sank, ebenso signifikant, von 55,3 auf 23,8 Punkte. Insgesamt wurde der WOMAC-Index statistisch signifikant von 79,2 auf 34,6 Zähler reduziert. Die Placebo-Gruppe zeigte hingegen mit einer Veränderung von 76,9 auf 69,5 Punkte keine statistisch signifikante Verbesserung. Weiterhin untersuchten die Forscher die Laufleistung der Patienten auf einem Laufband bis zum Auftreten von Schmerzen. Die Pycnogenol®-Gruppe konnte diese im Verlauf der Studie von anfangs 68 m auf 198 m signifikant steigern. In der Placebo-Gruppe war die Steigerung von 65 m auf 88 m deutlich weniger ausgeprägt als unter Verumgabe. Des Weiteren stellten die Autoren der Studie während des Verlaufes eine Reduktion des Analgetikagebrauchs um 58 % in der Pycnogenol®-Gruppe und um 1 % in der Placebo-Gruppe fest. Dieser Unterschied war statistisch signifikant. Auf Grund der Heterogenität der Daten aus den drei Studien, war im Review von Schoonees et al. in vielen Endpunkten keine zusammenfassende Bewertung möglich [52]. Lediglich der WOMAC-Index zur Bewertung der Gelenksteifigkeit wurde aus den Studien von Cisár et al. und Farid et al. zusammengefasst, wobei sich keine signifikante Verbesserung im Vergleich zu Placebo zeigte. Die anderen Studienendpunkte waren nicht vereinbar und müssen deshalb für sich betrachtet

werden. Henrotin et al. bewerteten den Rindenextrakt in ihrem Review als effektive Zusatzoption bei OA [50].

Alle drei klinischen Studien erfassten die UAW und stellten hierbei, neben schwächeren gastrointestinalen Nebenwirkungen, keine schwerwiegenden Komplikationen unter Therapie mit Pycnogenol[®] fest. Auch Maimoona et al. berichten in ihrem Review über 70 klinische Studien mit Pycnogenol[®] nur von gastrointestinalem Unwohlsein, Müdigkeit, Kopfschmerzen und Übelkeit und sehen daher Langzeitdosen von 20-100 mg am Tag bzw. Kurzzeitdosen von 100–300 mg pro Tag als unbedenklich an [86]. Pycnogenol[®] kann daher als sichere Alternative zur unterstützenden Therapie der Kniegelenksarthrose in Betracht gezogen werden. Mobasheri sieht ein Problem in Hinblick auf Wirksamkeit und Sicherheit pflanzlicher Präparate in der nicht gesicherten Zusammensetzung der meisten Produkte aus Fernost [6]. Da Pycnogenol[®] in seinen Bestandteilen durch das amerikanische Arzneibuch USP gesichert ist, kann man darin einen Vorteil des standardisierten Kiefernridenextraktes gegenüber vieler pflanzlicher Präparate zur Anwendung bei OA erkennen. Dies ist v.a. im Vergleich zu den meisten Produkten aus dem Internet hervorzuheben.

Generell betrachtet ist eine gewisse positive Wirkung pflanzlicher Präparate bzw. von Nahrungsergänzungsmitteln auf die Symptome und die Pathophysiologie der Erkrankung Osteoarthritis erkennbar. Umfassende klinische Studien sind zur Bestätigung dieser Wirkungen weiterhin empfehlenswert und notwendig, um in die Empfehlungen der aktuellen Leitlinien aufgenommen zu werden. Nur dann wäre eventuell auch eine Erstattung dieser Präparate durch die Krankenkassen möglich. Eine Anwendung als Zusatz zur Basistherapie ist aber auch heute schon denkbar, ohne jedoch falsche Hoffnungen beim Patienten zu wecken.

Um die zellulären Mechanismen untersuchen zu können, die die Grundlage für eine Symptomlinderung im Rahmen einer Therapie darstellen, muss man zunächst das Gleichgewicht aus Knorpelaufbau und -abbau im gesunden Gewebe, die sogenannte Knorpelhomöostase, näher betrachten und im Anschluss die Veränderungen im Rahmen der Erkrankung durchleuchten.

2 Zelluläre Vorgänge im Knorpelgewebe bei Osteoarthritis

2.1 Knorpelhomöostase im gesunden Kniegelenk und Veränderungen während Osteoarthritis

Das humane Kniegelenk verbindet den Oberschenkelknochen (*Os femoris*, *Femur*) und das Schienbein (*Tibia*) miteinander (Abbildung 3).

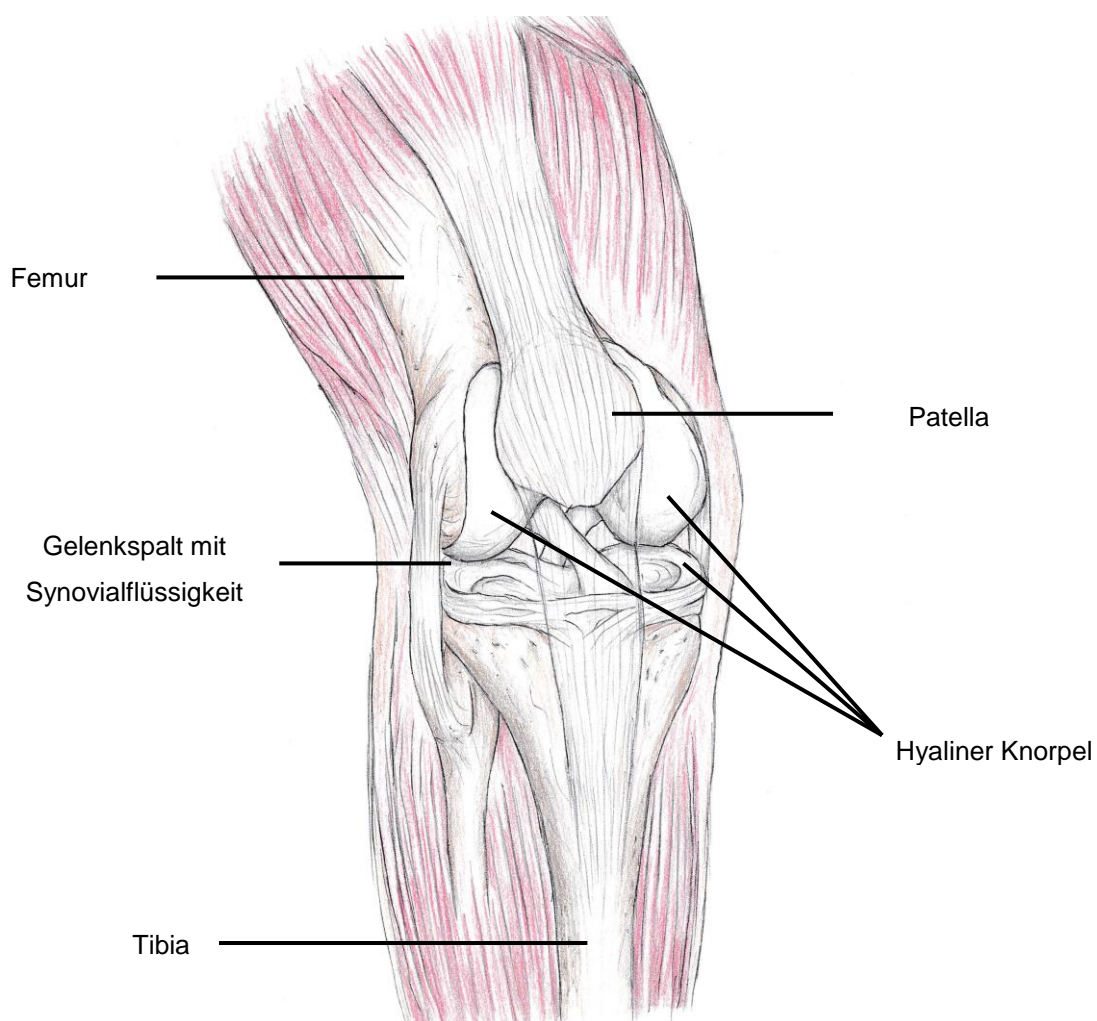


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Aufbaus eines gesunden Kniegelenks, wiedergegeben mit Genehmigung von Herrn Ralf Bertsch. Der Gelenkspalt ist gefüllt mit Synovialflüssigkeit, die umgangssprachlich auch als „Gelenkschmiere“ bezeichnet wird und den Knorpel mit Nährstoffen versorgt. Das Synovium kleidet den Gelenkspalt aus.

Auf diese Knochen aufgelagert, ist im Bereich des Gelenkes, der hyaline Gelenkknorpel als Schutz der Knochenoberfläche. Die Gelenkkapsel ist im Innern mit dem Synovium ausgekleidet. Innerhalb des Gelenkspaltes befindet sich die viskose Synovialflüssigkeit, die das Aufeinandergleiten der Gelenkstücke erleichtern soll.

Der menschliche hyaline Gelenkknorpel ist sehr druckelastisch und befindet sich deshalb hauptsächlich in den Gelenken, auf die viel mechanischer Druck ausgeübt wird, wie z.B. dem Knie- und Hüftgelenk. Seine Aufgabe ist das Abfedern von Druckbelastungen und er ermöglicht dadurch ein hohes Maß an Bewegung.

Das Knorpelgewebe setzt sich zusammen aus einer extrazellulären Matrix (EZM) und dem in diesem Gewebe einzig vorhandenen Zelltyp, den Chondrozyten [9, 16, 87-89]. Die EZM besteht zu großen Teilen aus zwei Komponenten. Zum einen aus einer zugfesten Collagenmatrix aus Typ-II-, Typ-IX- und Typ-XI-Collagen, wobei anteilmäßig das Typ-II-Collagen überwiegt [16]. Zum anderen aus einem Proteoglykangerüst, v.a. aus Aggrecan, das für die Wasserbindung im Gewebe verantwortlich ist [89]. Insgesamt betrachtet ist es ein Netzwerk aus Collagen-Fibrillen durchsetzt von Proteoglykanen [16] (Abbildung 4).

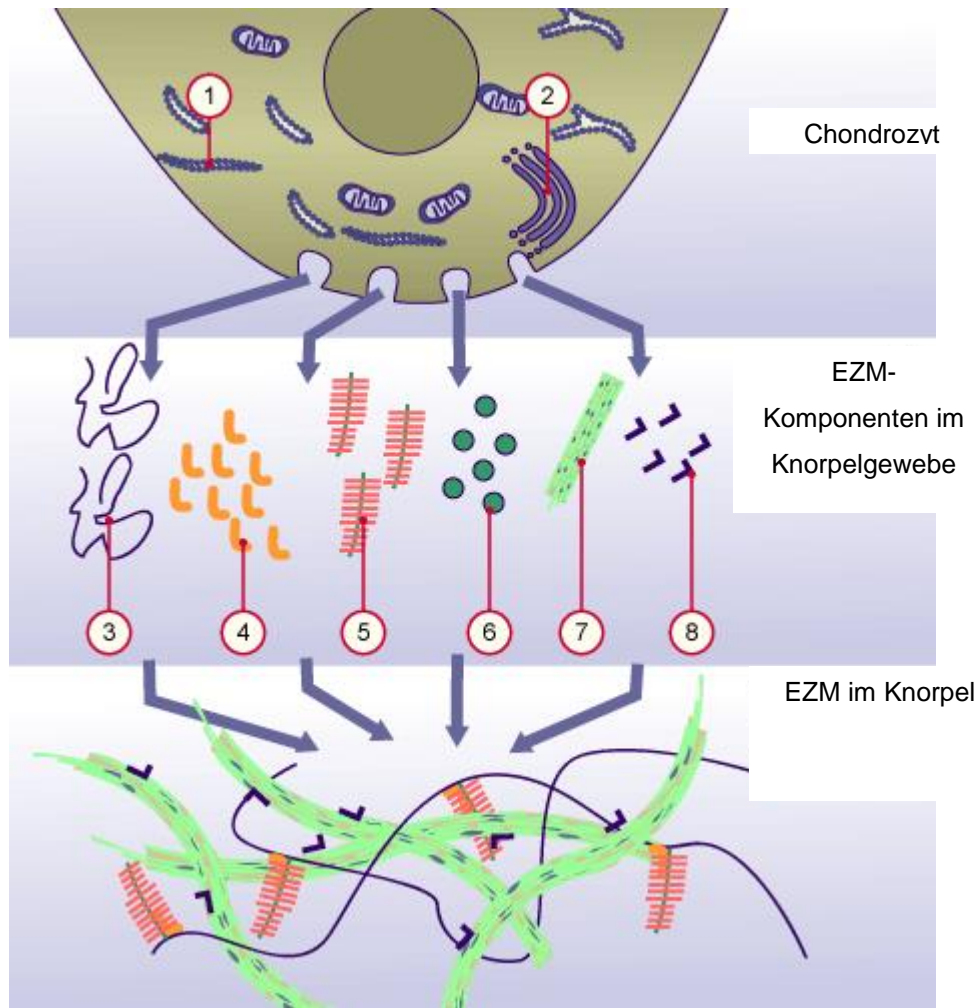


Abbildung 4: Produktion und Aufbau der Extrazellulärmatrix im Knorpelgewebe. Im reifen Chondrozyten (1= raues Endoplasmatisches Retikulum, 2= Golgi-Apparat) werden die einzelnen Matrix-Komponenten (3= Hyaluronsäure, 4= Verbindungsprotein, 5= Aggrecan-Monomer, 7= Typ-II- und Typ-XI-Collagen, 8= Typ-IX-Collagen) und Enzyme (6) produziert und in den extrazellulären Raum freigegeben. Dort lagern sie sich zu einem geordneten System zusammen. Wiedergabe nach Quelle [90] mit Genehmigung der Universität Fribourg, Schweiz (© Departement Medizin-Anatomy, University of Fribourg, Switzerland).

Darin eingebettet sind die Chondrozyten, die etwa 2-3 % des Gesamtvolumens ausmachen [89]. Das Gewebe ist nicht durchblutet, die Nährstoffversorgung wird durch die Synovialflüssigkeit übernommen [88, 91]. Diese strömt bei Bewegung ins Gewebe ein und verlässt dieses wieder während der Relaxation. Die unteren Knorpelschichten werden zusätzlich durch den subchondralen Knochen versorgt [89]. Auf Grund der fehlenden vaskulären Versorgung befinden sich die Zellen meist in einem hypoxischen Zustand [87]. Durch eine geringe metabolische und

mitotische Aktivität ist diese Art von Zellen jedoch gut an die Umgebungsbedingungen angepasst [91]. Die Hauptaufgaben der Chondrozyten sind die Synthese, Aufrechterhaltung und auch der Abbau von Extrazellulärmatrix. Diese Vorgänge werden im hypoxischen Zustand effektiver durch die Zellen ausgeführt [92]. Auf Grund der geringen Aktivität sind die Selbstheilungskräfte des Knorpels jedoch gering, was i. d. R. zur Bildung von nicht funktionsfähigem Gewebe nach Verletzung führt [93]. Essentiell für das Verständnis der Vorgänge im Gelenk ist das Wissen über die Fähigkeit der Chondrozyten, diverse knorpelprotektive und -schädigende Faktoren auszuschütten [9].

Die Verteilung der Zellen ist im Knorpel recht unterschiedlich. In der obersten, der superfizialen Zone, die sich durch dünne Collagenfibrillen und einen geringen Gehalt an Aggrecan auszeichnet, liegen die Chondrozyten einzeln verteilt vor und sind, morphologisch gesehen, klein und flach [16, 87]. In der benachbarten Schicht zum Knochen hin, auch transitionale oder intermediäre Zone genannt, werden die Zellen deutlich rundlicher, treten aber meist noch vereinzelt auf. Die EZM besteht hier aus einem Bündel dicker Collagenfibrillen. In der darauf folgenden radialen Zone liegen die Zellen nun gruppiert in Säulen bzw. Clustern vor [89]. Sie sind eingebettet in ein Netzwerk dickster Collagenbündel. Zusammengefasst werden diese drei Ebenen auch als nicht-mineralisierter Knorpel bezeichnet [92]. Noch darunter, und damit direkt auf dem subchondralen Knochen, befindet sich die calcifizierte Zone, deren Elastizität auf Grund des Calciumgehalts, im Vergleich zu den oberen Schichten, schon deutlich geringer ist. Je näher man dem Knochen kommt, desto mehr nimmt die Zelldichte ab, das Zellvolumen und der Proteoglykananteil zu [16].

Im gesunden Knorpel befinden sich die Zellen in der Ruhephase, es herrscht eine feine Balance zwischen Synthese und Abbau der EZM. Es gibt dabei zahlreiche Faktoren, die die Knorpelhomöostase beeinflussen. Auf der einen Seite sind die knorpelabbauenden Enzyme und proinflammatorischen Zytokine. Auf der anderen Seite befinden sich die Wachstumsfaktoren, die den Knorpelaufbau initiieren. Diese Stimulatoren sind für Entwicklung, Erhalt und Reparatur des Gelenkknorpels verantwortlich. Der Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) ist ein Beispiel für einen solchen Wachstumsfaktor mit Einfluss auf den Knorpel [94]. Er stimuliert die

Matrixsynthese, hemmt die katabolen Mechanismen und reduziert somit Knorpelläsionen [95]. Ebenso wird der Chondrozyten-Phänotyp durch dessen Einfluss erhalten und eine Hypertrophie vermieden, die v.a. während der Erkrankung OA zu erkennen ist. Im Laufe dieser Erkrankung sinkt zusätzlich die Sensitivität der Zellen gegenüber IGF-1 [9]. Die Transforming growth factor (TGF)-Familie ist ebenso wichtig für den Knorpelerhalt [16]. TGF- β_1 erhöht z.B. das Ansprechen des Gewebes auf IGF-1 durch Erhöhung der IGF-Rezeptordichte ohne Einfluss auf die Rezeptoraffinität. Daraus resultiert eine verbesserte Knorpelsynthese. Für TGF- β wird jedoch eine duale Rolle diskutiert [96]. Auf der einen Seite fördert dieser Wachstumsfaktor den Knorpelaufbau und senkt die Matrix-Metalloproteinase-Ausschüttung [97]. Auf der anderen Seite wurde auch eine Stimulierung der MMP-13-Expression und somit ein vermehrter EZM-Abbau durch TGF- β entdeckt [9]. Es scheinen also mehrere Signalwege durch TGF- β stimuliert zu werden, abhängig von dessen Konzentration. Zu der TGF-Wachstumsfaktorfamilie gehören auch die „Bone morphogenetic proteins“ (BMPs). Für das Knorpelgewebe sind v.a. das BMP-2 und das BMP-7 von Bedeutung. Dies sind potente Stimulatoren der EZM-Synthese und erhalten den Chondrozyten-Phänotyp. Es werden auch hier synergistische Effekte mit IGF-1 und auch mit TGF- β_1 angenommen. Eine weitere Wachstumsfaktorenfamilie mit Relevanz ist die Gruppe der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren (Fibroblast growth factors, FGFs) [98]. Hier spielt der FGF-18 mit seinen anabolen Wirkungen die wichtigste Rolle für den Knorpelaufbau [16]. Der FGF-2 wurde zwar als positiver Faktor in Mausmodellen identifiziert, wirkte jedoch fördernd auf den Knorpelabbau im Menschen [99].

Auf der Seite der knorpelabbauenden Enzyme, den Gegenspielern der Wachstumsfaktoren in der Homöostase, stehen die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) im Vordergrund (Genauerer zum Collagen-Stoffwechsel siehe Einleitung A, Kap. 2.2). Die Aktivität dieser zinkabhängigen Proteasen ist im gesunden Knorpelgewebe durch ein Wechselspiel mit ihren natürlichen Inhibitoren (Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, TIMPs) streng reguliert. Es gibt drei Gruppen von Metalloproteinasen: Die Collagenasen mit den Vertretern MMP-1, -8 und -13, die Stromelysine mit MMP-3, -10 und -11 und die Gelatinasen (MMP-2 und -9) [100].

Die Collagenasen spalten Typ-II-Collagen, bevorzugt in der superfizialen Zone. Zusätzlich bauen MMP-3 und MMP-13 noch Aggrecan ab, das wichtigste Proteoglykan im Knorpel. Die Stromelysine spalten hauptsächlich Proteoglykane. Die MMP-3 hat zudem die Fähigkeit, andere MMPs zu aktivieren. Die MMPs haben aber noch weitere, vielfältige Aufgaben im Körper, außerhalb des Knorpels [40]. Einerseits ermöglichen sie Zellwanderungen und damit die Entwicklung von Geweben, wie z.B. Knochen und Nerven. Andererseits tragen sie zur Wundheilung bei, v.a. das MMP-3, indem dieses die Wundkontraktion fördert. Eine Überaktivität von MMP-3 führt dabei jedoch zu chronisch, nicht heilenden Wunden [101]. Pathologisch gesehen werden die MMPs auf Grund der Ermöglichung der Zellwanderung zusätzlich für die Angiogenese bei Tumorerkrankungen verantwortlich gemacht [42].

Neben den MMPs sind die Cathepsine, eine Gruppe von Cystein-Proteasen, am Abbau von Collagen beteiligt. Die größte Bedeutung hat hierbei das Cathepsin K. Die Beteiligung dieses Proteins an der OA-Pathogenese wird noch erläutert (Einleitung A, Kap. 2.2).

Eine weitere Gruppe knorpelabbauender Enzyme sind die „A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs“ (ADAMTS)-Proteine (Genaueres zum Aggrecan-Stoffwechsel unter Einleitung A, Kap. 2.3). Diese degradieren das mengenmäßig am meisten im Knorpel vorkommende Proteoglykan, das Aggrecan. Auch diese Gruppe ist zinkabhängig. Hauptvertreter sind das ADAMTS-4 und das ADAMTS-5, auch als Aggrecanase-1 und -2 bezeichnet [102, 103]. Beide sind, laut Umlauf et al., durch die Zytokine Interleukin (IL)-1 β und Tumor Nekrose Faktor (TNF)- α stimulierbar [16]. Clark et al. berichten hingegen, dass nur ADAMTS-4, aber nicht ADAMTS-5, durch IL-1 β hochreguliert wird [37]. Alle anderen Aggrecanasen dieser Familie sind nur schwach aktiv [104].

Neben den Wachstumsfaktoren und knorpelabbauenden Enzymen spielen Zytokine eine wichtige Rolle im Rahmen der Knorpelhomöostase. Diese werden entweder direkt von den Chondrozyten ausgeschüttet oder gelangen über die Synovialflüssigkeit ins Knorpelgewebe, da Synoviozyten, die in der Gelenkkapsel lokalisiert sind, diese ebenso exprimieren [6]. IL-1 β und TNF- α nehmen Schlüsselrollen bei Entzündungen und Knorpelläsionen ein [105]. Beide

Mediatoren werden als Pro-Formen sekretiert und dann nach Aktivierung durch das IL-1 β Konversions-Enzym bzw. das TNF- α Konversions-Enzym aus der Zelle freigesetzt [98]. Sie fördern u.a. die Expression von MMPs, ADAMTSs, der induzierbaren Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (iNOS) und der Cyclooxygenase (COX)-2. Somit erhöht sich unter deren Einfluss die IL-6-, -8-, NO-, ROS- und Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Produktion [16, 64, 99]. IL-6 kann dann z.B. wiederum die MMP-1- und MMP-13-Expression direkt steigern [97]. PGE₂ gilt als Hauptauslöser des entzündlichen Schmerzes bei rheumatischen Erkrankungen [99]. Die Zytokine IL-1 und TNF- α können zusätzlich über autokrine bzw. parakrine Mechanismen ihre eigene Ausschüttung aus Chondrozyten fördern [106, 107]. Insgesamt gesehen ist eine Unterhaltung des Entzündungsprozesses das Resultat. Die beiden Mediatoren wirken synergistisch, wobei dem IL-1 β die bedeutendere Rolle zugeschrieben wird [98].

Im gesunden Knorpelgewebe sind diese Entzündungsmarker nur in einem geringen Maße exprimiert, es herrscht ein Gleichgewicht zwischen Knorpelaufbau und -abbau (Abbildung 5).

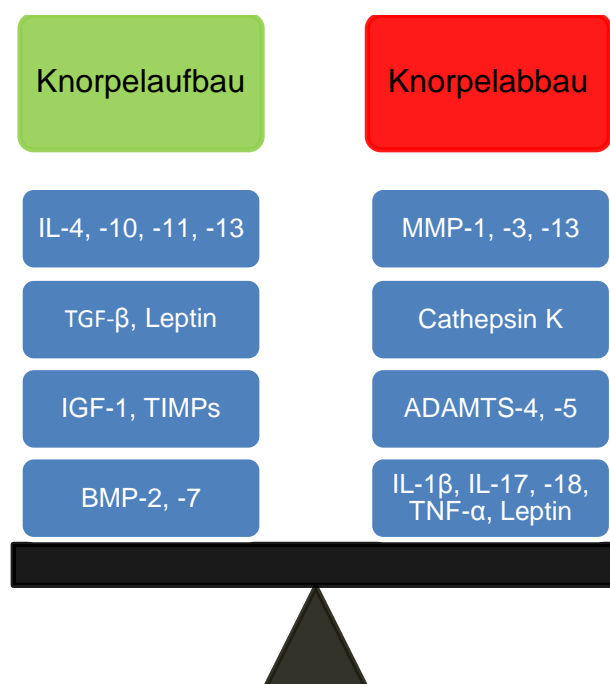


Abbildung 5: Die Knorpelhomöostase im menschlichen hyalinen Gelenkknorpel: Beim Gesunden herrscht ein Gleichgewicht zwischen anabolen (grün) und katabolen (rot) Markern. Die Aufzählung chondroprotektiver sowie chondrodestruktiver Faktoren erhebt, auf Grund der Komplexität der Knorpelhomöostase, keinen Anspruch auf Vollständigkeit.

Der schon erwähnte hypoxische Zustand sorgt zusätzlich für den Erhalt dieses Gleichgewichts durch Limitierung knorpelabbauender Mechanismen [92]. Auch für IL-17 und IL-18 wird eine proinflammatorische Wirkung angenommen [108, 109]. Chen et al. konnten z.B. eine signifikante positive Korrelation zwischen Erkrankungsschweregrad und der IL-17-Konzentration in der Synovialflüssigkeit feststellen [13]. Die Autoren vermuten eine Beteiligung des Zytokins, über IL-1β- und TNF-α-Induktion bzw. über eine Aktivierung von MMPs, an der Knorpelzerstörung. Weiterhin entdeckten Dai et al. einen induzierenden Effekt von IL-18 auf die MMP-Expression von Chondrozyten *in-vitro* [108]. Ob dieser jedoch biologisch relevant ist, ließen die Autoren offen. Goldring sieht beide Interleukine als Induktor von NF-κB mit der Folge einer Expressionssteigerung von IL-1β, IL-6, iNOS und COX-2 [98]. Ergänzend wird eine Rolle von IL-15 bei OA diskutiert, v.a. in der Frühphase der Erkrankung [110].

Es gibt jedoch auch protektiv wirksame Interleukine, die eine inhibitorische Wirkung auf den Knorpelabbau vermitteln. IL-4 senkt z.B. IL-1-Spiegel in der

Synovialflüssigkeit und verhindert die Aktivierung von MMPs aus ihren inaktiven Vorstufen [111]. IL-10 hemmt vorwiegend die TNF- α -stimulierte Freisetzung von MMP-1 und MMP-13 aus OA-Chondrozyten [97]. Somit haben die genannten Zytokine einen regulatorischen Effekt auf das Gleichgewicht im Knorpel. Eine intraartikuläre Verabreichung dieser Mediatoren zum Schutz des Knorpels bei entzündlichen Erkrankungsprozessen wird diskutiert [98].

In Folge eines initialen Geschehens, sei es eine mechanische Verletzung, der normale Alterungsprozess oder ein Gendeffekt, kommt es in der frühen Phase der OA zu einer Dysregulierung der Chondrozytenfunktion, einer Phänotyp-Änderung, und daraufhin zu einer vermehrten Expression von MMPs, Cysteinproteasen und ADAMTS-Enzymen [8, 9, 16]. Zunächst kommt es zwar zu einer vermehrten Bildung von EZM in den unteren Schichten, jedoch wird in der superfizialen Zone schon geringfügig mehr Typ-II-Collagen abgebaut als gebildet. Es kommt deshalb zu ersten oberflächlichen Schäden des Knorpels [8]. Ebenso werden vermehrt Zytokine von den Chondrozyten ausgeschüttet, die einen weiteren Abbau von Knorpelsubstanz begünstigen. Diese schieben in der frühen Erkrankungsphase das Gleichgewicht zwischen MMPs und TIMPs auf Seiten der abbauenden Enzyme. Zusätzlich fördert eine mechanische Verletzung die Ausschüttung von MMP-3. Im Krankheitsverlauf kommt es dann durch wiederholte Verletzungen, ein chronisches Entzündungsgeschehen und unter Beteiligung des subchondralen Knochens zu einer verstärkten Imbalance des Gleichgewichts aus Auf- und Abbau des Knorpelgewebes zu Gunsten des Abbaus (Abbildung 6). Dabei wird nicht nur der Abbau stimuliert, sondern auch der Aufbau gehemmt [91].

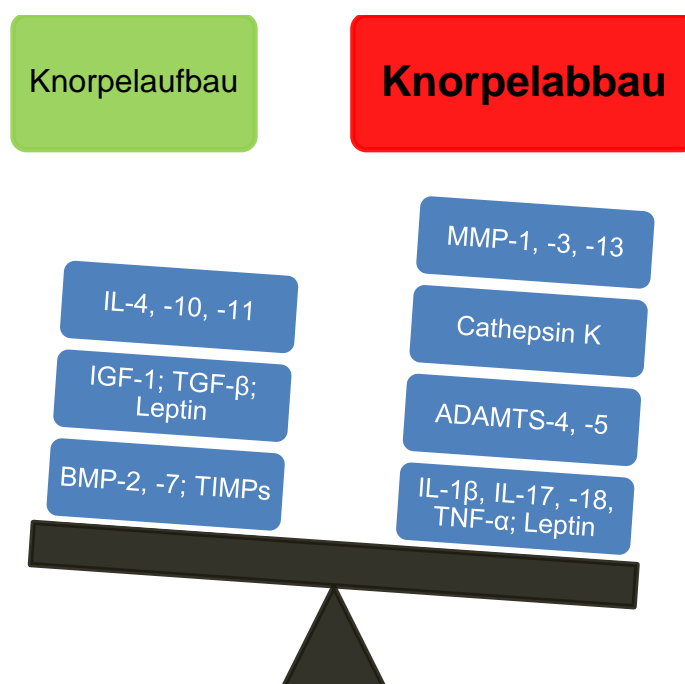


Abbildung 6: Im Rahmen der Erkrankung Osteoarthritis ist ein deutliches Übergewicht der knorpelabbauenden Enzyme und inflammatorischen Zytokine, im Vergleich zu den protektiven Faktoren, vorhanden. Folge dessen ist ein stetiger Knorpelverlust bis hin zur kompletten Freilegung des subchondralen Knochens im Spätverlauf der Erkrankung [9].

Ein Verlust an Aggrecan in der Frühphase von OA lässt eine Beteiligung der ADAMTS-Familie vermuten (Genaueres siehe Einleitung A, Kap. 2.3). Dieser Abbau führt zur Reduktion von Wasserbindevermögen im Gewebe mit der Folge des Funktionsverlustes. Dieser Prozess ist jedoch reversibel. Erst wenn im Anschluss Typ-II-Collagen durch MMPs abgebaut wird, wird der Knorpel irreversibel geschädigt. Ein Eingreifen in den frühen Aggrecanverlust wäre also ein sinnvolles Ziel einer möglichen Intervention [112].

Die veränderte Freisetzung verschiedener Marker liegt u.a. an einem Wandel des Chondrozyten-Phänotyps im Laufe der OA-Erkrankung. Es findet eine hypertrophe Umwandlung der normalerweise in Ruhe befindlichen Zellen statt, die zu einer Bildung von Clustern mehrerer Zellen und einer Proliferation führt. Folglich wird der Abbau von Knorpelgewebe gefördert und eine Mineralisierung des noch vorhandenen hyalinen Knorpels initiiert. Dabei handelt es sich zumeist um eine Calcifizierung mit Hilfe von basischem Calciumphosphat. Dadurch wird das Gewebe weniger elastisch und kann nicht mehr adäquat auf mechanischen Druck

reagieren. Insgesamt gesehen gehen die ursprünglich vorhandenen Eigenschaften des gesunden Gewebes immer mehr verloren, v.a. die Zugfestigkeit und das Wasserbindevermögen. Auch der subchondrale Knochen gewinnt im Zuge der Erkrankung an Bedeutung. Durch Bildung von Knochenzysten und sklerotischen Veränderungen ändert sich die Durchblutung des Knochens und somit die Nährstoffversorgung der unteren Gewebsschichten. Dadurch können pathogene Schädigungen schlechter ausgeglichen werden [8, 89]. Ebenso kommt es im Zuge der Calcifizierung zu einer zunehmenden Vaskularisierung der unteren Knorpelzone und damit zu einer gesteigerten Exposition des subchondralen Knochens mit löslichen Faktoren, z.B. Interleukine, aus dem Blut [92].

Alles in allem lässt sich erkennen, dass nicht nur das Knorpelgewebe für sich alleine wichtig für das Verständnis der Erkrankung ist, sondern ebenso das Synovium und der subchondrale Knochen mit einbezogen werden müssen [113] (Abbildung 7). Die Beteiligung des Synoviums wird durch eine Gelenkschwellung offensichtlich [109]. Diese kann jedoch sehr unterschiedlich ausfallen, so dass die Diagnose einer Synovitis nicht immer möglich ist.

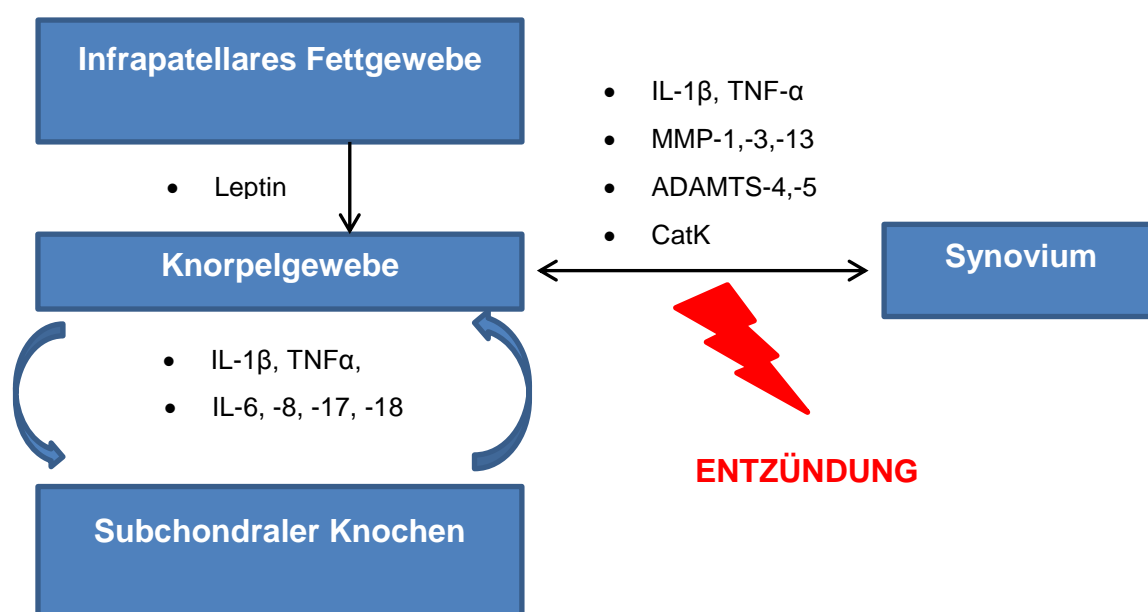


Abbildung 7: Darstellung des Zusammenspiels der verschiedenen Bestandteile des Kniegelenks bei Osteoarthritis. Zwischen Knorpelgewebe, Knochen und Synovium herrscht ein reger Austausch von Mediatoren und Enzymen mit der Folge eines chronischen Entzündungsgeschehens im späten Verlauf der Erkrankung. Das infrapatellare Fettgewebe trägt zu der OA-Pathogenese v.a. durch Ausschüttung von Leptin bei.

Um den Verlauf der Degeneration während der OA unter Individuen vergleichen zu können, gibt es Schweregradeinteilungen. Diese Bewertungen sind v.a. für die Durchführung klinischer Studien wichtig. In der Praxis ist eine solche Einteilung meist schwer möglich, da eine umfassende Diagnostik zu teuer ist. Nach Soder et al. geht man dabei in drei Schritten vor: Zunächst findet eine Typisierung der Erkrankung statt. Dabei unterscheidet man primäre Formen ohne erkennbare Grunderkrankung und sekundäre Erkrankungsformen mit Grunderkrankungen, z.B. Rheumatoider Arthritis oder Gicht [89]. Zusätzlich findet eine Stadieneinteilung statt, in Deutschland i.d.R. nach Otte. Hier spricht man im Stadium null von einem normalen Knorpel. Mit fortschreitendem Stadium nimmt der Knorpelabbau, bis hin zum vollständigen Knorpelverlust im Stadium IV, zu. Man bezeichnet diese Methode auch als „summarischen Gesamtbefund“ des Gelenkes. Abschließend wird noch eine histologische Graduierung nach Mankin durchgeführt. Mit einer Zahl wird der jeweilige Knorpelzustand beschrieben. Ein Nachteil davon ist, dass

nur eine lokale Bewertung durchgeführt wird, die nicht auf den Gesamtknorpel übertragen werden kann.

Inwiefern der normale Alterungsprozess eine Rolle in der Pathogenese spielt, wird diskutiert. Aigner et al. erläutern einen Einfluss durch vermehrte Einlagerung von „advanced glycation end-products“ (AGEs) in die Knorpelmatrix [113]. Diese bewirken über ihren Rezeptor eine vermehrte Synthese von MMP-13 und darüber einen vermehrten Typ-II-Collagenabbau. Typ-II-Collagen ist besonders anfällig für diese nicht-enzymatischen Glykosylierungen, auf Grund der langen Halbwertszeit von 120 Jahren im normalen Knorpel [114]. Zusätzlich wird eine DNA-Schädigung durch oxidativen Stress diskutiert [91]. Im Alter nimmt die Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies im Körper zu und das antioxidative Potential ab. Knorpelläsionen sind die Folge. Eine Supplementierung mit Antioxidantien könnte das Problem lösen, die Studienlage hierzu ist aber unklar (Einleitung A, Kap. 1.5). Findlay et al. beschreiben zusätzlich eine mit steigendem Alter fortschreitende Vaskularisierung des subchondralen Knochens und eine damit einhergehende stärkere Durchblutung der calcifizierten Knorpelzone, ähnlich den Vorgängen bei OA [115]. In diesem Bereich können schon im Gesunden kleine Moleküle zwischen Knorpel und Knochen ausgetauscht werden, was u.a. der Versorgung des Knorpelgewebes mit Glucose, Sauerstoff und Wasser dient. Nach einer Knorpelschädigung in Folge einer abnormal hohen Belastung kommt es zu einem gesteigerten „Cross-Talk“ zwischen den Osteozyten des Knochens und den Chondrozyten des Knorpels mit dem Resultat eines gesteigerten Knochenumbaus und einer Bildung hypertropher Chondrozyten-Phänotypen. Dem Zusammenspiel aus Knorpel, Synovium und Knochen bedarf es weiterer Forschung, um den auslösenden Faktor von OA zu identifizieren und in der Folge modulierend in das Krankheitsgeschehen eingreifen zu können.

2.2 Aufbau und Metabolismus des Collagen-Netzwerks im gesunden Knorpelgewebe und bei Osteoarthritis

Der Hauptbestandteil der Extrazellulärmatrix des Knorpelgewebes ist mit ca. 60-70 % der Trockenmasse das Typ-II-Collagen [116], welches mit Typ-IX- und Typ-XI-Collagen quervernetzt vorliegt (Einleitung A, Kap. 2.1). Das Typ-II-Collagen wird als Procollagen in den Chondrozyten synthetisiert. Es stellt eine Triple-Helix aus drei identischen α -Ketten dar, die ineinander verflochten sind [117, 118]. Die Collagen-Moleküle sind zu Mikrofibrillen zusammengelagert. Diese wiederum sind über Proteoglykan-GAG-Brücken miteinander verbunden und dicht gebündelt in einer Collagen-Faser vereint. Spezifische Proteinasen spalten die Propeptide C-terminal (PIICP) und N-terminal (PIINP) am Collagen-Molekül ab, um eine Ablagerung in die Fibrillen der EZM überhaupt erst zu ermöglichen [95, 117, 119]. Dort hat das Typ-II-Collagen, wie bereits erwähnt, eine Halbwertszeit von ca. 120 Jahren beim Gesunden [92, 114]. Die abgespaltenen Propeptide gelten als Marker für den Knorpelaufbau im Gelenk. Der Wachstumsfaktor BMP-2 ist ein bekannter Induktor dieser Typ-II-Collagensynthese [119], genauso der Wachstumsfaktor IGF-1 [116].

Die Collagenasen sind die Hauptabbauenzyme von Typ-II-Collagen [120]. Die Enzyme, namentlich das MMP-1, -8, -13 und -14, spalten das Typ-II-Collagen bevorzugt zwischen den Aminosäuren Gly⁷⁹⁴ und Leu⁷⁹⁵ [117, 121]. Dieser Abbau bewirkt die Bildung zweier Fragmente mit ein Viertel und drei Viertel der Länge des Ausgangsmoleküls [122]. Die helikale Struktur wird entwunden und das Molekül wird anfälliger für weitere Spaltungen [123]. Die MMP-1 wird hauptsächlich von Synoviozyten und Chondrozyten, die MMP-3 und MMP-13 von Chondrozyten und die MMP-8 von Neutrophilen sekretiert [124, 125]. Die MMP-13 hat von allen Matrix-Metalloproteinasen die höchste Spezifität für Typ-II-Collagen, setzt dieses am schnellsten um und gilt deshalb als wichtigster Marker für die OA-Pathogenese [37, 120, 126, 127]. Diese These untermauerten Miller et al. und Little et al. anhand von Maus-Modellen, in denen ein Ausschalten des Enzyms vor Knorpelverlust schützte [128, 129]. Im Gegensatz zum Abschalten, bewirkte das Einsetzen eines Gens in Mäuse, das für eine konstante Expression von MMP-13

sorgte, OA-ähnliche Knorpelveränderungen [93]. Diese Untersuchung unterstrich nochmals die Wichtigkeit dieses Enzyms im Rahmen der Gelenkerkrankung OA. Zusätzlich zu den Collagenasen wird auch den Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) die Fähigkeit zur Collagenspaltung zugesprochen, aber nur, wenn zuvor eine Spaltung durch Collagenasen stattgefunden hat [120, 123]. Eine weitere Form der Metalloproteinasen sind die Matrix-Metalloproteinasen vom Membran-Typ (MT-MMPs), z.B. MT1-MMP. Die membrangebundenen Formen sind u.a. dazu in der Lage, das MMP-13 zu aktivieren [130]. Alle Mitglieder dieser Familie werden nämlich als inaktive Proenzyme, auch Zymogene genannt, synthetisiert. Die MMPs werden dann durch Proteasen extrazellulär aktiviert, wohingegen die MT-MMPs intrazellulär im Golgi-Apparat durch Furin, eine Serin-Protease, aktiviert werden [120] (Abbildung 8). Die bereits erwähnten endogenen Regulatoren der MMP-Aktivität, die TIMPs, binden in einer 1:1 Stöchiometrie an das aktive Zentrum der Proteasen und sorgen damit für eine Blockade [120].

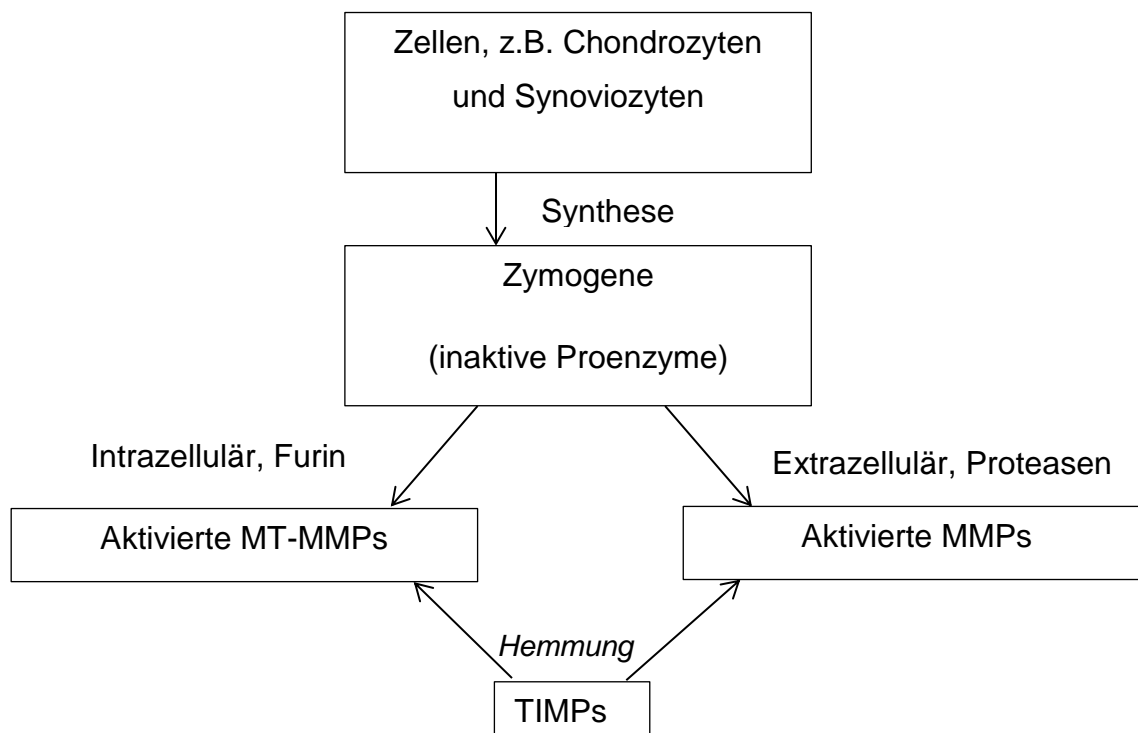


Abbildung 8: Schaubild der Synthese und Aktivierung verschiedener MMPs. Synthetisiert werden ungebundene (MMPs) und membrangebundene (MT-MMPs) Metalloproteinasen in diversen Zelltypen, z.B. Chondrozyten und Synoviozyten, als inaktive Vorstufen. Membrangebundene MT-MMPs werden intrazellulär durch Furin aktiviert, ungebundene MMPs extrazellulär durch Proteasen. Gehemmt werden beide Enzymtypen durch TIMPs.

Die MMP-13 wird, auf Grund ihrer breiten Substratspezifität und dem daraus resultierenden Schadenspotential für vielfältige Gewebe, am strengsten reguliert [125]. Ob nun eine verstärkte Synthese bzw. Aktivierung der MMPs der Auslöser für ein Ungleichgewicht ist, oder eine Verschiebung des Verhältnisses zwischen MMPs und TIMPs, ist bis jetzt unklar. Dean et al. sprechen z.B. von einem höheren Anstieg der MMP-Expression bei OA im Vergleich zum Anstieg der TIMPs [131]. Bluteau et al. bestimmten eine stärkere Genexpression von MMP-1, -3 und -13 bei gleichbleibender TIMP-1-Expression im Knorpel von Kaninchen in einem OA-Modell [132]. Tetlow et al. sahen ergänzend eine erhöhte Aktivität von sechs verschiedenen MMPs im Knorpel von OA-Patienten im Vergleich zu Kontrollen, v.a. in der superfizialen Zone des Gewebes [107]. Aber auch andere Meinungen hierzu existieren. Sobald jedoch der Collagen-Abbau via MMPs bzw. MT-MMPs begonnen hat, ist der Prozess des Knorpelverlustes irreversibel [116]. Lediglich der Aggrecan-Abbau durch Aggrecanasen in der Frühphase der OA ist noch reversibel (Einleitung A, Kap. 2.1). Eine weitere Erklärung für den wachsenden Knorpelverlust während der Erkrankung, nämlich die Apoptose der Matrix bildenden Chondrozyten, scheint hingegen unwahrscheinlich [133].

Die Verschiebung des Gleichgewichts zwischen Collagen-Aufbau und -Abbau in Richtung Abbau während der OA-Pathogenese hat mehrere Auslöser, u.a. induziert Typ-II-Collagen seinen eigenen Abbau [134]. Als Reinsubstanz förderte es über den p38 MAPK- und NF- κ B-Signalweg die Expression von MMP-1, -3 und -13 in humanen primären Chondrozyten. Zusätzlich wurde die Ausschüttung der Zytokine IL-1 β , -6 und -8, mit den bereits erwähnten Folgen, gefördert (Einleitung A, Kap. 2.1). Auch einem 45 kDa-Fragment des Fibronectins, eines mengenmäßig geringfügig vorkommenden Bestandteils der EZM, wird eine induzierende Rolle auf den Knorpelabbau zugesprochen [127]. Durch dieses Bruchstück wurden in kultivierten Chondrozyten und Knorpelimplantaten die MMP-3- und MMP-13-Expressionen gesteigert. Im Gegensatz zu Typ-II-Collagen war hierbei aber nicht der IL-1-Signalweg beteiligt. Die Überaktivität von MMPs im Erkrankungsgeschehen wird aber vermutlich primär durch die erhöhten Konzentrationen von proinflammatorisch wirksamen Zytokinen, z.B. IL-1 β und TNF- α , gefördert [107, 130]. Das IL-1 β induziert z.B. über MAP-Kinasen-

Signalwege, genauer betrachtet über p38 und JNK, die Aktivierung von AP-1 und zusätzlich aktiviert es den NF- κ B, die beide als Transkriptionsfaktoren die Hochregulierung von MMP-13 in Chondrozyten bewirken [125]. Die Induktion der MMP-1 scheint laut den Autoren, je nach Zelltyp, aber über einen davon abweichenden Signalweg stattzufinden.

Neben den MMPs gibt es weiterhin Cystein-Proteasen, die sog. Cathepsine, die in der Lage sind, Collagen zu spalten. Aus der Enzymfamilie hat jedoch nur das Cathepsin K (CatK) eine nennenswerte collagenolytische Aktivität [118]. Miller et al. bezeichnen dieses als eines der Hauptabbauenzyme von Mausknorpel [128]. Eine Ausschaltung dessen schützte genetisch veränderte Mäuse vor Knorpelverlust. CatL, CatV, CatS und CatB können hingegen lediglich die Proteoglykan-Brücken des Collagen-Netzwerks spalten [118]. Das hat zwar auch eine Auswirkung auf die mechanische Stabilität der Collagen-Fasern, jedoch nicht so stark wie durch den Einfluss von CatK. Cathepsin K wurde in Osteoklasten entdeckt und hat dort, im Zuge des Umbaus während der normalen körperlichen Entwicklung, die Aufgabe der Knochenresorption [135]. Inaoka et al. gingen noch von dieser Hauptaufgabe aus. Eine saure Umgebung sahen diese dabei als essentiell an. Im Knochen baut CatK das Typ-I-Collagen ab [136]. CatK-Knockout-Mäuse entwickeln eine Osteosklerose, bei Überexprimierung der Protease wird die Entstehung einer Osteoporose gefördert [137]. Ähnlich den MMPs wird auch das CatK als inaktives Proenzym ausgeschüttet. Bei pH 4-4,5 erfolgt dann die Abspaltung der Pro-Domäne. Deshalb sind Cathepsine vorwiegend in Lysosomen lokalisiert und aktiv, da in deren Inneren ein saurer pH vorherrscht [137]. Svelander et al. beschreiben, dass die CatK auch in synovialen Fibroblasten gebildet wird und neben Typ-I- und Typ-II-Collagen auch Aggrecan abbauen kann [138]. Die These des Aggrecan-Abbaus stellten schon Hou et al. auf [139]. Die Forschergruppe entdeckte fünf bevorzugte Spaltstellen des Enzyms im Aggrecan-Molekül. Nach Spaltung kam es zu einer Dissoziation bzw. Zerstörung von Aggrecan-Aggregaten. Für den Collagen-Abbau essentiell sind elektrostatische Wechselwirkungen des Enzyms mit den sGAG-Seitenketten der Proteoglykane, die auf der Oberfläche der Collagen-Fibrillen lokalisiert sind [118]. Zum Proteoglykan-Abbau sind diese Cofaktoren dagegen nicht notwendig.

Eine Überexprimierung der Protease im Synovium führte in den Versuchen von Morko et al. zu einer Verdickung des Synoviums in Folge einer Proliferation [140]. Zusätzlich entdeckte die Forschergruppe eine Anreicherung von CatK im Knorpel bevorzugt in der Nähe von Knorpelläsionen, da dort Chondrozyten-Cluster vorhanden waren. Eine Beteiligung am initialen Geschehen der OA sehen die Autoren als durchaus möglich an. Untermuert wird diese These durch die Untersuchungen von Svelander et al., die in einem Mausmodell durch eine prophylaktische Behandlung mit CatK-Inhibitoren einen reduzierten Knorpelabbau in Bezug auf eine unbehandelte Kontrollgruppe feststellten [138]. Eine Eindämmung der Entzündung war laut Autoren dafür entscheidend. Auch Panwar et al. betrachten CatK als eines der Hauptenzyme bei OA und Osteoporose [118]. Die Collagen-Faserstruktur wird durch das Enzym vollkommen zerstört und das Konstrukt bis auf seine Einzelteile zerlegt. Die wichtigen Eigenschaften des Knorpels, nämlich die Dehnbarkeit und Zugfestigkeit, gehen dadurch verloren.

Obige Ausführungen lassen eine Beteiligung von CatK, auf Grund seiner collagenolytischen Aktivität, am Erkrankungsgeschehen von OA vermuten. Die genaue Bedeutung der erhöhten Expressierung des Enzyms in Knorpel, Knochen und Synovium bedarf jedoch weiterer Forschung [140].

Um den Metabolismus von Typ-II-Collagen beurteilen zu können, bedarf es neben der Synthesemarker auch verlässlicher Abbaumarker. Mit diesen könnte man z.B. die Wirksamkeit einer OA-Therapie beurteilen. Das C-Telopeptid von Typ-II-Collagen (CTX-II) gilt als solcher und wurde auch in der Synovialflüssigkeit der Probanden der Pycnogenol®-Studie im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.2). MMPs bilden hauptsächlich CTX-II und nur wenig vom helikalen Peptid (Helix-II), einem weiteren Abbauprodukt von Typ-II-Collagen [122]. Das CatK produziert dagegen nur Helix-II und kein CTX-II. Beide Spaltprodukte werden durch MMPs und Cathepsine noch weiter gespalten (Abbildung 9).

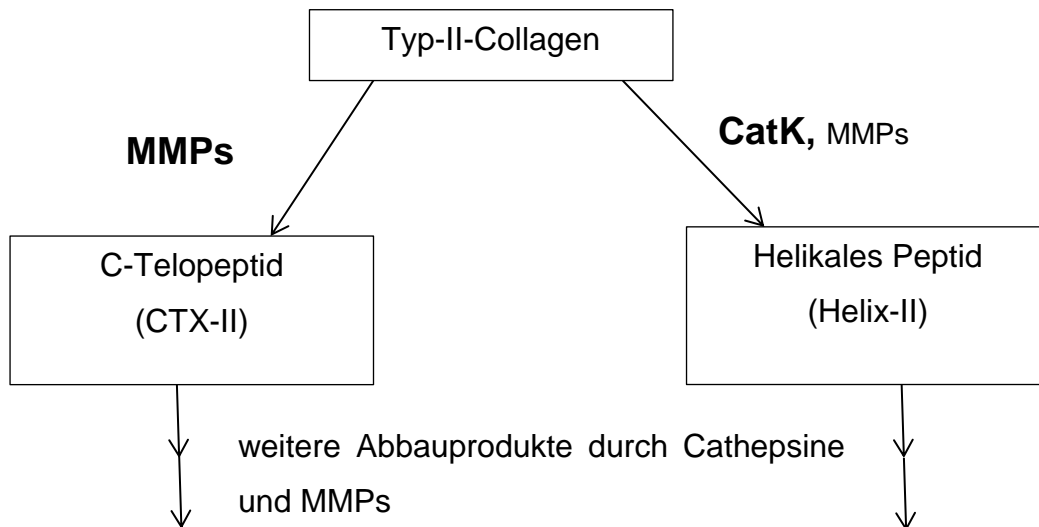


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Typ-II-Collagen-Abbaus inklusive der beteiligten Enzyme. MMPs produzieren hauptsächlich CTX-II und zusätzlich Helix-II, CatK kann nur Helix-II als Abbauprodukt bilden. Beide Abbauprodukte werden durch verschiedene Cathepsine und MMPs noch weiter abgebaut.

Eine alleinige Untersuchung nur eines der beiden Marker würde laut Autoren keinen Sinn ergeben. Deshalb wurden bei uns die Konzentrationen beider Marker in der Synovialflüssigkeit bestimmt (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.2). Nemirovskiy et al. identifizierten mittels LC-MS/MS-Analytik von Urin- und Synovialflüssigkeitsproben einen weiteren Biomarker des Collagenabbaus [123]. Das Polypeptid aus 45 monomeren Bestandteilen bezeichnete die Forschergruppe als TIINE. Es dient v.a. zur Beurteilung der MMP-Aktivität. Aber keines der genannten Abbauprodukte kann bis zum heutigen Tag als valides Instrument zur Diagnose bzw. zur Prognose bei OA bezeichnet werden [141].

Neben dem Typ-II-Collagen-Stoffwechsel gilt es auch den Proteoglykan-Stoffwechsel im Knorpel zu verstehen, um die zellulären Effekte von Pycnogenol® beurteilen zu können.

2.3 Auf- und Abbau der EZM mit Fokus auf den Aggrecan-Stoffwechsel und dessen Bedeutung im Rahmen von Osteoarthritis

Die extrazelluläre Matrix ist, wie bereits beschrieben, hauptsächlich aus Typ-II-Collagen und Proteoglykanen, hier vorwiegend Aggrecan, zusammengesetzt (Einleitung A, Kap. 2.1). Aggrecan ist ein großes, chondroitinsulfatreiches Proteoglykan, das im erwachsenen Knorpel ca. 10 % der Trockenmasse ausmacht [142]. Es besteht aus drei kugelförmigen Domänen (globular domains, G1-3) (vereinfachter Aufbau siehe Abbildung 10).

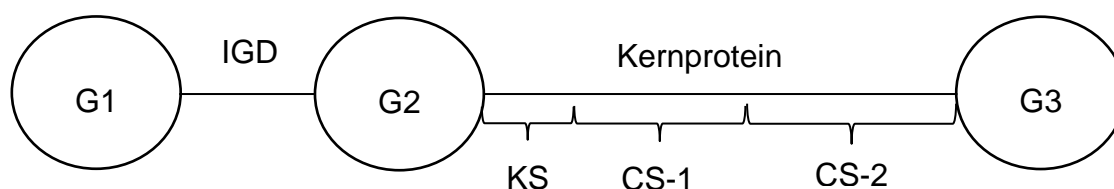


Abbildung 10: Vereinfachter Aufbau eines Aggrecan-Moleküls, modifiziert nach [103] und [143]. Mit KS ist die keratansulfatreiche Region und mit CS-1 und CS-2 sind die beiden chondroitinsulfatreichen Regionen im Kernprotein bezeichnet, das die beiden kugelförmigen Domänen G2 und G3 trennt. Zwischen G1 und G2 liegt die interglobuläre Domäne (IGD), die für Spaltungen sehr anfällig ist.

An G1 interagiert das Proteoglykan (PG) mit Bindeproteinen und Hyaluronsäure (HA) im Maschennetzwerk des Knorpels [139, 144]. Etwa hundert Aggrecan-Monomere sind, über Bindeproteine, an ein HA-Molekül gebunden. Dieses hochgeladene Aggregat sichert den Verbleib von Aggrecan im Knorpel [145]. Zwischen G1 am N-Terminus des Aggrecan-Moleküls und G2 liegt die sogenannte „Interglobuläre Domäne“, die aus 128 Aminosäuren besteht [146]. An das große Zwischenstück, das G2 und G3 trennt und 1491 Aminosäuren lang ist, heften sich bevorzugt Glucosaminglykane (GAGs) und sorgen damit für die starke negative Ladung des Aggrecans [146]. In Richtung N-Terminus entsteht eine Keratansulfat (KS)-reiche Region, in Richtung C-Terminus eine chondroitinsulfatreiche Region (CS) [147]. Letztere unterteilt sich nochmals in einen CS-1- und einen CS-2-Teil [143]. Die Aggrecan-Struktur ist jedoch stark variabel, was v.a. durch die Heterogenität des Kernproteins zwischen G2 und G3 zu stande kommt [148]. Das

intakte Molekül mit angehefteten GAGs hat eine Größe von 1000 bis 2000 kDa [112]. An die stark negativ geladenen Stellen lagern sich Wassermoleküle an. Diese Konstrukte zwingen sich in die Zwischenräume des Collagen-Netzwerks [103, 145]. Das Gewebe quillt und bekommt so seine charakteristischen Eigenschaften wie z.B. eine elastische Verformbarkeit, um Druckbelastungen des Gelenkes abfedern zu können [149]. Zusätzlich wird hierdurch ein reibungsfreies Gleiten ermöglicht [150].

Im gesunden Gewebe hat das Aggrecan eine Halbwertszeit von ca. 25 Jahren [151]. Der Anteil intakter Aggrecan-Moleküle sinkt während des Alterungsprozesses und es treten vermehrt KS-reiche Spaltprodukte mit einem niedrigeren Molekulargewicht auf.

Die interglobuläre Domäne ist besonders anfällig für Spaltungen durch Enzyme. Vermehrt wird Aggrecan im gesunden, sowie im kranken, Knorpel durch Aggrecanasen abgebaut. Am aktivsten sind hierbei die Aggrecanasen-1 und -2 (ADAMTS-4 und -5) [102, 103, 152], wohingegen ADAMTS-1 kein Aggrecan abbauen kann [142]. Die charakteristischste Spaltstelle ist zwischen den Aminosäuren Glu³⁷³ und Ala³⁷⁴ in der interglobulären Domäne [142]. Hierbei entstehen das C-Terminus-Fragment G1-TEGE, das im Knorpelgewebe verbleibt und das N-Terminus-Fragment Ala³⁷⁴-Arg-Gly-Ser-G2, das in die Synovialflüssigkeit übergeht [148, 153]. Durch Abspaltung dieser CS-reichen Region wird der Knorpel in seinem Wasserbindevermögen deutlich eingeschränkt [143]. Zwar ist diese Spaltstelle am charakteristischsten für eine Aggrecanase-Aktivität, jedoch nicht die beliebteste Angriffsstelle im Molekül. Zwischen Glu¹⁷¹⁴ und Gly¹⁷¹⁵ wird am häufigsten gespalten. Dabei entstehen die Produkte G2-KEEE¹⁷¹⁴ am C-Terminus und ¹⁷¹⁵GLGS-G3 am N-Terminus [112]. Weitere drei Spaltstellen im Kernprotein sind die Regel [147]. Das Auffinden dieser fünf Abbauprodukte, im Serum oder in der Synovialflüssigkeit, bzw. die Detektion abgespalteter sulfatierter GAGs, ist ein Hinweis für die Aggrecanase-Aktivität im Individuum.

Aufgebaut sind die ADAMTSs-Proteine aus einer N-terminalen Propeptid-Domäne, einer Metalloproteinase-Domäne mit zinkbindendem Motiv (= katalytisches Zentrum), einer cysteinreichen und einer Disintegrin-ähnlichen Domäne [142, 152]. Der C-Terminus enthält eine variierende Anzahl an Thrombospondin-

Typ-I-Motiven, die entscheidend für die Spaltung von Aggrecan sind. Damit bindet das Enzym nämlich an die sulfatierten GAG-Seitenketten des Proteoglycans [120]. ADAMTS-4 enthält ein Thrombospondin-Motiv, ADAMTS-5 zwei [143, 146]. Beide werden als Proenzyme von Chondrozyten und Synoviozyten sekretiert und, analog der MT-MMPs, intrazellulär im Golgi-Apparat durch Furin aktiviert [120] (Einleitung A, Kap. 2.2). Ein potenter endogener Inhibitor der Aggrecansen-1 und -2 ist das TIMP-3, das die Aktivität derer reguliert [146, 153].

Auch Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) können Aggrecan abbauen. Der Nachweis dessen gelang Fosang et al. durch die Detektion von spezifischen Aggrecan-Abbauprodukten in der Synovialflüssigkeit [149]. Die charakteristischste Spaltstelle befindet sich in der interglobulären Domäne zwischen den Aminosäuren Asn³⁴¹ und Phe³⁴² [148]. Es entstehen in der Folge die Fragmente G1-IPEN (C-Terminus), das im Knorpel verbleibt, und FFGV-G2 (N-Terminus), das in die Synovialflüssigkeit übertritt. Hierbei sind v.a. MMP-3 und -13 beteiligt. MMP-3 kann Aggrecan aber auch in der CS1- und CS2-Region angreifen. Weitere MMPs sind an der Spaltung in der KS-Region beteiligt [154].

Generell ist der Aggrecan-Abbau durch MMPs als weniger bedeutsam anzusehen als der Abbau durch die Aggrecanasen-1 und -2 [148, 153]. Struglics et al. sehen die Rolle der MMPs am Aggrecan-Metabolismus v.a. im normalen Knorpelumbau, mit einer geringen Beteiligung in der frühen OA-Phase und einer wachsenden Beteiligung in der Spätphase der Erkrankung [154]. Jedoch berichten Fosang et al. von sehr stark individuell variierenden Konzentrationen an MMP-Abbauprodukten in der Synovialflüssigkeit verschiedener Patienten [149]. Deshalb ist eine allgemein gültige Aussage über die Beteiligung von MMPs am Aggrecan-Abbau schwierig zu treffen.

Es gibt mehrere Rahmenbedingungen, durch welche eine erhöhte Konzentration an Aggrecan-abbauenden Enzymen bzw. an deren Abbauprodukten vorliegen kann. Zum Beispiel kommt es im Laufe einer akuten bzw. chronischen Gelenksverletzung zu einer Imbalance aus Auf- und Abbau der EZM [155]. Chockalingam et al. zeigten an einem Rattenmodell, dass das ARGS-G2-Aggrecan-Abbauprodukt vermehrt nach einer Operation vorhanden ist. Ebenso waren, im Vergleich zu Gesunden, in der Synovialflüssigkeit von OA-Patienten

deutlich höhere Spiegel dieses spezifischen Abbauproduktes vorhanden. Dieser Sachverhalt spricht für eine Beteiligung der Aggrecanasen am Aggrecan-Abbau im Falle einer akuten Verletzung.

Dies lässt darauf schließen, dass auch der vermehrte Aggrecan-Verlust in der Frühphase von OA hauptsächlich durch Aggrecanasen erzeugt wird [112], da (wiederholte) Verletzungen von Gelenkstrukturen als Risikofaktor für OA gelten (Einleitung A, Kap. 1.1). Welche Aggrecanase hierbei die größte Relevanz hat, wird intensiv erforscht und diskutiert (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.3). Die Folge des vermehrten Aggrecan-Abbaus ist ein Verlust an Wasser im Gewebe, was zu einer Reduktion der Kompensationsfähigkeit mechanischer Belastungen führt [153, 156]. Zusätzlich scheint das Aggrecan im Netzwerk der EZM einen protektiven Effekt auf das Typ-II-Collagen zu besitzen [155]. Erst nach Abbau des Proteoglykans wird in einer späteren Phase der Erkrankung das Typ-II-Collagen durch MMPs angegriffen und abgebaut (Einleitung A, Kap. 2.2). Die progressive Knorpelzerstörung ist die Folge. Eine Hemmung der beiden Aggrecanasen wäre sinnvoll, um das Voranschreiten der Knorpelzerstörung zu verlangsamen bzw. zu verhindern. Dies müsste jedoch frühzeitig im Erkrankungsprozess und selektiv geschehen. Eine Inhibition weiterer Mitglieder der Enzymfamilie steht im Verdacht, negative Auswirkungen auf andere Gewebe zu haben und sollte deshalb vermieden werden [153]. Eine Reduktion der Aktivität von ADAMTS-4 könnte hingegen zusätzlich noch positive Auswirkungen auf das Herzgewebe haben, da hohe Serumspiegel des Enzyms mit dem Schweregrad koronarer Herzerkrankungen positiv korrelieren [157].

Die Konzentration an löslichen ADAMTS-Enzymen im Serum und der Synovialflüssigkeit wird als Marker für die Krankheitsaktivität bei OA diskutiert [152, 158]. Eine Senkung der Spiegel wäre ein Zeichen für einen geringeren Abbau von Aggrecan [159]. Ob Pycnogenol[®] einen Einfluss auf diese und weitere Marker der Knorpelhomöostase hat, sollte im Rahmen dieser Arbeit erörtert werden. Zusätzlich dazu sollten die jeweiligen Abbauprodukte in der Synovialflüssigkeit quantitativ untersucht werden, um eine Aussage über die Aktivität der abbauenden Enzyme treffen zu können. Hierbei wurde mittels etablierten DMMB-Assay die Konzentration an sulfatierten Glucosaminglykan-

seitenketten (sGAG) bestimmt, die vom Kernprotein im Zuge des Abbaus abgespalten worden sind (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.2).

2.4 Die Rolle von Leptin in der Knorpelhomöostase und der Pathogenese von Osteoarthritis

Übergewicht und Adipositas sind ein wachsendes Gesundheitsproblem in der westlichen Welt. Die Bedeutung von Adipositas als Risikofaktor für die Entwicklung einer OA ist unumstritten (Einleitung A, Kap. 1.1). Zunächst ging man davon aus, dass nur das Risiko für OA in gewichtstragenden Gelenken, wie z.B. dem Knie- bzw. dem Hüftgelenk, auf Grund der höheren mechanischen Belastung, davon betroffen ist [160]. Jedoch zeigte sich auch ein erhöhtes Risiko für Handgelenks- und Schultergelenks-OA mit steigendem Body-Mass-Index (BMI) [161, 162]. Dies war ein Indiz für eine biochemische Rolle des Fettgewebes bei Osteoarthritis. Der entscheidende Faktor in diesem Zusammenhang war jedoch lange Zeit unbekannt.

Die Entdeckung des „obese“ Gens in Mäusen und die Klonierung seines humanen Analogons, das für ein nicht-glykosiliertes 16 kDa-Protein, das Leptin, codiert, war der erste Schritt zur genaueren Aufklärung des Phänomens der höheren Osteoarthritis-Prävalenz unter Adipösen [163]. Die Bedeutung dieses Hormons im Zuge der Steuerung der Nahrungsaufnahme, speziell die Vermittlung eines Sättigungsgefühls, die Steigerung der Energieverwertung und in der Folge die Regulierung des Körpergewichts, wird aus der Wortherkunft (griechisch *leptos*, bedeutet dünn) ersichtlich und war zu Beginn im Vordergrund des Interesses [164]. Da die Hormonkonzentration im Serum adipöser Patienten erhöht war, ergab sich das Hauptziel der Ausschaltung des Hormons, um in den Krankheitsprozess einzugreifen. Die Hoffnung auf die rasche Entwicklung einer „Schlankheitspille“ zerschlug sich jedoch schnell, da Leptin pleiotrope Effekte offenbarte, die das Verständnis der „Leptin-Achse“ erschwerten [165]. Auch wurde schnell klar, dass die zunächst angenommene Hypothese der ausschließlichen Produktion im Fettgewebe nicht haltbar war. Inzwischen ist von vielen Geweben bekannt, dass diese Leptin produzieren, u.a. vom Knorpelgewebe und der Skelettmuskulatur.

Die Hypothese der pleiotropen Effekte von Leptin wurde weiter untermauert durch das Auffinden funktioneller Leptin-Rezeptoren in zahlreichen Körperregionen. Die Leptin-Rezeptoren gehören zur Familie der Zytokin-Rezeptoren (Typ I) und durch alternatives Splicen der mRNA entstehen fünf verschiedene Varianten: eine lange (OB-Rb), drei kurze (OB-Ra, -Rc und -Rd) und eine lösliche Form (OB-Re oder sOB-R) [166]. Die lösliche Form ist das Hauptbindeprotein von Leptin im menschlichen Blutkreislauf [167, 168]. Die Konzentration an Bindeprotein nimmt im Laufe des Lebens ab und zeigt ein Maximum im Alter von etwa 2 Jahren. Zusätzlich zu dieser inversen Korrelation fanden Kratzsch et al. auch eine inverse Korrelation zu den Serum-IGF-1-Spiegeln [167]. Hinzu kommt, dass der Leptin-Synovialflüssigkeits-Spiegel mit wachsendem Alter zu steigen scheint [169]. Dies würde bei gleichzeitig sinkenden Rezeptorkonzentrationen ein Ansteigen von freiem Leptin und damit einen gesteigerten Effekt dessen bedeuten. Lammert et al. entdeckten zwei Isoformen des löslichen Rezeptors, die eine hohe Affinität zu Leptin aufwiesen [168]. In Mäusen sorgte die Überexprimierung des sOB-R für eine gesteigerte Gewichtsreduktion; laut Autoren durch eine vermutlich höhere Funktionalität des Leptin in gebundener Form oder durch einen längeren Verbleib im Blut auf Grund geringerer Clearance des Hormons gebunden am Rezeptor [166]. Die lange Isoform hat als einzige die passende intrazelluläre Ausprägung zur Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges [170]. Genauer beschrieben kommt es nach Bindung des Liganden Leptin zu einer Tyrosinkinaseaktivität (JAKs) und in der Folge zu einer Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren (STATs), die dann dimerisieren und in den Zellkern wandern, um dort nach Bindung an spezielle Regionen ihrer Hauptfunktion als Transkriptionsfaktor nachzugehen [171]. Die kurzen Formen des Rezeptors scheinen dagegen nur wichtig für den Transport und die Clearance des Zytokins zu sein. Leptin hat in ungebundener Form eine kurze Halbwertszeit im Blut auf Grund einer effizienten renalen Clearance inklusive Metabolismus im Tubulussystem der Nieren.

Die Rolle des Adipokins speziell bei OA wird erst seit kurzer Zeit rege erforscht und diskutiert. Es wird angenommen, dass Leptin die metabolische Verknüpfung zwischen OA und Adipositas darstellt, ohne bislang den genauen Mechanismus hinter dieser Beziehung zu kennen [172-174]. Das Auffinden von Leptin-

Rezeptoren auf der Oberfläche von Chondrozyten untermauert diese These [175]. Dabei konnte das Forscherteam zeigen, dass die Bindung von Leptin an seinen Rezeptor über die Phosphorylierung speziell von STAT-1 und -5 durch JAK zu einer erhöhten Zellproliferation und EZM-Synthese führte. Eine anabole Rolle von Leptin scheint deshalb denkbar. Diese anabolen Effekte konnten Dumond et al. an Ratten bestätigen [174]. Sie beobachteten unter Leptinstimulation eine erhöhte IGF-1 und TGF- β 1-Produktion. Diese Wachstumsfaktoren sind u.a. für die Knorpelreparatur im beschädigten Gewebe verantwortlich und auch in OA-Knorpel nachweisbar, nicht jedoch im gesunden Knorpel.

Leptin ist das einzige Adipokin, das, im Vergleich zum Serum, in höherer Konzentration in der Synovialflüssigkeit vorkommt [170, 176]. Lokale Effekte des Leptins im Gelenk gelten deshalb als wahrscheinlich. Dabei gilt nicht nur das weiße Fettgewebe im Bauchbereich als Quelle des Zytokins, sondern auch das im Gelenk lokalisierte infrapatellare Fettgewebe scheint in größeren Mengen Leptin zu sekretieren [177, 178] (Abbildung 3). Die Rolle dieses Gewebes bei OA ist unklar. Antikatabole [177] wie auch katabole Effekte [178] auf den Knorpel sind beschrieben.

Generell ist die Rolle von Leptin bei OA nicht abschließend aufgeklärt und die Ergebnisse der aktuellen Forschung widersprüchlich, die Tendenz geht jedoch in Richtung einer katabolen Rolle des Adipokins bei OA. Dies wird bestätigt durch eine Studie, die eine signifikante Korrelation zwischen Leptinspiegeln in der Synovialflüssigkeit und Schmerzen entdeckte [179]. Bei Gewichtsabnahme konnte eine Schmerzreduktion erzielt werden. Die Gewichtsabnahme ging auch einher mit sinkenden Plasmaleptinspiegeln [180]. Ebenso konnten sinkende Spiegel des Zytokins nach physiologischer Aktivität beobachtet werden. Klein et al. stellten fest, dass die sinkenden Leptin-Spiegel beim Fasten durch eine geringere Produktion hervorgerufen werden [181]. Es zeigte sich, dass die Abnahme der Plasmaspiegel bei Adipösen, im Vergleich zu Normalgewichtigen, deutlich geringer ausfiel und sich langsamer entfaltete. Vincent et al. bestätigten die Beobachtungen von Miller und stellten zudem fest, dass Osteoarthritis mit wachsendem BMI schneller voranschreitet [182]. Der Rat zur Gewichtsnormalisierung und Steigerung der sportlichen Aktivität bei adipösen

(OA-) Patienten ist gerade hierdurch begründet und scheint ein vielversprechender Ansatz zu sein, um den Verlauf von OA zu beeinflussen bzw. gar eine Erkrankung zu verhindern.

Um den *in-vivo* im Menschen beobachteten positiven Korrelationen zwischen Schmerzen und Leptinspiegeln in der Synovialflüssigkeit auf den Grund zu gehen, wurden zahlreiche Studien zur Aufklärung des Mechanismus von Leptin bei OA initiiert. Die entdeckten Effekte sind vielfältig.

Li et al. zeigten eine Erhöhung der Expression von ADAMTS-4 und -5 unter Leptineinfluss mit sinkenden Aggrecan-Spiegeln auf Gen- und Proteinebene in der Folge [156]. Dabei war die Phosphorylierung der p38-MAPK der entscheidende Schritt des Signalweges. Ob dieser Weg einen Zwischenschritt über IL-1 β und TNF- α benötigt oder diese Zytokine nur zusätzlich potenzierend wirken, konnte nicht erschlossen werden. Durch den provozierten Aggrecanabbau scheint eine Beteiligung von Leptin in der Frühphase von OA, v.a. bei Adipösen, denkbar. Die direkte Stilllegung der ADAMTS bzw. die Hemmung der Enzyme durch Inhibition der p38-MAPK sind vielversprechende Angriffspunkte für einen möglichen Arzneistoff.

Der Einfluss von Leptin auf Typ-II-Collagen bei OA scheint ebenso negativ wie für Aggrecan. Bao et al. bestätigten die Proteoglycan-Abnahme im Knorpel nach Leptininjektion in das Kniegelenk von Ratten [183]. Zusätzlich ermittelte die Forschergruppe steigende MMP-2- und MMP-9-Spiegel neben erhöhten ADAMTS-4- und ADAMTS-5-Werten. Darüber hinaus wurde Cathepsin-D erhöht exprimiert, das ebenso eine katabole Rolle im Knorpel einnimmt. Die Autoren folgerten eine primär abbauende Funktion von Leptin. Im Gegensatz dazu sehen Pallu et al. einen dualen Effekt des Adipokins [184]. Zwar wurde auch von ihnen unter Leptineinfluss eine Hochregulierung des Collagen-abbauenden Enzyms MMP-13 beobachtet, jedoch fanden sich auch erhöhte IGF-1 und Typ-II-Collagen-Spiegel bei Adipösen. Die Autoren fanden heraus, dass die Leptin-Antwort BMI-abhängig ausfällt und die Leptinresistenz, wie sie im ZNS bei Adipösen beobachtet wurde, nicht 1:1 für die Peripherie angenommen werden kann. Loeser et al. fassen zusammen, dass im gesunden Gewebe vermutlich die anabolen Effekte von Leptin über IGF-1, BMP-7 und TGF- β vermittelt, dominieren,

wohingegen im hochaktiven Gewebe bei OA die katabolen Effekte überwiegen [185].

Trotz dieser unklaren Funktion von Leptin bei OA war eine Untersuchung dieses Parameters bei der vorliegenden Arbeit von Interesse, da der Einfluss von Pycnogenol® auf das Adipokin noch nicht getestet wurde (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.1 und Kap. 1.4.2). Ebenso sollten die Korrelationen aus der Literatur überprüft werden, um den prädiktiven Wert des BMI auf den Serumleptinspiegel sowie dessen Vorhersagekraft für den Leptinspiegel in der Synovialflüssigkeit beurteilen zu können (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.5.1). Eine weniger invasive Diagnostik wäre die Folge.

3 Zielsetzung der Arbeit

Den positiven Effekten des standardisierten Kiefernrintenextraktes, in Hinblick auf Symptome bei Osteoarthritis, wurde im Verlauf der vorliegenden Arbeit auf den Grund gegangen. Ziel war es, zelluläre Effekte zu erkennen, die die Verbesserung von Gelenkschmerzen, -steifigkeit und –funktionalität erklären könnten. Im Zuge dessen sollten die positiven Wirkungen von Pycnogenol® auch bei der schweren Verlaufsform der Gonarthrose bestätigt werden, da zuvor immer nur die milden Verlaufsformen in die klinischen Studien eingeschlossen wurden. Damit konnte eine genauere Bewertung des Einsatzes des Nahrungsergänzungsmittels im Rahmen der Gelenkerkrankung ermöglicht werden.

Der Hauptteil der Studien zu Pycnogenol® sind *in-vitro*-Experimente. Dabei wird meist der Gesamtextrakt in einer zu hohen Konzentration eingesetzt, die so *in-vivo* im Menschen nicht erreicht werden kann. Ebenso muss man bedenken, dass der Rindenextrakt an sich, niemals vollständig unverändert absorbiert werden würde und an den Wirkort im Knie penetrieren könnte. Deshalb war es wichtig, in den vorliegenden Untersuchungen zu erforschen, ob sich Effekte aus *in-vitro*-Studien auch *in-vivo* nach p.o.-Gabe des Extraktes mit anschließender Verstoffwechslung erzielen ließen. Zudem sollte im Rahmen unserer Untersuchungen erstmalig die Brücke zwischen *in-vitro*-, *ex-vivo*- und *in-vivo*-Untersuchungen geschlagen werden. Diese Art von Experimenten wurde unseres Wissens noch nie zuvor für

Pycnogenol[®] bzw. vergleichbare Pflanzenextrakte und NEM am selben Organismus durchgeführt, stattdessen als *in-vitro*-Versuche mit Nagern, als *in-vivo*-Tierversuche mit Nagern oder als humane Studien zur klinischen Symptombeurteilung einzeln angesetzt. Die gleichzeitige Erfassung von *ex-vivo*-Effekten von entnommenen Gelenkflüssigkeiten und zellulären *in-vivo*-Effekten auf verschiedenen Ebenen, vergesellschaftet mit der Erfassung der klinischen Symptome, war in der vorliegenden Arbeit neuartig.

Zusätzlich sollte mit Hilfe eines *in-vitro*-Modells die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit ausgewählter Bestandteile des Rindenextraktes und eines Metaboliten (M1) bestimmt werden, um eventuell positive Effekte auf das Gehirn beurteilen zu können. Epidemiologische und *in-vitro*- bzw. *in-vivo*-Untersuchungen lassen einen Einfluss von Polyphenolen auf neurologische Erkrankungen vermuten. Anhand der Versuche wurde auch die Aussagekraft von Ergebnissen eines zuvor in einer Kooperation entwickelten *in-silico*-Modells bewertet bzw. überprüft [186].

1 Pharmakodynamische Effekte eines standardisierten Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol®) bei Osteoarthritis

1.1 Klinische Studie zur Ermittlung der Wirkung von Pycnogenol® bei fortgeschrittener Gonarthrose

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit geplante randomisiert-kontrollierte, monozentrische Interventionsstudie wurde in Zusammenarbeit mit dem König-Ludwig-Haus, einem orthopädischen Zentrum in Würzburg, durchgeführt. Insgesamt 30 Probanden wurden randomisiert zu zwei gleich großen Gruppen zugewiesen (n= 15 je Gruppe). Eine Gruppe erhielt zwei Mal täglich 100 mg Pycnogenol®, die weiteren Patienten waren unbehandelte Kontrollen (nähere Details im Experimentellen Teil C, Kap. 1.5). Ziel war die Untersuchung der Pharmakokinetik [62] und Pharmakodynamik des standardisierten Kiefernrintenextraktes Pycnogenol® bei höhergradiger Kniegelenks-OA, um bereits festgestellte symptomlindernde Effekte auf zellulärer Ebene erklären zu können und eventuelle Anreicherungen von Bestandteilen in Körperflüssigkeiten zu entdecken. Eine flavonoidfreie Diät im Rahmen der Studie war notwendig, damit gemessene Effekte ausschließlich dem Nahrungsergänzungsmittel zugewiesen werden konnten und keine Verzerrung durch Nahrungsmiteleinfluss zu Stande kam. Ernährungsverstöße wurden dokumentiert und in die Auswertung der Korrelationen mit einbezogen (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.5.2 und Kap. 1.5.3). Ein möglicher Kritikpunkt an der Studie, das Nichtvorhandensein einer Placebothherapie, kann damit entkräftet werden, dass es sich hierbei um eine hauptsächlich pharmakokinetische Untersuchung handelte und auch die Effekte auf zellulärer Ebene vermutlich nicht durch einen Placeboeffekt hätten verändert werden können. Ein Einfluss ist aber nicht vollständig auszuschließen.

Die Studie wurde durchgeführt, um die durch andere Autoren bereits gezeigten Effekte von Pycnogenol®, in Hinblick auf einen möglichen Mechanismus, erklären zu können (Einleitung A, Kap. 1.5). Die Gewinnung verschiedener Spezimen ermöglichte einen Einblick in das zelluläre Geschehen auf mehreren Ebenen

(Abbildung 11). Dabei war die Gelenkflüssigkeit, auch Synovialflüssigkeit genannt, von besonderem Interesse, da man diese nur zum Zeitpunkt der OP in ausreichender Menge gewinnen kann. Diese Körperflüssigkeit wurde bis jetzt auch noch nicht auf die Wirkungen von Pycnogenol® überprüft, da bei den in den vorangegangenen Studien eingeschlossenen Probanden eine schwächere OA-Form vorlag, die in der Regel keine Indikation für einen Kniegelenksersatz darstellt und eine Gewinnung der Synovialflüssigkeit somit nicht möglich war (Einleitung A, Kap. 1.5).

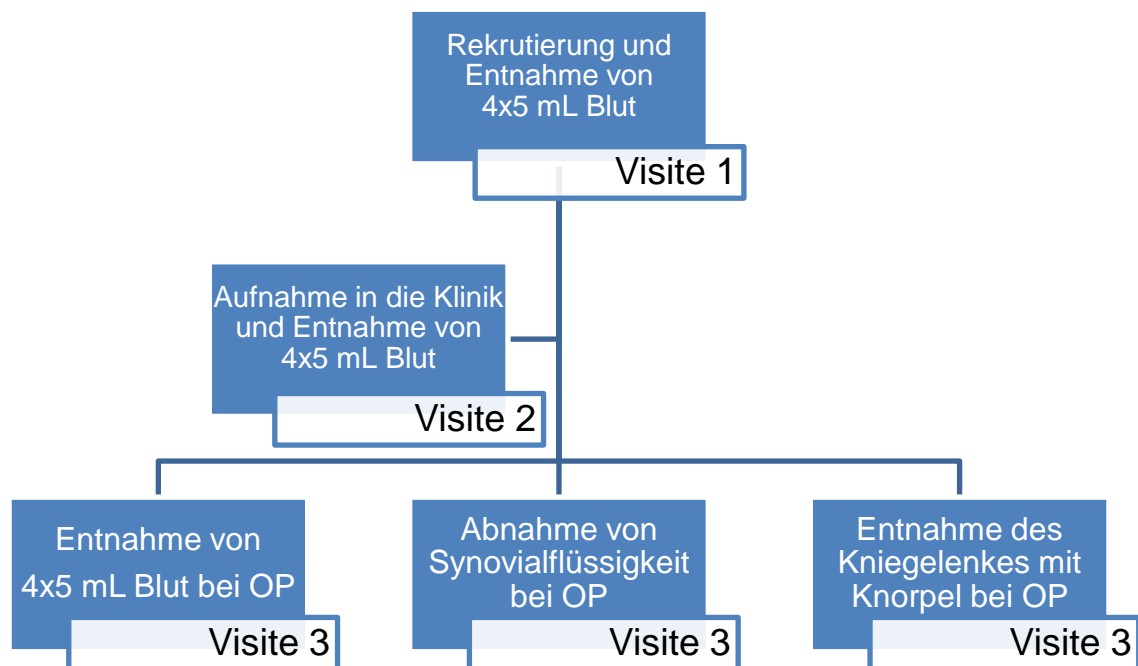


Abbildung 11: Flussdiagramm des Studienverlaufes. Beim Zeitpunkt der Rekrutierung (entspricht Visite 1) wurden dem Patienten vier Röhrchen Blut entnommen. Ebenso zum Zeitpunkt der Aufnahme in die Klinik, hier auch als Visite 2 bezeichnet. Während der Operation (OP) wurden dem Patienten dann erneut 4x5 mL Blut und zusätzlich möglichst viel Gelenkflüssigkeit entnommen. Zudem wurden die Knochen- und Knorpelreste vom Kniegelenksaustausch weiter untersucht.

Die Basischarakteristika der beiden Studiengruppen waren vergleichbar (Tabelle 1).

Tabelle 1: Basischarakteristika der Teilnehmer der Pycnogenol®-Studie. Es war kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen erkennbar ($p > 0,05$).

Parameter	Pycnogenol®	Kontrolle	gesamt
Anzahl	15	15	30
Alter [Jahren]	63,3 ± 7,6	65,3 ± 8,8	64,3 ± 8,2
Körpergröße [m]	1,69 ± 0,10	1,69 ± 0,11	1,69 ± 0,10
Körpergewicht [kg]	90,22 ± 15,95	79,90 ± 24,12	87,33 ± 15,66
BMI [kg/m ²]	30,87 ± 4,72	28,98 ± 4,14	30,74 ± 5,29
Frauenanteil [%]	60	73,3	66,7

Zur Überprüfung der Compliance der Studienteilnehmer in der Pycnogenol®-Gruppe, wurden die Behältnisse der Studienmedikation nach der Operation eingesammelt und die verbliebenen Kapseln gezählt. Ein Fehlen von mindestens 84 Kapseln entsprach einer 100 %igen Therapietreue, da dies ein Indiz für eine durchgängige dreiwöchige Einnahme war. Als ausreichend compliant wurden Patienten mit mehr als 80 %iger Therapietreue akzeptiert. Nur Patient #130 wurde mit 76 % eingenommener Kapseln als unzureichend compliant identifiziert. Dies fand Berücksichtigung in der Bewertung der Ergebnisse. Die durchschnittliche Compliance aller anderen Teilnehmer war mit $99,4 \pm 1,2$ % sehr hoch.

Zusätzlich zur Gewinnung der verschiedenen Spezimen, wurde bei Visite 1 und 2 jeweils der Western Ontario and McMaster Universities (WOMAC)-Score erfasst, um den Verlauf der Symptomatik der Kniegelenksarthrose während der Studie zu erfassen (Details in der Einleitung A, Kap. 1.2). Diese standardisierten Fragebögen sollten einen ersten Hinweis darauf geben, ob der standardisierte Kiefernrintenextrakt positive Effekte in der Studienpopulation zeigen konnte.

1.2 Auswirkung der Einnahme des standardisierten Kiefernextraktes auf die Symptomatik der Gonarthrose

1.2.1 Erfassung der Symptome im Rahmen der Osteoarthritis-Studie

Die Bewertung der klinischen Symptomatik im Rahmen unserer OA-Studie sollte, wie bereits erwähnt, mit Hilfe der Langfassung des WOMAC-Scores durchgeführt werden (Einleitung A, Kap. 1.2). Die validierten Fragebögen wurden von den Teilnehmern der Studie zum Zeitpunkt der Rekrutierung (*Visite 1*) und zum Zeitpunkt der Aufnahme in das Krankenhaus vor der Kniegelenkersatzoperation (*Visite 2*) ausgefüllt und bei den Studienschwestern hinterlegt. Nach Beendigung der Studie wurden die Fragebögen ausgewertet, die Ergebnisse der beiden Gruppen zusammengefasst und Mittelwerte, inklusive Standardabweichungen, der einzelnen Unterkategorien bzw. des Gesamtindex miteinander verglichen. Hierbei wurde der Wilcoxon-Rangsummentest für gepaarte, ordinale Daten angewandt.

1.2.2 Ergebnisse der WOMAC-Score-Erfassung

Im Rahmen der Untersuchung der Schmerzsymptomatik zeigte sich in der Verumgruppe eine leichte Zunahme des Wertes von 51,2 % ($\pm 18,8$ %) auf 52,5 % ($\pm 15,2$ %) und in der Kontrollgruppe eine leichte Abnahme des Wertes von 55,0 % ($\pm 12,5$ %) auf 54,0 % ($\pm 16,7$ %) (Abbildung 12). Die Unterschiede zwischen den Messzeitpunkten waren in beiden Gruppen nicht signifikant ($p > 0,05$).

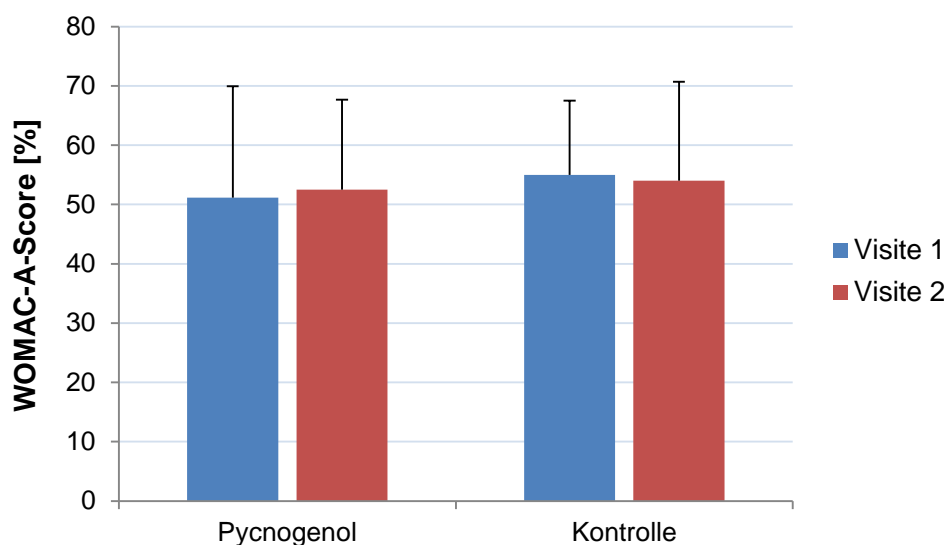


Abbildung 12: Ergebnisse der Ermittlung der Schmerzen in der Pycnogenol®-Studie. Der WOMAC-A-Score zeigte in der Verumgruppe (n= 15) im Mittel eine leichte Zunahme der Schmerzen von 51,2 % auf 52,5 %. Die Untersuchung der Kontrollgruppe (n= 15) zeigte eine leichte Abnahme von 55 % auf 54 %. Diese Entwicklungen waren jedoch auf Grund der hohen Standardabweichungen nicht signifikant ($p > 0,05$).

Beim Unterpunkt Gelenksteifigkeit (WOMAC-B) offenbarte sich in beiden Gruppen eine Abnahme des Wertes von Visite 1 zu Visite 2 (Abbildung 13). In der Pycnogenol®-Gruppe verbesserte sich der Wert von anfangs 60,8 % ($\pm 16,1$ %) auf 55,4 % ($\pm 14,7$ %). In der Kontrollgruppe zeigte sich eine Abnahme von 68,3 % ($\pm 14,8$ %) bei Visite 1 auf 62,1 % ($\pm 15,0$ %) bei Visite 2. Jedoch waren beide Unterschiede nicht signifikant ($p > 0,05$).

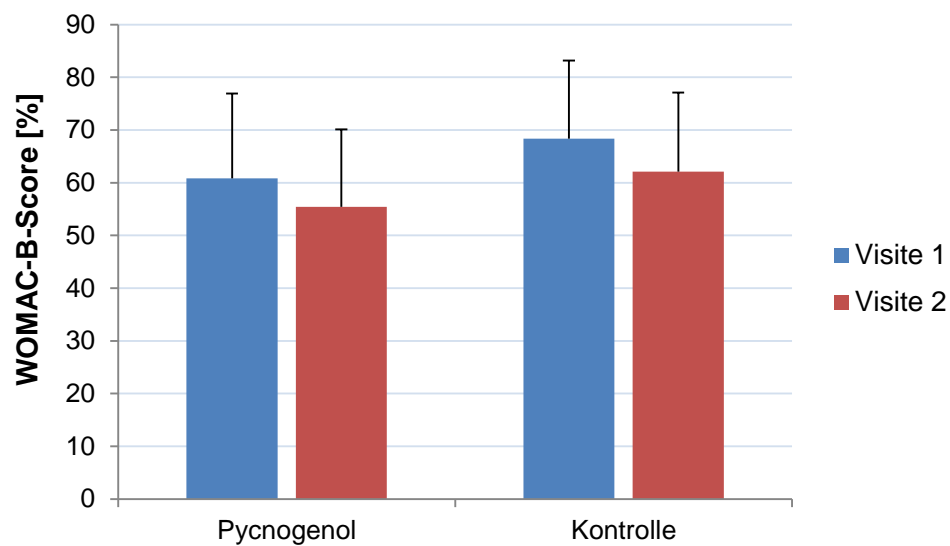


Abbildung 13: Darstellung der Ergebnisse der WOMAC-B-Erfassung im Rahmen der klinischen Studie. Unter Verum (n= 15) zeigte sich eine Abnahme des Wertes von 60,8 % bei Visite 1 auf 55,4 % bei Visite 2. Analog dazu verbesserte sich der Wert von 68,3 % auf 62,1 % in der Kontrollgruppe (n= 15) im gleichen Zeitraum. Die Unterschiede zwischen den beiden Erfassungspunkten waren in beiden Gruppen nicht signifikant ($p > 0,05$).

Der WOMAC-C-Teil zur Beurteilung der Funktionalität des untersuchten Gelenkes demonstrierte in beiden Gruppen eine leichte Zunahme (Abbildung 14), in der Verumgruppe von 49,9 % ($\pm 12,9$ %) auf 51,0 % ($\pm 10,1$ %) und in der Kontrollgruppe von 55,4 % ($\pm 11,5$ %) auf 55,7 % ($\pm 14,3$ %). Auf Grund der hohen Standardabweichungen waren dies jedoch in beiden Gruppen keine statistisch signifikanten Zunahmen ($p > 0,05$).

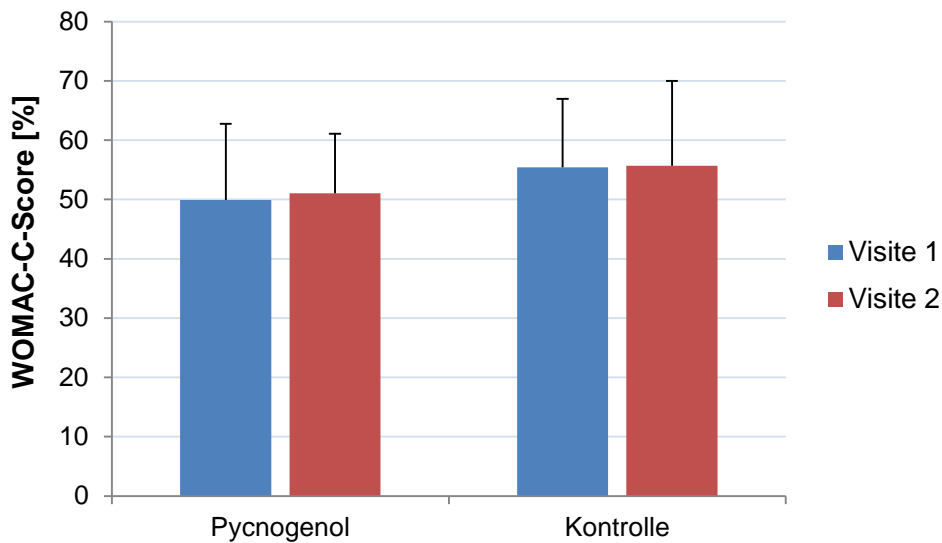


Abbildung 14: Entwicklung des WOMAC-C-Scores zur Erfassung der Funktionalität des von der Erkrankung Osteoarthritis betroffenen Gelenkes im Zeitraum von Visite 1 zu Visite 2 (in etwa drei Wochen). In der Pycnogenol®-Gruppe (n= 15) ist die Zunahme von 49,9 % auf 51,0 % etwas stärker ausgeprägt als die Zunahme des Wertes von 55,4 % auf 55,7 % in der Kontrollgruppe (n= 15). Die Unterschiede waren in beiden untersuchten Gruppen nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$).

Wie sich aus der Einzelbetrachtung der Unterpunkte bereits erahnen lässt, war auch der Gesamtscore nicht signifikant verschieden in den beiden Gruppen zwischen Visite 1 und 2 (Abbildung 15). Einem leichten Anstieg von 51,1 % ($\pm 13,3$ %) auf 51,7 % ($\pm 10,2$ %) in der Verumgruppe stand eine leichte Abnahme des Wertes von 56,4 % ($\pm 10,8$ %) auf 55,9 % ($\pm 13,8$ %) in der Kontrollgruppe gegenüber. Die gezeigten Unterschiede in beiden Gruppen waren nicht signifikant ($p > 0,05$).

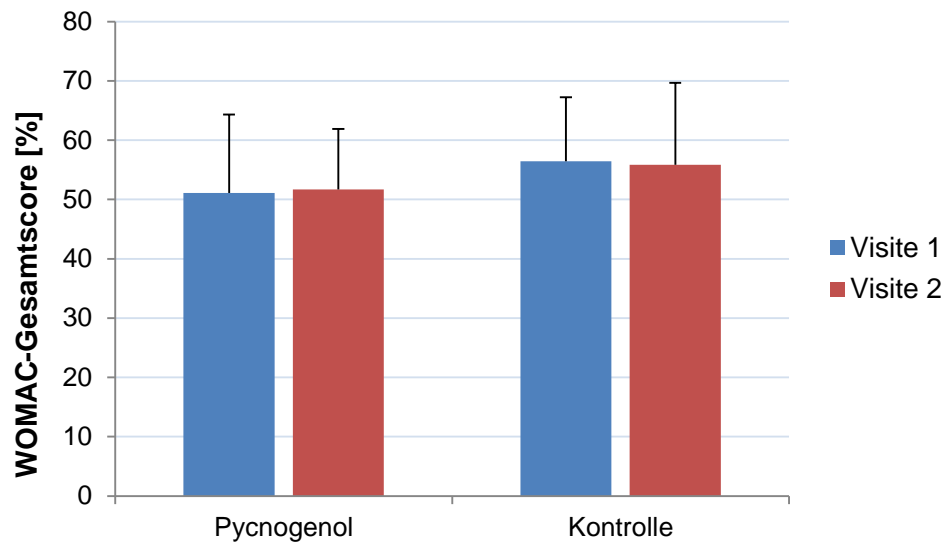


Abbildung 15: Darstellung der Veränderung des WOMAC-Gesamtwertes über die Zeit von Visite 1 zu Visite 2 in den beiden untersuchten Gruppen. Dabei erhöhte sich der Wert in der Pycnogenol[®]-Gruppe (n= 15) leicht von anfangs 51,1 % auf 51,7 %. In der Kontrollgruppe (n= 15) verringerte sich dieser marginal von 56,4 % auf 55,9 %. Beide Unterschiede waren nicht signifikant ($p > 0,05$).

Es wurde somit, insgesamt betrachtet, keine Verbesserung der Symptomatik durch Einnahme von Pycnogenol[®] über mindestens drei Wochen in einer Dosierung von 200 mg Extrakt pro Tag bei Patienten mit schwerer Gonarthrose mit Indikation zum Kniegelenksersatz beobachtet.

1.2.3 Diskussion

Im Vergleich zu den bereits durchgeführten Studien mit Pycnogenol[®] im Indikationsgebiet Osteoarthritis handelte es sich in unserer Studie um schwerwiegende Krankheitsbilder, bei denen ein Kniegelenksersatz angezeigt war. Die Arbeitsgruppen um Farid, Cisár und Belcaro schlossen Patienten mit Kellgren-Lawrence Grad I-II in Ihre Untersuchungen ein, bei uns waren die Schweregrade III-IV als Einschlusskriterium festgelegt [83-85]. Auch die Dauer der Untersuchung unterschied sich, da bei uns die aktive Medikation ca. drei Wochen, bei den anderen Studien drei Monate, eingenommen wurde. Die Dosis an standardisiertem Kiefernextrakt war bei uns am höchsten im Vergleich zu Cisár und Farid mit jeweils 150 mg Rindenextrakt pro Tag und Belcaro mit 100 mg Pycnogenol[®] pro Tag. Ebenso waren die Gruppengrößen in den anderen

Untersuchungen größer, bei Farid geringfügig (19 Verum, 18 Placebo), bei Cisár (50 Verum, 50 Placebo) und Belcaro (77 Verum, 79 Placebo) deutlich. Analog zu Cisár et al. fanden wir keine signifikante Verbesserung beim WOMAC-A-Wert, der die Schmerzsymptomatik erfasst. Dagegen stellten Belcaro et al. eine signifikante Senkung des Wertes unter Verumtherapie fest. Unser WOMAC-B-Wert zeigte, ähnlich wie bei Farid et al., keine signifikante Veränderung. Belcaro et al. ermittelten nach drei Monaten und Cisár et al. nach 8-12 Wochen eine signifikante Verbesserung der Steifigkeit des betroffenen Gelenkes. Eine signifikante Verbesserung der Funktionalität konnten alle drei vorangegangenen Untersuchungen nachweisen, bei Cisár et al. nach 8-14 Wochen. Unsere Werte veränderten sich nicht. Ebenso waren bei allen Autoren, im Gegensatz zu unserer Studie, in der Verumgruppe die Gesamtwerte signifikant erniedrigt.

Es gibt zahlreiche Gründe dafür, dass unsere Studie die in den vorangegangenen Untersuchungen gezeigte Verbesserung der Symptomatik nicht bestätigen konnte. Wie beschrieben, waren Patienten mit einem höheren Krankheitsstadium eingeschlossen worden. Hier könnte die Entzündung schon so weit fortgeschritten sein, dass sich moderate Effekte auf zelluläre Mechanismen nicht direkt in einer Verbesserung der Symptome zeigen. Zusätzlich korrelieren Entzündungsmarkerkonzentrationen im Knorpelgewebe nicht zwangsläufig mit der Schwere der Symptomatik. Weiterhin war die Dauer der Behandlung vielleicht zu kurz, um einen Effekt zu sehen. Bei Belcaro wurde nur nach drei Monaten ausgewertet, dabei zeigten sich dann signifikante Verbesserungen. Im Rahmen der Untersuchungen von Cisár et al. offenbarten sich erst nach acht Wochen erste signifikante Veränderungen. Mit einer längeren Anwendung hätten vielleicht auch wir Veränderungen zwischen den beiden Gruppen in Hinblick auf die Symptomatik sehen können, erst Recht auf Grund der höher gewählten Dosierung. Diese hat sich aber, vermutlich wegen der kurzen Einnahmezeit, nicht auswirken können. Ein weiterer Unterschied lag in den Gruppengrößen. Unsere Patientenzahl (15 Verum, 15 Kontrolle) war vermutlich zu klein, um signifikante Differenzen im WOMAC-Gesamtwert und den Unterpunkten zu zeigen. Da die Studie aber dafür nicht primär angelegt, sondern auf die pharmakokinetischen und pharmakodynamischen Untersuchungen auf Zellebene fokussiert war, wurden

diese Nachteile in Kauf genommen. Der Umstand, dass bei uns kein Placebo verabreicht wurde, also die Medikation unverblindet war, fiel auf Grund fehlender Unterschiede in den Gruppen anscheinend nicht stark ins Gewicht. Ein Einfluss, positiv wie negativ, wäre dennoch denkbar. Deshalb sollte für eine adäquate Beurteilung des WOMAC-Scores immer eine Placebo-Gabe durchgeführt werden. Die Expressionsveränderung verschiedener Gene der Knorpelhomöostase war Gegenstand der vorliegenden Arbeit. Um Veränderungen durch pharmakologische Interventionen in diesem Bereich zu beschreiben, wird in der Literatur häufig die Methodik der quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) verwendet. Zunächst soll grundlegend auf diese Art der Analyse eingegangen werden.

1.3 Effekte von Pycnogenol® auf die Genexpression im Knorpelgewebe

1.3.1 Prinzip der Quantitativen real-time Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) und analytisches Vorgehen nach standardisierten Leitlinien

Die quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (quantitative real-time polymerase Chain Reaction, qPCR) stellt, wie die ursprüngliche PCR-Version von Saiki et al. [187], ein analytisches Verfahren dar, das es ermöglicht, kleinste DNA-Mengen in einer unbekannt Probe zu bestimmen. Damit kann man auch Zielgene untersuchen, die nur schwach in einem Organismus exprimiert werden bzw. ist es möglich, aus kleinsten Probenmengen verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Die Weiterentwicklung durch Higuchi et al. ermöglicht eine Überwachung der Produktmenge noch während des PCR-Prozesses [188]. Mit Hilfe einer willkürlich festgelegten Grenze und der ermittelten Amplifikationseffizienz, erlaubt diese Methode Rückschlüsse auf die Ausgangsprobenmenge. Dies war mit der ursprünglichen Version nicht möglich, da der PCR-Prozess erst im Anschluss an die Reaktion überprüft werden konnte und dabei immer ähnliche Produktmengen bestimmt wurden, unabhängig von der Ausgangsmenge. Je nach Assay ist es heute gar realisierbar, eine einzelne Ausgangskopie zu detektieren.

Fluoreszenzfarbstoffe bzw. fluoreszierende Proben werden zur unmittelbaren Detektion der erzeugten DNA-Doppelstränge verwendet und zeigen meist ein direkt proportional zunehmendes Signal mit der Menge gebildeter Kopien. Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. SYBR®Green, binden unspezifisch an doppelsträngige DNA (dsDNA), genauer gesagt in deren „kleine Furche“. Durch die Einschränkung der Rotation im asymmetrischen Molekül fluoresziert der vorher im ungebundenen Zustand nicht fluoreszierende Farbstoff. Dem Vorteil der Kostenersparnis gegenüber spezifischen Sonden steht der Nachteil der unspezifischen Bindung gegenüber. SYBR®Green bindet nämlich an jegliche dsDNA, also auch an genomische DNA-Verunreinigungen oder Primer-Dimer-Produkte. Durch Mitführen eines Ansatzes, dem bei der Umwandlung von RNA in cDNA keine Reverse Transkriptase zugesetzt wurde, auch noRT-Kontrolle

genannt, können genomische Verunreinigungen ausgeschlossen werden, wenn keine Fluoreszenz im Endansatz messbar ist. Weiterhin können unspezifisch gebildete Primer-Dimer-Produkte mit Hilfe einer Schmelzkurvenanalyse ausgeschlossen werden, die nach jeder PCR durchgeführt werden muss. Entsteht beim Schmelzvorgang nur ein Produktpeak, dann spricht dies dafür, dass nur das Zielgen abgelesen wurde und keine Primer-Dimer-Bildung eingesetzt hat. Ist ein kleiner Peak meist vor oder auch nach dem Hauptpeak erkennbar, dann spricht dies für diese Art von Verunreinigung und der PCR-Prozess bedarf weiterer Optimierung (Abbildung 16).

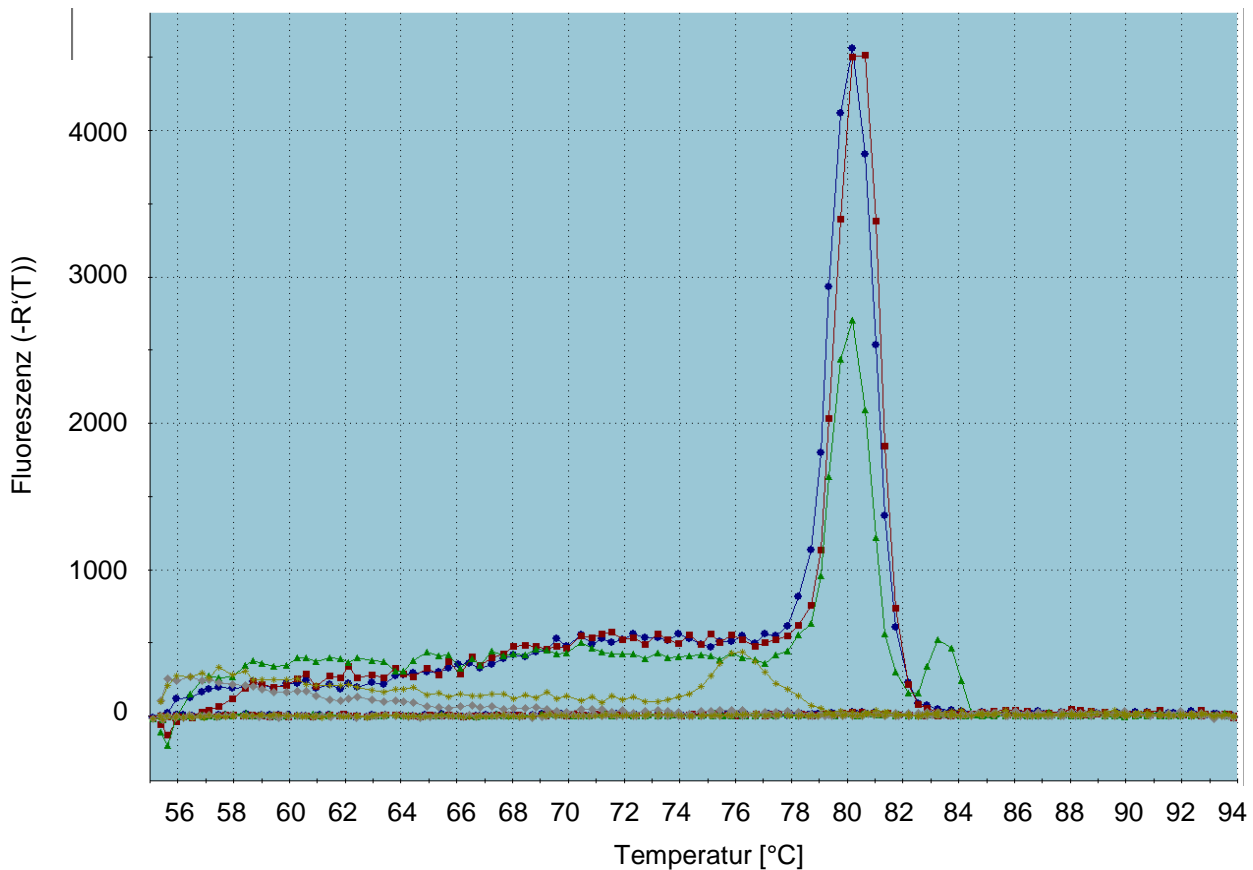


Abbildung 16: Beispielhaftes Ergebnis einer Schmelzkurvenanalyse von vier verschiedenen Ansätzen, die alle das Ziel hatten, das gleiche Zielgen zu exprimieren. Die y-Achse zeigt die Stärke des Fluoreszenzsignals und auf der x-Achse ist die Temperatur in [°C] aufgeführt. Beim roten und blauen Ansatz ist eine spezifische Produktbildung geglückt (Produkt bei ca. 80 °C geschmolzen). Der grüne Ansatz zeigt neben dem Produktpeak einen zweiten Schmelzpeak bei etwa 83 °C. Im gelben Versuchsansatz wurde kein Produkt gebildet, lediglich ein kleiner Schmelzpeak bei 76 °C ist erkennbar. Bei beiden unspezifischen Schmelzpeaks handelt es sich vermutlich um Primer-Dimere.

Eine Amplifikationskurve folgt i.d.R. einem klassischen Verlauf (Abbildung 17). Zunächst befindet sich der Ansatz in einer linearen Basisphase, in der die Produktmenge und folglich das Fluoreszenzsignal zu gering sind, um die Hintergrundfluoreszenz zu überragen [189].

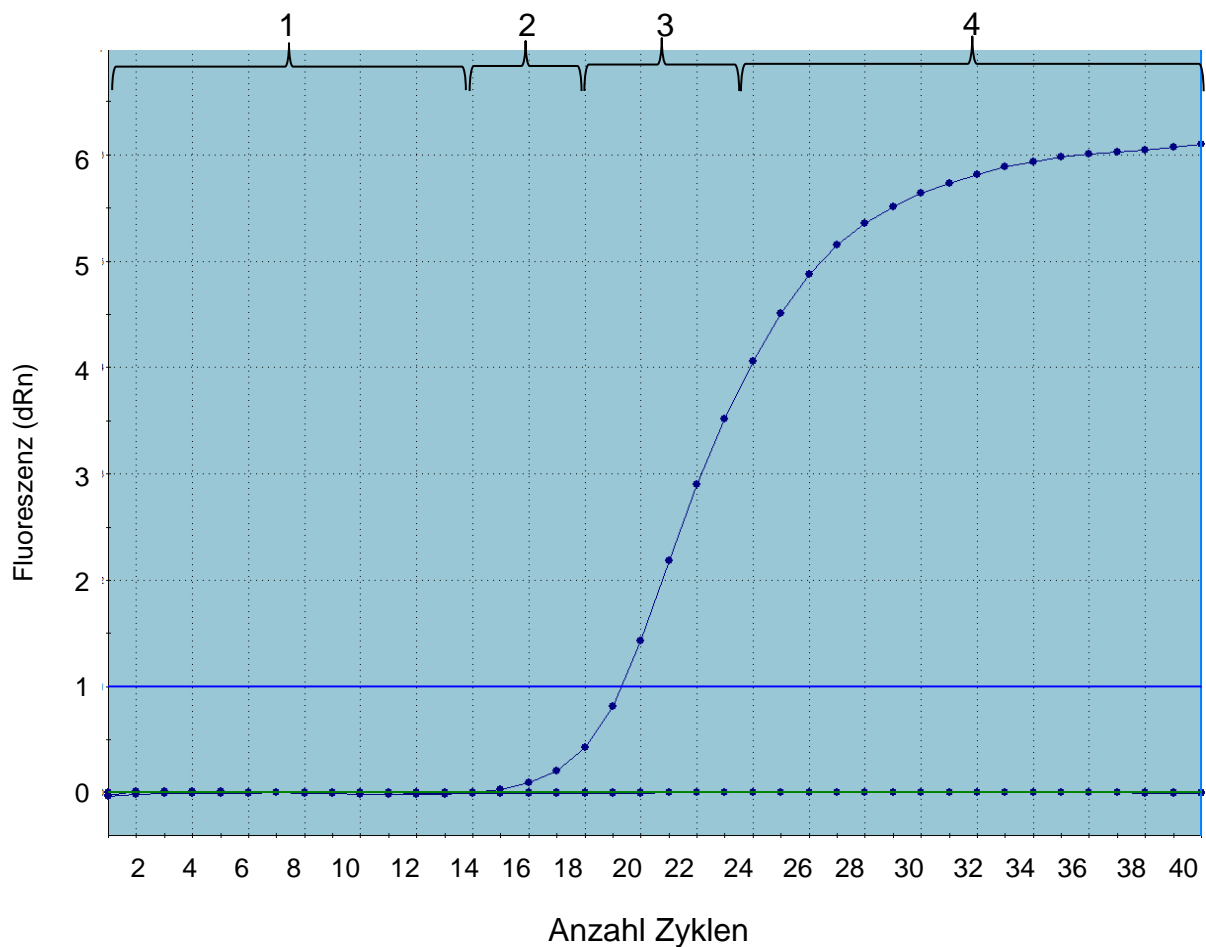


Abbildung 17: Klassischer Verlauf einer PCR-Amplifikationskurve. Vier Phasen sind erkennbar: Die lineare Anfangsphase (1), der daran angrenzende früh exponentielle Teil (2), eine log-lineare Phase (3), in der eine nahezu ideale Verdopplung der jeweiligen Ausgangskopienzahl pro Zyklus stattfindet, und ein abschließendes Plateau (4), während dessen der Prozess aus mehreren Gründen zum Erliegen kommt. Auf der y-Achse ist die Stärke des Fluoreszenzsignals aufgetragen, auf der x-Achse die Zykluszahl, bei welcher das Signal gemessen wurde.

Im sich darin anschließenden frühen exponentiellen Verlauf überschreitet das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal. Den Zyklus, während dessen das Signal eine festgelegte Schwelle übersteigt, die der Experimentator willkürlich festgesetzt hat, bezeichnet man als Schwellenzyklus (cycle threshold, C_T -Wert). Ergebnisse von qPCR-Untersuchungen werden immer als C_T -Werte angegeben. Im dritten Abschnitt, der log-linearen Phase, findet eine nahezu ideale Verdopplung des Ausgangsmaterials pro Zyklus statt. Am Ende geht die Kurve in ein Plateau über, das Fluoreszenzsignal steigt nur noch schwach bzw. überhaupt nicht mehr an.

Gründe hierfür können ein Mangel an Edukten, eine Behinderung des Prozesses durch Produkte und eine Senkung der Polymerase-Aktivität sein.

Weitere Detektionsmöglichkeiten für den Verlauf einer qPCR-Reaktion sind in Form von spezifischen Proben, z.B. TaqMan™-Sonden, vorhanden. Deren höhere Spezifität und Sensitivität erkaufte man sich mit deutlich teureren Materialkosten. Da in der vorliegenden Arbeit nur mit SYBR®Green gearbeitet wurde, soll auf das Detektionsprinzip mit Sonden nicht näher eingegangen werden.

Das Ausgangsmaterial für den PCR-Prozess ist ein cDNA-Templat, das zuvor gewonnen werden muss. Nach Isolierung von Ribonukleinsäure (totale RNA) aus Gewebeproben oder Zellpellets muss diese in komplementäre Desoxyribonukleinsäure (cDNA) umgeschrieben werden, welche dann in verdünnter Form (meist in 1:10-Verdünnung) dem PCR-Ansatz zugegeben wird. Die Bildung dieser cDNA ist ein hochsensibler Vorgang, der auf unterschiedliche Art und Weise stattfinden kann. Entweder finden Random-Hexamer-Primer, verankerte oligodT-Primer oder eine Kombination aus beiden Verwendung. Nach Bustin et al. sind oligodT-Primer spezifischer als Random-Primer und die beste Methode, um eine verlässliche cDNA-Bandbreite zu erzeugen [190]. Der Nachteil, dass nur intakte RNA abgeschrieben werden kann, war in unseren Untersuchungen nicht relevant, da es sich um frische und nicht um archivierte Proben handelte. Die cDNA-Synthese kann dem PCR-Vorgang in einem separaten Ansatz vorgelagert sein (zwei-Stufen-Reaktion) oder im gleichen Ansatz unmittelbar vorher stattfinden. In der vorliegenden Arbeit wurden stets oligodT-Primer für die cDNA-Synthese verwendet und in einem zwei-Stufen-Ansatz gearbeitet (Experimenteller Teil C, Kap. 1.7).

Der finale PCR-Ansatz enthält, neben der cDNA in einer 10-fach-Verdünnung, eine festgelegte Menge an Master-Mix, der zur Vermeidung von Variationen zwischen den Ansätzen, industriell vorgefertigt gekauft wurde, und für jedes Zielgen passende Primer (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.2). Mit sterilem Wasser wird jeder Ansatz zu einem festen Volumen aufgefüllt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde im 20 µL-Maßstab gearbeitet.

Um Ergebnisse mehrerer verschiedener Ausgangsmaterialien vergleichen zu können, bedarf es einer einheitlichen Quantifizierung. Es gibt zwei Möglichkeiten,

ein qPCR-Ergebnis zu quantifizieren: relativ oder absolut. Für eine exakte, also absolute Angabe der vorhandenen Kopienzahl benötigt man eine Standardkurve, die mit einer hochreinen Referenz bekannter Konzentration erzeugt wurde. Da solche Standards nur schwierig und kostenintensiv zu erhalten sind, stellt die relative Quantifizierung die gängige Praxis im Rahmen von qPCR-Versuchen dar und wurde auch im Rahmen dieser Arbeit angewendet. Im Zuge dieser Methode wird die Expression eines Zielgens auf die Expression von einem Referenzgen oder mehreren Referenzgenen normalisiert. Diese Gene müssen im untersuchten Gewebe bei der vorliegenden Art von Erkrankung von Probe zu Probe möglichst konstant exprimiert werden und dürfen auch durch die Behandlung nicht beeinflusst werden, um einen verlässlichen Bezugspunkt für die relative Quantifizierung darzustellen [191]. Da deren Expression jedoch von Gewebe zu Gewebe und von Mensch zu Mensch zum Teil deutlich variieren kann, es also faktisch kein ideales Referenzgen für alle Anwendungen gibt [190], empfehlen gängige Leitlinien und aktuelle Forschungsberichte die Normalisierung gegen mehr als nur ein Referenzgen [192, 193]. Die Anzahl der nötigen Referenzgene muss dabei individuell für jede Untersuchung bestimmt werden. Daher ist es zwingend erforderlich, dass vor einer Genexpressionsstudie für dieses Gewebe und für die vorliegende Erkrankung eine Housekeeping-Gen-Validierung durchgeführt wird, um passende Referenzen zu bestimmen (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.3). Nur damit sind zuverlässige biochemische Aussagen möglich [194, 195]. Die einfache Auswahl eines beliebigen Referenzgenes wird in Fachkreisen nicht länger toleriert, da die Ergebnisse zwischen einem validierten und einem frei gewählten Referenzgen signifikant variieren könnten [196, 197]. Biologische Falschaussagen wären dann denkbar. Laut Kubista et al. kann das Risiko für die Auswahl solch ungeeigneter Referenzgene minimiert werden, indem man Gene mit unterschiedlicher metabolischer Funktion auswählt [198].

Die erhaltenen C_t -Werte der Zielgene werden folglich auf die C_t -Werte der Referenzen normiert. Mit Hilfe einer entsprechenden Software können alle Verhältnisse miteinander kombiniert werden. Dafür wurde in der vorliegenden Arbeit das Programm REST2009[®] von Pfaffl et al. verwendet [199]. Diese Software ermöglicht zusätzlich die Einbeziehung der tatsächlichen Effizienz der

PCR-Prozesse. Diese liegt im Idealfall bei 100 %, sprich, es findet pro Zyklus eine ideale Verdopplung des Eduktes statt. In der Realität ist diese aber meist nicht 100 %, sondern pendelt sich im Bereich um 90 % ein. Eine Bestimmung der Effizienz der Amplifikation jedes Zielgens, auch der Referenzgene, ist deshalb unerlässlich (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.4).

Auf Grund der Einfachheit, der hohen Spezifität und Sensitivität der Methode, wird die qPCR in vielen Untersuchungen als Mittel der Wahl verwendet. Um Verzerrungen im Bereich der Dokumentation zu vermeiden, ist es notwendig, festzulegen, welche Angaben in Veröffentlichungen erforderlich sind, um Experimente miteinander vergleichen zu können. Daher entwickelten Bustin et al. eine allgemein gültige Leitlinie, die minimale Mengen an aufzuführenden Informationen beschreibt [192]. Die Planungen der Versuche für die vorliegende Arbeit orientierten sich an diesen Vorgaben. Generell war eine sehr genaue Auflistung jeglicher verwendeter Materialien und von Versuchsparametern erforderlich, um eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu verschiedenen Laboratorien und Analytikern zu ermöglichen (für Details siehe Tabelle 1 in [192] und Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.2 bzw. Kap. 1.3.3).

1.3.2 Primerentwurf und Primerkonzentrationstests

Zur Erzeugung eines optimalen qPCR-Ergebnisses ist es notwendig, ideal auf die jeweiligen Zielgene abgestimmte Primer zu entwerfen. Im Folgenden wurde eine Primerentwurfs-Software mit dem Namen „PrimerBLAST™“ verwendet [200], in die die wichtigsten Eigenschaften des zu entwerfenden Primers eingepflegt wurden (siehe Tabelle 11 in Experimentellem Teil C, Kap. 1.7.2). Der große Vorteil dieser Software liegt in der Kombination zweier wichtiger Schritte. Zunächst werden die Primer, auf Basis mehrerer Parameter, mit dem Werkzeug „Primer3“ entworfen, um dann mit dem Programm „BLAST“ auf ihre Spezifität hin überprüft zu werden. Die anderen vorhandenen Programme auf dem Markt können immer nur einen dieser Schritte separat ausführen. Im Anschluss wurden diese Primer extern hergestellt. Im Rahmen der Primerkonzentrationstests wurden die Oligonucleotide auf Verlässlichkeit geprüft. Eine weitere Möglichkeit, gute Primer zu erhalten, ist das Zurückgreifen auf schon validierte Primer, die in der offen

zugänglichen Datenbank „RTPrimerDB“ veröffentlicht wurden [201]. Dabei hätte man den Vorteil, dass diese Oligonucleotide für die jeweiligen Ziele schon getestet wurden, jedoch auch das Risiko der fehlerhaften Veröffentlichung. Eine falsch aufgeführte Base könnte schon zu einem fehlerhaften PCR-Vorgang führen.

Nach dem Entwurf passender Primer (Tabelle 2), mussten deren ideale Konzentrationen im Ansatz bestimmt werden, um einen möglichst effizienten PCR-Vorgang ohne Primer-Dimer-Bildung zu gewährleisten (Ergebnisse siehe Tabelle 12 in Experimentellem Teil C, Kap. 1.7.4). Dieser Schritt wird auch in der relevanten Leitlinie gefordert [192].

Tabelle 2: Basensequenzen der verwendeten Primer für die qPCR-Analytik der Probandenproben (Chondrozyten aus Knorpelgewebe) im Rahmen der Pycnogenol®-Studie.

Primer-Typ	Länge [bp]	Basensequenz [5'→ 3']
GAPDH forward	20	CGC TCT CTG CTC CTC CTG TT
GAPDH reverse	20	CCA TGG TGT CTG AGC GAT GT
ACTB forward	18	TGA GCG CGG CTA CAG CTT
ACTB reverse	22	TCC TTA ATG TCA CGC ACG ATT T
18sRNA forward	20	GCC TGC GGC TTA ATT TGA CT
18sRNA reverse	20	ACC AGA CAA ATC GCT CCA CC
HPRT-1 forward	22	AGC CAG ACT TTG TTG GAT TTG A
HPRT-1 reverse	21	ACT GGC GAT GTC AAT AGG ACT
B2M forward	25	AAG ATA GTT AAG TGG GAT CGA GAC A
B2M reverse	23	AAT TCA TCC AAT CCA AAT GCG GC
SDHA forward	22	AGA CCT AAA GCA CCT GAA GAC G
SDHA reverse	24	CTC ATC AAT CCG ACC TTG TAG TC
Leptin forward	24	AGG GTT GGG TTC ATC TGA GCA AGA
Leptin reverse	24	CTC AGG GCA ACA CCA TTG CAA ACA
MMP-1 forward	20	TGG ACC TGG AGG AAA TCT TG
MMP-1 reverse	20	GGT ACA TCA AAG CCC CGA TA
MMP-3 forward	24	AGG CAA GAC AGC AAG GCA TAG AGA
MMP-3 reverse	24	ACG CAC AGC AAC AGT AGG ATT GGA
MMP-13 forward	22	TGG AAT TAA GGA GCA TGG CGA C
MMP-13 reverse	20	ACC TAA GGA GTG GCC GAA CT
IL-1β forward	24	AAT CTC CGA CCA CCA CTA CAG CAA

IL-1 β reverse	24	AAG GGA AAG AAG GTG CTC AGG TCA
ADAMTS-5 forward	24	ACA AGA GCC TGG AAG TGA GCA AGA
ADAMTS-5 reverse	24	TGA TGC CCA CAT AAA TCC TCC CGA
CathepsinK forward	20	TTC CCG CAG TAA TGA CAC CC
CathepsinK reverse	20	GGA ACC ACA CTG ACC CTG AT

Um zu kontrollieren, ob eine relevante Primer-Dimer-Bildung im Ansatz vorlag, wurde jeweils am Ende der 40 PCR-Zyklen eine Schmelzkurve in 0,5 °C-Schritten von 55 °C bis 95 °C aufgenommen. Falls darin nur ein Schmelzpeak vorhanden war, konnte man von einer spezifischen Produktbildung ohne Vorliegen unspezifischer Nebenprodukte ausgehen (Abbildung 18).

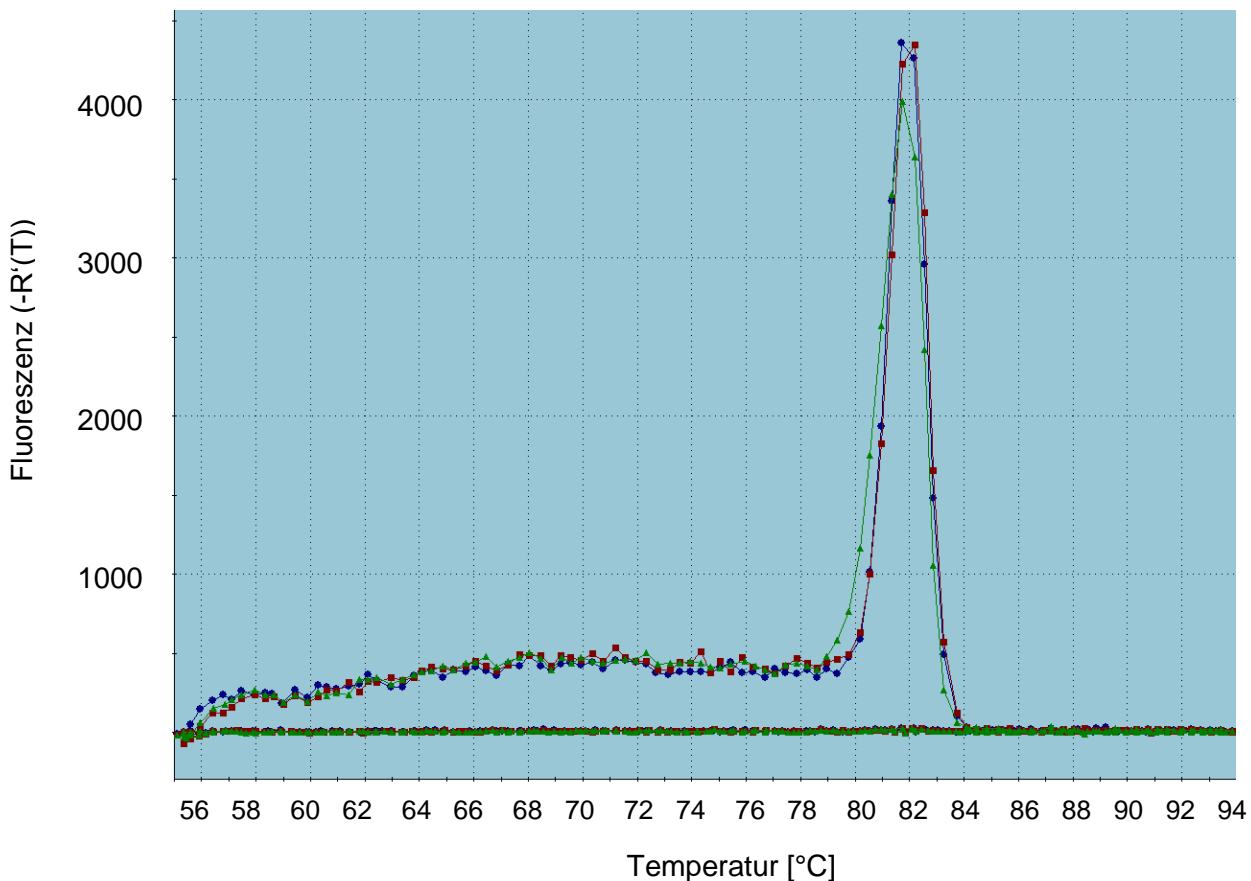


Abbildung 18: Beispielhafte Darstellung von Schmelzkurven nach einer Amplifikation von MMP-3 (n= 3). Auf der y-Achse ist die Fluoreszenzintensität und auf der x-Achse die dazugehörige Temperatur [°C] aufgetragen. Alle Kurven zeigen nur einen Schmelzpeak. Daher kann in diesem Fall von einer spezifischen Produktbildung ausgegangen werden.

1.3.3 Housekeeping-Gen-Validierung

Auf Basis von Untersuchungen anderer Forschergruppen, die Wirkungen von Chondroprotektiva auf das Knorpelgewebe untersucht haben und im Rahmen dieser Studien Housekeeping-Gen-Validierungen für das Knorpelgewebe bei Osteoarthritis durchgeführt haben, wurden in der vorliegenden Arbeit die Expression der Gene für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), für β -Actin (ACTB), für β_2 -Mikroglobulin (B2M), für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-1 (HPRT-1), für 18S RNA (18sRNA) und für die Flavoprotein-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase (SDHA) erforscht (Tabelle 3) [194, 202]. Dafür wurden im Rahmen der Pycnogenol[®]-Studie fünf Knorpelgewebeproben untersucht (n= 5) (siehe Experimenteller Teil C, Kap. 1.7.5).

Tabelle 3: Untersuchte Referenzgene zur Normalisierung der Zielgenexpression im Knorpelgewebe der Probanden der Pycnogenol[®]-Studie und deren Funktion im menschlichen Organismus [191]. Die im Endeffekt ausgewählten Referenzgene sind fett markiert.

Genname	Abkürzung	Funktion
Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase	GAPDH	Glycolyse (katalysiert Umwandlung von Glycerinaldehyd-3-phosphat zu 1,3-Bisphosphoglycerat)
β-Actin	ACTB	Strukturprotein; Bestandteil des Zytoskeletts
β_2 -Mikroglobulin	B2M	Lösliche Protein-Untereinheit des Haupthistokompatibilitätskomplexes I
Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-1	HPRT-1	Purinstoffwechsel (Wiederverwertung von Purinbasen)
18S RNA	18sRNA	Ribosomale RNA der 40 S-Untereinheit der 80 S-Ribosomen
Succinat-Dehydrogenase (SDH) (Flavoprotein-Untereinheit)	SDHA	Citratzyklus (katalysiert Oxidation von Succinat zu Fumarat)

Hierbei wurden die Gene HPRT-1, SDHA und B2M mit Hilfe der BestKeeper[®]-Software als die verlässlichsten Housekeeping-Gene identifiziert (Tabelle 4) [203].

Tabelle 4: Ergebnis der Housekeeping-Gen-Validierung, ausgewertet mittels BestKeeper™-Software [203]. Aufgeführt werden für alle Housekeeping-Gene die Anzahl Gewebeprobe(n) (n), der geometrische Mittelwert (geom. Mittelwert), das arithmetische Mittel (arithm. Mittelwert), der minimale (Min) und maximale (Max) C_t-Wert, die Standardabweichung (Sdv) und der Variationskoeffizient (CV). Alle Daten werden als C_t-Werte angegeben. In roter Farbe sind diejenigen Standardabweichungen markiert, die laut Software zu hoch ausgefallen sind.

	GAPDH	ACTB	18SRNA	HPRT-1	B2M	SDHA
n	5	5	5	5	5	5
Geom. Mittelwert [C_t]	23,17	23,85	25,01	27,64	21,44	26,83
Arithm. Mittelwert [C_t]	23,21	23,87	25,05	27,65	21,47	26,84
Min [C_t]	21,42	22,40	23,45	26,42	19,96	25,87
Max [C_t]	25,34	25,34	27,63	28,56	22,41	28,01
Sdv [± C_t]	1,27	1,03	1,27	0,74	0,88	0,76
CV [% C_t]	5,49	4,32	5,07	2,67	4,12	2,83

Auch in der graphischen Auswertung als Box-und-Whisker-Schaubild zeigten sich diese drei Gene als am geringsten variabel (Abbildung 19).

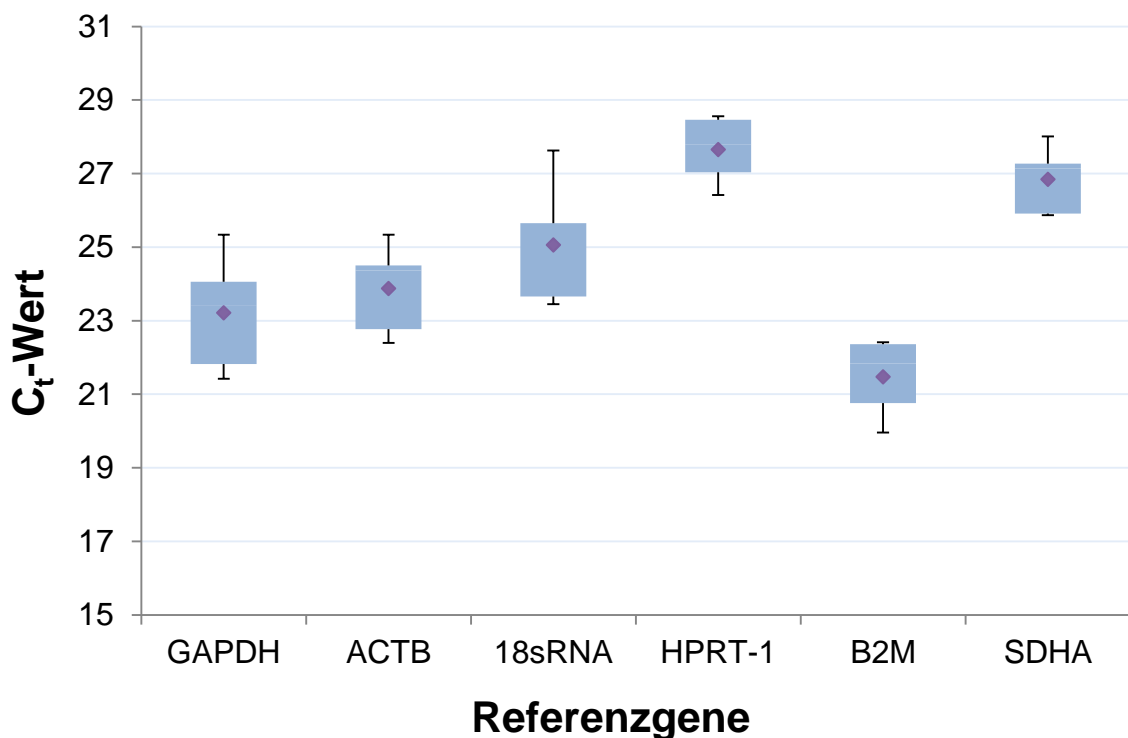


Abbildung 19: Box-und-Whisker-Schaubild der Ergebnisse der Housekeeping-Gen-Validierung für Knorpelgewebeproben (n= 5) aus dem Kniegelenk von OA-Patienten. Aufgetragen sind die erhaltenen C_t -Werte gegen die einzelnen Referenzgene. Die vertikalen Linien begrenzen das 95 %- und das 5 %-Quantil („Whisker“). Die „Box“ stellt den Interquartilsabstand zwischen 75 %- und 25 %-Quantil dar. Die Raute symbolisiert das arithmetische Mittel. Die Referenzgene mit der geringsten Varianz der C_t -Werte stellen die verlässlichsten Referenzen dar.

Da in einer Vielzahl der Publikationen zu Untersuchungen an Knorpelgewebe bei Osteoarthritis ACTB als Housekeeping-Gen angewendet wird bzw. wurde, fand dieses, statt des leicht konstanter exprimierten B2M, als drittes Referenzgen Verwendung, um einen Vergleich zur Literatur herstellen zu können (u.a. [204]). Im Rahmen der Vermessung der Studienproben wurde die Tauglichkeit dieses Referenzgens nochmals genau überprüft und bestätigt (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.5).

Mit der durchgeführten Housekeeping-Gen-Validierung wurde die Grundlage zur Ermittlung valider qPCR-Ergebnisse in der vorliegenden Arbeit geschaffen. Die Ergebnisse offenbarten auch, dass das häufig als einziges Referenzgen zur Untersuchung von Knorpelgewebe eingesetzte GAPDH die größten

Schwankungen zwischen den einzelnen Proben offenbarte und somit zumindest für unsere Untersuchungen nicht in Frage kam. Diese große Schwankung macht auch deutlich, dass die willkürliche Auswahl einer Referenz, v.a. wenn sie den einzigen Bezugspunkt darstellt, die Aussage der Genexpressionsergebnisse deutlich verzerren kann.

1.3.4 Effizienzbestimmung

Neben der Primer-Wahl und der Referenzgen-Validierung ist es auch wichtig, die Effizienz des Amplifikationsprozesses eines jeden Zielgens zu bestimmen, da man nicht von einer idealen Verdopplung des Ausgangsmaterials pro Zyklus ausgehen kann (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.1 und Näheres zur Berechnung im Experimentellen Teil C, Kap. 1.7.6) [205]. In der vorliegenden Arbeit wurden, je Zielgen, drei Standardkurven von Verdünnung V1 (1:10) bis Verdünnung V3 (1:1000) in Dreifachreplikaten aufgenommen (Abbildung 20) und deren Mittelwert als tatsächliche Amplifikationseffizienz für die Berechnungen in der REST2009[®]-Software verwendet (Tabelle 5). Alle berechneten Werte lagen im akzeptablen Bereich von 80-100 %. Damit konnte von einer ausreichenden Effizienz der qPCR-Prozesse ausgegangen werden.

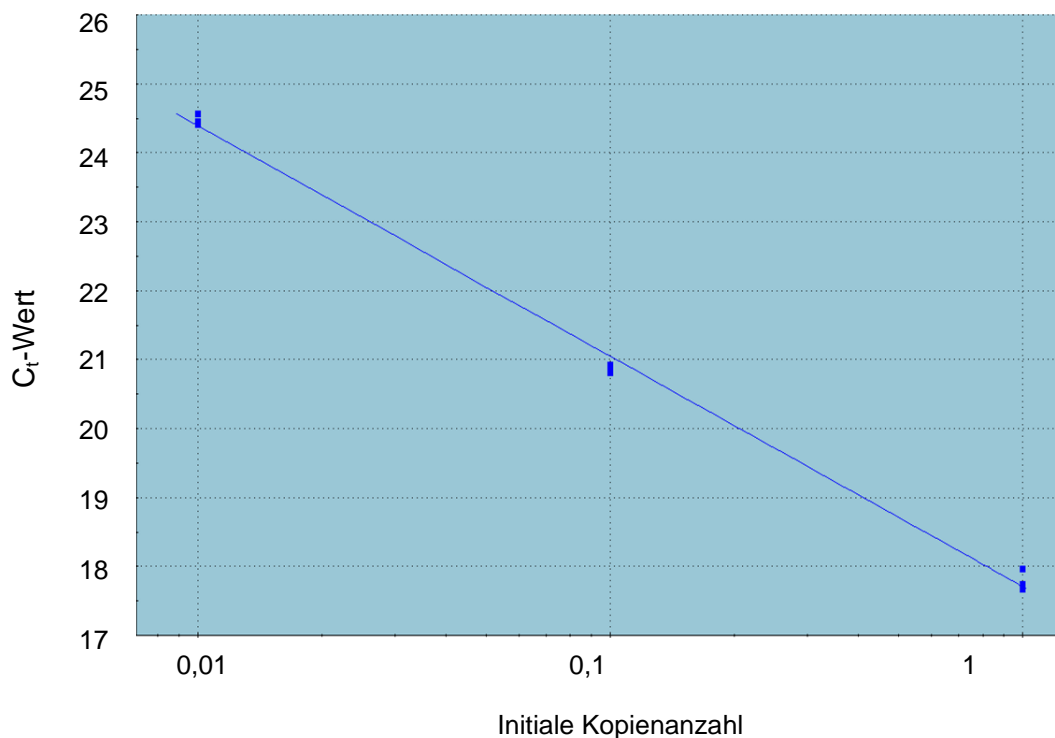


Abbildung 20: Beispiel einer MMP-3-Standardkurve von Verdünnung V1 bis Verdünnung V3. Auf der x-Achse ist die initiale Anzahl an Genkopien und auf der y-Achse der dazugehörige C_t-Wert aufgetragen. Für jeden Geradenpunkt wurden drei Messungen durchgeführt (n= 3). Die aus der Steigung berechnete Effizienz betrug hier 99,3 %.

Tabelle 5: Ermittelte Effizienzen für die relevanten Ziel- und Referenzgene. Die angegebenen Werte entsprechen dem Mittelwert aus drei Standardkurven von Verdünnung V1 bis Verdünnung V3 (je n= 3).

Zielgen	Effizienz [%]	Standardabweichung [%]
MMP-1	96,77	10,2
MMP-3	99,27	1,55
MMP-13	95,27	4,10
Leptin	90,57	4,91
IL1 β	91,97	4,84
ADAMTS-5	96,97	3,85
Cathepsin K	99,87	0,64
ACTB	92,97	5,25
HPRT-1	96,93	3,67
SDHA	93,40	3,06

1.3.5 Ergebnisse der qPCR-Untersuchungen

Die Eignung der drei ausgewählten Housekeeping-Gene für die Auswertung wurde bei der Vermessung der Studienproben mit der BestKeeper™-Software überprüft [203]. Dabei erwies sich SDHA als das am wenigsten verlässliche Housekeeping-Gen bei allen Zielstrukturen (beispielhaft an Hand der ADAMTS-5-Analyse aufgelistet in Tabelle 6, restliche Daten nicht aufgeführt).

Tabelle 6: Ergebnis der Überprüfung der Zuverlässigkeit der HKG bei der Vermessung von ADAMTS-5 mit der BestKeeper™-Software. SDHA zeigte eine Standardabweichung (Sdv) von mehr als einem C_t-Wert und war daher als Referenz nicht ausreichend verlässlich. Mit roter Farbe ist diejenige Standardabweichung markiert, die laut Software zu hoch war.

	ACTB	HPRT-1	SDHA
n	28	28	28
Geom. Mittelwert [C _t]	24,77	28,75	28,82
Arith. Mittelwert [C _t]	24,80	28,77	28,86
Min [C _t]	22,64	26,71	26,60
Max [C _t]	26,77	30,94	32,56
Sdv [\pm C _t]	0,91	0,97	1,31
CV [% C _t]	3,67	3,39	4,55

Auf Grund dessen wurden die Ergebnisse der Genexpressionen jeweils mit und ohne SDHA als Referenz berechnet und sollen im Folgenden für jedes Zielgen separat aufgeführt werden. Dies entspricht dem Vorgehen nach Leitlinie [192]. Ausreißer wurden mit Hilfe der GraphPad-Prism™-Software identifiziert. Die Genexpressionen wurden mit der REST2009®-Software von Pfaffl et al., unter Beachtung der ermittelten Effizienzen, berechnet (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.4) [199]. Grundlage der statistischen Analyse war ein „Pair Wise Fixed Reallocation Randomisation Test®“. Vorteil dieses zweiseitigen Tests ist die fehlende Notwendigkeit einer Annahme der Normalverteilung der Daten, da eine Aussage zur Normalverteilung meist nicht verlässlich möglich ist.

Alle untersuchten Matrix-Metalloproteinasen zeigten im Mittel eine Herunterregulierung ihrer Genexpression in der Verumgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. Bei MMP-1 ergab sich ein Expressionsverhältnis von 0,290 [0,009; 8,331] (Abbildung 21). Der Unterschied zwischen den Gruppen war jedoch nicht signifikant ($p=0,178$). Nach Elimination des am wenigsten stabilen Referenzgens, SDHA, resultierte ein niedrigeres Verhältnis von 0,234 [0,005; 10,058]. Auf Grund der hohen Variabilität der Verhältnisse war der Unterschied zwischen den beiden untersuchten Gruppen nicht signifikant ($p=0,148$). Durch Ausschluss von Patient #130 (Non-Compliance; Allgemeiner Teil B, Kap. 1.1) wurde die Tendenz der Herunterregulierung verstärkt sichtbar. Es resultierten relative Genexpressionen von 0,225 [0,001; 85,797] bzw. 0,179 [0,000; 128,828] nach zusätzlichem Ausschluss von SDHA. Die Unterschiede blieben statistisch nicht signifikant ($p=0,089$ bzw. $p=0,092$).

Das Zielgen MMP-3 wurde, ähnlich dem MMP-1, weniger stark exprimiert. Das Expressionsverhältnis lag bei 0,547 [0,146; 1,823] (Abbildung 21) bzw. bei 0,442 [0,087; 1,977] nach Nichtberücksichtigung des Housekeeping-Gens SDHA in der Auswertung. Die beiden untersuchten Sachverhalte offenbarten jedoch keine signifikanten Unterschiede, auch wenn nach Auslassen von SDHA eine Tendenz zur Herunterregulierung erkennbar war ($p=0,112$ bzw. $p=0,07$).

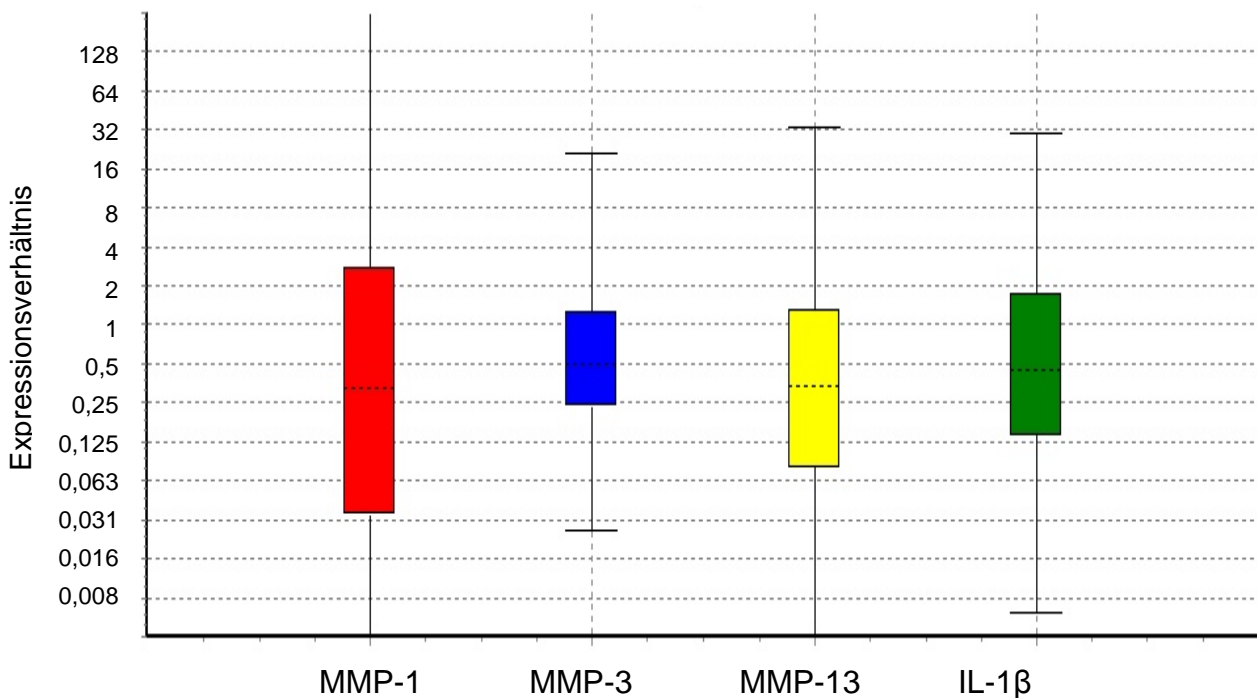


Abbildung 21: Darstellung der Genexpressionsverhältnisse von MMP-1, -3, -13 und IL-1 β zu den drei HKG ACTB, HPRT-1 und SDHA. Alle Zielgene waren absolut deutlich herunterreguliert in der Pycnogenol[®]- im Vergleich zur Kontrollgruppe (je n= 14). Auf Grund der großen Sdv sind die Unterschiede jedoch nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$).

Nach Ausschluss eines zuvor identifizierten Ausreißers (Patient #119, Kontrolle), war der Unterschied zwischen den beiden Gruppen mit einem Wert von 0,469 [0,051; 3,495], unter Einschluss aller Housekeeping-Gene in die Berechnung, signifikant ($p = 0,026$). Wenn man nun noch zusätzlich das instabil exprimierte SDHA nicht für die Berechnungen berücksichtigte, wurde die Signifikanz noch deutlicher ($p = 0,015$). Das Gen wurde nur noch zu einem Prozentsatz von 36,7 % des Kontrollwertes exprimiert (0,367 [0,026; 3,552]) (Abbildung 22). Man konnte also von einer signifikanten Herunterregulierung von MMP-3 in der Pycnogenol[®]-Gruppe sprechen. Wenn man zusätzlich Patient #130 für die Auswertung ausließ, wurde der Effekt von Pycnogenol[®] verstärkt sichtbar. Genexpressions-Verhältnisse von 0,427 [0,048; 3,110] bzw. 0,329 [0,025; 3,035] nach Ausschluss von SDHA waren die Folge. Die Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen waren statistisch signifikant (je $p = 0,01$).

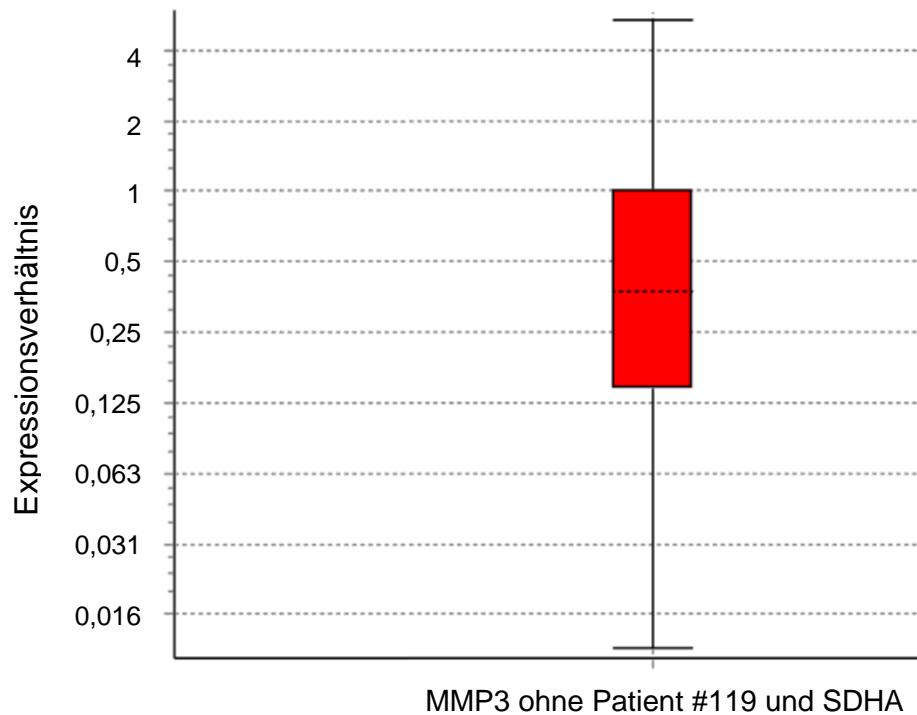


Abbildung 22: Box-und-Whisker-Schaubild der vergleichenden Untersuchung der Genexpression von MMP-3 in Verum- und Kontrollgruppe. Normiert wurden die Ergebnisse jeweils auf die Expression von ACTB und HPRT-1. Das Housekeeping-Gen SDHA wurde hier nicht berücksichtigt, genauso wenig floss der Wert des Patienten #119 mit in die Berechnung ein, da dieser zuvor als Ausreißer identifiziert wurde. Auf der y-Achse ist das Expressionsverhältnis Verum (n= 14) zu Kontrolle (n= 13) aufgetragen. Es zeigte sich nach Pycnogenol®-Einnahme eine Reduktion auf 36,7 % der MMP-3-Expression in Relation zur Kontrollgruppe.

Im Rahmen der Untersuchung des Gens, das für MMP-13 kodiert, wurde auch eine Senkung der Expression offenbar. Das Expressionsverhältnis war 0,327 [0,030; 3,322] mit (Abbildung 21) und 0,265 [0,018; 3,460] ohne SDHA in der Berechnung. Beide Vergleiche erreichten zwar keine statistische Signifikanz in den Unterschieden ($p= 0,093$ bzw. $p= 0,058$), zeigten jedoch eine klare Tendenz zur Herunterregulierung in der Verumgruppe. Bei Ausschluss des Patienten #130 kam es zur Verstärkung der beobachteten Tendenz. Die relative Genexpression war 0,339 [0,008; 5,489] bzw. 0,292 [0,003; 8,698] bei Nicht-Berücksichtigung von

SDHA. Die Unterschiede waren signifikant ($p=0,04$ mit SDHA) bzw. zeigten eine deutliche Tendenz ($p=0,051$ ohne SDHA).

Die Untersuchung des proinflammatorischen Zytokins IL-1 β offenbarte eine Senkung der Expression in der Verumgruppe auf ein Verhältnis von 0,465 [0,072; 2,891] mit (Abbildung 21) bzw. 0,376 [0,059; 2,423] ohne SDHA. Beide Unterschiede waren statistisch nicht signifikant, zeigten jedoch Tendenzen zur Herunterregulierung des Zielgens ($p=0,123$ bzw. $p=0,078$). Unter Ausgrenzung von Patient #130 entstand ein deutlicheres Bild. Die relativen Genexpressionen betragen 0,433 [0,021; 8,406] mit und 0,359 [0,013; 7,112] ohne SDHA in der Auswertung. Erstgenannter Unterschied war nicht, letztgenannter war statistisch signifikant ($p=0,06$ vs. $p=0,05$).

Die Cysteinprotease Cathepsin K wurde in den vorliegenden Experimenten schwach herunterreguliert. Unter Einbezug von SDHA auf 0,770 [0,174; 3,670] (Abbildung 23) und nach Ausschluss von SDHA auf 0,622 [0,143; 2,991].

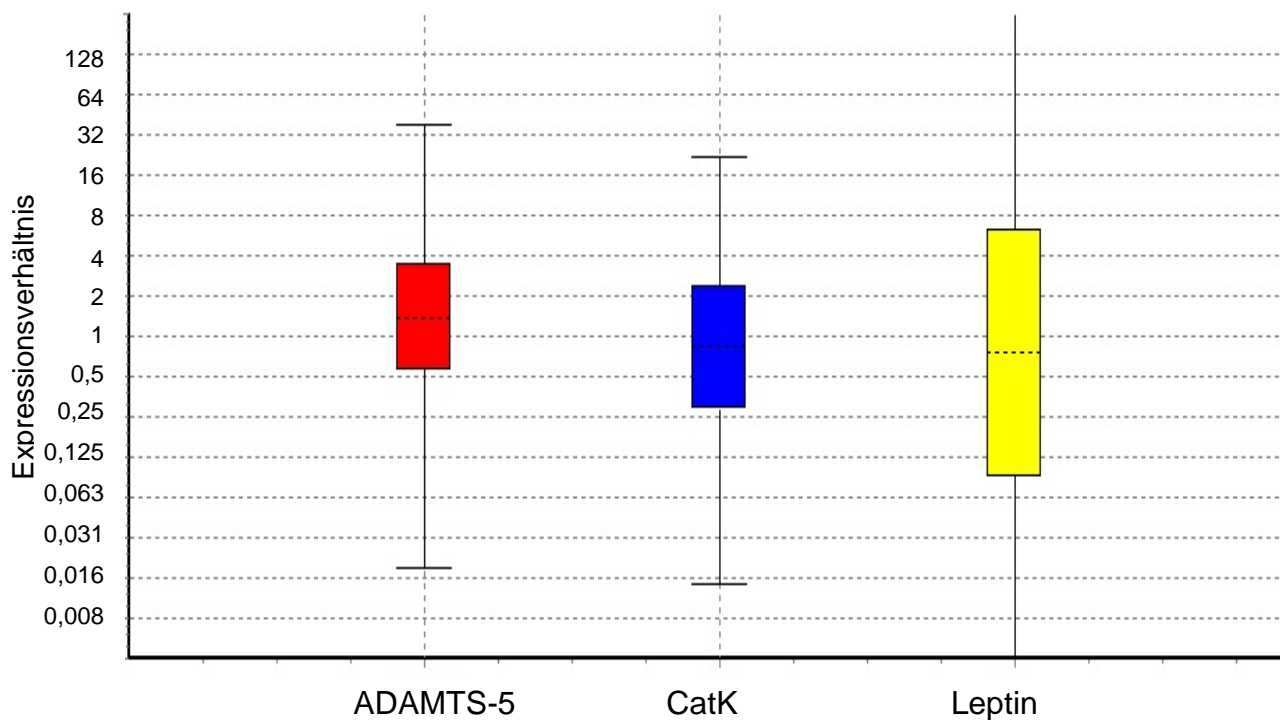


Abbildung 23: Expressionsverhältnisse von ADAMTS-5, Cathepsin K und Leptin unter Einbezug aller drei HKG. Cathepsin K und Leptin sind leicht herunterreguliert und ADAMTS-5 leicht hochreguliert in der Verum- im Vergleich zur Kontrollgruppe (je n = 14). Keiner der Unterschiede zwischen den Gruppen war statistisch signifikant ($p > 0,05$).

Der Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen war jedoch in beiden Fällen nicht signifikant ($p= 0,545$ bzw. $p= 0,248$).

Die einzige schwache Tendenz zur Hochregulierung wurde bei ADAMTS-5 gezeigt. Hier zeigte sich ein Verhältnis von 1,274 [0,335; 4,947] mit (Abbildung 23) bzw. 1,030 [0,305; 3,793] ohne SDHA in der Auswertung. Diese Sachverhalte offenbarten keine signifikanten Unterschiede zwischen Verum- und Kontrollgruppe ($p= 0,551$ bzw. $p= 0,939$).

Die Untersuchung der Expressierung des Zielgens Leptin zeigte keinerlei Tendenzen in Richtung Hoch- bzw. Herunterregulierung. Dafür variierten die Verhältnisse zu stark. Ohne SDHA zeigte sich ein Verhältnis von 0,586 [0,023; 13,899] (Abbildung 23), mit SDHA eines von 0,725 [0,035; 19,872]. Beide Expressionsunterschiede waren nicht signifikant ($p > 0,05$).

1.3.6 Diskussion

Nach unserem Wissen ist die vorliegende Arbeit die Erste, die sich mit den Effekten von Pycnogenol[®] auf die Genexpression im Knorpelgewebe beschäftigt hat. Im Rahmen der Experimente wurden gängige Parameter des Knorpelabbaus untersucht (Einleitung A, Kap. 2.1). Es zeigten sich hierbei z.T. deutliche Senkungen der Genexpression, v.a. bei den Matrix-Metalloproteinasen, den Hauptabbauenzymen von Typ-II-Collagen (Einleitung A, Kap. 2.1 und Kap. 2.2). Meist waren dabei nur Tendenzen erkennbar; bei MMP-3 nach Elimination eines Ausreißers jedoch auch ein signifikanter Zusammenhang. Dies überraschte, da die Studie mit der geringen Teilnehmerzahl von insgesamt 30 Probanden für die Detektion eines signifikanten Unterschieds nicht ausgelegt, sondern primär als Pharmakokinetik-Studie geplant war (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.1). Untermuert wurde die Bedeutung der Expressionssenkung von MMP-3 auf den Collagen-Abbau durch die beobachtete signifikante Korrelation zwischen der relativen Genexpression von MMP-3 und der Konzentration des Abbaumarkers CTX-II in der Synovialflüssigkeit (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.5.4). Auch die Tendenzen zur Herunterregulierung von MMP-1 (auf 23,4 %), MMP-13 (auf 26,5 %) und IL-1 β (auf 37,6 %) können als deutliches Signal eines positiven Effektes von Pycnogenol[®] auf die Knorpelhomöostase gewertet werden. Die Messungen der Expressionen

von Cathepsin K, ADAMTS-5 und Leptin zeigten solch starke Standardabweichungen, dass eine Aussage zu einer Wirkung des standardisierten Kiefernrintenextraktes auf die Genexpression dieser Zielgene an Hand der vorliegenden Arbeit nicht möglich war. Größer angelegte Studien sind dafür zwingend erforderlich.

Die Durchführung der Chondrozytenisolierung aus Knorpelgewebe (Experimenteller Teil C, Kap. 1.6) entsprach den gängigen Vorgaben der Literatur [72, 206, 207]. Zur Untersuchung der Genexpression im betroffenen Knieknorpel wurden die frisch isolierten Zellen direkt eingefroren und für die weitere RNA-Extraktion verwendet. Auf Grund der geringen Menge an Zellen, und folglich RNA, im Knorpelgewebe, wurden teilweise nur 250 ng bzw. 500 ng totale RNA zur cDNA-Synthese eingesetzt, statt der vom Hersteller des Kits (Roche) empfohlenen Menge von 1 µg (Experimenteller Teil C, Kap. 1.7.1). Dies entspricht aber der gängigen Praxis in der Untersuchung dieses Gewebes [208, 209]. Es wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit, analog zu erfolgreichen Berichten aus der Literatur, auch versucht, totale RNA aus dem Knorpelgewebe direkt zu isolieren [210-212], um den Isolierungsschritt mit Typ-II-Collagenase zu vermeiden. Es konnte jedoch keine ausreichende Menge gewonnen werden (Daten nicht aufgeführt). Es wird in der Literatur diskutiert, ob der Verdau mit Typ-II-Collagenase einen Einfluss auf die Genexpression der Chondrozyten hat. Martin et al. sahen einen solch negativen Einfluss des Verdaus mit der Folge einer veränderten Genexpression im Vergleich zu direkt verwendetem Knorpelgewebe [213]. Hingegen berichteten Eid et al. von einer konstanten Genexpression wichtiger Marker, nach Verdau des Gewebes, in frisch isolierten Zellen [214]. Ein großer Schwachpunkt der beschriebenen Experimente lag jeweils in der Verwendung nur eines Housekeeping-Gens zur relativen Quantifizierung der qPCR-Ergebnisse. Diese Art der Auswertung ist nicht *lege artis* [192]. Das verwendete Referenzgen GAPDH wurde zudem schon als unzuverlässig für manche Art von Untersuchungen bewertet und offenbarte auch in unserer Housekeeping-Genvalidierung die am wenigsten konstante Expressierung aller untersuchter Referenzgene (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.3) [196, 202, 215]. Eine abschließende Bewertung des Einflusses eines Verdaus mit Typ-II-Collagenase

auf den Chondrozytenphänotyp lässt sich bis jetzt nicht treffen. Es verdichten sich jedoch die Anzeichen, dass eine Kultivierung von Chondrozyten in Monolayern, nach Isolierung aus dem Knorpelgewebe, eine Veränderung der Genexpression bewirkt [206, 216, 217]. Der Chondrozyten-Phänotyp ändert sich zu einem fibroblastenähnlichen Typ. Die Typ-II-Collagensynthese wird zu Gunsten der Typ-I-Collagensynthese herunterreguliert, wodurch es zu einem Ungleichgewicht kommt. Diesen Schritt bezeichnet man auch als „Entdifferenzierung“. Durch Einbetten der isolierten Chondrozyten in Agarose- bzw. Alginatgele kann eine Redifferenzierung bewirkt werden [206, 217, 218]. Jedoch sind diese Ansätze nicht immer erfolgreich [216]. Auf Grund der beschriebenen Veränderung des Zell-Phänotyps während der Kultivierung wurde in der vorliegenden Arbeit nur auf frisch isolierte Zellen zur RNA-Extraktion zurückgegriffen.

Weiterhin gilt es bei der Interpretation der Ergebnisse zu berücksichtigen, dass es Unterschiede in der Genexpression zwischen normalem und OA-Knorpel gibt. Yagi et al. beobachteten z.B. einen signifikant geringeren sGAG-Gehalt im Knorpel bei fortgeschrittener OA im Vergleich zu nicht betroffenem Gewebe [219]. Auf Genexpressionsebene wurde eine Herunterregulierung der Gene für Aggrecan, MMP-3, -9 und -13 gezeigt. Bei Typ-II-Collagen konnte, auf Grund hoher Standardabweichungen, kein Unterschied festgestellt werden. Martin et al. sahen ebenso eine geringere Aggrecan-Expression und zusätzlich eine veränderte Typ-II-Collagenexprimierung zu Gunsten einer einsetzenden Typ-I-Collagensynthese [213]. Dies lässt, laut Autoren, auf einen Umbau hin zu einem fibrösen Knorpel bei OA schließen, welcher die Funktionen des hyalinen Knorpels nicht mehr aufrechterhalten kann. Im Gegensatz dazu sprechen Eid et al. und Gebhard et al. von einem Erhalt des Chondrozyten-Phänotyps während der Entwicklung einer OA [214, 220]. Zwar wurde eine Erhöhung der Syntheserate bei OA beobachtet, jedoch veränderte sich das Collagen-Typ-Verhältnis nicht, was ein Indiz für einen Phänotyp-Wandel wäre. Diese Begebenheiten muss man insofern berücksichtigen, als dass man in der vorliegenden Arbeit den Knorpel von OA-Patienten untersucht hat, in deren Gewebe die Expressierung mancher Gene, im Vergleich zu gesundem Knorpel, verändert sein kann. Eine positive Wirkung auf die Genexpression durch Pycnogenol® würde im gesunden Knorpel also

vermutlich weniger stark ausfallen. Da in der vorliegenden Studie jedoch nur eine Aussage zur Wirkung bei fortgeschrittener OA gemacht werden sollte und beide Gruppen dieses Einschlusskriterium erfüllten, sind die möglichen Genexpressionsunterschiede zwischen gesundem und OA-Knorpel hier nur Nebensache.

Wie bereits beschrieben, werden die Zellen des Knorpelgewebes im Normalzustand, auf Grund fehlender vaskulärer Versorgung, nur durch die einströmende Synovialflüssigkeit ernährt (Einleitung A, Kap. 2.1). Deshalb kann ein potentieller Wirkstoff nur Effekte zeigen, wenn er in ausreichendem Ausmaß in die Gelenkflüssigkeit penetrieren kann. Im Rahmen unserer klinischen Studie gelang, mit Hilfe der hochsensitiven LC/MS-MS-Analytik, das erste Mal der Nachweis von Inhaltsstoffen von Pycnogenol® in der Synovialflüssigkeit von Probanden mit Kniegelenks-Osteoarthritis [62]. Hierbei konnte gar eine Anreicherung diverser Inhaltsstoffe in dieser Körperflüssigkeit, im Vergleich zum Blutserum, bestimmt werden. Eine lokale Wirkung, wie unsere Ergebnisse zur Genexpression im Knorpelgewebe andeuten, scheint daraus ableitbar. Im späten Erkrankungs-zustand ist zusätzlich eine Penetration der Inhaltsstoffe über das Blut in den Knorpel möglich, da der subchondrale Knochen zunehmend vaskularisiert wird und das angrenzende Knorpelgewebe versorgt.

Um nach Erreichen des Wirkorts Effekte ausüben zu können, müssen die Substanzen außerhalb an die Zelle „andocken“ oder gar in die Zellen aufgenommen werden können. Wie bereits für Erythrozyten und auch für Kapillarendothelzellen im Rahmen dieser Arbeit bewiesen (Allgemeiner Teil B, Kap. 2.6), wird der aktive Metabolit des (+)-Catechins, der M1, über GLUT-1-Transporter ins Zellinnere aufgenommen und kann dann dort seine positiven Wirkungen entfalten [60]. Diese Aufnahmeroute scheint auch bei Chondrozyten möglich zu sein. Ohara et al. bewiesen nämlich das Vorhandensein von GLUT-1-5-Transportern in Chondrozyten von Ratten [221]. Vor allem im hypertrophen Zustand, der im Rahmen der Osteoarthritis-Erkrankung meist vorliegt, waren die Transporter, auf Grund des hohen Verbrauchs an Energie, stark exprimiert. Dies würde eine gesteigerte Aufnahme des M1 während OA bedeuten, die mit einer hohen intrazellulären Konzentration einhergehen könnte. Ein Nachweis dieser

Aufnahmeroute könnte in näherer Zukunft, analog den Durchführungen zum cEND-*in-vitro*-Modell, erfolgen (Experimenteller Teil C, Kap. 2.6).

Die antiinflammatorischen Effekte von Pycnogenol[®] konnten schon vielfältig gezeigt werden. In unserer Arbeitsgruppe wurde in *ex-vivo*-Versuchen mit Plasma, nach Einnahme von 200 mg des standardisierten Kiefernrintenextraktes über fünf Tage, eine Hemmwirkung auf die Entzündungsmediator produzierenden Enzyme COX-1 und -2 gezeigt [222]. Dieser Effekt war schon 30 min nach einmaliger Einnahme von 300 mg des Extraktes messbar. Grimm et al. wiesen weiterhin eine Radikalfängereigenschaft des Metaboliten M1 nach und unabhängig davon auch eine Inhibition der Freisetzung von MMP-1, -2 und -9 aus humanen Monozyten durch die Metaboliten M1 und M2 [223]. Diese Hemmwirkung war gar stärker als die des Gesamtextraktes. Canali et al. demonstrierten in *ex-vivo*-Versuchen mit humanen polymorphkernigen Leukozyten von Probanden nach Einnahme von 150 mg des Pycnogenols[®] über fünf Tage eine Hemmung der 5-Lipoxygenase- und COX-2-Expression neben einer gesenkten Phospholipase A2-Aktivität [224]. Eine reduzierte Leukotriensynthese mit reflektorischer COX-1-Hochregulierung war die Folge. Weiterhin wurde von einer anderen Forschergruppe eine hemmende Wirkung des Gesamtextraktes auf die TNF- α -induzierte Höherregulierung der Adäsionsmoleküle VCAM-1 und ICAM-1 festgestellt, was ein Indiz für eine antiinflammatorische Wirkung darstellt [225]. Die Autoren machten die Radikalfängereigenschaft des Extraktes dafür verantwortlich. Der Abfang der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) O_2^- und H_2O_2 durch die Bestandteile des Extraktes führte ihrer Meinung nach zu einer geringeren NF- κ B-Expimierung und in der Folge dessen zu einer geringeren Bildung der Adhäsionsmoleküle. Analog zu unseren Ergebnissen, wiesen Cho et al., in *in-vitro*-Versuchen mit LPS-stimulierten RAW264.7-Maus-Makrophagen, eine reduzierte IL-1 β -mRNA-Synthese durch Pycnogenol[®] nach [226]. Die Unterschiede zur Kontrolle waren hier signifikant. Auch in Chondrozyten und synovialen Fibroblasten konnten die antiinflammatorischen Effekte von Pycnogenol[®] bereits *in-vitro* gezeigt werden. Peng et al. demonstrierten, nach einem Entzündungsstimulus mit Monouratkristallen, in Chondrozyten und Fibroblasten eine COX-2- und IL-8-Expressionshemmung und in Chondrozyten zusätzlich eine Reduktion der iNOS-

Expression durch Pycnogenol[®] [72]. Die Bedenken zu dieser Untersuchung wurden bereits geäußert (Einleitung A, Kap. 3). Ein möglicher Mechanismus der Hemmung der MMP-Expression durch Pycnogenol[®] in Chondrozyten könnte eine Verhinderung der NF-κB-Aktivierung sein. Dies wurde bereits in Makrophagen von Ratten gezeigt [227]. Zusätzlich wurde in unserer Arbeitsgruppe eine *ex-vivo*-Hemmung der Freisetzung von MMP-9 und gleichzeitig der Aktivierung von NF-κB in humanen Monozyten durch Plasma aus Blutproben von Probanden gezeigt, welche nach wiederholter Einnahme von Pycnogenol[®] entnommen wurden [228]. Vergleichbar mit unseren vorliegenden Ergebnissen zu Pycnogenol[®], wurden auch für diverse andere pflanzliche Stoffgemische bereits, neben den bereits beschriebenen Wirkungen, positive Effekte auf die Genexpression im Knorpelgewebe gezeigt (Einleitung A, Kap. 1.5). Jedoch wurden diese Beobachtungen noch nie, wie in unserer Studie, *in-vivo* am Menschen bestätigt.

Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), das am häufigsten vorkommende und biologisch aktivste Catechin aus grünem Tee, hat *in-vitro* diverse positive Effekte auf die Genexpression primärer humaner Chondrozyten. Ahmed et al. zeigten z.B., neben einer gesteigerten Entwicklungsfähigkeit der Zellen selbst, eine Hemmung der COX-2- und iNOS-Expression und in der Folge eine gesenkte NO- und PGE₂-Produktion in mit IL-1β-stimulierten Chondrozyten durch Vorinkubation mit EGCG [66]. Ebenso bestätigte die Forschergruppe eine direkte Radikalfängereigenschaft des Catechins. Singh et al. demonstrierten, dass die Expressionssenkung der iNOS durch eine Stabilisierung des NF-κB-IκB-Komplexes ausgelöst wird, die eine Translokation des Transkriptionsfaktors in den Zellkern verhindert, in dem dieser die Transkription proinflammatorischer Mediatoren fördert [229]. Ahmed et al. wiesen ergänzend nach, dass die Hemmung der Aktivierung von NF-κB in Chondrozyten ebenso eine Inhibition der Expression von MMP-1 und v.a. MMP-13 zur Folge hat [230]. Zusätzlich wurde in den Versuchen eine Senkung der sGAG-Freisetzung aus Knorpelimplantaten unter EGCG-Einfluss festgestellt. Rasheed et al. untersuchten den Einfluss von EGCG auf die von AGEs vermittelte Induktion der TNF-α- und MMP-13-Expression und erkannten eine deutliche Inhibition durch das Catechin [67]. Ein positiver Effekt auf die altersbedingte OA ist deshalb denkbar. Akhtar et al.

bestätigten die gesamten positiven Effekte von EGCG durch eine Analyse von dessen Einfluss auf die Expression von über 80 Zytokinen, die in einer Herunterregulierung aller untersuchter Marker, z.B. von IL-6 und IL-8, resultierte [69]. Leong et al. bestätigten die berichteten positiven Effekte des EGCG auf die Genexpression im Knorpelgewebe *in-vivo* in ihrem Mausmodell [231]. Insgesamt betrachtet waren alle Versuche mit EGCG *in-vitro*-Ansätze oder *in-vivo*-Versuche an Tieren mit hohen Konzentrationen, die so *in-vivo* im Menschen nicht erreichbar sind. Laut Autoren wäre aber durchaus eine lokale Anwendung der Substanz, zur Prävention oder Therapie der Osteoarthritis, möglich. Ein positiver Eingriff des Catechins ins Entzündungsgeschehen ist durchaus erkennbar.

Resveratrol, das in Trauben und Rotwein enthalten ist, hat nachgewiesene antiinflammatorische, antioxidative, antiproliferative und anabole Wirkungen. Die Forschergruppe um Im konnte mehrfach positive Effekte des Resveratrols, auf die Genexpression im Knorpelgewebe, *in-vitro* und *ex-vivo* nachweisen [78, 232]. Dabei zeigte sich, nach Stimulation des jeweiligen Modells mit IL-1 β , eine reduzierte Expression von MMP-13, ADAMTS-4 und ADAMTS-5 durch Resveratrol, im Vergleich zur Kontrolle. Ebenso konnte eine gesteigerte Proteoglycan-Synthese in den Ansätzen mit Resveratrol nachgewiesen werden. Auch hier ist, laut Autoren, jedoch nur eine lokale Injektion zur Beeinflussung der Pathogenese von OA sinnvoll, da oral über die Nahrung solche Mengen an Resveratrol nicht aufgenommen werden könnten. Shakibaei et al. konnten die chondroprotektiven Effekte dieses Polyphenols bestätigen [233]. Es zeigte sich eine signifikante Hemmung des IL-1 β -induzierten Typ-II-Collagen-Abbaus. Für Resveratrol liegen jedoch, ebenso wie für grünen Tee, keine klinischen Studien vor. Damit ist der Vergleich mit den Ergebnissen von Pycnogenol[®], aus unseren Untersuchungen, schwierig.

Weitere Stoffe bzw. Stoffgemische wie Piperin aus *Piper nigrum*, *Caesalpinia sappan*-Extrakt oder das synthetische Triterpenoid CDDO zeigten *in vitro* chondroprotektive Eigenschaften [234-236]. Es gibt, wie man aus den Erläuterungen schließen kann, eine große Anzahl an Stoffen bzw. Stoffgemischen, die sich positiv auf die Pathogenese von OA *in-vivo* auswirken könnten. Der große Vorteil der natürlichen Substanzen ist zumeist das gute Risikoprofil. Groß

angelegte Studien müssen diese positiven Effekte jedoch erst *in-vivo* bestätigen, um einen flächenmäßigen Einsatz in der OA-Prävention bzw. –Therapie zu rechtfertigen.

Unsere Ergebnisse zur Genexpression liefern einen ersten Hinweis auf die zellulären Geschehnisse, nach Einnahme von Pycnogenol[®], im Knorpelgewebe von OA-Patienten. Zahlreiche Entzündungsmarker bzw. am Knorpelabbau beteiligte Marker wurden in ihrer Expression gehemmt. Ein positiver Effekt auf die Knorpelhomöostase ist deshalb wahrscheinlich. Die Ergebnisse müssen aber zunächst mit Vorsicht betrachtet werden, da translationale und posttranslationale Modifikationen, sowie endogene Inhibitoren, einen Einfluss auf die Aktivität der Enzyme haben, der anhand der Genexpressionsstudien nicht ersichtlich ist [237]. Zum Beispiel werden die MMPs meist auf Gen- und Proteinebene reguliert, wohingegen die Aggrecanasen auf Genebene stabil exprimiert werden, um dann auf posttranslationaler Ebene beeinflusst zu werden [132]. Die Beurteilung Letzterer sollte also vorwiegend auf Proteinebene erfolgen. Ebenso ist bei beiden Enzymfamilien der proteolytische Aktivierungsschritt der Enzymvorformen noch zu berücksichtigen [237].

Um die Wirkungen des Extrakts auf die Genexpression auch auf Proteinebene bestätigen zu können, wurden die Konzentrationen interessanter Marker in Serum und Synovialflüssigkeit der Probanden der Studie bestimmt. Damit sollte ein umfassender Überblick der Effekte des standardisierten Kiefernridenextraktes auf die Pathogenese der OA erhalten werden.

1.4 Direkter Einfluss von Pycnogenol® auf die Konzentration von Markern der Knorpelhomöostase in Serum und Synovialflüssigkeit

1.4.1 Effekte von Pycnogenol® nach dreiwöchiger Einnahme auf die Konzentration von diversen Markern der Knorpelhomöostase im Serum

In unserer klinischen Studie wurden zu drei Zeitpunkten Blutproben entnommen (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.1). Im Folgenden wurden je Proband die Konzentrationen im Serum von Visite 1 (vor Einnahme) und Visite 2 (im Steady state der Einnahme von Pycnogenol®) bestimmt. An Hand der Konzentrationsveränderung diverser Marker der Knorpelhomöostase im Serum sollten Rückschlüsse auf die zellulären Effekte von Pycnogenol® bei OA gezogen werden. Die Gruppen wurden jeweils mit Hilfe des Student's t-Tests verglichen.

In der Pycnogenol®-Gruppe sanken die ADAMTS-5-Spiegel im Mittel um $31,12 \pm 67,85$ ng/mL (Abbildung 24). Dagegen stiegen, wenn man alle Ergebnisse mit einbezog, die Konzentrationen in der Kontrollgruppe von V1 zu V2 um $33,37 \pm 72,82$ ng/mL. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war im Student's t-Test statistisch signifikant ($p=0,02$). Nach Elimination des Ausreißers in der Kontrollgruppe mit -188 ng/mL (Patient #132) war der Unterschied gar statistisch hochsignifikant ($p=0,0007$). Somit konnte durch Einnahme des standardisierten Kiefernrintenextraktes der Anstieg der Aggrecanase-2-Konzentration im Serum über den Verlauf der Studie verhindert bzw. die Konzentration gar gesenkt werden.

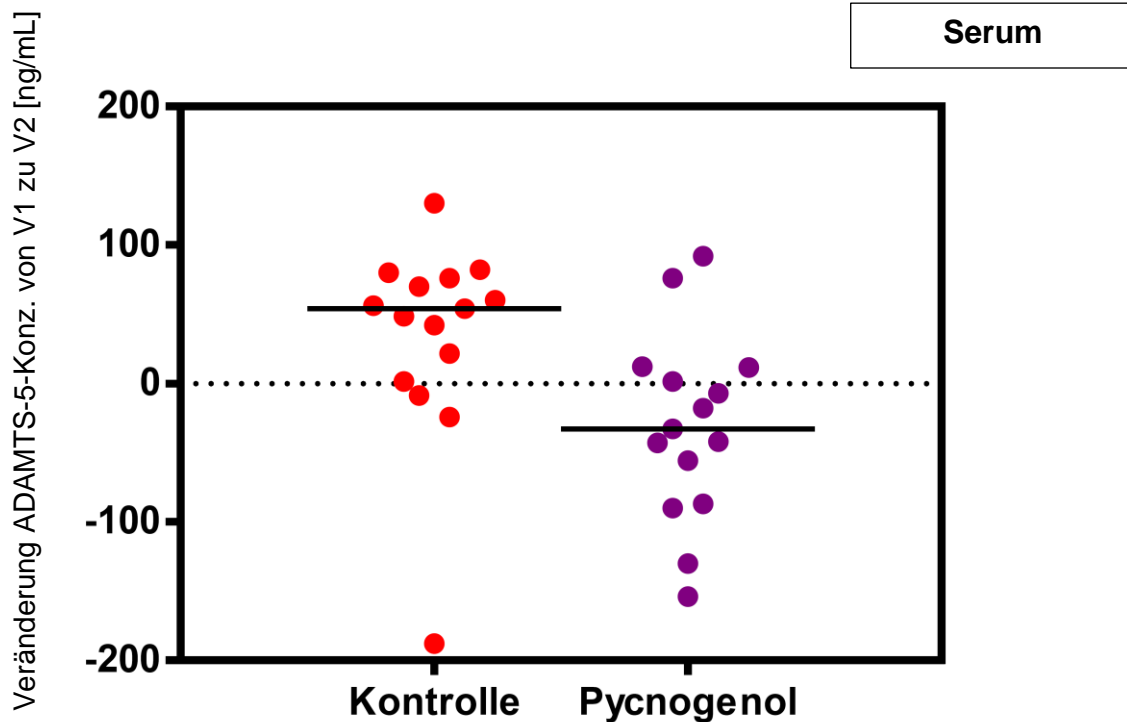


Abbildung 24: Veränderung der ADAMTS-5-Konzentration im Serum der Patienten von V1, vor Einnahme, zu V2, im Steady State der Einnahme des Verums. Unter Einbezug aller Werte ist der Unterschied zwischen beiden Behandlungsgruppen signifikant ($p < 0,05$, $n = 15$ (P), $n = 15$ (K)), nach Eliminierung eines statistisch bestätigten Ausreißers in der Kontrollgruppe hochsignifikant ($p < 0,001$, $n = 15$ (P), $n = 14$ (K)).

Bei der Untersuchung des Markers MMP-13 zeigte sich ein ähnliches Bild. Allerdings waren nur bei 11 der 30 Probanden Spiegel messbar, alle anderen Konzentrationen lagen unterhalb der Nachweisgrenze von 6 pg/mL (Abbildung 25). In der Pycnogenol[®]-Gruppe war im Mittel eine leichte Konzentrationssenkung um $2,62 \pm 20,17$ pg/mL ($n = 4$) messbar. In der Kontrollgruppe zeigte sich ein durchschnittlicher moderater Anstieg um $20,87 \pm 25,09$ pg/mL ($n = 7$). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant ($p = 0,15$). Unter der Annahme einer Differenz von 0 pg/mL für die fehlenden Proben sah man eine Tendenz zur Konzentrationssenkung unter Verumeinnahme ($p = 0,07$, $n = 15$ (P), $n = 15$ (K)). Der Unterschied blieb jedoch statistisch nicht signifikant.

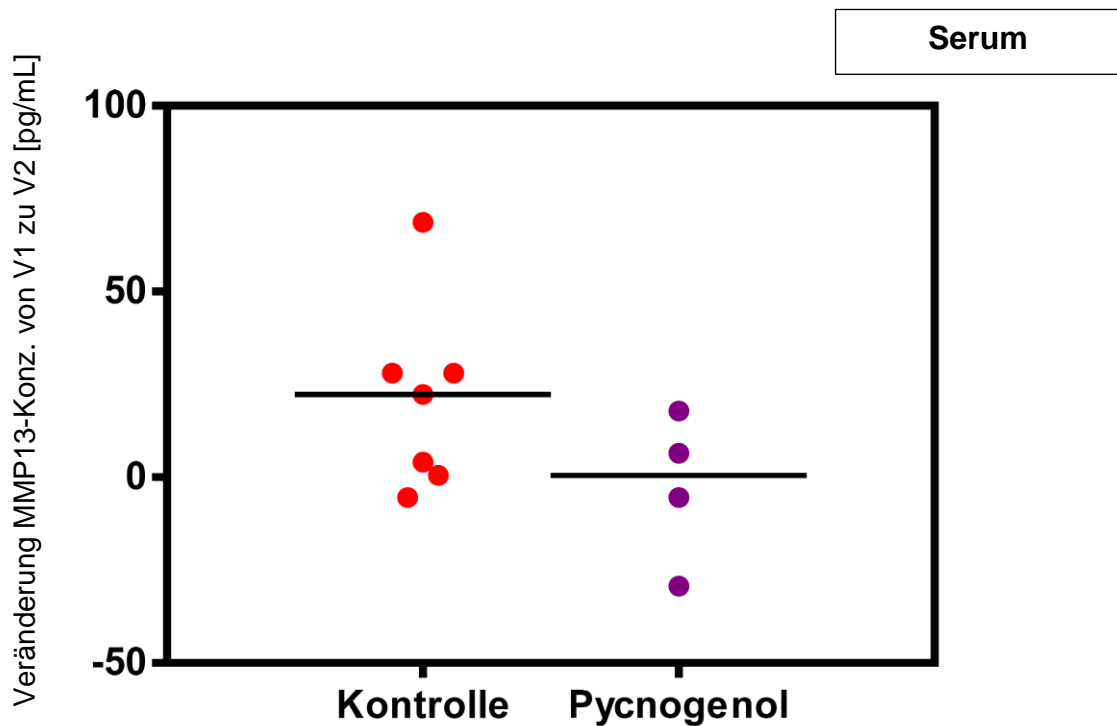


Abbildung 25: Darstellung der Veränderung der MMP-13-Serum-Konzentration in den beiden Studiengruppen von V1 zu V2. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant ($p > 0,05$, $n = 4$ (P), $n = 7$ (K)). In den anderen Studienproben waren keine MMP13-Konzentrationen messbar. Bei der Annahme der Differenz 0 für alle fehlenden Werte ergab sich eine Tendenz zur Konzentrationsenkung von MMP13 im Serum unter Pycnogenol[®]-Einnahme ($p = 0,07$, $n = 15$ (P), $n = 15$ (K)).

Die Serumkonzentrationen einer weiteren Matrix-Metalloproteinase, der MMP-3, veränderten sich in den beiden Gruppen kaum. Einem leichten Anstieg um $0,38 \pm 0,63$ ng/mL in der Verumgruppe ($n = 9$) stand ein moderater Abfall um $0,17 \pm 1,74$ ng/mL in der Kontrollgruppe ($n = 12$) gegenüber. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war zufällig ($p = 0,38$).

Die Konzentration des Markers Leptin im Serum veränderte sich während der Studie ebenso kaum. Beide Gruppen verzeichneten einen leichten Anstieg, in der Pycnogenol[®]-Gruppe um $0,40 \pm 3,94$ ng/mL ($n = 15$) und in der Kontrollgruppe um $1,26 \pm 4,32$ ng/mL ($n = 15$). Der Unterschied zwischen den Gruppen war nicht signifikant ($p = 0,57$). Jedoch gab es beim Vergleich aller Frauen und Männer der Studie einen signifikanten Unterschied im Serum-Leptinspiegel, sowohl bei Visite 1 ($18,4 \pm 11,2$ ng/mL (Frauen, $n = 20$) gegenüber $8,4 \pm 6,9$ ng/mL (Männer, $n = 10$),

$p=0,02$, Student's t-Test) als auch bei Visite 2 ($19,6 \pm 13,2$ ng/mL (Frauen, $n=20$) gegenüber $8,6 \pm 6,2$ ng/mL (Männer, $n=10$), $p=0,02$, Student's t-Test).

1.4.2 Einfluss des standardisierten Kiefernridenextraktes auf die Konzentration von Markern in der Synovialflüssigkeit

Die Synovialflüssigkeit stellt eine interessante Untersuchungsmatrix dar, da diese in unmittelbarem Kontakt mit dem Knorpelgewebe im Kniegelenk kommt und dieses u.a. mit Nährstoffen versorgt. Im Gegensatz zu Blutproben, die man regelmäßig, auch ohne invasiven Eingriff, gewinnen kann, ist dieses Spezimen zudem meist nur im Rahmen einer Kniegelenksersatzoperation zu entnehmen. Im Rahmen der vorliegenden Studie wurden Proben am Tag der Operation gewonnen und für die Untersuchungen zur Verfügung gestellt. Es war, im Vergleich zum Serum, daher kein Vergleich zwischen „vor Einnahme“ und „nach Einnahme“ des Rindenextraktes möglich. Daher wurden die Ergebnisse der Verum-Gruppe in Bezug zu denen der Kontrollgruppe gesetzt. Neben den direkten Konzentrationsmessungen wurden *ex-vivo*-Versuche mit dem Spezimen durchgeführt (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.7). Konzentrationsunterschiede in der Synovialflüssigkeit von wichtigen Entzündungsmarkern zwischen den Behandlungsgruppen könnten ein Hinweis für unterschiedliche Erkrankungsschweregrade und ein Indiz für die Wirksamkeit des standardisierten Kiefernridenextraktes sein. Die statistische Signifikanz der Unterschiede wurde mit dem Student's t-Test bewertet. Auf Grund der einmaligen Entnahme der Synovialflüssigkeit über den Studienverlauf war die Aussagekraft dieser Versuche jedoch limitiert auf diesen Entnahmezeitpunkt.

Die jeweils zu $n=15$ pro Gruppe fehlenden Werte sind damit begründbar, dass nicht bei jedem Patient ausreichend Spezimen für alle Messungen zur Verfügung stand. Bei Patient #120 war das Gelenk so stark ausgetrocknet, dass keine verwendbare Synovialflüssigkeit gewonnen werden konnte. Dieser Patient (Pycnogenol®-Gruppe) konnte deshalb in die Ergebnisse nicht mit einbezogen werden. Desweiteren waren bei Patient #106 (Kontrolle), Patient #108 und Patient #121 (beide Pycnogenol®) nur wenig Synovialflüssigkeit vorhanden, so dass lediglich einzelne Tests damit durchgeführt werden konnten (Einzelergebnisse siehe Tabellarischer Anhang D, Kap. 1.6.2). Weitere fehlende Werte waren durch

Konzentrationen, die unterhalb der Nachweisgrenze des jeweils verwendeten ELISA-Kits lagen, zu erklären.

Die Konzentration von MMP-1 in der Synovialflüssigkeit der Pycnogenol®-Gruppe (n= 9) war mit im Mittel $11,61 \pm 8,61$ ng/mL leicht geringer als die Konzentration in der Synovialflüssigkeit der Kontrollgruppe (n= 12) mit durchschnittlich $14,04 \pm 6,93$ ng/mL (Abbildung 26). Der Unterschied zwischen den beiden Studiengruppen war nicht signifikant (p= 0,47).

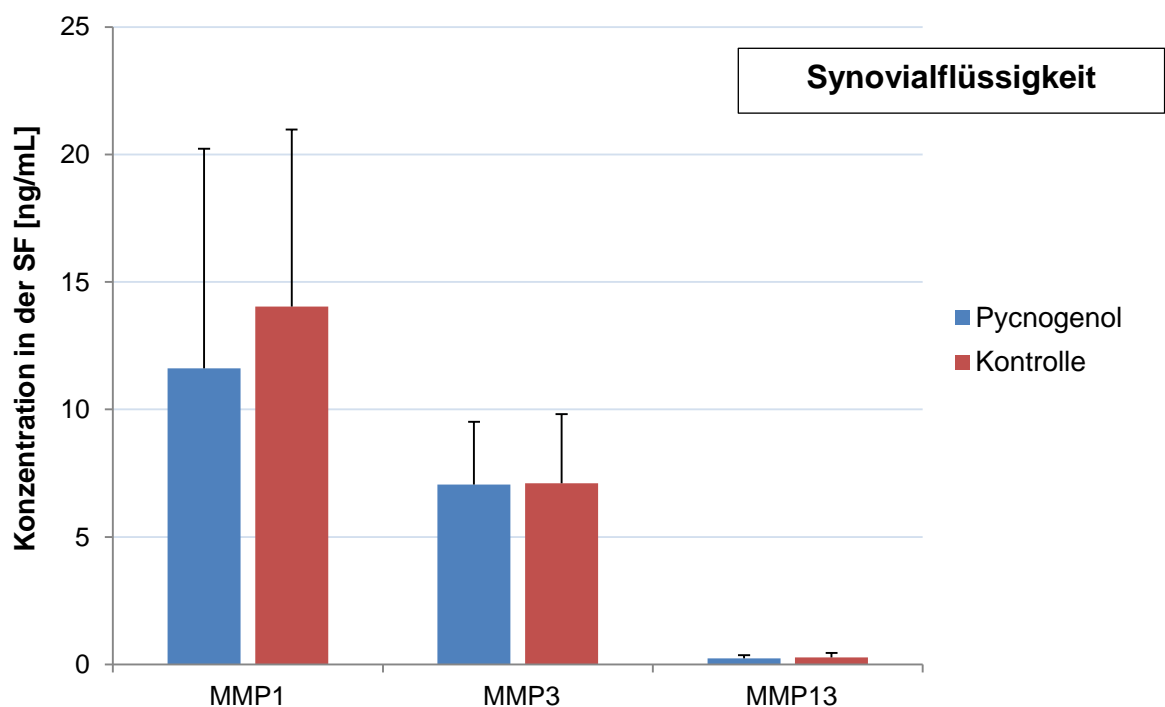


Abbildung 26: Konzentration der Matrix-Metalloproteinasen-1, -3 und -13 (MMP1/ MMP3/ MMP13) in der Synovialflüssigkeit der Probanden der OA-Studie. Die blauen Balken symbolisieren jeweils den Mittelwert mit Standardabweichung für die Konzentration der Marker in der Pycnogenol®-Gruppe. Die roten Balken stehen für den Mittelwert mit Standardabweichung in der Kontrollgruppe. Der Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen war bei keinem der untersuchten Marker signifikant (p> 0,05; MMP1: n= 9 (Pycnogenol®), n= 12 (Kontrolle); MMP3: n= 12 (Pycnogenol®), n= 13 (Kontrolle); MMP13: n= 13 (Pycnogenol®), n= 14 (Kontrolle)). SF= Synovialflüssigkeit.

Für MMP-3, auch als Stromelysin-1 bezeichnet, war ebenso kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen erkennbar (p= 0,96) (Abbildung 26). Die Konzentration in der Verumgruppe betrug im Mittel $7,06 \pm 2,45$ ng/mL (n= 12), die in der Kontrollgruppe durchschnittlich $7,10 \pm 2,72$ ng/mL (n= 13).

Die Konzentrationen der Matrix-Metalloproteinase-13 (MMP-13) in der Synovialflüssigkeit der beiden Gruppen verhielten sich ähnlich wie die MMP-1-Konzentrationen. Im Mittel waren die Spiegel in der Pycnogenol[®]-Gruppe mit $0,23 \pm 0,13$ ng/mL (n= 13) leicht niedriger als in der Kontrollgruppe ($0,27 \pm 0,18$ ng/mL; n= 14) (Abbildung 26). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war auch hier nicht signifikant ($p= 0,51$).

Um zu untersuchen, ob nicht nur die Konzentrationen der collagenabbauenden Enzyme verringert war, sondern auch deren Aktivität, wurden zusätzlich die Konzentrationen zweier Abbauprodukte von Typ-II-Collagen in der Synovialflüssigkeit der Probanden analysiert, namentlich vom C-Telopeptid (CTX-II) und vom helikalen Peptid (Helix-II) (Abbildung 27 und Abbildung 28). Dabei zeigte sich mit einer Konzentration von $236,76 \pm 168,08$ pg/mL in der Pycnogenol[®]-Gruppe (n= 12) eine geringere Konzentration des Abbauprodukts CTX-II als in der Kontrollgruppe mit $428,90 \pm 511,83$ pg/mL (n= 14, Abbildung 27). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p= 0,23$).

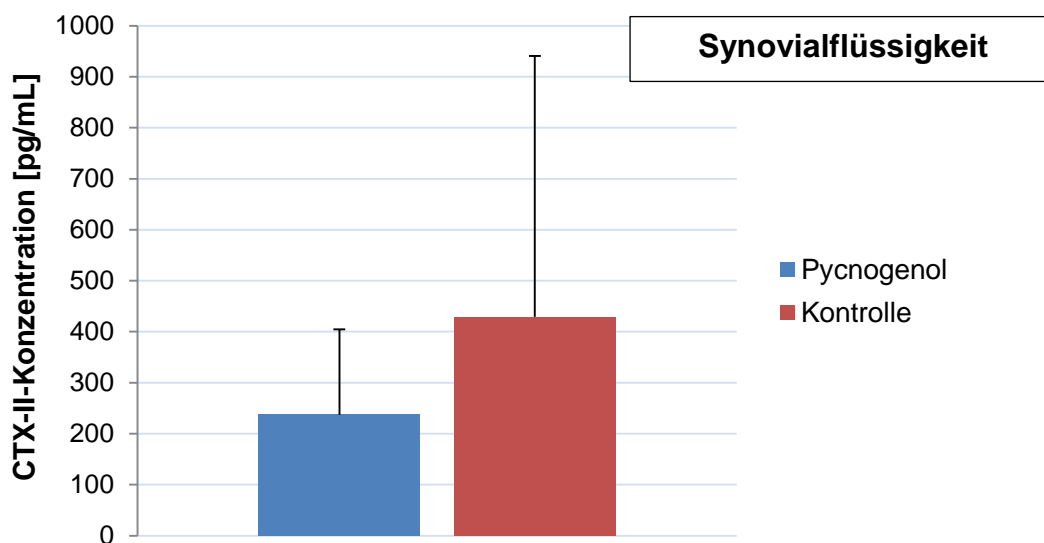


Abbildung 27: Konzentrationen des humanen C-Telopeptids von Typ-II-Collagen in der Synovialflüssigkeit der Studienteilnehmer der OA-Studie. Dargestellt sind die Mittelwerte der Konzentrationen mit Standardabweichungen (blauer Balken entspricht der Pycnogenol[®]-Gruppe (n= 12), roter Balken der Kontrollgruppe (n= 14)). Der Unterschied in den Konzentrationen der beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p= 0,23$).

Bei der Betrachtung der Spiegel des helikalen Peptids von Typ-II-Collagen (Helix-II), einem weiteren spezifischen Abbauprodukt, zeigte sich eine ähnliche Tendenz (Abbildung 28). Im Mittel war die Konzentration des Abbauprodukts in der Verumgruppe mit $0,90 \pm 0,68$ nmol/L (n= 12) geringer als bei den Kontrollen ($1,23 \pm 1,19$ nmol/L; n= 15). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p= 0,57$).

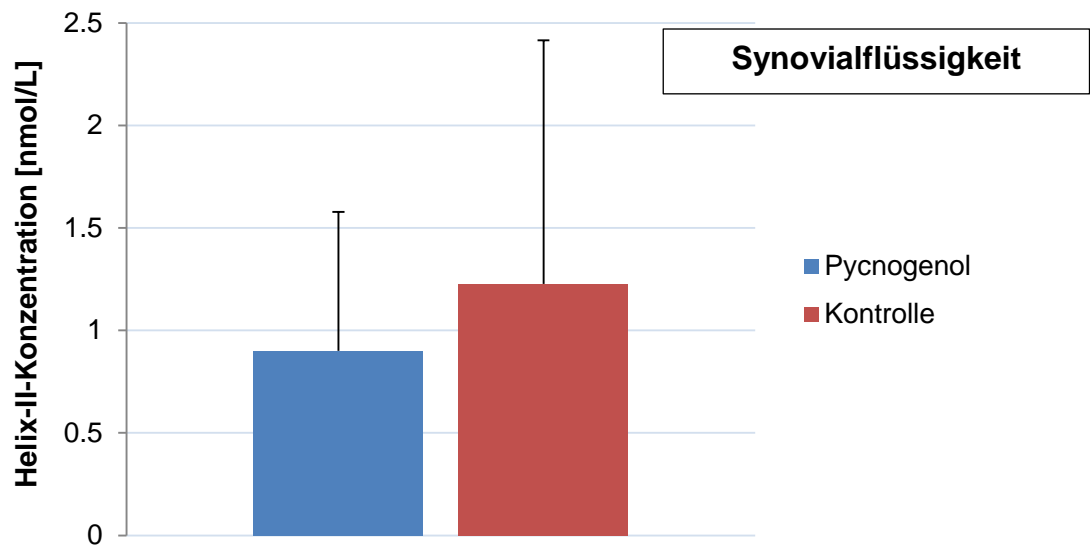


Abbildung 28: Synovialflüssigkeits-Konzentrationen des humanen helikalen Peptids von Typ-II-Collagen (Helix-II) bei den Patienten der Pycnogenol®-Studie. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (blau entspricht Pycnogenol® (n= 12), rot entspricht der Kontrolle (n= 14)). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war nicht signifikant ($p > 0,05$).

Die Untersuchung der Aggrecanase-1, auch als ADAMTS-4 bezeichnet, und der Aggrecanase-2, auch als ADAMTS-5 deklariert, zeigte zu der Untersuchung der Matrix-Metalloproteinasen gegenläufige Tendenzen. Beide Enzyme waren höherkonzentriert in der Verumgruppe im Vergleich zu den Kontrollen in der Synovialflüssigkeit. Diese Hochregulierung war stärker bei ADAMTS-4 mit im Mittel $32,50 \pm 33,26$ ng/mL in der Verumgruppe (n= 9) zu $22,55 \pm 19,69$ ng/mL in der Kontrollgruppe (n= 11) als bei ADAMTS-5 mit durchschnittlich $12,58 \pm 10,83$ ng/mL in der Pycnogenol®-Gruppe (n= 12) zu $7,08 \pm 4,28$ ng/mL in der Kontrollgruppe (n= 15) (Abbildung 29). Die Unterschiede waren jeweils nicht statistisch signifikant ($p= 0,42$ (ADAMTS-4); $p= 0,12$ (ADAMTS-5)).

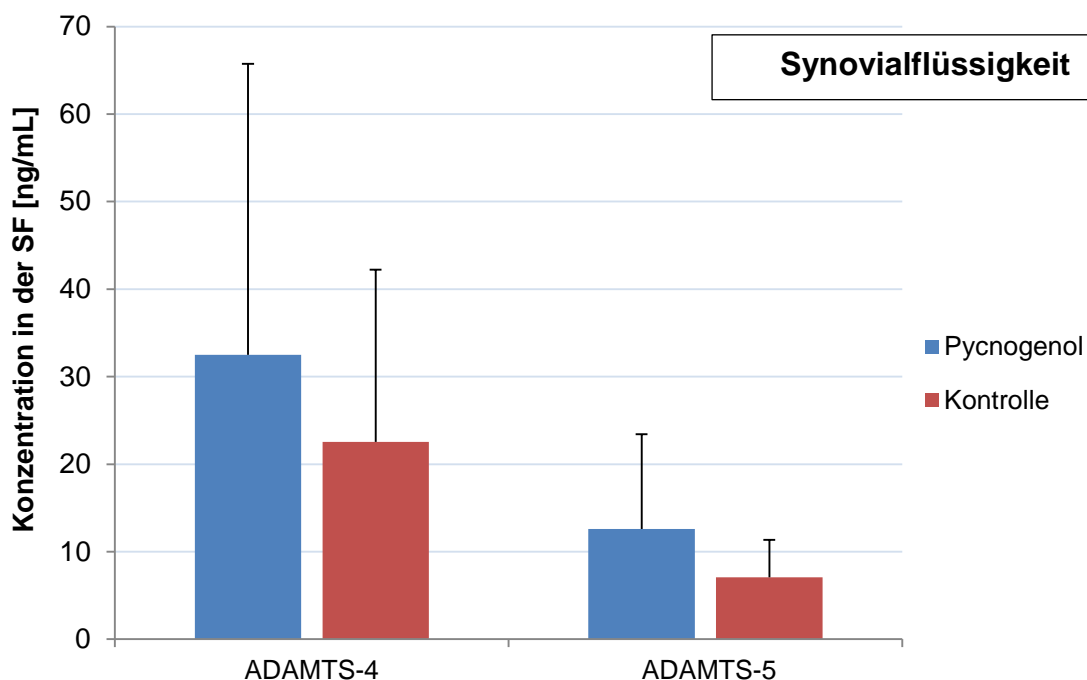


Abbildung 29: Konzentrationen der Aggrecanasen-1 (ADAMTS-4) und -2 (ADAMTS-5) in der Synovialflüssigkeit der Probanden der OA-Studie. Aufgetragen sind die Mittelwerte der Konzentrationen der jeweiligen Gruppen mit Standardabweichung (blau: Pycnogenol® (n= 9 bei ADAMTS-4, n= 12 bei ADAMTS-5); rot: Kontrolle (n= 12 bei ADAMTS-4, n= 15 bei ADAMTS-5)). Der Unterschied der Konzentration beider Enzyme zwischen den zwei Gruppen der Studie war nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$). SF= Synovialflüssigkeit.

Analog zu den Versuchen das Typ-II-Collagen betreffend, wurde auch hier, zusätzlich zu den Konzentrationen der Enzyme, die Konzentration des Abbauprodukts derer in der Synovialflüssigkeit bestimmt, um die Enzymaktivität beurteilen zu können. Dazu fand der Dimethylmethylenblau (DMMB)-Assay zur Bestimmung des Gehaltes an sulfatierten Glucosaminglykanen (sGAG) Anwendung [238]. Im Vorfeld der Versuche war ein Vorverdau der Synovialflüssigkeitsproben mit Papain notwendig, um einen flockigen Niederschlag in der Küvette zu vermeiden und verlässliche Absorptionsmessungen zu gewährleisten (Experimenteller Teil C, Kap. 1.8.8). Es ergab sich in der Pycnogenol®-Gruppe mit im Mittel $356,89 \pm 61,89 \mu\text{g/mL}$ (n= 12) eine geringere Konzentration der Abbauprodukte in der Synovialflüssigkeit als in der Kontrollgruppe mit durchschnittlich $390,32 \pm 53,81 \mu\text{g/mL}$ (n= 15) (Abbildung 30). Der Unterschied zwischen den Studiengruppen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,19$).

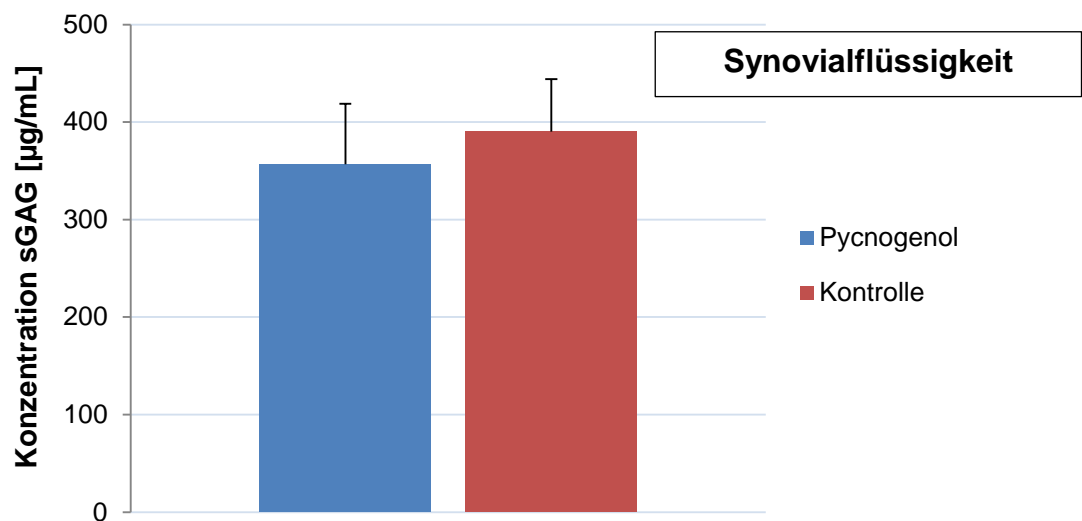


Abbildung 30: Konzentration von sulfatierten Glucosaminglykanen in der Synovialflüssigkeit der Studienprobanden. Abgebildet sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen (blau: Verum (n= 12), rot: Kontrolle (n= 15)). Die Gruppen unterschieden sich nicht signifikant ($p > 0,05$).

Ergänzend zu den dominanten Markern des Knorpelabbaus, den Matrix-Metalloproteinasen bzw. den Aggrecanasen mit den jeweiligen Abbauprodukten, sollten noch weitere Mediatoren untersucht werden, deren Rolle bei der Knorpelhomöostase noch nicht eindeutig ersichtlich ist. Dazu gehört u.a. das Adipokin Leptin (theoretischer Hintergrund Einleitung A, Kap. 2.4). Die Leptin-Konzentration in der Synovialflüssigkeit der Pycnogenol®-Gruppe war im Mittel mit $16,41 \pm 16,32$ ng/mL höher als die in der Kontrollgruppe mit durchschnittlich $11,63 \pm 11,29$ ng/mL (n= 12 vs. n= 14) (Abbildung 31). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p = 0,39$). Analog zu den Serumergebnissen wurden auch hier die Konzentrationen von Frauen und Männern verglichen (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.1). Es zeigte sich im Mittel mit $14,5 \pm 11,4$ ng/mL bei den Frauen (n= 18) eine höhere Konzentration von Leptin in der Synovialflüssigkeit im Vergleich zu den Männern mit $8,4 \pm 7,9$ ng/mL (n= 8). Auf Grund der hohen Standardabweichung war dieser Unterschied zufällig ($p = 0,18$).

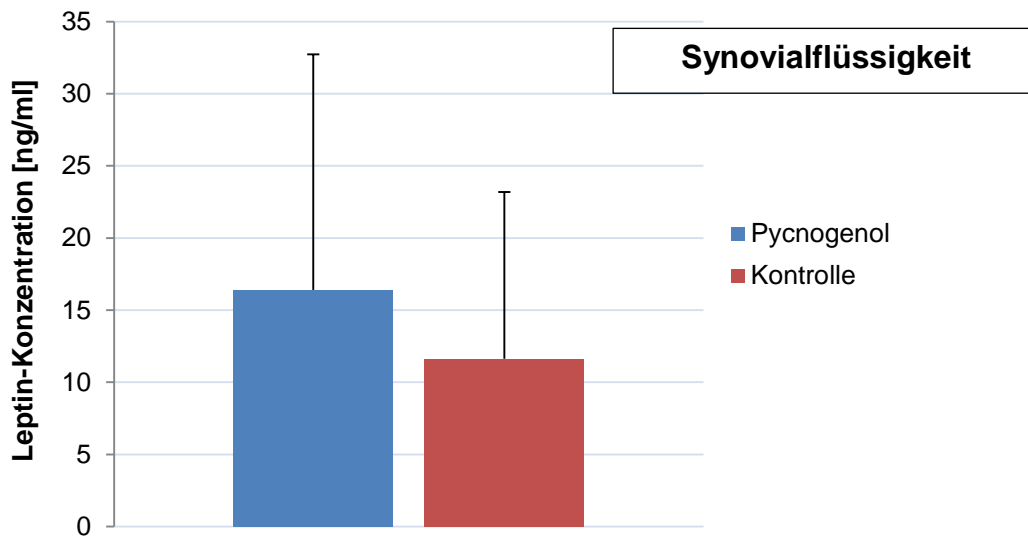


Abbildung 31: Mittelwerte mit Standardabweichungen der Leptin-Konzentrationen in den Synovialflüssigkeits-Proben der beiden Gruppen der Pycnogenol®-Studie. Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war statistisch nicht signifikant ($p=0,39$, $n=12$ (blau, Pycnogenol®), $n=14$ (rot, Kontrolle)).

Um einen Einblick in das Entzündungsgeschehen im Gelenk auf anderer Ebene zu bekommen, wurde ergänzend der lösliche Makrophagen-Oberflächenmarker CD163 (sCD163) untersucht. Zur Gewährleistung einer guten Fließfähigkeit der Synovialflüssigkeit wurde diese mit Hyaluronidase vorverdaut (Experimenteller Teil C, Kap. 1.8.7). Im Mittel lag die sCD163-Konzentration mit $214,19 \pm 74,22$ ng/mL in der Verum-Gruppe ($n=11$) leicht höher als die in der Kontrollgruppe mit durchschnittlich $211,47 \pm 79,68$ ng/mL ($n=14$) (Abbildung 32). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen war zufällig ($p=0,98$).

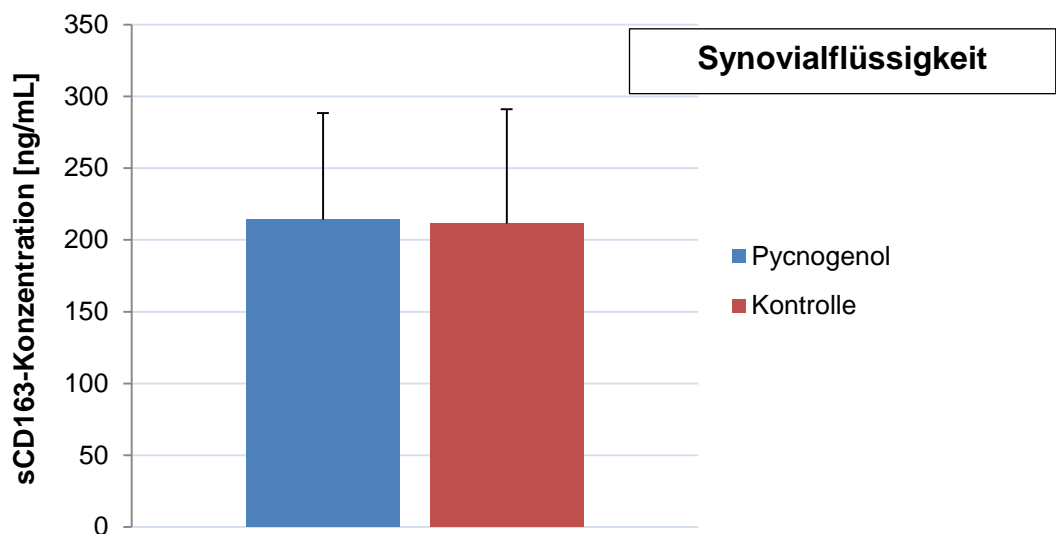


Abbildung 32: Konzentration von löslichem CD163 (sCD163) in der Synovialflüssigkeit der Patienten in [ng/mL]. Die Balken symbolisieren die Mittelwerte, die Striche die Standardabweichungen der jeweiligen Gruppen (blau: Verum (n= 11), rot: Kontrolle (n= 14)). Die Gruppen sind statistisch nicht signifikant verschieden voneinander ($p > 0,05$).

1.4.3 Diskussion der Resultate der Konzentrationsbestimmung in Serum und Synovialflüssigkeit

Die Rolle und Bedeutung von Leptin in Serum und Synovialflüssigkeit wurde bereits ausgiebig diskutiert (Einleitung A, Kap. 2.1 und Kap. 2.4). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Simopoulou et al. [170] und Presle et al. [176] konnten wir keine höheren Leptin-Spiegel in der Synovialflüssigkeit ($14,32 \pm 13,73$ ng/mL, n= 27) im Vergleich zum Serum ($15,50 \pm 11,62$ ng/mL, n= 62) bestimmen. Die beobachteten geschlechtsspezifischen Unterschiede anderer Forschergruppen konnten bestätigt werden. Es zeigte sich zumeist ein signifikant höherer Plasmaspiegel von Leptin bei Frauen im Vergleich zu Männern [176, 180]. In der Synovialflüssigkeit ergab sich bei unseren Untersuchungen nur eine Tendenz zu einer höheren Leptinkonzentration bei Frauen im Vergleich zu Männern. Im Gegensatz dazu entdeckten Presle et al., Ku et al. und Lübbecke et al. auch in dieser Körperflüssigkeit statistisch signifikante geschlechtsspezifische Unterschiede [169, 176, 179]. Ein unterschiedlicher BMI kann für die beobachteten Unterschiede nicht die Erklärung sein, da die männlichen Patienten im Mittel einen höheren BMI hatten als die Frauen (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.1). Auch bei Ku et

al. war kein signifikanter Unterschied in Hinblick auf den BMI zwischen den Geschlechter-Gruppen feststellbar. Die unterschiedliche Körperzusammensetzung, mit einer höheren Fettmasse bei Frauen und im Gegensatz dazu einer höheren Muskelmasse bei Männern, sind wahrscheinlich für die Unterschiede in den Leptin-Spiegeln der verschiedenen Körperflüssigkeiten verantwortlich.

Die von uns gemessenen MMP-3-Konzentrationen lagen absolut mit $3,68 \pm 2,11$ ng/mL im Serum im unteren Bereich der Ergebnisse von Sarma et al., bei deren Untersuchung die Spannweite der Mediane der Gruppen von 1,5-60 ng/mL reichte [239]. Weitere Forschergruppen fanden noch höhere Werte im Bereich 50-110 ng/mL bzw. 0-1100 ng/mL [240, 241]. Diese Konzentrationsunterschiede können durch verschiedene Analysenarten und durch interindividuelle Unterschiede unter Einfluss diverser Erkrankungen erklärt werden. Zwischen der Verum- und der Kontrollgruppe gab es in unserer Studie keinen signifikanten Unterschied in der Entwicklung der MMP-3-Konzentrationen von V1 (vor Einnahme von Pycnogenol[®]) zu V2 (nach Einnahme von Pycnogenol[®]). Ein Effekt von Pycnogenol[®] auf die MMP-3-Serumkonzentration konnte daher nicht belegt werden. Jedoch ist ein lokaler Einfluss im Gelenk durch die gesenkte Genexpression von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 in den Chondrozyten schon gezeigt worden (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.5).

In der vorliegenden Studie waren die MMP-13-Konzentrationen im Serum im Bereich $0,18 \pm 0,29$ ng/mL. Ähnliche Werte maßen Cevik et al. mit einer Spannweite von 0,2-0,75 ng/mL [242]. Diese Forschergruppe verwendete, ähnlich unserer Durchführung, ein industriell gefertigtes ELISA-Kit. Jiao et al. detektierten mit ihrem selbstentworfenen Kit Konzentrationen im Bereich 50-90 ng/mL [243]; Asano et al. mit einem Peptidsubstratspaltung-Assay MMP-13-Konzentrationen von 20-95 ng/mL [244]. Die unterschiedlichen Messmethoden sind vermutlich der Grund für diese Konzentrationsunterschiede. Wir konnten auch, im Gegensatz zu den Ausführungen von Jiao et al. und Asano et al. [243, 244], in den meisten Probandenproben kein MMP-13 nachweisen. Auf Grund der geringen Stichprobe war der Unterschied zwischen den Gruppen in der Entwicklung der Konzentrationen von V1 zu V2 zwar absolut vorhanden, jedoch statistisch nicht signifikant (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.1). Wenn man das Ganze jedoch

prozentual in Bezug auf die Ausgangsmenge ausgewertete, zeigte sich mit einer Abnahme um $42,32 \pm 46,58$ % in der Verumgruppe (n= 4) und einer Zunahme von $46,58 \pm 44,58$ % in der Kontrollgruppe (n= 7) im Student's t-Test ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen (p= 0,03). Jedoch ist die klinische Relevanz auf Grund der absolut geringen Veränderung der MMP-13-Konzentrationen fraglich.

Der beobachtete mittlere Anstieg der ADAMTS-5-Konzentration im Serum der Kontrollpatienten im Verlauf der Studie ist, ähnlich dem mittleren Anstieg der MMP-13-Konzentration, damit zu erklären, dass die rekrutierten Personen an schwergradiger OA litten und die Progression der Erkrankung weiter vorangeschritten ist. Der standardisierte Kiefernriindenextrakt konnte diesen Anstieg an ADAMTS-5 im Serum zumeist verhindern, im Mittel gar die Konzentration signifikant senken. Die klinische Relevanz dieser Beobachtung ist diskutabel, da, wie bereits erwähnt, noch über die Bedeutung der verschiedenen Aggrecanasen bei OA gestritten wird (Einleitung A, Kap. 2.3). Ein absoluter Vergleich der Werte war nicht möglich, da in den Untersuchungen anderer Forschergruppen nur Verhältnisse, und keine genauen Zahlen, angegeben waren. In Mäusen scheint ADAMTS-5 die größere Rolle beim Aggrecan-Abbau zu spielen [126]. Glasson et al. konnten zeigen, dass in ADAMTS-5-Knockout-Mäusen die Knorpelzerstörung verhindert wird, wohingegen das Ausschalten des aktiven ADAMTS-4 darauf keine Auswirkungen zeigte [245]. Zusätzlich stellten die Autoren fest, dass ADAMTS-5 in der normalen Entwicklung keine entscheidende Rolle einnehmen kann, da alle ADAMTS-5-Knockout-Mäuse normal entwickelt waren. Stanton et al. sehen auch ADAMTS-5 als Hauptenzym beim PG-Abbau [246]. Die Abschaltung von ADAMTS-5 *in-vivo* in Mäusen bewirkte bei den Untersuchungen dieser Forschergruppe einen signifikanten Schutz vor Aggrecan-Verlust, wohingegen das Ausschalten von ADAMTS-4 keinen Effekt zeigte. East et al. sahen hingegen auch eine gewisse Rolle von ADAMTS-4 beim Aggrecan-Abbau in der Maus [104]. Hierbei spaltete ADAMTS-4 bevorzugt in der chondroitinsulfatreichen Region im Kernprotein, wohingegen ADAMTS-5 v.a. in der interglobulären Domäne das Aggrecan spaltete. Letzteres scheint im Hinblick auf den Funktionsverlust des Gewebes wichtiger zu sein, da bei dieser Art von

Spaltung die kompletten sGAG-Seitenketten verlorengehen, die das Wasser binden können. Miller et al. bestätigten die Rolle des ADAMTS-5 als Hauptabbauenzym für Aggrecan in der Maus und sahen in der Hemmung dieses Enzyms eine effektive Variante zum Schutz vor Knorpelverlust [128].

Im Menschen scheinen beide Aggrecanasen zum Aggrecan-Abbau beizutragen, jedoch mit einer höheren Bedeutung des ADAMTS-4 [153, 159, 247-249]. Die Konzentration dessen war nämlich in den Untersuchungen von Zhang et al. zu Beginn der Experimente erhöht und korrelierte positiv mit der Konzentration des Abbauproduktes ARGXXX. ADAMTS-5 war jedoch gesamt stärker exprimiert als die Aggrecanase-1. Da ADAMTS-5 aber meist inaktiv in der humanen Synovialflüssigkeit bei OA vorliegt, wirken sich diese höheren Werte nicht zwingend negativ aus. Die höheren Konzentrationen von ADAMTS-5 und ADAMTS-4 in der Synovialflüssigkeit der Verum- im Vergleich zur Kontrollgruppe in unserer Studie sollten deshalb nicht überbewertet werden (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.2). Hierbei wurde die Gesamtheit (aktive und Pro-Form der Enzyme) bestimmt. Der geringere Wert des Abbauproduktes (sGAG) offenbarte hingegen, dass die Aktivität der beiden Aggrecanasen in der Pycnogenol[®]-Gruppe, trotz der höheren absoluten Konzentrationen, gesenkt war. Dies lässt einen positiven Effekt des standardisierten Kiefernrintenextraktes auf den Aggrecan-Stoffwechsel vermuten, auch wenn der Unterschied sich als statistisch nicht signifikant herausstellte. Eventuell ist diese Wirkung des Pycnogenols auch durch die Hemmung von Proteasen, die die Umwandlung der Propeptidform der ADAMTS in die aktive Form, durch Abspaltung der Propeptid-Domäne, bewirken, begründet [250]. Winsz-Szczotka et al. unterstützen die These von Zhang et al. zur Rolle von ADAMTS-4 als Hauptaggrecanase [248]. In ihren Untersuchungen sahen sie, bei Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis, eine signifikante positive Korrelation der ADAMTS-4-Konzentration mit einem im Blut zirkulierenden Abbaumarker von Aggrecan, dem Keratansulfat. In Hinblick auf ADAMTS-5 war eine solche Korrelation nicht zu entdecken. Bondeson et al. beschreiben ergänzend, dass ADAMTS-4, nicht jedoch ADAMTS-5, in humanen synovialen Fibroblasten durch IL-1 und TNF- α über den NF- κ B-Signalweg hochreguliert werden kann [159]. Durch Hemmung des NF- κ B-Signalweges konnte im Gegenzug eine Reduktion

der ADAMTS-4-Sekretion erzielt werden. Da die beiden Zytokine eine Hauptrolle bei OA spielen, ist diese Untersuchung ein weiteres Zeichen für die größere Bedeutung der Aggrecanase-1, im Vergleich zur Aggrecanase-2, im humanen Knorpel, auch wenn die Autoren sich abschließend nicht festlegen wollen. Fosang und Little bestätigen diese Theorie und sprechen ergänzend von einer konstitutiven Expression von ADAMTS-5 [152].

Generell scheinen die beiden Enzyme nicht nur zu Beginn, sondern auch in der Spätphase der Erkrankung am Aggrecan-Abbau beteiligt zu sein [247]. Deshalb würde eine Inhibition der Enzyme zu jeder Zeit etwas Positives bewirken. Li et al. sprechen von einer Beteiligung beider Enzyme und zwar von ADAMTS-4 in der Frühphase und ADAMTS-5 neben MMP1 und 3 in der Spätphase von OA [158]. Dies wiederum widerspricht den Ausführungen von Zhang et al., die ADAMTS-5 generell weniger Bedeutung zumessen [247]. Davidson et al. bringen noch eine weitere Aggrecanase ins Spiel, die Aggrecan abbauen kann, genauer die ADAMTS-8 [251]. Diese wird aber von den Autoren, im Vergleich zu den Aggrecanasen-1 und -2, als weniger effizient bezeichnet.

Insgesamt lässt sich zusammenfassen, dass, trotz der diskutablen Rolle der verschiedenen Aggrecanasen, Pycnogenol[®] durch Senkung der Konzentration von ADAMTS-5 im Serum und der Senkung des sGAG-Gehaltes in der Synovialflüssigkeit einen positiven Effekt auf den Proteoglykan-Stoffwechsel hat. Die genauen Mechanismen bedürfen weiterer Forschung.

Die Konzentration der hier untersuchten Marker des Collagen-Abbaus in der Synovialflüssigkeit wurde schon von anderen Arbeitsgruppen gemessen. Unsere Werte lagen für das gesamte MMP-3 mit $7,06 \pm 2,45$ ng/mL in der Verum- und $7,10 \pm 2,72$ ng/mL in der Kontrollgruppe im unteren Bereich der Ergebnisse von Vasara et al. (95 % Konfidenzintervall [3,4; 39,0 ng/mL]) [94]. Tchetverikov et al. bestimmten nur die Konzentrationen der Vorläufermoleküle von MMP-1 und MMP-3, auch proMMP-1 und proMMP-3 genannt, in der Synovialflüssigkeit von Probanden nach Verletzung bzw. bei OA im Vergleich zu gesunden Kontrollen [252]. Dabei zeigten sich bei akuter Verletzung mit im Mittel $44,7$ ng/mL und bei OA mit durchschnittlich $31,2$ ng/mL höhere Spiegel des Enzyms in der Pro-Form (pro-MMP-3) als in unseren Messungen der Gesamtmenge (pro+aktiv) (All-

gemeiner Teil B, Kap. 1.4.2). Lediglich die Kontrollen lagen mit 6,7 ng/mL proMMP-3 in unserem Bereich (siehe oben). Jedoch kann man aus den Experimenten von Vasara schließen, dass der Anteil an aktivem MMP-3 in der Synovialflüssigkeit verhältnismäßig gering ist im Vergleich zur Pro-Form [94]. Der Unterschied zum Wert nach akutem Trauma lässt sich damit begründen, dass in der Akutphase einer Verletzung vermutlich mehr MMP-3 ausgeschüttet wird, als bei dem chronischen Verlauf einer OA, wie bei unseren Patienten vorliegend (Experimenteller Teil C, Kap. 1.5) [252]. Zudem wurden in den beiden Ansätzen verschiedene ELISA-Kits verwendet, wodurch sicherlich auch Abweichungen zu Stande kommen können. Die Messung von proMMP-1 zeigte noch deutlichere Unterschiede. Die Forschergruppe beobachtete Werte von 0,81 ng/mL pro MMP-1 unter den Probanden mit Verletzungen, 0,84 ng/mL bei den OA-Patienten und 0,12 ng/mL in der Kontrollgruppe [252]. Unsere Werte lagen deutlich darüber (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.2). Dabei gilt jedoch zu bedenken, dass wir, mit Hilfe des gewählten ELISA Kits, Pro- und aktive Form gemeinsam bestimmt haben. Man könnte also vermuten, dass der höhere Wert aus einem hohen Anteil aktiver Form resultierte. Dies passt auch zu den Ausführungen von Tchertverikov et al., die in MMP-1 die aktivere Collagenase im Vergleich zu MMP-3 (bei Verletzung) sehen. Die Senkung der Expression durch Pycnogenol[®] in Hinblick auf die MMP-1-Spiegel in der Synovialflüssigkeit kann deshalb, zumindest für den Collagen-Abbau, als bedeutender angesehen werden, als die unveränderte MMP-3-Expression in diesem Spezimen. Zudem scheint hier v.a. die aktive Form gehemmt worden zu sein, welche bei OA und Verletzung dominant vorliegt.

Heard et al. untersuchten die Konzentrationen von diversen MMPs in der Synovialflüssigkeit von Probanden mit früher bzw. fortgeschrittener OA im Vergleich zu Kontrollen ohne OA [124]. Die gemessenen MMP1-Konzentrationen waren für die späte OA im Bereich 5-10 ng/mL und damit leicht unterhalb unseres Durchschnitts. Die Forschergruppe entdeckte dabei einen Anstieg im Verlauf der Erkrankung. Dagegen berichteten Rübenhagen et al. von einer abnehmenden MMP-1-Expression in Spätformen der OA [253]. Die Autoren begründeten diesen Sachverhalt mit der abnehmenden Dicke des Knorpels und dem damit einhergehenden Verlust von Chondrozyten, v.a. in der superfizialen Zone. Jedoch liegt

die Hauptquelle von MMP-1 in der Produktion im Synovium, wie bereits beschrieben [124]. Die genauen absoluten Werte der Messung von Rübenhagen et al. waren nicht angegeben, jedoch lagen diese im Bereich 1-100 ng/mL [253]. Unsere gemessenen Werte waren somit vergleichbar.

Für MMP-3 gaben Heard et al. Werte im Bereich 19-22 ng/mL für die späten OA-Formen an [124] und lagen damit oberhalb unserer gemessenen Werte. Im Vergleich dazu waren die bestimmten Konzentrationen bei Zhang et al. mit im Mittel 140 µg/mL deutlich höher [254]. Diese Unterschiede sind nicht durch interindividuelle Unterschiede begründbar und bedürften eines näheren Einblickes in die Messmethoden von Zhang.

Beim wichtigsten Enzym, der MMP-13, lagen unsere Werte in der Synovialflüssigkeit im Bereich der gemessenen Konzentrationen von Heard et al. und Rübenhagen et al. [124, 253]. Lediglich die Werte von Anitua et al. waren mit $0,056 \pm 0,024$ ng/mL leicht unterhalb den von uns gemessenen (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.2) [255]. Dies kann damit begründet werden, dass bei deren Untersuchungen lediglich bei 13 von 63 Patienten überhaupt MMP-13-Spiegel gemessen werden konnten. Methodische Unterschiede könnten der Grund hierfür sein. Auch unsere Ergebnisse waren im unteren Bereich der Verlässlichkeit des verwendeten ELISA-Kits. Jedoch waren bei allen Probanden, bis auf drei, bei denen nicht mehr ausreichend Untersuchungsmatrix vorhanden war, MMP-13-Konzentrationen bestimmbar.

Wenn man eines der Abbauprodukte der Collagenasen, das CTX-II, betrachtet, bewegten sich unsere Ergebnisse im unteren Bereich der Spannweiten von Lohmander et al. (0-5 ng/mL) und Oestergaard et al. (0-25 ng/mL) [256, 257]. Auf Grund dieser niedrigen Konzentrationen war vermutlich kein signifikanter Unterschied feststellbar, auch wenn sich die beiden Gruppen absolut unterschieden. Die Konzentrationen eines weiteren Typ-II-Collagen-Abbauproduktes, dem Helix-II, lagen im Bereich der Messung von Wie et al. [258], stark geschädigte Knorpelbereiche betreffend ($1,11 \pm 0,23$ nmol/L).

CTX-II und Helix-II gelten als gute Marker für den Collagen-Abbau (Einleitung A, Kap. 2.2). Dabei hat die Messung der Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit die höchste Bedeutung. Hier ist deren Konzentration höher als im Serum, was für

eine lokale Produktion spricht [257]. Zwar ist die Bestimmung von CTX-II im Serum für die Analyse entzündlicher Prozesse auch sinnvoll, jedoch liegt ein solcher bei OA nicht zwingend vor bzw. ist interindividuell stark verschieden. Die Verwendbarkeit von CTX-II und Helix-II als Abbaumarker generell kann auch daran liegen, dass deren Konzentration mit zunehmenden OA-Schweregraden steigt [257, 258]. Somit könnte man mit diesen den Verlauf einer Erkrankung verfolgen bzw. den Erfolg einer Intervention auf den Collagen-Metabolismus testen. Neben der Detektion in Serum und Synovialflüssigkeit wird auch eine Messung im Urin diskutiert (uCTX-II bzw. uHelix-II). Charni et al. sehen darin Prädiktoren für die radiologische Progression einer RA [121]. Jedoch waren die Helix-II-Spiegel bei RA signifikant höher als bei OA und deshalb die Verwendbarkeit der Marker im Urin in Hinblick auf OA daraus nicht ableitbar. Elsaid et al. sprechen auch davon, dass CTX-II im Urin erst in der Spätphase von OA signifikante Unterschiede zeigt und deshalb für die Erfassung einer frühen OA nicht nützlich ist [117]. Zudem erscheint die Messung in der Synovialflüssigkeit sinnvoller als die Bestimmung im Urin oder Serum, da diese Körperflüssigkeit am Ort des Krankheitsgeschehens liegt [256]. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit nur die Konzentration der Abbaumarker in der Synovialflüssigkeit bestimmt und auf eine Messung der Konzentrationen im Serum der Probanden verzichtet. Die signifikante Korrelation zwischen der MMP-3-Genexpression im Knorpel und der CTX-II-Konzentration in der Synovialflüssigkeit lässt den Schluss zu, dass eine Hemmung dieses Enzyms durch eine aktive Substanz den Collagenabbau im Knorpelgewebe reduziert und somit das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen könnte (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.5.4).

Das Bone morphogenetic protein-7 (BMP7) aus der TGF- β -Superfamilie, wurde in der vorliegenden Studie ebenfalls untersucht (Daten nicht aufgeführt). Wir konnten in keiner Studienprobe quantifizierbare Mengen dieses Faktors messen. Alle OD-Werte lagen im Bereich zwischen 0-Standard und 1.Standard. Im Gegensatz dazu wiesen Honsawek et al. bei Knie-OA-Patienten BMP-7 in Plasma und Synovialflüssigkeit nach [259]. Jedoch lagen auch hier die Werte im niedrigen Konzentrationsbereich mit $12,1 \pm 1,6$ pg/mL im Plasma und $10,5 \pm 2,2$ pg/mL in der Synovialflüssigkeit. Die Verwendung eines ELISA-Kits mit einem niedrigeren

LOQ als des hier eingesetzten Kits erlaubte der Forschergruppe jedoch die verlässliche Quantifizierung des Proteins. Sie konnten zeigen, dass mit steigendem Schweregrad der Knie-OA die BMP7-Konzentration im Plasma ansteigt und diese mit der Konzentration in der Synovialflüssigkeit positiv korreliert. Der Einfluss von Pycnogenol® auf die Konzentration von BMP-7 in der Synovialflüssigkeit konnte in der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden. Auch über die Wirkung des Wachstumsfaktors bei OA herrscht noch Unklarheit. Die Untersuchungen von Honsawek et al. deuten darauf hin, dass BMP-7 einen fördernden Effekt auf die Progression von Knie-OA hat, da die Spiegel mit wachsendem Schweregrad der Erkrankung steigen [259]. Im Gegensatz dazu, fanden Hayashi et al. inhibitorische Effekte auf die fortschreitende Knorpelzerstörung in einem Kaninchen-OA-Modell nach Injektion von BMP-7 in die betroffenen Gelenke [260]. Zusätzlich sahen Hunter et al. in einer Phase-I-Dosiseskalationsstudie eine Tendenz zu einem positiven Effekt von intraartikulär verabreichten BMP-7 auf die Symptomatik der Kniegelenks-OA, auch wenn der Unterschied zwischen den Gruppen nicht statistisch signifikant war [261].

Das Zelloberflächen-Glykoprotein CD163 ist auf mononuklearen Phagozyten exprimiert, genauer auf Monozyten und Makrophagen [262]. Eine mögliche Rolle von Makrophagen im Entzündungsgeschehen von OA wird diskutiert. Im Rahmen einer Entzündung wird CD163 von den Zellen abgelöst und liegt frei im Plasma vor (lösliches CD163, sCD163) [263]. Die Konzentration des Markers in der Synovialflüssigkeit könnte somit ein Indiz für die Schwere der Entzündung im Gelenk sein. Unsere gemessenen Konzentrationen lagen im Bereich der Werte von Daghestani et al. (718 ng/mL; 95 % Konfidenzintervall [4-20107 ng/mL]) (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.2). Bei den Ergebnissen von Baeten et al. zeigten sich jedoch deutlich höhere Spiegel des Oberflächenmarkers in der Synovialflüssigkeit (8,9 µg/mL bzw. 2,6 µg/mL im Schnitt) [262]. Begründet werden kann der Unterschied mit dem fehlenden Hyaluronidase-Vorverdau bei Baeten im Vergleich zu Daghestani und unseren Untersuchungen. Die Folge dieses Fehlens sind weniger zuverlässige Ergebnisse auf Grund der teilweise hohen Viskosität der Synovialflüssigkeit wegen Komplexbildung [264]. Durch Einwirkung des Enzyms können deutliche Viskositätssenkungen erreicht werden [265]. Es zeigten

sich bei uns keine Konzentrationsunterschiede von sCD163 zwischen den beiden Gruppen. Pycnogenol® scheint auf diesen Teil der Entzündung folglich keinen Einfluss gehabt zu haben. Darüber lässt sich aber abschließend, u.a. auf Grund der geringen Teilnehmerzahl der vorliegenden Studie, kein Urteil fällen.

1.5 Beobachtete Korrelationen

1.5.1 Korrelationen zwischen Konzentrationen von Markern der Knorpelhomöostase in diversen Spezimen

Zusätzlich zu den Konzentrationsbestimmungen der einzelnen Parameter in den unterschiedlichen Spezimen, wurden die ermittelten Werte außerdem in Beziehung zueinander gesetzt. Mit Hilfe des Pearson Korrelationstests konnte im Anschluss die Signifikanz dieser Zusammenhänge überprüft werden. Für das Leptin ergab sich eine signifikant positive Korrelation zwischen Konzentration im Serum bei Visite 2 und Leptinkonzentration in der Synovialflüssigkeit der jeweiligen Probanden (Abbildung 33; $p < 0,05$, $n = 26$, Elimination eines Ausreißers via GraphPad™-Prism). Dieser Sachverhalt ermöglicht eine Abschätzung der Konzentration von Leptin in der Synovialflüssigkeit aus der Kalibrierfunktion, wenn man den leichter zu bestimmenden Gehalt des Markers im Serum kennt.

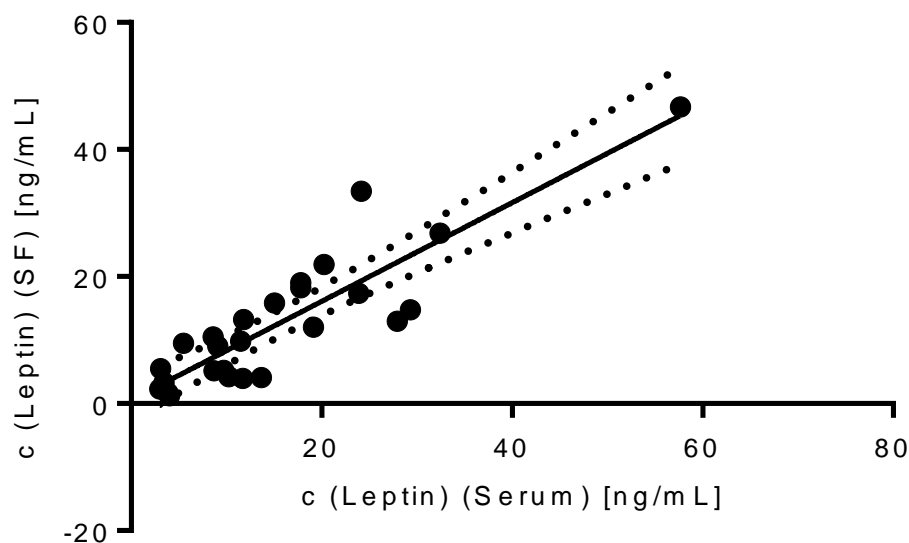


Abbildung 33: Beziehung zwischen der Serumkonzentration von Leptin bei Visite 2 zu der Leptinkonzentration in der Synovialflüssigkeit (SF) des jeweiligen Patienten. Die positive Korrelation der beiden Parameter war statistisch signifikant nach Eliminierung eines Ausreißers ($p < 0,05$; $n = 26$; $R = 0,882$). Die gepunkteten Linien zeigen das 95 %-Konfidenzintervall.

Eine weitere interessante Beziehung konnte bei der Korrelation von Serumleptinspiegeln bei Visite 2 und dem Body-Mass-Index (BMI) der Patienten entdeckt

werden (Abbildung 34). Jedoch zeigte sich hierbei nur eine Tendenz und kein signifikanter Zusammenhang ($p > 0,05$; $n = 30$).

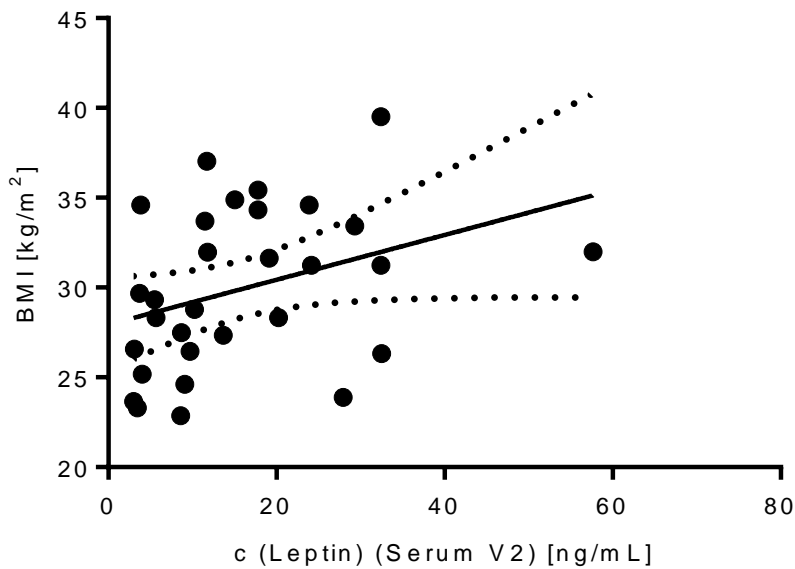


Abbildung 34: Korrelation zwischen der Leptinkonzentration im Serum, entnommen bei Visite 2, und dem Body-Mass-Index (BMI) der Studien-Probanden. Im Pearson Korrelationstest zeigte sich nur eine Tendenz und kein signifikanter Zusammenhang ($p = 0,06$; $n = 30$; $R = 0,347$). Die gepunkteten Linien symbolisieren das 95 % KI.

1.5.2 Korrelationen zwischen Markerkonzentrationen und Konzentrationen wichtiger Inhaltsstoffe von Pycnogenol® im Serum und den Blutzellen

Ergänzend zu den Korrelationen zwischen den Markern der Knorpelhomöostase untereinander wurde mit den Konzentrationen der Knorpelhomöostase-Parameter und den erhaltenen Konzentrationen der diversen Inhaltsstoffe von Pycnogenol® und des Metaboliten M1 in den verschiedenen Spezimen [62] eine Korrelationsanalyse durchgeführt.

Dabei ergab sich zwischen der Konzentration des Metaboliten M1 im Serum nach Enzyminkubation und der Konzentration von ADAMTS-5 im Serum eine signifikante negative Korrelation im Pearson Korrelationstest ($p= 0,016$; $n= 37$, $R= 0,394$) (Abbildung 35). Dabei wurden die Werte aller Probanden von Visite 1 und 2, soweit für beide Parameter vorliegend, verwendet. Auch Konzentrationen von Probanden, die Ernährungsverstöße begangen hatten, wurden mit einbezogen. Es lässt sich als Resultat zusammenfassen, dass je mehr M1 im Serum vorlag, desto geringer die ADAMTS-5-Konzentration in diesem Spezimen war.

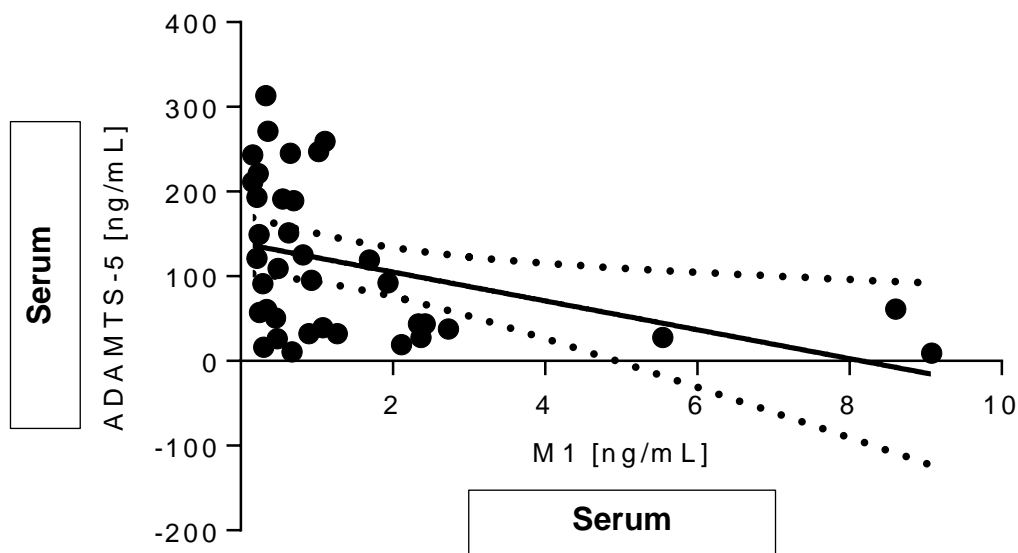


Abbildung 35: Korrelation zwischen den Konzentrationen von M1 nach Enzyminkubation und von ADAMTS-5 im Serum der Probanden der Pycnogenol®-Studie. Es ergab sich ein signifikanter negativer Zusammenhang zwischen den beiden Parametern unter Einbeziehung der Ernährungsverstöße ($p= 0,016$, $n= 37$; $R= 0,394$). Die gepunkteten Linien stellen das 95 %-Konfidenzintervall (KI) dar.

Bei Betrachtung der Kaffeesäure-Konzentration im Serum nach Enzyminkubation in Bezug zur MMP-13-Konzentration im Serum ergab sich eine signifikant positive Korrelation im Pearson-Test ($p= 0,02$, $n= 8$, $R= 0,789$) (Abbildung 36). Dabei handelte es sich um eine überraschende Feststellung: Je mehr Kaffeesäure im Serum vorhanden war, umso höher war die MMP-13-Konzentration.

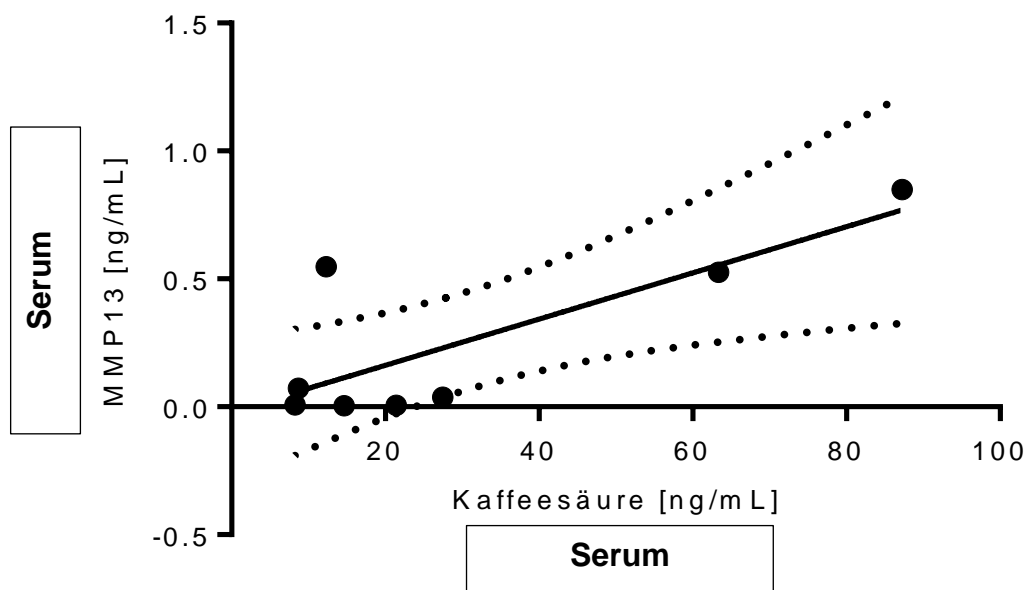


Abbildung 36: Korrelation zwischen der MMP-13- und der Kaffeesäure-Konzentration (nach Enzyminkubation) im Serum der Probanden, ausgewertet mit der GraphPad™-Prism-Software, Version 6.0. Es resultierte ein signifikant positiver Zusammenhang zwischen den beiden Parametern ($p= 0,02$, $n= 8$; $R= 0,789$). Die gepunkteten Linien symbolisieren das 95 % KI.

Weiterführend wurden die Beziehungen zwischen den Konzentrationen der Inhaltsstoffe des Rindenextraktes und von M1 in den Blutzellen mit der Konzentration der Knorpelmarker im Serum betrachtet. Es ergab sich ein signifikant negativer Zusammenhang zwischen der Konzentration des Metaboliten M1 in den Zellen und der ADAMTS-4-Konzentration im Serum unter Berücksichtigung von Ernährungsverstößen und nach Ausschluss eines Ausreißers ($p= 0,036$, $n= 23$, $R= 0,445$) (Abbildung 37). Folglich nahm in der vorliegenden Studie die ADAMTS-4-Konzentration im Serum mit wachsenden M1-Konzentrationen in den Zellen ab.

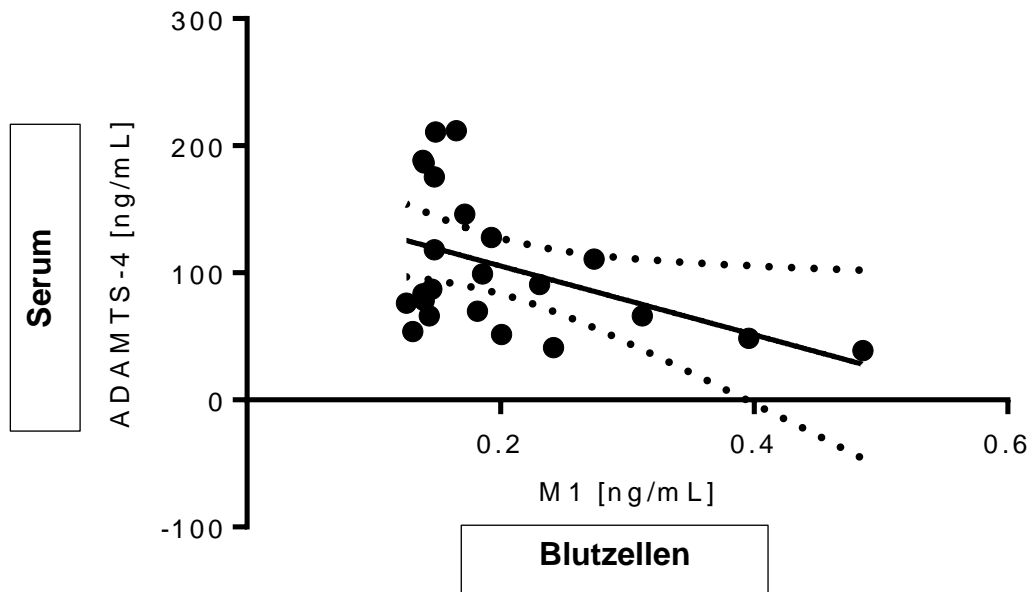


Abbildung 37: Schaubild der Beziehung zwischen der ADAMTS-4-Konzentration im Serum und der M1-Konzentration in den Blutzellen nach Enzyminkubation und unter Ausschluss von Verstößen gegen das Ernährungsprotokoll und eines Ausreißers. Es ergab sich ein signifikant negativer Zusammenhang ($p= 0,036$, $n= 23$; $R= 0,445$). Die gepunkteten Linien zeigen das 95 %-KI.

1.5.3 Korrelationen zwischen Markerkonzentrationen und Konzentrationen wichtiger Inhaltsstoffe von Pycnogenol® in der Synovialflüssigkeit

Der zuvor überraschend festgestellte Zusammenhang zwischen Kaffeesäure und MMP13 im Serum bestätigte sich in einem weiteren Spezimen, der Synovialflüssigkeit. Es zeigte sich auch hier eine positive Korrelation, die sich jedoch nur als Tendenz und nicht als statistisch signifikant herausstellte ($p= 0,064$, $n= 10$, $R= 0,602$).

Im Gegensatz dazu ergab sich eine tendenziell negative Korrelation zwischen Kaffeesäure und MMP1 in der Synovialflüssigkeit unter Ausschluss der Verstöße gegen das Ernährungsprotokoll ($p= 0,066$, $n= 8$, $R= 0,615$) (Abbildung 38).

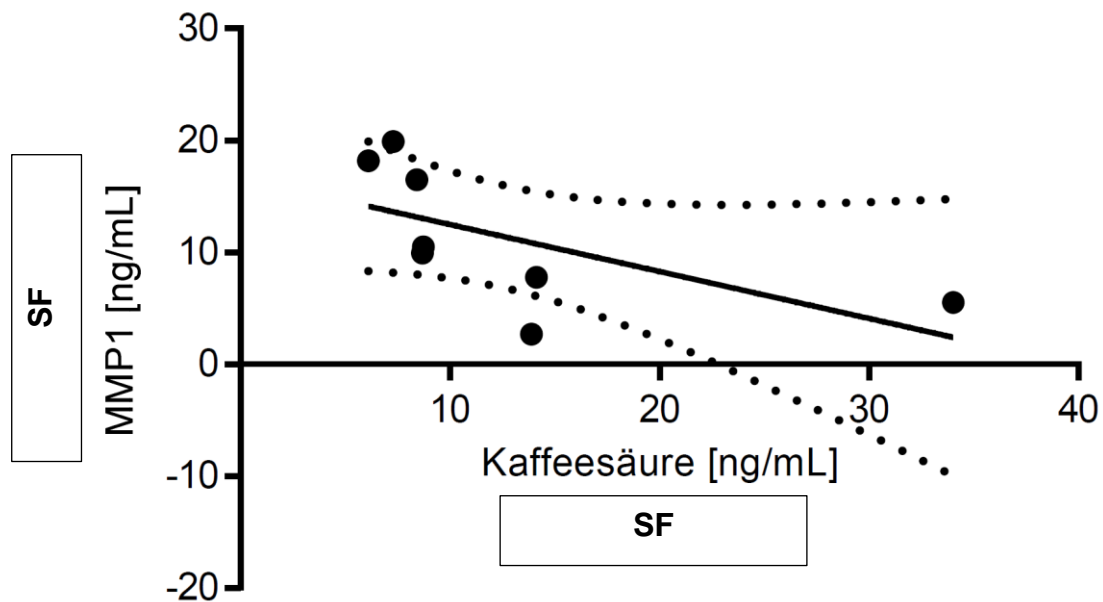


Abbildung 38: Beziehung zwischen der MMP1- und der Kaffeensäure-Konzentration in der Synovialflüssigkeit (SF) der Probanden der vorliegenden Studie nach Ausschluss der Verstöße gegen die Ernährungsvorschriften. Es resultierte ein tendenziell negativer Zusammenhang ($p=0,066$, $n=8$, $R=0,615$). In gepunkteten Linien dargestellt ist das 95 %-KI.

Die einzig signifikante Beziehung in Hinblick auf die Synovialflüssigkeit ergab sich bei der Betrachtung der Ferulasäure- in Bezug zur MMP3-Konzentration. Hier zeigte sich eine signifikant negative Korrelation, sowohl unter Einschluss ($p=0,007$, $n=11$, $R=0,761$) (Abbildung 39) sowie unter Ausschluss der Ernährungsprotokollverstöße ($p<0,05$, $n=8$, $R=0,615$).

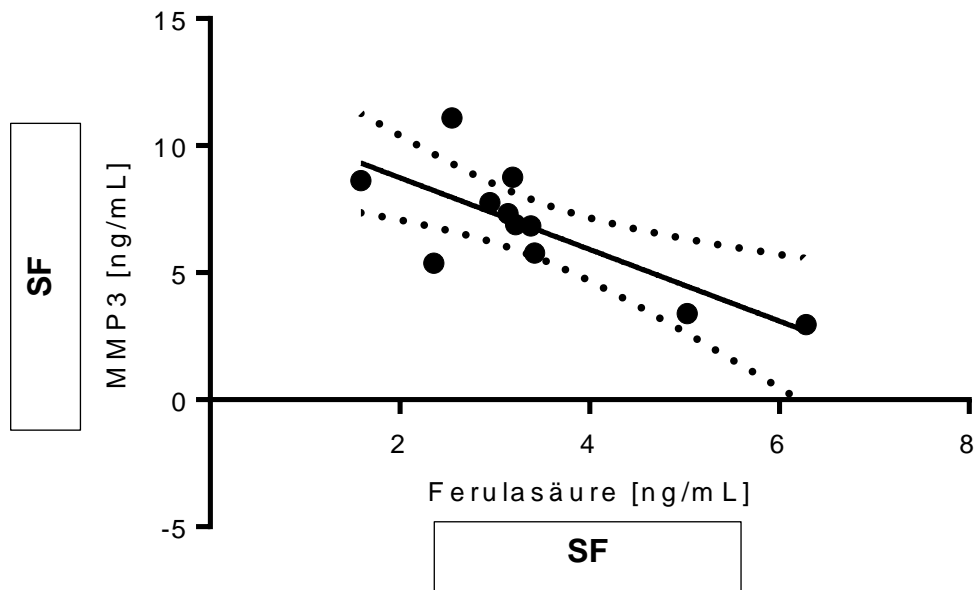


Abbildung 39: Darstellung der Korrelation der Ferulasäure- zur MMP3-Konzentration in der Synovialflüssigkeit (SF) der Probanden. Unter Einschluss der Ernährungsprotokollverstöße resultierte ein signifikant negativer Zusammenhang ($p= 0,007$, $n= 11$; $R= 0,761$). Die gepunkteten Linien symbolisieren das 95 %-KI.

Alle weiteren untersuchten Beziehungen zeigten keine signifikanten Zusammenhänge und auch keine Tendenzen in eine bestimmte Richtung.

1.5.4 Zusammenhänge zwischen der Genexpression im Knorpel und Konzentrationen von Abbaumarkern in der Synovialflüssigkeit

Ergänzend zu den vorangegangenen Korrelationstests wurden die relativen Genexpressionen der MMPs im Knorpelgewebe mit den Konzentrationen von CTX-II in der Synovialflüssigkeit der Probanden in Verbindung gesetzt. Die Genexpressionen wurden jeweils, nur auf ein Housekeeping-Gen normiert, in die Analyse mit einbezogen.

Im Rahmen der MMP-1-Untersuchung zeigten sich im Pearson Korrelationstest jeweils signifikant negative Korrelationen zwischen dem ΔC_t -Wert in Bezug auf ACTB ($R= -0,415$, $p= 0,049$, $n= 23$) und in Bezug auf HPRT-1 ($R= -0,427$, $p= 0,042$, $n= 23$) und den Konzentrationen von CTX-II in der Synovialflüssigkeit der Patienten. Lediglich bei Betrachtung der Werte in Relation zu SDHA wurde kein signifikanter Zusammenhang offenbar.

Die Berechnungen zum Zusammenhang zwischen der MMP-3-Expression im Knorpel und der CTX-II-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit offenbarten ein ähnliches Bild. Unter Einbezug von ACTB zeigte sich eine Tendenz zur negativen Korrelation ($R = -0,356$, $p = 0,095$, $n = 23$). Bei Betrachtung der auf HPRT-1 normierten Genexpressionen war die Korrelation signifikant negativ ($R = -0,548$, $p = 0,007$, $n = 23$, Abbildung 40), nach Ausschluss eines Ausreißers (Patient #133). Vergleichbar mit der Analyse von MMP-1 war auch hier kein signifikanter Zusammenhang unter Einbezug von SDHA als Referenz erkennbar.

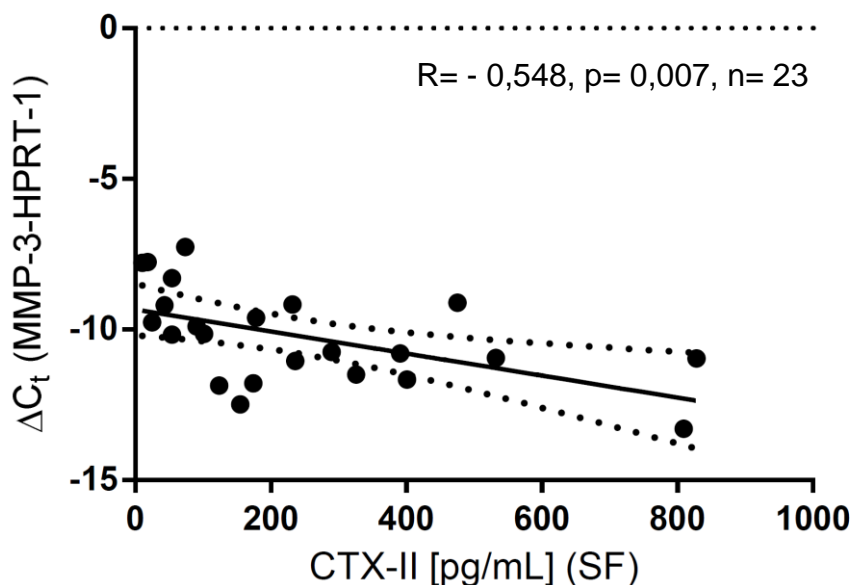


Abbildung 40: Zusammenhang zwischen der relativen Genexpression von MMP-3, bezogen auf HPRT-1, im Knorpelgewebe der Probanden und der Konzentration des Abbaumarkers CTX-II in der Synovialflüssigkeit. Es wurde eine signifikant negative Korrelation offenbar (Pearson Korrelationstest, $p = 0,007$, $n = 23$).

Analoge Untersuchungen zum Zusammenhang zwischen der MMP-13-Genexpression und den CTX-II-Konzentrationen, sowie zwischen der Cathepsin K-Expression und der Helix-II-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit ergaben keine signifikanten Korrelationen (Daten nicht aufgeführt).

1.5.5 Diskussion der ermittelten Korrelationen

Unsere beobachtete Korrelation zwischen Leptin-Spiegeln in der Synovialflüssigkeit und Leptin-Spiegeln im Serum hat eine praktische Bedeutung. Wenn in Zukunft z.B. ein Antikörper gegen Leptin in der Synovialflüssigkeit zur Therapie der OA eingesetzt werden sollte (Zusammenhang Einleitung A, Kap. 2.4), könnte man mit dieser Erkenntnis die notwendige therapeutische Dosis berechnen, ohne dem Patienten die invasive Synovialflüssigkeit-Entnahme zumuten zu müssen. Dies würde u.a. auch ein geringeres Infektionsrisiko des Gelenkes nach sich ziehen, welches bei Punktion eines Gelenkes immer vorhanden ist. Damit bestätigten unsere Untersuchungen die Ergebnisse von Presle et al. [176] und Lübbecke et al. [179], die auch eine signifikant positive Korrelation zwischen Serum- und Synovialflüssigkeits-Leptinspiegeln beobachteten. Weiterhin könnte man mit dem gemessenen Spiegel im Serum eine Aussage über die Schwere der OA treffen, da der daraus abgeleitete Synovialflüssigkeits-Spiegel von Leptin mit dem OA-Schweregrad positiv korreliert [169]. Mit diesem biochemischen Parameter könnte dann z.B. eine Indikation zum Kniegelenkersatz untermauert werden.

Im Gegensatz zu unseren Ergebnissen konnten Considine et al. einen hochsignifikanten Zusammenhang zwischen Serum-Leptinspiegel und BMI feststellen [266]. Die absoluten Leptinspiegel im Serum von Visite 1 und 2 lagen im Mittel bei $17,36 \pm 15,36$ ng/mL ($n=60$). Damit bewegten sich unsere gemessenen Spiegel in der Mitte zwischen den beiden untersuchten Gruppen bei Considine et al. ($31,3 \pm 24,1$ ng/L bei den Adipösen vs. $7,5 \pm 9,3$ ng/mL bei den Normalgewichtigen) [266]. Der durchschnittliche BMI der Teilnehmer unserer Studie lag bei $30,74 \pm 5,29$ kg/m². Damit war dieser, wie die Serumspiegel von Leptin, auch in der Mitte der beiden Studiengruppen von Considine et al. ($35,1 \pm 7,2$ kg/m² bei den Adipösen vs. $23,0 \pm 2,5$ kg/m² bei den Normalgewichtigen) lokalisiert [266]. Die in der vorliegenden Untersuchung gemessenen Leptin-Serumspiegel waren somit vergleichbar und die beobachtete Tendenz kann als tatsächliche Korrelation angenommen werden.

Im Rahmen unserer Untersuchungen konnte kein signifikanter Zusammenhang zwischen den Leptinspiegeln in der Synovialflüssigkeit und dem BMI der Patienten festgestellt werden. Im Unterschied dazu stellten Ku et al. (n= 42) eine signifikante Korrelation der beiden Parameter fest [169]. Dabei bewegten sich deren gemessene Absolutkonzentrationen mit 0,5 -15,8 ng/mL in dem von uns gemessenen Bereich ($14,32 \pm 13,73$ ng/mL, n= 27). Eine relevante Korrelation der beiden Parameter kann also nicht ausgeschlossen werden und sollte mit einer größeren Anzahl an Patienten überprüft werden. Die Korrelationsanalysen mit allen anderen untersuchten Markern lieferten keine weiteren signifikanten bzw. tendenziellen Korrelationen.

Die von uns beobachtete Tendenz zur negativen Korrelation zwischen dem Gehalt an Kaffeesäure und der Konzentration an MMP-1 in der Synovialflüssigkeit (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.5.3) war schon anderweitig Gegenstand der Forschung. Chiang et al. fanden an einer humanen Fibroblastenzelllinie heraus, dass Kaffeesäure die Expression von MMP-1, aber nicht von MMP-3 hemmt [267]. Durch *Coffea arabica*-Extrakt, der u.a. Kaffeesäure enthält, konnte in diesen *in-vitro*-Tests eine Reduktion der Collagen- bzw. Elastin-Zerstörung erreicht werden. Dafür machten die Autoren die Blockade des MAPK-Signalweges, speziell von p38, JNK und ERK, verantwortlich. Ein ähnlicher Mechanismus ist auch für die Kaffeesäure in der Synovialflüssigkeit, mit Wirkung auf die Freisetzung von MMP-1 aus Chondrozyten, denkbar. Die beobachtete Tendenz zur Hemmung der MMP-1-Genexpression in der Pycnogenol®-Gruppe (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.5) könnte u.a. durch Inhibition der MAPK-Signalwege erklärt werden. Shi et al. untersuchten die Wirkung von synthetisch hergestellten Kaffeesäure-Amiden auf Matrix-Metalloproteinasen und entdeckten dabei gute inhibitorische Effekte derer auf MMP-2 und -9 und eine gute Selektivität gegenüber MMP-1 [268]. Die Autoren betonten die Nützlichkeit von MMP-Inhibitoren aus natürlichen Quellen, da diese, im Gegensatz zu synthetisch hergestellten Breitspektrum MMP-Inhibitoren, die jeweiligen Enzyme nicht vollständig hemmen. Diese Eigenschaft ist, wie bereits erwähnt, essentiell (Einleitung A, Kap. 2.1). Pflanzliche Therapeutika mit Wirkung auf diese Enzymklasse könnten die vorhandene Lücke also zumindest

vorübergehend schließen, bis wirksame und sichere synthetische MMP-Inhibitoren auf den Markt kommen (Einleitung A, Kap. 1.3).

Pluemsamran et al. untersuchten die Wirkung der beiden Hydroxyzimtsäuren Kaffeesäure und Ferulasäure (Abbildung 41) auf die Genexpression von MMP1 einer immortalisierten humanen Keratinozytenzelllinie nach Reizung durch UVA-Strahlung [269]. Durch die UVA-Strahlen wurde oxidativer Stress in Form gebildeter ROS ausgelöst, der in der Folge zur MMP1-Freisetzung und wiederum folglich in einem Collagen-Abbau resultierte. Es zeigte sich in diesem Modell der Hautalterung, dass Kaffee- und Ferulasäure als potente Antioxidantien die Zellen vor oxidativem Stress und in der Konsequenz vor MMP1-Aktivierung und -Expression schützen können.

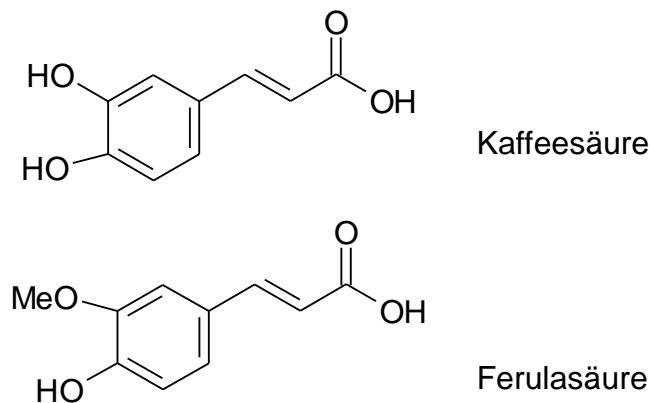


Abbildung 41: Darstellung der beiden Hydroxyzimtsäuren Kaffee- und Ferulasäure, die beide als Bestandteile im standardisierten Kiefernrintenextrakt (Pycnogenol®) vorhanden sind.

Kim et al. bestätigten die UV-Schutzwirkung von Kaffeesäure, jedoch wurden hier UVB-Strahlen verwendet [270]. Kaffeesäure und andere aktive Komponenten von Knoblauch konnten im Tierversuch mit haarlosen Mäusen einen modulierenden Effekt auf die AP1- und NF-κB-Signalwege zeigen und somit die MMP-1-, -3- und -9-Aktivität reduzieren. Ein Schutz vor Collagen-Abbau und Faltenbildung der Haut konnte damit erzielt werden. Man muss jedoch beachten, dass in Mäusen eine andere Form der MMP-1 vorliegt und somit die Ergebnisse von Kim et al. nicht 1:1 auf den Menschen übertragen werden können [271]. Auch andere Flavonoide konnten eine hemmende Wirkung auf die Expression der MMP-1 in humanen Fibroblasten zeigen. Lim et al. wiesen eine starke inhibitorische Wirkung der Flavonole Quercetin und Kaempferol und eine schwache Hemmwirkung der

Flavone Apigenin und Wogonin auf die MMP-1-Expression nach [272]. Die Modulierung der MAPK-Signalwege war dafür der Grund. Ebenso beobachteten die Autoren die Hemmung des AP1-Transkriptionsfaktors. Auf Grund der bereits erwähnten Ergebnisse ist auch eine solche Hemmwirkung der Kaffeesäure auf MMP-1 in Chondrozyten denkbar. Die Kaffeesäure könnte auch für die von Grimm et al. *in-vitro* entdeckte Hemmwirkung von Pycnogenol® auf die MMP-1-Aktivität verantwortlich sein, auch wenn in der Untersuchung der Forschergruppe der Metabolit M1 und der Metabolit M2 als potenter in Hinblick auf die Hemmung des Enzyms MMP-1 eingestuft wurden [223]. Ergänzend zu den Untersuchungen von Plemsamran et al. konnten auch Chen et al. in ihren Experimenten eine Hemmwirkung der Ferulasäure auf die MMP-1-Expression zeigen [269, 273]. Als *in-vitro*-Modell dienten hier mit H₂O₂ stimulierte porcine Chondrozyten. Als Folge der Stimulation mit diesen ROS wurde die PG-Synthese gehemmt und die Apoptose sowie die MMP-Expression, über eine IL-1 β -vermittelte AP1-Aktivierung, aktiviert. Nach Vorinkubation mit 40 μ M Ferulasäure, konnten die IL-1 β - bzw. TNF- α -vermittelte Steigerung der MMP-1-Expression verhindert werden. Durch Nachbehandlung konnten sowohl die MMP-1- als auch die MMP-13-Expression gehemmt werden [273]. Da ROS am Knorpelabbau im Rahmen von OA beteiligt sind und deren Abbau auf Grund einer Reduktion der Katalase im Laufe der Erkrankung gehemmt ist, ist der Abfang dieser ROS durch Ferulasäure eine sinnvolle Option zum Eingriff in die OA-Pathogenese (Abbildung 42) und wird analog für Kaffeesäure diskutiert [120]. Eine negative Korrelation zwischen Ferulasäure- und MMP-1-Konzentration in der Synovialflüssigkeit konnte in der vorliegenden Arbeit zwar nicht bestimmt werden, jedoch wurde eine signifikante negative Korrelation zwischen Ferulasäure- und MMP-3-Konzentration in der Synovialflüssigkeit entdeckt (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.5.3). Wenn man bedenkt, dass MMP-3 die Fähigkeit besitzt, proMMP-1 zu aktivieren, deutet dieser Zusammenhang auch auf eine Wirkung der Ferulasäure auf die MMP-1-Expression hin, wenn auch indirekt. Neben der direkten ROS-Abfangqualität sorgt Ferulasäure auch für die Hochregulierung ROS-abbauender Enzyme, wie z.B. der Katalase, der Superoxid-Dismutase und der Glutathion-Peroxidase. Da jedoch in den Versuchen von Chen et al. hohe Mengen an Ferulasäure eingesetzt wurden,

ist die Übertragbarkeit dieser Ergebnisse auf den Menschen schwer möglich. Ein Einfluss der Ferulasäure erscheint jedoch, auf Grund unserer Ergebnisse, trotzdem als wahrscheinlich.

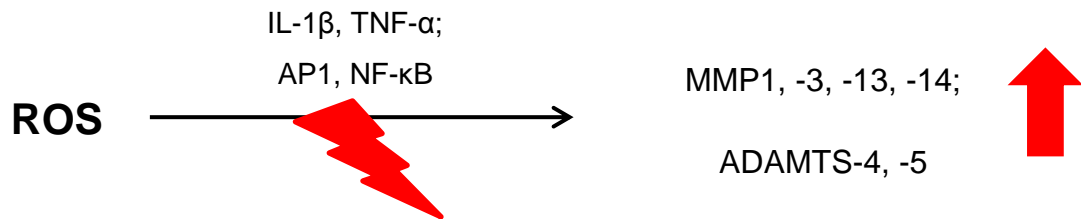


Abbildung 42: Schematische Darstellung der ROS-Pathogenese bei OA. Die reaktiven Sauerstoffspezies sorgen für einen Zytokin- bzw. Transkriptionsfaktorvermittelten Anstieg knorpelabbauender Enzyme im Serum, der Synovialflüssigkeit und dem Knorpel. Pycnogenol® könnte u.a. durch Abfangen der ROS modulierend in das Entzündungsgeschehen eingreifen.

Auch für den Kiefernrintenextrakt Pycnogenol® wurden schon positive Effekte auf die MMP-Expression gezeigt (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.5). Zusätzlich konnten Cho et al. mit einer Mischung aus Vitamin C und E, Primelöl und Pycnogenol® eine Hemmwirkung auf die UVB- und ROS-vermittelte Faltenbildung bei haarlosen Mäusen nach oraler Gabe feststellen [271]. Die Autoren machten dafür die Hemmwirkung auf MMP-1 und MMP-13 verantwortlich und maßen auf Grund der Unterschiede von MMP-1 in der Maus im Vergleich zum Menschen der MMP-13-Hemmung die größere Bedeutung zu. Die ROS-Fängereigenschaft war dabei klar im Fokus des diskutierten Wirkmechanismus. Die entdeckte Hemmung des standardisierten Kiefernrintenextrakts auf die ADAMTS-5-Spiegel im Serum (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.1) bzw. MMP-1-, -3- und -13-Expression im Knorpel (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.5) kann u.a. damit erklärt werden. Andere MMPs, z.B. die MMP-9, können ebenso durch Pycnogenol® in ihrer Aktivität gehemmt werden, jedoch spielt diese MMP vermutlich nur eine untergeordnete Rolle in der Pathogenese der OA [274]. Im humanen Knorpel greift MMP-9, und auch MMP-2, erst dann ein, wenn bereits eine Degradation des Collagens durch MMP-1, -8, -13 und -14 stattgefunden hat [275]. Die im Serum signifikante und in der Synovialflüssigkeit tendenziell beobachtete positive Korrelation der Kaffeesäure-

Konzentration mit der ADAMTS-5-Konzentration bedarf weiterer Untersuchungen mit größeren Probandenkollektiven. Dies ist notwendig, um einen Mechanismus plausibel erklären zu können.

Die signifikant negative Korrelation der Konzentration des Metaboliten M1 mit der Konzentration von ADAMTS-5 im Serum ist mit der vorher genannten Theorie zur Ferula- und Kaffeesäure-Wirkung erklärbar. Der M1 konnte auch starke antioxidative Effekte in den Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen [223]. Daher wird ein Eingriff in die ROS-Pathogenese von uns als wahrscheinlich erachtet. Da der Metabolit in diverse Zellen aufgenommen und in diesen auch angereichert werden kann, ist die beobachtete Korrelation von der M1-Konzentration in den Blutzellen mit der ADAMTS-4-Konzentration im Serum begründbar (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.1). Eine zusätzlich mögliche Aufnahme des M1 auch in Chondrozyten, und eine damit verbundene Auswirkung auf die Geschehnisse im Zellinneren, muss jedoch noch untersucht werden (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.6).

Die beobachteten Zusammenhänge zwischen den relativen Genexpressionen von MMP-1 und MMP-3 im Knorpelgewebe und den Konzentrationen des Typ-II-Collagen-Abbaumarkers CTX-II in der Synovialflüssigkeit der Probanden sind biologisch plausibel. Da MMPs für die Spaltung von Typ-II-Collagen im Knorpel verantwortlich sind, ist bei einer erhöhten Expression derer mit einem Anstieg des Abbaus von Typ-II-Collagen zu rechnen. Die Spaltprodukte werden dann in die Synovialflüssigkeit freigesetzt. Dies war in der vorliegenden Studie zu sehen. Einen signifikanten Zusammenhang zwischen CTX-II, im Urin, und MMP-3, im Serum, stellten auch Maksymovych et al. bei Patienten mit ankylosierender Spondylitis fest [276]. Nach Behandlung mit dem TNF- α -Antikörper Adalimumab wurden beide Parameter signifikant verbessert. Die Verwendung von CTX-II als Biomarker für den Verlauf einer OA bzw. zur Bestimmung des Effektes einer Therapie erhält somit weiter Glaubhaftigkeit. Eine Bestätigung der von uns entdeckten Beziehung ist aber notwendig, da eine vermehrte Expression eines Enzyms, wie bereits beschrieben, nicht zwingend mit einer gesteigerten Aktivität dessen einhergehen muss (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.6). Ebenso ist MMP-3 hauptsächlich für die Spaltung von Aggrecan verantwortlich. Die Bedeutung

dessen für den Typ-II-Collagen-Metabolismus wird als gering erachtet (Einleitung A, Kap. 2.2). Auf Grund dessen ist die klinische Relevanz der erfassten Korrelation (Abbildung 40) fraglich.

Um ein weitläufigeres Bild der Effekte des standardisierten Kiefernrintenextraktes bei OA zu bekommen, sollten im Folgenden die Wirkungen der verschiedenen Spezimen, Serum und Synovialflüssigkeit, nach Einnahme von Pycnogenol® *ex vivo* auf die Ausschüttung von MMPs aus Chondrozyten, nach IL-1 β -Stimulus, untersucht werden. Dadurch sollten in den Spezimen gelöste, unbekannte Stoffe sowie deren Metabolite in pharmakokinetisch vertretbaren Konzentrationen Beachtung finden.

1.6 Ex-vivo-Effekte von Serum nach Pycnogenol®-Einnahme auf humane primäre Chondrozyten

1.6.1 Prinzip und Aufbau der Versuchsdurchführung

Die Durchführung der Versuche orientierte sich an den Experimenten von Grimm et al. [228]. Das Serum mit darin enthaltenen Extraktbestandteilen und entstandenen Metaboliten nach mehrwöchiger Einnahme (Visite 2) von Pycnogenol® diente auch hier als „Verum“. Verglichen wurden die Konzentrationen von MMP-3/-13 in diesen Ansätzen mit den MMP-Konzentrationen in den Ansätzen mit Serum vor Einnahme des Extraktes desselben Patienten (Visite 1). Es lag somit eine interne Kontrolle vor. Der gleiche Versuch wurde mit Seren der Kontrollpatienten durchgeführt. Die Entwicklungen der MMP-3- bzw. MMP-13-Konzentrationen wurden dann miteinander in Relation gesetzt (externe Kontrolle), um Umwelteinflüsse zu eliminieren und einen eventuell zu erkennenden Effekt durch Einnahme des standardisierten Kiefernrintenextraktes, diesem auch zuschreiben zu können. Für den Erhalt verlässlicher Ergebnisse waren zusätzliche Kontrollen in den jeweiligen Ansätzen von Nöten.

Zunächst gab es Ansätze ohne jegliche Zusätze, also lediglich kultiviert mit IMDM-Kulturmedium ohne Serumzusatz (n= 3) (dunkelblau, Abbildung 43). Damit wurde die Basissekretion von MMP-13 durch die Chondrozyten erfasst. Der fehlende Zusatz von fötalem bovines Serum (FBS) sollte eine Interaktion zwischen tierischem und menschlichem Serum verhindern.

Daneben wurden drei Näpfchen mit 10 ng/mL IL-1 β als Entzündungsstimulus ohne weitere Zugabe geführt (rot, Abbildung 43). Diese Ansätze dienten als Positivkontrolle einer reinen Stimulation der MMP-Sekretion. Andere Arbeitsgruppen arbeiteten auch mit dieser, mit geringeren (0,1-5 ng/mL) oder höheren Konzentrationen (20 ng/mL) [108, 204, 277-279]. Im Bereich von 5-20 ng/mL IL-1 β scheinen keine signifikanten Unterschiede in Hinblick auf die Stimulation eines Entzündungsgeschehens zwischen den unterschiedlichen Konzentrationen vorzuliegen. Clutterbuck et al. zeigten z.B. an Knorpelimplantaten, dass 10 ng/mL IL-1 β ausreichen, um den pro-inflammatorischen Zustand, analog zum Geschehen im Knorpel *in-vivo*, auszulösen [280]. Zusätzlich bestätigten unsere Versuche

(Allgemeiner Teil B, Kap. 1.7.2), dass diese Konzentration keinen toxischen Einfluss auf die Zellen hatte.

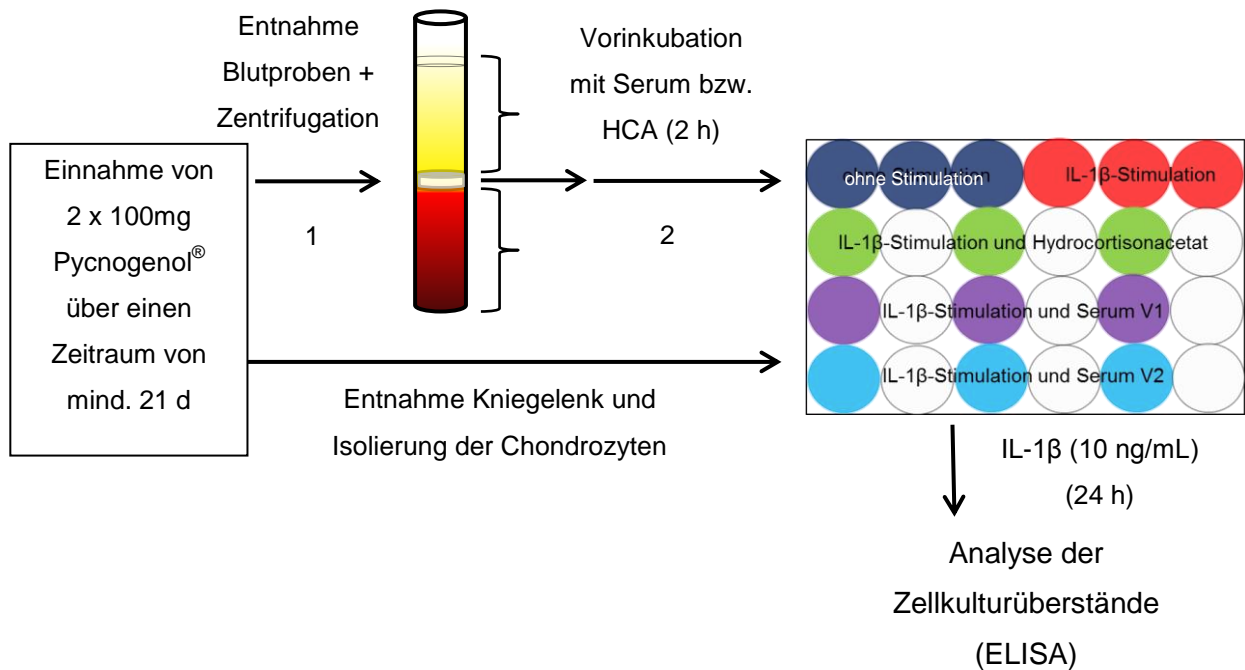


Abbildung 43: Prinzip der ex-vivo-Versuche mit humanem Serum und primären Chondrozyten. Nach Einnahme von Pycnogenol[®] über mindestens drei Wochen wurden dem Probanden 4x5 mL Blut entnommen, zentrifugiert und der Serumüberstand für die folgenden Versuche verwendet. Als Zellen fanden die nach Kniegelenkersatzoperation isolierten Chondrozyten aus dem Knorpel des jeweiligen Patienten Verwendung. Nach Vorinkubation über 2 h mit Serum bzw. 0,05 μ g/mL Hydrocortisonacetat (HCA) wurde mit 10 ng/mL IL-1 β ein Entzündungsstimulus gesetzt. Nach 24 h Inkubation wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und bei - 80 °C bis zur Vermessung gelagert.

Als Positivkontrolle für eine vorhandene Hemmwirkung auf die MMP-Freisetzung wurden drei Versuche mit 0,05 μ g/mL Hydrocortisonacetat je Ansatz zusätzlich zum Entzündungsstimulus mitgeführt (grün, Abbildung 43). Dass Glucocorticoide die Freisetzung von Entzündungsmediatoren im Knorpelgewebe unterdrücken können, wurde schon mehrfach gezeigt. Caron et al. zeigten einen regulierenden Effekt von Methylprednisolonacetat und Triamcinolonacetonid auf die Freisetzung von MMP-3 und MMP-13 aus Knorpelimplantaten von Pferden [277]. Jedoch war die Senkung der Expression nur bei MMP-13 signifikant, so dass eine Verlässlichkeit des verwendeten Glucocorticoids als Positivkontrolle der Senkung

der MMP3-Sekretion in den vorliegenden *ex-vivo*-Versuchen nicht als sicher anzusehen war. Wang et al. hingegen zeigten, dass 0,05 µg/mL Hydrocortisonacetat, die verwendete Menge der Positivkontrolle in der vorliegenden Arbeit, schon ausreichten, um katabole Stoffwechselwege in Chondrozyten zu hemmen und die EZM-Synthese anzuregen [281]. Auch Kydd et al. konnten einen inhibitorischen Einfluss des Glucocorticoids Methylprednisolonacetat auf die MMP-3- und MMP-13-Expression im Knorpelgewebe, in ihrem Bericht am Beispiel von Kaninchen, demonstrieren [282]. Die Eignung von Glucocorticoiden als Positivkontrolle sollte daher gegeben sein.

Der Haupt-Untersuchungsgegenstand waren je drei Ansätze mit jeweils einer 1:1-Verdünnung von Serum (Visite 1 bzw. 2) mit IMDM-Kulturmedium ohne Serumzusatz und Entzündungsstimulus (lila bzw. hellblau, Abbildung 43).

1.6.2 Ergebnisse

Bei Betrachtung der Resultate der *ex-vivo*-Versuche mit Serum von Patienten nach Einnahme von Pycnogenol[®], im Vergleich mit Serum der Kontrollen, zeigte sich, in Hinblick auf die Entwicklung der MMP-3-Konzentrationen in den verschiedenen Ansätzen, ein ähnliches Bild. Es ergab sich eine Basissekretion von $1043,92 \pm 540,19$ ng/mL MMP-3 pro 100000 Zellen in den Versuchen der Verumgruppe (n= 10) im Vergleich zu $928,05 \pm 496,09$ ng/mL MMP-3 bei den Kontrollen (n= 12) (Abbildung 44 bzw. Abbildung 45). Durch die Stimulation mit 10 ng/mL IL-1 β wurde diese Sekretion auf $2316,21 \pm 1519,76$ ng/mL MMP-3 in der Verumgruppe (n= 10) bzw. $1828,95 \pm 866,62$ ng/mL MMP-3 in der Kontrollgruppe (n= 12) signifikant gesteigert ($p= 0,02$ bzw. $p= 0,005$). Folglich war die Stimulierung der MMP-3-Ausschüttung mit 10 ng/mL IL-1 β erfolgreich.

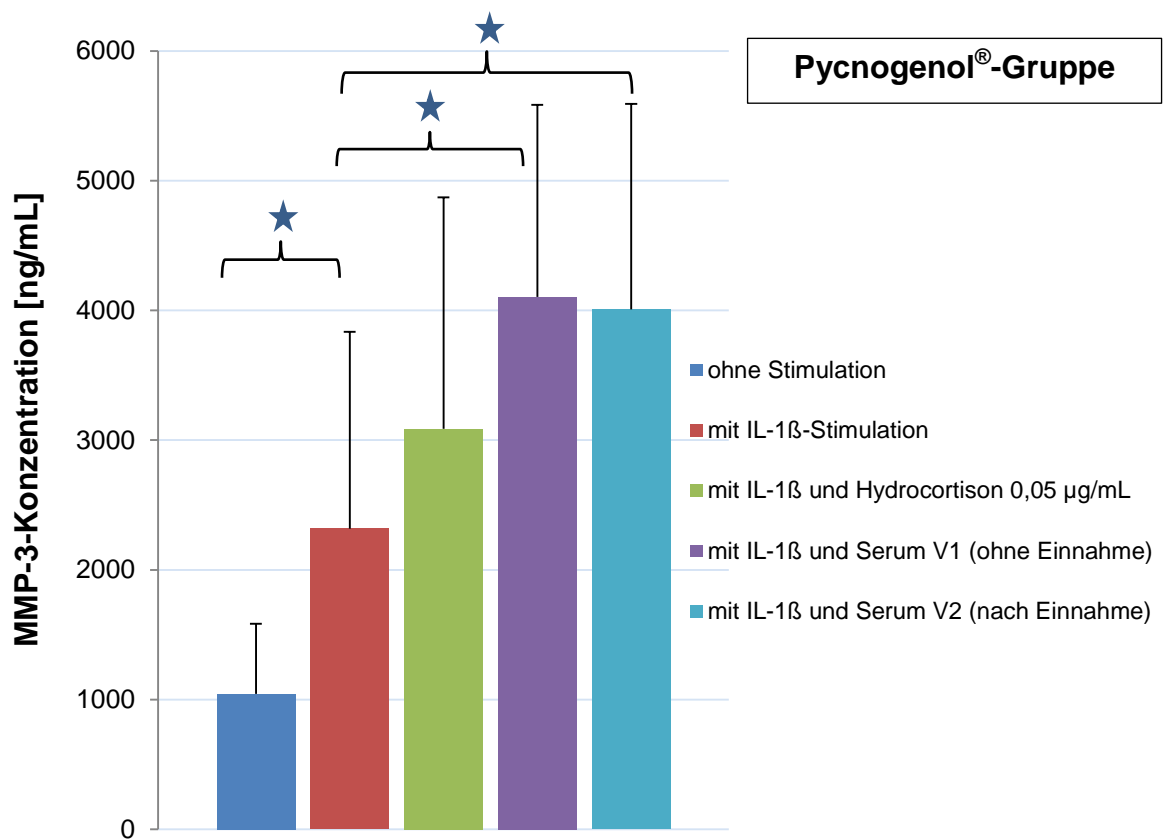


Abbildung 44: Ergebnisse der *ex-vivo*-Versuche mit Serum der Pycnogenol[®]-Patienten in Hinblick auf MMP-3 in [ng/mL], normiert auf 10000 Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte der einzelnen Gruppen mit Standardabweichungen. Angesetzt wurden jeweils drei Versuche pro Gruppe pro Patient (n= 3). Der blaue Balken zeigt das Ergebnis der Gruppe ohne IL-1 β -Stimulation (n= 8 gesamt), der rote Balken die Gruppe mit reiner IL-1 β -Stimulation (n= 8). Als Positivkontrolle wurde dem Ansatz zusätzlich Hydrocortison zugesetzt (grüner Balken, n= 5). Als interne Kontrolle zum Serum von Visite 2 nach Einnahme des Rindenextraktes (türkis, n= 11) diente das Serum von Visite 1 des jeweiligen Patienten vor Einnahme (violett, n= 11). Der Unterschied zwischen den beiden Serumgruppen war nicht signifikant ($p > 0,05$). * entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,05$)

Die Positivkontrolle der Hemmung der MMP-3-Ausschüttung durch Hydrocortisonacetat, war in dieser Konzentration nicht adäquat. Die MMP-3-Konzentration im Zellkulturüberstand war mit $3087,89 \pm 1783,30$ ng/mL in der Pycnogenol[®]-Gruppe (n= 7) und $2267,30 \pm 1122,94$ ng/mL in der Kontrollgruppe (n= 8) jeweils tendenziell höher als bei den Vergleichsansätzen mit reiner IL-1 β -Stimulation ($p = 0,34$). Auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war, konnte eben auch die erwartete Senkung der Freisetzung durch das Glucocorticoid nicht erzielt

werden. In der Verumgruppe zeigte sich von den Ansätzen mit Serum von Visite 1 zu Serum von Visite 2 eine leichte Senkung der MMP-3-Konzentration von anfangs $4104,69 \pm 1479,75$ ng/mL auf $4007,91 \pm 1585,74$ ng/mL (je $n=10$) (Abbildung 44). Diese Differenz war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$). Im Vergleich zur reinen Stimulation zeigten beide Ansätze im Mittel eine Steigerung der MMP-3-Konzentration. Diese Anstiege waren jeweils signifikant ($p=0,01$ zu V1 bzw. $p=0,02$ zu V2). Der Unterschied der beiden Seren-Gruppen zur Hydrocortisongruppe war nicht statistisch signifikant ($p > 0,05$).

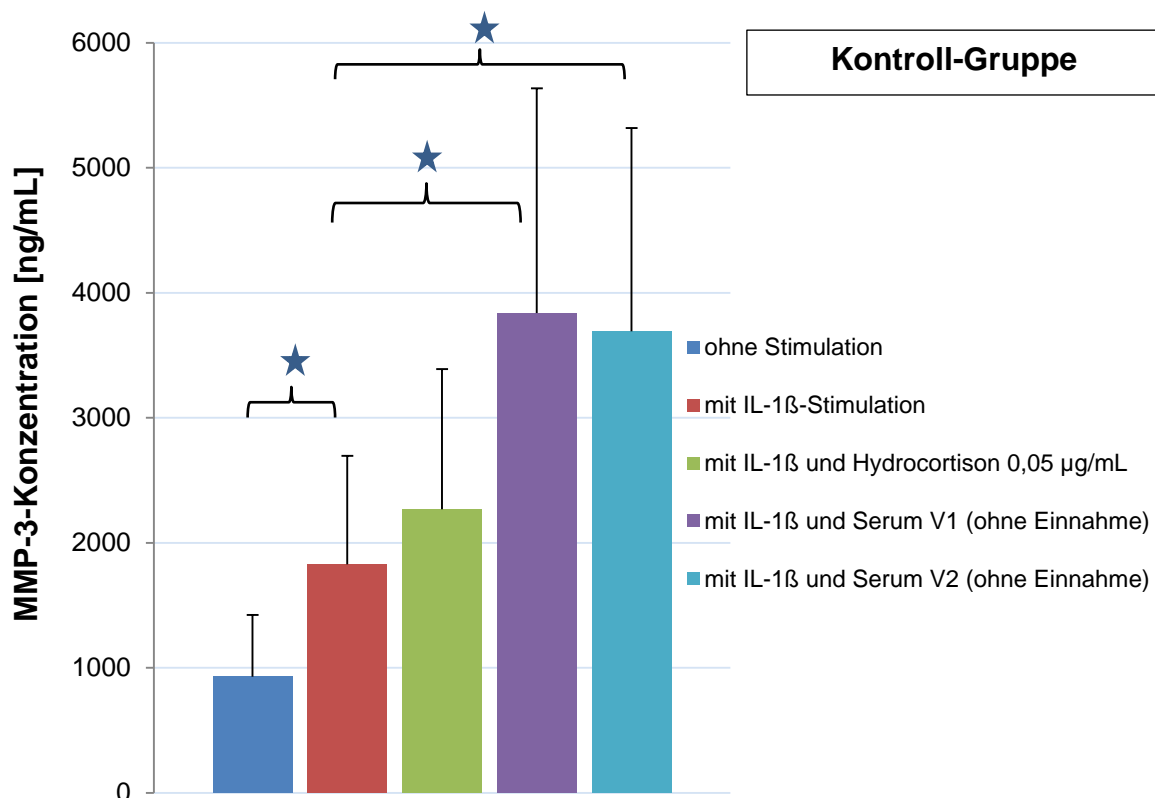


Abbildung 45: Resultate zur MMP-3-Konzentration in [ng/mL] in den verschiedenen Ansätzen der *ex-vivo*-Versuche mit Serum der Kontrollpatienten normiert auf 100000 Zellen. Die Balken symbolisieren die Mittelwerte mit Standardabweichung der einzelnen Ansätze ($n=3$ pro Ansatz für jeden Patienten). Blau: ohne Entzündungsstimulus ($n=9$); rot: mit reiner IL-1 β -Stimulation ($n=9$); grün: IL-1 β -Stimulation und Hydrocortison ($n=5$); violett: IL-1 β und Serum V1 ($n=13$); türkis: IL-1 β und Serum V2 ($n=13$). * entspricht signifikantem Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,05$)

Auch bei den Kontrollpatienten zeigte sich im Vergleich der Ansätze mit Serum von V1 und Serum von V2 eine leichte Senkung der MMP3-Konzentration von $3838,54 \pm 1797,49$ ng/mL auf $3691,00 \pm 1626,42$ ng/mL (je $n=12$) (Abbildung 45).

Dieser Unterschied war ebenso nicht signifikant ($p=0,84$). Im Vergleich zur reinen Stimulation mit IL-1 β war auch hier ein zusätzlicher Anstieg der MMP-3-Konzentrationen in den Ansätzen mit Serum erkennbar. Diese Konzentrationssteigerungen waren signifikant für V1 ($p=0,002$) und hochsignifikant für V2 ($p=0,0006$). Die Unterschiede der Seren-Gruppen zum Hydrocortison waren jeweils auch signifikant ($p=0,02$ bzw. $p=0,046$).

Die Untersuchungen der Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP-13)-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen ergaben eine Basissekretion von $254,39 \pm 240,98$ pg/mL in der Verum- ($n=12$) bzw. $210,14 \pm 217,97$ pg/mL MMP-13 in der Kontrollgruppe ($n=14$) (Abbildung 46 bzw. Abbildung 47).

Durch den Entzündungsstimulus IL-1 β konnte eine signifikante Sekretionssteigerung von MMP-13 auf $1728,13 \pm 1947,20$ pg/mL in der Verumgruppe ($n=13$, $p=0,02$) bzw. $1327,84 \pm 1129,70$ pg/mL MMP-13 in der Kontrollgruppe ($n=14$, $p=0,001$) erzielt werden.

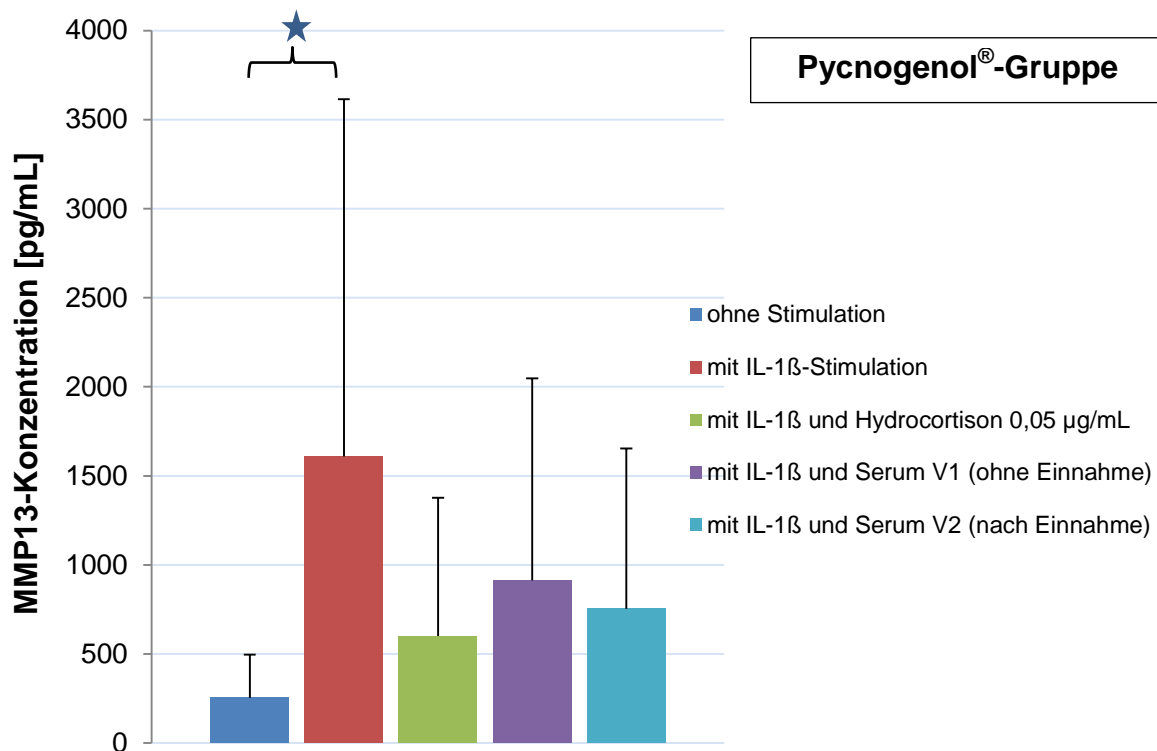


Abbildung 46: MMP-13-Konzentrationen in [pg/mL] in den diversen Ansätzen der *ex-vivo*-Versuche mit Serum der Verumpatienten normiert auf 100000 Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte der verschiedenen Ansätze (n= 3 je Proband je Ansatz) mit Standardabweichungen. Blau zeigt die Basissekretion von MMP-13 (n=12), rot die MMP-13-Konzentration nach reiner IL-1 β -Stimulation (n= 13), grün die Sekretion von MMP-13 nach Zugabe von Hydrocortison zum IL-1 β -Stimulus (n= 10), violett die MMP-13-Konzentration im Ansatz nach Vorinkubation mit Serum von V1 (n= 14) und der türkisfarbene Balken zeigt die MMP-13-Sekretion im Ansatz nach Vorinkubation mit Serum von V2 (n= 14). * entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen (p< 0,05)

Im Gegensatz zu den Versuchen zu MMP-3 konnte die Positivkontrolle Hydrocortison hier eine Senkung der MMP-13-Konzentration, im Vergleich zum Ansatz mit reiner IL-1 β -Stimulation, auf $564,31 \pm 777,23$ pg/mL in der Verumgruppe (n= 10, p= 0,09) und signifikant auf $309,16 \pm 302,14$ pg/mL MMP-13 in der Kontrollgruppe (n= 11, p= 0,007) bewirken.

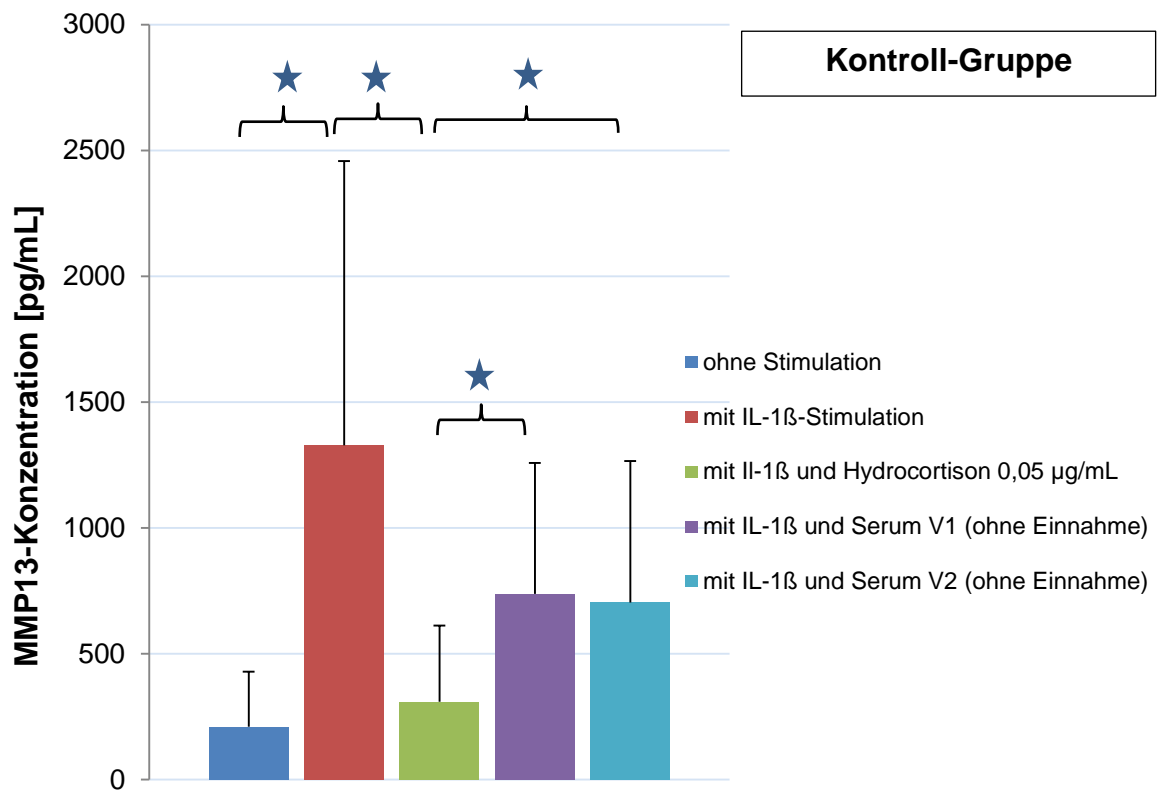


Abbildung 47: Resultate zur MMP13-Sekretion in [pg/mL] in den verschiedenen Ansätzen der *ex-vivo*-Versuche mit Serum der Kontrollpatienten normiert auf 100000 Zellen. Die Balken symbolisieren die Mittelwerte mit Standardabweichung der einzelnen Ansätze (n= 3 pro Ansatz für jeden Patienten). Blau: ohne Entzündungsstimulus (n= 14); rot: mit reiner IL-1 β -Stimulation (n= 14); grün: IL-1 β -Stimulation und Hydrocortison (n= 10); violett: IL-1 β und Serum V1 (n= 15); türkis: IL-1 β und Serum V2 (n= 15). * entspricht einem signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen ($p < 0,05$)

Im Rahmen der Untersuchung der Pycnogenol[®]-Patienten zeigte sich eine Abnahme der MMP-13-Konzentration von $912,45 \pm 1134,20$ pg/mL in den Ansätzen mit Serum von Visite 1 auf $753,76 \pm 899,13$ pg/mL in den Ansätzen mit Serum von Visite 2, nach Einnahme des standardisierten Kiefernextraktes (je n= 14) (Abbildung 46). Dieser Unterschied war statistisch nicht signifikant ($p = 0,69$). Im Vergleich zur reinen Stimulierung mit dem Interleukin zeigte sich in beiden Ansätzen mit Serum im Mittel ein Rückgang der MMP-13-Sekretion, jedoch waren diese Unterschiede nicht signifikant ($p = 0,19$ für V1 bzw. $p = 0,10$ für V2). Die Versuche mit den Seren der Kontrollpatienten zeigten deutlich geringere Unterschiede zwischen den Ansätzen mit Serum von V1 mit $737,21 \pm 520,34$ pg/mL und denen mit Serum von V2 mit $702,87 \pm 563,15$ pg/mL

MMP-13 (je n= 15) (Abbildung 47). Auch hier zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Serumgruppen ($p= 0,86$) und die MMP-13-Expression war in den Ansätzen mit Serum geringer als bei den Ansätzen mit reinem Entzündungsstimulus analog den Untersuchungen mit den Seren der Verumpatienten, wenn auch nicht signifikant geringer ($p= 0,08$ für V1 bzw. $p= 0,07$ für V2).

1.6.3 Diskussion der *ex-vivo*-Versuche mit Serum

In allen Ansätzen wurde zur Ermittlung der *ex-vivo*-Effekte eine ausreichende Zelldichte von mehr als 100000 Zellen/cm² eingehalten [283]. Damit war die für ein Überleben in Zellkultur notwendige autokrine Stimulation der primären Chondrozyten gewährleistet. Hauptverantwortlich für diese gegenseitige Beeinflussung der Zellen scheinen die Wachstumsfaktoren IGF-1 und -2 zu sein [284], wobei der genaue Mechanismus von deren Effekt jedoch noch unklar ist.

Das Versuchsprinzip konnte in allen vier Gruppen umgesetzt werden. Es wurden, mit Hilfe des Entzündungsstimulus, jeweils signifikante Steigerungen der MMP-3- sowie der MMP-13-Ausschüttung, im Vergleich zur Basissekretion, erzielt. Damit bestätigten wir die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, die *in-vitro* ebenso eine Expressionssteigerung dieser beiden MMPs nach IL-1 β -Stimulation beobachteten [204, 237, 285]. Wie bereits durch Aida et al. beschrieben, reichte auch in unseren Experimenten eine Stimulation über 24 h aus, um die MMP-13-Sekretion signifikant im Vergleich zur Kontrolle zu steigern [105]. Eine längere Inkubation hätte laut Autoren vermutlich gar negative Einflüsse auf das Induktionspotential der MMP-Synthese gehabt. Die Verwendung von Hydrocortisonacetat als Positivkontrolle für die Inhibition der MMP-Freisetzung funktionierte dagegen nur beim Zielmolekül MMP-13. Hier war in beiden Gruppen eine deutliche Senkung der MMP-13-Freisetzung, im Vergleich zur reinen Stimulation mit IL-1 β , erkennbar. Diese war zwar nur in den Versuchen mit Serum der Verumgruppe signifikant, das lag aber mit großer Wahrscheinlichkeit nur an den hohen interindividuellen Unterschieden und den daraus resultierenden hohen Standardabweichungen in den Versuchen mit den Kontrollseren. Bei der Untersuchung der MMP-3-Konzentrationen wurde hingegen kein Unterschied zwischen reiner Stimulation mit

IL-1 β und der Positivkontrolle HCA offenbar. Der positive antikatabole Effekt von Hydrocortisonacetat im Knorpel scheint sich also auf die wichtigere Protease zu beschränken. Die Verwendung von Serum im Ansatz resultierte in beiden Gruppen in einer signifikant höheren MMP-3-Ausschüttung in die Zellkulturüberstände der Primärzellen als die reine Stimulation mit IL-1 β . Dies kann damit begründet werden, dass im Serum möglicherweise weitere proinflammatorische Mediatoren vorhanden waren, die die Ausschüttung von MMP-3 synergistisch begünstigten. Weiteres IL-1 β , oder auch gelöst vorliegender TNF- α , sind mögliche Stimulatoren. Dieser Sachverhalt hat eine praktische Bedeutung bei OA. Zwar ist der Knorpel im Normalzustand nicht vaskulär versorgt, jedoch bildet sich ein vaskuläres Versorgungsnetzwerk im Erkrankungsverlauf bis hin zur Gelenkoberfläche, auch Eburnisation genannt, welches dann, durch Transport von Entzündungsmediatoren an den Ort des Geschehens, die Entzündung weiter unterhält (Einleitung A, Kap. 2.1 und [28]). Unsere Ergebnisse untermauern diese These zumindest für den Faktor MMP-3. In unseren Versuchen wurde nur die Konzentration an totalem MMP-3 bestimmt, also die Kombination aus aktivem Enzym und der Pro-Form. Die Bestimmung der aktiven Form alleine hätte vermutlich ein anderes Bild ergeben, jedoch war dies nicht ohne weiteres durchführbar, da ein industriell gefertigtes Kit nicht zur Verfügung stand. Sun et al. hatten zuvor eine bessere Korrelation der Konzentration der aktiven Form zu Entzündungsmarkern gezeigt, als das bei der totalen Konzentration des Enzyms der Fall gewesen wäre [286]. Die Forschergruppe hatte dabei einen eigens konstruierten ELISA verwendet.

Für die Collagenase-3 (MMP-13) zeigte sich jedoch ein komplett anderes Bild als für MMP-3. Durch Zugabe der Serumproben beider Probennahmezeitpunkte resultierte eine tendenzielle Senkung der MMP-13-Ausschüttung in den Zellkulturüberstand. Zusätzlich zeigte sich, im Vergleich zur internen Kontrolle (V1), eine stärkere Senkung der MMP-13-Konzentration in den Ansätzen mit Serum nach Einnahme von Pycnogenol[®]. Dies ist ein Hinweis auf die bereits postulierten antiinflammatorischen Effekte in der Literatur (Einleitung, Kap. 1.5 und Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.6). Im Serum vorhandene Mediatoren, z.B. Wachstumsfaktoren wie IGF-1 oder TGF- β , schienen hier hemmend auf die MMP-

13-Ausschüttung gewirkt zu haben [28]. Über den genauen Einflussfaktor kann nur spekuliert werden.

Ein Grund für die fehlende „Wirksamkeit“ des Serums nach Einnahme von Pycnogenol® könnte eine Instabilität der wirksamen Bestandteile im Serum nach Entnahme gewesen sein. Während der kurzfristigen Lagerung im Kühlschrank und des Transports auf Eis könnte ein Abbau stattgefunden haben. Weitere mögliche Ursachen für Substanzverluste waren der Einfrier- und Auftauprozess, sowie der sich anschließende Zellkulturversuch über mehr als 24 h bei 37 °C und 5 % CO₂. Letzterer dürfte den größten Einfluss auf die Stabilität der wirksamen Stoffe gehabt haben, da viele Polyphenole bekanntermaßen unter Zellkulturbedingungen zur Instabilität neigen, im Plasma durch Polyphenol-Protein-Wechselwirkungen dagegen stabiler zu sein scheinen [287]. Insgesamt betrachtet kann also nicht sicher davon ausgegangen werden, dass alle im Plasma gelösten Substanzen, inklusive im Körper gebildeter Metabolite, während der Versuchsdurchführung stabil waren. Hinzu kommt, dass die Halbwertszeit der Pycnogenol®-Inhaltsstoffe z.T. sehr gering sein kann, für (+)-Catechin z.B. sind Werte von 2-3 h beschrieben [288]. Da der Probenahmezeitpunkt in unserer Studie bei V2 auf Grund unterschiedlicher Aufnahmezeiten ins Krankenhaus stark variiert hat, ist durchaus möglich, dass zu diesem Moment nur noch wenig Substanz im Plasma vorhanden war (vgl. Daten in [62]). Mitarbeiter unserer Arbeitsgruppe konnten bereits, wie zuvor beschrieben, die Bioverfügbarkeit zahlreicher Stoffe des standardisierten Kiefernextraktes zeigen (Einleitung A, Kap. 1.4 und [58]). Hierbei zeigten sich auch kontinuierlich hohe Spiegel von (+)-Catechin, was damit zusammenhängt, dass dieses sukzessive aus oligomeren Polyphenolen freigesetzt wird, wodurch die zuvor erwähnte kurze Halbwertszeit an Bedeutung verliert. Zusätzlich offenbarte sich noch ein Effekt des Plasmas, nach 5-tägiger Einnahme von 200 mg des Extraktes, *ex-vivo*, analog dem Vorgehen in der aktuellen Studie, auf die Ausschüttung von MMP9 aus Monozyten [228]. Ebenso wurde hierbei eine Hemmung des Transkriptionsfaktors NF-κB offenbar. Unterschiedliche Probenahmezeitpunkte und Verstöße gegen die Ernährungsvorschriften durch die Kontrollgruppe könnten Gründe für den Unterschied der aktuellen zu den vorangegangenen Ergebnissen sein. Über das

Blut vermittelte positive Effekte von Pycnogenol® können folglich, trotz fehlender Wirkung in unseren *ex-vivo*-Versuchen, nicht abschließend ausgeschlossen werden. Denkbar wären hier z.B. matrixstabilisierende Effekte durch Polyphenol-Collagen-Interaktionen. In Form von Wasserstoffbrücken, über die zahlreichen Hydroxygruppen der Polyphenole vermittelt, gebunden bzw. durch hydrophobe Wechselwirkungen an das Collagen-Netzwerk adsorbiert, wird ein Schutz des Netzwerks vor enzymatischem Abbau durch MMPs durch höhermolekulare Polyphenole propagiert [289]. Was bei der Autorengruppe anhand von intra-artikulären Injektionen direkt im betroffenen Gelenk erfolgreich versucht wurde, ist auf Grund der bewiesenen Bioverfügbarkeit zwar durchaus auch für den Menschen *in-vivo* nach oraler Gabe plausibel [58, 290], jedoch ist die matrixstabilisierende Wirkung hauptsächlich durch das Vorhandensein hochmolekularer Polyphenole begründbar, die so in den Körper nicht aufgenommen werden können.

Im Allgemeinen reichen *ex-vivo*-Versuche näher an die Situation *in-vivo* heran als *in-vitro*-Versuche. Neben isolierten Chondrozyten werden auch immer häufiger für diese Art Versuche ganze Knorpelstücke kultiviert, um das physiologische Geschehen besser nachvollziehen zu können [127, 291, 292]. Durch Verwendung von Serum als wirksames Agens werden pharmakokinetische Eigenschaften des untersuchten Extraktes mit berücksichtigt. Einerseits können damit Effekte von *in-vivo* gebildeten Metaboliten mit einfließen. Die verschiedenen Stoffwechselprodukte eines Extraktes sind meist nicht vollständig bekannt, deren Identifizierung ist schwierig [293]. Durch direkte Verwendung der Körperflüssigkeit werden alle gebildeten Metabolite in die Untersuchungen mit eingeschlossen. Andererseits werden auch nur so hohe Konzentrationen der Bestandteile eingesetzt, wie im Körper überhaupt aufgenommen und verteilt werden, sprich bioverfügbar sind. Plasmaspiegel von Flavonoiden sind z.B. gewöhnlich < 10 µM und im Fließgleichgewicht meist < 1 µM [294]. Bei *in-vitro*-Versuchen werden dahingegen meist viel zu hohe Konzentrationen an Stoffen verwendet, die so im Körper nicht anfluten, und Absorptions- bzw. Metabolisierungs-Schritte, wie z.B. durch die bakterielle Darmflora, werden ebenso wenig berücksichtigt [288, 295]. Daher sind einige positive Effekte aus dieser Art von Experimenten meist *in-vivo*

nicht zu bestätigen. Hinzu kommt, dass oft nicht alle aktiven Komponenten eines komplexen Stoffgemisches bekannt sind. Durch den direkten Einsatz der verschiedenen Spezimen können alle Stoffe untersucht werden, die im Körper nach Einnahme der Stoffgemische vorhanden sind, auch wenn deren Identität nicht geklärt ist. Nicht zu vernachlässigen ist auch die Tatsache, dass die Zellen in ihrer „natürlichen“ Umgebung kultiviert werden [95]. Ein weiterer Vorteil unserer Versuchsdurchführung war die Verwendung der Chondrozyten aus dem Knorpel des jeweiligen Patienten. Dies hat die Situation *in-vivo* nochmals besser nachstellen können, als eine ersatzweise Verwendung einer immortalisierten Zelllinie. Ein Problem beider Versuchsarten, also *in-vitro* und *ex-vivo*, ist, dass der hypoxische Zustand des natürlichen Umgebungsmilieus der Zellen mit durchschnittlich 8 % Sauerstoffsättigung nur schwer nachzustellen ist [91]. Ein zu den vorliegenden Versuchen abweichendes Verhalten der Zellen in Hinblick auf die MMP-Synthese wäre *in-vivo* also durchaus denkbar. Ideale Modellsysteme, die diesen Sachverhalt berücksichtigen, gibt es zurzeit nicht.

Die Messung weiterer Marker im Zellkulturüberstand der *ex-vivo*-Versuche war im Studienprotokoll nicht vorgesehen und hätte vermutlich auch wenig neue Erkenntnisse gebracht. Die Untersuchung des Collagen-Abbauprodukts CTX-II z.B., neben den Konzentrationen der Enzyme, war nicht sinnvoll, da eine Freisetzung in den Zellkulturüberstand laut Olsen et al. erst nach ca. 14 Tagen stattfindet [119]. Eine solch lange Kultivierung war, auf Grund der Verwendung von Primärzellen, nicht möglich. Eine dafür notwendige Passagierung hätte, wie bereits beschrieben, starke Auswirkungen auf den Phänotyp der Chondrozyten gehabt (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.6). Die beiden Aggrecanasen, ADAMTS-4 und -5, wurden probenhalber in mehreren Versuchen bestimmt, zeigten jedoch nur in Ansätzen mit Körperflüssigkeiten messbare Konzentrationen (Daten nicht aufgeführt). Die primären Zellen haben also nicht auf den Entzündungsreiz durch IL-1 β mit einer vermehrten ADAMTS-Expression reagiert. Ein vom natürlichen abweichendes Umgebungsmilieu könnte, wie bereits beschrieben, dafür verantwortlich gewesen sein.

Ergänzend zu den Versuchen mit Serum als wirksames Agens sollten *ex-vivo*-Versuche mit der Synovialflüssigkeit der Studienteilnehmer durchgeführt werden,

da diese Körperflüssigkeit dem Erkrankungsgeschehen im Gelenk am nächsten kommt.

1.7 Ex-vivo-Effekte von Synovialflüssigkeit nach Einnahme des standardisierten Kiefernrintenextraktes auf die immortalisierte Chondrozytzelllinie TC28

1.7.1 Prinzip und Aufbau des ex-vivo-Versuches

Im Rahmen der *ex-vivo*-Versuche mit Synovialflüssigkeit sollte diese Körperflüssigkeit, inklusive der darin enthaltenen Extraktbestandteile bzw. Metabolite, auf Wirksamkeit als „Verum“ überprüft werden. Somit fanden die Bioverfügbarkeit der Substanzen und der Transport derer in dieses Spezimen, ähnlich der *ex-vivo*-Versuche mit Serum, Beachtung. Diese Art Versuchsaufbau ähnelt mehr den Bedingungen *in-vivo*, als *in-vitro*-Experimente. Diese werden oft mit einzelnen Extraktbestandteilen bzw. dem Gesamtextrakt, die bzw. der so vielleicht gar nicht das Gewebe erreichen würde bzw. würden, durchgeführt. Das Prinzip entspricht in den Grundzügen dem zuvor Beschriebenen mit Serum als wirksame Komponente (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.6.1, Abbildung 43). Da jedoch, auf Grund der notwendigen Dichte der Zellen in den einzelnen Ansätzen, nach den Versuchen mit Serum nicht mehr ausreichend Primärzellen vorhanden waren, wurden diese Versuche mit Zellen der immortalisierten Zelllinie TC28 durchgeführt (Näheres zur Durchführung, Experimenteller Teil C, Kap. 1.10). Auf Grund der hohen Viskosität mancher Synovialflüssigkeitsproben wurde eine 1:4-Verdünnung in jedem Ansatz verwendet. Eine adäquate Mischbarkeit mit dem Zellkulturmedium war somit gegeben. Vereinzelte Entmischungen waren dennoch zu beobachten. Im Gegensatz zu den vorher beschriebenen Versuchen (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.6.1) konnte hier nur mit externer und nicht mit interner Kontrolle gearbeitet werden, da die Synovialflüssigkeit nur bei Visite 3 zum Zeitpunkt der Operation gewonnen werden konnte. Somit war lediglich ein Vergleich der Effekte der Synovialflüssigkeit von Patienten nach Pycnogenol®-Einnahme zu der Wirkung der Synovialflüssigkeit der Kontrollen, in Hinblick auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren durch TC28-Zellen, möglich.

1.7.2 Einfluss der Zellviabilität auf die Ergebnisse der *ex-vivo*-Versuche mit Synovialflüssigkeit

Zur Ermittlung des Anteils lebender Zellen im Ansatz, wurden in der vorliegenden Arbeit die verwendeten Zellen nach jeder Versuchsdurchführung trypsiniert und nach Trypanblaufärbung gezählt. Hierbei wurde die Anzahl lebender Zellen, die auf Grund ihrer intakten Zellmembran leuchtend weiß waren, mit der Zahl toter Zellen ins Verhältnis gesetzt, deren Innenleben blau angefärbt war, da die zerstörte Zellmembran den Farbstoff nicht mehr außerhalb der Zelle halten konnte. Lediglich Ansätze mit > 95 % überlebender Zellen wurden in die Auswertung mit einbezogen, da ein zu großes Absterben der Zellen zu einer Verfälschung der Ergebnisse geführt hätte. Da diese nämlich keine Entzündungsmediatoren mehr produzieren, hätten niedrigere Konzentrationen diverser Marker nicht zwingend eine Wirksamkeit der Medikation bedeuten müssen. Auf Grund der Tatsache, dass die Trypanblau-Methode aufwendig und mit Fehlern behaftet ist, wurde zusätzlich ein 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Test durchgeführt. Darin wurde die Zelltoxizität aller Zusätze unter *ex-vivo*-Versuchsbedingungen untersucht (Experimenteller Teil C, Kap. 1.10.4). Dies diente als zusätzliche Kontrolle, ob die gemessenen Effekte in den *ex-vivo*-Versuchen auch tatsächlich durch die Intervention ausgelöst wurden. Dieser Test wurde nur für den Versuchsansatz mit TC28-Zellen durchgeführt, da nicht ausreichend primäre Chondrozyten vorhanden waren, um neben den *ex-vivo*-Versuchen noch diese Vitalitätsprüfung anzusetzen. Auf Grund der Vergleichbarkeit der Zelltypen kann jedoch von einer Übertragbarkeit der Ergebnisse ausgegangen werden.

Das Vorgehen entsprach dem Ansatz von Mosmann et al. [296], lediglich das Lösungsmittel für das gebildete Formazan-Produkt wurde von Isopropanol/ 0,04 N HCl zu DMSO verändert [297]. Das Prinzip des Tests beruht darauf, dass nur lebende Zellen das zugesetzte MTT zum schwerlöslichen blauen Formazan-Produkt spalten können, da tote Zellen diese Fähigkeit nicht mehr besitzen [296]. Frühere Annahmen, dass die Spaltung von MTT unter Succinat-Beteiligung im Innern der Mitochondrien stattfindet, wurden bald widerlegt. Berridge und Tan fanden heraus, dass der größte MTT-Umsatz außerhalb der Mitochondrien unter

Beteiligung von Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) und Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH), jedoch nur ein kleiner Teil der Spaltung innerhalb der Mitochondrien stattfindet [298].

Um den Einfluss der eingesetzten Substanzen auf die Zellviabilität zu testen, wurden mehrere verschiedene Ansätze untersucht. Als Kontrolle diente hierbei der Ansatz mit IL-1 β in einer Konzentration von 10 ng/mL. Der Mittelwert der Absorption bei 570 nm wurde als 100 % Zellviabilitätskontrolle ($100 \pm 8,93$ %; n=3) angenommen (Abbildung 48). In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass kein Unterschied in der Viabilität zwischen den Kontrollzellen ohne Behandlung und den Zellen mit 10 ng/mL IL-1 β im Ansatz vorhanden war (Daten nicht aufgeführt).

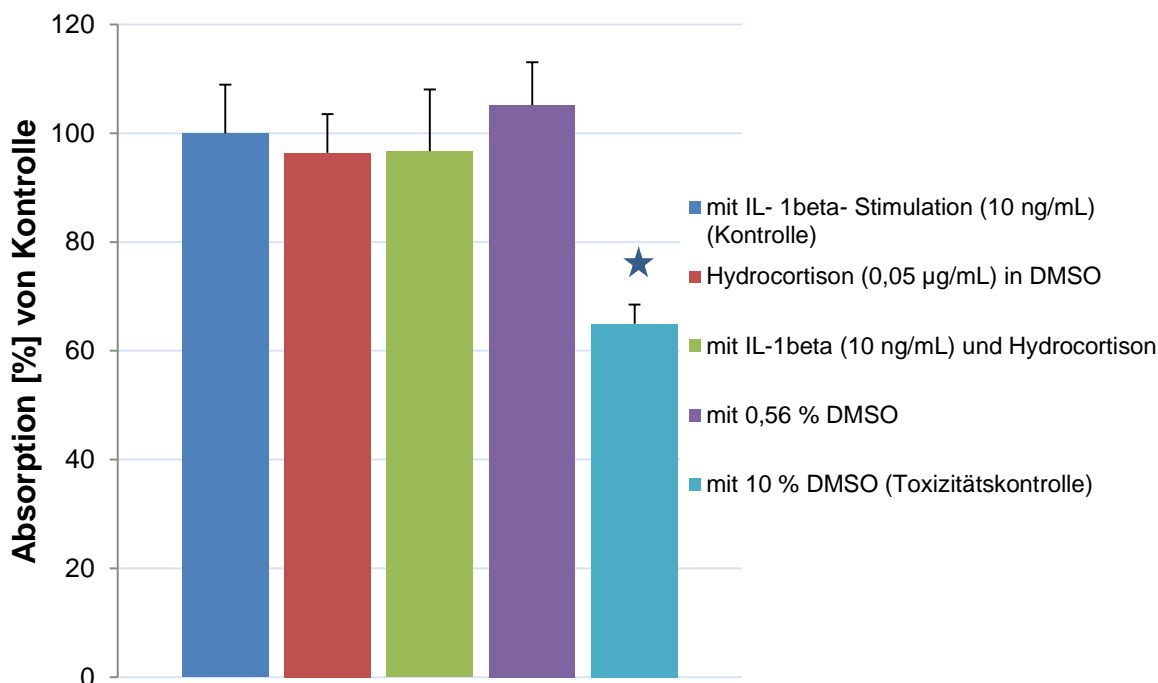


Abbildung 48: Ergebnisse des MTT-Assays zur Ermittlung der Zellviabilität der TC28-Zelllinie unter den Versuchsbedingungen der *ex-vivo*-Untersuchungen bei 37 °C und 5 % CO₂. Abgebildet sind die Absorptionen der verschiedenen Ansätze (je n= 3) in % mit Standardabweichungen im Verhältnis zur Kontrolle mit IL-1 β (10 ng/mL) (n= 3) im Ansatz. Der mit einem Stern markierten Balken zeigt einen signifikanten Unterschied zur Kontrolle mit reiner Stimulation (dunkelblau).

Der 2. Ansatz enthielt 0,05 μ g/mL Hydrocortisonacetat gelöst in DMSO. Hierbei ergab sich eine Zellviabilität von $96,42 \pm 7,09$ % (n= 3), der Unterschied zur Kontrolle war im Student's t-Test nicht signifikant ($p > 0,05$). Ebenso wenig

signifikant war der Unterschied zwischen der Zellviabilität von $96,67 \pm 11,37$ % im Versuch mit IL-1 β (10 ng/mL) und Hydrocortisonacetat (0,05 μ g/mL gelöst in DMSO) im Vergleich zur Kontrolle. Um den Effekt des Lösungsmittels DMSO im Ansatz mit Hydrocortison auf die Zellviabilität zu testen, wurde eine Menge von 0,56 % DMSO analog zur *ex-vivo*-Versuchsdurchführung eingesetzt (Experimenteller Teil C, Kap. 1.9). Es zeigte sich mit einer Zellviabilität von $105,15 \pm 7,89$ % im Vergleich zur Kontrolle keine signifikante Veränderung, so dass ein zelltoxischer Effekt von DMSO in dieser Konzentration als unwahrscheinlich angenommen werden konnte. Positive Effekte von Hydrocortison auf die Freisetzung von Entzündungsmediatoren waren somit lediglich auf das Arzneimittel zurückzuführen und nicht auf eine Apoptose der Zellen auf Grund des DMSO-Einflusses. Dass dieses Lösungsmittel in höheren Konzentrationen zelltoxisch ist, zeigte sich im vorliegenden Versuch anhand der Kontrolle mit 10 % DMSO im Ansatz. Hier wurde die Zellviabilität signifikant auf $64,95 \pm 3,57$ % der Kontrolle reduziert ($p = 0,03$).

Die ausgewählten Versuchsbedingungen für die *ex-vivo*-Untersuchungen waren somit nicht schädigend für die verwendeten Zellen. Da die TC28-Zelllinie von humanen primären Chondrozyten abgeleitet wurde, kann davon ausgegangen werden, dass die Versuchsbedingungen auch für die Primärzellen nicht toxisch waren (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.6). Zusätzlich war aus der Literatur bekannt, dass IL-1 β zwar einen Einfluss auf die EZM-Homöostase, aber keinen negativen Einfluss auf die Viabilität der Chondrozyten, sowie keinen Effekt auf ihre Proliferierung hat [105, 299].

1.7.3 Ergebnisse der *ex-vivo*-Versuche mit Synovialflüssigkeit

Die Ergebnisse wurden statistisch mit Hilfe des Student's t-Test für parametrische Daten bewertet. Das Prinzip des Versuches (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.7.1) konnte auch hier umgesetzt werden. Dies erkennt man an der erfolgreichen, statistisch signifikanten Stimulation der Basalsekretion ($p = 0,001$) von $40,75 \pm 34,04$ pg/mL MMP-13 ($n = 8$) auf $154,57 \pm 75,47$ pg/mL MMP-13 ($n = 9$) in der Gruppe mit reiner IL-1 β -Stimulation (10 ng/mL) ohne weitere Zusätze (Abbildung 49). TC28-Zellen waren somit mit IL-1 β stimulierbar und folglich ein

geeignetes Modell zur Simulation der Entzündungsreize im betroffenen Gelenk im Rahmen der Erkrankung Osteoarthritis.

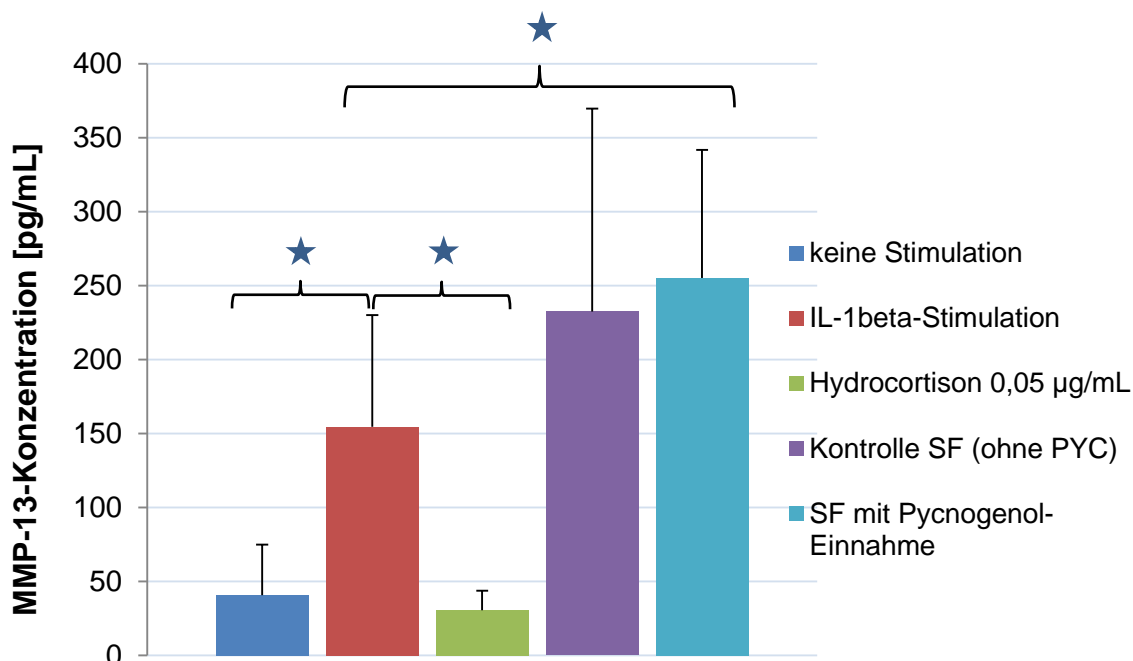


Abbildung 49: Ergebnisse der ex-vivo-Versuche mit Synovialflüssigkeit ohne Abzug der absoluten Konzentrationen an MMP-13 in der jeweiligen Synovialflüssigkeitsprobe von den gemessenen MMP-13-Konzentrationen im Zellkulturüberstand. Der rote Balken (n= 9) zeigt, dass die Stimulation der MMP-13-Sekretion mit IL-1 β erfolgreich war im Vergleich zur Basissekretion (dunkelblau, n= 8). Die Positivkontrolle der Hemmung der MMP-13-Freisetzung (grün, n= 8) war ebenso erfolgreich. Die Konzentrationen an MMP-13 in den Zellkulturüberständen mit Synovialflüssigkeit der Kontrollpatienten (lila, n= 14) und der Pycnogenol[®]-Patienten (türkis, n= 12) sind nochmals höher als die der reinen Stimulation. Alle Konzentrationen wurden auf $1 \cdot 10^5$ Zellen normiert. Die mit Stern markierten Balken sind signifikant verschieden zur Kontrolle mit reiner Stimulation (roter Balken) ($p < 0,05$).

Das als Positivkontrolle der Hemmwirkung auf die MMP-13-Freisetzung verwendete Hydrocortisonacetat, in einer Konzentration von 0,05 $\mu\text{g/mL}$, zeigte eine hochsignifikante Senkung der Ausschüttung auf $30,44 \pm 13,30 \text{ pg/mL}$ (n= 8; $p < 0,001$), welche mit der Basalsekretion vergleichbar war ($p = 0,22$). Daran erkennt man, dass eine Senkung der Expression durch das Verum möglich gewesen wäre. In den Versuchen mit Synovialflüssigkeiten der Kontrollgruppe zeigte sich eine Zunahme der Sekretion, im Vergleich zur reinen Stimulation, auf $232,44 \pm 137,23 \text{ pg/mL}$ (n= 14). Dieser Unterschied war jedoch nicht statistisch

signifikant ($p= 0,14$). Eine weitere Sekretionssteigerung fand in den Proben der Pycnogenol[®]-Gruppe auf $255,23 \pm 86,61$ pg/mL ($n= 12$) statt, welche auch signifikant war ($p= 0,01$). Der Unterschied zwischen den beiden Gruppen wies aber keine Signifikanz auf ($p= 0,31$). Alle Ergebnisse wurden auf $1 \cdot 10^5$ Zellen normiert. Um eine verlässlichere Aussage über die *ex-vivo*-Versuche an sich treffen zu können, mussten bei den Konzentrationen von MMP-13 in den Zellkulturüberständen der Versuche mit Synovialflüssigkeit noch, unter Berücksichtigung der Verdünnung, die zuvor bestimmte absolute Konzentration an MMP-13 in der Synovialflüssigkeit abgezogen werden. Dabei ergaben sich Werte von $164,10 \pm 145,73$ pg/mL ($n= 14$) in der Kontroll- und von $195,17 \pm 94,17$ pg/mL ($n= 12$) in der Verumgruppe, normiert auf 100000 Zellen (Abbildung 50). Beide Gruppen zeigten keinen signifikanten Unterschied zur reinen Stimulation mit IL-1 β ($p= 0,86$ für die Kontrollgruppe bzw. $p= 0,30$ beim Vergleich zwischen Verumgruppe und reiner Stimulation). Der Vergleich beider Behandlungsgruppen untereinander blieb statistisch nicht signifikant ($p= 0,53$).

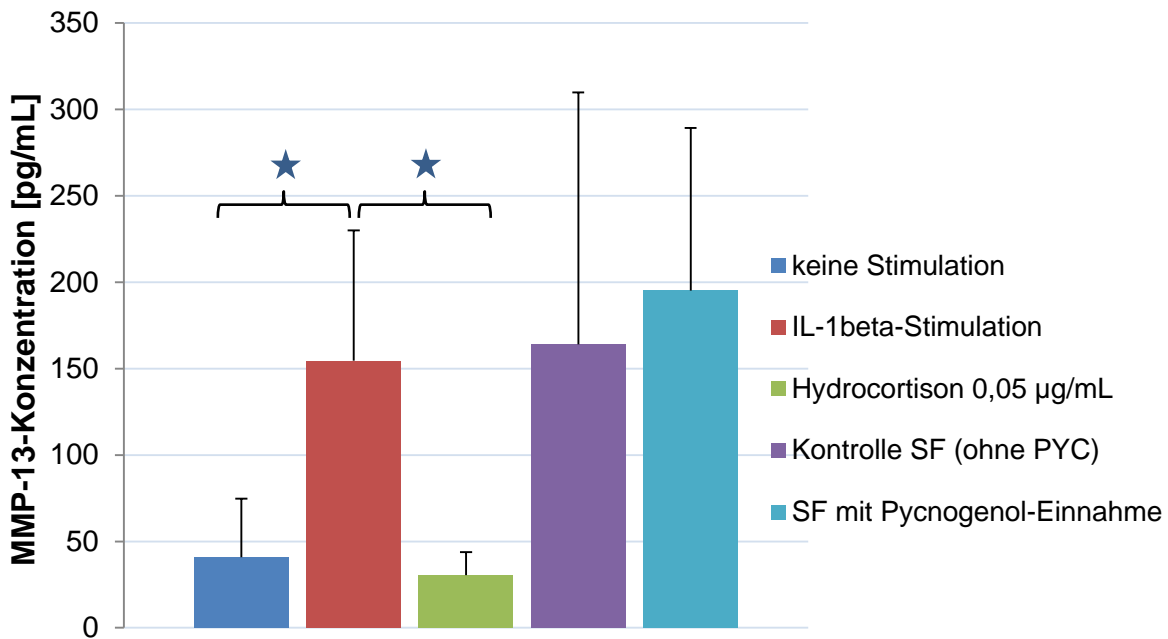


Abbildung 50: Ergebnisse der *ex-vivo*-Versuche mit Synovialflüssigkeit analog zu Abbildung 49. Bei den Ergebnissen der Überstände mit Synovialflüssigkeit wurden jeweils die dazu gehörigen absoluten Konzentrationen der Synovialflüssigkeit von den gemessenen Konzentrationen im Zellkulturüberstand abgezogen. Alle Konzentrationen sind auf $1 \cdot 10^5$ Zellen normiert. Die mit Stern markierten Balken sind signifikant verschieden von der Kontrolle mit reiner IL-1 β -Stimulation.

1.7.4 Diskussion

Für die Durchführung der *ex-vivo*-Versuche mit Synovialflüssigkeit wurden je Proband mindestens 0,75 mL der Gelenkflüssigkeit benötigt. Da die Menge an diesem Spezimen jedoch von Patient zu Patient sehr unterschiedlich war, konnte nicht von allen Studienteilnehmern ausreichend SF gewonnen werden, um die Versuche durchführen zu können. Dies erklärt die fehlenden Probenkonzentrationen in der Kontroll- bzw. in der Pycnogenol[®]-Gruppe.

Auch für diese *ex-vivo*-Versuche lässt sich als Vorteil festhalten, dass wir unter Verwendung der Synovialflüssigkeit der Probanden näher am *in-vivo*-Geschehen lagen als das *in-vitro*-Versuche mit Reinsubstanzen bzw. mit dem Gesamtextrakt gewesen wären. Im Gegensatz zum Serum, welches nur im fortgeschrittenen Erkrankungsstadium das natürliche Milieu der Zellen darstellt, sind die

Chondrozyten mit der Synovialflüssigkeit dauerhaft in Kontakt, da sie über diese Körperflüssigkeit mit Nährstoffen versorgt werden (Einleitung A, Kap. 2.1) [95].

Es zeigte sich in allen Ansätzen mit Synovialflüssigkeit der Probanden eine Tendenz zur Sekretionssteigerung von MMP-13 im Vergleich zur reinen Stimulation mit IL-1 β . Zwar waren diese Unterschiede, in der Pycnogenol[®]-Gruppe nach Abzug der absoluten MMP-13-Konzentration in der SF, nicht signifikant, aber der Trend war deutlich erkennbar. In den *ex-vivo*-Versuchen mit Serum als „Verum“ war ein komplett gegensätzlicher Effekt sichtbar (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.6.2). Hier zeigte sich im Mittel durch das Serum der Kontrollen sowie der Pycnogenol[®]-Patienten zu beiden Probenahmezeitpunkten eine Herunterregulierung der MMP-13-Expression im Vergleich zur reinen Stimulation mit IL-1 β . Für diese Unterschiede könnte das lokale Entzündungsgeschehen im Gelenk verantwortlich sein, das bei den vorliegenden Patienten, auf Grund des Schweregrades der Erkrankung, besonders ausgeprägt war. Dadurch konnten in der Synovialflüssigkeit vermehrt Zytokine, MMPs und andere Chemokine vorhanden gewesen sein, die die Entzündungen unterhalten und somit zu einer verstärkten Freisetzung von MMP-13 aus den Zellen geführt haben können. Eine Hauptrolle wird hierbei z.B. IL-1 β und TNF- α zugeordnet, da diese durch aktivierte Synoviozyten und Chondrozyten gebildet und in die Synovialflüssigkeit ausgeschüttet werden [130]. Indizien hierfür sind deren erhöhte Konzentration in der Gelenkflüssigkeit von OA-Patienten und die chondroprotektiven Effekte von IL-1 β - bzw. TNF- α -Antikörpern in manchen Individuen [106, 107]. Hinzu kommt die beobachtete verstärkte Bindung der beiden Zytokine an Chondrozyten bei OA und eine verstärkte MMP-13-Synthese in der Folge [97]. Aber auch IL-6 und IL-8 können synergistisch zu den Vorangenannten wirken. Über die Synovialflüssigkeit werden die Mediatoren zum Knorpel transportiert, wo sie direkten Einfluss auf die Chondrozyten ausüben. Der Hauptteil der Zytokine, der in der Synovialflüssigkeit vorliegt, wird jedoch in den Chondrozyten selbst produziert. Diese Mediatoren wirken dann autokrin bzw. parakrin auf das Knorpelgewebe direkt ein, ohne die klassischen klinischen Symptome einer Entzündung hervorzurufen [106, 300]. Neben den zuvor genannten Zytokinen werden ebenso Prostaglandine und NO als proinflammatorische Mediatoren in den Chondrozyten synthetisiert. Die NO-

Produktion ist in OA-Chondrozyten durch eine Induktion der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) erhöht, was die katabolen Vorgänge fördert. Zusätzlich gilt NO als Auslöser einer Chondrozyten-Apoptose [300].

Im Serum hingegen scheinen antientzündliche bzw. hemmende Faktoren enthalten zu sein, die der Entzündung entgegenwirken und somit die MMP-13-Ausschüttung aus den primären Chondrozyten senken, z.B. IGF-1, IL-4, IL-10, IL-13 oder TGF- β_1 [130, 300, 301]. Diese hemmen bekanntermaßen die TNF- α -induzierte MMP-Synthese bzw. auch die IL-1 β - und TNF α -Synthese an sich. Eine ähnliche Hemmung wäre für die IL-1 β -Induktion der Chondrozyten denkbar. Zusätzlich regen die Wachstumsfaktoren TGF β und IGF-1 den Reparaturmechanismus an, der im OA-Zustand zwar gesteigert ist, jedoch die Imbalance aus Auf- und Abbau des Knorpels nicht ausgleichen kann [301]. Ein weiterer Grund könnte auch die Verwendung verschiedener Zelltypen sein. In den Versuchen mit Serum fanden Primärzellen der Patienten Anwendung, die frisch isoliert wurden. Bei den Experimenten mit SF wurden stattdessen TC28-Zellen eingesetzt, da nicht ausreichend viele Chondrozyten für beide Versuche gewonnen werden konnten. Diese beiden Zelltypen reagieren vermutlich unterschiedlich auf einen Entzündungsstimulus und zeigen andere Freisetzungsmuster an Zytokinen. Dies dürfte nicht zuletzt daran liegen, dass die TC28-Zellen immortalisiert vorlagen und die Primärzellen eben nicht immortalisiert wurden und von Patienten mit OA stammten.

Ein weiterer Grund für die fehlende „Wirksamkeit“ der Synovialflüssigkeit, nach Einnahme des Rindenextraktes, könnte ein Verlust der darin gelösten Substanzen und Metabolite während des Transports, des Einfrier- und Auftauvorganges und der Versuchsdurchführung unter Zellkulturbedingungen, analog den Versuchen mit Serum, gewesen sein. Zusätzlich wäre eine Komplexierung der wirksamen Stoffe durch natürliche Inhaltsstoffe der viskosen Gelenkflüssigkeit denkbar. Eine niedrigere Verfügbarkeit an wirksamen Bestandteilen in diesem Spezimen, im Vergleich zum Serum, wäre eine weitere Erklärung [62].

Die Untersuchungen der MMP-3-Konzentration zeigten jeweils nur in den Ansätzen mit SF geringe Konzentrationen an MMP-3, die jedoch auf die absolute Konzentration in der Synovialflüssigkeit selbst zurückzuführen waren (Daten nicht

aufgeführt). Die TC28-Zellen in unseren Ansätzen produzierten folglich, wenn überhaupt, nur geringe, nicht nachweisbare Mengen an MMP-3. Darin lag ein Unterschied zu den verwendeten Primärzellen, da diese in sehr großer Menge MMP-3 ausschütteten (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.6.2). Finger et al. zeigten diesen Sachverhalt bereits beim Vergleich von Primärzellen mit drei gängigen immortalisierten Chondrozytenzelllinien, u.a. der bei uns verwendeten TC28-Zelllinie [302]. Es wurden deutliche Unterschiede im Genexpressionsmuster offenbar, am stärksten bei MMP-3, das nur noch zu einem geringen Bruchteil nach Immortalisierung exprimiert wurde. Hinzu kommt, dass die immortalisierten Zellen auf Grund des Ausschaltens von Zell-Zyklus-Regulierungen sich viel stärker teilen als primäre Chondrozyten. Die Autoren sehen deshalb keine der untersuchten Zelllinien als adäquaten Ersatz für primäre Chondrozyten. Im Gegensatz zu den Beschreibungen von Finger et al. konnten wir in unseren Experimenten einen Effekt von IL-1 β auf die MMP-13-Ausschüttung der Zellen sehen. Damit bestätigten wir die Ergebnisse von Goldring et al., die ebenso eine Induktion der Collagenase-Expression durch IL-1 β feststellten [303].

Zusammenfassend konnten wir keinen Effekt der Synovialflüssigkeit *ex-vivo* nach Einnahme von Pycnogenol[®] auf die Sekretion von MMP-13 aus TC28-Zellen sehen. Der beobachtete hemmende Effekt von Pycnogenol[®] auf die Genexpression diverser Knorpelabbaumarker scheint nicht über dieses Spezimen vermittelt zu werden.

2 Simulierung des Verhaltens ausgewählter Bestandteile von Pycnogenol® und eines Metaboliten an der Blut-Hirn-Schranke mit Hilfe eines *in-vitro*-Modells

2.1 Effekte von Polyphenolen auf das Gehirn

Seit Jahrzehnten werden Polyphenole, auf Grund ihrer antioxidativen Eigenschaften, protektive Effekte auf neurologische Erkrankungen nachgesagt. Besonders stark soll diese Wirkung im asiatischen Raum sichtbar sein, da dort die Einnahme dieser Stoffe durch die Lebensweise, im Vergleich zu Europa und Nordamerika, verhältnismäßig hoch ist.

Morbus Alzheimer und Morbus Parkinson gehören zu den am häufigsten vorkommenden neurologischen Störungen in der westlichen Welt und belasten die nationalen Gesundheitssysteme in hohem Maße. Die Pathogenese beider Erkrankungen ist multifaktoriell, bestehend aus genetischen und nicht genetischen Ursachen [304]. Dabei wird ein Zusammenwirken von radikalen Sauerstoffspezies (ROS) und β -Amyloid-Plaques bzw. τ -Proteinen diskutiert. Antioxidativ wirksame Polyphenole könnten sinnvolle Optionen zum Abfangen der Radikale sein.

Epidemiologische Studien zum Risiko, an Morbus Alzheimer zu erkranken, in Bezug auf die Polyphenol-Zufuhr, lieferten widersprüchliche Ergebnisse. Die Honolulu-Asia Aging-Studie zeigte keinen signifikanten Einfluss von Antioxidantien auf die Inzidenz von Alzheimer [305]. Gegenstand der Untersuchungen waren der Pflanzeninhaltsstoff β -Carotin, Flavonoide und die Vitamine C und E. Dagegen konnten große Mengen Vitamin C und E in der Rotterdam-Studie die Alzheimer-Inzidenz senken [306]. Die PAQUID-Studie zeigte speziell eine Verlangsamung der Abnahme der kognitiven Leistungen unter Flavonoid-Einnahme bei über 65-Jährigen [307]. Ebenso konnte eine mediterrane Diät, die in der Regel durch Bestandteile wie Olivenöl und Rotwein polyphenolreich ist, das Alzheimer-Risiko senken [308]. Dabei war die Inzidenz in der Gruppe mit der höchsten Compliance am geringsten. Der Einsatz von Polyphenolen, zur Senkung des Risikos der

Alzheimer-Demenz, ist sehr vielversprechend und lohnenswert, da diese Stoffe nebenwirkungsarm sind.

Für einzelne Polyphenole wurden bereits Effekte auf neurologische Störungen beschrieben.

Polyphenolreicher grüner Tee, mit einem hohen Anteil an Flavonoiden und dem Hauptbestandteil (-)-Epigallocatechin-3-gallat (EGCG), wird schon seit Jahrtausenden, v.a. in der asiatischen Welt, konsumiert. Früher aus traditionellen und rituellen Gründen getrunken, wurden in den letzten Jahren immer mehr potentiell gesundheitsfördernde Eigenschaften entdeckt, so dass heute die Anwendung im Rahmen der Prävention und unterstützenden Therapie von Erkrankungen immer mehr in den Fokus des Interesses rückt [309, 310]. Im Vordergrund der Wirkung standen lange Zeit ausschließlich die antioxidativen Effekte der enthaltenen Polyphenole. Beispielhaft dafür wiesen Nanjo et al. die Radikalfängereigenschaft der Inhaltsstoffe nach und zeigten, dass ca. 50 % der 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazil-Radikale abgefangen wurden [311]. Es zeigte sich, dass Flavonoide mit enthaltenem Gallussäure-Rest, wie z.B. (-)-Epicatechingallat ein erhöhtes antioxidatives Potential besitzen [312]. Dies wurde ihrem höheren Lipid-Wasser-Verteilungskoeffizienten und dem damit verbundenen verstärkten Eindringen in Plasmamembranen zugeschrieben, da sich lipophile Moleküle besser in lipophile Membranen einlagern können. Das erhöhte antioxidative Potential könnte aber auch durch die zusätzlich ins Molekül eingebrachten Hydroxygruppen bedingt sein.

Lee et al. fanden heraus, dass EGCG die LPS-induzierte Bildung von β -Amyloid-Plaques reduzieren kann und u.a. dadurch den Gedächtnisverlust vermindert [313]. Gleichzeitig hemmte das Polyphenol die Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (iNOS) und der Cyclooxygenase-2 (COX-2). Eine weitere Untersuchung zeigte den inhibitorischen Effekt des Extraktes aus grünem Tee auf die Amyloid- β -induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B [314]. Dadurch könnte ein eventuell beteiligtes entzündliches Geschehen eingedämmt werden. Rezai-Zadeh et al. fanden heraus, dass zusätzlich zur β -Amyloid-Plaque-Reduktion eine Modifizierung des τ -Profils stattfindet und die Behandlung mit EGCG kognitive Verbesserungen bei den therapierten Ratten

auslöste [315]. Ein präventiver bzw. therapeutischer Effekt auf das Krankheitsgeschehen von Morbus Alzheimer wäre deshalb denkbar.

In einer epidemiologischen Studie zeigten Checkoway et al., dass der Konsum von zwei Tassen oder mehr grünem Tee pro Tag das Parkinson-Risiko signifikant reduzierte [316]. Allerdings schlossen die Forscher das enthaltene Coffein für diesen Effekt aus, da keine Assoziation zwischen Kaffeekonsum bzw. gesamter Coffein-Aufnahme und der Inzidenz von Parkinson gefunden wurde.

Die Polyphenole aus grünem Tee reduzierten in einem Ratten-Modell die durch zerebrale Ischämie verursachte Erhöhung der Durchlässigkeit der „Tight junctions“ der Blut-Hirn-Schranke (BHS) [317]. Dabei richteten die Forscher ihren Fokus vor allem auf die Verhinderung der Senkung der Expressionslevel von Claudin-5, Occludin und Zonula occludens-1, den wichtigsten „Tight junctions“-Proteinen (Näheres Allgemeiner Teil B, Kap. 2.2). Ebenso griffen die Polyphenole in die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung mit Eisenbeteiligung ein, indem sie das redoxaktive Metall chelatierten und so unschädlich machten [310]. Das Fe^{2+} -Ion liegt im Gehirn in hoher Konzentration vor und katalysiert dort die Bildung von freien Radikalen, die als oxidative Spezies die Schädigung der Neurone bei Morbus Alzheimer begünstigen können [318]. Dieser Prozess könnte durch die Polyphenole verhindert werden.

Curcumin, der polyphenolische Hauptbestandteil des Extraktes aus dem Rhizom von *Curcuma longa*, wird dafür verantwortlich gemacht, dass es in Indien eine deutlich geringere Inzidenz von Morbus Alzheimer gibt, als in den USA [319]. Erklärt wurde dieses Phänomen durch die antioxidativen [320] und antiinflammatorischen Wirkungen [321]. Ono et al. beschrieben dessen inhibitorische Effekte auf die β -Amyloid-Plaques Bildung im Zusammenhang mit Alzheimer und die destabilisierende Wirkung auf schon vorhandene Plaques [322]. Die Bindung von redoxaktivem Eisen und Kupfer wurde im Tier-Modell mit physiologischen Curcumin-Konzentrationen erreicht [323]. Dadurch reduzierten sich die oxidativen Schäden. Generell wird eine Eisenüberladung des Gehirns mit einem erhöhten Risiko für Alzheimer assoziiert und ein Abfangen dessen somit als Prävention gegen die Alzheimer-Erkrankung angesehen [324]. Im Vordergrund steht dabei, wie oben erwähnt, die Katalysierung der Bildung von reaktiven

Sauerstoffspezies (ROS) [318]. Zusammenfassend wird diesem Stoff also eine deutlich neuroprotektive Wirkung zugeschrieben.

Resveratrol (trans-3,5,4'-Trihydroxystilben), der polyphenolische Hauptbestandteil in der Weintraube und daraus folgend im Rotwein, besitzt ebenso starke antioxidative Eigenschaften *in vitro* [325]. Eine Vorbehandlung mit dem Polyphenol unterdrückte dabei die β -Amyloid-induzierte NF- κ B-Aktivierung in kultivierten Phäochromozytom-Zellen aus Ratten (PC12). Eine Wirkung auf die Pathogenese von Alzheimer scheint dadurch möglich. Das veranschaulichen auch epidemiologische Studien, die ein reduziertes Alzheimer-Risiko unter mindestens einmal wöchentlichem Rotwein-Konsum zeigten [326]. Dabei ließ sich auch nachweisen, dass dieser Effekt nicht alleine durch den enthaltenen Alkohol erzielt wurde. Truelsen et al. bestätigten diese Ergebnisse [327]. Hier korrelierten auch die wöchentlichen und monatlichen Einnahmemengen von Rotwein invers mit dem Erkrankungsrisiko für Alzheimer.

Auf Grund dieser Beobachtungen kommen immer mehr verschiedenartige polyphenolhaltige Nahrungsergänzungsmittel auf den Markt, die unterstützend im Rahmen von neurologischen Erkrankungen eingesetzt werden sollen. Der in der vorliegenden Arbeit untersuchte polyphenolreiche, standardisierte Kiefern-rindenextrakt aus *Pinus maritima* (Pycnogenol[®]) wurde schon in einigen *in-vitro*- und *in-vivo*-Studien auf seine Wirksamkeit, in Hinblick auf neurologische Störungen, getestet [328-331].

Hasegawa und Mochizuki untersuchten den Einfluss von Pycnogenol[®] auf das räumliche Gedächtnis von Ratten nach Orchiektomie [331]. Durch die Kastration sanken die Testosteron-Spiegel der Nager, so dass sich in der Folge deren Leistung in einem standardisierten Labyrinth-Experiment verschlechterte. Die Einnahme von Pycnogenol[®], in Form von Pellets, konnte diesen Leistungsabfall vermindern. Ebenso erhöhten sich die Spiegel des „Nerve growth factors“ (NGF) in Hippocampus und Cortex nach Pycnogenol[®]-Einnahme. Dies könnte eine Verbesserung des räumlichen Gedächtnisses durch erhöhte neuronale Proliferation bewirken. Ein Einsatz des polyphenolreichen Rindenextraktes könnte deshalb zur Verbesserung der räumlichen Gedächtnisleistung, vor allem unter älteren Männern mit sinkenden Testosteronspiegeln, in Betracht gezogen werden.

Groß angelegte, randomisiert-kontrollierte Studien wären zur Überprüfung der Wirksamkeit in dieser Bevölkerungsgruppe zusätzlich notwendig, um Kosten und Nutzen der Therapie mit Pycnogenol[®] gegeneinander abwägen zu können.

Peng et al. fanden heraus, dass der Rindenextrakt die Amyloid- β (A β)-induzierte Apoptose und ROS-Bildung *in-vitro* unterdrücken kann [328]. Sie zeigten damit auch, dass ROS im Kontext der A β -induzierten Apoptose von Neuronen im Laufe der Alzheimer-Erkrankung mitwirken. Damit könnte Pycnogenol[®] mit seiner Radikalfängereigenschaft eventuell zusätzlich im Rahmen der Therapie dieser degenerativen Erkrankung eingesetzt werden, um ein Fortschreiten zu verhindern bzw. zu verlangsamen. Allerdings verwendeten Peng et al. für ihre Untersuchungen *in vitro* den Gesamtextrakt. Von diesen Bedingungen auf die *in-vivo*-Realität im Menschen zu schließen ist schwierig, da nach oraler Aufnahme von Pycnogenol[®] nicht der komplette Extrakt in unveränderter Form in den Körper aufgenommen werden kann und damit auch nicht die Neuronen in ursprünglicher Zusammensetzung erreicht. Auch hier wären, zur Bestätigung dieser Ergebnisse, klinische Studien am Menschen sicherlich die beste Option.

Die Wirkungen von Pycnogenol[®] auf Schäden nach einem Schädel-Hirn-Trauma untersuchten Scheff et al. mit Hilfe eines Ratten-Modells [329]. Dabei wurden neuroprotektive Effekte des Extraktes, u.a. durch Konzentrationssenkung der Entzündungsmediatoren IL-6 und TNF- α , offenbar.

Mit einem 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin-induzierten Maus-Modell, das den pathologischen Zustand des Parkinsonismus abbildet, zeigten Khan et al. die schützende Wirkung des polyphenolreichen Rindenextraktes vor neurologischen Entzündungen und Degenerierungen [330]. Damit bewies die Forschergruppe, dass auch Parkinson-Patienten in der Zukunft vom Einsatz von Pycnogenol[®] profitieren könnten. Das muss natürlich *in vivo* noch belegt werden.

Um diese *in-vitro*- und *in-vivo*-Effekte aus Studien an Tieren im menschlichen Körper überhaupt sehen zu können, müssten die wirksamen Bestandteile erst einmal ausreichend im ZNS angereichert werden. Dabei besteht in der Blut-Hirn-Schranke sicherlich das größte Hindernis für die größtenteils hydrophilen Moleküle.

2.2 Physiologie der humanen Blut-Hirn-Schranke

Die Blut-Hirn-Schranke (BHS) stellt die Homöostase des Zentralen Nervensystems sicher. Sie erfüllt auf der einen Seite Transportfunktionen, in dem sie die Einfuhr essentieller Nährstoffe durch Transporter ermöglicht und deren z.T. toxische Metabolite wieder entfernt [332-334]. Auf der anderen Seite ist die BHS eine Diffusionsbarriere zwischen Blutkreislauf und zentralem Nervensystem (ZNS). Das Eindringen von Xenobiotika, mit potentiell toxischen Effekten, in das Gehirn wird verhindert und dadurch eine normale Funktion des ZNS ermöglicht. Damit erschwert sich aber auch die Aufnahme von Arzneistoffen in wirksamen Konzentrationen, die gegen neurologische Störungen gerichtet sind. Die große Herausforderung in der Wirkstoffentwicklung ist die Vorhersage der ZNS-Gängigkeit der untersuchten Arzneistoffe. Um dieses Problem einschätzen zu können, wurden in den letzten Jahrzehnten mehrere Modelle etabliert, die die physiologische BHS unterschiedlich gut imitieren. Um solche Modelle entwickeln zu können, muss zunächst die Funktionsweise der menschlichen BHS verstanden werden.

Die Blut-Hirn-Schranke setzt sich aus drei verschiedenen Zelltypen zusammen: zerebralen Endothelzellen, Astrozyten und Perizyten [332]. Die Endothelzellen kleiden die kapillare Basalmembran aus (Abbildung 51).

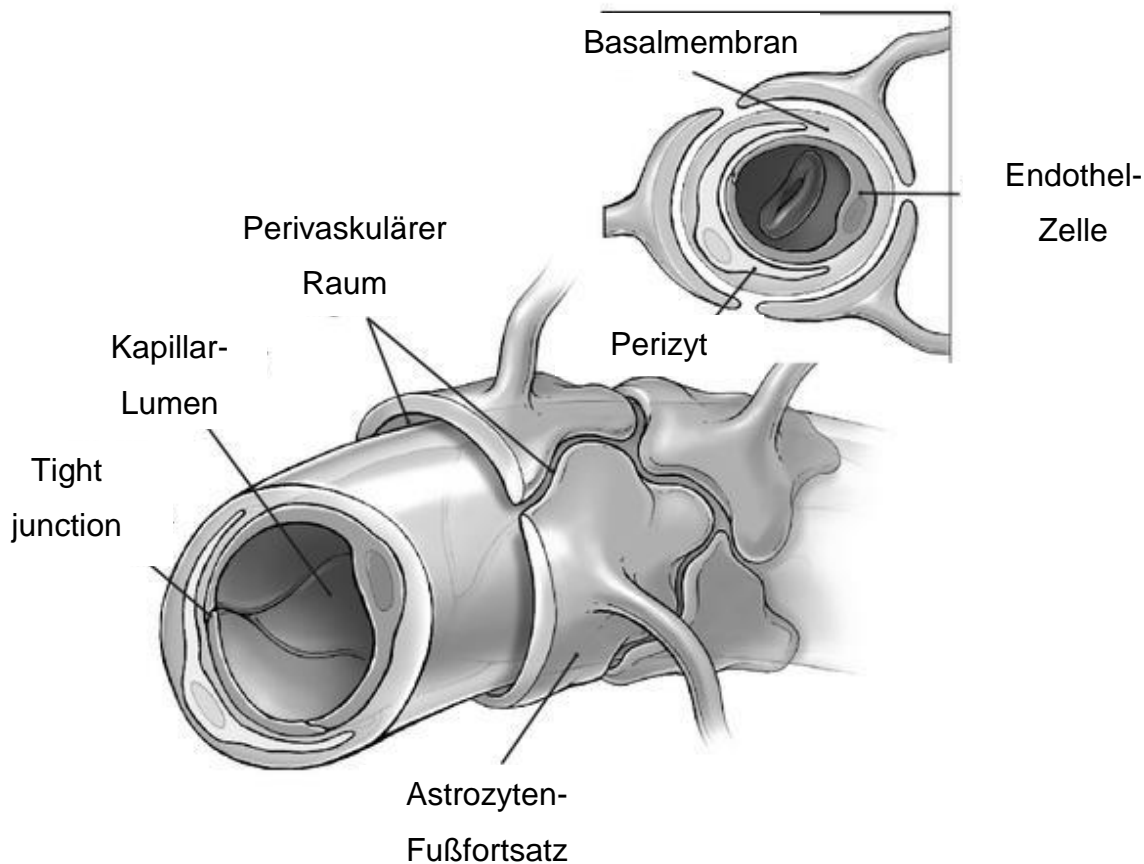


Abbildung 51: Schematischer Aufbau der humanen Blut-Hirn-Schranke. Wiedergabe nach Anderson et al. [335] mit Genehmigung der Hindawi Publishing Corporation. Das Kapillarlumen wird durch Endothelzellen ausgekleidet, welche über Tight junctions miteinander eng verbunden sind. Astrozyten und Perizyten sorgen, im Zusammenspiel, für eine besondere Dichte der Blut-Hirn-Schranke als Endothelzellbarriere.

Der große Unterschied zu anderen Endothelzellmembranen im Körper liegt darin, dass hier keine Fenestrierung vorliegt. So bezeichnet man das Vorhandensein zahlreicher Öffnungen in Membranen, die den Transport von Stoffen durch sie hindurch erleichtern. Stattdessen existiert in der BHS eine dichte Zell-Zell-Verbindung. Diese wird durch sogenannte „Tight junctions“ und „Adherens junctions“ erreicht [336]. Die „Tight junctions“ bestehen aus drei verschiedenen integralen Membranproteinen. Furuse et al. entdeckten das Claudin und Occludin [337, 338], Martin-Padura et al. die Junctional Adhesion Molecules (JAM) 1-3 [339]. Zusätzlich dazu gibt es die zytoplasmatischen, akzessorischen Proteine, z.B. Zonula occludens-1, -2, -3. Diese organisieren die Membranproteine und

verknüpfen sie mit Actin, dem primären Zytoskelettprotein des Endothels [333]. Die „Tight junctions“ erzwingen, als physikalische Barriere, den transzellulären Transportweg, an Stelle des parazellulären. Der Verlust an z.B. Claudin-1 führt bei Tumoren, Schlaganfällen etc. zur Erweiterung der Durchlässigkeit der BHS, u.a. für toxische Stoffe [334]. Die weitaus weniger starken Zell-Zell-Verbindungen, genannt „Adherens junctions“, werden durch die Verbindung von Vaskulär-endotheliale-Cadherin mit Actin gebildet [340]. Intermediäre Proteine, die als Catenine bezeichnet werden, vermitteln die Verbindung und stabilisieren diese. Zwischen „Tight junctions“ und „Adherens junctions“ findet eine gewisse Wechselwirkung statt, vermittelt über das Vaskulär-endotheliale-Cadherin, das die Expression von Claudin-5 hochreguliert [341].

Kleine, lipophile Moleküle, wie z.B. O₂ und CO₂, können frei über die BHS, entlang eines Konzentrationsgradienten, diffundieren. Der Transport hydrophiler Moleküle wird dagegen stark eingeschränkt. Glucose und Aminosäuren als wichtige Energieträger penetrieren durch die BHS über Transporter, große Moleküle, wie Insulin oder Leptin, werden via rezeptorvermittelter Endozytose in das Gehirn aufgenommen [333].

Der zweite Zelltyp, der zu der Bildung dieser dichten Barriere beiträgt, sind die Astrozyten, die mit ihren Endfortsätzen in den Endothelzellen verankert sind (Abbildung 51). Ein direkter Kontakt der Zellen ist zur Erhöhung der Integrität der BHS erforderlich. Als Ursache für die Verbesserung der Barriere-Funktion werden lösliche Mediatoren diskutiert, genauer TGF-β₁ [342], IL-6, bFGF [343] und Ca²⁺. Dabei berichten Ramsauer et al. von unterschiedlichen Effekten auf die Durchlässigkeit der BHS, wenn sie dem Ansatz aus Endothelzellen und Perizyten wahlweise Astrozyten, oder als Ersatz TGF-β₁, hinzugaben. Das spricht eher dafür, dass dieser Wachstumsfaktor nicht, bzw. nicht alleine, für die Verbesserung der Barriere-Funktion durch Astrozyten verantwortlich ist [342]. Sobue et al. konnten bei der Untersuchung des Fibroblasten-Wachstumsfaktor bFGF feststellen, dass dieser zwar einen großen Einfluss auf die Integrität der BHS hat, die Expression von diversen Transportern, wie MDR-1 und GLUT-1, aber nicht induzieren kann [343]. Das ist ein Indiz dafür, dass ein Zusammenspiel mehrerer

Komponenten, und nicht ein Wachstumsfaktor alleine, für die stabilisierenden Effekte der Astrozyten auf die BHS *in vivo* verantwortlich ist.

Der letzte zelluläre Hauptbestandteil, die Perizyten, liegen in großer Zahl in der Basallamina vor. Die Perizyten wickeln sich um die Endothelzellen und sorgen damit für eine weitere Stabilisierung des Gefüges der BHS [333].

Die Transporterausstattung der BHS ist vielfältig [332, 344]. Effluxtransporter, wie die ABC-Transporterfamilie, mit dem bekanntesten Vertreter p-Glykoprotein, und die Multi-drug resistance-Proteine (MRP) sorgen für den Auswärtstransport von Nährstoffmetaboliten und toxischen Substanzen. Daher werden viele Arzneistoffe zwar ins ZNS aufgenommen, aber im Anschluss direkt wieder heraus transportiert und sind somit im Gehirn nicht bioverfügbar, wenn sie Substrate dieses Efflux-Transporters sind.

Eine weitere wichtige Transporterfamilie, die in der Endothelzellbarriere vorhanden ist, ist die Solute-Carrier-Transporter (SLC)-Familie. Dazu zählen u.a. der GLUT-1, der SLC-2 und der „Organic Anion Transporting Polypeptide“ (OATP)-Transporter. Diese sind für die Aufnahme wichtiger Substrate in das Gehirn verantwortlich und stellen somit die Energieversorgung im ZNS sicher. Arzneistoffe zu entwickeln, die natürlichen Substraten dieser Transporter ähneln, könnte ein lohnenswerter Ansatz bei der Entwicklung ZNS-gängiger Wirkstoffe sein.

2.3 Ausgewählte Modelle zur Untersuchung der Blut-Hirn-Schrankengängigkeit von Arzneistoffen

Der Übertritt von neuen, aber auch etablierten, Wirkstoffen in das Gehirn, ist aus zwei Gründen relevant: Auf der einen Seite möchte man das Potential von Arzneistoffen erkennen, die direkt im ZNS wirken sollen, wie z.B. Wirkstoffe gegen Alzheimer oder andere neurologische Erkrankungen. Zum anderen soll das Risiko für zentrale Nebenwirkungen unter solchen Arzneistoffen erkannt werden, die ihre Zielstrukturen primär in der Peripherie angreifen, wie z.B. Antihypertonika. Des Weiteren sind ZNS-Gängigkeiten von Nahrungsbestandteilen und Genussmitteln, z.B. von Alkohol, von Bedeutung, sowohl in protektiver als auch schädigender Hinsicht. Zu beachten ist auch die erhöhte Permeabilität der BHS im Kontext von diversen neurologischen Erkrankungen und nach Schlaganfällen [332]. Auf Grund

der Schwierigkeit der Passage der BHS im normalen Zustand und des daraus resultierenden hohen Risikos, im Rahmen der Arzneistoff-Entwicklung von ZNS-gängigen Substanzen einen Misserfolg zu verzeichnen, ist die Anzahl an Neuentwicklungen solcher Stoffe, die ins Gehirn permeieren können, sehr gering [345].

Da *in-vivo*-Untersuchungen im Menschen zu dieser Thematik meist unethisch und, da sie Hochdurchsatz-Screenings nicht erlauben, nicht praktikabel sind, befindet sich die pharmazeutische Industrie auf der Suche nach adäquaten Modellen, um möglichst gut die physiologischen Vorgänge beschreiben zu können und die Testung vieler Substanzen mit geringem Zeitaufwand zu ermöglichen [346]. Indikationen, die *in-vivo*-Untersuchungen ethisch vertretbar werden lassen, sind z.B. Krebserkrankungen oder neurologische Erkrankungen mit einem hohen Morbiditäts- und Mortalitätsrisiko, wie Multiple Sklerose (MS). Innerhalb dieser Patientengruppen sind Tests unmittelbar am Menschen denkbar.

Computer-Simulationen rücken auf der Suche nach Alternativen, oder als Ergänzung zur *in-vivo*-Testung, immer mehr in den Fokus. *In-silico*-Modelle haben gewisse Vorteile, z.B. sind sie im Vergleich zu *in-vitro*-Ansätzen deutlich weniger aufwendig, verbrauchen weniger Ressourcen in Hinblick auf Verbrauchsmaterial und tierische Quellen und können die ZNS-Gängigkeit von Substanzen schon prospektiv vorhersagen, ohne den Stoff in der Regel synthetisiert vorliegen zu haben [347]. Dabei versuchen diese Computermodelle möglichst genau, anhand verschiedener Moleküleigenschaften, den log BB der jeweiligen Substanz zu bestimmen [348, 349]. Dieser berechnet sich wie folgt:

Formel 1: Berechnung der Blut-Hirn-Schrankengängigkeit eines Stoffes über das Verhältnis dessen Konzentrationen im Gehirn und Blut.

$$\log BB = \log \frac{[\text{Konzentration im Gehirn}]}{[\text{Konzentration im Blut}]}$$

Interessante Eigenschaften sind z. B. die Anzahl von Wasserstoffbrücken-Donoren und -Akzeptoren, die Hydrophobie, die Anzahl drehbarer Bindungen, der log P-Wert, das Molekulargewicht und die polare Oberfläche (PSA). Uhlenhut et al. entwickelten ein solches Modell auf Basis eines 177 Strukturen umfassenden Trainingsdatensatzes [186]. Der Datensatz enthielt Ergebnisse aus

in-vitro-Untersuchungen der Substanzen mit dem Wissen, ob die Substanz jeweils ZNS-gängig oder eben nicht BHS-permeabel war [349]. Verwendet wurden hierbei 12 verschiedene Deskriptoren. Gewählt wurde ein harter „cut-off“ von $\log BB = -0,3$. Bei Werten darüber wurde die Substanz als ZNS-gängig bewertet. Ein weiteres, lineares Modell zur Vorhersage der BHS-Gängigkeit entwickelten Liu et al. basierend auf 23 verschiedenen Stoffen, die überwiegend durch passive Diffusion ins Gehirn gelangen, und drei molekularen Deskriptoren [350]. Eine weitere Arbeitsgruppe entwickelte auf Grundlage von 1970 Strukturen aus der Literatur, ein auf der Wahrscheinlichkeitsrechnung beruhendes Modell, das am Ende 83 % aller ZNS-gängigen Substanzen und 96 % aller nicht gängigen Substanzen als solche erkannte [351].

Eine allgemein gültige Aussage zur Permeation von Stoffen durch die BHS lässt sich jedoch mit Computermodellen schwer treffen, da diese z.B. die Aufnahme über Transporter, und damit die erleichterte bzw. energieverbrauchende Auf- bzw. Abgabe von Stoffen, nicht genau beurteilen können [349]. Zwar werden meist Datensätze aus *in-vitro*-Versuchen mit einbezogen, jedoch werden diese Untersuchungen meist mit tierischen Zellen durchgeführt, wodurch die Übertragbarkeit auf den Menschen begrenzt ist. Es bestünde die Gefahr der Über- bzw. Unterschätzung von Aufnahmeraten und in der Folge von Wirkungen derartiger Substanzen, die Substrate solcher Transporter sind, da in den tierischen Zellen mengen- und artmäßig eine andere Transporterexprimierung stattfindet, bzw. stattfinden könnte. Vielversprechende Stoffe könnten durch falsche Vorhersagen den potentiellen Patienten vorenthalten bleiben oder, im Gegenzug, toxische Wirkungen anderer Stoffe unterschätzt werden. Trotz der stetigen Verbesserung der Datensätze und der Linearität der Vorhersagen, sind *in-silico*-Ansätze bis jetzt nicht in der Lage, die *in-vivo*- bzw. *in-vitro*-Studien zu ersetzen und die BHS-Permeabilität als solche zu bestimmen [348]. Als Ergänzung, oder als Screening-Instrument zur Suche nach vielversprechenden Kandidaten, sind die Computermodelle aber durchaus geeignet.

Innerhalb der *in-vivo*-Untersuchungen zur BHS-Permeation stehen vor allem folgende Verfahren heraus: die Mikrodialyse, die intravenöse Injektion mit anschließendem Probenzug in Gehirnbereichen, z.B. der zerebrospinalen

Flüssigkeit (CSF), der „Brain uptake index“ und die Gehirnperfusion. Mit diesen, teils sehr aufwendigen Methoden, sind die besten Vorhersagen möglich, da sie sehr nahe an die tatsächlichen Gegebenheiten heranreichen [348]. Hierbei hat die Gehirnperfusion unter den drei letztgenannten Methoden die größte Aussagekraft, da die Kapillaren am längsten mit dem Wirkstoff in Berührung sind (10 min vs. 5-15 sec im Rahmen des BUI vs. 1-2 sec innerhalb der Methode der intravenösen Injektion), bevor die Tiere getötet werden und der Gehalt an Arzneistoff im Gehirn bestimmt wird. Dabei wird durch einen Katheter ein mit Sauerstoff angereicherter Puffer in die Halsschlagader infundiert, der mit der zu testenden Substanz versetzt ist. Die Koronararterie wurde zuvor abgebunden. Die Perfusatkonzentration kann dabei über die komplette Zeit konstant gehalten werden. Durch die längere Expositionsdauer der Substanz mit dem Gehirnkapillarbett kann die Sensitivität der Methode, im Vergleich zum „Brain uptake index“, verdoppelt werden. Ebenso ist es möglich, rezeptorvermittelte Transportvorgänge zu erfassen. Diese vergleichsweise langsamen Vorgänge werden mit der „Brain uptake index“-Methode nur unzureichend erfasst [348].

Mit der Mikrodialyse sind Konzentrations-Zeit-Verläufe in Echtzeit individuell, je nach Substanz, messbar. Zunächst findet eine invasive stereotaktische Probenverabreichung unter Narkose statt, die in der Folge ein wiederholtes bzw. dauerhaftes Probenziehen in sich frei bewegenden Tieren ermöglicht [348]. Dieses Verfahren ist am besten für durchschnittlich gehirngängige Substanzen geeignet. Für gut BHS-permeable Substanzen könnte die Konzentration im Dialysat für eine verlässliche Quantifizierung zu gering sein, da diese auch zu einer Akkumulation in den Zellen tendieren. Die Gehirngängigkeit schlecht permeabler Stoffe könnte hingegen durch BHS-Schäden überschätzt werden. Zusätzlich könnten lipophile Substanzen zur Adsorption an der Dialysemembran neigen. Ein ideales Modell ist somit noch nicht gefunden.

Nachteilig an den *in-vivo*-Untersuchungen ist generell der deutliche Mehraufwand im Vergleich zu *in-vitro*- oder *in-silico*-Versuchen. Ebenso handelt es sich um Tierversuche, die zwar sehr sinnvoll sind, allerdings möglichst mit geringem „Tierverbrauch“ durchgeführt werden sollten. Die Menge an getöteten Tieren ließe sich durch Verwendung einer immortalisierten Zelllinie, jedoch auf Kosten der

Vorhersagekraft der BHS-Permeabilität, deutlich reduzieren. Eine Kombination beider Methoden, also beginnend mit einem *in-vitro*-Screening aller interessanten Stoffe, gefolgt von Tierversuchen mit den im Vorversuch am besten gehirngängigen Substanzen, wäre sicherlich eine erfolgsversprechende Vorgehensweise.

Viele Forschergruppen haben versucht, mit verschiedenen *in-vitro*-Modellen aus unterschiedlichsten Geweben, ein verlässliches Modell zur BHS-Permeationssimulation zu etablieren [348]. Wichtig dabei ist die Expression der tight-junctions-Proteine Occludin, Claudin-5 und Zonula occludens-1 und -2, um eine adäquate Dichte der Monolayer zu gewährleisten und somit die physiologischen Bedingungen der BHS möglichst realistisch darzustellen. Ebenso essentiell zur Untersuchung der BHS-Gängigkeit, ist die Expression zahlreicher Efflux- und Influx-Transporter in der Zelllinie, die die Bioverfügbarkeit von ZNS-gängigen Arzneistoffen *in vivo* stark beeinflussen können. Diverse Publikationen beschreiben die Verwendung von Endothelzellen nicht zerebralen Ursprungs. Dabei wird unter Verwendung von mit p-Glykoprotein (pGp) bzw. leerem Vektor transfektierten, modifizierten MDCK (Madin-Darbin canine kidney)-Zellen versucht, die BHS zu simulieren [352, 353]. Meistens basieren diese Modelle aber auf der Kultivierung von Endothelzellen zerebralen Ursprungs. Zur Erhöhung des transendothelialen elektrischen Widerstands (TEER) werden diese häufig mit Zellen ihrer natürlichen Umgebung, nämlich den Astrozyten und/oder Perizyten, co-kultiviert [332]. TEER-Werte über $100 \Omega/\text{cm}^2$ werden dabei meist als akzeptabel zur Durchführung von Permeationsversuchen angesehen.

Durch die Verwendung humaner Mikrogefäßendothelzellen des Gehirns (hCMEC/D3) versuchten Sano et al. möglichst nahe an die physiologischen Gegebenheiten heranzukommen [354]. Immortalisiert wurden die Zellen mit dem SV40-T-Antigen, was einer gängigen Methode in der Mikrobiologie entspricht, da sonst eine rasche Alterung der primären BMEC-Zellen eingetreten wäre. Generell ist die Verwendung von humanen Primärzellen durch deren Verfügbarkeit limitiert. Smith et al. untersuchten ein BHS-Modell auf Basis von Schweine-Endothelzellen (PBMVEC's) [355]. Um deren Dichte zu erhöhen, wurden sie mit Astrozyten co-kultiviert. TEER-Werte von ca. $900 \Omega/\text{cm}^2$ konnten damit erreicht werden. Auch die

Eigenschaften dieser Primärzellen ähnelten den Beschaffenheiten der humanen BHS. Ein weiteres Modell auf Basis von Schweine-Endothelzellen erzielte ähnliche TEER-Werte ($\sim 800 \Omega/\text{cm}^2$) [356]. Dieses wurde auch auf die Verwendbarkeit als Arzneistoff-Screening-Instrument getestet und als verlässlich und robust bewertet. Die mit Abstand meisten *in-vitro*-Modelle basieren jedoch auf der Verwendung von Nagetierzellen, z.B. von Ratten und Mäusen [357-366]. RBE-Zellen werden, meist transfektiert mit einem immortalisierenden Gen, sehr häufig angewandt. Die RBE4-Zelllinie ist dabei am besten charakterisiert [357]. Abbott et al. co-kultivierten RBEC-Zellen mit Astrozyten von Ratten. Hiermit wurden hohe TEER-Werte ($> 600 \Omega/\text{cm}^2$) erreicht [358]. Nakagawa et al. gingen noch einen Schritt weiter. Sie verwendeten eine Tripel-Co-Kultur, bestehend aus Endothelzellen auf der einen Seite, Perizyten auf der anderen Seite der porösen Membran der Transwell-Einsätze sowie Astrozyten auf dem Boden der Transwells als Design ihres Modells [359]. Damit erzielte diese Forschergruppe höhere Dichten als mit der Co-Kultur aus Astrozyten und Endothelzellen, allerdings mit max. $400 \Omega/\text{cm}^2$ unter den Werten des vorher beschriebenen Modells von Abbott et al. [358].

Da das in dieser Arbeit verwendete Modell auf muriner Basis entwickelt wurde [363-366], lohnt ein Blick auf andere *in-vitro*-Modelle aus Mäusezellen: Shayan et al. etablierten ein Modell von BMEC-Zellen in Co-Kultur mit Astrozyten von Ratten [361]. Um die Dichte der Monolayer zu optimieren, wurden im Anschluss verschiedene Aussaatdichten von beiden Zelltypen kombiniert und die Zellkulturmedien verändert zusammengesetzt [360]. Damit konnten TEER-Werte von max. $200 \Omega/\text{cm}^2$ erreicht werden.

Diese Übersicht der verschiedenen Modelle zeigt, dass die Suche nach einer optimalen Lösung der Simulation der humanen BHS schon lange andauert und sich als sehr komplex darstellt. Im Folgenden wird nun das murine cEND-Modell beschrieben, mit dem in der vorliegenden Arbeit die BHS-Gängigkeit ausgewählter Stoffe bestimmt wurde.

2.4 cEND-*in-vitro*-Modell für die Analyse der Aufnahme von ausgewählten Bestandteilen von Pycnogenol® und dessen Metaboliten in das Gehirn

Für die vorliegenden Untersuchungen wurde ein *in-vitro*-Modell auf Grundlage einer immortalisierten Mauszelllinie verwendet. Entwickelt und betrieben wurde das Modell im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Förster am Universitätsklinikum in Würzburg. Die Endothelzellen aus den Mikrogefäßen des Gehirns von Mäusen sind dabei nach einem standardisierten Verfahren gewonnen worden [363]. Die Bezeichnung cEND sagt aus, dass die Endothelzellen (END) aus dem zerebralen Kortex (engl. *cerebral cortex*) der Mäuse stammten. Diese zeigen zum Teil, im Vergleich zu cerebEND-Zellen aus dem Cerebellum der Mäuse, deutliche Unterschiede in ihren Eigenschaften, z.B. höhere Expressionslevel der Hauptkomponenten der tight junctions, Claudin-1 und Occludin [366]. Immortalisiert wurden die Zellen durch Transformation mit dem Onkoprotein des murinen Polyomavirus. Die vorangegangenen Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Förster zeigten die Einflüsse einer Glucocorticoid-Zugabe auf die Expression von Occludin [364, 365], ebenso wie die Einflüsse eines entzündlichen Stimulus (Tumor necrosis factor α (TNF α)) auf die Dichte der Zellmonolayer über die Messung des transendothelialen elektrischen Widerstandes (TEER-Wert) [366]. Dabei wurde eine signifikant stärkere Expressierung von Occludin und, in der Folge, eine signifikante Zunahme der TEER-Werte der Monolayer, nach Zugabe von 100 nmol/L Dexamethason zum Versuchsansatz, ermittelt [364]. Ein Entzündungsstimulus hingegen bewirkte eine Verringerung der Dichte der Zellmonolayer [365, 366]. Daraus kann man ableiten, dass entzündliche Erkrankungen einen negativen Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke haben können. Antientzündliche Wirkstoffe, wie z.B. Glucocorticoide, könnten daher bei diesen Krankheitsbildern eingesetzt werden, um eine pathologisch erhöhte Permeabilität der BHS wieder zu verringern, um somit den Übertritt toxischer Stoffe ins ZNS zu verhindern.

Eine ausreichende Dichte der Monolayer aus cEND-Zellen ist für Transportversuche essentiell, da sonst Fehlschlüsse über die Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit der interessierenden Substanzen gezogen werden. Um die

Dichte der Zell-Monolayer bewerten zu können, wurde mit dem Millicell-ERS der Firma Millipore der TEER-Wert in Dreifachmessung vor Aufgabe der Substanzen bestimmt (Experimenteller Teil C, Kap. 2.4). Zu beachten ist, dass der Eigenwiderstand der Membranen der Einsätze der 12-Multiwell-Platten ca. 30-50 Ω/cm^2 beträgt [367]. Aus diesem Grund wurden für die Transportstudie nur Monolayer mit TEER-Werten $> 100 \Omega/\text{cm}^2$ akzeptiert, um eine Verfälschung der Ergebnisse durch unzureichend dichte Zellschichten zu verhindern.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Permeation von (+)-Catechin, Protocatechusäure und des (+)-Catechin-Metaboliten M1 durch die Monolayer des cEND-Modells untersucht. Diese Substanzen wurden auf Grund der Computer-Berechnungen von Uhlenhut et al. ausgewählt [186]. Hierbei zeigte Protocatechusäure die schlechteste vorhergesagte BHS-Gängigkeit unter den untersuchten Pycnogenol[®]-Inhaltsstoffen mit einem $\log BB$ von $-1,18$. (+)-Catechin lag im Durchschnitt aller Stoffe ($\log BB = -0,90$) und der M1 zeigte die beste, simulierte ZNS-Gängigkeit ($\log BB = -0,33$). Alle drei Stoffe wurden somit nach Wahl eines harten „cut off“ bei $\log BB = -0,30$ als nicht ZNS-gängig identifiziert. Diese Ergebnisse sollten mit Hilfe des ausgewählten *in-vitro*-Modells bestätigt werden. Neben dem Durchtritt der Reinsubstanzen M1, (+)-Catechin und Protocatechusäure durch den Endothelzellmonolayer, sollte beim M1 noch der Mechanismus der Aufnahme untersucht werden. Hierfür wurde der M1 zusätzlich mit dem GLUT-1-Inhibitor Phloretin und dem GLUT-1-Substrat Glucose angesetzt (Details der Versuchsdurchführung: Experimenteller Teil C, Kap. 2.6), um die Ergebnisse vorheriger Publikationen, die eine erleichterte Aufnahme des M1 über GLUT-1-Transporter nahelegten, auch für diese Art von Zellen zu prüfen [60, 368].

2.5 Ergebnisse der cEND-Modell-Versuche

Vor Beginn der Permeationsversuche wurden, wie erwähnt (Experimenteller Teil C, Kap. 2.4), zunächst die TEER-Werte aller Monolayer dreifach gemessen ($n = 3$). Es erfüllten alle getesteten und verwendeten Monolayer die festgelegten Voraussetzungen (Allgemeiner Teil B, Kap. 2.4). Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen den TEER-Werten der einzelnen Ansätze festgestellt (Abbildung 52). Alle Vergleiche resultierten in p -Werten $> 0,05$ beim Student's t-

Test. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass die Ausgangsbedingungen für alle Stoffe gleich waren und tatsächlich festgestellte Unterschiede zwischen der Blut-Hirn-Schrankengängigkeit der einzelnen Substanzen nicht der unterschiedlichen Dichte der Monolayer geschuldet waren.

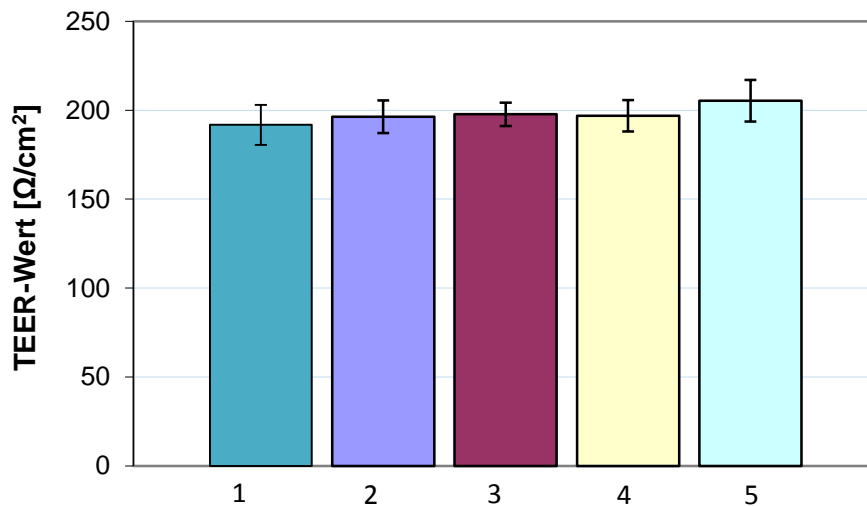


Abbildung 52: Gemessene TEER-Werte der Endothelzellmonolayer der unterschiedlichen Ansätze vor Versuchsbeginn in [Ω/cm²]. Dargestellt sind die Mittelwerte der Einzelwerte der verschiedenen Ansätze einer Substanz bei einer gewissen Versuchsdauer mit Standardabweichungen. Für die Untersuchungen des Metaboliten M1 wurden jeweils vier Versuche angesetzt, bei der Untersuchung der Substanzen (+)-Catechin und Protocatechusäure jeweils sechs. 1: M1 ohne Zusatz (10 min und 30 min); 2: M1+Phloretin (10 min und 30 min); 3: M1+D-Glucose (10 min und 30 min); 4: Protocatechusäure (30 min); 5: (+)-Catechin (30 min).

Die im Vergleich zu vorher aufgeführten Modellen deutlich geringeren TEER-Werte (Allgemeiner Teil B, Kap. 2.3) sind dadurch zu begründen, dass die cEND-Zellen im vorliegenden Modell nicht mit Astrozyten und Perizyten co-kultiviert wurden, die eine Verdichtung der „Tight junctions“ und somit höhere TEER-Werte der Monolayer bewirkt hätten. Dennoch war das Modell von Burek et al. für die vorliegende Fragestellung vollkommen ausreichend.

Keiner der drei Stoffe konnte in den Proben aus der basolateralen Kammer nachgewiesen werden. Dies bedeutet, dass der Zellmonolayer impermeabel für die Testsubstanzen in dieser Konzentration (5 µmol/L) war bzw. keine messbaren Mengen hindurchtreten konnten.

Die Vermessung der Konzentrationen in den apikalen Kammern hingegen zeigte quantifizierbare Mengen der Analyten. Beim Metaboliten M1, in einer Konzentration von 5 $\mu\text{mol/L}$, konnten nach 10 min Versuchsdurchföhrung, ohne weiteren Zusatz in die Ausgangslösung, $50,13 \pm 3,23 \%$ der Ausgangsmenge als in den Zellen aufgenommene bzw. an die Zellen adsorbierte Menge gefunden werden (Abbildung 53).

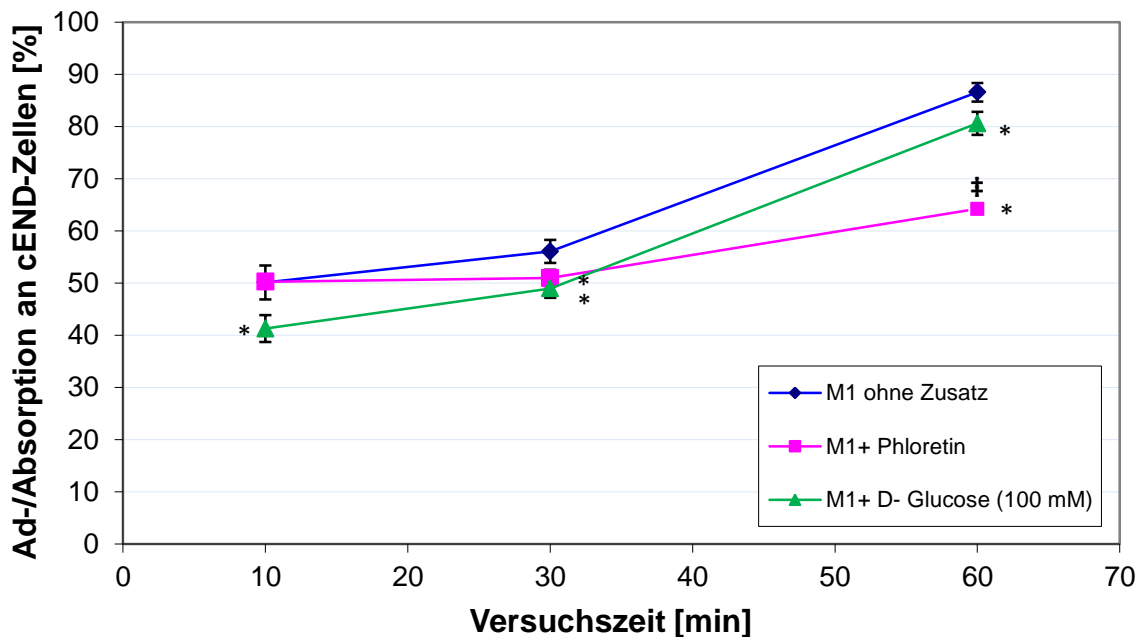


Abbildung 53: Verlauf der in die Zellen aufgenommenen bzw. an die Zellen gebundenen Menge M1 über die Zeit. Aufgetragen sind die Mittelwerte der resultierenden Prozentsätze an der Ausgangsmenge und deren Standardabweichungen ($n=4$ für 10 min und 30 min; $n=3$ für 60 min). Die Phloretin-Konzentration war 200 $\mu\text{mol/L}$ für die Versuche über 10 min und 30 min und 1,2 mmol/L (mit ‡ markiertes Symbol) für den Versuch über 60 min. Die mit * markierten Datenpunkte sind signifikant verschieden vom Datenpunkt des Ansatzes von M1 ohne Zusatz des jeweiligen Versuchszeitpunktes.

Im Ansatz mit 200 $\mu\text{mol/L}$ Phloretin-Zusatz waren dies $50,26 \pm 1,37 \%$ und bei der Analyse mit gleichzeitiger Zugabe von 100 mmol/L D-(+)-Glucose $41,27 \pm 2,58 \%$. Der Vergleich der Ansätze von 5 $\mu\text{mol/L}$ M1 ohne Zusatz und 5 $\mu\text{mol/L}$ M1 mit 200 $\mu\text{mol/L}$ Phloretin lieferte nach 10 min mit einem p-Wert von 0,95 keinen signifikanten Unterschied bei der Aufnahme in die Zellen bzw. der Adsorption an die Zellen. Dagegen konnten bei der Gegenüberstellung des Ansatzes mit 100 mmol/L D-(+)-Glucose als Zusatz und dem mit 200 $\mu\text{mol/L}$ Phloretin

($p=0,006$) bzw. dem ohne Zugabe von Zusätzen ($p=0,001$) signifikante ($p<0,01$) Unterschiede aufgezeigt werden.

Nach einer Versuchszeit von 30 min wurden im Ansatz mit $5\ \mu\text{mol/L}$ M1 ohne Zusatz $56,06 \pm 2,19\%$ der Ausgangsmenge des Metaboliten M1 in bzw. an die Zellen adsorbiert gemessen. Bei der gleichzeitigen Zugabe von $200\ \mu\text{mol/L}$ Phloretin in die apikale Kammer wurden $50,96 \pm 1,72\%$ und bei Zusatz von $100\ \text{mmol/L}$ D-(+)-Glucose $48,97 \pm 1,82\%$ gefunden. Der Vergleich des Ansatzes von $5\ \mu\text{mol/L}$ M1 ohne Zusatz mit dem unter $200\ \mu\text{mol/L}$ Phloretin-Zugabe lieferte signifikante Unterschiede ($p=0,01$). Die Gegenüberstellung des Versuches ohne Zusätze mit dem D-(+)-Glucosehaltigen zeigte einen hochsignifikanten Unterschied ($p=0,003$). Dagegen war der Unterschied zwischen $200\ \mu\text{mol/L}$ Phloretin-Zugabe und $100\ \text{mmol/L}$ D-(+)-Glucose-Zugabe nicht signifikant ($p=0,16$).

Im Rahmen der Versuchsdurchführung über 60 min wurden in der anschließenden Vermessung, im Ansatz von $5\ \mu\text{mol/L}$ M1 ohne Zusatz, $86,57 \pm 1,76\%$ der ursprüngliche Menge M1 als in die Zellen aufgenommene bzw. an die Zellen gebundene Menge quantifiziert. Die gleichzeitige Zugabe von $1,2\ \text{mmol/L}$ Phloretin resultierte in einer Aufnahme bzw. Adsorption von $64,23 \pm 1,37\%$ und der Zusatz von $100\ \text{mmol/L}$ D-(+)-Glucose in einem Wert von $80,60 \pm 2,23\%$. Die 60-minütige Versuchszeit lieferte beim Vergleich vom Ansatz des Metaboliten M1 ohne Zusatz mit der Versuchsreihe mit $1,2\ \text{mmol/L}$ Phloretin-Zusatz hochsignifikante Differenzen ($p=0,00006$). Ebenso die Gegenüberstellung des zusatzlosen Versuchs mit dem unter $100\ \text{mmol/L}$ D-(+)-Glucose-Zusatz ($p=0,0004$). Hier offenbarte der Vergleich des Phloretin- mit dem Glucose-Zusatz wieder signifikante Unterschiede ($p=0,02$).

Damit wurde, zusammenfassend betrachtet, weniger M1 in die Zellen aufgenommen bzw. daran adsorbiert, wenn gleichzeitig Phloretin dem Ansatz zugegeben wurde. Der Unterschied war nach 10 min mit einer Phloretin-Konzentration von $200\ \mu\text{mol/L}$ noch nicht signifikant, wurde dann nach 30 min signifikant ($200\ \mu\text{mol/L}$ Phloretin) und nach 60 min mit Zusatz von $1,2\ \text{mmol/L}$ Phloretin hochsignifikant, jedoch muss man hier, im Vergleich zu den 10 min- und 30 min-Ansätzen, die höhere Phloretin-Konzentration beachten.

Ebenso wurde eine Hemmung der Aufnahme des Metaboliten M1 in die Zellen, bzw. eine Hemmung der Adsorption erzielt, indem parallel 100 mmol/L D-(+)-Glucose zum Ansatz zugegeben wurden. Dieser Unterschied war nach 10 min und 30 min hochsignifikant, nach 60 min nur noch signifikant (Abbildung 53).

Im Rahmen aller drei Ansätze zeigte sich, innerhalb von 10 min, eine schnelle Aufnahme von mehr als 40 % des M1 in die Zellen. Der zeitliche Verlauf der Aufnahme des M1 ähnelte sich beim Vergleich der Ansätze ohne und mit Zusatz von 100 mmol/L D-(+)-Glucose. Lediglich das absolute Ausmaß der Aufnahme war unter Zugabe des kompetitiven Substrats D-(+)-Glucose zu jedem Probenentnahmezeitpunkt, im Vergleich zum Ansatz ohne D-(+)-Glucose, signifikant geringer. Der zeitliche Verlauf der Aufnahme des M1 unter Zugabe von Phloretin demonstrierte ein etwas anderes Bild. Hier waren nach 10 min und 30 min nahezu identische Mengen in den Zellen vorhanden, es erfolgte also kein Anstieg der aufgenommenen Menge M1 von 10 min auf 30 min im Gegensatz zu den Ansätzen ohne Zusatz (~ 6 %) und mit 100 mmol/L D-(+)-Glucose (~ 7 %). Auch von 30 min auf 60 min fiel der Anstieg der prozentual aufgenommenen Menge des Metaboliten deutlich geringer aus (~ 14 %) als beim Ansatz ohne Zusatz (~ 30 %) und beim Versuch mit 100 mmol/L D-(+)-Glucose (~ 31 %).

Die Aufnahme von (+)-Catechin betrug nach 30 min $58,58 \pm 2,98$ % der aufgegebenen Gesamtmenge (Abbildung 54), über 60 min wurde der Versuch auf Grund der Instabilität dieser Substanz nicht durchgeführt (siehe Experimenteller Teil C, Kap. 2.8.1.4). Bei der Analyse der Protocatechusäure wurden nach 30 min $4,15 \pm 5,44$ % (Abbildung 54) und nach 60 min $35,69 \pm 5,16$ % (Abbildung 55) als an die Zellen adsorbierte bzw. in die Zellen aufgenommene Mengen festgestellt.

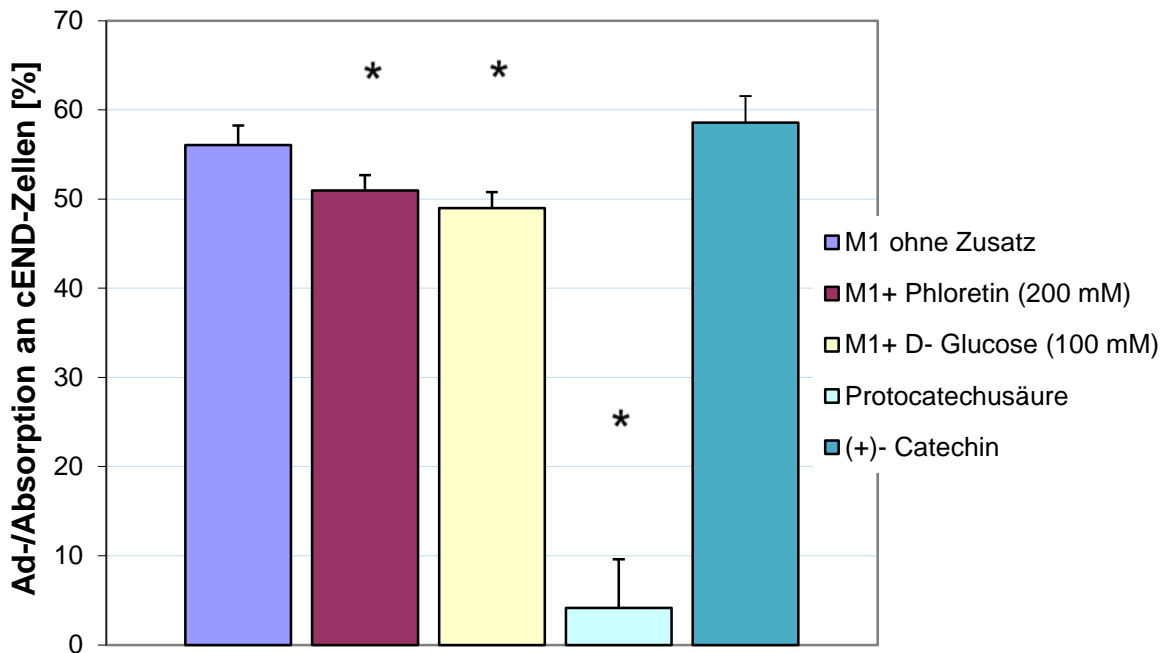


Abbildung 54: Ergebnisse der Permeationsversuche der einzelnen Ansätze über 30 min (n= 4 für M1-Versuche, n= 6 für Protocatechusäure und (+)-Catechin). Dargestellt sind die Anteile der Substanzen an der Gesamtmenge, die in die Zellen aufgenommen bzw. daran adsorbiert wurden mit Standardabweichung. * zeigt signifikante Unterschiede zum Ausgangswert M1 ohne Zusatz.

Beim Vergleich der (+)-Catechin-Werte mit den M1-Werten ohne Zusatz nach 30 min ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p= 0,97$). Somit wurde auf den ersten Blick eine vergleichbare Menge (+)-Catechin und M1 in die Zellen aufgenommen bzw. daran adsorbiert. Beide Stoffe zeigten jedoch hochsignifikant mehr Aufnahme bzw. Adsorption nach 30 min als Protocatechusäure ($p< 0,001$) (Abbildung 54).

Dieser signifikante Unterschied war beim Vergleich des M1 ohne Zusatz und Protocatechusäure auch nach 60 min noch vorhanden ($p < 0,05$) (Abbildung 55).

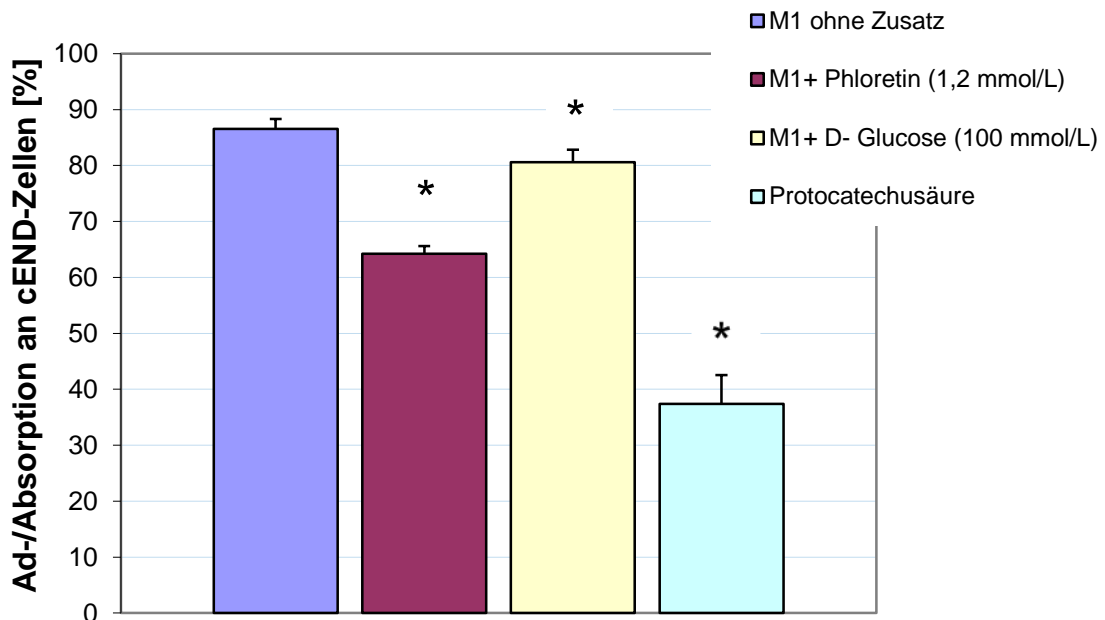


Abbildung 55: Ergebnisse der Permeationsversuche über 60 min ($n = 3$ je Versuchsansatz). Graphisch veranschaulicht sind hier die Anteile der Substanzen an der Gesamtmenge, die in die Zellen aufgenommen bzw. daran adsorbiert wurden, mit deren Standardabweichung. Das * markiert signifikante Unterschiede zum Ausgangspunkt M1 ohne Zusatz.

2.6 Diskussion

Ziel der Untersuchungen war es, eine mögliche Aufnahme von Protocatechusäure, (+)-Catechin und des Metaboliten M1 in das Gehirn via cEND-*in-vitro*-Modell zu beschreiben. Dabei sollten physiologische Konzentrationen eingesetzt werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass kein Stoff unter den gewählten Versuchsbedingungen in detektierbarer Menge durch das Blut-Hirn-Schranken-Modell permeierte. Nach Untersuchung der Zellkulturüberstände ließ sich jedoch erkennen, dass der Metabolit M1 und (+)-Catechin in großer Menge in die Zellen des Modells aufgenommen wurden und zwar beide offensichtlich etwa gleich stark. Allerdings muss man dabei in Betracht ziehen, dass sich die Wiederfindungen der beiden Analysenmethoden mit 86,4 % für den M1 und 44,0

% für (+)-Catechin deutlich unterschieden (Experimenteller Teil C, Kap. 2.8.1.8). Somit könnte man davon ausgehen, dass deutlich weniger (+)-Catechin in der apikalen Kammer detektiert wurde, als tatsächlich vorhanden war. Da die Kalibrierung der Methode allerdings mit ähnlichen Wiederfindungsraten durchgeführt wurde, sollte dieser Umstand nur eine geringe Auswirkung auf das Gesamtergebnis gehabt haben. Auch wenn gleiche Mengen (+)-Catechin und M1 in die Zellen aufgenommen würden, kann man nach den *in-vitro*-Untersuchungen von Uhlenhut et al. jedoch davon ausgehen, dass der M1 stärker wirksam ist, als das Vorläufermolekül, also eine Bioaktivierung durch den Metabolismus von (+)-Catechin zum M1 stattfindet. Dies wurde im Rahmen der Versuche für die Inhibition der Stickstoffmonoxid (NO)-Produktion und der Reduzierung der induzierbaren NO-Synthase (iNOS)-Expriemierung gezeigt [368]. Daher kann eine Aufnahme des M1 in die Zellen, im Vergleich mit (+)-Catechin, trotz ähnlicher Aufnahmezeiten, als deutlich wichtiger für die möglichen Effekte des Pycnogenol[®] bei neurologischen Erkrankungen angesehen werden.

Die Aufnahme von Protocatechusäure war, im Gegensatz zu (+)-Catechin und dem M1 nach 30 min, gering, wenn überhaupt vorhanden und nicht nur im Bereich des Messfehlers detektiert.

Wenn man nun explizit den Metaboliten M1 betrachtet, zeigte sich, dass durch die Zugabe von D-(+)-Glucose und Phloretin jeweils eine signifikante bis größtenteils hochsignifikante Hemmung der Aufnahme (bzw. der Adsorption) des Metaboliten erzielt wurde. Für die Aufnahme des Metaboliten in humane Erythrozyten [60], humane Monozyten und die murine Makrophagenzelllinie RAW 264.7 [368] konnte dies zuvor auch gezeigt werden. Die Wahl der Konzentrationen von Glucose (100 mmol/L) und Phloretin (200 µmol/L) beruhte auf den Untersuchungen mit Erythrozyten [60]. Die hochkonzentrierte Phloretin-Zugabe im Rahmen der Versuchsdurchführung über 60 min (1,2 mmol/L) sollte zusätzlich die GLUT-1-Theorie untermauern.

Phloretin gilt als kompetitiver Inhibitor des GLUT-1-Kanals [369], dessen natürliches Substrat die α -D-Glucose ist [367, 370, 371]. Kurlbaum et al. konnten eine große strukturelle Ähnlichkeit zwischen den beiden Stoffen M1 und α -D-Glucose zeigen, so dass eine erleichterte Aufnahme des Metaboliten M1 durch

diesen Transporter als wahrscheinlich angenommen werden kann [60]. Ein weiteres Indiz dafür ist die kompetitive Hemmung der Aufnahme des bioaktiven Metaboliten durch gleichzeitige Inkubation der Zellen mit D-(+)-Glucose in einer Konzentration von 100 mmol/L. Diese fiel, im Vergleich zur Phloretin-Zugabe in einer Konzentration von 200 µmol/L nach 10 min, stärker aus, nach 30 min war der Unterschied dann nicht mehr signifikant. Erklärbar ist dies mit dem Umstand, dass für die abluminale, wie auch für die luminale Seite der Blut-Hirn-Schranke, keine Einschränkung der Transportkapazität des GLUT-1-Transporters für das natürliche Substrat bekannt ist [367]. Daher kann die Aufnahme der Glucose, im Vergleich zum Xenobiotikum Phloretin, sehr schnell erfolgen, was die unterschiedliche Hemmung nach 10 min und die vergleichbare Hemmung nach 30 min bestätigt. Die starke, hochsignifikante Hemmung der M1-Aufnahme durch die hohe Phloretin-Konzentration (1,2 mmol/L) nach 60 min untermauert diese Theorie. Die dosisabhängige Hemmung des M1-Transportes kann man ebenso damit begründen, dass die erleichterte Aufnahme via Transporter sättigbar ist [372]. In der humanen Blut-Hirn-Schranke sind bewiesenermaßen GLUT-1-Transporter in hoher Dichte in den Endothelzellen auf beiden Seiten, zum Blut (luminal) und zum Gehirn (abluminal), exprimiert [344]. Dabei wurde auf der luminalen Seite eine höhere Dichte an Transporter gemessen, Dobrogowska et al. fanden hingegen dreifach höhere Konzentrationen von GLUT-1 an der abluminalen Seite in vier Regionen von Mäuse-Gehirnen [372]. Insgesamt sind ca. 15-30 % der Glucosetransporter an der BHS GLUT-1-Transporter [367]. Dabei sind unterschiedliche Phosphorylierungsmuster der GLUT-1-Transporter dafür verantwortlich, dass diese an luminaler und abluminaler Seite teilweise stark unterschiedliche Konformationen einnehmen [370]. Dies könnte ein Grund dafür sein, dass der M1 zwar luminal durch die Transporter befördert werden kann, abluminal allerdings nicht mehr. Das natürliche Substrat D-(+)-Glucose kann jedoch auch abluminal transportiert werden, sonst könnte das Gehirn nicht mit ausreichend Energie versorgt werden, um seine normale Funktion aufrecht zu erhalten. Dies muss parallel aber nicht für den M1 zutreffen, da ein anderes Phosphorylierungsmuster der Transporter auch eine andere Substratpräferenz bedingen könnte.

Whitesell et al. stellten zusätzlich fest, dass die Phosphorylierung der Glucose selbst, in den Zellen den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellte und nicht die Beförderung über unterschiedlich phosphorylierte Transporter an sich [371]. Ob eine Phosphorylierung des M1 eine Rolle spielt, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht.

Generell gilt ein stereoselektiver Transport der D-Glucose als gesichert [367]. Auch Ratten- und Mäuseendothelzellen exprimieren diesen GLUT-1-Transporter [371]. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die vorliegende cEND-Zelllinie diesen ebenso exprimierte [372, 373]. Nishizaki et al. bewiesen das Vorhandensein des Transporters auch in bovinen Gehirn-Arterien-Endothelzellen [374], was darauf schließen lässt, dass dieser Transporter in den meisten Lebewesen exprimiert wird, um die Energieversorgung des Gehirns sicherzustellen.

Ein weiteres natürliches Substrat des GLUT-1-Transporters ist die reduzierte Form der Ascorbinsäure, die Dehydroascorbinsäure [375]. Die Ascorbinsäure selbst wird nicht durch die BHS transportiert, da sie kein Substrat eines Transporters und für den parazellulären Transport zu hydrophil ist. Im Anschluss an den Transport der DHA wird nach Oxidation die Ascorbinsäure in 10-facher Konzentration im Vergleich zum Blut im Gehirn angereichert. Dabei zeigt die Dehydroascorbinsäure noch geringere strukturelle Übereinstimmungen mit dem natürlichen Substrat D-Glucose als der Metabolit M1, womit ein Übertritt des Metaboliten durch den GLUT-1-Transporter zusätzlich begründet werden kann.

Ergänzend zum GLUT-1-Transporter, wurde auch ein gehirnspezifischer Glucose-Transporter (bGT) entdeckt [376]. Es ist jedoch unklar, ob dieser auch in den murinen cEND-Zellen exprimiert wird und ob eine Hemmung dessen durch Phloretin und/oder Glucose möglich ist.

Es verwundert, dass der Metabolit M1 in den vorliegenden Untersuchungen zwar schnell und in großer Menge in die Zellen aufgenommen wurde, diese aber scheinbar nicht mehr verlassen und somit auch nicht ins Gehirnkompartment übertreten konnte, obwohl auch auf der dem Gehirn zugewandten Seite der BHS entsprechende Transporter exprimiert werden.

Ein Grund dafür könnte eine nicht ausreichend geringe Nachweisgrenze der Methode gewesen sein, wobei diese mit 50 ng/mL nahe am physiologisch nachweisbaren Bereich lag. Eine weitere Erklärung liefert der Blick auf die Stabilitätsdaten (Experimenteller Teil C, Kap. 2.8.1.4). Während die höher konzentrierte Lösung über den gesamten Versuchszeitraum als stabil angesehen werden konnte, mit minimalen Verlusten von 16,5 %, nahm die Konzentration in der 100 ng/mL-Lösung über die Zeit um ca. 50 % der Ausgangsmenge ab. Damit ist durchaus möglich, dass durch die BHS minimal permeierte Mengen nicht nachgewiesen werden konnten, da sie sich vorher zersetzten. Bei Einsatz höher konzentrierter Testlösungen hätte man eventuell Übertritte messen können, sich damit aber von physiologisch erreichbaren Konzentrationen der Polyphenole weitgehend entfernt.

Wie bereits erwähnt, beschrieben Kurlbaum et al. erstmals eine Adduktbildung des M1 mit dem natürlich im Körper vorhandenen Glutathion in Erythrozyten [60]. Mülek et al. konnten diesen Fund in humanen Blutzellen bestätigen und mit Hilfe eines metabolomischen Ansatzes weitere M1-Metabolite identifizieren [63] (Einleitung A, Kap. 1.4). Es wäre denkbar, dass auch in den cEND-Zellen ein Addukt solcher Art gebildet wurde, so dass der M1 zwar in die Zellen gelangt ist, diese nach Adduktbildung aber nicht mehr verlassen konnte. Ein Nachweis dieses Adduktes wurde in diesem Fall nicht durchgeführt, könnte aber Bestandteil zukünftiger Untersuchungen sein.

Auch andere Phase-II-Metabolite wären innerhalb der Zellen vorstellbar, z.B. das Glucuronid. Heydel et al. zeigten, dass Riechkolbenepithelzellen von Ratten die UDP-Glucuronyltransferase 2A1 exprimieren [377]. Es wäre denkbar, dass auch dieser Phase-II-Metabolit nur erschwert die Endothelzellen der BHS auf Grund der Größe und Hydrophilie wieder verlässt, was eine Anreicherung des Adduktes als möglich erscheinen lässt. Um diese Theorie zu bestätigen, müsste man zunächst die Enzymausstattung in den von uns verwendeten Nagetierzellen bestätigen und dann im Inneren das glucuronidierte Produkt nachweisen. Auch Wahlstrom et al. wiesen eine Glucuronidierungsaktivität in verschiedenen Bereichen des Gehirns nach; bei dieser Forschergruppe unter Verwendung der Stoffe Morphin und Naloxon [378].

Im Gegensatz zu den Befunden von Faria et al., die einen zeitabhängigen Transport von (+)-Catechin durch den Monolayer ihres *in-vitro*-Modells detektierten [379], ließ sich in unserem Ansatz kein Übertritt von (+)-Catechin durch die simulierte BHS in das Gehirn-Kompartiment messen. Der Unterschied zwischen unseren Untersuchungen und denen von Faria et al. bestand darin, dass Faria et al. mit RBE4-Zellen einen anderen Typ Zellen verwendeten und mit einer Konzentration von 30 µmol/L (+)-Catechin deutlich über der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Konzentration von (+)-Catechin (5 µmol/L) arbeiteten. Ebenso wandte die Forschergruppe um Faria zur Detektion mit der LC-MS-Analytik eine deutlich sensitivere Methode an als die von uns verwendete HPLC-Methode mit UV-Detektion. Interessanterweise stellten sie zusätzlich eine Glucuronidierung von (+)-Catechin in diesen Zellen fest und bewiesen damit, dass Endothelzellen die Enzymausstattung besitzen, um Phase-II-Metabolite zu bilden. Wir haben bewusst diese niedrigeren Konzentrationen an (+)-Catechin gewählt, um möglichst nahe an die physiologisch erreichbaren Werte heranzukommen, auch wenn diese, je nach zugeführtem Nahrungs- und/oder Genussmittel, immer noch darunter liegen [290]. Gängige Praxis in *in-vitro*-Studien ist jedoch der Einsatz deutlich höherer Konzentrationen, wobei dann eine gewisse BHS-Gängigkeit diverser Polyphenole und Flavonoide, z.B. von Hesperidin und Naringenin, nachgewiesen wurde. Jedoch gibt diese exzessive Dosierung Anlass zur Kritik [380]. Auch wir verwendeten beim Metaboliten M1 deutlich höhere Konzentrationen, als *in-vivo* nach Einmal- bzw. Mehrfachgabe von Pycnogenol® im Plasma von Probanden erreicht werden können [58]. Da wir aber keinen Übertritt feststellten, verzerrt diese Konzentration nicht die Aussagekraft. Man kann daher recht gesichert davon ausgehen, dass wahrscheinlich physiologisch kein freier M1 durch die BHS permeiert. Tsang et al. konnten bei einem *in-vivo*-Versuch mit Ratten ebenso keinen Übertritt von Flavan-3-olen, speziell (+)-Catechin und (-)-Epicatechin, ins Gehirn feststellen [381]. Das müsste ein Beweis dafür sein, dass unsere, näher an der Realität, gewählten Konzentrationen die Situation *in vivo* besser simulierten, als die Versuchsbedingungen bei Faria et al. [379]. Ähnlich unseren Untersuchungen, stellten Zini et al. bei der Untersuchung der Flavan-3-ole aus grünem Tee keinen Übertritt der Substanzen durch die BHS fest [382].

Neben der Diskussion über die einsetzbaren Konzentrationen in Versuchen zur Ermittlung der BHS-Gängigkeit von Polyphenolen, rücken Schaffer et al. die Frage in den Mittelpunkt, ob es bei allen Überlegungen überhaupt wichtig ist, ob diese Stoffe in ausreichenden Mengen in das Gehirn übertreten können, oder ob diese auch über andere Wege Vorgänge im ZNS beeinflussen können [383]. Studien mit Nagetieren haben gezeigt, dass die Konzentration an Ascorbinsäure, im Vergleich zu den Konzentrationen, die Polyphenole erreichen können, 3000-4000-fach höher im Gehirn ist [383, 384]. Hierfür wurde eine Gehirnperfusion durchgeführt, nach Tötung die Gehirne der Ratten entnommen und die Konzentrationen diverser Marker im Gehirnhomogenisat bestimmt [384]. Dabei wurde für (+)-Catechin z.B. eine Konzentration von 0,5 nmol/g Gewebe und im Vergleich dazu eine Konzentration von ca. 1500 nmol/g Gewebe an Ascorbinsäure gemessen. Hierbei muss beachtet werden, dass die Ascorbinsäurekonzentrationen in Nagetier-Gehirnen in der Regel deutlich höher sind als beim Menschen (ca. 600-900 nmol/g Gewebe), was einmal daran liegt, dass eine höhere Neuronendichte vorhanden ist, welche dann mehr Vitamin C pro Flächeneinheit gespeichert haben. Hinzu kommt, dass Nagetiere, im Gegensatz zum Menschen, dazu fähig sind, Vitamin C selbst zu synthetisieren [383]. Trotz der höheren antioxidativen Kapazität der Polyphenole kann deshalb davon ausgegangen werden, dass der direkte Radikalfänger-Effekt eher eine untergeordnete Rolle im ZNS spielt. Diese Versuche haben aber auch gezeigt, dass einige Polyphenole in der Lage sind, in die Endothelzellen aufgenommen zu werden. Somit stellt sich die Frage, ob und wenn ja, was sie dort bewirken können. Zusätzlich müsste man untersuchen, ob die Substanzen selbst oder ihre Metabolite absorbiert werden und welcher Inhaltsstoff bzw. Metabolit der Wirksamste ist. Dabei muss man beachten, dass durch Metabolisierung nicht nur eine Inaktivierung, sondern auch eine Verstärkung der Bioaktivität erreicht werden kann [290]. Hinweise auf mögliche Wirkungen liefern Untersuchungen mit dem standardisierten Kiefernrintenextrakt Pycnogenol®.

Virgili et al. beobachteten, dass Pycnogenol® in *in-vitro*-Untersuchungen einer Co-Kultur von RAW 264.7-Makrophagen mit ECV 302 Endothelzellen das antioxidativ wirksame α -Tocopherol vor der Zerstörung durch die von den Makrophagen

produzierten reaktiven Stickstoffspezies schützen kann [385]. Da das α -Tocopherol ein essentieller Bestandteil des antioxidativen Netzwerkes der Zellen ist, könnte Pycnogenol[®] durch Verhinderung des Abbaus indirekt eine wichtige Rolle zum Schutz des Endothels vor oxidativem Stress spielen. Jedoch haben, wie bereits beschrieben, *in-vitro*-Versuche mit dem Gesamtextrakt nur eine geringe Relevanz. Für Anthocyane aus der Holunderbeere wurde eine Aufnahme in die Endothelzellen der BHS, sowie ein protektiver Effekt eben dieser gegen oxidativen Stress, beobachtet [386]. Mitglieder dieser Forschergruppe entdeckten auch die Reduzierung der Verwundbarkeit des Endothels durch oxidative und inflammatorische Insulte nach Inkubation mit Anthocyanen aus der Heidelbeere und der Cranberry [387]. Diese gefundenen antioxidativen Effekte sind durchaus auch für Bestandteile bzw. Metabolite von Pycnogenol[®] denkbar, da der M1 ja z.B. offenbar in die Endothelzellen aufgenommen wird.

Der standardisierte *Gingko biloba*-Extrakt EGb761[®] wird schon lange zur Behandlung neurologischer Erkrankungen eingesetzt, auch wenn der wirksame Bestandteil und der Wirkungsmechanismus nicht bekannt sind. Fehske et al. fanden heraus, dass der Extrakt, unter dauerhafter Einnahme, den Noradrenalin (NA)-Uptake in die Präsynapse hemmt und somit die Konzentration von NA im synaptischen Spalt steigert, jedoch keinen Einfluss auf die Monoaminoxidase (MAO)-Aktivität hat [388]. Ein Einfluss auf die Neurotransmitter-Zusammensetzung im ZNS könnte also ebenso zur komplexen Wirkung von Pycnogenol[®] beitragen.

Es konnte im Rahmen der vorliegenden Untersuchungen das erste Mal gezeigt werden, dass der Metabolit M1 nicht direkt durch die BHS permeiert, allerdings in großem Ausmaß in die Endothelzellen dieser Barriere aufgenommen wird. Ob dieser seine antioxidativen Wirkungen auch auf diese Zellen ausüben kann und ob eine Übertragung der vorliegenden *in-vitro*-Bedingungen auf die Anwendung am Menschen möglich ist, muss jedoch überprüft werden, da dafür ausreichend große Mengen des M1 im Plasma bzw. des Vorläufermoleküls (+)-Catechin im Darm benötigt würden, die so nicht erreicht werden. Allerdings könnte diese Menge durch Anreicherung des Stoffes in der BHS nach dauerhafter Einnahme durchaus resultieren [368]. Um eine bessere Aussage darüber treffen zu können, wären Gehirnperfusionstudien an Nagetieren mit physiologischen Konzentrationen der

Einzelstoffe vonnöten. Solche Modelle sind der Goldstandard zur Simulation der Verhältnisse an der BHS, da *in-vivo*-Versuche am Menschen, wie bereits erwähnt, ethisch nicht immer vertretbar sind (Allgemeiner Teil B, Kap. 2.3). An solchen Tiermodellen wäre auch eine Applikation des Rindenextraktes in seiner ursprünglichen Form möglich, so dass Aufnahme- und Metabolisierungsvorgänge mit in Betracht gezogen werden könnten.

Ferruzzi et al. zeigten im Rahmen ihrer Versuche mit Ratten, dass die Mehrfachapplikation eines Traubenkernextraktes höhere Bioverfügbarkeiten der monomeren Inhaltsstoffe, v.a. Catechin und Epicatechin, im Vergleich zur Einmalgabe der gleichen Menge des Extraktes, liefert [389]. Die Fläche unter der Kurve (area under the curve (AUC)) für Catechin erhöhte sich um 253 % nach 10-tägiger Gabe, im Vergleich zur Einmalgabe von 150 mg des Extraktes. Für Epicatechin ergab sich gar eine 282 %ige Steigerung der AUC. Die Forscher konnten zudem eine Akkumulation der Stoffe Catechin und Epicatechin im Gehirn der Tiere nach Mehrfachgabe des Traubenkernextraktes zeigen. Nach Einmalgabe waren diese beiden Stoffe noch nicht nachweisbar, nach 10 Tagen waren die Mengen im Gehirn detektierbar und quantifizierbar. Eine solche Akkumulation der Inhaltsstoffe im Gehirngewebe wäre somit auch für den Kiefernextrakt denkbar, so dass man quantifizierbare Mengen der Einzelstoffe eventuell nach mehreren Tagen Verabreichung entdecken könnte. Gehirnperfusionsstudien an Tieren würden darüber Aufschluss geben. Mit den vorliegenden *in-vitro*-Versuchen wären solche Mehrfachgaben nur schwer zu realisieren.

Weiteren Raum für Spekulationen lässt die Effektivität und Wirksamkeit des Rindenextraktes zur Prävention und Therapie von chronischen Erkrankungen. Unter Morbus Alzheimer-Patienten ist z.B. die GLUT-1-Expression im ZNS verringert, wodurch eine Anreicherung des M1 möglicherweise erschwert würde [390]. Hier wäre der Einsatz von Pycnogenol[®] aber zur Prävention denkbar. Eine weitere neurologische Indikation für Pycnogenol[®] könnte das Aufmerksamkeits-Defizit-Hyperaktivitäts-Syndrom (ADHS) darstellen. Diese Krankheit ist eine der am häufigsten vorkommenden neurologischen Störungen im Schulkindalter, aber auch bei erwachsenen Menschen wird sie immer häufiger diagnostiziert, jedoch

noch viel zu selten behandelt. Experten gehen davon aus, dass ein Ungleichgewicht im dopaminergen und noradrenergen System für diese Erkrankung verantwortlich ist, die mit Hyperaktivität, Schlafstörungen, Unaufmerksamkeit und geistiger Unterentwicklung einhergehen kann. Zunächst existierten zur Anwendung von Pycnogenol® bei ADHS nur Einzelfallberichte von Ärzten [391]. Heimann berichtete von einer signifikanten Verbesserung der ADHS-Symptomatik eines 10-jährigen Jungen nach Pycnogenol®-Einnahme und von einem Rückfall zwei Wochen nach Absetzen des Rindenextraktes. Da Einzelfallberichte jedoch nicht aussagekräftig sind, wurden in der Folge zwei randomisiert-kontrollierte Studien durchgeführt, die die Wirksamkeit und Unbedenklichkeit von Pycnogenol® bei ADHS untersuchten [392, 393]. Tenenbaum et al. verglichen die Wirkung des Rindenextraktes mit derjenigen von Methylphenidat, dem Standardmedikament zur Behandlung von ADHS im Kindes- und Erwachsenenalter, und Placebo bei 24 Erwachsenen [392]. Die Forschergruppe konnte zwar eine Tendenz zur Senkung der Symptomatik unter Pycnogenol®- und Methylphenidat-Einnahme zeigen, jedoch erreichten die Ergebnisse keine statistische Signifikanz. Laut Autoren waren die zu geringe Teilnehmerzahl und die zu niedrige Dosierung ausschlaggebend für die Nicht-Signifikanz der Ergebnisse.

In Folge dessen führten Trebatická et al. eine randomisierte, doppelblinde und placebo-kontrollierte Studie zur Therapie von ADHS mit Pycnogenol® durch [393]. Dabei wurden 61 Kinder untersucht, 44 nahmen den Rindenextrakt in einer Dosierung von 1 mg/kg Körpergewicht pro Tag ein und 17 Kinder dienten als Placebo-Kontrolle. In der Verumgruppe zeigte sich eine signifikante Reduktion von Scores zur Aufmerksamkeits- und Hyperaktivitätsbeurteilung, die von Lehrern und Eltern ermittelt wurden. Eine Senkung dieser Scores bedeutete dabei eine Symptomverbesserung. Einen Monat nach Stopp der Pycnogenol®-Einnahme zeigte sich eine deutliche Symptomverschlimmerung. Der Mechanismus der Wirkung des Rindenextraktes bei ADHS ist zwar unklar; Trebatická et al. diskutieren unter anderem einen Effekt der Inhaltsstoffe auf Katecholamine; allerdings scheint Pycnogenol®, vergleichbar mit Methylphenidat, nur eine Wirkung auf die Symptome der Erkrankung zu haben und nicht ursächlich in das

Krankheitsgeschehen einzugreifen, da in allen bisher durchgeführten Untersuchungen nach Absetzen der Medikation ein schneller Rückfall in den Ursprungszustand vonstatten ging. Auf Grund des guten Nebenwirkungsprofils von Pycnogenol[®], im Vergleich zur Standardtherapie von ADHS mit Methylphenidat bzw. Atomoxetin, stellt diese Indikation eine verträgliche Alternative dar und könnte zumindest als Zusatzoption empfohlen werden.

Als weiteres Anwendungsgebiet von Pycnogenol[®] wurden von mehreren Forschergruppen kognitive Symptome im Rahmen von peri- und/oder postmenopausale Beschwerden untersucht [394, 395]. Da in den letzten Jahrzehnten auf Grund starker Nebenwirkungen, wie z.B. thromboembolischer Ereignisse, immer mehr von der Hormonersatztherapie abgesehen wurde, haben Forscher den Fokus stärker auf nebenwirkungsärmere Alternativen gerichtet. Errichi et al. zeigten statistisch signifikante Verbesserungen der Wechseljahrsbeschwerden Müdigkeit, Schlafstörungen, Konzentrations- und Gedächtnisschwäche, Schwindel, Depression und Reizbarkeit [394]. Yang et al. konnten diese Ergebnisse an einem Kollektiv von 155 perimenopausalen, taiwanesischen Frauen bestätigen [395]. Sie zeigten anhand eines standardisierten Fragebogens, dem Women's Health Questionnaire (WHQ), eine deutliche Verbesserung der Häufigkeit und Intensität der klimakterischen Beschwerden nach sechsmonatiger Einnahme von zwei Mal 100 mg Pycnogenol[®] pro Tag. Die Autoren machen einen kombinierten Effekt aus Stimulation der endothelialen Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase (eNOS) und der neuronalen NO-Synthase (nNOS) für die positiven neurologischen Effekte des Rindenextraktes verantwortlich. Nach ihrer Meinung soll NO die zerebrale Mikrozirkulation verbessern und somit die kognitive Leistungsfähigkeit erhöhen. Eine Verbesserung der Gedächtnisleistung durch Pycnogenol[®] konnten auch Ryan et al. an einem Kollektiv von 101 Probanden zwischen 60 und 85 Jahren zeigen [318].

Für alle beschriebenen Effekte von Pycnogenol[®] auf neurologische Funktionen ist es wichtig zu wissen, ob und in welcher Form Inhaltsstoffe des Extraktes die BHS passieren bzw. ob sie auf andere Art und Weise Effekte auf das ZNS ausüben können. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit demonstrierten das erste Mal, dass der Metabolit M1 in großen Mengen in die Zellen der BHS aufgenommen

werden kann, um dort seine in *in-vitro*-Versuchen ermittelten, u.a. antioxidativen, Effekte zu entfalten. Wie stark diese Wirkungen *in vivo* sind, müssen weitere Untersuchungen im Rahmen von groß angelegten randomisiert, placebo-kontrollierten Studien offenbaren. Daraus wäre dann eventuell eine klinische Relevanz ableitbar, die die Anwendung von Pycnogenol® bei chronischen neurologischen Störungen begründen könnte.

1 Pharmakodynamische Effekte eines standardisierten Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol[®]) bei Osteoarthritis

1.1 Reagenzien und Chemikalien

1.1.1 Verwendete Reagenzien und Chemikalien in der Zellkultur

- Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Sigma Aldrich, Taufkirchen
- Iscove's Modified Dulbecco's Medium (IMDM), Sigma Aldrich
- Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM), Biochrom AG, Berlin
- Fungizone[®] Antimykotikum, Life Technologies, Darmstadt
- Typ-II-Collagenase, Life Technologies
- Rekombinantes humanes Interleukin-1 β , Life Technologies
- Trypsin/EDTA-Lösung 0,25 %/0,02 %, Biochrom AG und Sigma Aldrich
- Penicillin/Streptomycin, 10000 I.E./mL, Biochrom AG und Sigma Aldrich
- L-Glutamin (200 mmol/L), Biochrom AG
- Fötale Bovines Serum, Biochrom AG
- Trypanblau-Lösung 0,5 % (m/V), Biochrom AG
- DMSO für die Zellkultur, Carl Roth GmbH, Karlsruhe
- Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide, Sigma Aldrich
- Isopropanol p.a., Chemikalienausgabe, Universität Würzburg
- 0,5 mol/L Salzsäure, Grüssing GmbH, Filsum
- Chondroitinsulfat vom Haifischknorpel, Sigma Aldrich
- Dimethylmethylenblau (DMMB), Sigma Aldrich
- Papain von *Papaya latex*, Sigma Aldrich
- Hyaluronidase aus bovinen Hoden, Sigma Aldrich
- Iodessigsäure, Sigma Aldrich

1.1.2 Spezielle Reagenzien und Chemikalien zur Durchführung von ELISAs

- Humanes Leptin ELISA-Kit, IBL International, Hamburg

- Humanes MMP13 ELISA-Kit, RayBiotech, Norcross, GA, USA
- Humanes MMP1 ELISA-Kit, RayBiotech
- Humanes A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs 5 (ADAMTS-5) ELISA-Kit, Cusabio, Wuhan, China
- Humanes lösliches CD163 (sCD163) ELISA-Kit, Cusabio
- Humanes ADAMTS-4 ELISA-Kit, Novateinbio, Woburn, MA, USA
- Humanes C-Telopeptid von Typ-II-Collagen (CTX-II) ELISA-Kit, Novateinbio
- Humanes Typ-II-Collagen Helical Peptid (Helix-II) ELISA-Kit, Novateinbio
- Humanes MMP3 CytoSet™, Invitrogen Corporation, Frederick, USA
- Antibody Pair Buffer-Kit, Invitrogen

1.1.3 Reagenzien und Chemikalien für RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und quantitative real-time PCR

- High Pure RNA Isolation Kit, Roche Diagnostics, Mannheim
- Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit, Roche Diagnostics
- RNase Away-Lösung, Sigma Aldrich
- RNAlater®-Lösung, Qiagen, Hilden
- qPCR-Wasser
- iTaq™-Universal SYBR®Green-Supermix, Bio-Rad Laboratories GmbH, München
- Individuell entworfene Primer, Menge je 0,01 µmol, Eurofins MWG GmbH, Ebersberg

1.2 Geräte und Materialien

1.2.1 Verwendete Geräte und Materialien in der Zellkultur

- Sterile Einmalskalpelle (No.21), Hartenstein, Würzburg
- Petrischalen 92 x 16 mm mit Nocken, Sarstedt AG, Nümbrecht
- Autoklavierte, gebogene Pinzette, Hartenstein
- Autoklaviertes Metallsieb, VWR, Darmstadt
- Zellsieb 70 µm BD Falcon™, BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
- Sterile 50 mL BD-Röhrchen, Sarstedt

- Serologische 10 mL-Pipetten mit Filter, Sarstedt
- Serologische 25 mL-Pipetten mit Filter, Sarstedt
- Multiwell-Platte mit Deckel und ohne Einsätze (12-well, steril), mit Typ-IV-Collagen beschichtet, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- Multiwell-Platte mit Deckel und ohne Einsätze (24-well, steril) mit Typ-IV-Collagen beschichtet, Greiner Bio-One
- Nunc™ 96-well Polypropylen Microwell-Platte, Thermo Scientific
- Minisart® 0,2 µm-Sterilfilter, Sartorius, Göttingen
- Injekt 20 mL-Einwegspritzen, Braun AG, Melsungen
- Megafuge 1.0 R, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
- Eppendorf Centrifuge 5702, Eppendorf AG, Hamburg
- Microfuge 22R Centrifuge, Beckman Coulter GmbH, Krefeld
- C-Chip Einwegzählkammer für alle Zelltypen, Biochrom AG
- HeraSafeKS Safety Cabinet, Thermo Scientific
- HeraCell 240i, CO₂-Inkubator, Thermo Scientific
- HeraCell, CO₂-Inkubator, Heraeus, Hanau
- Vortex Reax 1, Typ 54111, Heidolph, Schwabach
- Nikon Eclipse TS 100 Mikroskop, Nikon, Japan
- Kern ABJ-220-4M Feinwaage, Kern & Sohn, Balingen
- Unimax 1010, Schüttler, Heidolph
- Ultraschallbad USR 30; Merck eurolab, Darmstadt
- UV-Meter UV-mini-1240, Shimadzu, Duisburg
- Einwegküvetten für UV-Meter, Sarstedt
- Feinwaage Mettler Toledo AB204-S/PH, Mettler-Toledo GmbH, Gießen
- Zellkulturflasche mit Filterkappe, Volumen 260 mL, Kulturfläche 75 cm², Hartenstein
- Mr. Frosty™ Freezing Container, Thermo Scientific

1.2.2 Spezielle Geräte und Materialien für die Durchführung von ELISAs

- Microplatte, 96 well, PS, F-Boden, High Binding, glasklar, Greiner Bio-One

- Abdeckfolie, EasySeal, transparent, 80 x 140 mm, Greiner Bio-One
- 96 Multiply[®] PCR-Platte natur, Sarstedt
- Plattenlesegerät Multiscan Ascent, Thermo Scientific
- Ascent Software, Version 2.6, Thermo Scientific
- Eppendorf Research[®] 8-Kanal-Pipette mit 10-100 µL Pipettiervolumen, Eppendorf AG

1.2.3 Geräte und Materialien für die RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und qPCR

- 8er Deckel-Kette, optisch klar mit flachem Deckel, Sarstedt
- Eppendorf Centrifuge 5415R, Eppendorf AG
- Thermomixer compact, Eppendorf AG
- Stratagene Mx3005P qPCR System, Agilent Technologies, Waldbronn
- MxPro-Software, Version 4.10, Agilent Technologies
- Infinite[®] 200 PRO NanoQuant, TECAN Group Ltd., Männedorf, Schweiz
- i-control[™] Microplate Plate Reader-Software, Version 1.10, TECAN Group Ltd.
- Biosphere Filter Tip 20 µL, 100 µL und 1000 µL, Sarstedt

1.3 Häufig verwendete Lösungen

- **Antimykotische Fungizone[®]-Lösung:**

Tabelle 7: Zusammensetzung der antimykotisch wirksamen Fungizone[®]-Lösung.

Inhaltsstoff	Molekulargewicht [g/mol]	Konzentration [µmol/L]
Amphotericin B	924,08	0,3
Natriumdesoxycholat	414,57	0,5

Mit destilliertem Wasser wurde die Lösung zu 50,0 mL ergänzt. Die Lagerung erfolgte bei – 20 °C.

- **Antimikrobielle Lösung zur Zwischenlagerung der Knorpelstücke:**

Tabelle 8: Zusammensetzung der antimikrobiell wirksamen Aufbewahrungslösung für die Knorpelstücke nach Abtrennung vom Knochen.

Inhaltsstoff	Ausgangskonzentration	Eingesetztes Volumen [mL]
Fungizone®-Lösung	siehe Tabelle 7	5
L-Glutamin	200 mM	5
Penicillin/Streptomycin	10000 I.E./mL	5

Mit PBS wurde der Ansatz zu 100,0 mL ergänzt. Davon wurden 25 mL-Aliquots für den späteren Gebrauch bei – 20 °C gelagert.

- **Typ-II-Collagenase-Lösung für den Knorpelverdau:**

Tabelle 9: Zusammensetzung der Typ-II-Collagenaselösung für den Knorpelverdau über Nacht.

Inhaltsstoff	Aktivität	eingesetzte Masse [mg]
Typ-II-Collagenase (Pulverform)	> 125 U/mg	120

Die bei 4 °C gelagerte Typ-II-Collagenase in Pulverform wurde auf der Kern ABJ-220-4M-Feinwaage in eine 50 mL-Einmalröhre eingewogen. Das Pulver wurde in 40 mL IMDM ohne Serum gelöst und nach Aufziehen in eine 20 mL-Einwegspritze und Filtration durch einen 0,2 µm-Sterilfilter in zwei 20 mL-Aliquots aufgeteilt. Diese Lösung wurde jeweils am Tag der Verwendung frisch hergestellt und komplett aufgebraucht. Die eingesetzte Konzentration von 0,3 % [m/V] Typ-II-Collagenase liegt im empfohlenen Bereich des Herstellers (0,1 % [m/V] bis 0,5 % [m/V], Life technologies).

1.4 Zellkulturmedien

Als Standardmedium, für die Lagerung der bei der Kniegelenkersatzoperation entfernten Stücke, wurde „Dulbecco’s modified essential medium“ (DMEM) nach Standardrezeptur mit 3,7 g/L NaHCO₃, 4,5 g/L D-Glucose, ohne Natriumpyruvat und mit stabilem Glutamin verwendet.

Zur Versorgung der isolierten Chondrozyten und der Zelllinie TC28 in Kultur wurde „Iscove’s modified Dulbecco’s medium“ (IMDM) nach Standardrezeptur mit folgenden Zellkulturzusätzen verwendet:

- 10 % Fötale Bovines Serum
- 1 % L-Glutamin (2 mmol/L)
- 1 % Penicillin/Streptomycin (100 I.E./ mL)

Die Medien wurden bei 4 °C gelagert und spätestens vier Wochen nach Anbruch aufgebraucht oder verworfen.

1.5 Randomisiert-kontrollierte Studie zur Ermittlung der pharmakodynamischen Effekte von Pycnogenol® bei Patienten mit schwerer Knie-Osteoarthritis

In Kooperation mit dem König-Ludwig-Haus in Würzburg wurde unter Leitung von Dr. med. L. Seefried und den Studienschwestern Frau Baumann und Frau Hellwich eine unverblindete, randomisiert-kontrollierte Studie durchgeführt. Dafür wurden 30 Probanden mit schwerer Knie-Osteoarthritis und Indikation zum Kniegelenkersatz (Grad III-IV nach Kellgren und Lawrence [396]) rekrutiert, die 1:1-randomisiert zu einer Interventions- oder einer Kontrollgruppe zugeteilt wurden (jeweils 15 Probanden pro Gruppe). Im Rahmen der Randomisierung wurden die Patienten zur Einhaltung einer flavonoidfreien Diät während gewissen Zeitpunkten im Studienverlauf angehalten. Ihnen wurde ein Fragebogen mitgegeben, mit dessen Hilfe die Patienten die Lebensmittel und Getränke erfassen konnten, die am Tag vor und am Tag der jeweiligen Blutentnahme konsumiert wurden. Der Grund hierfür war, dass die meisten Nahrungs- und Genussmittel (Tabelle 10) größere Mengen Ferula- und Kaffeesäure enthalten. Ein weiterer Inhaltsstoff vieler Obstsorten und Genussmittel, v.a. von grünem Tee und Schokolade, ist (+)-Catechin. Diese genannten Bestandteile sind auch in der Studienmedikation, dem standardisierten Kiefernrintenextrakt Pycnogenol®, enthalten, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht wurde. Die Erfassung der Verstöße gegen die Lebensmittelliste konnte daher dabei helfen, die erhaltenen Ergebnisse in Hinblick auf Verzerrung durch Nichtbefolgung der Ernährungshinweise zu bewerten.

Die Listen mit Art, Zeitpunkt und Menge der verzehrten Lebensmittel wurden vor der Operation bei den Studienschwestern hinterlegt.

Tabelle 10: Auszug aus der Liste vom Patienten zu vermeidender Nahrungs- und Genussmittel während der Studienteilnahme.

Gemüse	Obst	Genussmittel
Möhre	Apfel	Rotwein
Sellerie (Knolle)	Birne	Grüner Tee
Rotkohl	Kirsche	Schwarzer Tee
Spinat	Pflaume	Früchtetee
Broccoli	Aprikose	Kräutertee
Tomate	Mango	Schokolade
Aubergine	Orange	Kakao
Schwarzwurzel	Grapefruit	Kaffee-Produkte
Rhabarber	Erdbeere	
Wirsing	Heidelbeere	
Endivie	Johannisbeere	
Feldsalat	Brombeere	
Kopfsalat	Himbeere	
Rote Rübe	Stachelbeere	
Blumenkohl	Pfirsich	

Zwei Tage nach Randomisierung wurden dem Patienten dann 4 x 5 mL Blut in BD-Röhrchen (BD Vacutainer SST II Advance mit Trenngel, 13 mm x 100 mm, Firma BD, Heidelberg) entnommen (*Visite 1*), welche durch Zentrifugation eine Trennung des Vollblutes in Zellanteil und Serum ermöglichten. Die durch eine Gelschicht abgetrennten Serumüberstände wurden abgenommen und in Aliquots bei – 80 °C eingefroren. Die Zellen wurden ebenso bei – 80 °C gelagert.

Im Anschluss erfolgte in der Interventionsgruppe eine Einnahme von 200 mg Pycnogenol®, aufgeteilt auf zwei Gaben von jeweils 100 mg morgens (zwei Kapseln zu je 50 mg) und abends, über einen Zeitraum von mindestens drei Wochen. Die Kontrollgruppe erhielt keine Medikation.

Nach diesen drei Wochen wurden die Probanden in das Klinikum aufgenommen und ihnen wurden erneut 4 x 5 mL Blut entnommen (*Visite 2*). Der Zeitpunkt der letzten Pycnogenol®-Einnahme vor Blutentnahme wurde dokumentiert, um die Pharmakokinetik der Bestandteile des standardisierten Kiefernrintenextraktes besser interpretieren zu können [62].

Am nächsten Tag fand die Kniegelenksersatz-Operation statt. Dabei wurden erneut 4 x 5 mL Blut entnommen (*Visite 3*), möglichst viel Synovialflüssigkeit via Spritze aus dem Kniegelenk gezogen und das Kniegelenk im Austausch gegen eine Endoprothese entfernt. Die Synovialflüssigkeit wurde mit 2770 g bei RT für 5 min zentrifugiert und der Überstand mit flüssigem Stickstoff in Aliquots eingefroren. Die Lagerung bis zur Verwendung erfolgte bei – 80 °C.

Das humane Gelenk wurde direkt im Anschluss weiterverarbeitet (Experimenteller Teil C, Kap.1.6).

Bei Patient #120 konnte keine Gelenkflüssigkeit gewonnen werden. Patient #111 wurde auf Grund schwerwiegender gesundheitlicher Probleme nicht operiert, in der Folge aus der Studie ausgeschlossen und durch #131 ersetzt. Bei den Patienten #123 und #125 wurde im Laufe der Operation die Probenentnahme vergessen. Die beiden Probanden wurden ebenfalls aus der Studie ausgeschlossen und durch die Patienten #132 und #133 ersetzt.

1.6 Isolierung von primären Chondrozyten aus humanem Kniegelenkknorpel

Die bei der Kniegelenksersatz-Operation entfernten Stücke wurden in einem sterilen Plastikbeutel verpackt, auf Eis transportiert und innerhalb von zwei Stunden verarbeitet. Das folgende Vorgehen entspricht mehrfach beschriebenen Standardprozeduren des Knorpelverdaus [72], mit größeren Abwandlungen auf Grund der durchgeführten Folgeuntersuchungen.

Während der Verarbeitung wurden die Knie-Stücke, in vorher auf 37 °C erwärmtem DMEM ohne Serum, in einem autoklavierten 1 L-Becherglas gelagert. Geschnitten wurden die Gelenk-Stücke mit einem sterilen Einmalskalpell der Einheitsgröße Nr. 21 in einer sterilen Petrischale, die mit einem Bodensatz antimikrobieller Lösung gefüllt wurde. Dafür wurden die Stücke einzeln aus dem

Becherglas entnommen und mit einer gebogenen, autoklavierten Pinzette fixiert. Nach dem Entfernen der Knorpelstücke vom Knochen wurde dieses Material auf zwei weitere Petrischalen verteilt, die mit jeweils ca. 10 mL steriler antimikrobieller Lösung gefüllt waren. Alle Knorpelstücke waren zu jedem Zeitpunkt mit Flüssigkeit benetzt, um ein Absterben der darin enthaltenen Chondrozyten zu vermeiden. Diese Prozedur wurde bei jedem Teil wiederholt, bis kein Knorpel mehr erkennbar war (Abbildung 56).

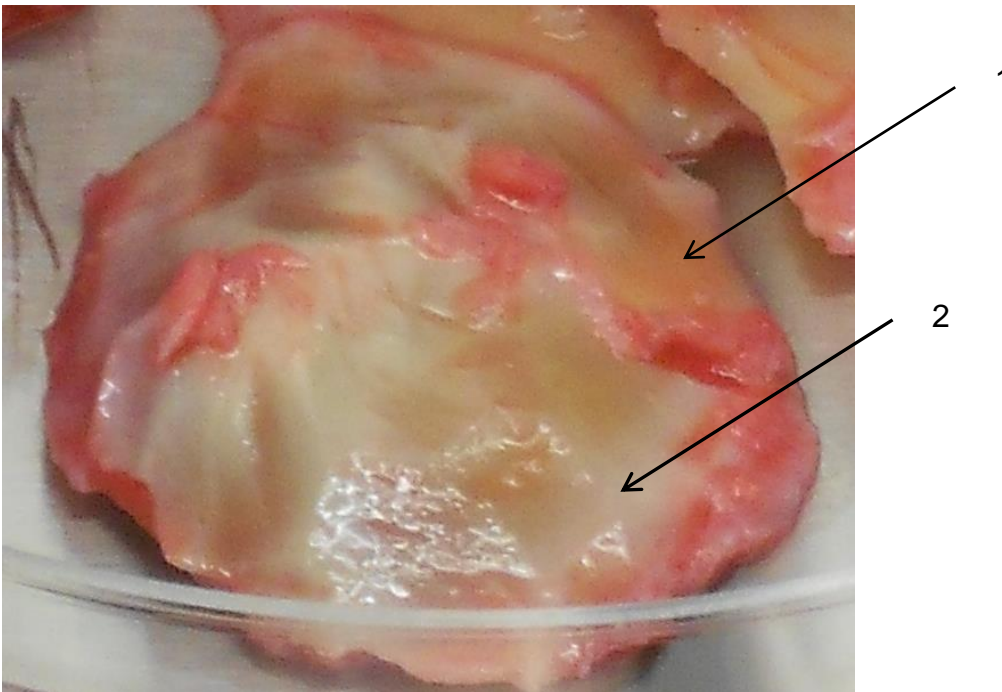


Abbildung 56: Kniestücke nachdem der Knorpel abgeschabt wurde. Die gelblichen Stellen zeigen den freiliegenden Knochen (1), die schwach weißlichen Stellen sind noch vorhandene Knorpelreste (2).

Durch Aufsetzen der Skalpell-Spitze auf die Oberfläche wurde die vollständige Entfernung überprüft. Wenn ein weiches Eindringen in das Explantat noch möglich war, wurde der verbliebene Knorpel durch Abschaben entfernt. Eine raue, harte Oberfläche war der Beweis für nur noch vorhandenen Knochen. Der Rest des humanen Materials wurde verworfen und die in der antimikrobiellen Flüssigkeit gelagerten Knorpelstücke 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden die größeren Stücke mit dem Skalpell in ca. 1-2 mm² große Teile zerkleinert, um den sich anschließenden Verdau zu beschleunigen. Die nun folgenden Schritte erfolgten separat für die jeweiligen Petrischalen.

Im Anschluss an die Inkubation wurde die Flüssigkeit mit einer sterilen 10 mL-Pipette abgesaugt und das Knorpelmaterial mit 20 mL PBS unter Schwenken der Petrischale gewaschen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Zu dem Ansatz wurde ein vorher bei 37 °C für 30 min erwärmtes 12 mL-Aliquot Trypsin/EDTA-Lösung der Konzentration 0,25 % [m/V] gegeben und die Knorpelstücke bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank für 30 min inkubiert. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit jeweils 20 mL PBS wurde der Ansatz mit 20 mL Typ-II-Collagenaselösung versetzt. Zum Verdau wurden die Knorpelstücke über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ auf einem Heidolph unimax 1010-Schüttler auf Stufe 3 (ca. 90 U/min) in ständiger Bewegung gehalten, um eine dauerhaft optimale Benetzung zu erzielen. Nach ca. 16 Stunden wurde der Verdau begutachtet. Wenn nur noch kleine Reste vorhanden waren, wurde mit der Aufreinigung der Zellen fortgefahren. Wenn der Verdau nicht ausreichend war, wurde die Inkubationszeit verlängert und der Ansatz eventuell mit zusätzlichen 10 mL Typ-II-Collagenaselösung versetzt.

Zur Aufreinigung der Chondrozyten wurde die Verdauung mit einer sterilen 10 mL-Pipette aus der Petrischale aufgesogen und durch Filtration der Lösung durch ein autoklaviertes Metallsieb in ein neues 50 mL-Tube die übriggebliebenen groben Gewebestücke entfernt. Zur Erzielung eines Zellpellets wurde der Ansatz bei RT und bei einer Geschwindigkeit von 1000 g 10 min in der Megafuge zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Zellpellet mit 10 mL PBS gewaschen. Es erfolgte eine erneute Zentrifugation bei vorher genannten Bedingungen. Dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Nach den beiden Waschstufen wurde das Zellpellet in 7,5 mL IMDM ohne Serum resuspendiert und durch ein 70 µm Zellsieb in ein neues 50 mL-Tube filtriert, um die Zellen von Verunreinigungen zu befreien. Von dieser Zellsuspension wurden 50 µL in ein 1,5 mL-Eppendorf-Cap überführt und mit Trypanblau-Lösung 1:1 verdünnt. Davon wurden 10 µL in eine Kammer des C-Chips überführt und die Zellen ausgezählt. Alle Chondrozyten in den vier großen Rechtecken der Kammer wurden, ohne Berücksichtigung der auf dem Rand liegenden Zellen, gezählt, die Werte im Anschluss addiert und die Gesamtmenge an Zellen durch vier geteilt. Auf Grund der 1:1-Verdünnung wurde diese Zahl mit zwei multipliziert. Das Ergebnis wurde

mit 10.000 als Volumen-Faktor multipliziert und diese Zahl entsprach der Zellzahl pro mL Zellsuspension (Formel 2).

Formel 2: Ermittlung der Zellzahl mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (C-Chip). A entspricht der Summe der vier großen Quadrate der Zählkammer.

$$\text{Zellzahl} = \frac{A}{4} * 2 * 10000$$

Es wurden dabei nur die weiß gefärbten, lebenden Zellen gezählt. Eine Blaufärbung zeigte, dass der Farbstoff in die Zellen eingedrungen war, was nur bei toten Zellen möglich ist. Um die Vitalität zu beurteilen, wurde die Anzahl toter Zellen mit der Anzahl lebender Zellen ins Verhältnis gesetzt. Nur Ansätze mit einem Anteil von > 95 % lebender Zellen wurden akzeptiert.

Von dieser Zellsuspension wurden vier Aliquots entsprechend ca. einer Mio. Zellen abgefüllt, nach Zentrifugation und Abgießen des Überstandes in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur RNA-Isolierung bei - 80 °C gelagert.

Je 0,25 mL der Suspension wurden zu jeweils 0,75 mL IMDM mit Serum in insgesamt 15 Reaktionsgefäße einer 24-Multiwell-Platte gegeben. Diese Platte wurde für die *ex-vivo*-Versuche mit humanem Serum verwendet (siehe Allgemeiner Teil B, Kap. 1.6).

Die Isolierung der Primärzellen aus dem Knorpel von Patient #101 war nicht erfolgreich. Auf Grund dessen fehlen die Ergebnisse zu diesem Probanden in Hinblick auf die Genexpressionsuntersuchung.

1.7 Genexpressionsanalysen mittels quantitativer real-time PCR zur Ermittlung der Pycnogenol[®]-Effekte auf Genebene

1.7.1 RNA-Isolation und cDNA-Synthese

Um ein geeignetes Templat für die spätere quantitative real-time PCR zu generieren, musste zunächst aus einem Aliquot von circa einer Million frisch isolierter Chondrozyten (Experimenteller Teil C, Kap. 1.6) der jeweiligen Probanden die totale RNA isoliert werden. Dafür wurde das High Pure RNA-Isolation Kit der Firma Roche Diagnostics unter Beachtung der Durchführungsempfehlungen des Herstellers verwendet. Darin enthalten war unter anderem ein Inkubationsschritt mit einer DNase. Die Konzentration und Reinheit der gewonnenen RNA wurde mittels Infinite[®] 200 PRO Nanoquant-Mikroplattenlesegerät der Firma TECAN Ltd. gemessen und mit der i-control[™]-Software in der Version 1.10 ausgewertet. Hierbei wurde die Absorption von 2 µL Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm sowie von 280 nm bestimmt und darüber die RNA-Konzentration berechnet. Diese Analyseart wird als „NanoDrop-Methode“ bezeichnet. Durch Bildung des Verhältnisses der optischen Dichten bei 260 nm und 280 nm konnte die Reinheit bestimmt werden. Lediglich RNA-Lösungen mit einem Verhältnis von 1,9 bis 2,1 wurden für weitere Schritte verwendet.

Je 1000 ng RNA dienten als Ausgangsmatrix für die cDNA-Synthese mittels Transcriptor First Strand cDNA Synthesis-Kit der Firma Roche Diagnostics. Bei zu geringer Konzentration der RNA-Lösung, aber ausreichender Reinheit, wurden alternativ 500 ng bzw. 250 ng RNA als Ausgangsmenge akzeptiert. Um den MIQE-Leitlinien zu entsprechen [192], wurden die genauen Konzentrationen und die Reinheit der RNA-Lösungen sowie die im Anschluss für die cDNA-Synthese verwendeten RNA-Mengen in einer Tabelle zusammengefasst (Tabellarischer Anhang D, Kap. 1.1). Zu jedem Ansatz wurde 1 µL der OligodT-Primerlösung gegeben und mit Wasser zu 13 µL ergänzt. Das weitere Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellers, das Endvolumen jedes Ansatzes betrug 20 µL. Auf Grund der Templat-Länge wurde eine Synthesezeit von 30 min bei einer

Temperatur von 55 °C gewählt. Für eine adäquate Temperatureinstellung wurde der Thermomixer compact von Eppendorf angewendet. Für jeden Probanden wurde parallel eine Probe ohne Zugabe der Reversen Transkriptase angesetzt (no RT-Kontrolle), um den Prozess auf genomische Verunreinigungen zu überprüfen. Stattdessen wurde der Ansatz mit weiteren 0,5 µL Wasser ergänzt. Die restliche Zusammensetzung entsprach den Vorgaben des Herstellers. Die Lagerung der synthetisierten cDNA und der no RT-Kontrollen erfolgte bei - 20 °C bis zur Vermessung.

1.7.2 Primer-Design

Die Wahl der richtigen Primer ist der wichtigste Einzelschritt, was die PCR-Phase betrifft [200]. Diese dürfen nur die Zielsequenz ablesen und sollten keine unerwarteten PCR-Produkte generieren. Ebenso ist ein Binden an sich selbst, sowie eine Primer-Dimer-Bildung zwischen Forward- und Reverse-Primer unerwünscht. Um adäquate Primer für die Housekeeping-Gene sowie für die Zielgene verwenden zu können, mussten diese zunächst entworfen werden.

Dafür benötigte man die Sequenz des Zielgens. Diese bekommt man aus diversen Datenquellen. In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die PubMed-Datenbank (National Center for Biotechnology Information, USA) verwendet. Über die Genidentifikationsnummer (GeneID) konnte dann die FASTA-Sequenz des interessierenden Gens ermittelt werden. Unter Festlegung wichtiger Parameter (Tabelle 11) wurden im Anschluss, mit Hilfe der PrimerBlast™-Software (NCBI, USA) und der vorliegenden FASTA-Sequenz, passende Primerpaare entworfen (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.2, Tabelle 2) [200].

Tabelle 11: Wichtige Einstellungen in der Software PrimerBLAST™.

Parameter	Einstellung
PCR-Produktgröße [bp]	70 - 200
Primer-Schmelz-Temperatur T_m [°C]	57 - 63
max. T_m -Differenz der Primer [°C]	3
Exon/Intron-Einstellung	Primer muss Exon-Exon-Spange überspannen
GC-Gehalt [%]	35 - 65
Größe [bp]	18 - 25

Weiterhin sollten innerhalb der Primer niemals vier gleiche Basen in Folge auftreten, an deren 3'-Ende mindestens ein bis zwei Guanin (G) oder Cytosin (C), aber nicht mehr als drei G oder C vorhanden sein.

Nach diesem Vorgang wurden die erhaltenen Primer mit dem Oligo Property Scan (MOPS, Eurofins MWG) überprüft [397]. Dabei wurden die generellen Eigenschaften analysiert und mit BLAST getestet, ob die abzulesende Sequenz auch nur einmal im Gen vorhanden war. Ebenso wurden die Primer auf Dimerbildung untersucht und ihre Verwendbarkeit für die PCR bewertet. Primer, die alle Vorgaben erfüllten, wurden in einer Menge von 0,01 μmol durch die Firma Eurofins MWG synthetisiert, mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 $\mu\text{mol/L}$ resuspendiert und bei - 20 °C gelagert (fertige Primer siehe Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.2, Tabelle 2).

1.7.3 Auswertung von qPCR-Daten

Alle in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Versuche wurden mit dem Thermocycler Mx3005P der Firma Agilent Technologies durchgeführt. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der MxPro-Software in der Version 6.0. Zur Detektion wurde der Farbstoff SYBR®Green verwendet, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und ein Fluoreszenzsignal proportional zur in der Probe enthaltenen DNA-Menge erzeugt (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.1). Zur Minimierung der Pipettierfehler durch weniger Pipettierschritte, fand der iTaq™ Universal SYBR®Green-Supremix der Firma Bio-Rad Anwendung. Der Farbstoff

absorbiert blaues Licht der Wellenlänge 494 nm und emittiert Licht der Wellenlänge 521 nm. Daher kann die Emission des Farbstoffs mit dem Filter für 6-Carboxyfluorescein (FAM) vermessen werden, da dieser Licht der Wellenlänge 517 nm detektieren kann und somit das Signal von SYBR[®]Green ebenso erfasst. Zur internen Normalisierung dienen die Fluoreszenzfarbstoffe Fluorescein und ROX, die im SYBR[®]Green-Master-Mix enthalten sind. Auf das Signal dieser Farbstoffe wurden alle mit dem FAM-Filter gemessenen Signale normalisiert, um Fluoreszenzfluktuationen zu minimieren, die nicht durch den PCR-Prozess selbst bedingt waren. Zum Vergleich der Ergebnisse verschiedener Versuche braucht man eine Zahl, die man in Relation mit anderen Proben setzen kann. Diese Maßzahl ist der sogenannte „cycle threshold“, auch C_t -Wert genannt. Dieser gibt den Zyklus an, während dessen das Fluoreszenzsignal der Probe eine festgelegte Fluoreszenzschwelle überschreitet. Diese Grenze ist beliebig festgelegt und liegt im linearen Bereich der Amplifikation der Probe. Um mehrere Versuche miteinander vergleichen zu können, muss diese Schwelle für ein Zielgen immer gleich bleiben. Man ermittelt den C_t -Wert durch Fällen eines Lots vom Schnittpunkt der Kurve mit der Schwellenwertgerade auf die x-Achse (Abbildung 57). Der Wert, der dann auf der x-Achse abgelesen werden kann, ist der C_t -Wert [398].

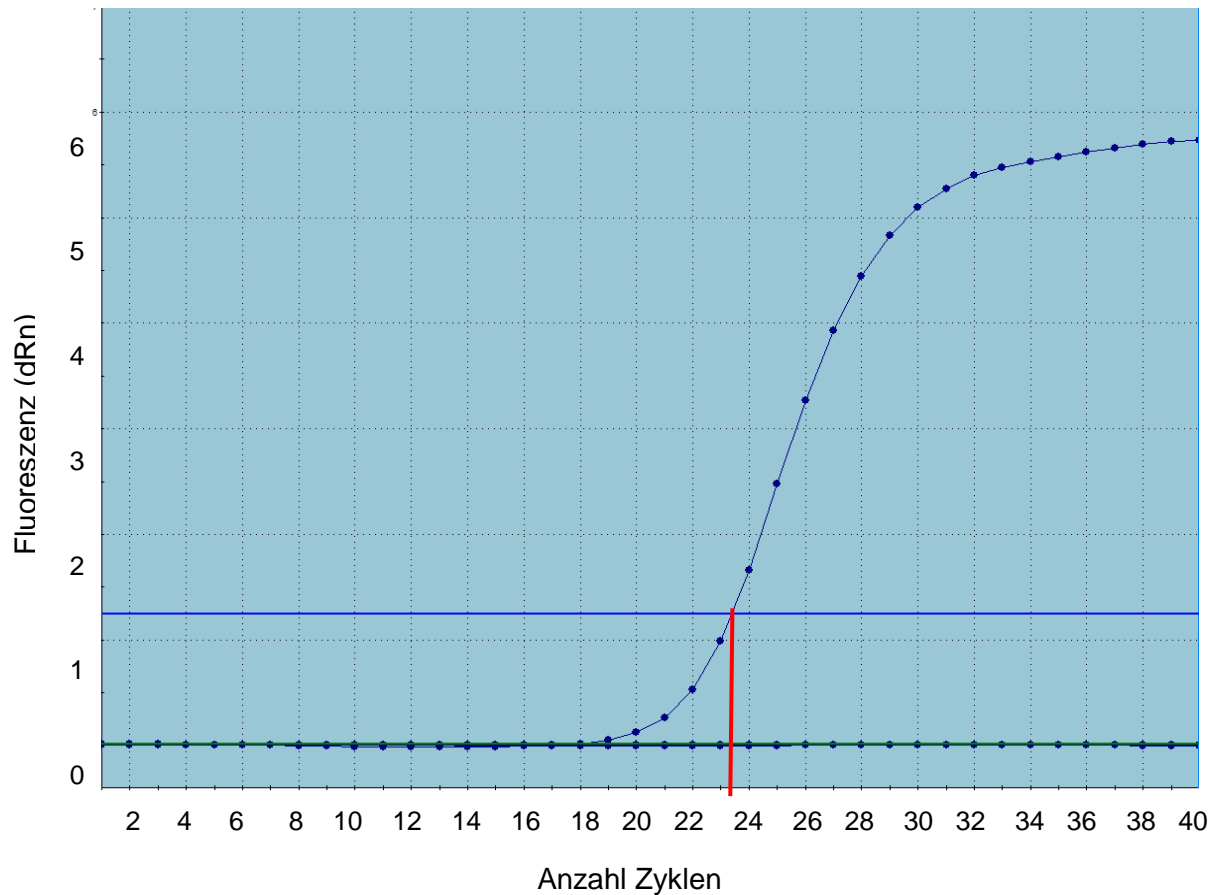


Abbildung 57: Beispielhaftes Schaubild einer Amplifikation eines Zielgens. Die dunkelblaue, gepunktete Linie zeigt den Verlauf der Fluoreszenz des Zielgens während des qPCR-Prozesses, gemessen mit dem FAM-Filter. Die hellblaue Horizontale bei einer Fluoreszenz von 1,25 dRn ist eine willkürlich gezogene Grenze im linear aufsteigenden Bereich der Amplifikationskurve, die jedoch bei jeder zu vergleichenden Probe auf selber Höhe liegen muss. Das Lot zur Ermittlung des C_T-Wertes ist in roter Farbe dargestellt.

1.7.4 Primer-Konzentrationstest

Bevor die entworfenen Primer eingesetzt werden konnten, musste die ideale Konzentration für den späteren 20 µL-PCR-Ansatz ermittelt werden. Dafür wurde pro Primerpaar eine Primer-Optimierungs-Matrix erstellt. Hierbei setzen wir Forward- und Reverse-Primer in unterschiedlichen Konzentrationen, über eine Spannweite von 0,05 µmol/L bis 1 µmol/L, ein. Ziel war es, die niedrigst mögliche Konzentration des jeweiligen Primers zu ermitteln, um den Verbrauch gering zu halten und die Spezifität der PCR-Reaktion zu erhöhen, da die Gefahr der Primer-Dimer-Bildung durch geringe Konzentrationen generell deutlich gesenkt werden kann [398]. Im Gegensatz dazu, durfte die Menge an eingesetzten Primern auch

nicht zu gering sein, um den PCR-Prozess nicht zu limitieren. Die beim kleinsten erreichten C_t -Wert vorliegenden Primer-Konzentrationen, wurden für die weiteren Untersuchungen als ideal angenommen. Für diese Tests wurden Gewebeproben verwendet, die im Rahmen des Ethikantrages der Pycnogenol[®]-Studie gewonnen wurden ($n= 1$). Für Leptin ergaben sich beispielsweise für den Forward- und den Reverse-Primer Idealkonzentrationen von jeweils 0,75 $\mu\text{mol/L}$, da hiermit der geringste C_t -Wert erreicht wurde (Abbildung 58). Bei geringerer Konzentration war die Amplifikation des Zielgens unvollständig, bei höheren Konzentrationen wurde die Spezifität des Vorganges durch Primer-Dimer-Bildung verschlechtert (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.1).

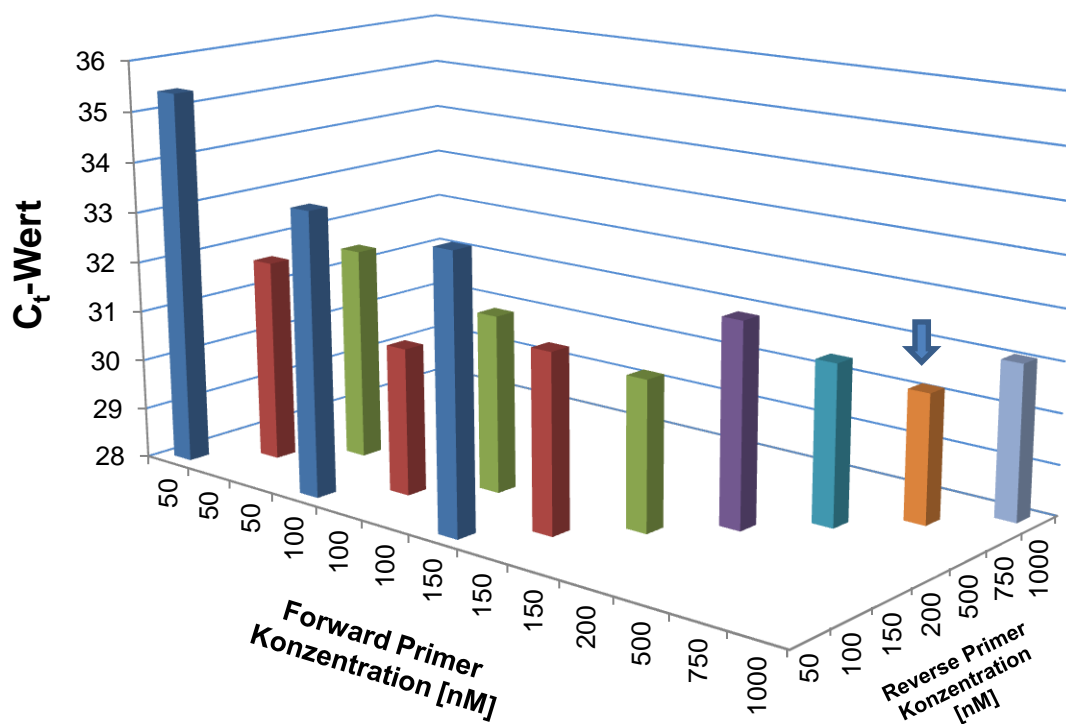


Abbildung 58: Primer-Optimierungs-Matrix für die Amplifizierung von Leptin. Aufgetragen sind die erhaltenen C_t -Werte in Einfachbestimmung ($n= 1$) gegen die jeweiligen Konzentrationen von Forward- und Reverse-Primer in nmol/L. Die für die qPCR-Versuche verwendete Primer-Zusammensetzung ist mit einem Pfeil markiert.

Der Forward- und Reverse-Primer für das Target IL-1 β lieferten die besten Ergebnisse bei einer Konzentration von je 0,5 $\mu\text{mol/L}$. Bei höheren Konzentrationen fand eine Inhibition des PCR-Prozesses statt.

Die Zielsequenzen von MMP1 und MMP13 wurden am effektivsten mit einer jeweiligen Primer-Konzentration von 0,75 $\mu\text{mol/L}$ amplifiziert, die des Zielgens MMP3 mit jeweils 0,5 $\mu\text{mol/L}$ Forward- und Reverse-Primer im Ansatz.

Beim Housekeeping-Gen B2M wurde der geringste C_t -Wert zwar bei einer jeweiligen Primer-Konzentration von 0,75 $\mu\text{mol/L}$ gemessen, allerdings war dieser nur marginal geringer als der Grenzwert bei einer Primerkonzentration von 0,375 $\mu\text{mol/L}$, so dass unter Akzeptanz dieser geringen Unterschiede die niedrigere Konzentration für die Folgeversuche eingesetzt wurde, um Primer-Lösung einzusparen (Abbildung 59).

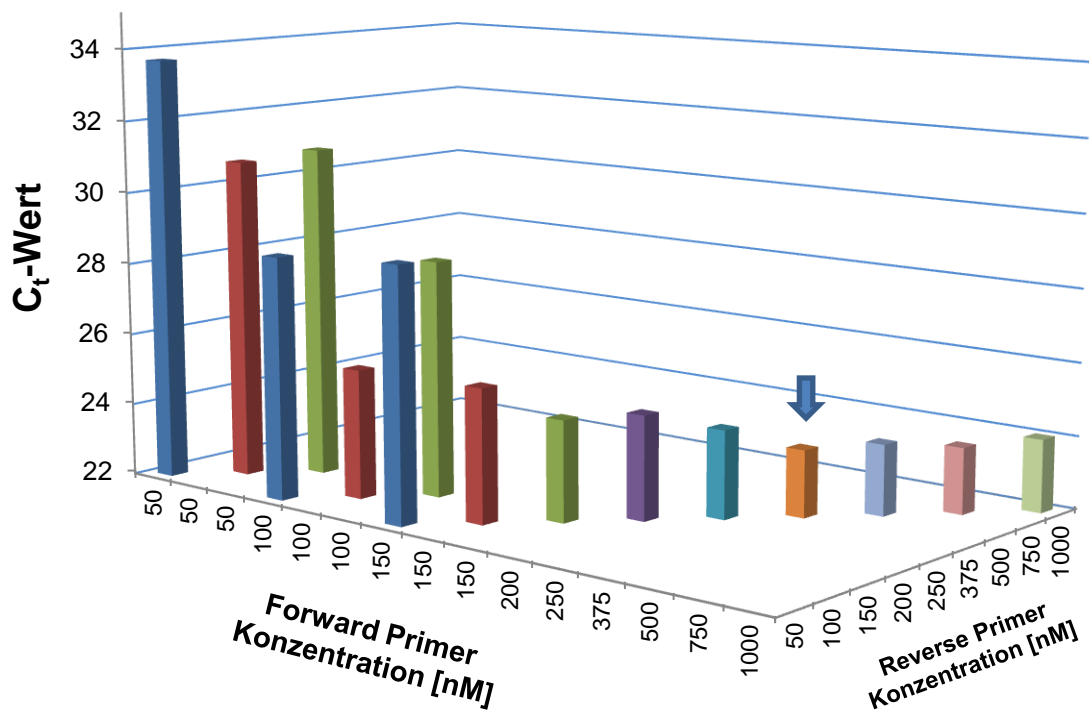


Abbildung 59: Primer-Optimierungs-Matrix für die Amplifikation des Housekeeping-Gens β_2 -Mikroglobulin (B2M). Aufgetragen sind die erhaltenen C_t -Werte in Einfachbestimmung ($n=1$) gegen die jeweiligen Konzentrationen von Forward- und Reverse-Primer in nmol/L . Die für die qPCR-Versuche verwendete Primer-Zusammensetzung ist mit einem Pfeil markiert.

Zusätzlich gab es bei der höheren Konzentration ein Auftreten von Primer-Dimeren im geringen Maße, welche bei der kleineren Menge an Primern nicht beobachtet wurde. Für alle weiteren getesteten Housekeeping-Gene und für

Cathepsin K wurden die idealen Primerkonzentrationen auf gleiche Weise bestimmt (Tabelle 12).

Tabelle 12: Ideale Primerkonzentrationen für die Untersuchung aller Housekeeping-Gene und weiterer interessanter Gene.

Genname	Forward- Primerkonzentration [µmol/L]	Reverse- Primerkonzentration [µmol/L]
GAPDH	0,15	0,15
ACTB	0,15	0,15
18sRNA	0,15	0,15
HPRT-1	0,15	0,15
SDHA	0,15	0,15
B2M	0,375	0,375
MMP1	0,75	0,75
MMP3	0,5	0,5
MMP13	0,75	0,75
Leptin	0,75	0,75
IL-1β	0,5	0,5
ADAMTS-5	0,75	0,75
CatK	0,20	0,20

Das Temperaturprofil des PCR-Vorganges wurde an den verwendeten SYBR®Green-Master-Mix der Firma Bio-Rad angepasst. Zunächst wurde ein einmaliger Polymerase-Aktivierungs- und cDNA-Denaturierungsschritt für 3 min bei 95 °C durchgeführt. Im Anschluss folgten 40 PCR-Zyklen. Dabei wurde die generierte doppelsträngige DNA (dsDNA) zunächst 10 sec bei 95 °C denaturiert, um dann in 30 sec bei 60 °C unter Anlagerung der Primer amplifiziert zu werden. Nachfolgend an die Denaturierung der Produkte über 1 min bei 95 °C wurde jeweils eine Schmelzkurve, durch Erwärmung des Ansatzes in 0,5 °C-Schritten von 55 °C auf 95 °C, aufgenommen. Damit sollte eine unspezifische Produkt- bzw. eine Primer-Dimer-Bildung erkannt werden (Allgemeinter Teil B, Kap. 1.3.1).

1.7.5 Housekeeping-Genvalidierung

Die MIQE-Leitlinien sind, wie bereits erwähnt, Richtlinien, die minimale Informationen beschreiben, die bei der Veröffentlichung von im Rahmen der qPCR gewonnenen Daten enthalten sein müssen [192]. Eine Normierung gegen ein einzelnes Referenzgen wird dabei von den Autoren als nicht ausreichend erachtet. Damit die relative Quantifizierung der Proben in der vorliegenden Arbeit möglichst verlässlich war, mussten zunächst drei Housekeeping-Gene ermittelt werden, deren Expression im vorliegenden Knorpelgewebe bei der Erkrankung Osteoarthritis möglichst konstant war. Somit wurde der Anforderung aus der Leitlinie von Bustin et al. entsprochen, die mehr als ein Referenzgen für eine verlässliche relative Quantifizierung fordert [192].

Verglichen wurden in der vorliegenden Arbeit die Expressionen der Gene für die Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), für β -Actin (ACTB), für die 18S-Untereinheit der ribosomalen RNA (18SRNA), für die Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase-1 (HPRT-1), für das β_2 -Mikroglobulin (B2M) und für die Flavoprotein-Untereinheit der Succinat-Dehydrogenase (SDHA). Als Ausgangsmatrix wurde die cDNA von fünf verschiedenen Probanden bzw. Testpersonen gewählt. Die C_t -Werte der einzelnen Housekeeping-Gene ($n=5$) wurden ermittelt und nach Berechnung der einzelnen Quantile in einem Box- und Whisker-Graph dargestellt (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.7.5, Abbildung 19). Bei der graphischen Auswertung erschienen die Gene HPRT-1, B2M und SDHA die am konstantesten exprimierten Gene im Knorpelgewebe bei Osteoarthritis zu sein. Die exakte mathematische Auswertung der ermittelten Daten wurde mit Hilfe der BestKeeper™-Software durchgeführt (siehe Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.3, Tabelle 4) [203].

1.7.6 Probenvermessung

Durch die Bestimmung der verlässlichsten Housekeeping-Gene für das Knorpelgewebe bei Osteoarthritis, konnte bei der Vermessung der Probanden-Proben nun eine relative Quantifizierung gegen drei verschiedene Referenzgene durchgeführt werden [203]. Um die Effizienz der Amplifikation der einzelnen Targets mit einfließen lassen zu können, mussten mindestens drei

Kalibriergeraden von Verdünnung V1 (1:10) bis Verdünnung V3 (1:1000) pro Zielgen aufgenommen werden. Aus der Steigung dieser Geraden wurde dann, durch die Software, die Effizienz des Vorganges nach folgender Formel berechnet [398]:

Formel 3: Berechnung der Effizienz eines PCR-Prozesses mit Hilfe der Steigung der Standardkurve.

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

Die berechnete Effizienz ging in die Berechnungsmethode nach Pfaffl et al. ein [199] (Näheres zur Auswertung im Allgemeinen Teil B, Kap. 1.3.1).

Eine 96-well-Platte zur Bestimmung der Genexpression eines Zielmoleküls bestand aus je drei Kalibriergeraden V1 bis V3 von Zielgen und den Housekeeping-Genen ACTB, HRPT-1 und SDHA. Die Proben jedes Probanden wurden in der V1-Verdünnung (1:10; 100 ng/mL cDNA) in vierfachem Ansatz vermessen (n= 4). Ebenso wurde die Expression der einzelnen Referenzgene im Knorpelgewebe der Studienteilnehmer vierfach bestimmt. Hinzu kamen bei jeder Vermessung no RT-Kontrollen für alle Probandenproben auf dieser Platte und no-Template-Kontrollen (NTC) für alle verwendeten Primerpaare, um Primer-Dimer-Bildungen in einer zusätzlichen Art und Weise auszuschließen (je n= 1). Ergänzend wurden bei jedem Ansatz Inter-run-Kalibratoren mit zwei verschiedenen Primern (B2M und ACTB) vermessen (je n= 3), um die Platten untereinander vergleichen zu können. Damit wurden unspezifische äußere Einflüsse auf die Amplifikation eliminiert.

Für alle Untersuchungen betrug das Endvolumen des PCR-Ansatzes 20 µL. Die Zusammensetzung variierte je nach eingesetztem Primer-Paar, auf Grund der unterschiedlichen idealen Primer-Konzentration (Tabelle 12). Dabei waren die Anteile SYBR[®]Green-Master-Mix und V1-Verdünnung der cDNA immer gleich, nämlich 10 µL und 2 µL (Tabelle 13). Die V1-Verdünnung entsprach einer 1:10-Verdünnung der synthetisierten cDNA. Analog war die V2-Verdünnung eine 1:10-Verdünnung der V1-Verdünnung etc..

Tabelle 13: Zusammensetzung eines Standard-PCR-Ansatzes. Das x entspricht der jeweiligen Primerkonzentration, das y der individuell fehlenden Menge an Wasser, die sich an dem Wert von x orientiert und zu einem Gesamtvolumen von 20 µL im Endansatz führt.

Bestandteil	Volumen [µl]
SYBR®Green-Master-Mix	10
Verdünnung V1 cDNA	2
Primer-Mix	x
Wasser	y

Der nach individueller Zugabe von Primer-Mix resultierende fehlende Volumenteil zu 20 µL wurde mit Wasser ergänzt. Bei Leptin und MMP13 entsprach dies z. B. 3 µL Primer-Mix (10 µmol/L; 1:1) und 5 µL Wasser. Analog wurde bei der Vermessung der anderen Targets und der Housekeeping-Gene vorgegangen. Es wurden die sechs Zielgene, die für die Proteine MMP1, -3 und -13, Leptin (LEP), Interleukin-1β (IL-1β) und „A disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 5“ (ADAMTS-5) codieren (Tabelle 14), untersucht und relativ in Bezug zu der Genexpression der drei Referenzgene ACTB, HPRT-1 und SDHA quantifiziert.

Tabelle 14: Auflistung der Zielgene der Genexpressionsuntersuchungen im Knorpelgewebe mit der zugehörigen Sequenz der NCBI-Datenbank und entsprechender Sequenz-Länge (Anzahl Basenpaare [bp]). *NCBI = National Center for Biotechnology Information*

Genname	NCBI Referenz-Sequenz	Sequenz-Länge [bp]
ADAMTS-5	NM_007038.3	9663
IL-1β	NM_000576.2	1498
Leptin	NM_000230.2	3444
Cathepsin K	NM_000396.3	1825
MMP1	NM_002421.3	2081
MMP3	NM_002422.3	1828
MMP13	NM_002427.3	2735

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem REST2009®-Programm von Pfaffl et al. [199].

1.8 Bestimmung der Konzentration ausgewählter Marker der Knorpelhomöostase in Serum, Synovialflüssigkeit und Zellkulturüberständen

1.8.1 Matrix-Metalloproteinase 3 (MMP-3)

Zur Analyse der Konzentration von MMP-3 im Serum, der Synovialflüssigkeit der Probanden und den Zellkulturüberständen der *ex-vivo*-Versuche wurde ein Konstruktions-Kit der Firma Life Technologies verwendet. Im Kit enthalten waren alle notwendigen Materialien inklusive eines passenden Antikörper-Paares und der dazugehörigen Puffersysteme. Da es kein komplett validiertes Kit war, mussten zunächst die idealen Antikörperkonzentrationen für den Assay ermittelt werden. Es wurde jeweils eine „High binding“-Platte der Firma Greiner Bio-one mit 96 Nöpfchen, flachem Boden und passender Abdeckplatte benutzt. Das Prinzip der Analytik war eine Sandwich-Technik. Zunächst wurde die Platte über Nacht bei 4 °C mit 100 µL einer 3 µg/mL-Lösung des Fänger-Antikörpers je Napf inkubiert. Nach anschließender Waschen und einstündiger Inkubation mit Blockpuffer bei RT, um möglichst alle unspezifischen Bindestellen zu blockieren, wurden, nach Abgießen des Blockpuffers mit Ausklopfen der Platte, 100 µL der Standardlösungen oder der Proben pro Napf zugegeben. Je Platte wurde eine Standardkurve mit sechs Standards im Bereich 0-20 ng/mL MMP-3 aufgenommen. Dabei diente der einfach konzentrierte Assaypuffer als Nullkontrolle. Gleichzeitig zu den Proben und Standards, erfolgte die Zugabe von 50 µL einer 0,05 µg/mL-Lösung des Detektions-Antikörpers. Dieser Ansatz wurde zwei Stunden bei RT auf einem Schüttler mit 250 U/min inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit einfach konzentriertem Waschpuffer erfolgte eine Zugabe von 100 µL einer 1:2500-Verdünnung der im Kit enthalten HRP-Streptavidin-Lösung je well. Die Platte wurde mit dieser Lösung eine halbe Stunde auf dem Schüttler bei RT mit 250 U/min durchmischt und inkubiert. Nach fünfmaligem Auswaschen der wells erfolgte die Zugabe von 100 µL Substratlösung und eine sich anschließende 30-minütige Inkubation bei vorher genannten Bedingungen auf dem Schüttler.

Im Anschluss wurde jedem well 100 µL Stopplösung hinzugegeben und die Platte im Plattenlesegerät bei einer Wellenlänge von 450 nm vermessen, da die Zugabe

der Stopplösung die Farbe des Ansatzes von anfänglich blau auf gelb änderte. Die sigmoidale Auswertung der Standardkurve mit Hilfe einer 4-Parameter-Logistikfunktion erfolgte mit der GraphPad Prism™-Software in der Version 6.0 der Firma GraphPad Software (Abbildung 60). Alle im Rahmen der vorliegenden Arbeit vermessenen Standardkurven der diversen ELISA-Bausätze wurden, wenn nicht anders erwähnt, mit dieser Software ausgewertet.

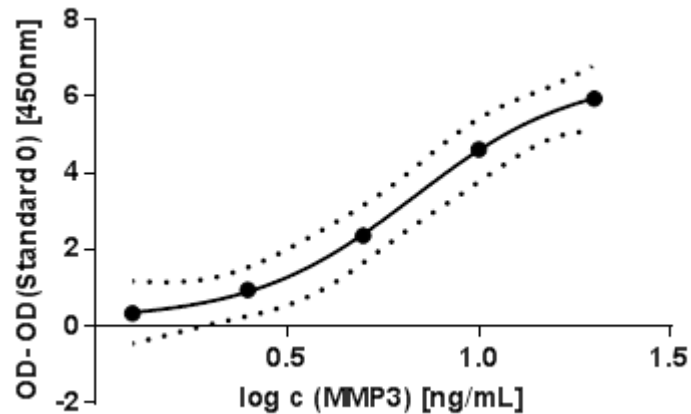


Abbildung 60: Beispiel einer MMP-3-Standardkurve. Ausgewertet wurden die Daten als 4-Parameter-Logistikfunktion mit GraphPad Prism™ in der Version 6.0. Auf der x-Achse ist der 10er-Logarithmus der MMP3-Konzentration in [ng/mL] und auf der y-Achse die Differenz aus Optischer Dichte des jeweiligen Standards abzüglich der optischen Dichte des 0-Standards, ohne enthaltenes MMP-3, aufgetragen. Gemessen wurde die optische Dichte jeweils bei einer Wellenlänge von 450 nm. Mit Hilfe der Standardkurve wurden im Anschluss die unbekannt Konzentrationen der Proben aus deren Absorption bestimmt. Die durchschnittliche Richtigkeit der Kurve betrug 99,1 %. Die gepunkteten Kurven symbolisieren das 95 % Konfidenzintervall.

1.8.2 Matrix-Metalloproteinase 13 (MMP-13)

Zur Bestimmung der MMP-13-Konzentration in den verschiedenen Körperflüssigkeiten und den Zellkulturüberständen wurde ein ELISA Kit der Firma Raybiotech für humanes MMP-13 verwendet. Das Design entsprach einem indirekten Sandwich-ELISA. Die Böden der Näpchen waren mit einem Antikörper gegen MMP-13 beschichtet. Nach Zugabe der Standards und der Proben wurde das darin enthaltene MMP-13 an diesen Antikörper gebunden. Nach einem Waschschrift wurde ein zweiter Antikörper zum Ansatz hinzugegeben, der vorher mit Biotin markiert worden war und der dann an ein anderes Epitop des MMP-13

band und somit das Antigen zwischen sich und dem Antikörper auf dem Boden in einer Art „Sandwich“ einschloss. Auf einen weiteren Waschschrift folgte die Zugabe einer Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Lösung. Das darin enthaltene Streptavidin band an das Biotin. Die an das Streptavidin gekoppelte Peroxidase setzte ein im Anschluss zugegebenes Substrat (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) um und in Folge dessen entwickelte sich proportional zur enthaltenen MMP-13-Menge eine blaue Färbung. Der Ansatz wurde im Dunkeln inkubiert, um eine Photolyse des Produkts zu vermeiden. Nach Zugabe einer sauren Stopplösung erfolgte ein Farbumschlag von blau nach gelb und die Platte wurde direkt bei 450 nm mit dem Plattenlesegerät vermessen. Die Nachweisgrenze des Kits lag bei < 6 pg/mL und die Wiederfindung aus Serum bzw. Zellkulturüberstand bei 91,99 % bzw. 94,72 %. Unter Betrachtung der Reproduzierbarkeit zeigte das Kit eine Intra-Assay-Variabilität von $V_k < 10\%$ und eine Inter-Assay-Variabilität von $V_k < 12\%$.

MMP-13 konnte in einem Konzentrationsbereich von 6 pg/mL-6000 pg/mL nachgewiesen werden. Serum- und Synovialflüssigkeitsproben wurden, statt in der empfohlenen 1:1-Verdünnung, unverdünnt vermessen, da Vorversuche eine zu niedrige Konzentration an MMP-13 in den Proben bei dieser Verdünnung gezeigt hatten. Die Zellkulturüberstände aus den *ex-vivo*-Versuchen mit Synovialflüssigkeit wurden vor der Durchführung der Untersuchung 1:1 und die Zellkulturüberstände aus den Versuchen mit Serum 1:10 mit dem mitgelieferten Reagens verdünnt. Das weitere Vorgehen entsprach den Herstellervorgaben. Die Auswertung der Proben erfolgte mit einer Kalibriergerade, die bei jedem Versuchsansatz mitvermessen wurde (Abbildung 61).

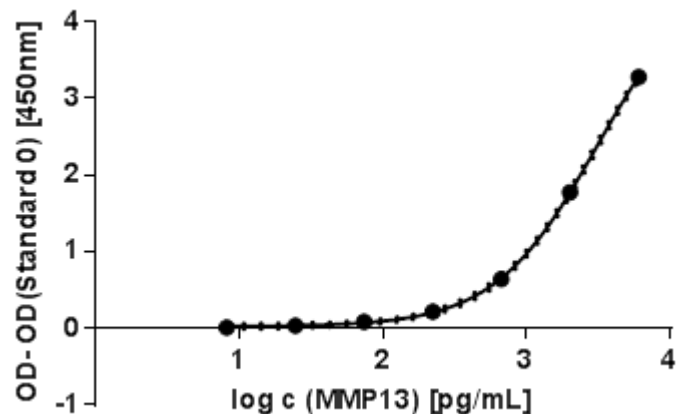


Abbildung 61: Beispiel einer MMP-13-Standardkurve. Ausgewertet wurden die Daten als 4-Parameter-Logistikfunktion mit GraphPad-Prism in der Version 6.0. Auf der x-Achse ist der 10er-Logarithmus der MMP-13-Konzentration in [pg/mL] und auf der y-Achse die Differenz aus Optischer Dichte des jeweiligen Standards abzüglich der optischen Dichte des 0-Standards ohne enthaltenes MMP-13 aufgetragen. Gemessen wurde die optische Dichte jeweils bei einer Wellenlänge von 450 nm. Mit Hilfe der Standardkurve wurden im Anschluss die unbekannt Konzentrationen der Proben aus deren Absorption bestimmt. Die durchschnittliche Richtigkeit der Kurve betrug 104,4 %.

1.8.3 Matrix-Metalloproteinase 1 (MMP-1)

Die Analyse der MMP-1-Konzentration in Serum und in der Synovialflüssigkeit erfolgte mit Hilfe eines humanen MMP-1-ELISA Kit der Firma Raybiotech, analog zur Bestimmung der MMP-13-Konzentration (Experimenteller Teil C, Kap. 1.8.2). Die Standardkurve erstreckte sich über den Bereich von 24,69-18000 pg/mL (sieben Standards, Abbildung 62). Das Kit gewährleistete eine Intra-Assay-Variabilität von $V_k < 10 \%$ und eine Inter-Assay-Variabilität von $V_k < 12 \%$.

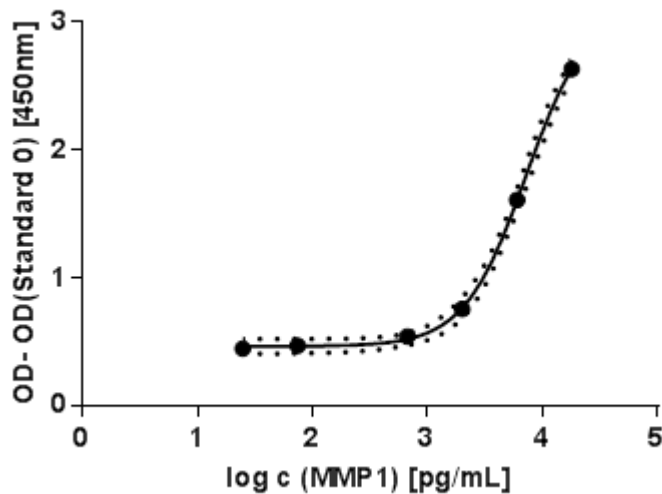


Abbildung 62: Schaubild einer MMP-1-Standard-4-Parameter-Logistikfunktion. Durch Einsetzen der Absorptionen der unbekanntenen Proben konnten deren Konzentrationen ermittelt werden. Der 10er-Logarithmus der MMP1-Konzentration in [pg/mL] auf der x-Achse ist gegen die Differenz der Optischen Dichte bei 450 nm vom jeweiligen Standard und des 0-Wertes auf der y-Achse aufgetragen. Die durchschnittliche Richtigkeit der Kurve betrug 105,0 %. Die gepunkteten Kurven symbolisieren das 95 %-Konfidenzintervall.

1.8.4 ADAMTS-5

Für die Quantifizierung von ADAMTS-5 in den Serumproben der Probanden, wurde ein ADAMTS-5-ELISA Kit der Firma Cusabio verwendet. Das Prinzip des Assays entsprach einer indirekten Sandwich-ELISA-Technik mit nahezu analogem Vorgehen zum MMP13-Kit. Im Gegensatz zum RayBiotech-Kit führte man alle Inkubationsschritte bei 37 °C und 5 % CO₂ durch. Auch die Waschschriffe unterschieden sich durch eine jeweils zweiminütige Inkubation der Näpfcchen nach Zugabe der Waschlösung. Die Nachweisgrenze des Kits wurde mit < 3,9 ng/mL angegeben, der Arbeitsbereich lag zwischen 15,6-1000 ng/mL. Die Präzision wurde durch die Intra-Assay- und die Inter-Assay-Variabilität von $V_k < 8 \%$ bzw. $V_k < 10 \%$ charakterisiert. Alle Serumproben wurden unverdünnt vermessen. Die Konzentrationen wurden jeweils mit einer Standardkurve, die mit jedem Lauf separat durchgeführt wurde, ermittelt (Abbildung 63). Die Auswertung der Standardkurve erfolgte mit Microsoft Excel 2010.

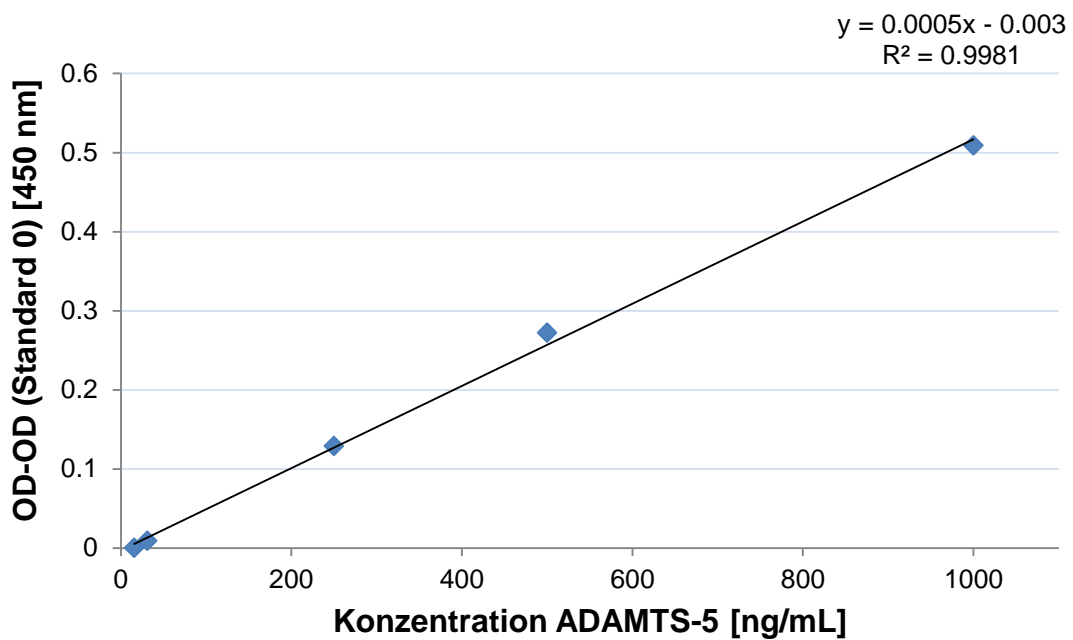


Abbildung 63: Beispiel einer ADAMTS-5-Standardkurve mit fünf verschiedenen Referenzkonzentrationen. Auf der x-Achse ist die ADAMTS-5-Konzentration in [ng/mL] und auf der y-Achse die Optische Dichte des jeweiligen Standards abzüglich der Optischen Dichte des Standards 0 bei einer Wellenlänge von 450 nm aufgetragen. Die durchschnittliche Richtigkeit der Kurvenpunkte lag bei 105,21 %. Mit Hilfe der Kalibriergerade konnten im Anschluss die Konzentrationen unbekannter Proben durch Einsetzen der jeweiligen Optischen Dichten in die Geradengleichung berechnet werden.

1.8.5 ADAMTS-4

Zur Quantifizierung des Gehalts an ADAMTS-4 in den Proben, wurde der humane ADAMTS-4-ELISA der Firma Novateinbio Biosciences (Cambridge, MA, USA) verwendet. Vom Prinzip entsprach das Kit einer Sandwich-Technik. Jedoch war die Meerrettich-Peroxidase hier direkt an den Detektionsantikörper gebunden und dieses Konjugat wurde direkt mit den Standards bzw. unbekanntem Proben zu Beginn in die Nüpfchen der 96-well-Platte gegeben. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C und fünfmaligem Waschen, wurden zwei separate Substratlösungen zugesetzt und der Ansatz bei 37 °C im Dunkeln für 15 min inkubiert. Nach Stoppen der Reaktion mit Säure veränderte sich die anfangs blaue Farbe in eine gelbe Färbung, deren Intensität bei 450 nm im Plattenlesegerät bestimmt wurde. Mit Hilfe einer gleichzeitig aufgenommenen Standardkurve im Bereich von 6,25-

200 ng/mL (sechs Standards, Abbildung 64) wurden die unbekanntenen Konzentrationen der Studienproben ermittelt.

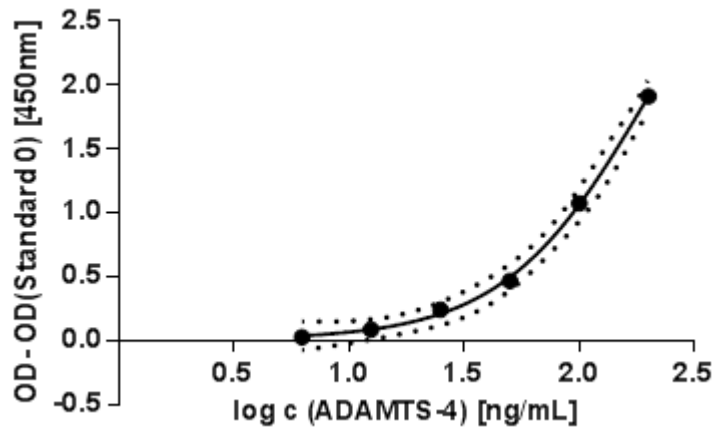


Abbildung 64: Beispielhafte Darstellung einer ADAMTS-4-Standardkurve mit sechs Standards. Aufgetragen ist der Logarithmus der ADAMTS-4-Konzentration in [ng/mL] (x-Achse) gegen die Differenz aus Optischer Dichte vom jeweiligen Standard und des 0-Wertes bei 450 nm. Der Mittelwert der Richtigkeit der Kurvenpunkte betrug 101,5 %. Die gepunkteten Linien zeigen das 95 % KI.

1.8.6 Leptin

Die Analyse der Leptin-Konzentration in Serum und Synovialflüssigkeit der Probanden wurde mit Hilfe des IBL Leptin-ELISA Kit zur Bestimmung von Leptin in humanem Serum und Plasma durchgeführt. Das Prinzip der Bestimmung war eine indirekte Sandwich-Methode. Die Nachweisgrenze wurde vom Hersteller auf 1 ng/mL getestet und der Messbereich erstreckte sich von 1-100 ng/mL Leptin. Die Präzision wird vom Hersteller mit einer Intra-Assay-Variabilität von im Mittel 6,43 % und einer Inter-Assay-Variabilität von 10,11 % angegeben. Die Serumproben wurden unverdünnt und die Synovialflüssigkeitsproben, 1:1 mit Standard 0 verdünnt, vermessen. Das Vorgehen entsprach den Angaben des Herstellers. Die Auswertung der erhaltenen optischen Dichte erfolgte durch Einsetzen der Werte in die Geradengleichung der jeweils mitgeführten Standardkurve (Abbildung 65).

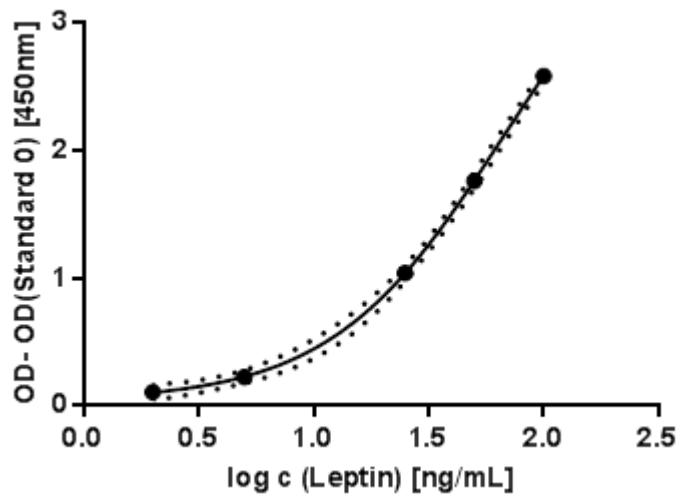


Abbildung 65: Beispiel einer Leptin-Standardkurve. Ausgewertet wurden die Daten als 4-Parameter-Logistikfunktion mit GraphPad-Prism in der Version 6.0. Auf der x-Achse ist der 10er-Logarithmus der Leptin-Konzentration in [ng/mL] und auf der y-Achse die Differenz aus Optischer Dichte des jeweiligen Standards abzüglich der optischen Dichte des 0-Standards, ohne enthaltenes Leptin, aufgetragen. Gemessen wurde die optische Dichte jeweils bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die durchschnittliche Richtigkeit der Kurvenpunkte lag bei 100,34 %. Mit Hilfe der Standardkurve wurden im Anschluss die unbekannt Konzentrationen der Proben aus deren Absorption bestimmt. Die gepunkteten Kurven entsprechen dem 95 %-Konfidenzintervall.

1.8.7 Lösliches CD163 (sCD163)

Um eine verlässliche Konzentrationsbestimmung von löslichem CD163 in der Synovialflüssigkeit durchführen zu können, war zunächst ein Vorverdau der Proben mit Hyaluronidase nötig, um die Fließeigenschaften der Synovialflüssigkeit zu verbessern. Dazu wurde eine 4 mg/mL-Lösung von Hyaluronidase (aus bovinen Hoden, Sigma Aldrich) in 0,02 M Natriumphosphatpuffer (pH= 7) mit 77 mM Natriumchlorid und 0,01 % Bovinem Serum Albumin (BSA) hergestellt und diese 1:1 mit den Synovialflüssigkeits-Proben zu einer Endkonzentration von 2 mg/mL Hyaluronidase im Ansatz gemischt. Die verwendete Konzentration von 2 mg/mL Hyaluronidase (aus bovinen Hoden) orientierte sich an den Ausführungen von Jayadev et al. [399]. Die Pufferlösung entsprach den Empfehlungen des Herstellers (Sigma Aldrich). Diese Mischung wurde 1 h bei RT und 600 rpm auf dem Thermomix (Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Zur

Konzentrationsbestimmung in den Synovialflüssigkeit-Proben wurde ein ELISA Kit der Firma Cusabio verwendet, welche ein identisches Vorgehen, wie bei ihrem ADAMTS-5 ELISA-Kit, vorschreibt (Experimenteller Teil C, Kap. 1.8.4). Laut Hersteller betrug die Nachweisgrenze 0,39 ng/mL lösliches CD163 bei einem Quantifizierungsbereich von 1,56-100 ng/mL. Die angegebene Intra-Assay-Variabilität betrug < 8 % und die Inter-Assay-Variabilität < 10 %. Die Studienproben wurden in vierfacher bzw. zehnfacher Verdünnung analysiert. Die Konzentrationen der unbekanntenen Proben wurden mit Hilfe einer Standardkurve, die bei jedem Ansatz mitgeführt wurde, bestimmt. Diese wurde, nach Empfehlungen des Herstellers, als 4-Parameter-Logistikfunktion ausgewertet (Abbildung 66).

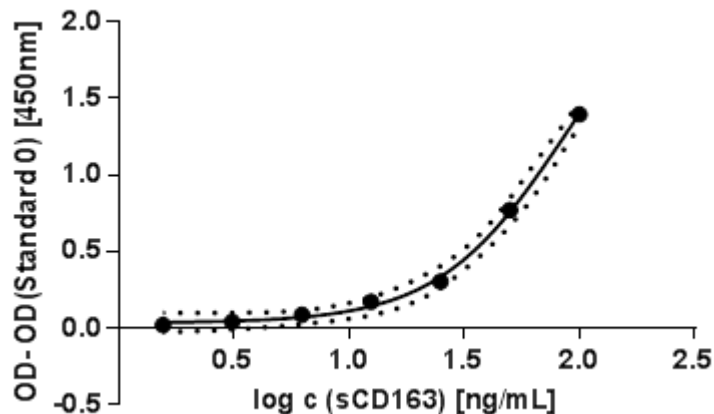


Abbildung 66: Beispiel einer Standardkurve zur Bestimmung der unbekanntenen Konzentration von löslichem CD163 (sCD163) in der Synovialflüssigkeit der Patienten der Pycnogenol®-Studie. Im Vorfeld der Messung war ein Verdau der Synovialflüssigkeit mit Hyaluronidase nötig. Auf der x-Achse ist der Logarithmus der Konzentration von sCD163 in [ng/mL] abgebildet, auf der y-Achse die Differenz aus der Absorption der Lösungen des jeweiligen Standards und des 0-Wertes. Die gepunkteten Kurven zeigen das 95%-Konfidenzintervall der Kurvenpunkte.

1.8.8 Sulfatierte Glucosaminglykane (sGAG) über den Dimethylmethylblau (DMMB)-Assay

Zur Verbesserung der Fließeigenschaften der Synovialflüssigkeits-Proben wurde zunächst ein Vorverdau mit Papain (aus *Papaya latex*, Sigma Aldrich) durchgeführt. Dazu wurde zunächst eine Lösung aus 1 mM Na₂H₂EDTA,

2 mM Dithiothreitol und 300 µg/mL Papain in 20 mM Natriumphosphatpuffer (pH= 6,8) hergestellt und damit die Synovialflüssigkeit der jeweiligen Probanden 1:10 zu einem Endvolumen von 1 mL verdünnt. Diese Mischung wurde 1 h bei 60 °C und leichtem Schütteln (300 rpm) im Thermomix inkubiert. Im Anschluss wurde die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 1 mL 20 mM Iodessigsäure gestoppt und der Ansatz mit 3 mL 50 mM TRIS/HCl-Puffer (pH= 8,0) ergänzt. Davon wurden 500 µL mit 2 mL DMMB-Lösung (Tabelle 15) versetzt und im Anschluss die Absorption der Lösung mit dem UV-Meter bei 525 nm bestimmt.

Tabelle 15: Gelöste Bestandteile der DMMB-Farblösung nach [238]. Der Ansatz wurde mit 95 mL 0,1 M HCl ergänzt und zu 1 L Endvolumen mit Millipore-Wasser aufgefüllt. Gelagert wurde die Lösung bis zu vier Wochen in einer Braunglasflasche bei RT.

Bestandteil	Molekulargewicht [g/mol]	Masse [g]
Dimethylmethylenblau- Zinkchlorid-Doppelsalz	416,05	0,016
Glycin	75,07	3,04
Natriumchlorid	58,44	2,37

Als Blank diente ein Ansatz, der analog behandelt wurde, und, statt Synovialflüssigkeit, weitere 100 µL Natriumphosphatpuffer enthielt. Die gemessene Absorption des 0-Standards wurde von der Absorption der Studienproben abgezogen. Die damit erhaltenen Werte für die unbekanntenen Proben wurden durch Einsetzen in die vorher bestimmte Kalibriergerade in Gehalte umgerechnet (Abbildung 67). Als Standard zur Aufnahme einer Kalibrierfunktion wurde Chondroitinsulfat (aus Haifischknorpel, Sigma Aldrich) verwendet. Analog Farndale et al. wurde die Kalibrierkurve im Bereich 0,25-5 µg Chondroitinsulfat aufgenommen [238].

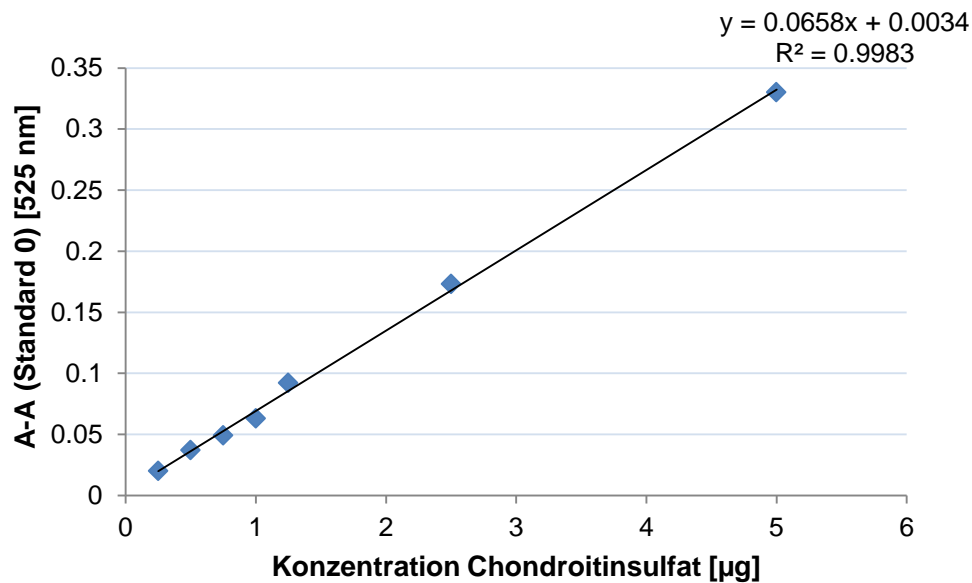


Abbildung 67: Beispielhafte Darstellung einer Kalibrierkurve des DMMB-Assays. Als Standard diente Chondroitinsulfat. Im Bereich 0,25-5 µg/mL wurden die Absorptionen der Lösungen von 7 verschiedenen Konzentrationen bestimmt. Die durchschnittliche Richtigkeit der Standardkurve betrug 99,4 %.

1.8.9 Humanes C-Telopeptid (CTX-II) und Helix-Peptid (Helix-II) von Typ-II-Collagen

Die Konzentration beider Typ-II-Collagen-Abbauprodukte in der SF der Probanden wurde mit Hilfe von ELISA Kits der Firma Novateinbio (Cambridge, USA), analog dem bereits beschriebenen Vorgehen, bestimmt (Experimenteller Teil C, Kap. 1.8.5). Die Standardkurve wurde in einem Bereich von 62,5-2000 pg/mL humanem CTX-II, ergänzend zu jeder Versuchsdurchführung, vermessen und als 4-Parameter-Logistikfunktion mittels GraphPadPrism ausgewertet (Abbildung 68). Die Nachweisgrenze betrug, laut Hersteller, 10 pg/mL.

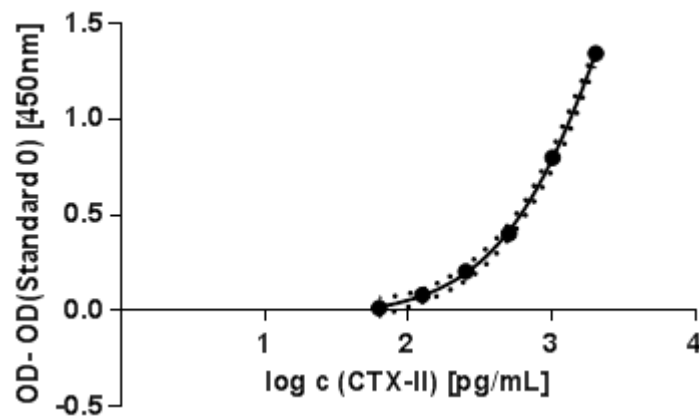


Abbildung 68: Beispieldarstellung einer CTX-II-Standardkurve zur Bestimmung der unbekanntem Konzentration an CTX-II in der Synovialflüssigkeit der Studienpopulation. Aufgetragen ist der log der CTX-II-Konzentration in [pg/mL] auf der x-Achse gegen die Differenz aus der Absorption des jeweiligen Standards und des Standards 0 bei einer Wellenlänge von 450 nm. Die gepunkteten Linien stellen das 95 % Konfidenzintervall der Messwerte dar. Der Mittelwert der Richtigkeit der Kurvenpunkte lag bei 99,4 %.

Beim Helix-II-ELISA wurde, analog dazu, eine Standardkurve von 0,25-8 nmol/L je Versuch bestimmt (Abbildung 69). Die Nachweisgrenze des ELISA Kits lag bei 0,1 nmol/L. Die Validität der Tests wurde bestätigt, jedoch erfolgten durch den Hersteller keine näheren Angaben zu Inter-Assay- bzw. Intra-Assay-Variabilität.

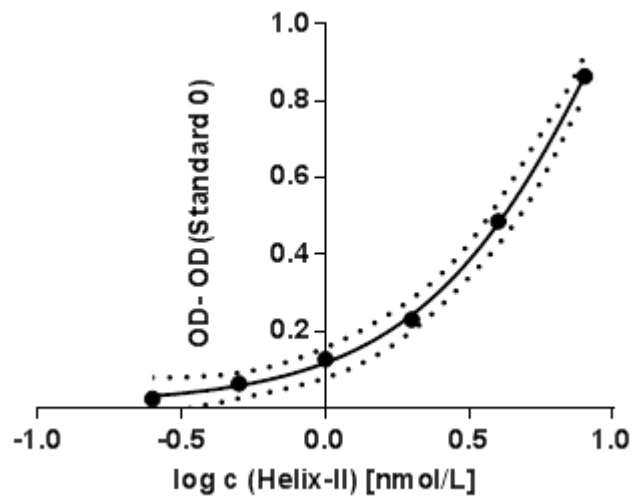


Abbildung 69: Schaubild einer Helix-II-Standardkurve zur Bestimmung der Konzentration des Typ-II-Collagenabbauproduktes in der Synovialflüssigkeit der Studienteilnehmer. Dem Logarithmus der Helix-II-Konzentration auf der x-Achse in [nmol/L] ist die Differenz der Optischen Dichte des jeweiligen Standards und des Null-Standards bei einer Wellenlänge von 450 nm auf der y-Achse zugewiesen. Die gepunkteten Linien symbolisieren das 95 % KI. Die mittlere Richtigkeit der Kurve lag bei 102,8 %.

1.9 Ex-vivo-Versuche mit Serum

Für die im Folgenden beschriebenen Versuche wurden die isolierten Chondrozyten aus dem Knorpel der Probanden verwendet, die in 15 wells einer 24-Multiwell-Platte, in ausreichender Zelldichte (> 100.000 Zellen/ cm^2), ausgesät wurden (Experimenteller Teil C, Kap. 1.6) [283]. Bis zum Start des Versuches wurden die Zellen 72 Stunden kultiviert. Ein längeres Kultivieren wird in der Literatur widersprüchlich diskutiert, da die Gefahr besteht, dass die Chondrozyten nach vier Tagen ihr Genexpressionsmuster verändern [67, 214] (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3.6). Nach 24 h in Kultur wurde zunächst das Medium gewechselt, um restliche Verunreinigungen durch Knorpelmatrixreste zu entfernen. Zu Beginn der Versuche wurde das Medium mit Serumanteil entfernt und durch 0,5 mL IMDM ohne Serumzusatz ersetzt.

Dadurch wurden die Zellen vom tierischen Serum entwöhnt und eventuell denkbare Kreuzreaktionen mit humanem Serum vermieden. Nach 1 h wurden den wells 1-9 weitere 0,5 mL IMDM ohne Serum, den wells 10-12 je 0,5 mL des

Probandenserums von Visite 1 (vor Einnahme von Pycnogenol®) und den wells 13-15 je 0,5 mL des Serums von Visite 2 (Pycnogenol® im Steady-state) zugesetzt.

Die Zellen wurden 2 h mit Serum vorinkubiert. Dann erfolgte bei den wells 4-12 bzw. 4-15 ein Zusatz von 10,1 µL IL-1β-Lösung in IMDM ohne Serum zu einer Endkonzentration von 10 ng/mL IL-1β in den individuellen Ansätzen [280].

Die Vertiefungen 1-3, ohne IL-1β-Zusatz, dienten hierbei als Kontrolle, ähnlich die wells 4-6 ohne Serum-Zusatz. Die wells 10-12 lassen sich als interne Kontrolle zur Überprüfung der Pycnogenol®-Wirkung verstehen [400]. Bei je drei Ansätzen von Patienten-Proben nach Pycnogenol®-Einnahme und ohne, wurden, parallel zur Inkubation mit dem Serum, 5,61 µL einer 10 µg/mL-Hydrocortisonacetat-Lösung in DMSO zugesetzt. Dies entsprach einer eingesetzten Konzentration von 0,05 µg/mL Hydrocortison, die nach Wang et al. reicht, um katabole Stoffwechselwege in Chondrozyten zu inhibieren und auch physiologisch erreicht werden kann [281]. Diese Ansätze sollten als Positivkontrolle für die Hemmung der MMP13-Freisetzung dienen. Auf Grund mangelnder Löslichkeit in wässrigen Medien wurde Hydrocortisonacetat in DMSO gelöst. Die Konzentration an DMSO im Gesamtansatz betrug 0,56 % [V/V]. Trotz der möglichen Zelltoxizität von DMSO können die Versuche als verlässlich angesehen werden. Es wurde zwar, auf Grund zu geringer Zellzahlen, kein separater MTT-Assay durchgeführt, jedoch zeigten die Ergebnisse des MTT-Assays für den *ex-vivo*-Versuch mit Synovialflüssigkeit und TC28-Zellen, dass bei 0,56 % DMSO, im Vergleich zu Ansätzen ohne DMSO, noch keine signifikante Senkung der metabolischen Aktivität vorlag (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.7.2).

Nach 24 h in Kultur wurden die Überstände abgenommen, bei 4 °C fünf Minuten mit 6800 g zentrifugiert und direkt in flüssigem Stickstoff eingefroren. Gelagert wurden die Proben bis zu ihrer Vermessung bei - 80 °C.

Die Zellen in den 12 (bzw. 15) wells der 24-Multiwell-Platte wurden trypsiniert, die Zellen der wells 1-3, 4-6, 7-9 und 10-12 (bzw. 13-15) jeweils zu einem Aliquot vereinigt, gezählt und ihr Vitalitätstatus überprüft, um eine Verzerrung der Ergebnisse durch abgestorbene Zellen ausschließen zu können.

1.10 Ex-vivo-Versuche mit Synovialflüssigkeit

1.10.1 Auftauen von immortalisierten Zellen

Die immortalisierte Chondrozyten-Zelllinie TC28 wurde für die *ex-vivo*-Versuche mit Synovialflüssigkeit verwendet. Besonderer Dank gilt hierbei Herrn Prof. Dr. N. Schütze aus dem König-Ludwig-Haus in Würzburg, der ein Aliquot dieser Zelllinie für die Versuche bereitgestellt hatte. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen als Aliquot in einem Stickstofftank bei -196 °C aufbewahrt und zur Überführung auf Trockeneis transportiert. Ein langsames Antauen musste dringend vermieden werden, da das im Einfriermedium enthaltene DMSO zelltoxisch ist. Auf Grund dessen wurde das Aliquot schnell in einem ca. 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut und komplett in einer neuen Zellkulturflasche in 10 mL Medium ausgesät. Nach spätestens 24 h erfolgte ein Mediumwechsel, um das enthaltene DMSO weiter zu verdünnen.

1.10.2 Passagieren von TC28-Zellen

Die immortalisierte Zelllinie TC28 wurde in Zellkulturflaschen auf 75 cm^2 Fläche kultiviert. Wenn ca. 80 % des Flaschenbodens mit Zellen besetzt war, wurden die Zellen passagiert, um eine Phänotyp-Änderung auf Grund zu dichten Wachstums zu verhindern. Dazu musste zunächst das alte Zellkulturmedium entfernt werden. Dann wurde der Ansatz mit ca. 5 mL PBS gewaschen, um letzte Reste an Serum zu entfernen, welches im Folgenden die Aktivität des Trypsins beeinträchtigen hätte können. Unter Zugabe von 5 mL Trypsin/EDTA-Lösung in einer Konzentration von 0,25 %/0,02 % erfolgte im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO_2 die Ablösung der Zellen vom Untergrund. Wenn der Großteil der Zellen abgelöst war, wurde die Reaktion mit 10 mL IMDM mit Serumzusatz gestoppt. Eine zu kurze Trypsinierung hätte eine Selektion von Zellen zur Folge gehabt. Bei einer zu langen Reaktionszeit hätte es Probleme bei der Adhärenz der Zellen in einer neuen Zellkulturflasche geben können. Die Aussaat in eine neue Zellkulturflasche, mit enthaltenen 10 mL Zellkulturmedium mit 10 % FBS, erfolgte im Verhältnis 1:10.

1.10.3 Einfrieren von Zellen der Chondrozyten-Zelllinie TC28

Um Zellen einfrieren zu können, mussten diese zunächst, analog zum Passagieren (Experimenteller Teil C, Kap. 1.10.2), mit 5 mL Trypsin/EDTA 0,25%/0,02 % von der Zellkulturflasche abgelöst werden. Nach Stoppen der Trypsinierung mit 10 mL IMDM mit Serum wurde diese Suspension bei RT mit 300 g für 4 min in der Megafuge zentrifugiert. Nach Abdekantieren des Überstandes und Resuspension des Zellpellet mit 2,5 mL IMDM mit Serumzusatz, wurden die Zellen in einer Neubauer-Kammer gezählt. Parallel dazu wurde ein Einfrieremedium aus einer Mischung von 0,5 mL DMSO und 2,0 mL FBS hergestellt. Diese beiden Lösungen wurden im Verhältnis 1:1 vereinigt, gut durchmischt und in 1 mL-Aliquots auf mehrere 2,0 mL Kryoröhrchen aufgeteilt. Je Aliquot sollte dabei eine Gesamtzahl zwischen 5×10^5 und 1×10^6 Zellen enthalten sein. Die Kryoröhrchen wurden umgehend in den Mr. Frosty™ gestellt und im - 80 °C-Gefrierschrank in Schritten von 1 °C pro Minute über Nacht auf - 80 °C abgekühlt.

Ein schneller Ablauf des Einfrierprozesses war dabei notwendig, um einen schädigenden Einfluss des DMSO bestmöglich zu vermeiden. Die Langzeitlagerung erfolgte bei - 196 °C im Stickstofftank.

1.10.4 Vitalitätstest der Zelllinie TC28 mittels MTT-Assay

Zusätzlich zur Trypanblaufärbung, die als Indikator für das Zellüberleben dient, wurde ein 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)-Assay, zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Zellen unter den vorliegenden Testbedingungen, durchgeführt. Die Versuchsdurchführung entsprach weitgehend der nach Mosmann et al. beschriebenen [296]. Der alternative Ansatz mit DMSO als Lösungsmittel des entstehenden Produktes wurde auch vielfach beschrieben [297]. Während der routinemäßigen Passagierung der Zellen wurden nach Stopp der Trypsinierung durch serumhaltiges Medium je 0,1 mL der Zellsuspension in 18 wells einer 96-Multiwell-Platte gegeben. Dieser Ansatz wurde für 24 h im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Nach Absaugen der Zellkulturüberstände und Ersatz des Zellkulturmediums durch IMDM ohne Serumzusatz wurde die Platte für 1 h, analog

zum *ex-vivo*-Ansatz (Experimenteller Teil C, Kap. 1.9), inkubiert, um die Zellen vom tierischen Serum zu entwöhnen. Im Anschluss wurden je drei wells mit 10 ng/mL IL-1 β (Kontrolle für 100 % Zellviabilität), drei mit 0,05 μ g/mL Hydrocortison in DMSO, drei mit 10 ng/mL IL-1 β und 0,05 μ g/mL Hydrocortison in DMSO, drei mit 0,56 % DMSO im Ansatz und drei mit 10 % DMSO behandelt und 24 h im Brutschrank inkubiert. Die Konzentrationen entsprachen exakt denen der *ex-vivo*-Versuche. Reines DMSO diente als zelltoxische Positivkontrolle. Nach Ablauf der 24 h wurden jedem Ansatz 0,01 mL einer 5 mg/mL MTT-Stammlösung in PBS zugesetzt und den Zellen wurde 4 h bei 37 °C und 5 % CO₂ die Spaltung des MTT zu einem unlöslichen Formazan-Produkt ermöglicht.

Die Zellkulturüberstände wurden entfernt und das ausgefallene, bläuliche Formazan in 100 μ L DMSO gelöst. Durch häufiges Auf- und Abpipettieren wurde eine vollständige Auflösung des Produktes gewährleistet. Es zeigten sich rosa Färbungen.

Die Platte wurde bei 570 nm vermessen. Die erhaltenen Absorptionen der diversen Ansätze wurden mit den Ergebnissen der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Dabei erhielt die Kontrolle ohne Behandlung den Wert 100 % als metabolische Aktivität (Ergebnisse siehe Allgemeiner Teil B, Kap. 1.7.2).

1.10.5 Prinzip der Bestimmung

Zur Vervielfältigung der Zellen wurden diese in 75 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und mit 10 mL IMDM mit Serumzusatz kultiviert (siehe Experimenteller Teil C, Kap. 1.4). Dieses Medium entsprach nach Zugabe von 200 mmol/L L-Glutamat in seiner Zusammensetzung in den wichtigen Teilen der in der Literatur empfohlenen 1:1-Mischung aus DMEM und Ham's F12. Bei regulärer Passagierung der Zellen wurden, zusätzlich zur normalen Aussaat, in eine neue Zellkulturflasche weitere Zellsuspensionsaliquots (0,1 mL) in je 15 wells einer 24-Multiwell-Platte ausgesät, in denen 0,9 mL Zellkulturmedium vorlagen. Nach Kultivierung der Zellen bis zur Konfluenz wurde der Versuch analog zum Vorgehen bei den Primärzellen durchgeführt (Experimenteller Teil C, Kap. 1.9). Hierbei dienten die wells 1-3 ohne IL-1 β -Stimulation und die wells 4-6 mit IL-1 β -Stimulation, aber ohne weiteren Zusatz, als Kontrolle der Wirkung von IL-1 β auf die Zellkultur. Die wells 7-9

wurden zusätzlich mit 0,05 µg/mL Hydrocortisonacetat als Positivkontrolle der Hemmung der MMP13-Freisetzung versetzt. Die wells 10-12 mit 0,25 mL Synovialflüssigkeit eines Patienten nach Pycnogenol®-Einnahme in Mischung mit 0,75 mL Zellkulturmedium ohne FBS zum Vergleich mit den wells 13-15 mit Synovialflüssigkeit ohne Einnahme von Pycnogenol® in Kombination mit IMDM ohne Zusatz im selben Verhältnis stellten den eigentlichen Untersuchungsgegenstand dar (Abbildung 43, Allgemeiner Teil B, Kap. 1.6.1).

1.11 Statistische Methoden

Wenn nicht anders erwähnt, wurde zur statistischen und graphischen Auswertung die GraphPadPrism-Software in der Version 6.0 verwendet. Zur Betrachtung der Echtheit der Korrelation zweier Datensätze intervallskalierter Daten wurde der Pearsonsche Korrelationskoeffizient mit Hilfe der Online-Rechenhilfe der Firma Social Science Statistic berechnet (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.5) [401]. Die Entwicklung der Konzentrationen im Serum von Visite 1 zu Visite 2 wurden als Scatter-Plot dargestellt (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.4.1). Hierbei wurden durch die Software direkt Ausreißer erkannt.

Die Unterschiede zwischen den Gruppen der Studie in Hinblick auf den WOMAC-Score wurden mit Hilfe des Wilcoxon matched pairs-Rangsummentest auf statistische Signifikanz überprüft, da es sich bei diesen Werten um gepaarte ordinale Daten handelte (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.2.2).

Die Identifikation der Ausreißer wurde für die ΔC_t -Werte der Genexpressionsanalyse auch mit GraphPad Prism durchgeführt. Die effizienzkorrigierte, statistische Auswertung der Genexpression erfolgte, wie erwähnt, mit Hilfe der REST2009®-Software [199] (Allgemeiner Teil B, Kap. 1.3).

2 Bestimmung der Aufnahme ausgewählter Bestandteile von Pycnogenol[®] und eines Metaboliten in das Gehirn mit Hilfe eines cEND-*in-vitro*-Modells

2.1 Spezielle Reagenzien und Chemikalien

- Der Metabolit M1 (5-(3,4-dihydroxybenzyl)dihydrofuran-2(3*H*)-one) wurde im Arbeitskreis von Frau Prof. Schirmeister von Herrn Dr. Ferdinand Mats synthetisiert [402].
- Protocatechusäure, Sigma Aldrich, Taufkirchen
- Phloretin, Sigma Aldrich
- p-Cumarsäure, Sigma Aldrich
- (+)-Catechin, Sigma Aldrich
- D-(+)-Glucose, Sigma Aldrich
- Dimethylsulfoxid, Carl Roth, Karlsruhe
- Methanol (HPLC-grade), VWR, Darmstadt
- Acetonitril (HPLC-grade), VWR
- Methyl-tert-butylether (MTBE), Chemikalienausgabe, Universität Würzburg
- Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mit 3,7 g/L NaHCO₃ und 4,5 g/L D-Glucose, ohne Natriumpyruvat und mit stabilem Glutamin, Sigma Aldrich
- Penicillin/Streptomycin (50 U/mL), Biochrom AG, Berlin
- Nicht-essentielle Aminosäuren, Biochrom AG
- Milli-Q-Wasser

2.2 Geräte und Materialien

- Transwell-Filter und -Platten mit 0,4 µm Porengröße und Typ-IV-Collagen-Beschichtung (12-well), Greiner Bio-One, Frickenhausen
- Millicell-ERS, Millipore, Schwalbach
- Ultraschallbad USR 30, Merck eurolab/VWR

- Vortex Reax 1, Typ 54111, Heidolph, Schwabach
- Sterilwerkbank, HeraSafeKS 12, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
- Mischrad, Durchmesser ca. 36 cm, Eigenproduktion Werkstatt, Universität Würzburg

2.3 HPLC-Anlage und verwendete Fließmittel

Verwendet wurde eine binäre HPLC-Pumpe vom Modell 1525, ein Autosampler des Modells 717 plus und ein dualer Wellenlängendetektor, Modell 2487, der Firma Waters (Milford, MA, USA), der auf eine Messwellenlänge von 280 nm eingestellt wurde. Zur Entgasung der Fließmittel fand ein DEGASYS DG-2410-Degasser der Firma uniflows (Tokyo, Japan) Anwendung. Für die Datensammlung und -auswertung wurde die Breeze-Software in der Version 3.30 verwendet. Als Fließmittel kamen Acetonitril (HPLC-grade) und 0,2 %ige Essigsäure zum Einsatz.

2.4 Vorbereitung des murinen cEND-*in-vitro*-Modells

Die im *in-vitro*-Modell verwendete murine Gehirnendothelzelllinie cEND wurde im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. Förster nach standardisiertem Verfahren isoliert und immortalisiert [363, 364]. Die Zellen wurden auf die Einsätze von Multiwell-Platten (12-well) mit 0,4 μm Porengröße und Typ-IV-Collagenbeschichtung ausgesät und für fünf Tage in DMEM mit 10 % FBS, 2 % NEA und 50 U/mL Penicillin/Streptomycin bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Im Anschluss sind die Zellen für weitere zwei Tage in serumreduziertem Medium (2 % FBS) bis zur Konfluenz kultiviert worden. Der transendotheliale elektrische Widerstand (TEER) wurde mit Hilfe des Millicell-ERS bestimmt, um die Verwendbarkeit der Zell-Monolayer für die Transportversuche zu überprüfen. Lediglich Monolayer mit einem TEER-Wert > 100 Ω/cm^2 wurden für die Experimente verwendet, um eine ausreichende Zelldichte zu gewährleisten.

2.5 Verwendete Lösungen

Phloretin wurde, auf Grund von Löslichkeitsproblemen, statt in DMEM in DMSO für die Zellkultur gelöst. Da DMSO schon in Konzentrationen von 0,5-1,5 % [V/V] zelltoxisch ist, wurde durch hochkonzentrierte Phloretin-Lösungen möglichst wenig davon zu den Ansätzen zugesetzt (Endkonzentration: 0,25 % [V/V]). Alle anderen verwendeten Testsubstanzen wurden in DMEM ohne FBS gelöst und in Stammlösungen mit einer Konzentration von 1 mg/mL in Aliquots bei - 20 °C aufbewahrt. Für die Herstellung der Versuchs-Lösungen (Tabelle 16) wurden 10 µg/mL-Lösungen verwendet.

Tabelle 16: Im Rahmen der Permeationsversuche eingesetzte Substanzen mit jeweiligem Molekulargewicht und untersuchter Konzentration. Phloretin wurde in DMSO, alle weiteren Substanzen in DMEM ohne Serumzusatz gelöst.

Stoffname	Molekulargewicht [g/mol]	Versuchsdauer [min]	Eingesetzte Konzentration [mmol/L]
Metabolit M1	208,0	10	0,005
		30	0,005
		60	0,005
Phloretin	274,3	10	0,2
		30	0,2
		60	1,2
D-(+)-Glucose	180,2	10	100
		30	100
		60	100
(+)-Catechin	290,0	30	0,005
Protocatechusäure	154,0	30	0,005
		60	0,003

2.6 Durchführung der Transport-Experimente

In die basolateralen Kammern (untere Kammern, Akzeptor-Kammern) der 12-Multiwell-Platte wurden 1,5 mL DMEM ohne FBS und in die apikalen Kammern (obere Kammern, Donor-Kammern) jeweils 0,5 mL der Testlösung gegeben. Danach wurden die Platten über 10 min, 30 min oder 60 min bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und im Anschluss der Inhalt beider Kammern abgenommen und direkt, mit Ausnahme der Proben mit (+)-Catechin, auf Trockeneis eingefroren und bei - 80 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Alle Überstände mit (+)-Catechin wurden auf Eis transportiert, direkt weiterverarbeitet und vermessen. Vorversuche hatten ergeben, dass bei einem Einfrieren von Catechin-Proben mit Verlusten durch den Einfrier- und Auftauvorgang zu rechnen ist (Daten nicht aufgeführt).

Zur Ermittlung der Blut-Hirn-Schranken-Gängigkeit von M1 wurde eine Konzentration von 5 µmol/L in allen Versuchen eingesetzt und drei unterschiedliche Sachverhalte evaluiert (Allgemeiner Teil B, Kap. 2.5). Zunächst einmal wurden die Zellen über 10 min (n= 4), 30 min (n= 4) und 60 min (n= 3) mit M1 inkubiert und im Anschluss die Konzentrationen des Metaboliten in den apikalen und basolateralen Kammern bestimmt. Der zweite Ansatz untersuchte die gleichzeitige Inkubation der Zellen mit M1 und dem GLUT-1-Inhibitor Phloretin über 10 min (n= 4; 200 µmol/L Phloretin), 30 min (n= 4; 200 µmol/L Phloretin) und 60 min (n= 3; 1,2 mmol/L Phloretin). Ein weiterer Testlauf befasste sich mit der kompetitiven Hemmung der M1-Aufnahme durch 100 mmol/L D-(+)-Glucose, erneut über 10 min (n= 4), 30 min (n= 4) und 60 min (n= 3).

Für die Bestimmung der Permeabilität von (+)-Catechin durch die cEND-Monolayer wurde eine Konzentration von 5 µmol/L je Versuch über 30 min eingesetzt (n= 6).

Zur Analyse des Übertritts von Protocatechusäure durch das *in-vitro*-Modell der Blut-Hirn-Schranke wurden die murinen Endothelzell-Monolayer mit einer Konzentration von 5 µmol/L über 30 min (n= 6) und von 3 µmol/L über 60 min (n= 3) inkubiert.

2.7 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Um die zu analysierenden Stoffe in möglichst großer Reinheit, und mit wenigen Matrixkomponenten verunreinigt, zu erhalten, wurde eine Flüssig-Flüssig-Extraktion durchgeführt. Es wurde für den Metaboliten M1 wie folgt vorgegangen:

Aus den Restvolumina der basolateralen Kammern wurden jeweils 1,0 mL entnommen und in ein 15 mL-Probengefäß überführt. Der Ansatz wurde mit 75 μ L 1 N HCl versetzt, damit ein möglichst großer Anteil an M1 undissoziiert vorlag und damit besser in das organische Extraktionsmittel übertreten konnte. Zu jeder Probe wurden 0,3 μ mol/L p-Cumarsäure als interner Standard für die HPLC-Analyse gegeben. Als Extrahierungsmittel wurden 5 mL Methyl-tert-butylether (MTBE) verwendet, welches sich in Voruntersuchungen als bestes Auszugsmittel herausgestellt hatte und im Arbeitskreis schon häufig für ähnliche Untersuchungen erfolgreich verwendet wurde. Um eine gute Homogenisierung zu erzielen, wurde das Gemisch auf dem Mischrad bei ca. 10 U/min für 10 min rotiert, die Proben für 5 min mit 3000 g bei RT zentrifugiert und der organische, klare Überstand in ein Olivenkölbchen aus Glas überführt. Die Proben wurden unter Stickstoffatmosphäre bis zur Trockne eingedampft und der Rückstand mit 250 μ L des jeweiligen Fließmittelgemisches aufgenommen.

Bei der Analyse der Proben aus den apikalen Kammern wurden 0,4 mL des abgenommenen Überstandes analysiert und dieser Ansatz mit 30 μ L 1 mol/L HCl und 0,75 μ mol/L p-Cumarsäure versetzt. Das weitere Vorgehen entsprach dem oben aufgeführten.

Zur Aufarbeitung der (+)-Catechin-Proben wurde lediglich der pH durch Verringerung der HCl-Zugabe erhöht (50 μ L, pH~ 3,3) und bei der Verarbeitung der Protocatechusäure-Proben durch Erhöhung der Säure-Zugabe verringert (100 μ L, pH~ 2,1). Die idealen pH-Werte in den Probenansätzen wurden für jeden Stoff separat in Vorversuchen ermittelt (Daten nicht aufgeführt).

2.8 HPLC-Methoden zur Bestimmung der Stoffkonzentrationen in den apikalen und basolateralen Kammern

Es wurde eine Waters Sunfire™ C18-Säule (150 x 4.6 mm I.D.; 5 µm Partikelgröße) für alle Messungen verwendet. Für jede Testsubstanz wurde eine HPLC-Methode entwickelt und validiert (Tabelle 17, Tabelle 18).

Tabelle 17: HPLC-Methode für die Analytik des Metaboliten M1 und von (+)-Catechin.

Zeitpunkt [min]	Flussrate [mL/min]	Anteil	
		Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	1,5	88	12
bis 18.0	1,5	88	12
bis 18.5	1,5	5	95
bis 24.0	1,5	5	95
bis 24.5	1,5	88	12
bis 32.0	1,5	88	12

Tabelle 18: HPLC-Methode für die Protocatechusäure-Analytik.

Zeitpunkt [min]	Flussrate [mL/min]	Anteil	
		Fließmittel A [%]	Fließmittel B [%]
0	1,0	88	12
bis 35.0	1,0	88	12
bis 35.5	1,0	5	95
bis 42.0	1,0	5	95
bis 42.5	1,0	88	12
bis 55.0	1,0	88	12

Fließmittel A: 0,2 %ige Essigsäure

Fließmittel B: Acetonitril

Es wurde je Lauf 200 µL injiziert und ohne Temperierung der Säule, also bei RT, gearbeitet. Als interner Standard diente bei allen Versuchen p-Cumarsäure.

Zunächst wurden die zu analysierenden Stoffe isokratisch eluiert. Daran schloss sich ein Gradient bis zu einem Anteil von 95 % organischem Fließmittel an, um alle Matrixbestandteile von der Säule auszuspülen. Am Ende eines jeden Laufes erfolgte die Konditionierung der stationären Phase mit den Ausgangsbedingungen für den nächsten Test. Somit waren identische Bedingungen für alle Läufe gewährleistet.

2.8.1 Validierung der HPLC-Methoden

Bei der Validierung der Methoden wurde nach der „Guideline on bioanalytical method validation“ der EMA vorgegangen [403]. Im Folgenden werden die einzelnen Validierungsparameter aufgeführt, deren Nachweis wichtig für die Bewertung der Eignung der jeweiligen Methode für die vorliegende Fragestellung ist.

2.8.1.1 Selektivität/Spezifität

Von Selektivität spricht man, wenn mit einer Analysenmethode eine Komponente in Gegenwart anderer, potentiell störender Komponenten, nachgewiesen und quantifiziert werden kann. Spezifität ist die Fähigkeit, eine Komponente eindeutig in Anwesenheit anderer Komponenten zu identifizieren [404]. Dafür ist eine Basislinientrennung essentiell. Es zeigten sich bei keinem der drei Stoffe Überschneidungen mit Matrixbestandteilen. Damit können die jeweiligen Methoden als selektiv und spezifisch bezüglich der Testkomponenten bezeichnet werden (beispielhaft dargestellt in Abbildung 70 und Abbildung 71).

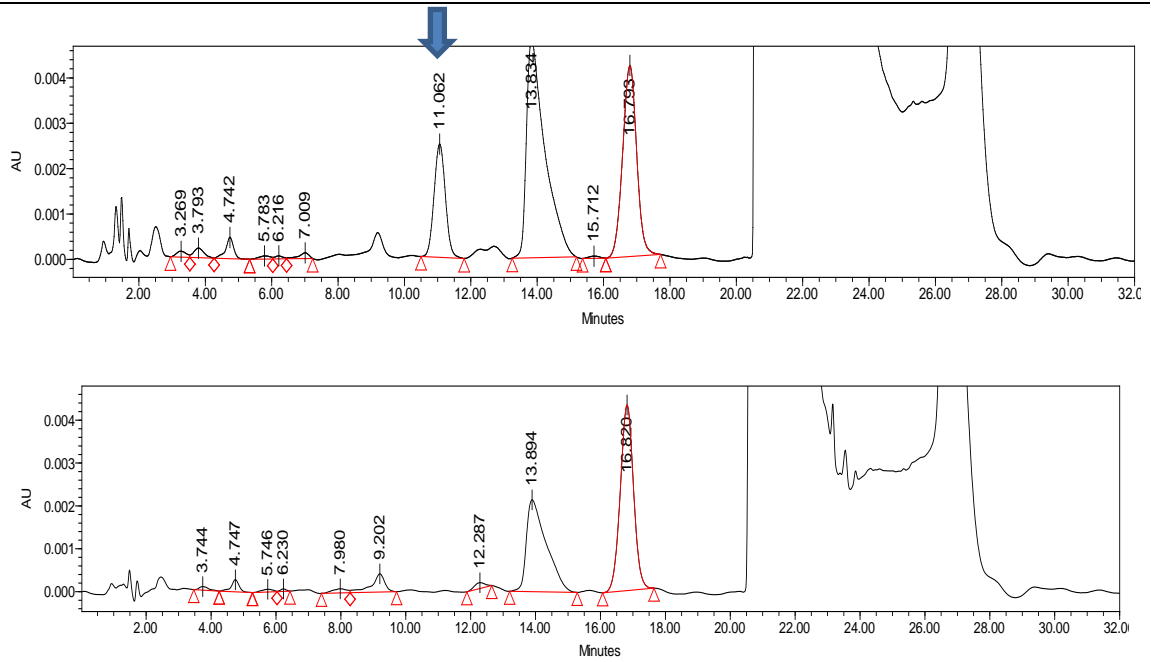


Abbildung 70: Muster-Chromatogramme von einem Blank ohne und einer Probe mit dem Metaboliten M1. Der Peak im oberen Chromatogramm bei 11,06 min stellt den M1-Peak dar, der Peak bei 16,79 min entspricht dem internen Standard p-Cumarsäure.

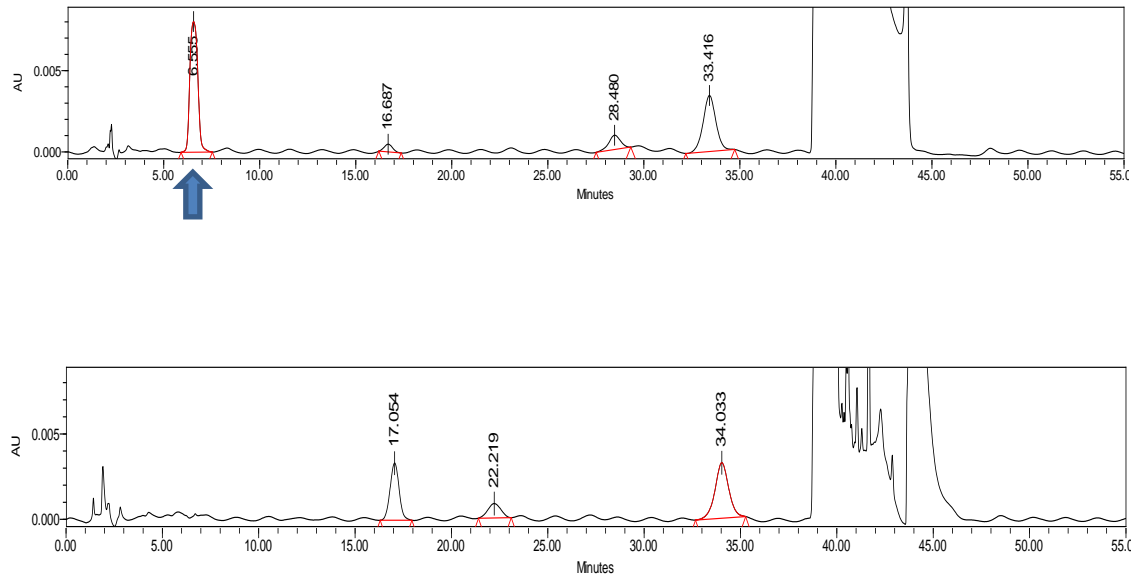


Abbildung 71: Muster-Chromatogramme von einer Probe mit und einem Blank ohne Protocatechusäure. Der Peak bei 6,56 min im oberen Chromatogramm entspricht dem Protocatechusäure-Signal, der bei 33,42 min dem Signal des internen Standards p-Cumarsäure.

2.8.1.2 Linearität/Kalibrierfunktion

Linearität bezeichnet die Fähigkeit einer Methode, Werte zu erhalten, die sich direkt proportional zur Menge Testsubstanz in der Probe verhalten [404].

Für die Validierung der Methode aus 400 µL DMEM zum Nachweis der Konzentration von M1 in der apikalen Kammer wurde mit acht unterschiedlichen Konzentrationsniveaus im Bereich 50 ng/mL bis 750 ng/mL gearbeitet, exklusive des Methanol-Blanks und des Zero-Blanks mit internem Standard. Alle Kalibrierpunkte wurden frisch hergestellt und insgesamt dreifach vermessen (n= 3). Ausnahmslos alle Kalibrierpunkte erfüllten die Kriterien der vorliegenden Leitlinie zur Linearität [403] (Tabelle 19). Das Minimum von sechs unterschiedlichen Konzentrationsniveaus wurde ebenso überschritten.

Tabelle 19: Linearitäts-Parameter der HPLC-Methode zur M1-Bestimmung aus 400 µL DMEM ohne Serumzusatz (n= 3).

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
Steigung	0,0009	0,0001
y-Abschnitt	-0,0014	0,0164
R ²	0,9977	

Die Methode zur Bestimmung der M1-Konzentration aus 1,0 mL DMEM aus der basolateralen Kammer wurde über einen Bereich von 50 ng/mL bis 600 ng/mL mit sieben verschiedenen Konzentrationsniveaus validiert, ebenso mit dreifacher Wiederholung (n= 3) jedes Kalibrierpunktes. Auch diese Methode war leitlinienkonform in Hinblick auf Linearität [403] (Tabelle 20).

Tabelle 20: Linearitäts-Parameter der HPLC-Methode zur M1-Bestimmung aus 1,0 mL DMEM ohne Serumzusatz (n= 3).

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
Steigung	0,0019	5,8 x 10 ⁻⁵
y-Abschnitt	0,0457	
R ²	0,9979	

Die Linearität der Methode zur Bestimmung von (+)-Catechin aus 400 µL Matrix wurde mit acht verschiedenen Konzentrationen im Bereich 100 ng/mL bis 1500 ng/mL überprüft. Jedes Konzentrationsniveau wurde dreifach vermessen (n= 3). Alle wichtigen Parameter lagen im akzeptablen Bereich [403] (Tabelle 21).

Tabelle 21: Linearitäts-Parameter der HPLC-Methode zur Bestimmung der (+)-Catechin-Konzentration aus 400 µL DMEM ohne Serumzusatz (n= 3).

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
Steigung	0,0004	$5,8 \times 10^{-5}$
y-Abschnitt	-0,0044	0,023
R ²	0,9977	

Bei der Untersuchung der Linearität aus 1,0 mL Matrix wurden sechs Konzentrationsniveaus dreifach vermessen (n= 3) über einen Konzentrationsbereich von 100 ng/mL bis 600 ng/mL. Die Voraussetzungen der Leitlinie [403] wurden alle erfüllt (Tabelle 22).

Tabelle 22: Linearitäts-Parameter der HPLC-Methode zur Bestimmung der (+)-Catechin-Konzentration aus 1,0 mL DMEM ohne Serumzusatz (n= 3).

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
Steigung	0,0012	0,0001
y-Abschnitt	0,00908	0,012
R ²	0,9997	

Für die Methode zur Bestimmung der Protocatechusäure-Konzentration in der apikalen Kammer wurde die Linearität über einen Bereich von 100 ng/mL bis 1000 ng/mL anhand von sechs verschiedenen Konzentrationsniveaus in Dreifachbestimmung (n= 3) untersucht. Alle Werte lagen im vorgegebenen Bereich [403] (Tabelle 23).

Tabelle 23: Linearitäts-Parameter der HPLC-Methode zur Bestimmung der Protocatechusäure-Konzentration aus 0,4 mL DMEM ohne Serumzusatz (n= 3).

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
Steigung	0,0018	$5,8 \times 10^{-5}$
y-Abschnitt	0,040	0,018
R ²	0,9977	

Die Linearität der Methode zur Analyse von Protocatechusäure aus 1,0 mL DMEM wurde über einen Konzentrationsbereich von 100 ng/mL bis 750 ng/mL durch sechs unterschiedliche Konzentrationsniveaus überprüft mit Dreifachbestimmungen der einzelnen Kalibrierpunkte (n= 3). Auch diese Werte entsprachen den Vorgaben [403] (Tabelle 24).

Tabelle 24: Linearitäts-Parameter der HPLC-Methode zur Bestimmung der Protocatechusäure-Konzentration aus 1,0 mL DMEM ohne Serumzusatz (n= 3).

Parameter	Mittelwert	Standardabweichung
Steigung	0,0047	0,0002
y-Abschnitt	0,1570	0,0486
R ²	0,9981	

Die Linearität aller Methoden wurde somit nachgewiesen.

2.8.1.3 Präzision und Richtigkeit

Die Präzision einer analytischen Methode beschreibt das Ausmaß der Übereinstimmung zwischen einer Reihe von Versuchen, generiert durch mehrfaches Probenziehen aus einer gleichartigen Probe [404].

Man unterscheidet hierbei die Intraday- und Interday-Präzision, die beide durch den Variationskoeffizienten V_k beschrieben werden. Intraday-Präzision beschreibt hierbei das Verhältnis der Werte verschiedener Messungen an einem Tag, Interday-Präzision das Ausmaß der Übereinstimmung der Werte aus Messungen an drei aufeinanderfolgenden Tagen. Für die Intraday-Präzision werden drei verschiedene Konzentrationen an einem Tag sechsmal aufgearbeitet und

vermessen. Zur Bestimmung der Interday-Präzision wird dies an sechs aufeinanderfolgenden Tagen wiederholt.

Die Richtigkeit einer Analysenmethode beschreibt das Ausmaß der Übereinstimmung zwischen den aus der Methode erhaltenen Werten (Mittelwert) und den nominalen Werten, also als richtig akzeptierte Werte [404] (Formel 4). Sie wird von systematischen Abweichungen beeinflusst [405].

Formel 4: Berechnung der Richtigkeit einer Analysenmethode in [%].

$$\text{Richtigkeit [\%]} = \frac{(\text{ermittelte Konzentration})}{(\text{eingesetzte Konzentration})} * 100$$

Auch hier unterscheidet man zwischen Intraday- und Interday-Richtigkeit.

Hierbei sollten jeweils mindestens vier Konzentrationsniveaus in fünffacher Wiederholung vermessen werden [403]. Nahezu alle Werte lagen im vorgegebenen Bereich (Richtigkeit 80-120 %; Präzision < 15 %) [403] (Tabelle 25).

Tabelle 25: Präzisions- und Richtigkeits-Parameter der jeweiligen HPLC-Methoden zur Bestimmung der Substanzkonzentrationen in den apikalen und basolateralen Kammern des *in-vitro*-Modells (n= 6). Rot=abweichend von der geforderten Norm [403].

Substanzname	Matrix-Volumen [mL]	Intraday-Präzision [%]	Intraday-Richtigkeit [%]	Interday-Präzision [%]	Interday-Richtigkeit [%]
M1	0,4	-	-	9,3	100,1
	1,0	5,0	105,3	7,5	103,0
(+)-Catechin	0,4	12,3	123,4	10,0	105,2
	1,0	-	-	13,7	105,7
Protocatechusäure	0,4	-	-	3,6	104,4
	1,0	7,4	93,1	4,8	100,6

Nur die Intraday-Präzision für die Bestimmung von (+)-Catechin aus 0,4 mL Matrix lag knapp außerhalb der Grenze, was ausschließlich den variablen Werten des LLOQ geschuldet war. Hier nahmen die Matrixbestandteile einen starken Einfluss auf die Ergebnisse. Dieser störende Effekt durch Matrixkomponenten ließ sich bei höheren Konzentrationen nicht erkennen. Die Intraday-Präzision wurde jeweils nur

für die Bestimmung aus einem Matrix-Volumen überprüft. Da sich die Methoden, außer durch das vorliegende Volumen, durch nichts unterscheiden, konnte von einer akzeptablen Präzision der weiteren Methode ausgegangen werden.

2.8.1.4 Stabilität

Um eine Fehlinterpretation der Ergebnisse durch unterschiedliche Stabilität der Testsubstanzen zu verhindern, wurden jeweils mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen Stabilitätsversuche bei den vorgegebenen Versuchsbedingungen (37 °C; 5% CO₂) im Brutschrank in Fünffachreplikaten durchgeführt (n= 5). Dabei wurden ein Konzentrationsniveau im unteren und ein Wert im oberen Bereich der Kalibriergerade getestet, wie von der Leitlinie vorgeschlagen [403].

Bei einer Konzentration von 100 ng/mL waren nach der maximalen Versuchsdauer von 60 min nur noch 52,5 % ± 10,69 % der Ausgangsmenge vorhanden (Abbildung 72, Tabelle 26). Damit bestand die Gefahr, dass eventuell geringe Mengen an übergetretener Substanz durch die Blut- Hirn- Schranke in der basolateralen Kammer nicht detektiert werden konnten.

In der Konzentration von 500 ng/mL zeigte der Metabolit M1 über den gesamten Versuchszeitraum nur leichte, akzeptable Verluste von 16,5 % ± 12,96 % der Ausgangsmenge (Abbildung 73, Tabelle 27). Damit sollte die Stabilität der Substanz in der apikalen Kammer gewährleistet gewesen sein.

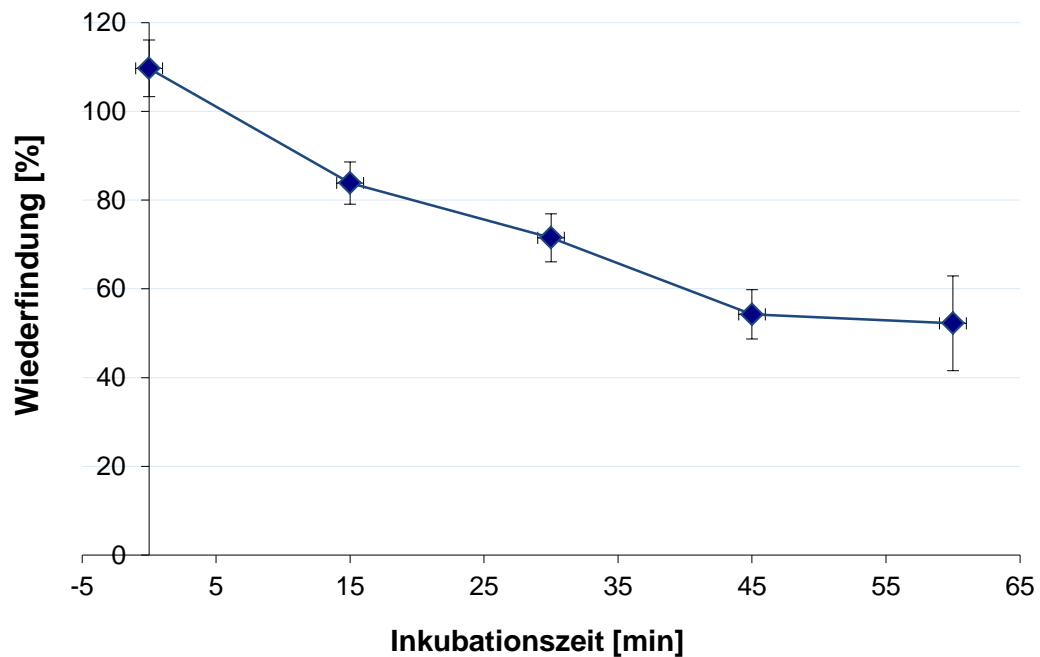


Abbildung 72: Stabilitätsverlauf einer 100 ng/mL M1-Lösung in DMEM ohne Serumzusatz. Aufgetragen sind die Mittelwerte der prozentualen Wiederfindungen (n= 5 je Messpunkt) mit Standardabweichungen gegen die Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Tabelle 26: Ergebnisse des Stabilitätstests einer 100 ng/mL M1-Lösung in DMEM ohne Serumzusatz bei 37 °C und 5 % CO₂.

Inkubationszeit [min]	eingesetzte Konzentration [ng/mL]	ermittelte Konzentration [ng/mL]	Wiederfindung [%]
0	92,6	100,3	108,3
15	92,6	77,7	83,9
30	92,6	66,2	71,5
45	92,6	50,2	54,2
60	92,6	48,4	52,2

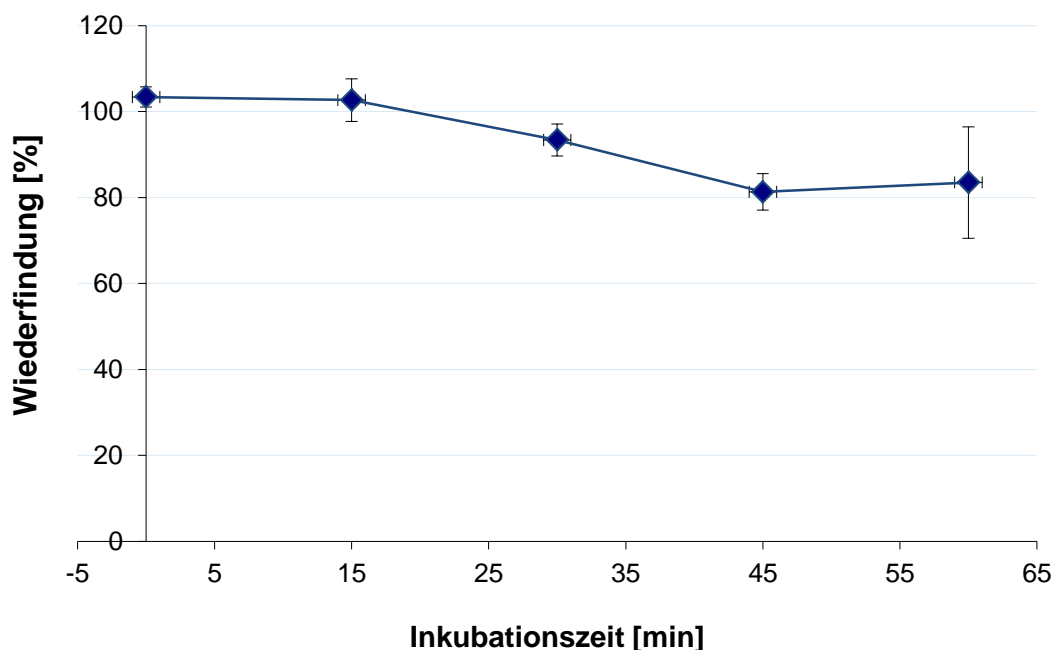


Abbildung 73: Stabilitätsverlauf einer 500 ng/mL M1-Lösung in DMEM ohne Serumzusatz. Aufgetragen sind die Mittelwerte der prozentualen Wiederfindungen (n= 5 je Messpunkt) mit Standardabweichungen gegen die Inkubationszeit im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂.

Tabelle 27: Ergebnisse des Stabilitätstest einer 500 ng/mL M1-Lösung in DMEM ohne Serumzusatz bei 37 °C und 5 % CO₂.

Inkubationszeit [min]	eingesetzte Konzentration [ng/mL]	ermittelte Konzentraion [ng/mL]	Wiederfindung [%]
0	463,0	478,6	103,4
15	463,0	475,4	102,7
30	463,0	432,4	93,4
45	463,0	376,5	81,3
60	463,0	386,6	83,5

Die Langzeitstabilitätsdaten nach Lagerung über zwei Monate bei - 20 °C zeigten keine Verluste. Die Dauer der Lagerversuche entsprach der maximalen Lagerzeit der Proben nach Versuchsdurchführung (Daten nicht aufgeführt).

Bei der Betrachtung der Stabilitätsuntersuchung von (+)-Catechin zeigte sich ein ähnliches Bild wie beim Metaboliten M1. Es waren nur noch 56,6 % ± 25,27 % der

Ausgangsmenge der 100 ng/mL-Konzentration nach 30 min enthalten (Abbildung 74, Tabelle 28). Ein mengenmäßig geringer Übertritt hätte hier ebenso wie beim M1 nicht erkannt werden können. Relevante Mengen jedoch konnten detektiert werden.

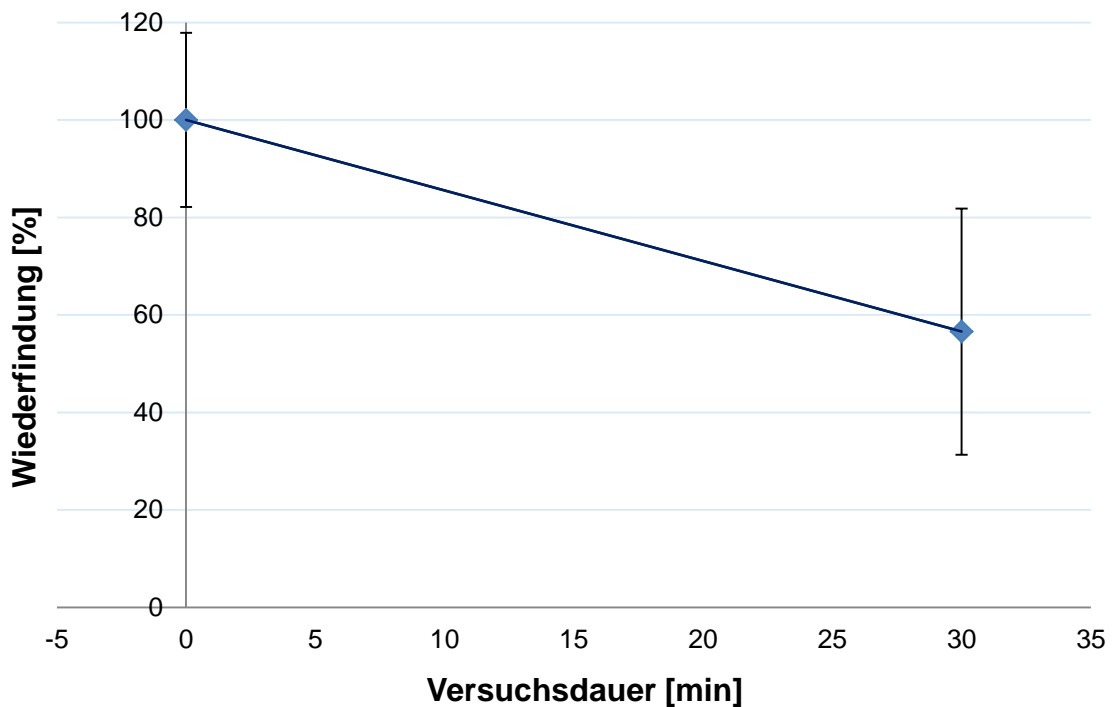


Abbildung 74: Stabilitätsverlauf einer 100 ng/mL (+)-Catechin-Lösung in DMEM ohne Serumzusatz bei 37 °C und 5 % CO₂. Aufgetragen sind die Mittelwerte der gemessenen prozentualen Wiederfindungen (n= 5 je Messpunkt) mit Standardabweichungen gegen die Versuchszeit.

Von der 500 ng/mL- Lösung waren nach 30 min Versuchszeit noch 83,40 % ± 12,4 % vorhanden (Abbildung 75, Tabelle 28). In Hinblick auf die Stabilität sollten die Konzentrations- Werte der apikalen Kammer also verlässlich sein.

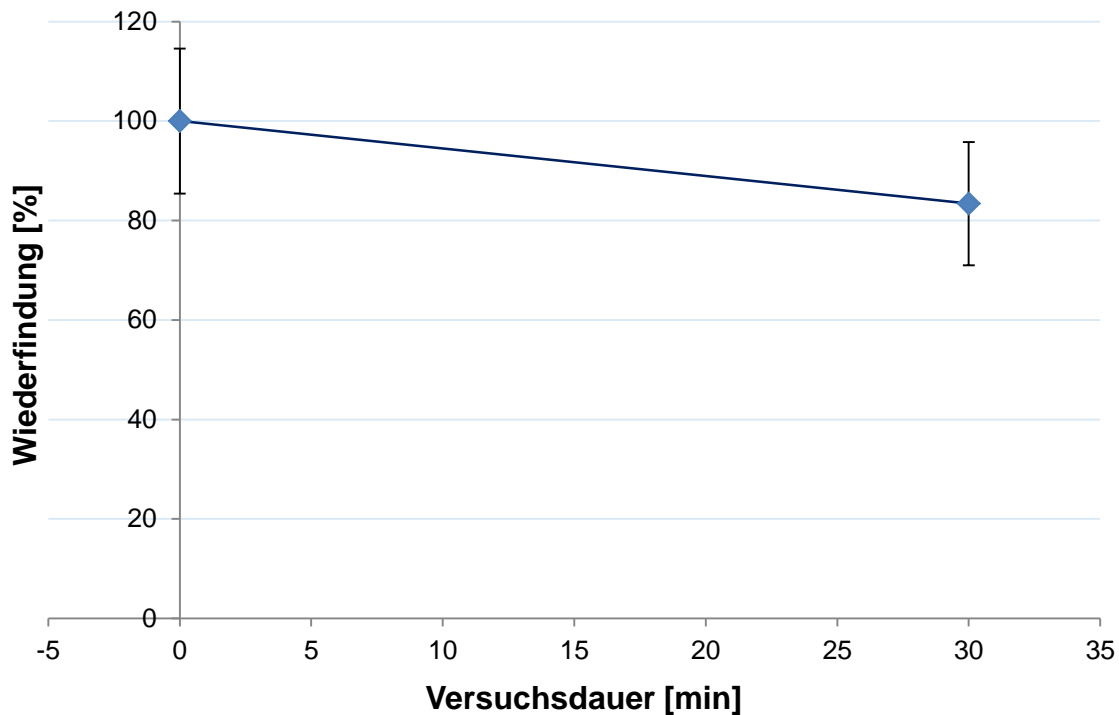


Abbildung 75: Stabilitätsverlauf einer 500 ng/mL (+)-Catechin-Lösung in DMEM ohne Serumzusatz bei 37 °C und 5 % CO₂. Aufgetragen sind die Mittelwerte der bestimmten prozentualen Wiederfindungen (n= 5 je Messpunkt) mit Standardabweichungen gegen die Versuchszeit.

Tabelle 28: Ergebnisse der Stabilitätstests von (+)-Catechin-Lösungen in DMEM ohne Serumzusatz bei 37 °C und 5 % CO₂.

eingesetzte Konzentration [ng/mL]	Versuchsdauer [min]	Wiederfindung [%]
100	0	100,0
100	30	56,6
500	0	100,0
500	30	83,4

Langzeitstabilitätsuntersuchungen waren für Catechin nicht erforderlich, da die Proben nicht gelagert, sondern direkt nach Versuchsdurchführung vermessen wurden.

Protocatechusäure war über den gesamten Versuchszeitraum in beiden Konzentrationen stabil mit nur minimalen Verlusten von $1,23 \pm 1,24$ % der

Ausgangsmenge der 100 ng/mL-Konzentration (Abbildung 76, Tabelle 29) und $4,23 \pm 7,15$ % der eingesetzten Menge bei der 500 ng/mL- Lösung (Abbildung 77, Tabelle 29).

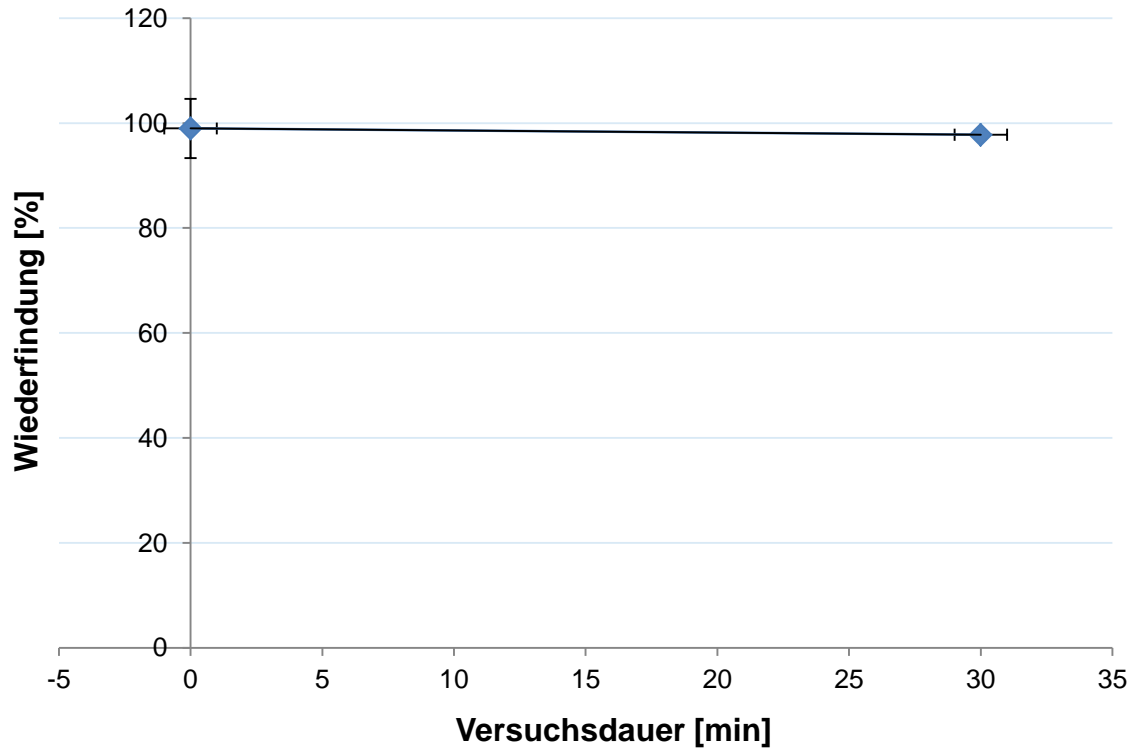


Abbildung 76: Stabilitätsverlauf einer 100 ng/mL Protocatechusäure-Lösung in DMEM ohne Serumzusatz. Im Diagramm aufgetragen sind die Mittelwerte der prozentualen Wiederfindungen (mit Standardabweichungen) zu den beiden Messzeitpunkten (je $n=5$) gegen die Versuchszeit im Inkubator bei 37 °C und 5 % CO₂.

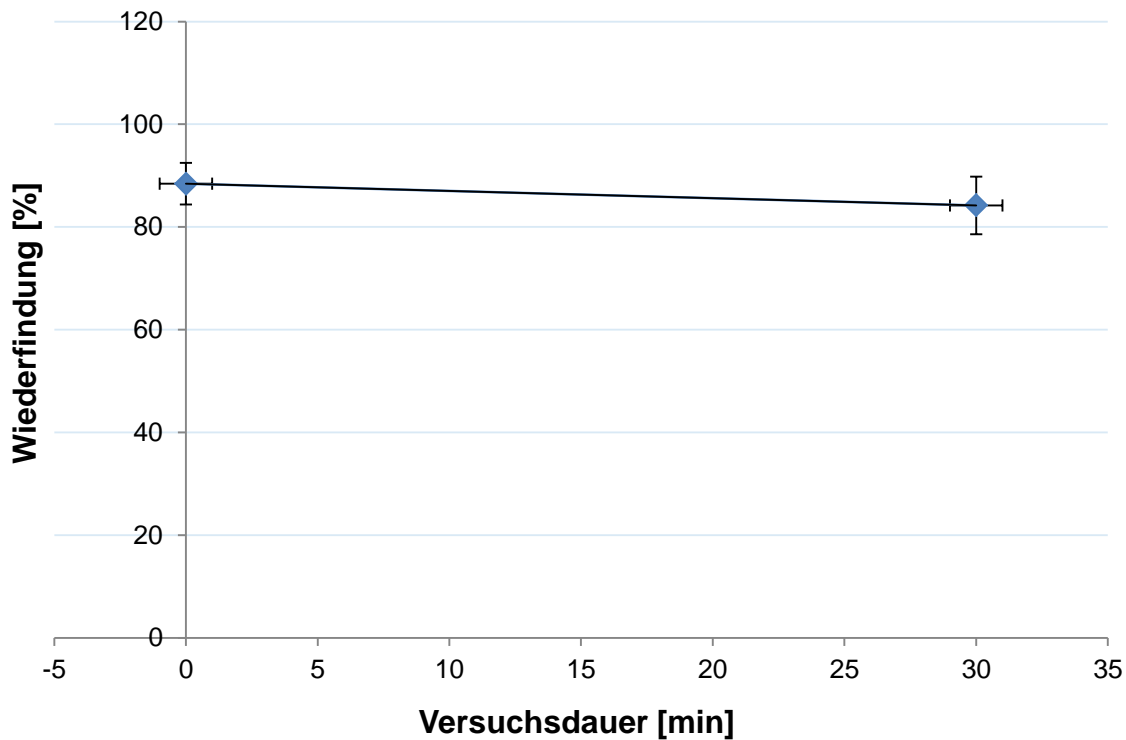


Abbildung 77: Stabilitätsverlauf einer 500 ng/mL Protocatechusäure-Lösung in DMEM ohne Serumzusatz bei 37 °C und 5 % CO₂. Aufgetragen sind hier die Mittelwerte der prozentualen Wiederfindungen (n= 5 je Messzeitpunkt) mit Standardabweichungen gegen die Versuchszeit.

Tabelle 29: Stabilitätsdaten der Protocatechusäure-Lösungen in DMEM ohne Serumzusatz (n= 5) bei 37 °C und 5 % CO₂.

eingesetzte Konzentration [ng/mL]	Versuchsdauer [min]	Wiederfindung [%]
100	0	99,0
100	30	97,8
500	0	88,4
500	30	84,2

Auch die Langzeitstabilitätswerte nach Lagerung über zwei Monate bei - 20 °C zeigten keinen signifikanten Abbau (Daten nicht aufgeführt).

2.8.1.5 Bestimmungsgrenze (LLOQ)

Unter der Bestimmungsgrenze (lower limit of quantification, LLOQ) versteht man die niedrigste Konzentration eines Analyten in der Probe, die noch verlässlich quantifiziert werden kann [404]. Am LLOQ gelten von anderen Probenkonzentrationen abweichende Grenzen für Präzision und Richtigkeit. Der V_k zur Bewertung der Präzision muss unter 20 % liegen und die Richtigkeit muss sich in den Grenzen 80 % bis 120 % bewegen [403]. Beim Metaboliten M1 konnten Konzentrationen bis minimal 50 ng/mL verlässlich nachgewiesen werden, bei (+)-Catechin und Protocatechusäure lag das LLOQ der jeweiligen analytischen Methoden bei jeweils 100 ng/mL (Tabelle 30).

Tabelle 30: Bestimmungsgrenzen der jeweiligen HPLC-Methoden für die im *in-vitro*-Modell untersuchten Substanzen gelöst in DMEM ohne Serumzusatz (Matrix) (n= 3).

Substanzname	Matrix- Volumen [mL]	LLOQ [ng/mL]	Interday- Präzision [%]	Interday- Richtigkeit [%]
M1	1,0	50	5,9	115,8
(+)-Catechin	1,0	100	1,1	93,5
Protocatechusäure	1,0	100	2,3	113,1

Ab diesen Konzentrationen konnte man also den Durchtritt der jeweiligen Substanz durch den Monolayer in die basolaterale Kammer quantifizieren. Unterhalb dieser Grenze waren die Versuchsergebnisse nicht quantifizierbar, man konnte lediglich eine Aussage treffen, ob der Stoff in der Probe vorhanden war, oder nicht.

2.8.1.6 Nachweisgrenze (LOD)

Die Nachweisgrenze (Limit of detection, LOD) einer individuellen analytischen Methode ist die kleinste Menge eines Analyten in der Probe, die zwar detektiert, aber nicht zwingend quantifiziert werden kann [404].

Bei Werten zwischen LOD und LLOQ kann lediglich eine Aussage getroffen werden, ob der Analyt in der Probe vorhanden ist, jedoch nicht in welcher Menge.

Beim Metaboliten M1 entsprach das LOD dem LLOQ, da Untersuchungen mit niedrigeren Konzentrationen, z.B. 25 ng/mL, keine M1- Peaks zeigten. Bei der Untersuchung von (+)-Catechin konnte der Analyt bis zu einer Konzentration von 30 ng/mL aus einem Volumen von 1,0 mL DMEM ohne Serumzusatz (Matrix) detektiert werden. Bei Protocatechusäure konnten lediglich 50 ng/mL im gleichen Matrixvolumen detektiert werden (Tabelle 31).

Tabelle 31: Nachweisgrenzen der jeweiligen HPLC-Methoden zur Bestimmung der Konzentration des Metaboliten M1, von (+)-Catechin und Protocatechusäure in Zellkulturüberständen (DMEM ohne Serumzusatz (Matrix)) (n= 3).

Substanzname	Matrix- Volumen	LOD
	[mL]	[ng/mL]
M1	0,4	50
	1,0	50
(+)- Catechin	0,4	100
	1,0	30
Protocatechusäure	0,4	100
	1,0	50

2.8.1.7 Extraktionseffektivität

Die Extraktionseffektivität der jeweiligen Methode berechnet sich wie folgt:

Formel 5: Ermittlung der Extraktionseffektivität der jeweiligen Flüssig-Flüssig-Extraktion.

$$\text{Extraktionseffektivität [\%]} = \frac{\left(\text{ermittelte Konzentration nach FFE} \left[\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right] \right)}{\left(\text{tatsächliche Konzentration} \left[\frac{\text{ng}}{\text{mL}} \right] \right)}$$

Beim Metaboliten M1 mit 90,1 % und bei der Protocatechusäure mit 100,1 % wurden gute Ergebnisse erzielt (Tabelle 32). Die deutlich schlechtere Effektivität von 40,4 % bei der Extraktion von (+)-Catechin aus der Matrix muss bei der Diskussion der Ergebnisse beachtet werden.

Tabelle 32: Extraktionseffektivität der jeweiligen Methoden zur Aufbereitung der einzelnen Testsubstanzen aus DMEM ohne Serumzusatz (n= 3).

Substanzname	Extraktionseffektivität [%]
M1	90,1
(+)-Catechin	40,4
Protocatechusäure	100,1

2.8.1.8 Wiederfindung

Die Wiederfindung oder Wiederfindungsrate W gibt das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert eines Analytgehaltes in Prozent an [405] (Formel 6).

Formel 6: Berechnung der Wiederfindung einer Substanz in %.

$$\text{Wiederfindung [\%]} = \frac{(a(e) \text{ (Steigung extrahierte Probe)})}{(a(s) \text{ (Steigung Standardprobe)})}$$

Mit Hilfe der Wiederfindung lassen sich Aussagen über Verluste durch Proben-Vorbereitungsschritte oder Matrixeinfluss treffen. Bei der Protocatechusäure waren bei einer Wiederfindung von 102,2 % keinerlei Verluste feststellbar. Beim Metaboliten M1 war der Verlust von 13,6 % akzeptabel, wohingegen der massive Verlust von 56,0 % bei der Aufbereitung der (+)-Catechin-Proben bei der Diskussion der Ergebnisse beachtet werden musste (Tabelle 33).

Tabelle 33: Wiederfindung der einzelnen Verfahrensmethoden zur Gewinnung der Testsubstanzen aus Zellkulturüberständen (DMEM ohne Serumzusatz (Matrix)) (n= 3).

Substanz	Matrix- Volumen [mL]	Steigung Kalibriergerade nach FFE	Steigung Kalibriergerade ohne FFE	Wiederfindung [%]
M1	1,0	0,0019	0,0022	86,4
(+)-Catechin	1,0	0,0011	0,0025	44,0
Protocatechu- säure	1,0	0,0047	0,0046	102,2

2.9 Statistische Methoden

Zum Ausschluss des Zufalls der Ergebnisse, unter Irrtumsvorbehalt ($\alpha = 5\%$), wurden statistische Tests vollzogen. Der F-Test, zum Vergleich der Varianzen, wurde jeweils für den Vergleich zweier Ergebnisreihen untereinander durchgeführt. Unter Ergebnisreihen sind hier die genauen Einzelergebnisse der Versuche mit den jeweiligen Analyten zusammengefasst, also jeweils die prozentualen Mengen der Substanzen, die an die Zellen adsorbiert bzw. darin aufgenommen wurden. Ebenso wurde dieser Test für den Vergleich der TEER-Werte der Monolayer der unterschiedlichen Ansätze verwendet (Allgemeiner Teil B, Kap. 2.5).

Je nachdem, ob ein Unterschied der Varianzen festgestellt wurde, ist im Anschluss ein zweiseitiger Student's t-Test für gleiche oder für unterschiedliche Varianzen durchgeführt worden. Die Wahl dieses Tests ist dadurch begründet, dass man hier von unabhängigen Stichproben ausgeht, die normalverteilt sind und deren Ausprägung zweiseitig sein kann. Das Signifikanzniveau α wurde für alle statistischen Tests mit 0,05 festgesetzt. Bei p-Werten $< 0,05$ sprach man von einem statistisch signifikanten Ergebnis. Die Normalverteilung wurde zuvor durch den Shapiro-Wilk-Test überprüft [406, 407]. Hier konnte man bei p-Werten $> 0,05$ von einer Normalverteilung ausgehen. Da bei manchen Versuchsreihen, auf Grund des geringen Stichprobenumfangs von $n = 3$, nicht sicher von einer Normalverteilung ausgegangen werden konnte, wurde zusätzlich ein nicht-

parametrischer Mann-Whitney-U-Test für verteilungsfreie Stichproben mit allen Vergleichspaaren durchgeführt. Damit konnten jegliche statistisch signifikanten Ergebnisse der t-Tests bestätigt werden ($p < 0,05$). Alle statistischen Tests wurden mit dem Programm Origin in der Version 9.0 (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) berechnet.

1 Pharmakodynamische Effekte eines standardisierten Kiefernrintenextraktes (Pycnogenol®) bei Osteoarthritis

1.1 Konzentration und Reinheit verwendeter RNA-Proben für die cDNA-Synthese nach Isolierung aus Chondrozyten

Proband	c ₁ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]	c ₂ [ng/μL]	Ratio [OD(260 nm)/OD(280 nm)]
102	137,84	2,03	129,2	2,02
103	65,16	2,26		
104	43,97	1,94	27,24	2,01
105	159,92	2,05	126,37	1,96
106	113,84	2,18		
107	106,2	1,95		
108	64,2	1,86		
109	54,56	1,92		
110	43,76	1,91		
112	71,04	1,98	60,36	1,79
113	191,04	2,05	174,32	2,06
114	71,12	2	65,84	2
115	81,00	2,04	79,48	1,96
116	75,48	2,02	88,28	2,01
117	97,68	2,02		
118	72,76	2,01		
119	63,28	1,99	64,16	1,98
120	31,56	1,95	28,48	1,96
121	77,84	1,96	48,48	2,02
122	99,88	2,07	87,36	2,07
124	89,96	2,04	68,72	2,04
126	96,96	2,03	93,44	2,02
127	93,56	2		
128	105,00	2,06	71,52	2,04
129	40,32	1,95		
130	124,48	2,05		
131	93,52	2,01		
132	87,16	2,05	75,48	2,04
133	79,72	2,03	88,44	2,04

1.2 Ergebnisse Primerkonzentrationstest

1.2.1 C_t-Werte des Primerkonzentrationstests für MMP-13

	C _{reverse} [nmol/L]								
C _{forward} [nmol/L]	50	100	150	200	250	375	500	750	1000
50	-								
50		-							
50			-						
100	35								
100		31,9							
100			31,4						
150	31,3								
150		29,4							
150			28,76						
200				30,18					
250					30,25				
375						27,82			
500							26,55		
750								26,1	
1000									26,64

1.2.2 C_t-Werte des Primerkonzentrationstests für Leptin

	C _{reverse} [nmol/L]								
C _{forward} [nmol/L]	50	100	150	200	250	375	500	750	1000
50	35,4								
50		32							
50			32,2						
100	33,6								
100		30,9							
100			31,5						
150	33,4								

150		31,5							
150			30,94						
200				32					
250									
375									
500							31,16		
750								30,55	
1000									31,07

1.2.3 C_r-Werte des Primerkonzentrationstests für ADAMTS-5

C _{forward} [nmol/L]	C _{reverse} [nmol/L]								
	50	100	150	200	250	375	500	750	1000
50	33,93								
50		33,87							
50			33,02						
100	31,52								
100		29,88							
100			30,08						
150	30,47								
150		29,62							
150			29,38						
200				28,58					
250					29,22				
375									
500							28,39		
750								28,05	
1000									28,09

1.2.4 C_t-Werte des Primerkonzentrationstests für IL-1β

C _{forward} [nmol/L]	C _{reverse} [nmol/L]								
	50	100	150	200	250	375	500	750	1000
50	36,1								
50		34,3							
50			33,9						
100	33								
100		30,6							
100			31						
150	32,5								
150		30,2							
150			29,81						
200				30,31					
250									
375									
500							28,96		
750								29,15	
1000									29,61

1.2.5 C_t-Werte des Primerkonzentrationstests für MMP-1

C _{forward} [nmol/L]	C _{reverse} [nmol/L]								
	50	100	150	200	250	375	500	750	1000
50	40								
50		34,29							
50			34,5						
100	34,7								
100		31,07							
100			29,55						
150	33,07								
150		29,76							

150			28,56						
200				29,37					
250					26,9				
375									
500							25,87		
750								25,41	
1000									25,4

1.2.6 C_t-Werte des Primerkonzentrationstests für MMP-3

	C _{reverse} [nmol/L]								
C _{forward} [nmol/L]	50	100	150	200	250	375	500	750	1000
50	24,64								
50		21,85							
50			21,25						
100	21,48								
100		20,23							
100			19,94						
150	21,77								
150		22,93							
150			19,8						
200				20,56					
250					19,2				
375									
500							17,4		
750								18,69	
1000									18,91

1.2.7 C_t-Werte des Primerkonzentrationstests für Cathepsin K

C _{forward} [nmol/L]	C _{reverse} [nmol/L]								
	50	100	150	200	250	375	500	750	1000
50	27,62								
50		27,24							
50			-						
100	27,73								
100		26,27							
100			26,23						
150	28,86								
150		26,74							
150			26,99						
200				26,03					
250					26,02				
375									
500							26,25		
750								26,23	
1000									26,18

1.3 Housekeeping-Genvalidierung

Referenzgen	Probe	C _t -Wert	Mittelwert	sdv
GAPDH	# 105	23,42		
	# 106	21,82		
	# 107	21,42		
	Testknie # 1	24,06		
	Testknie # 2	25,34	23,21	1,62
18sRNA	# 105	24,87		
	# 106	25,65		
	# 107	27,63		
	Testknie # 1	23,45		
	Testknie # 2	23,66	25,05	1,70
B2M	# 105	22,41		
	# 106	19,96		
	# 107	20,76		
	Testknie # 1	21,84		
	Testknie # 2	22,36	21,47	1,07
ACTB	# 105	24,36		
	# 106	22,4		
	# 107	22,77		
	Testknie # 1	24,5		
	Testknie # 2	25,34	23,87	1,24
HRPT-1	# 105	28,56		
	# 106	26,42		
	# 107	27,04		
	Testknie # 1	27,78		
	Testknie # 2	28,46	27,65	0,92
SDHA	# 105	27,27		
	# 106	25,87		
	# 107	25,91		
	Testknie # 1	27,14		
	Testknie # 2	28,01	26,84	0,93

1.4 Effizienzbestimmung

Zielgen	Effizienz [%]	Mittelwert [%]	Standardabw. [%]
MMP-1	85,0		
	102,2		
	103,1	96,77	10,20
MMP-3	99,9		
	100,4		
	97,5	99,27	1,55
MMP-13	91,1		
	99,3		
	95,4	95,27	4,10
Leptin	93,5		
	84,9		
	93,3	90,57	4,91
IL-1β	90,4		
	97,4		
	88,1	91,97	4,84
ADAMTS-5	93,1		
	100,8		
	97	96,97	3,85
Cathepsin K	100,6		
	99,5		
	99,5	99,87	0,64
ACTB	98,1		
	87,6		
	93,2	92,97	5,25
HPRT-1	92,7		
	99		
	99,1	96,93	3,67
SDHA	93,1		
	90,5		
	96,6	93,4	3,06

1.5 Genexpressionsuntersuchung

1.5.1 MMP-13

Proband	C _t (MMP-13)	C _t (ACTB)	C _t (HPRT-1)	C _t (SDHA)
102	23,15	26,4	29,51	27,64
103	25,94	23,43	27,35	27,55
104	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt
105	27,82	28,41	31,15	29,85
106	27,3	24,6	28,86	28,59
107	24,86	25,37	29,11	28,13
108	24,88	24,73	27,25	27,55
109	27,59	25,96	29,97	30,47
110	28,95	26,46	29,83	29,37
112	28,21	24,43	28,98	28,88
113	26,4	25,2	29,53	28,8
114	28,78	26,33	29,11	31,78
115	27,94	26,33	29,96	29,95
116	28,42	24,63	28	30,57
117	31,25	24,98	29,78	31,5
118	30,14	24,29	28,36	29,63
119	29	24,27	29,4	30,6
120	31,35	24,7	30,51	31,42
121	32,95	27,43	31,37	33
122	30,2	26,27	29,89	31,46
124	26,44	23,27	27,11	27,01
126	23,9	25,16	28,64	27,44
127	27,89	25,66	28,45	28,91
128	26,28	24,89	28,69	28,05
129	24,77	25,56	28,71	27,51
130	24,78	24,58	27,92	27,03
131	23,62	27,03	30,47	28,3
132	28,08	25,54	28,54	28,54
133	30,27	26,4	30,97	30,72

1.5.2 Leptin

Proband	C _t (Leptin)	C _t (ACTB)	C _t (HPRT-1)	C _t (SDHA)
102	29,05	28,25	30,73	28,75
103	31,19	24,09	27,94	28,58
104	32,3	24,8	29,38	28,88
105	34,74	28,67	30,87	29,65
106	31,76	26,21	28,96	28,96
107	32,18	25,64	28,92	28,99
108	30,06	24,73	27,45	27,71
109	34,51	26,6	29,89	30,61
110	28,68	26,65	29,77	29,31
112	33,12	25,31	29	29,25
113	35,38	25,6	28,59	27,51
114	36,18	27,39	29,01	31,76
115	31,71	25,43	28,73	28,73
116	33,93	25,24	28,39	30,95
117	32,82	25,56	30,13	31,87
118	32,66	24,95	28,73	30
119	33,72	24,84	29,75	30,96
120	30,66	25,26	30,86	31,8
121	28,99	28,04	31,76	33,46
122	38,27	26,87	30,29	31,87
124	37,46	23,84	27,49	27,42
126	34,35	25,74	28,98	27,82
127	30,78	26,18	28,8	29,32
128	33,12	25,47	29,03	28,47
129	37,44	26,13	29,06	27,88
130	34,73	25,12	28,3	27,45
131	29,47	27,62	30,83	28,72
132	30,51	26,12	28,9	28,6
133	31,21	26,96	31,39	31,12

1.5.3 IL-1 β

Proband	C _t (IL-1 β)	C _t (ACTB)	C _t (HPRT-1)	C _t (SDHA)
102	26,52	28,79	31,25	29,21
103	27,5	25,27	28,47	28,67
104	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt
105	29,13	28,52	31,25	30,42
106	29,7	25,99	29,28	28,61
107	25,85	25,77	29,7	29,14
108	28,58	25,25	27,54	27,71
109	32,11	26,86	29,58	30,74
110	27,91	26,26	29,28	29,06
112	30,61	25,83	29,05	29,48
113	28,91	25,72	28,45	27,83
114	29,2	27,91	29,6	32,12
115	30,48	25,43	28,73	28,73
116	28,66	25,24	28,39	30,95
117	32,16	25,25	29,92	31,97
118	31,46	24,95	28,73	30
119	31,14	24,46	29,88	31,16
120	30,42	25,3	30,91	31,53
121	28,69	28,04	31,76	33,46
122	33,07	26,87	30,29	31,87
124	27,91	23,84	27,49	27,42
126	26,73	25,74	28,98	27,82
127	28,33	26,18	28,8	29,32
128	27,85	25,47	29,03	28,47
129	28,82	26,13	29,06	27,88
130	26,7	25,12	28,3	27,45
131	27,69	27,62	30,83	28,72
132	30,39	26,12	28,9	28,6
133	30,91	26,96	31,39	31,12

1.5.4 ADAMTS-5

Proband	C _t (ADAMTS-5)	C _t (ACTB)	C _t (HPRT-1)	C _t (SDHA)
102	28,7	25,95	29,32	27,91
103	25,82	22,64	27	27,1
104	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt
105	29,43	26,47	30,94	29,86
106	28,71	25,78	30	29,04
107	27,52	25,71	29,57	28,16
108	26,26	23,77	27,12	27,34
109	26,02	25,19	29,22	30,19
110	28,25	25,82	28,92	28,9
112	27,63	24,73	28,48	28,96
113	26,4	23,34	27,06	26,2
114	26,88	25,42	27,84	30,32
115	28,41	24,2	27,95	27,88
116	26,72	23,97	27,62	30,1
117	26,63	24,05	29,16	31,1
118	25,98	23,63	27,92	29,16
119	26,62	23,24	29,08	30,33
120	27,43	24,04	30,11	30,67
121	29,33	26,77	30,91	32,56
122	27,95	25,64	29,48	30,98
124	26,56	22,68	26,71	26,6
126	27,34	24,58	28,23	26,97
127	27,07	25,07	28,02	28,49
128	27,74	24,31	28,29	27,62
129	26,08	24,92	28,3	27,04
130	27,19	23,97	27,53	26,61
131	27,3	26,47	30,02	27,83
132	29,02	24,91	28,11	27,73
133	29,78	25,78	30,57	30,26

1.5.5 MMP-1

Proband	C _t (MMP-1)	C _t (ACTB)	C _t (HPRT-1)	C _t (SDHA)
102	23,58	27,3	30,43	28,57
103	23,72	24,14	27,82	27,99
104	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt
105	25,56	27,02	30,79	28,83
106	24,23	25,13	28,44	27,54
107	21,99	25,85	28,85	27,84
108	19,36	22,85	25,63	25,97
109	28,84	25,83	29,15	30,39
110	26,33	25,77	28,48	29,12
112	28,3	26,14	28,68	28,86
113	25,83	24,55	28,07	27,22
114	28,83	25,89	27,81	30,22
115	25,63	24,36	27,87	27,94
116	31,54	24,95	28,63	30,62
117	33,52	25,14	29,28	31,29
118	30,97	23,96	28,47	30,04
119	32,22	23,89	29,04	30,38
120	32,22	24,02	29,91	30,68
121	30,87	24,94	29,96	31,79
122	30,97	26	30,01	31,15
124	22,72	22,97	26,63	27,08
126	20,02	24,37	28,22	27,35
127	22	24,57	27,92	28,04
128	22,98	25,16	28,59	28,01
129	20,75	24,92	28,3	27,04
130	20,68	24,11	27,54	27,05
131	21,52	26,56	29,4	27,93
132	23,71	24,41	27,98	27,66
133	27,41	25,76	30,39	29,55

1.5.6 MMP-3

Proband	C _t (MMP-3)	C _t (ACTB)	C _t (HPRT-1)	C _t (SDHA)
102	17,14	27,3	30,43	28,57
103	17,55	24,33	28,5	28,6
104	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt
105	20,04	27,02	30,79	28,83
106	18,83	25,13	28,44	27,54
107	18,06	25,85	28,85	27,84
108	14,67	22,85	25,63	25,97
109	20,05	25,83	29,15	30,39
110	19,31	25,77	28,48	29,12
112	19,49	26,14	28,68	28,86
113	18,21	24,34	28,1	27,39
114	19,52	25,89	27,81	30,22
115	18,11	24,36	27,87	27,94
116	18,46	24,95	28,63	30,62
117	21,5	25,14	29,28	31,29
118	19,24	23,76	28,84	30,37
119	21,9	23,84	29,16	30,65
120	21,92	24,02	29,91	30,68
121	21,71	24,94	29,96	31,79
122	22,25	26	30,01	31,15
124	15,59	22,97	26,63	27,08
126	15,74	24,37	28,22	27,35
127	17,77	24,57	27,92	28,04
128	16,93	25,16	28,59	28,01
129	16,44	24,92	28,3	27,04
130	16,04	24,11	27,54	27,05
131	17,62	26,56	29,4	27,93
132	17,02	24,41	27,98	27,66
133	19,28	25,76	30,39	29,55

1.5.7 Cathepsin K

Proband	C _t (CatK)	C _t (ACTB)	C _t (HPRT-1)	C _t (SDHA)
102	26,67	27,3	30,43	28,57
103	26,34	24,33	28,5	28,6
104	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt	verunreinigt
105	28,37	27,02	30,79	28,83
106	27,17	25,13	28,44	27,54
107	26,26	25,85	28,85	27,84
108	25,08	22,85	25,63	25,97
109	27,8	25,83	29,15	30,39
110	29,07	25,77	28,48	29,12
112	26,85	26,14	28,68	28,86
113	25,74	24,34	28,1	27,39
114	25,93	25,89	27,81	30,22
115	27,28	24,36	27,87	27,94
116	26,14	24,95	28,63	30,62
117	27,49	25,14	29,28	31,29
118	25,71	23,76	28,84	30,37
119	26,66	23,84	29,16	30,65
120	25,78	24,02	29,91	30,68
121	28,29	24,94	29,96	31,79
122	27,51	26	30,01	31,15
124	26,11	22,97	26,63	27,08
126	26,89	24,37	28,22	27,35
127	26,69	24,57	27,92	28,04
128	27,78	25,16	28,59	28,01
129	26,71	24,92	28,3	27,04
130	26,74	24,11	27,54	27,05
131	25,22	26,56	29,4	27,93
132	25,9	24,41	27,98	27,66
133	27,27	25,76	30,39	29,55

Tabelle 1.5.1-1.5.7: Grün= Pycnogenol®-Patienten, Rot= Kontrollen

1.6 Konzentrationen von Entzündungsmarkern im Serum und in der Synovialflüssigkeit

1.6.1 Konzentrationsentwicklungen diverser Marker im Serum

1.6.1.1 *Leptin*

Probe	Konzentration [ng/mL]	Serum V2-Serum V1 [ng/mL]
101 Serum V1	8,26	
101 Serum V2	8,61	0,35
102 Serum V1	8,93	
102 Serum V2	3,46	-5,47
103 Serum V1	26,92	
103 Serum V2	24,15	-2,76
104 Serum V1	6,32	
104 Serum V2	10,23	3,91
105 Serum V1	20,18	
105 Serum V2	17,78	-2,40
106 Serum V1	27,73	
106 Serum V2	32,43	4,70
107 Serum V1	4,86	
107 Serum V2	5,47	0,61
108 Serum V1	5,97	
108 Serum V2	5,66	-0,31
109 Serum V1	21,58	
109 Serum V2	32,51	10,93
110 Serum V1	19,82	
110 Serum V2	20,23	0,41
111 Serum V1	74,30	
111 Serum V2	71,94	-2,36
112 Serum V1	3,27	
112 Serum V2	3,08	-0,19
113 Serum V1	6,22	
113 Serum V2	13,68	7,45
114 Serum V1	25,70	

D Tabellarischer Anhang

114 Serum V2	27,93	2,22
115 Serum V1	29,99	
115 Serum V2	29,31	-0,68
116 Serum V1	10,21	
116 Serum V2	9,10	-1,11
117 Serum V1	13,80	
117 Serum V2	11,69	-2,11
118 Serum V1	4,45	
118 Serum V2	3,83	-0,62
119 Serum V1	13,18	
119 Serum V2	19,14	5,96
120 Serum V1	3,25	
120 Serum V2	3,69	0,44
121 Serum V1	35,24	
121 Serum V2	32,43	-2,81
122 Serum V1	26,24	
122 Serum V2	23,88	-2,36
124 Serum V1	8,02	
124 Serum V2	8,69	0,67
126 Serum V1	2,26	
126 Serum V2	4,02	1,76
127 Serum V1	17,91	
127 Serum V2	15,03	-2,88
128 Serum V1	3,01	
128 Serum V2	2,99	-0,02
129 Serum V1	21,23	
129 Serum V2	17,78	-3,45
130 Serum V1	7,74	
130 Serum V2	9,71	1,97
131 Serum V1	12,82	
131 Serum V2	11,80	-1,02
132 Serum V1	45,08	
132 Serum V2	57,68	12,59
133 Serum V1	12,33	
133 Serum V2	11,51	-0,82

1.6.1.2 MMP-13

Probe	Konzentration [pg/mL]	Serum V2-Serum V1 [pg/mL]
101 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
101 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
102 Serum V1	37,58	
102 Serum V2	41,69	4,11
103 Serum V1	100,93	
103 Serum V2	71,61	-29,32
104 Serum V1	5,47	
104 Serum V2	6,00	0,53
105 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
105 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
106 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
106 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
107 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
107 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
108 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
108 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
109 Serum V1	849,18	
109 Serum V2	866,96	17,78
110 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
110 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
111 Serum V1	42,95	
111 Serum V2	70,96	28,01
112 Serum V1	35,65	
112 Serum V2	63,68	28,03
113 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
113 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
114 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
114 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
115 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
115 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
116 Serum V1	unterhalb 1. Standard	

D Tabellarischer Anhang

116 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
117 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
117 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
118 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
118 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
119 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
119 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
120 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
120 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
121 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
121 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
122 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
122 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
124 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
124 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
126 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
126 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
127 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
127 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
128 Serum V1	61,94	
128 Serum V2	130,62	68,67
129 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
129 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
130 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
130 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
131 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
131 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
132 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
132 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
133 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
133 Serum V2	unterhalb 1. Standard	

1.6.1.3 ADAMTS-5

Probe	Konzentration [ng/mL]	Serum V2-Serum V1 [ng/mL]
101 Serum V1	62,14	
101 Serum V2	63,57	1,43
102 Serum V1	5	
102 Serum V2	26,43	21,43
103 Serum V1	32,14	
103 Serum V2	43,57	11,43
104 Serum V1	50,71	
104 Serum V2	26,43	-24,28
105 Serum V1	39,29	
105 Serum V2	32,14	-7,15
106 Serum V1	43,57	
106 Serum V2	92,14	48,57
107 Serum V1	27,86	
107 Serum V2	19,29	-8,57
108 Serum V1	60,71	
108 Serum V2	27,86	-32,85
109 Serum V1	40,71	
109 Serum V2	0	-40,71
110 Serum V1	72,14	
110 Serum V2	16,43	-55,71
112 Serum V1	9,29	
112 Serum V2	10,71	1,43
113 Serum V1	125	
113 Serum V2	37,86	-87,14
114 Serum V1	95	
114 Serum V2	151	56,00
115 Serum V1	61	
115 Serum V2	137	76,00
116 Serum V1	193	
116 Serum V2	247	54,00

D Tabellarischer Anhang

117 Serum V1	105	
117 Serum V2	197	92,00
118 Serum V1	91	
118 Serum V2	73	-18,00
119 Serum V1	189	
119 Serum V2	259	70,00
120 Serum V1	107	
120 Serum V2	119	12,00
121 Serum V1	333	
121 Serum V2	243	-90,00
122 Serum V1	149	
122 Serum V2	107	-42,00
124 Serum V1	195	
124 Serum V2	271	76,00
126 Serum V1	183	
126 Serum V2	313	130,00
127 Serum V1	221	
127 Serum V2	91	-130,00
128 Serum V1	109	
128 Serum V2	191	82,00
129 Serum V1	61	
129 Serum V2	121	60,00
130 Serum V1	211	
130 Serum V2	57	-154,00
131 Serum V1	165	
131 Serum V2	245	80,00
132 Serum V1	313	
132 Serum V2	125	-188,00
133 Serum V1	149	
133 Serum V2	191	42,00

1.6.1.4 MMP-3

Probe	Konzentration [ng/mL]	Serum V2-Serum V1 [%]
101 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
101 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
102 Serum V1	2,40	
102 Serum V2	2,00	-16,63
103 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
103 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
104 Serum V1	8,34	
104 Serum V2	4,51	-45,92
105 Serum V1	3,24	
105 Serum V2	4,07	25,60
106 Serum V1	3,02	
106 Serum V2	4,21	39,32
107 Serum V1	3,37	
107 Serum V2	2,92	-13,10
108 Serum V1	2,08	
108 Serum V2	2,15	3,28
109 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
109 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
110 Serum V1	3,70	
110 Serum V2	3,56	-3,62
111 Serum V1	2,54	
111 Serum V2	2,75	8,39
112 Serum V1	0	
112 Serum V2	2,63	100
113 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
113 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
114 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
114 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
115 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
115 Serum V2	unterhalb 1. Standard	

D Tabellarischer Anhang

116 Serum V1	1,27	
116 Serum V2	1,53	20,78
117 Serum V1	1,27	
117 Serum V2	2,15	69,04
118 Serum V1	1,30	
118 Serum V2	1,70	31,22
119 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
119 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
120 Serum V1	1,90	
120 Serum V2	2,32	22,18
121 Serum V1	4,26	
121 Serum V2	3,54	-16,82
122 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
122 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
124 Serum V1	unterhalb 1. Standard	
124 Serum V2	unterhalb 1. Standard	
126 Serum V1	5,66	
126 Serum V2	6,18	9,14
127 Serum V1	3,40	
127 Serum V2	3,65	0,24
128 Serum V1	4,02	
128 Serum V2	3,39	-15,67
129 Serum V1	4,82	
129 Serum V2	6,46	1,64
130 Serum V1	8,09	
130 Serum V2	9,53	1,44
131 Serum V1	3,67	
131 Serum V2	3,60	-0,08
132 Serum V1	9,04	
132 Serum V2	5,86	-3,18
133 Serum V1	2,91	
133 Serum V2	2,80	-0,11

1.6.2 Konzentration von Markern der Knorpelhomöostase in der Synovialflüssigkeit der Teilnehmer der Osteoarthritis-Studie.

Grün= Pycnogenol®-Patienten, Rot= Kontrollen

Probe	MMP-13 [ng/mL]	MMP-3 [ng/mL]	ADAMTS- 5L [ng/mL]	Leptin [ng/mL]	MMP-1 [ng/mL]	ADAMTS-4 [ng/mL]	sCD163 [ng/mL]
101	34,04	8,75	8,05	10,47	16,60	-	208,45
102	275,42	6,84	7,53	3,33	16,48	73,79	278,65
103	81,66	3,40	37,76	33,42	6,79	14,06	135,52
104	130,32	7,76	4,20	4,22	9,93	-	227,51
105	243,78	5,78	15,81	19,01	-	22,34	178,26
106	-	-	8,32	26,86	-	-	262,42
107	93,97	7,33	3,21	9,48	19,91	-	237,68
108	147,91	10,19	-	-	-	-	-
109	457,09	2,96	19,01	58,75	-	74,82	293,76
110	158,49	11,09	8,05	21,93	10,47	27,48	284,45
112	94,41	6,90	2,73	5,50	9,82	-	144,90
113	147,91	-	4,69	4,09	18,20	9,95	178,65
114	693,43	2,48	4,69	12,97	-	9,93	264,28
115	250,03	5,32	4,30	14,79	7,76	29,92	-
116	243,22	6,81	8,19	9,06	14,13	9,68	196,36
117	226,46	5,37	3,46	3,95	4,88	-	259,45
118	149,28	-	9,93	1,73	2,69	100,93	255,89
119	160,32	-	15,96	12,02	16,44	11,83	398,16
120	-	-	-	-	-	-	-
121	-	7,16	-	-	-	-	-
122	285,76	8,39	5,65	17,38	6,43	-	-
124	314,77	7,46	3,37	5,15	30,00	4,89	95,07
126	181,55	5,14	3,37	1,22	-	10,91	163,31
127	383,71	7,55	4,03	15,81	8,47	7,33	142,89
128	180,30	5,31	6,47	2,32	25,71	40,83	231,24
129	527,23	9,02	3,89	18,24	4,07	11,83	153,13
130	363,92	6,61	10,57	5,22	-	30,69	323,64
131	144,88	13,65	12,88	13,21	18,45	10,89	141,93
132	406,44	8,63	1,73	46,67	5,51	17,06	80,73
133	445,66	7,18	8,85	9,84	20,28	21,38	231,24

1.6.3 Konzentration von Abbauprodukten in der Synovialflüssigkeit der Probanden

Probe	CTX-II [pg/mL]	Helix-II [nmol/L]	sGAG [µg/mL]
101	352,37	0,59	420,21
102	809,10	2,65	306,23
103	532,11	2,19	211,25
104	1674,94	2,14	359,42
105	289,73	1,10	382,22
106	-	3,94	481,00
107	390,84	0,10	386,02
108	-	-	-
109	475,34	2,53	359,42
110	231,74	1,04	378,42
112	43,15	0,10	363,22
113	90,36	0,36	378,42
114	53,95	0,33	386,02
115	24,66	0,56	492,40
116	53,95	1,25	386,02
117	10,00	1,13	329,03
118	178,24	2,92	469,60
119	73,45	0,15	340,43
120	-	-	-
121	-	-	-
122	17,95	0,10	336,63
124	236,05	0,10	321,43
126	154,53	0,34	340,43
127	101,39	0,40	351,82
128	400,87	1,10	454,41
129	123,59	0,27	348,02
130	325,84	1,21	344,22
131	174,18	0,44	416,41
132	827,94	0,05	370,82
133	1199,50	1,14	424,01

1.7 Ex-vivo-Untersuchungen

1.7.1 Ex-vivo-Versuche mit Serum und humanen primären Chondrozyten bzw. TC28-Zellen

1.7.1.1 MMP-3

Probe	Mittelwert MMP-3-Konzentration [ng/mL] im Überstand (normiert auf $1 \cdot 10^5$ Zellen) (n=3)	Standardabweichung [ng/mL]
102 01-03	988,41	267,79
102 04-06	1100,61	328,25
102 07-09	3713,69	725,39
102 10-12	3322,48	497,40
103 01-03	541,27	133,46
103 04-06	969,88	107,06
103 07-09	4230,41	528,98
103 10-12	4038,88	295,66
104 01-03	489,61	64,44
104 04-06	1208,46	283,52
104 07-09	4728,47	1092,82
104 10-12	4317,20	1013,13
105 01-03	431,12	13,43
105 04-06	990,86	33,81
105 07-09	3055,90	398,27
105 10-12	3118,34	340,94
106 01-03	587,62	59,79
106 04-06	1108,47	138,78
106 07-09	3353,59	672,79
106 10-12	3130,19	1220,54
107 01-03	1978,38	462,61
107 04-06	2549,24	457,90
107 07-09	7699,97	1658,63
107 10-12	6502,24	431,53
108 01-03	1691,55	467,42
108 04-06	2194,14	477,67
108 07-09	4488,90	1351,09
108 10-12	3462,06	630,83
109 01-03	1391,46	109,37

109 04-06	5189,44	514,56
109 07-09	6361,05	296,13
109 10-12	7131,85	267,01
109 13-15	7602,15	145,14
110 01-03	802,93	200,62
110 04-06	3117,58	1018,24
110 07-09	3517,73	1357,89
110 10-12	4604,64	458,59
110 13-15	4407,34	436,97
112 01-03	592,86	69,01
112 04-06	1679,45	133,77
112 07-09	2090,34	265,02
112 10-12	3190,77	149,78
112 13-15	2850,33	469,78
113 01-03	974,36	317,34
113 04-06	2257,98	341,90
113 07-09	2139,97	170,83
113 10-12	3718,18	365,06
113 13-15	3312,52	120,66
115 01-03	607,38	345,93
115 04-06	1350,50	469,69
115 07-09	1274,45	221,82
115 10-12	2267,93	560,34
115 13-15	2541,28	351,12
118 01-03	375,87	36,66
118 04-06	1172,24	15,27
118 07-09	1129,13	143,01
118 10-12	1362,85	38,66
118 13-15	1299,68	44,91
124 01-03	846,67	157,61
124 04-06	726,93	79,78
124 07-09	1367,79	128,96
124 10-12	3735,71	719,23
124 13-15	4017,75	578,15
126 01-03	1617,01	366,94
126 04-06	1803,20	353,58
126 07-09	3533,10	770,82
126 10-12	5180,78	915,80
126 13-15	4761,67	1188,39
127 01-03	1850,41	491,16
127 04-06	3866,64	1374,84

D Tabellarischer Anhang

127 07-09	3725,75	1061,88
127 10-12	5099,81	783,33
127 13-15	4810,74	1425,95
128 01-03	914,77	65,63
128 04-06	1728,44	154,68
128 07-09	1847,60	53,21
128 10-12	2765,07	431,56
128 13-15	3134,94	242,34
129 01-03	1484,10	371,22
129 04-06		
129 07-09	3376,73	649,66
129 10-12	5660,84	1096,67
129 13-15	6362,14	1819,22
130 01-03	1543,31	329,81
130 04-06	2676,46	1097,36
130 07-09	3373,79	1391,14
130 10-12	3618,61	763,49
130 13-15	4009,65	832,89
131 01-03		
131 04-06	3991,21	609,16
131 07-09	3754,99	811,91
131 10-12	4334,84	493,30
131 13-15	4309,46	546,41
132 01-03	717,37	349,76
132 04-06	1249,86	250,42
132 07-09	1091,06	135,30
132 10-12	1645,44	415,58
132 13-15	1604,51	139,96
133 01-03	526,26	77,33
133 04-06	1418,22	223,19
133 07-09	1170,11	132,79
133 10-12	1521,15	177,21
133 13-15	1455,61	163,29

1.7.1.2 MMP-13

Probenbezeichnung	MMP-13-Konzentration [pg/mL] im Überstand (normiert auf $1 \cdot 10^5$ Zellen)	verwendete Zellen
EV-S-01 01	10,45	TC28
EV-S-01 04	138,57	TC28
EV-S-01 07	7,76	TC28
EV-S-01 10 (101 V1)	55,39	TC28
EV-S-01 13 (101 V2)	18,17	TC28
EV-S-01 16 (114 V1)	25,19	TC28
EV-S-01 19 (114 V2)	50,10	TC28
102 01	300,69	Chondrozyten #102
102 04	1122,32	Chondrozyten #102
102 07	873,21	Chondrozyten #102
102 10	729,65	Chondrozyten #102
103 01	201,50	Chondrozyten #103
103 04	3983,53	Chondrozyten #103
103 07	1133,10	Chondrozyten #103
103 10	1052,61	Chondrozyten #103
104 01	184,97	Chondrozyten #104
104 04	1037,76	Chondrozyten #104
104 07	794,50	Chondrozyten #104
104 10	494,42	Chondrozyten #104
105 01	351,67	Chondrozyten #105
105 04	914,39	Chondrozyten #105
105 07	507,14	Chondrozyten #105
105 10	513,02	Chondrozyten #105
106 01	384,92	Chondrozyten #106
106 04	1400,79	Chondrozyten #106
106 07	1005,48	Chondrozyten #106
106 10	914,90	Chondrozyten #106
107 01	770,11	Chondrozyten #107
107 04	3262,52	Chondrozyten #107

D Tabellarischer Anhang

107 07	1251,85	Chondrozyten #107
107 10	1554,37	Chondrozyten #107
108 01	198,89	Chondrozyten #108
108 04	1293,01	Chondrozyten #108
108 07	398,66	Chondrozyten #108
108 10	396,83	Chondrozyten #108
109 01	870,24	Chondrozyten #109
109 04	7089,41	Chondrozyten #109
109 07	2452,68	Chondrozyten #109
109 10	3031,38	Chondrozyten #109
109 13	2385,83	Chondrozyten #109
110 01	363,38	Chondrozyten #110
110 04	2590,35	Chondrozyten #110
110 07	1359,44	Chondrozyten #110
110 10	2872,95	Chondrozyten #110
110 13	3975,20	Chondrozyten #110
112 01	64,86	Chondrozyten #112
112 04	3459,04	Chondrozyten #112
112 07	696,55	Chondrozyten #112
112 10	1741,63	Chondrozyten #112
112 13	1782,19	Chondrozyten #112
113 01	219,54	Chondrozyten #113
113 04	1967,68	Chondrozyten #113
113 07	635,50	Chondrozyten #113
113 10	2900,76	Chondrozyten #113
113 13	2419,33	Chondrozyten #113
115 01	36,29	Chondrozyten #115
115 04	2059,49	Chondrozyten #115
115 07	525,73	Chondrozyten #115
115 10	1129,17	Chondrozyten #115
115 13	1066,01	Chondrozyten #115
116 01	4,21	Chondrozyten #116
116 04	105,55	Chondrozyten #116
116 07	3,14	Chondrozyten #116
116 10	4,21	Chondrozyten #116

D Tabellarischer Anhang

116 13	19,43	Chondrozyten #116
118 01	unterhalb 1. Standard!	Chondrozyten #118
118 04	1089,07	Chondrozyten #118
118 07	179,91	Chondrozyten #118
118 10	104,25	Chondrozyten #118
118 13	106,92	Chondrozyten #118
EV-S-02 01	13,79	TC28
EV-S-02 04	76,20	TC28
EV-S-02 07	16,70	TC28
EV-S-02 10 (119 V1)	60,50	TC28
EV-S-02 13 (119 V2)	54,92	TC28
EV-S-02 16 (120 V1)	76,94	TC28
EV-S-02 19 (120 V2)	43,76	TC28
EV-S-03 01	19,78	TC28
EV-S-03 04	49,38	TC28
EV-S-03 07	26,01	TC28
EV-S-03 10 (117 V1)	155,61	TC28
EV-S-03 13 (117 V2)	70,10	TC28
EV-S-03 16 (121 V1)	43,40	TC28
EV-S-03 19 (121 V2)	25,10	TC28
122 01	unterhalb 1. Standard!	Chondrozyten #122
122 04	77,43	Chondrozyten #122
122 07	unterhalb 1. Standard!	Chondrozyten #122
122 10	0,19	Chondrozyten #122
122 13	4,13	Chondrozyten #122
124 01	111,03	Chondrozyten #124
124 04	832,62	Chondrozyten #124
124 07	376,23	Chondrozyten #124
124 10	627,26	Chondrozyten #124
124 13	366,82	Chondrozyten #124
126 01	246,48	Chondrozyten #126
126 04	1647,37	Chondrozyten #126
126 07	523,35	Chondrozyten #126
126 10	954,53	Chondrozyten #126
126 13	1022,80	Chondrozyten #126

D Tabellarischer Anhang

127 01	243,18	Chondrozyten #127
127 04	891,11	Chondrozyten #127
127 07	242,62	Chondrozyten #127
127 10	378,38	Chondrozyten #127
127 13	562,25	Chondrozyten #127
128 01	315,92	Chondrozyten #128
128 04	1160,32	Chondrozyten #128
128 07	371,17	Chondrozyten #128
128 10	606,15	Chondrozyten #128
128 13	565,69	Chondrozyten #128
129 01	427,37	Chondrozyten #129
129 04	2397,73	Chondrozyten #129
129 07	765,25	Chondrozyten #129
129 10	1078,45	Chondrozyten #129
129 13	678,89	Chondrozyten #129
130 01	449,18	Chondrozyten #130
130 04	1350,27	Chondrozyten #130
130 07	346,28	Chondrozyten #130
130 10	489,13	Chondrozyten #130
130 13	412,50	Chondrozyten #130
131 01	2235,89	Chondrozyten #131
131 04	3894,49	Chondrozyten #131
131 07	1381,82	Chondrozyten #131
131 10	1041,00	Chondrozyten #131
131 13	1271,89	Chondrozyten #131
132 01	43,98	Chondrozyten #132
132 04	261,35	Chondrozyten #132
132 07	62,41	Chondrozyten #132
132 10	323,02	Chondrozyten #132
132 13	173,87	Chondrozyten #132
133 01	137,89	Chondrozyten #133
133 04	460,81	Chondrozyten #133
133 07	119,54	Chondrozyten #133
133 10	169,25	Chondrozyten #133
133 13	163,88	Chondrozyten #133

Legende zu den Tabellen der Unterpunkte 1.7.1.1 und 1.7.1.2:

Konzentration im Zellkulturüberstand beim Ansatz ohne IL-1 β -Stimulation

Konzentration im Zellkulturüberstand beim Ansatz mit IL-1 β -Stimulation (10 ng/mL)

Konzentration im Zellkulturüberstand beim Ansatz mit Hydrocortison (0,05 μ g/mL) als
Positivkontrolle

Konzentration im Zellkulturüberstand beim Ansatz mit Serum der Visite 1 (V1) 1:1-
verdünnt mit IMDM ohne Serumzusatz (vor Pycnogenol[®]-Einnahme)

Konzentration im Zellkulturüberstand beim Ansatz mit Serum der Visite 2 (V2) 1:1-
verdünnt mit IMDM ohne Serumzusatz (nach Pycnogenol[®]-Einnahme bzw. bei
Kontrollen ohne Pycnogenol[®]-Einnahme)

1.7.2 Ex-vivo-Versuche mit Synovialflüssigkeit und TC28-Zellen

1.7.2.1 MMP-13

Probenbezeichnung	MMP-13-Konzentration [pg/mL]
EV-SF-03 01	31,18
EV-SF-03 04	229,58
EV-SF-03 07 (HC)	35,03
EV-SF-03 10 (103)	250,45
EV-SF-03 13 (104)	545,49
EV-SF-04 01	111,93
EV-SF-04 04	281,15
EV-SF-04 07 (HC)	39,70
EV-SF-04 10 (105)	190,40
EV-SF-04 13 (112)	344,96
EV-SF-05 01	19,81
EV-SF-05 04	97,98
EV-SF-05 07 (HC)	46,63
EV-SF-05 10 (109)	153,64
EV-SF-05 13 (110)	350,10
EV-SF-06 01	48,81
EV-SF-06 04	181,85
EV-SF-06 07 (HC)	37,12
EV-SF-06 10 (113)	265,96
EV-SF-06 13 (114)	376,20
EV-SF-01 01	24,56
EV-SF-01 04	179,55
EV-SF-01 07 (HC)	25,52
EV-SF-01 10 (107)	238,85
EV-SF-02 01	1,79
EV-SF-02 04	56,45
EV-SF-02 07 (HC)	2,35
EV-SF-02 10 (101)	254,66
EV-SF-02 13 (102)	300,50

EV-SF-07 01	64,84
EV-SF-07 04	186,49
EV-SF-07 07 (HC)	37,33
EV-SF-07 13 (115)	123,58
EV-SF-07 16 (116)	223,61
EV-SF-07 19 (117)	282,16
EV-SF-07 22 (118)	152,23
EV-SF-08 01	13,67
EV-SF-08 04	96,18
EV-SF-08 07 (HC)	12,62
EV-SF-08 10 (119)	292,93
EV-SF-08 13 (122)	234,84
EV-SF-08 16 (124)	279,85
EV-SF-08 19 (126)	180,33
EV-SF-08 22 (128)	157,49
EV-SF-09 01	11,19
EV-SF-09 04	81,86
EV-SF-09 07 (HC)	9,59
EV-SF-09 10 (127)	188,26
EV-SF-09 13 (129)	188,70
EV-SF-09 16 (130)	460,18
EV-SF-09 19 (131)	23,50
EV-SF-09 22 (132)	34,30
EV-S-03 22 (133)	223,75

Legende zur Tabelle des Unterpunktes 1.7.2.1:

Konzentration im Zellkulturüberstand beim Ansatz ohne IL-1 β -Stimulation

Konzentration im Zellkulturüberstand beim Ansatz mit IL-1 β -Stimulation (10 ng/mL)

Konzentration im Zellkulturüberstand beim Ansatz mit Hydrocortison (0,05 μ g/mL) als
Positivkontrolle

Konzentration im Zellkulturüberstand beim Ansatz mit Synovialflüssigkeit 1:4-
verdünnt mit IMDM ohne Serumzusatz (Kontrollpatient)

Konzentration im Zellkulturüberstand beim Ansatz mit Synovialflüssigkeit 1:4-
verdünnt mit IMDM ohne Serumzusatz (nach Pycnogenol[®]-Einnahme)

2 Ergebnisse der Transportversuche mit dem cEND-*in-vitro*-Modell

2.1 Metabolit M1

2.1.1 Ergebnisse der Versuche über 10 min

Substanz	Ansatz	Prozentualer Anteil (aufgenommen/gebunden)
M1 ohne Zusatz	1	50,42
	2	47,81
	3	47,69
	4	54,60
M1 + Phloretin (200 µM)	1	51,45
	2	48,35
	3	51,04
	4	50,19
M1 + Glucose (100 mM)	1	42,85
	2	38,21
	3	44,22
	4	41,27

2.1.2 Ergebnisse der Versuche über 30 min

Substanz	Ansatz	Prozentualer Anteil (aufgenommen/gebunden)
M1 ohne Zusatz	1	57,49
	2	56,96
	3	57,00
	4	52,80
M1 + Phloretin (200 µM)	1	50,56
	2	48,71
	3	52,51
	4	52,05
M1 + Glucose (100 mM)	1	50,22
	2	50,17
	3	49,15
	4	46,34

2.1.3 Ergebnisse der Versuche über 60 min

Substanz	Ansatz	Prozentualer Anteil (aufgenommen/gebunden)
M1 ohne Zusatz	1	85,53
	2	85,57
	3	88,60
M1 + Phloretin (1,2 mM)	1	62,83
	2	64,30
	3	65,56
M1 + Glucose (100 mM)	1	78,07
	2	81,50
	3	82,25

2.2 Ergebnisse für (+)-Catechin nach 30 min

Substanz	Ansatz	Prozentualer Anteil (aufgenommen/gebunden)
(+)-Catechin	1	58,89
(ohne Zusatz)	2	57,85
	3	54,11
	4	52,45
	5	59,61
	6	53,00

2.3 Ergebnisse für Protocatechusäure

2.3.1 Ergebnisse der Versuche über 30 min

Substanz	Ansatz	Prozentualer Anteil (aufgenommen/gebunden)
Protocatechusäure	1	12,50
(ohne Zusatz)	2	0
	3	8,85
	4	0
	5	0
	6	4,04

2.3.2 Ergebnisse der Versuche über 60 min

Substanz	Ansatz	Prozentualer Anteil (aufgenommen/gebunden)
Protocatechusäure	1	30,22
(ohne Zusatz)	2	40,48
	3	36,36

Zusammenfassung

In klinischen Studien wurden bereits positive Effekte des standardisierten Kiefernrintenextrakts Pycnogenol[®] auf die Symptome von Patienten mit milden Formen von Kniegelenks-Osteoarthritis ermittelt; hauptsächlich ausgedrückt durch Senkung des WOMAC-Scores. Der hinter dieser Symptomverbesserung zu Grunde liegende Mechanismus wurde jedoch noch nicht untersucht. Deshalb sollten in der vorliegenden Arbeit erstmalig die zellulären pharmakodynamischen Effekte des Nahrungsergänzungsmittels, in Hinblick auf wichtige Marker der Knorpelhomöostase, untersucht werden. Hierfür wurden 30 Patienten mit schweren Gonarthrose-Formen und Indikation zum Kniegelenksersatz in eine randomisiert-kontrollierte Studie eingeschlossen.

Die genaue Ursache der Erkrankung Osteoarthritis ist bis heute nicht geklärt, jedoch gilt ein Ungleichgewicht von Knorpelaufbau und –abbau in den betroffenen Gelenken als einer der zentralen Parameter der Pathogenese. Diese Imbalance resultiert in einem sukzessiven Knorpelverlust, der mit einem Entzündungsgeschehen im ganzen Gelenk, also auch unter Beteiligung von Synovium und subchondralen Knochen, einhergeht. Eine wichtige Rolle spielen hierbei die matrix-abbauenden Enzyme MMPs und ADAMTS sowie proinflammatorische Mediatoren, z.B. das IL-1 β . Nach dreiwöchiger Einnahme von 200 mg Pycnogenol[®] am Tag, konnten wir, im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe, eine Senkung der relativen Genexpression von MMP-1, MMP-3 und MMP-13 im Knorpelgewebe feststellen. Bei MMP-3 und MMP-13 war diese Reduktion signifikant. Ebenso wurde die relative Expression von IL-1 β statistisch signifikant gesenkt. Im Rahmen der Untersuchung der Entwicklung von Markerkonzentrationen im Serum im Verlauf der Studie wurde eine signifikante Senkung der ADAMTS-5-Konzentrationen bei behandelten Patienten, im Vergleich zur Kontrollgruppe, offenbar. Weiterhin wurden die MMP-13-Konzentrationen im Serum positiv durch Einnahme des Rindenextraktes beeinflusst. In der Körperflüssigkeit, die dem Erkrankungsgeschehen am nächsten kommt, der Synovialflüssigkeit, konnten ebenso hemmende Effekte auf knorpelabbauende Enzyme nach Einnahme von Pycnogenol[®] beobachtet werden. Hierbei sah man niedrigere Konzentrationen der Marker MMP-1 und MMP-13 sowie der Abbaumarker von Typ-II-Collagen und von Aggrecan in den Gelenkflüssigkeiten der Verum- im

Vergleich zu denen der Kontrollgruppe. Im Rahmen von *ex-vivo*-Versuchen zeigten sich mit beiden Spezimen keine Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen. Die beobachteten Tendenzen konnten durch Korrelationsanalysen untermauert werden.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit liefern den ersten Ansatz zum Verständnis der zellulären Mechanismen, die für die positiven Einflüsse des standardisierten Kiefernrintenextraktes auf die Symptomatik der Gonarthrose verantwortlich sind. Weitere Studien mit einer größeren Studienpopulation und einer Anwendung von Pycnogenol® über einen längeren Zeitraum sind nötig, um diese zellulären Geschehnisse zu bestätigen und näher zu untersuchen. Auf Grund des günstigen Nebenwirkungsprofils von Pycnogenol® ist eine Langzeittherapie zur Verzögerung eines erstmaligen Kniegelenkersatzes durchaus denkbar. Dies hätte den Vorteil, dass das betroffene Gelenk weniger oft ausgetauscht werden müsste, was wegen der begrenzten Haltbarkeit in etwa alle 10 Jahre geschieht.

Aus epidemiologischen Studien ist schon seit Längerem bekannt, dass eine hohe tägliche Aufnahme von Polyphenolen über die Nahrung zu geringeren Inzidenzraten neurologischer Erkrankungen, wie z.B. Morbus Parkinson oder Morbus Alzheimer, führt. Auch Pycnogenol® hat *in-vivo* schon positive Effekte auf diverse neurologische Erkrankungsgeschehen gezeigt. Um zu verstehen, welcher Inhaltsstoff bzw. welche Inhaltsstoffe und/oder Metabolite die Blut-Hirn-Schranke passieren und für diese Wirkungen verantwortlich sein könnten, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe eines cEND-*in-vitro*-Modells die Blut-Hirn-Schrankengängigkeit ausgewählter Bestandteile des Extraktes und des Metaboliten M1 untersucht. Dabei zeigte keine der untersuchten Substanzen unter den gewählten Versuchsbedingungen einen quantifizierbaren Übertritt durch den Zellkultur-Monolayer. Auf Grund unserer Versuche ist jedoch eine Aufnahme des M1 und von (+)-Catechin in die Endothelzellen durchaus denkbar. Diese Aufnahme scheint für den M1, in erleichterter Form, durch den GLUT-1-Transporter zu verlaufen.

Die positiven Effekte des Nahrungsergänzungsmittels auf neurologische Erkrankungen scheinen nicht durch direkte Einwirkungen im Gehirn selbst verursacht zu werden. Eine stabilisierende Wirkung auf die BHS, die eine wichtige Barriere zum Schutz des Gehirns vor äußeren Einflüssen ist, scheint dafür eine plausiblere

Erklärung zu sein. Weiterführende *in-vivo*-Tierversuche können darüber Aufschluss geben.

Zusammenfassend konnte mit der vorliegenden Arbeit ein Beitrag zur Aufklärung der zellulären Effekte des standardisierten Kiefernridenextraktes bei schwerer Kniegelenks-Osteoarthritis geleistet werden. Zusätzlich konnten wir, mit Hilfe eines rationalen Ansatzes zur Ermittlung der Blut-Hirn-Schrankengängigkeit ausgewählter Inhaltsstoffe von Pycnogenol[®], das Verständnis für die positiven Wirkungen von Pycnogenol[®] im Rahmen neurologischer Erkrankungen erweitern.

Summary

In clinical trials, positive effects of standardized pine bark extract (Pycnogenol®) on symptoms of patients with mild forms of knee osteoarthritis were already seen, mostly identified by reduction of WOMAC scores. The underlying mechanisms were not investigated so far. Because of that, in the present work the cellular pharmacodynamic effects of the dietary supplement Pycnogenol® with regard to important markers of cartilage homeostasis should be observed. Therefore, 30 patients with severe forms of knee osteoarthritis, who had an indication for knee replacement surgery, were included.

The precise cause of osteoarthritis is so far unknown, but an imbalance of buildup and depletion of cartilage in affected joints is considered to be a hallmark of pathogenesis. This imbalance results in successive loss of tissue, which goes along with inflammatory processes in the whole joint, also affecting synovium and subchondral bone. Here, matrix-degrading enzymes like MMPs and ADAMTS, as well as inflammatory mediators, e.g. IL-1 β , play important roles. After daily intake of 200 mg Pycnogenol® over three weeks, reductions of relative gene expressions of MMP-1, MMP-3 and MMP-13 were observed. Regarding MMP-3 and MMP-13, this reduction was statistically significant. Relative gene expression of IL-1 β was also diminished significantly. In context of the investigation of marker concentration developments in serum we observed a statistically significant reduction of ADAMTS-5 concentrations during the clinical trial in treated patients in relation to controls. Furthermore, MMP-13 concentrations were positively influenced by oral intake of pine bark extract. Regarding synovial fluid, the body fluid next to disease events, we also determined modulating effects through intake of Pycnogenol®. Here we could observe lower levels of MMP-1 and MMP-13, as well as of markers of degradation of aggrecan and type II collagen, in joint fluids of patients who took Pycnogenol® in relation to control group. In context of *ex-vivo*-approaches, including both kinds of samples, no differences were observed between the two study groups. The observed tendencies could be confirmed by correlation analysis.

The results of the present work provide a first approach to understand the cellular mechanisms, which are responsible for the positive influences of standardized pine bark extract on symptoms of gonarthrosis. More clinical trials with greater study

populations and longer intake of Pycnogenol[®] are needed to confirm the observed cellular effects and to investigate them in more detail. Because of good side effect profile, long-term use of pine bark extract for delaying the date of knee replacement surgery seems possible. Renewing affected joints less often, which takes place around every ten years, would be the advantage of this time lag.

From epidemiological studies we know for quite some time that high daily intakes of polyphenols via food result in lower incidence rates of neurological disorders, like e.g. Parkinson's disease and Alzheimer's disease. Pycnogenol[®] also has already shown positive effects on neurological disturbances *in-vitro* and *in-vivo*. To understand, which ingredient or which ingredients and/or metabolites, respectively, are responsible for these effects, we measured the blood-brain barrier permeability of selected components of Pycnogenol[®] and its metabolite M1 in the present work by means of a cEND *in-vitro* model of this barrier. None of the investigated substances showed a quantifiable transfer through cell culture monolayers under present conditions. On basis of our approaches, an uptake of M1 and (+)-catechine in endothelial cells is reasonable, however. In this context, a facilitated uptake of M1 through GLUT-1 transporters seems likely.

Positive influences of the dietary supplement on neurological disorders seem not to be caused by direct effects in brain. A stabilizing impact on the blood-brain barrier, which protects the brain from external influences, could be a more likely explanation. Further *in-vivo* animal studies possibly could shed more light on this issue.

In summary the present work could make a contribution to the elucidation of the cellular mechanisms of standardized maritime pine bark extract in severe gonarthrosis of the knee. Additionally we could enlarge, by means of a rational approach to determine the blood-brain barrier permeability of selected ingredients of Pycnogenol[®], the understanding of the positive impacts of Pycnogenol[®] in neurological disorders.

F Abkürzungsverzeichnis

In der vorliegenden Arbeit wurden folgende Abkürzungen verwendet:

- Abb. Abbildung
- A β Amyloid-beta
- ACTB β -Actin
- ADAMTS Human "A Disintegrin and Metalloproteinase with Thrombospondin Motifs"
- AJ Adherens junctions
- B2M β_2 -Mikroglobulin
- bFGF basic fibroblast growth factor
- BHS Blut-Hirn-Schranke
- bzw. beziehungsweise
- ca. circa
- cDNA komplementäre Desoxyribonukleinsäure
- cEND zerebrale Hirnendothelzelllinie
- COX Cyclooxygenase
- DMEM Dulbecco's Modified Essentiell Medium
- DMMB Dimethylmethylenblau
- DMSO Dimethylsulfoxid
- DNA Desoxyribonukleinsäure
- dsDNA doppelsträngige Desoxyribonukleinsäure
- EGCG (-)-Epigallocatechin-3-gallat
- EMA European Medicines Agency
- EZM Extrazelluläre Matrix
- FBS Fötale Bovines Serum
- GAPDH Glyceralaldehyd-3-phosphat
- GLUT-1 Glucosetransporter 1
- HCl Salzsäure
- HPLC High Performance Liquid Chromatography
- HPRT-1 Hypoxanthin-phosphoribosyl-Transferase I
- i.d.R. in der Regel

- IL Interleukin
- IMDM Iscove's Modified Essentiell Medium
- iNOS induzierbare NO-Synthase
- LC-MS/MS Flüssigchromatographie mit Tandem-Massenspektrometrie
- LLOQ Lower-Limit of Quantification
- LPS Lipopolysaccharide
- M1 Metabolit M1
- MAO Monoaminoxidase
- MDCK Madin-Darbin canine kidney-Zelllinie
- Min Minute(n)
- mL Milliliter
- MMP Matrix-Metalloproteinase
- NA Noradrenalin
- NEA Nicht-essentielle Aminosäuren
- NF- κ B nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells
- Ng Nanogramm
- NO Stickstoffmonoxid
- OA Osteoarthritis
- OATP Organo- Anion- Transporter
- PBS Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
- PC12 Phäochromozytom-Zelllinie auf Rattenbasis
- PSA polar surface area (polare Oberfläche)
- RNA Ribonukleinsäure
- ROS Reaktive Sauerstoff-Spezies
- rpm rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
- RT Raumtemperatur
- SDHA Succinat-Dehydrogenase-Komplex
- SLC solute carrier
- Tab. Tabelle
- TEER Transendothelial electrical resistance
- T/E Trypsin/EDTA

- TGF β Transforming Growth Factor β
- TJ Tight junctions
- TNF- α Tumornekrose-Faktor α
- UDP Uridindiphosphat
- USA Vereinigte Staaten von Amerika
- V_k Variationskoeffizient
- WHO World Health Organization
- ZNS Zentrales Nervensystem
- ZO Zonula occludens

-
1. Brooks, P.M., *The burden of musculoskeletal disease - a global perspective*. Clinical Rheumatology, 2006. **25**(6): p. 778-781.
 2. Fuchs, J., M. Rabenberg, and C. Scheidt-Nave, *Prevalence of selected musculoskeletal conditions in Germany. Results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1)*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2013. **56**(5-6): p. 678-686.
 3. Cross, M., et al., *The global burden of hip and knee osteoarthritis: estimates from the Global Burden of Disease 2010 study*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2014. **73**(7): p. 1323-1330.
 4. Felson, D.T., et al., *Osteoarthritis: New Insights. Part 1: The Disease and Its Risk Factors*. Annals of Internal Medicine, 2000. **133**(8): p. 635-646.
 5. Chen, A., et al., *The Global Economic Cost of Osteoarthritis: How the UK Compares*. Arthritis, 2012. **2012**: p. 698709.
 6. Mobasheri, A., *Intersection of Inflammation and Herbal Medicine in the Treatment of Osteoarthritis*. Current Rheumatology Reports, 2012. **14**(6): p. 604-616.
 7. Green, J.A., et al., *The potential for dietary factors to prevent or treat osteoarthritis*. The Proceedings of the Nutrition Society, 2014. **73**(2): p. 278-88.
 8. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Osteoarthritis*. Journal of Cellular Physiology, 2007. **213**(3): p. 626-634.
 9. Goldring, M.B., *The role of the chondrocyte in osteoarthritis*. Arthritis and Rheumatism, 2000. **43**(9): p. 1916-1926.
 10. Catterall, J.B., et al., *Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254)*. Arthritis Research & Therapy, 2010. **12**(6): p. 9.
 11. Richmond, S.A., et al., *Are Joint Injury, Sport Activity, Physical Activity, Obesity, or Occupational Activities Predictors for Osteoarthritis? A Systematic Review*. Journal of Orthopaedic & Sports Physical Therapy, 2013. **43**(8): p. 515-524.
 12. Roos, E.M. and L. Dahlberg, *Positive effects of moderate exercise on glycosaminoglycan content in knee cartilage - A four-month, randomized controlled trial in patients at risk of osteoarthritis*. Arthritis and Rheumatism, 2005. **52**(11): p. 3507-3514.
 13. Chen, B., et al., *Association between severity of knee osteoarthritis and serum and synovial fluid interleukin 17 concentrations*. Journal of International Medical Research, 2014. **42**(1): p. 138-144.
 14. Ringdahl, E. and S. Pandit, *Treatment of Knee Osteoarthritis*. American Family Physician, 2011. **83**(11): p. 1287-1292.
 15. Conaghan, P.G., et al., *Guidelines - Care and management of osteoarthritis in adults: summary of NICE guidance*. British Medical Journal, 2008. **336**(7642): p. 502-503.
 16. Umlauf, D., et al., *Cartilage biology, pathology, and repair*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2010. **67**(24): p. 4197-4211.
 17. Lequesne, M.G., et al., *Indexes of Severity for Osteoarthritis of the hip and knee. Validation-value in Comparison with other Assessment Tests*. Scandinavian Journal of Rheumatology. Supplement, 1987. **65**: p. 85-9.

-
18. Lequesne, M., *Indexes of Severity and Disease-Activity for Osteoarthritis*. Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1991. **20**(6): p. 48-54.
 19. Stucki, G., et al., *Comparison of the WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities) osteoarthritis index and a self-report format of the self-administered Lequesne-Algofunctional index in patients with knee and hip osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage, 1998. **6**(2): p. 79-86.
 20. Bellamy, N., et al., *Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee*. Journal of Rheumatology, 1988. **15**(12): p. 1833-1840.
 21. Baron, G., et al., *Validation of a short form of the western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index function subscale in hip and knee osteoarthritis*. Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research, 2007. **57**(4): p. 633-638.
 22. Zhang, W., et al., *OARSI recommendations for the management of hip and knee osteoarthritis Part III: changes in evidence following systematic cumulative update of research published through January 2009*. Osteoarthritis and Cartilage, 2010. **18**(4): p. 476-499.
 23. McAlindon, T.E., et al., *OARSI guidelines for the non-surgical management of knee osteoarthritis*. Osteoarthritis and Cartilage, 2014. **22**(3): p. 363-388.
 24. Hochberg, M.C., et al., *American College of Rheumatology 2012 recommendations for the use of nonpharmacologic and pharmacologic therapies in osteoarthritis of the hand, hip, and knee*. Arthritis Care & Research, 2012. **64**(4): p. 465-474.
 25. Felson, D.T., et al., *Osteoarthritis: New insights - Part 2: Treatment approaches*. Annals of Internal Medicine, 2000. **133**(9): p. 726-737.
 26. Rostom, A., et al., *Prevention of NSAID-related upper gastrointestinal toxicity: a meta-analysis of traditional NSAIDs with gastroprotection and COX-2 inhibitors*. Drug, Healthcare and Patient Safety, 2009. **1**: p. 47-71.
 27. Thomson, A.B.R., et al., *Safety of the long-term use of proton pump inhibitors*. World Journal of Gastroenterology, 2010. **16**(19): p. 2323-2330.
 28. Wieland, H.A., et al., *Osteoarthritis - An untreatable disease?* Nature Reviews Drug Discovery, 2005. **4**(4): p. 331-344.
 29. Huebner, K.D., N.G. Shrive, and C.B. Frank, *Dexamethasone Inhibits Inflammation and Cartilage Damage in a New Model of Post-Traumatic Osteoarthritis*. Journal of Orthopaedic Research, 2014. **32**(4): p. 566-572.
 30. Bellamy, N., et al., *Intraarticular corticosteroid for treatment of osteoarthritis of the knee*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2006(2): p. 192.
 31. Chirurgie, D.G.f.O.u.O. *Leitlinie Koxarthrose*. Deutsche Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC). www.awmf.org, 2009, Aufrufdatum: 14.07.2015.
 32. Jiang, Y.B., et al., *A multicenter, double-blind, dose-ranging, randomized, placebo-controlled study of recombinant human interleukin-1 receptor antagonist in patients with rheumatoid arthritis - Radiologic progression and correlation of Genant and Larsen scores*. Arthritis and Rheumatism, 2000. **43**(5): p. 1001-1009.

-
33. Fernandes, J., et al., *In vivo transfer of interleukin-1 receptor antagonist gene in osteoarthritic rabbit knee joints - Prevention of osteoarthritis progression*. American Journal of Pathology, 1999. **154**(4): p. 1159-1169.
 34. Chevalier, X., et al., *Intraarticular Injection of Anakinra in Osteoarthritis of the Knee: A Multicenter, Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study*. Arthritis & Rheumatism-Arthritis Care & Research, 2009. **61**(3): p. 344-352.
 35. Fioravanti, A., et al., *Treatment of erosive osteoarthritis of the hands by intra-articular infliximab injections: a pilot study*. Rheumatology International, 2009. **29**(8): p. 961-965.
 36. Lane, N.E., et al., *Tanezumab for the Treatment of Pain from Osteoarthritis of the Knee*. New England Journal of Medicine, 2010. **363**(16): p. 1521-1531.
 37. Clark, I.M. and A.E. Parker, *Metalloproteinases: their role in arthritis and potential as therapeutic targets*. Expert Opinion on Therapeutic Targets, 2003. **7**(1): p. 19-34.
 38. Johnson, A.R., et al., *Discovery and characterization of a novel inhibitor of matrix metalloproteinase-13 that reduces cartilage damage in vivo without joint fibroplasia side effects*. Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(38): p. 27781-27791.
 39. Settle, S., et al., *Cartilage Degradation Biomarkers Predict Efficacy of a Novel, Highly Selective Matrix Metalloproteinase 13 Inhibitor in a Dog Model of Osteoarthritis Confirmation by Multivariate Analysis That Modulation of Type II Collagen and Aggrecan Degradation Peptides Parallels Pathologic Changes*. Arthritis and Rheumatism, 2010. **62**(10): p. 3006-3015.
 40. Vu, T.H. and Z. Werb, *Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology*. Genes & Development, 2000. **14**(17): p. 2123-2133.
 41. Renkiewicz, R., et al., *Broad-spectrum matrix metalloproteinase inhibitor marimastat-induced musculoskeletal side effects in rats*. Arthritis and Rheumatism, 2003. **48**(6): p. 1742-1749.
 42. Coussens, L.M., B. Fingleton, and L.M. Matrisian, *Cancer therapy - Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: Trials and tribulations*. Science, 2002. **295**(5564): p. 2387-2392.
 43. Bellamy, N., et al., *Viscosupplementation for the treatment of osteoarthritis of the knee*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2006(2): p. 244.
 44. Fransen, M., et al., *Glucosamine and Chondroitin for knee osteoarthritis: a double blind randomised controlled trial evaluating single and combination regimens*. Osteoarthritis and Cartilage, 2014. **22**: p. S457-S457.
 45. Martel-Pelletier, J., et al., *First-line analysis of the effects of treatment on progression of structural changes in knee osteoarthritis over 24 months: data from the osteoarthritis initiative progression cohort*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2015. **74**(3): p. 547-556.
 46. Sawitzke, A.D., et al., *Clinical efficacy and safety of glucosamine, chondroitin sulphate, their combination, celecoxib or placebo taken to treat osteoarthritis of the knee: 2-year results from GAIT*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2010. **69**(8): p. 1459-1464.
 47. Kwok, C.K., et al., *Effect of oral glucosamine on joint structure in individuals with chronic knee pain: a randomized, placebo-controlled clinical trial*. Arthritis & rheumatology 2014. **66**(4): p. 930-9.

-
48. Akhtar, N. and T.M. Haqqi, *Current nutraceuticals in the management of osteoarthritis: a review*. Therapeutic Advances in Musculoskeletal Disease, 2012. **4**(3): p. 181-207.
 49. Van Vijven, J.P.J., et al., *Symptomatic and chondroprotective treatment with collagen derivatives in osteoarthritis: a systematic review*. Osteoarthritis and Cartilage, 2012. **20**(8): p. 809-821.
 50. Henrotin, Y., et al., *Nutraceuticals: do they represent a new era in the management of osteoarthritis? - a narrative review from the lessons taken with five products*. Osteoarthritis and Cartilage, 2011. **19**(1): p. 1-21.
 51. du Souich, P., *Absorption, distribution and mechanism of action of SYSADOAS*. Pharmacology & Therapeutics, 2014. **142**(3): p. 362-374.
 52. Schoonees, A., et al., *Pycnogenol (extract of French maritime pine bark) for the treatment of chronic disorders*. The Cochrane Database of Systematic Reviews, 2012. **4**: p. CD008294.
 53. United States Pharmacopeial Convention Inc., U., *United States Pharmacopeia 37. Dietary Supplements*. Vol. 37. 2013, Rockville.
 54. Pirasteh, G., *Identifizierung und Quantifizierung der Inhaltsstoffe eines Extraktes aus der Rinde der Meereskiefer (Pinus maritima Lamk.)*, Westfälische Wilhelms-Universität Münster. 1988.
 55. Chen, P., F.H. Song, and L.Z. Lin, *Chromatographic Fingerprint Analysis of Pycnogenol (R) Dietary Supplements*. Journal of Aoac International, 2009. **92**(2): p. 624-632.
 56. Duweler, K.G. and P. Rohdewald, *Urinary metabolites of French maritime pine bark extract in humans*. Pharmazie, 2000. **55**(5): p. 364-368.
 57. Li, C., et al., *Structural identification of two metabolites of catechins and their kinetics in human urine and blood after tea ingestion*. Chemical Research in Toxicology, 2000. **13**(3): p. 177-184.
 58. Grimm, T., et al., *Single and multiple dose pharmacokinetics of maritime pine bark extract (pycnogenol) after oral administration to healthy volunteers*. BMC Clinical Pharmacology, 2006. **6**: p. 4.
 59. Kurlbaum, M. and P. Hogger, *Plasma protein binding of polyphenols from maritime pine bark extract (USP)*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2011. **54**(1): p. 127-132.
 60. Kurlbaum, M., M. Mulek, and P. Högger, *Facilitated Uptake of a Bioactive Metabolite of Maritime Pine Bark Extract (Pycnogenol) into Human Erythrocytes*. Plos One, 2013. **8**(4).
 61. Mulek, M. and P. Hogger, *Highly sensitive analysis of polyphenols and their metabolites in human blood cells using dispersive SPE extraction and LC-MS/MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2015. **407**(7): p. 1885-1899.
 62. Mulek, M., *Distribution and metabolism of constituents and metabolites of a standardized maritime pine bark extract (Pycnogenol) in human serum, blood cells and synovial fluid of patients with severe osteoarthritis*. , Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 2016.
 63. Mulek, M., et al., *Profiling a gut microbiota-generated catechin metabolite's fate in human blood cells using a metabolomic approach*. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2015. **114**: p. 71-81.

-
64. Leong, D.J., et al., *Nutraceuticals: Potential for Chondroprotection and Molecular Targeting of Osteoarthritis*. International Journal of Molecular Sciences, 2013. **14**(11): p. 23063-23085.
 65. Tsao, R., *Chemistry and Biochemistry of Dietary Polyphenols*. Nutrients, 2010. **2**(12): p. 1231-1246.
 66. Ahmed, S., et al., *Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-gallate inhibits the IL-1 β -induced activity and expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human chondrocytes*. Free Radical Biology & Medicine 2002. **33**(8): p. 1097-1105.
 67. Rasheed, Z., et al., *Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate inhibits advanced glycation end product-induced expression of tumor necrosis factor- α and matrix metalloproteinase-13 in human chondrocytes*. Arthritis Research & Therapy, 2009. **11**(3): p. R71.
 68. Haqqi, T.M., et al., *Prevention of collagen-induced arthritis in mice by a polyphenolic fraction from green tea*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1999. **96**(8): p. 4524-4529.
 69. Akhtar, N. and T.M. Haqqi, *Epigallocatechin-3-gallate suppresses the global interleukin-1 β -induced inflammatory response in human chondrocytes*. Arthritis Research & Therapy, 2011. **13**(3): p. 16.
 70. Katiyar, S.K. and C. Raman, *Green tea: a new option for the prevention or control of osteoarthritis*. Arthritis Research & Therapy, 2011. **13**(4): p. 2.
 71. Oliviero, F., et al., *Epigallocatechin-3-gallate reduces inflammation induced by calcium pyrophosphate crystals in vitro*. Frontiers in Pharmacology, 2013. **4**: p. 51.
 72. Peng, Y.J., et al., *Pycnogenol attenuates the inflammatory and nitrosative stress on joint inflammation induced by urate crystals*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **52**(4): p. 765-774.
 73. Chantre, P., et al., *Efficacy and tolerance of Harpagophytum procumbens versus diacerhein in treatment of osteoarthritis*. Phytomedicine, 2000. **7**(3): p. 177-183.
 74. Chrubasik, J.E., B.D. Roufogalis, and S. Chrubasik, *Evidence of effectiveness of herbal antiinflammatory drugs in the treatment of painful osteoarthritis and chronic low back pain*. Phytotherapy Research, 2007. **21**(7): p. 675-683.
 75. Fiebich, B.L., et al., *Molecular Targets of the Antiinflammatory Harpagophytum procumbens (Devil's claw): Inhibition of TNF α and COX-2 Gene Expression by Preventing Activation of AP-1*. Phytotherapy Research, 2012. **26**(6): p. 806-811.
 76. Long, L., K. Soeken, and E. Ernst, *Herbal medicines for the treatment of osteoarthritis: a systematic review*. Rheumatology, 2001. **40**(7): p. 779-793.
 77. Henrotin, Y., et al., *Biological actions of curcumin on articular chondrocytes*. Osteoarthritis and Cartilage, 2010. **18**(2): p. 141-149.
 78. Im, H.J., et al., *Biological effects of the plant-derived polyphenol resveratrol in human articular cartilage and chondrosarcoma cells*. Journal of Cellular Physiology, 2012. **227**(10): p. 3488-3497.
 79. Jensen, G.S., et al., *Pain Reduction and Improvement in Range of Motion After Daily Consumption of an Acai (Euterpe oleracea Mart.) Pulp-Fortified Polyphenolic-Rich Fruit and Berry Juice Blend*. Journal of Medicinal Food, 2011. **14**(7-8): p. 702-711.

-
80. McAlindon, T., et al., *Effect of Vitamin D Supplementation on Progression of Knee Pain and Cartilage Volume Loss in Patients With Symptomatic Osteoarthritis A Randomized Controlled Trial*. *Jama-Journal of the American Medical Association*, 2013. **309**(2): p. 155-162.
 81. Frestedt, J.L., et al., *A natural mineral supplement provides relief from knee osteoarthritis symptoms: a randomized controlled pilot trial*. *Nutrition Journal*, 2008. **7**: p. 8.
 82. O'Callaghan, Y.C., et al., *Antioxidant and Pro-Apoptotic Effects of Marine-Derived, Multi-Mineral Aquamin Supplemented with a Pine Bark Extract, Enzogenol, and a Green Tea Extract, Sunphenon*. *Journal of Medicinal Food*, 2013. **16**(10): p. 920-926.
 83. Farid, R., et al., *Pycnogenol supplementation reduces pain and stiffness and improves physical function in adults with knee osteoarthritis*. *Nutrition Research*, 2007. **27**(11): p. 692-697.
 84. Cisar, P., et al., *Effect of pine bark extract (Pycnogenol (R)) on symptoms of knee osteoarthritis*. *Phytotherapy Research*, 2008. **22**(8): p. 1087-1092.
 85. Belcaro, G., et al., *Treatment of osteoarthritis with Pycnogenol((R)). The SVOS (San Valentino osteo-arthrosis study). Evaluation of signs, symptoms, physical performance and vascular aspects*. *Phytotherapy Research*, 2008. **22**(4): p. 518-523.
 86. Maimoona, A., et al., *A review on biological, nutraceutical and clinical aspects of French maritime pine bark extract*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2011. **133**(2): p. 261-277.
 87. Goldring, M.B. and K.B. Marcu, *Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases*. *Arthritis Research & Therapy*, 2009. **11**(3): p. 16.
 88. Mariani, E., L. Pulsatelli, and A. Facchini, *Signaling Pathways in Cartilage Repair*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2014. **15**(5): p. 8667-8698.
 89. Soder, S. and T. Aigner, *[Osteoarthritis. Etiology, typing, staging and histological grading]*. *Pathologie*, 2011. **32**(3): p. 183-92.
 90. University of Fribourg, D.M.-A. http://www.unifr.ch/anatomy/assets/files/elearning/de/stuetzgewebe/knorpel/ezm_knorpel/d-ezm_knorpel.php. 2015, Aufrufdatum 12.11.2015.
 91. Henrotin, Y., B. Kurz, and T. Aigner, *Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?* *Osteoarthritis and Cartilage*, 2005. **13**(8): p. 643-654.
 92. Houard, X., M.B. Goldring, and F. Berenbaum, *Homeostatic Mechanisms in Articular Cartilage and Role of Inflammation in Osteoarthritis*. *Current Rheumatology Reports*, 2013. **15**(11): p. 10.
 93. Neuhold, L.A., et al., *Postnatal expression in hyaline cartilage of constitutively active human collagenase-3 (MMP-13) induces osteoarthritis in mice*. *Journal of Clinical Investigation*, 2001. **107**(1): p. 35-44.
 94. Vasara, A.I., et al., *Persisting High Levels of Synovial Fluid Markers after Cartilage Repair*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2009. **467**(1): p. 267-272.
 95. Madsen, S.H., et al., *Cartilage formation measured by a novel PIINP assay suggests that IGF-I does not stimulate but maintains cartilage formation ex vivo*. *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 2009. **38**(3): p. 222-226.

-
96. Westacott, C.I. and M. Sharif, *Cytokines in osteoarthritis: Mediators or markers of joint destruction?* Seminars in Arthritis and Rheumatism, 1996. **25**(4): p. 254-272.
 97. Shlopov, B.V., M.L. Gumanovskaya, and K.A. Hasty, *Autocrine regulation of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) during osteoarthritis.* Arthritis and Rheumatism, 2000. **43**(1): p. 195-205.
 98. Goldring, M.B., *Anticytokine therapy for osteoarthritis.* Expert Opinion on Biological Therapy, 2001. **1**(5): p. 817-829.
 99. Lee, A.S., et al., *A current review of molecular mechanisms regarding osteoarthritis and pain.* Gene, 2013. **527**(2): p. 440-447.
 100. Reboul, P., et al., *The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes - A role in osteoarthritis.* Journal of Clinical Investigation, 1996. **97**(9): p. 2011-2019.
 101. Whitlock, G.A., et al., *A novel series of highly selective inhibitors of MMP-3.* Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2007. **17**(24): p. 6750-6753.
 102. Tortorella, M.D., et al., *Purification and cloning of aggrecanase-1: A member of the ADAMTS family of proteins.* Science, 1999. **284**(5420): p. 1664-1666.
 103. Tortorella, M.D., et al., *Characterization of human aggrecanase 2 (ADAM-TS5): substrate specificity studies and comparison with aggrecanase 1 (ADAM-TS4).* Matrix Biology, 2002. **21**(6): p. 499-511.
 104. East, C.J., et al., *ADAMTS-5 deficiency does not block aggrecanolysis at preferred cleavage sites in the chondroitin sulfate-rich region of aggrecan.* Journal of Biological Chemistry, 2007. **282**(12): p. 8632-8640.
 105. Aida, Y., et al., *The effect of IL-1 beta on the expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of matrix metalloproteinases in human chondrocytes.* Life Sciences, 2005. **77**(25): p. 3210-3221.
 106. Kobayashi, M., et al., *Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage.* Arthritis and Rheumatism, 2005. **52**(1): p. 128-135.
 107. Tetlow, L.C., D.J. Adlam, and D.E. Woolley, *Matrix metalloproteinase and proinflammatory cytokine production by chondrocytes of human osteoarthritic cartilage - Associations with degenerative changes.* Arthritis and Rheumatism, 2001. **44**(3): p. 585-594.
 108. Dai, S.M., et al., *Implication of interleukin 18 in production of matrix metalloproteinases in articular chondrocytes in arthritis: direct effect on chondrocytes may not be pivotal.* Annals of the Rheumatic Diseases, 2005. **64**(5): p. 735-742.
 109. Berenbaum, F., *Osteoarthritis as an inflammatory disease (osteoarthritis is not osteoarthrosis!).* Osteoarthritis and Cartilage, 2013. **21**(1): p. 16-21.
 110. Scanzello, C.R., et al., *Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease.* Osteoarthritis and Cartilage, 2009. **17**(8): p. 1040-1048.
 111. Hui, W., et al., *Oncostatin M in combination with tumour necrosis factor alpha induces a chondrocyte membrane associated aggrecanase that is distinct from ADAMTS aggrecanase-1 or-2.* Annals of the Rheumatic Diseases, 2005. **64**(11): p. 1624-1632.

-
112. Malfait, A.M., et al., *Inhibition of ADAM-TS4 and ADAM-TS5 prevents aggrecan degradation in osteoarthritic cartilage*. Journal of Biological Chemistry, 2002. **277**(25): p. 22201-22208.
 113. Aigner, T., et al., *Mechanisms of Disease: role of chondrocytes in the pathogenesis of osteoarthritis - structure, chaos and senescence*. Nature Clinical Practice Rheumatology, 2007. **3**(7): p. 391-399.
 114. Verzijl, N., et al., *Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(50): p. 39027-39031.
 115. Findlay, D.M. and G.J. Atkins, *Osteoblast-Chondrocyte Interactions in Osteoarthritis*. Current Osteoporosis Reports, 2014. **12**(1): p. 127-134.
 116. Karsdal, M.A., et al., *Cartilage degradation is fully reversible in the presence of aggrecanase but not matrix metalloproteinase activity*. Arthritis Research & Therapy, 2008. **10**(3): p. 12.
 117. Elsaid, K.A. and C.O. Chichester, *Review: Collagen markers in early arthritic diseases*. Clinica Chimica Acta, 2006. **365**(1-2): p. 68-77.
 118. Panwar, P., et al., *Effects of Cysteine Proteases on the Structural and Mechanical Properties of Collagen Fibers*. Journal of Biological Chemistry, 2013. **288**(8): p. 5940-5950.
 119. Olsen, A.K., et al., *Anabolic and catabolic function of chondrocyte ex vivo is reflected by the metabolic processing of type II collagen*. Osteoarthritis and Cartilage, 2007. **15**(3): p. 335-342.
 120. Mort, J.S. and C.J. Billington, *Articular cartilage and changes in arthritis - Matrix degradation*. Arthritis Research, 2001. **3**(6): p. 337-341.
 121. Charni, N., F. Juillet, and P. Garnero, *Urinary type II collagen helical peptide (HELIX-II) as a new biochemical marker of cartilage degradation in patients with Osteoarthritis and rheumatoid arthritis*. Arthritis and Rheumatism, 2005. **52**(4): p. 1081-1090.
 122. Tabassi, N.C.B., et al., *The type II collagen fragments Helix-II and CTX-II reveal different enzymatic pathways of human cartilage collagen degradation*. Osteoarthritis and Cartilage, 2008. **16**(10): p. 1183-1191.
 123. Nemirovskiy, O.V., et al., *Discovery and development of a type II collagen neopeptide (TIINE) biomarker for matrix metalloproteinase activity: From in vitro to in vivo*. Analytical Biochemistry, 2007. **361**(1): p. 93-101.
 124. Heard, B.J., et al., *Matrix metalloproteinase protein expression profiles cannot distinguish between normal and early osteoarthritic synovial fluid*. BMC Musculoskeletal Disorders, 2012. **13**: p. 12.
 125. Mengshol, J.A., et al., *Interleukin-1 induction of collagenase 3 (matrix metalloproteinase 13) gene expression in chondrocytes requires p38, c-Jun N-terminal kinase, and nuclear factor kappa B - Differential regulation of collagenase 1 and collagenase 3*. Arthritis and Rheumatism, 2000. **43**(4): p. 801-811.
 126. Troeberg, L. and H. Nagase, *Proteases involved in cartilage matrix degradation in osteoarthritis*. Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics, 2012. **1824**(1): p. 133-145.
 127. Stanton, H., L. Ung, and A.J. Fosang, *The 45 kDa collagen-binding fragment of fibronectin induces matrix metalloproteinase-13 synthesis by chondrocytes*

-
- and aggrecan degradation by aggrecanases.* Biochemical Journal, 2002. **364**: p. 181-190.
128. Miller, R.E., et al., *Genetically Engineered Mouse Models Reveal the Importance of Proteases as Osteoarthritis Drug Targets.* Current Rheumatology Reports, 2013. **15**(8): p. 15.
 129. Little, C.B., et al., *Matrix Metalloproteinase 13-Deficient Mice Are Resistant to Osteoarthritic Cartilage Erosion but Not Chondrocyte Hypertrophy or Osteophyte Development.* Arthritis and Rheumatism, 2009. **60**(12): p. 3723-3733.
 130. Malesud, C.J., N. Islam, and T.M. Haqqi, *Pathophysiological mechanisms in Osteoarthritis lead to novel therapeutic strategies.* Cells Tissues Organs, 2003. **174**(1-2): p. 34-48.
 131. Dean, D.D., et al., *Evidence for Metalloproteinase and Metalloproteinase Inhibitor Imbalance in Human Osteoarthritic Cartilage.* Journal of Clinical Investigation, 1989. **84**(2): p. 678-685.
 132. Bluteau, G., et al., *Matrix metalloproteinase-1,-3,-13 and aggrecanase-1 and-2 are differentially expressed in experimental osteoarthritis.* Biochimica Et Biophysica Acta-General Subjects, 2001. **1526**(2): p. 147-158.
 133. Aigner, T., et al., *Apoptotic cell death is not a widespread phenomenon in normal aging and osteoarthritic human articular knee cartilage - A study of proliferation, programmed cell death (apoptosis), and viability of chondrocytes in normal and osteoarthritic human knee cartilage.* Arthritis and Rheumatism, 2001. **44**(6): p. 1304-1312.
 134. Klatt, A.R., et al., *A Critical Role for Collagen II in Cartilage Matrix Degradation: Collagen II Induces Pro-Inflammatory Cytokines and MMPs in Primary Human Chondrocytes.* Journal of Orthopaedic Research, 2009. **27**(1): p. 65-70.
 135. Inaoka, T., et al., *Molecular-Cloning of human cDNA for Cathepsin-K - novel Cysteine proteinase predominantly expressed in bone.* Biochemical and Biophysical Research Communications, 1995. **206**(1): p. 89-96.
 136. Chappard, D., et al., *The Cathepsin K Inhibitor AAE581 Induces Morphological Changes in Osteoclasts of Treated Patients.* Microscopy Research and Technique, 2010. **73**(7): p. 726-732.
 137. Lemaire, P.A., et al., *Chondroitin Sulfate Promotes Activation of Cathepsin K.* Journal of Biological Chemistry, 2014. **289**(31): p. 21562-21572.
 138. Svelander, L., et al., *Inhibition of cathepsin K reduces bone erosion, cartilage degradation and inflammation evoked by collagen-induced arthritis in mice.* European Journal of Pharmacology, 2009. **613**(1-3): p. 155-162.
 139. Hou, W.S., et al., *Cleavage site specificity of cathepsin K toward cartilage proteoglycans and protease complex formation.* Biological Chemistry, 2003. **384**(6): p. 891-897.
 140. Morko, J., et al., *Spontaneous development of synovitis and cartilage degeneration in transgenic mice overexpressing cathepsin K.* Arthritis and Rheumatism, 2005. **52**(12): p. 3713-3717.
 141. Rousseau, J.C. and P. Garnero, *Biological markers in osteoarthritis.* Bone, 2012. **51**(2): p. 265-277.

-
142. Tortorella, M., et al., *The thrombospondin motif of aggrecanase-1 (ADAMTS-4) is critical for aggrecan substrate recognition and cleavage*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(33): p. 25791-25797.
 143. Fosang, A.J., et al., *ADAMTS-5: The story so far*. European Cells & Materials, 2008. **15**: p. 11-26.
 144. Belcher, C., et al., *Synovial fluid chondroitin and keratan sulphate epitopes, glycosaminoglycans, and hyaluronan in arthritic and normal knees*. Annals of the Rheumatic Diseases, 1997. **56**(5): p. 299-307.
 145. Huang, K. and L.D. Wu, *Aggrecanase and Aggrecan Degradation in Osteoarthritis: a Review*. Journal of International Medical Research, 2008. **36**(6): p. 1149-1160.
 146. Verma, P. and K. Dalal, *ADAMTS-4 and ADAMTS-5: Key Enzymes in Osteoarthritis*. Journal of Cellular Biochemistry, 2011. **112**(12): p. 3507-3514.
 147. Tortorella, M.D., et al., *alpha(2)-Macroglobulin is a novel substrate for ADAMTS-4 and ADAMTS-5 and represents an endogenous inhibitor of these enzymes*. Journal of Biological Chemistry, 2004. **279**(17): p. 17554-17561.
 148. Struglics, A., et al., *Human osteoarthritis synovial fluid and joint cartilage contain both aggrecanase- and matrix metalloproteinase-generated aggrecan fragments*. Osteoarthritis and Cartilage, 2006. **14**(2): p. 101-113.
 149. Fosang, A.J., K. Last, and R.A. Maciewicz, *Aggrecan is degraded by matrix metalloproteinases in human arthritis - Evidence that matrix metalloproteinase and aggrecanase activities can be independent*. Journal of Clinical Investigation, 1996. **98**(10): p. 2292-2299.
 150. Vankemmelbeke, M.N., et al., *Expression and activity of ADAMTS-5 in synovium*. European Journal of Biochemistry, 2001. **268**(5): p. 1259-1268.
 151. Maroudas, A., et al., *Aggrecan turnover in human articular cartilage: Use of aspartic acid racemization as a marker of molecular age*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998. **350**(1): p. 61-71.
 152. Fosang, A.J. and C.B. Little, *Drug insight: aggrecanases as therapeutic targets for osteoarthritis*. Nature Clinical Practice Rheumatology, 2008. **4**(8): p. 420-427.
 153. Arner, E.C., *Aggrecanase-mediated cartilage degradation*. Current Opinion in Pharmacology, 2002. **2**(3): p. 322-329.
 154. Struglics, A. and M. Hansson, *MMP proteolysis of the human extracellular matrix protein aggrecan is mainly a process of normal turnover*. Biochemical Journal, 2012. **446**: p. 213-223.
 155. Chockalingam, P.S., et al., *Elevated aggrecanase activity in a rat model of joint injury is attenuated by an aggrecanase specific inhibitor*. Osteoarthritis and Cartilage, 2011. **19**(3): p. 315-323.
 156. Li, Z., et al., *Leptin Downregulates Aggrecan through the p38-ADAMST Pathway in Human Nucleus Pulposus Cells*. Plos One, 2014. **9**(10): p. 7.
 157. Chen, L.M., et al., *Association of serum a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motif 4 levels with the presence and severity of coronary artery disease*. Coronary Artery Disease, 2011. **22**(8): p. 570-576.
 158. Li, W., et al., *Increased serum ADAMTS-4 in knee osteoarthritis: a potential indicator for the diagnosis of osteoarthritis in early stages*. Genetics and Molecular Research, 2014. **13**(4): p. 9642-9649.

-
159. Bondeson, J., et al., *The regulation of the ADAMTS4 and ADAMTS5 aggrecanases in osteoarthritis: a review*. Clinical and Experimental Rheumatology, 2008. **26**(1): p. 139-145.
 160. Felson, D.T., et al., *Obesity and Knee Osteoarthritis - The Framingham Study*. Annals of Internal Medicine, 1988. **109**(1): p. 18-24.
 161. Yusuf, E., et al., *Association between weight or body mass index and hand osteoarthritis: a systematic review*. Annals of the Rheumatic Diseases, 2010. **69**(4): p. 761-765.
 162. Oliveria, S.A., et al., *Body weight, body mass index, and incident symptomatic osteoarthritis of the hand, hip, and knee*. Epidemiology, 1999. **10**(2): p. 161-166.
 163. Zhang, Y.Y., et al., *Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue*. Nature, 1994. **372**(6505): p. 425-432.
 164. Ahima, R.S., et al., *Role of leptin in the neuroendocrine response to fasting*. Nature, 1996. **382**(6588): p. 250-252.
 165. Margetic, S., et al., *Leptin: a review of its peripheral actions and interactions*. International Journal of Obesity, 2002. **26**(11): p. 1407-1433.
 166. Huang, L., Z.W. Wang, and C. Li, *Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor*. Journal of Biological Chemistry, 2001. **276**(9): p. 6343-6349.
 167. Kratzsch, J., et al., *Circulating soluble leptin receptor and free leptin index during childhood, puberty, and adolescence*. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002. **87**(10): p. 4587-4594.
 168. Lammert, A., et al., *Soluble leptin receptor represents the main leptin binding activity in human blood*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **283**(4): p. 982-988.
 169. Ku, J.H., et al., *Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis*. Clinical Rheumatology, 2009. **28**(12): p. 1431-1435.
 170. Simopoulou, T., et al., *Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism*. Osteoarthritis and Cartilage, 2007. **15**(8): p. 872-883.
 171. Fruhbeck, G., *Intracellular signalling pathways activated by leptin*. Biochemical Journal, 2006. **393**: p. 7-20.
 172. Gabay, O., et al., *Osteoarthritis and obesity: Experimental models*. Joint Bone Spine, 2008. **75**(6): p. 675-679.
 173. Teichtahl, A.J., et al., *Obesity and the female sex, risk factors for knee osteoarthritis that may be attributable to systemic or local leptin biosynthesis and its cellular effects*. Medical Hypotheses, 2005. **65**(2): p. 312-315.
 174. Dumond, H., et al., *Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis*. Arthritis and Rheumatism, 2003. **48**(11): p. 3118-29.
 175. Figenschau, Y., et al., *Human articular chondrocytes express functional leptin receptors*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. **287**(1): p. 190-7.
 176. Presle, N., et al., *Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production*. Osteoarthritis and Cartilage, 2006. **14**(7): p. 690-5.

-
177. Bastiaansen-Jenniskens, Y.M., et al., *Infrapatellar fat pad of patients with end-stage osteoarthritis inhibits catabolic mediators in cartilage*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2012. **71**(2): p. 288-294.
 178. Hui, W., et al., *Leptin produced by joint white adipose tissue induces cartilage degradation via upregulation and activation of matrix metalloproteinases*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2012. **71**(3): p. 455-62.
 179. Lubbeke, A., et al., *Do synovial leptin levels correlate with pain in end stage arthritis?* *International Orthopaedics*, 2013. **37**(10): p. 2071-2079.
 180. Miller, G.D., et al., *Influence of weight loss, body composition, and lifestyle behaviors on plasma adipokines: a randomized weight loss trial in older men and women with symptomatic knee osteoarthritis*. *Journal of obesity*, 2012. **2012**: p. 708505.
 181. Klein, S., et al., *Leptin production during early starvation in lean and obese women*. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2000. **278**(2): p. E280-E284.
 182. Vincent, H.K., et al., *Obesity and Weight Loss in the Treatment and Prevention of Osteoarthritis*. *Pm&R*, 2012. **4**(5): p. S59-S67.
 183. Bao, J.P., et al., *Leptin plays a catabolic role on articular cartilage*. *Molecular Biology Reports*, 2010. **37**(7): p. 3265-3272.
 184. Pallu, S., et al., *Obesity affects the chondrocyte responsiveness to leptin in patients with osteoarthritis*. *Arthritis Research & Therapy*, 2010. **12**(3): p. 9.
 185. Loeser, R.F., *Systemic and local regulation of articular cartilage metabolism: Where does leptin fit in the puzzle?* *Arthritis and Rheumatism*, 2003. **48**(11): p. 3009-3012.
 186. Uhlenhut, K., *Effekte eines standardisierten Kiefernridenextraktes und dessen Metabolit auf NO und NO-Synthasen*, Julius-Maximilians-Universität Würzburg. 2012.
 187. Saiki, R.K., et al., *Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia*. *Science*, 1985. **230**(4732): p. 1350-1354.
 188. Higuchi, R., et al., *Simultaneous amplification and detection of specific DNA-Sequences*. *Bio-Technology*, 1992. **10**(4): p. 413-417.
 189. Wong, M.L. and J.F. Medrano, *Real-time PCR for mRNA quantitation*. *Biotechniques*, 2005. **39**(1): p. 75-85.
 190. Bustin, S.A., et al., *Quantitative real-time RT-PCR - a perspective*. *Journal of Molecular Endocrinology*, 2005. **34**(3): p. 597-601.
 191. Vandesompele, J., et al., *Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes*. *Genome Biology*, 2002. **3**(7): p. 12.
 192. Bustin, S.A., et al., *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*. *Clinical Chemistry*, 2009. **55**(4): p. 611-622.
 193. Tricarico, C., et al., *Quantitative real-time reverse transcription polymerase chain reaction: normalization to rRNA or single housekeeping genes is inappropriate for human tissue biopsies*. *Analytical Biochemistry*, 2002. **309**(2): p. 293-300.
 194. Toegel, S., et al., *Selection of reliable reference genes for qPCR studies on chondroprotective action*. *BMC Molecular Biology*, 2007. **8**: p. 13.

-
195. Thellin, O., et al., *Housekeeping genes as internal standards: use and limits*. Journal of Biotechnology, 1999. **75**(2-3): p. 291-295.
 196. Huggett, J., et al., *Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations*. Genes and Immunity, 2005. **6**(4): p. 279-84.
 197. Dheda, K., et al., *The implications of using an inappropriate reference gene for real-time reverse transcription PCR data normalization*. Analytical Biochemistry, 2005. **344**(1): p. 141-143.
 198. Kubista, M., et al., *The real-time polymerase chain reaction*. Molecular Aspects of Medicine, 2006. **27**(2-3): p. 95-125.
 199. Pfaffl, M.W., G.W. Horgan, and L. Dempfle, *Relative expression software tool (REST (c)) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR*. Nucleic Acids Research, 2002. **30**(9): p. 10.
 200. Ye, J., et al., *Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 11.
 201. Pattyn, F., *RTPPrimerDB: the Real-Time PCR primer and probe database*. Nucleic Acids Research, 2003. **31**(1): p. 122-123.
 202. Pombo-Suarez, M., et al., *Reference genes for normalization of gene expression studies in human osteoarthritic articular cartilage*. BMC Molecular Biology, 2008. **9**: p. 17.
 203. Pfaffl, M., et al., *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper- Excel-based tool using pair-wise correlations*. Biotechnology Letters, 2003. **26**: p. 509-515.
 204. Stove, J., et al., *Interleukin-1 beta induces different gene expression of stromelysin, aggrecan and tumor-necrosis-factor-stimulated gene 6 in human osteoarthritic chondrocytes in vitro*. Pathobiology, 2000. **68**(3): p. 144-149.
 205. Ramakers, C., et al., *Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data*. Neuroscience Letters, 2003. **339**(1): p. 62-66.
 206. Lin, Z., et al., *Gene expression profiles of human chondrocytes during passaged monolayer cultivation*. Journal of Orthopaedic Research, 2008. **26**(9): p. 1230-1237.
 207. Xia, Z.D., et al., *A method of isolating viable chondrocytes with proliferative capacity from cryopreserved human articular cartilage*. Cell and Tissue Banking, 2013. **14**(2): p. 267-276.
 208. Chowdhury, T.T., D.L. Bader, and D.A. Lee, *Dynamic compression counteracts IL-1 beta induced iNOS and COX-2 activity by human chondrocytes cultured in agarose constructs*. Biorheology, 2006. **43**(3-4): p. 413-429.
 209. Akanji, O.O., et al., *Dynamic compression alters NF kappa B activation and I kappa B-alpha expression in IL-1 beta-stimulated chondrocyte/agarose constructs*. Inflammation Research, 2010. **59**(1): p. 41-52.
 210. Sato, T., et al., *Comparative analysis of gene expression profiles in intact and damaged regions of human osteoarthritic cartilage*. Arthritis and Rheumatism, 2006. **54**(3): p. 808-17.
 211. McKenna, L.A., et al., *Effective isolation of high-quality total RNA from human adult articular cartilage*. Analytical Biochemistry, 2000. **286**(1): p. 80-5.

-
212. Gehrsitz, A., et al., *Isolation of RNA from small human articular cartilage specimens allows quantification of mRNA expression levels in local articular cartilage defects*. Journal of Orthopaedic Research, 2001. **19**(3): p. 478-481.
 213. Martin, I., et al., *Quantitative analysis of gene expression in human articular cartilage from normal and osteoarthritic joints*. Osteoarthritis and Cartilage, 2001. **9**(2): p. 112-8.
 214. Eid, K., T.S. Thornhill, and J. Glowacki, *Chondrocyte gene expression in osteoarthritis: Correlation with disease severity*. Journal of Orthopaedic Research, 2006. **24**(5): p. 1062-8.
 215. Radonic, A., et al., *Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004. **313**(4): p. 856-862.
 216. Darling, E.M. and K.A. Athanasiou, *Rapid phenotypic changes in passaged articular chondrocyte subpopulations*. Journal of Orthopaedic Research, 2005. **23**(2): p. 425-432.
 217. Barlic, A., et al., *Quantitative analysis of gene expression in human articular chondrocytes assigned for autologous implantation*. Journal of Orthopaedic Research, 2008. **26**(6): p. 847-853.
 218. Benya, P.D. and J.D. Shaffer, *Dedifferentiated Chondrocytes Reexpress the Differentiated Collagen Phenotype When Cultured in Agarose Gels*. Cell, 1982. **30**(1): p. 215-224.
 219. Yagi, R., et al., *Intrajoint comparisons of gene expression patterns in human osteoarthritis suggest a change in chondrocyte phenotype*. Journal of Orthopaedic Research, 2005. **23**(5): p. 1128-1138.
 220. Gebhard, P.M., et al., *Quantification of expression levels of cellular differentiation markers does not support a general shift in the cellular phenotype of osteoarthritic chondrocytes*. Journal of Orthopaedic Research, 2003. **21**(1): p. 96-101.
 221. Ohara, H., et al., *Immunocytochemical demonstration of glucose transporters in epiphyseal growth plate chondrocytes of young rats in correlation with autoradiographic distribution of 2-deoxyglucose in chondrocytes of mice*. Acta Histochemica, 2001. **103**(4): p. 365-378.
 222. Schafer, A., et al., *Inhibition of COX-1 and COX-2 activity by plasma of human volunteers after ingestion of French maritime pine bark extract (Pycnogenol)*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2006. **60**(1): p. 5-9.
 223. Grimm, T., A. Schafer, and P. Hogger, *Antioxidant activity and inhibition of matrix metalloproteinases by metabolites of maritime pine bark extract (pycnogenol)*. Free Radical Biology and Medicine, 2004. **36**(6): p. 811-822.
 224. Canali, R., et al., *The anti-inflammatory pharmacology of Pycnogenol (R) in humans involves COX-2 and 5-LOX mRNA expression in leukocytes*. International Immunopharmacology, 2009. **9**(10): p. 1145-1149.
 225. Peng, Q., Z. Wei, and B.H.S. Lau, *Pycnogenol inhibits tumor necrosis factor- α -induced nuclear factor kappa B activation and adhesion molecule expression in human vascular endothelial cells*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2000. **57**(5): p. 834-841.
 226. Cho, K.J., et al., *Effect of bioflavonoids extracted from the bark of Pinus maritima on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in*

-
- lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000. **168**(1): p. 64-71.
227. Xia, Y.F., et al., *Pycnogenol, a compound isolated from the bark of pinus maritime mill, attenuates ventilator-induced lung injury through inhibiting NF-kappa B-mediated inflammatory response*. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 2015. **8**(2): p. 1824-1833.
228. Grimm, T., et al., *Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol)*. *Journal of Inflammation (London, England)*, 2006. **3**: p. 1.
229. Singh, R., et al., *Epigallocatechin-3-gallate inhibits interleukin-1beta-induced expression of nitric oxide synthase and production of nitric oxide in human chondrocytes: suppression of nuclear factor kappaB activation by degradation of the inhibitor of nuclear factor kappaB*. *Arthritis and Rheumatism*, 2002. **46**(8): p. 2079-86.
230. Ahmed, S., et al., *Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate (EGCG) differentially inhibits interleukin-1 beta-induced expression of matrix metalloproteinase-1 and-13 in human chondrocytes*. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 2004. **308**(2): p. 767-773.
231. Leong, D.J., et al., *Green tea polyphenol treatment is chondroprotective, anti-inflammatory and palliative in a mouse post-traumatic osteoarthritis model*. *Arthritis research & therapy*, 2014. **16**(6): p. 508.
232. Li, X., et al., *The Action of Resveratrol, a Phytoestrogen Found in Grapes, on the Intervertebral Disc*. *Spine*, 2008. **33**(24): p. 2586-2595.
233. Shakibaei, M., et al., *Resveratrol inhibits IL-1 beta-induced stimulation of caspase-3 and cleavage of PARP in human articular chondrocytes in vitro*, in *Signal Transduction Pathways, Pt C: Cell Signaling in Health and Disease*, M. Diederich, Editor. 2007, Blackwell Publishing: Oxford. p. 554-563.
234. Ying, X.Z., et al., *Piperine inhibits IL-beta induced expression of inflammatory mediators in human osteoarthritis chondrocyte*. *International Immunopharmacology*, 2013. **17**(2): p. 293-299.
235. Toegel, S., et al., *Caesalpinia sappan extract inhibits IL1beta-mediated overexpression of matrix metalloproteinases in human chondrocytes*. *Genes & Nutrition*, 2012. **7**(2): p. 307-18.
236. Elliott, S., et al., *The triterpenoid CDDO inhibits expression of matrix metalloproteinase-1, matrix metalloproteinase-13 and Bcl-3 in primary human chondrocytes*. *Arthritis Research & Therapy*, 2003. **5**(5): p. R285-R291.
237. Bau, B., et al., *Relative messenger RNA expression profiling of collagenases and aggrecanases in human articular chondrocytes in vivo and in vitro*. *Arthritis and Rheumatism*, 2002. **46**(10): p. 2648-2657.
238. Farndale, R.W., D.J. Buttle, and A.J. Barrett, *Improved quantitation and discrimination of sulfated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue*. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1986. **883**(2): p. 173-177.
239. Sarma, P.K., R. Misra, and A. Aggarwal, *Elevated serum receptor activator of NF kappa B ligand (RANKL), osteoprotegerin (OPG), matrix metalloproteinase (MMP)3, and ProMMP1 in patients with juvenile idiopathic arthritis*. *Clinical Rheumatology*, 2008. **27**(3): p. 289-294.
240. Zakovicova, E., et al., *Circulating Serum Matrix Metalloproteinase-3 and Metalloproteinase-9 Are Not Associated with Echocardiographic Parameters of*

-
- Diastolic Function in Asymptomatic Type 2 Diabetic Patients.* Journal of International Medical Research, 2010. **38**(6): p. 2093-2099.
241. Ma, J.D., et al., *Serum Matrix Metalloproteinase-3 as a Noninvasive Biomarker of Histological Synovitis for Diagnosis of Rheumatoid Arthritis.* Mediators of Inflammation, 2014: p. 10.
242. Cevik, C., et al., *Rosuvastatin Therapy Does Not Affect Serum MMP-13 or TIMP-1 Levels in Hypercholesterolemic Patients.* Texas Heart Institute Journal, 2011. **38**(3): p. 229-233.
243. Jiao, X.L., et al., *Clinical significance of serum matrix metalloproteinase-13 levels in patients with esophageal squamous cell carcinoma (ESCC).* European Review for Medical and Pharmacological Sciences, 2014. **18**(4): p. 509-515.
244. Asano, Y., et al., *Clinical significance of serum levels of matrix metalloproteinase-13 in patients with systemic sclerosis.* Rheumatology, 2006. **45**(3): p. 303-307.
245. Glasson, S.S., et al., *Deletion of active ADAMTS5 prevents cartilage degradation in a murine model of osteoarthritis.* Nature, 2005. **434**(7033): p. 644-648.
246. Stanton, H., et al., *ADAMTS5 is the major aggrecanase in mouse cartilage in vivo and in vitro.* Nature, 2005. **434**(7033): p. 648-652.
247. Zhang, E.S., et al., *Aggrecanases in the human synovial fluid at different stages of osteoarthritis.* Clinical Rheumatology, 2013. **32**(6): p. 797-803.
248. Winsz-Szczotka, K., et al., *Circulating keratan sulfate as a marker of metabolic changes of cartilage proteoglycan in juvenile idiopathic arthritis; influence of growth factors as well as proteolytic and prooxidative agents on aggrecan alterations.* Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2015. **53**(2): p. 291-297.
249. Song, R.H., et al., *Aggrecan degradation in human articular cartilage explants is mediated by both ADAMTS-4 and ADAMTS-5.* Arthritis and Rheumatism, 2007. **56**(2): p. 575-585.
250. Peng, S., et al., *Detection of ADAMTS-4 Activity Using a Fluorogenic Peptide-Conjugated Au Nanoparticle Probe in Human Knee Synovial Fluid.* Acs Applied Materials & Interfaces, 2013. **5**(13): p. 6089-6096.
251. Davidson, R.K., et al., *Expression profiling of metalloproteinases and their inhibitors in synovium and cartilage.* Arthritis Research & Therapy, 2006. **8**(4): p. 10.
252. Tchetverikov, I., et al., *MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis.* Annals of the Rheumatic Diseases, 2005. **64**(5): p. 694-698.
253. Rubenhagen, R., et al., *Interleukin-7 levels in synovial fluid increase with age and MMP-1 levels decrease with progression of osteoarthritis.* Acta Orthopaedica, 2012. **83**(1): p. 59-64.
254. Zhang, S.L., et al., *Effects of exercise therapy on knee joint function and synovial fluid cytokine levels in patients with knee osteoarthritis.* Molecular Medicine Reports, 2013. **7**(1): p. 183-186.
255. Anitua, E., et al., *Relationship between Investigative Biomarkers and Radiographic Grading in Patients with Knee Osteoarthritis.* International Journal of Rheumatology, 2009. **2009**: p. 747432.

-
256. Lohmander, L.S., et al., *The release of crosslinked peptides from type II collagen into human synovial fluid is increased soon after joint injury and in osteoarthritis*. *Arthritis and Rheumatism*, 2003. **48**(11): p. 3130-3139.
 257. Oestergaard, S., et al., *The utility of measuring C-terminal telopeptides of Collagen type II (CTX-II) in serum and synovial fluid samples for estimation of articular cartilage status in experimental models of destructive joint diseases*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2006. **14**(7): p. 670-679.
 258. Wei, X.C., et al., *Type II collagen fragment HELIX-II is a marker for early cartilage lesions but does not predict the progression of cartilage destruction in human knee joint synovial fluid*. *Rheumatology International*, 2013. **33**(7): p. 1895-1899.
 259. Honsawek, S., et al., *Relationship of plasma and synovial fluid BMP-7 with disease severity in knee osteoarthritis patients: a pilot study*. *International Orthopaedics*, 2009. **33**(4): p. 1171-1175.
 260. Hayashi, M., et al., *Intra-Articular Injections of Bone Morphogenetic Protein-7 Retard Progression of Existing Cartilage Degeneration*. *Journal of Orthopaedic Research*, 2010. **28**(11): p. 1502-1506.
 261. Hunter, D.J., et al., *Phase 1 safety and tolerability study of BMP-7 in symptomatic knee osteoarthritis*. *Bmc Musculoskeletal Disorders*, 2010. **11**: p. 8.
 262. Baeten, D., et al., *Association of CD163+ macrophages and local production of soluble CD163 with decreased lymphocyte activation in spondylarthropathy synovitis*. *Arthritis and Rheumatism*, 2004. **50**(5): p. 1611-1623.
 263. Daghestani, H.N., et al., *Soluble Macrophage Biomarkers are associated with Osteoarthritis-related knee inflammation*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2013. **21**: p. S76-S77.
 264. Mathieu, P., et al., *Rheologic Behavior of Osteoarthritic Synovial Fluid after Addition of Hyaluronic Acid: A Pilot Study*. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 2009. **467**(11): p. 3002-3009.
 265. Platt, D., H.L. Holley, and W. Pigman, *Effect of Testicular Hyaluronidase on Hyaluronic Acid Complexes of Human Synovial Fluid*. *Biochemical Journal*, 1961. **79**(3): p. 605-&.
 266. Considine, R.V., et al., *Serum immunoreactive leptin concentrations in normal-weight and obese humans*. *New England Journal of Medicine*, 1996. **334**(5): p. 292-295.
 267. Chiang, H.M., et al., *Coffea arabica extract and its constituents prevent photoaging by suppressing MMPs expression and MAP kinase pathway*. *Food and Chemical Toxicology*, 2011. **49**(1): p. 309-318.
 268. Shi, Z.H., et al., *Synthesis and structure-activity relationship analysis of caffeic acid amides as selective matrix metalloproteinase inhibitors*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013. **23**(5): p. 1206-1211.
 269. Pluemsamran, T., T. Onkoksoong, and U. Panich, *Caffeic Acid and Ferulic Acid Inhibit UVA-Induced Matrix Metalloproteinase-1 through Regulation of Antioxidant Defense System in Keratinocyte HaCaT Cells*. *Photochemistry and Photobiology*, 2012. **88**(4): p. 961-968.
 270. Kim, S.R., et al., *Anti-Wrinkle and Anti-Inflammatory Effects of Active Garlic Components and the Inhibition of MMPs via NF-kB Signaling*. *Plos One*, 2013. **8**(9): p. 12.

-
271. Cho, H.S., et al., *Anti-wrinkling effects of the mixture of vitamin C, vitamin E, pycnogenol and evening primrose oil, and molecular mechanisms on hairless mouse skin caused by chronic ultraviolet B irradiation*. *Photodermatology Photoimmunology & Photomedicine*, 2007. **23**(5): p. 155-162.
 272. Lim, H. and H.P. Kim, *Inhibition of mammalian collagenase, matrix metalloproteinase-1, by naturally-occurring flavonoids*. *Planta Medica*, 2007. **73**(12): p. 1267-1274.
 273. Chen, M.P., et al., *The chondroprotective effects of ferulic acid on hydrogen peroxide-stimulated chondrocytes: inhibition of hydrogen peroxide-induced pro-inflammatory cytokines and metalloproteinase gene expression at the mRNA level*. *Inflammation Research*, 2010. **59**(8): p. 587-595.
 274. Shin, I.S., et al., *Inhibitory effects of Pycnogenol (R) (French maritime pine bark extract) on airway inflammation in ovalbumin-induced allergic asthma*. *Food and Chemical Toxicology*, 2013. **62**: p. 681-686.
 275. Naito, S., et al., *Expression of ADAMTS4 (aggrecanase-1) in human osteoarthritic cartilage*. *Pathology International*, 2007. **57**(11): p. 703-711.
 276. Maksymowych, W.P., et al., *Beneficial effects of adalimumab on biomarkers reflecting structural damage in patients with Ankylosing spondylitis*. *Journal of Rheumatology*, 2008. **35**(10): p. 2030-2037.
 277. Caron, J.P., et al., *Influence of Corticosteroids on Interleukin-1 beta-Stimulated Equine Chondrocyte Gene Expression*. *Veterinary Surgery*, 2013. **42**(3): p. 231-237.
 278. Ding, Q.H., et al., *Celastrol, an inhibitor of heat shock protein 90 beta potently suppresses the expression of matrix metalloproteinases, inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 in primary human osteoarthritic chondrocytes*. *European Journal of Pharmacology*, 2013. **708**(1-3): p. 1-7.
 279. Garvican, E.R., et al., *MMP-Mediated Collagen Breakdown Induced by Activated Protein C in Equine Cartilage Is Reduced by Corticosteroids*. *Journal of Orthopaedic Research*, 2010. **28**(3): p. 370-378.
 280. Clutterbuck, A.L., et al., *Interleukin-1beta-induced extracellular matrix degradation and glycosaminoglycan release is inhibited by curcumin in an explant model of cartilage inflammation*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2009. **1171**: p. 428-35.
 281. Wang, J., et al., *Physiological levels of hydrocortisone maintain an optimal chondrocyte extracellular matrix metabolism*. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 2004. **63**(1): p. 61-66.
 282. Kydd, A.S., et al., *Early inflammatory arthritis in the rabbit: The influence of Intraarticular and systemic corticosteroids on mRNA levels in connective tissues of the knee*. *Journal of Rheumatology*, 2007. **34**(1): p. 130-139.
 283. Ishizaki, Y., J.F. Burne, and M.C. Raff, *Autocrine signals enable chondrocytes to survive in culture*. *Journal of Cell Biology*, 1994. **126**(4): p. 1069-1077.
 284. Loeser, R.F. and G. Shanker, *Autocrine stimulation by insulin-like growth factor 1 and insulin-like growth factor 2 mediates chondrocyte survival in vitro*. *Arthritis and Rheumatism*, 2000. **43**(7): p. 1552-1559.
 285. Inoue, K., et al., *Induction of vascular endothelial growth factor and matrix metalloproteinase-3 (stromelysin) by interleukin-1 in human articular chondrocytes and synoviocytes*. *Rheumatology International*, 2005. **26**(2): p. 93-98.

-
286. Sun, S., et al., *The active form of MMP-3 is a marker of synovial inflammation and cartilage turnover in inflammatory joint diseases*. BMC Musculoskeletal Disorders, 2014. **15**: p. 8.
287. Xiao, J.B. and P. Hogger, *Stability of Dietary Polyphenols under the Cell Culture Conditions: Avoiding Erroneous Conclusions*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2015. **63**(5): p. 1547-1557.
288. Williamson, G. and C. Manach, *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. II. Review of 93 intervention studies*. American Journal of Clinical Nutrition, 2005. **81**(1): p. 243S-255S.
289. Natarajan, V., B. Madhan, and M.L. Tiku, *Intra-Articular Injections of Polyphenols Protect Articular Cartilage from Inflammation-Induced Degradation: Suggesting a Potential Role in Cartilage Therapeutics*. PloS one, 2015. **10**(6): p. e0127165.
290. Manach, C., et al., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. American Journal of Clinical Nutrition, 2005. **81**(1): p. 230S-242S.
291. Hayashi, M., K. Kadomatsu, and N. Ishiguro, *Keratan sulfate suppresses cartilage damage and ameliorates inflammation in an experimental mice arthritis model*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **401**(3): p. 463-468.
292. Hanprasertpong, N., et al., *Analgesic, anti-inflammatory, and chondroprotective activities of *Cryptolepis buchanani* extract: in vitro and in vivo studies*. BioMed Research International, 2014. **2014**: p. 978582.
293. Pandey, K.B. and S.I. Rizvi, *Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2009. **2**(5): p. 270-278.
294. Yoon, J.H. and S.J. Baek, *Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties*. Yonsei Medical Journal, 2005. **46**(5): p. 585-596.
295. Vauzour, D., et al., *Polyphenols and Human Health: Prevention of Disease and Mechanisms of Action*. Nutrients, 2010. **2**(11): p. 1106-1131.
296. Mosmann, T., *Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival-Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays*. Journal of Immunological Methods, 1983. **65**(1-2): p. 55-63.
297. Alley, M.C., et al., *Feasibility of Drug Screening with Panels of Human- Tumor Cell- Lines using a microculture Tetrazolium Assay*. Cancer Research, 1988. **48**(3): p. 589-601.
298. Berridge, M.V. and A.S. Tan, *Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)- subcellular-localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron-transport in MTT-reduction*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1993. **303**(2): p. 474-482.
299. Stabellini, G., et al., *Effects of interleukin-1 beta on chondroblast viability and extracellular matrix changes in bovine articular cartilage explants*. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2003. **57**(7): p. 314-319.
300. Pelletier, J.P., J. Martel-Pelletier, and S.B. Abramson, *Osteoarthritis, an inflammatory disease - Potential implication for the selection of new therapeutic targets*. Arthritis and Rheumatism, 2001. **44**(6): p. 1237-1247.

-
301. Pelletier, J.P., *The influence of tissue cross-talking on OA progression: role of nonsteroidal antiinflammatory drugs*. Osteoarthritis and Cartilage, 1999. **7**(4): p. 374-376.
 302. Finger, F., et al., *Molecular phenotyping of human chondrocyte cell lines T/C-28a2, T/C-28a4, and C-28/12*. Arthritis and Rheumatism, 2003. **48**(12): p. 3395-3403.
 303. Goldring, M.B., et al., *Interleukin-1-beta-modulated Gene Expression in Immortalized Human Chondrocytes*. Journal of Clinical Investigation, 1994. **94**(6): p. 2307-2316.
 304. Ramassamy, C., *Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets*. European Journal of Pharmacology, 2006. **545**(1): p. 51-64.
 305. Laurin, D., et al., *Midlife dietary intake of antioxidants and risk of late-life incident dementia - The Honolulu-Asia Aging Study*. American Journal of Epidemiology, 2004. **159**(10): p. 959-967.
 306. Engelhart, M.J., et al., *Dietary intake of antioxidants and risk of Alzheimer disease*. Jama-Journal of the American Medical Association, 2002. **287**(24): p. 3223-3229.
 307. Letenneur, L., et al., *Flavonoid intake and cognitive decline over a 10-year period*. American Journal of Epidemiology, 2007. **165**(12): p. 1364-1371.
 308. Scarmeas, N., et al., *Mediterranean diet and risk for Alzheimer's disease*. Annals of Neurology, 2006. **59**(6): p. 912-921.
 309. Singh, M., et al., *Challenges for research on polyphenols from foods in Alzheimer's disease: Bioavailability, metabolism, and cellular and molecular mechanisms*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(13): p. 4855-4873.
 310. Mandel, S., et al., *Green tea catechins as brain-permeable, natural iron chelators-antioxidants for the treatment of neurodegenerative disorders*. Molecular Nutrition & Food Research, 2006. **50**(2): p. 229-234.
 311. Nanjo, F., et al., *Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical*. Free Radical Biology and Medicine, 1996. **21**(6): p. 895-902.
 312. Caturla, N., et al., *The relationship between the antioxidant and the antibacterial properties of galloylated catechins and the structure of phospholipid model membranes*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **34**(6): p. 648-662.
 313. Lee, Y.K., et al., *(-)-Epigallocatechin-3-gallate prevents lipopolysaccharide-induced elevation of beta-amyloid generation and memory deficiency*. Brain Research, 2009. **1250**: p. 164-174.
 314. Lee, S.Y., et al., *Inhibitory effect of green tea extract on beta-amyloid-induced PC12 cell death by inhibition of the activation of NF-kappa B and ERK/p38 MAP kinase pathway through antioxidant mechanisms*. Molecular Brain Research, 2005. **140**(1-2): p. 45-54.
 315. Rezai-Zadeh, K., et al., *Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice*. Brain Research, 2008. **1214**: p. 177-187.

-
316. Checkoway, H., et al., *Parkinson's disease risks associated with cigarette smoking, alcohol consumption, and caffeine intake*. American Journal of Epidemiology, 2002. **155**(8): p. 732-738.
 317. Liu, X.B., et al., *Green tea polyphenols alleviate early BBB damage during experimental focal cerebral ischemia through regulating tight junctions and PKC α signaling*. BMC Complementary and Alternative Medicine, 2013. **13**.
 318. Ryan, J., et al., *An examination of the effects of the antioxidant Pycnogenol (R) on cognitive performance, serum lipid profile, endocrinological and oxidative stress biomarkers in an elderly population*. Journal of Psychopharmacology, 2008. **22**(5): p. 553-562.
 319. Davinelli, S., et al., *Pleiotropic Protective Effects of Phytochemicals in Alzheimer's Disease*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2012.
 320. Das, K.C. and C.K. Das, *Curcumin (diferuloylmethane), a singlet oxygen (O-1(2)) quencher*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2002. **295**(1): p. 62-66.
 321. Ramsewak, R.S., D.L. DeWitt, and M.G. Nair, *Cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of Curcumins I-III from Curcuma longa*. Phytomedicine, 2000. **7**(4): p. 303-308.
 322. Ono, K., et al., *Curcumin has potent anti-amyloidogenic effects for Alzheimer's beta-amyloid fibrils in vitro*. Journal of Neuroscience Research, 2004. **75**(6): p. 742-750.
 323. Baum, L. and A. Ng, *Curcumin interaction with copper and iron suggests one possible mechanism of action in Alzheimer's disease animal models*. Journal of Alzheimers Disease, 2004. **6**(4): p. 367-377.
 324. Piloni, N.E., et al., *Acute iron overload and oxidative stress in brain*. Toxicology, 2013. **314**(1): p. 174-82.
 325. Jang, J.H. and Y.J. Surh, *Protective effect of resveratrol on beta-amyloid-induced oxidative PC12 cell death*. Free Radical Biology and Medicine, 2003. **34**(8): p. 1100-1110.
 326. Lindsay, J., et al., *Risk factors for Alzheimer's disease: A prospective analysis from the Canadian Study of Health and Aging*. American Journal of Epidemiology, 2002. **156**(5): p. 445-453.
 327. Truelsen, T., D. Thudium, and M. Gronbaek, *Amount and type of alcohol and risk of dementia - The Copenhagen City Heart Study*. Neurology, 2002. **59**(9): p. 1313-1319.
 328. Peng, Q.L., A.R. Buz'Zard, and B.H.S. Lau, *Pycnogenol protects neurons from amyloid- β peptide-induced apoptosis*. Molecular Brain Research, 2002. **104**: p. 55-65.
 329. Scheff, S.W., M.A. Ansari, and K.N. Roberts, *Neuroprotective effect of Pycnogenol (R) following traumatic brain injury*. Experimental Neurology, 2013. **239**: p. 183-191.
 330. Khan, M.M., et al., *Protection of MPTP-induced neuroinflammation and neurodegeneration by Pycnogenol*. Neurochemistry International, 2013. **62**(4): p. 379-388.
 331. Hasegawa, N. and M. Mochizuki, *Improved Effect of Pycnogenol (R) on Impaired Spatial Memory Function in Partial Androgen Deficiency Rat Model*. Phytotherapy Research, 2009. **23**(6): p. 840-843.

-
332. Wilhelm, I., C. Fazakas, and I.A. Krizbai, *In vitro models of the blood-brain barrier*. Acta Neurobiologiae Experimentalis, 2011. **71**(1): p. 113-128.
333. Ballabh, P., A. Braun, and M. Nedergaard, *The blood-brain barrier: an overview - Structure, regulation, and clinical implications*. Neurobiology of Disease, 2004. **16**(1): p. 1-13.
334. Weiss, N., et al., *The blood-brain barrier in brain homeostasis and neurological diseases*. Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes, 2009. **1788**(4): p. 842-857.
335. Anderson, V.C., et al., *The blood-brain barrier and microvascular water exchange in Alzheimer's disease*. Cardiovascular Psychiatry and Neurology, 2011. **2011**: p. 615829.
336. Geiger, B., T. Volk, and T. Volberg, *Molecular Heterogeneity of Adherens Junctions*. Journal of Cell Biology, 1985. **101**(4): p. 1523-1531.
337. Furuse, M., et al., *Claudin-1 and -2: Novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin*. Journal of Cell Biology, 1998. **141**(7): p. 1539-1550.
338. Furuse, M., et al., *Occludin-a novel integral membrane-protein localizing at tight junctions*. Journal of Cell Biology, 1993. **123**(6): p. 1777-1788.
339. Martin-Padura, I., et al., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. Journal of Cell Biology, 1998. **142**(1): p. 117-127.
340. Breier, G., et al., *Molecular cloning and expression of murine vascular endothelial cadherin in early stage development of cardiovascular system*. Blood, 1996. **87**(2): p. 630-641.
341. Taddei, A., et al., *Endothelial adherens junctions control tight junctions by VE-cadherin-mediated upregulation of claudin-5*. Nature Cell Biology, 2008. **10**(8): p. 923-934.
342. Ramsauer, M., D. Krause, and R. Dermietzel, *Angiogenesis of the blood-brain barrier in vitro and the function of cerebral pericytes*. Faseb Journal, 2002. **16**(8): p. 1274-+.
343. Sobue, K., et al., *Induction of blood-brain barrier properties in immortalized bovine brain endothelial cells by astrocytic factors*. Neuroscience Research, 1999. **35**(2): p. 155-164.
344. Ohtsuki, S. and T. Terasaki, *Contribution of carrier-mediated transport systems to the blood-brain barrier as a supporting and protecting interface for the brain; importance for CNS drug discovery and development*. Pharmaceutical Research, 2007. **24**(9): p. 1745-58.
345. Pardridge, W.M., *Why is the global CNS pharmaceutical market so under-penetrated?* Drug Discovery Today, 2002. **7**(1): p. 5-7.
346. Jeffrey, P. and S. Summerfield, *Assessment of the blood-brain barrier in CNS drug discovery*. Neurobiology of Disease, 2010. **37**(1): p. 33-7.
347. Goodwin, J.T. and D.E. Clark, *In silico predictions of blood-brain barrier penetration: considerations to "keep in mind"*. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2005. **315**(2): p. 477-83.
348. Bickel, U., *How to measure Drug Transport across the Blood-Brain Barrier*. . Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics, 2005. **2**: p. 15-26.

-
349. Lobell, M., L. Molnar, and G.M. Keseru, *Recent advances in the prediction of blood-brain partitioning from molecular structure*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 2003. **92**(2): p. 360-370.
350. Liu, X.R., et al., *Development of a computational approach to predict blood-brain barrier permeability*. Drug Metabolism and Disposition, 2004. **32**(1): p. 132-139.
351. Martins, I.F., et al., *A Bayesian Approach to in Silico Blood-Brain Barrier Penetration Modeling*. Journal of Chemical Information and Modeling, 2012. **52**(6): p. 1686-1697.
352. Wang, Q., et al., *Evaluation of the MDR-MDCK cell line as a permeability screen for the blood-brain barrier*. International Journal of Pharmaceutics, 2005. **288**(2): p. 349-359.
353. Nazer, B., S. Hong, and D.J. Selkoe, *LRP promotes endocytosis and degradation, but not transcytosis, of the amyloid-beta peptide in a blood-brain barrier in vitro model*. Neurobiology of Disease, 2008. **30**(1): p. 94-102.
354. Sano, Y., et al., *Establishment of a New Conditionally Immortalized Human Brain Microvascular Endothelial Cell Line Retaining an In Vivo Blood-Brain Barrier Function*. Journal of Cellular Physiology, 2010. **225**(2): p. 519-528.
355. Smith, M., Y. Omid, and M. Gumbleton, *Primary porcine brain microvascular endothelial cells: biochemical and functional characterisation as a model for drug transport and targeting*. Journal of Drug Targeting, 2007. **15**(4): p. 253-68.
356. Patabendige, A., R.A. Skinner, and N.J. Abbott, *Establishment of a simplified in vitro porcine blood-brain barrier model with high transendothelial electrical resistance*. Brain Research, 2013. **1521**: p. 1-15.
357. Roux, F. and P.O. Couraud, *Rat brain endothelial cell lines for the study of blood-brain barrier permeability and transport functions*. Cellular and Molecular Neurobiology, 2005. **25**(1): p. 41-58.
358. Abbott, N.J.D., D.; Drndarski, S.; Fredriksson, S.M., *An Improved In Vitro Blood- Brain barrier Model: Rat Brain Endothelial Cells Co- cultured with Astrocytes*. . Methods in Molecular biology, 2012. **814**: p. 415-430.
359. Nakagawa, S., et al., *Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells*. Cellular and Molecular Neurobiology, 2007. **27**(6): p. 687-694.
360. Wuest, D.M. and K.H. Lee, *Optimization of endothelial cell growth in a murine in vitro blood-brain barrier model*. Biotechnology Journal, 2012. **7**(3): p. 409-417.
361. Shayan, G., et al., *Murine in vitro model of the blood-brain barrier for evaluating drug transport*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2011. **42**(1-2): p. 148-155.
362. Cecchelli, R., et al., *In vitro model for evaluating drug transport across the blood-brain barrier*. Advanced Drug Delivery Reviews, 1999. **36**(2-3): p. 165-178.
363. Burek, M., E. Salvador, and C.Y. Förster, *Generation of an immortalized murine brain microvascular endothelial cell line as an in vitro blood brain barrier model*. Journal of Visualized Experiments, 2012(66): p. e4022.

-
364. Förster, C., et al., *Occludin as direct target for glucocorticoid-induced improvement of blood-brain barrier properties in a murine in vitro system*. Journal of Physiology-London, 2005. **565**(2): p. 475-486.
 365. Förster, C., et al., *Dexamethasone induces the expression of metalloproteinase inhibitor TIMP-1 in the murine cerebral vascular endothelial cell line cEND*. Journal of Physiology-London, 2007. **580**(3): p. 937-949.
 366. Silwedel, C. and C. Forster, *Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli*. Journal of Neuroimmunology, 2006. **179**(1-2): p. 37-45.
 367. McAllister, M.S., et al., *Mechanism of glucose transport at the blood-brain barrier: an in vitro study*. Brain Research, 2001. **409**: p. 20-30.
 368. Uhlenhut, K. and P. Hogger, *Facilitated cellular uptake and suppression of inducible nitric oxide synthase by a metabolite of maritime pine bark extract (Pycnogenol)*. Free Radical Biology and Medicine, 2012. **53**(2): p. 305-313.
 369. Krupka, R.M. and R. Deves, *An Experimental Test for Cyclic versus Linear Transport Models- The Mechanism of Glucose and Choline Transport in Erythrocytes*. Journal of Biological Chemistry, 1981. **256**(11): p. 5410-5416.
 370. Devraj, K., et al., *GLUT-1 glucose transporters in the blood-brain barrier: differential phosphorylation*. Journal of Neuroscience Research, 2011. **89**(12): p. 1913-25.
 371. Whitesell, R.R., et al., *Coupled Glucose Transport and Metabolism in Cultured Neuronal Cells: Determination of the Rate-Limiting Step*. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 1995. **15**: p. 814-826.
 372. Dobrogowska, D.H. and A.W. Vorbrod, *Quantitative Immunocytochemical Study of Blood-Brain Barrier Glucose Transporter (GLUT-1) in Four Regions of Mouse Brain*. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1999. **47**(8): p. 1021-1030.
 373. Nagamatsu, S., et al., *Gene expression of GLUT3 glucose transporter regulated by glucose in vivo in mouse brain and in vitro in neuronal cell cultures from rat embryos*. Biochemical Journal, 1994. **300**: p. 125-131.
 374. Nishizaki, T. and T. Matsuoka, *Low glucose enhances Na⁺/glucose transport in bovine brain artery endothelial cells*. Stroke, 1998. **29**(4): p. 844-849.
 375. Agus, D.B., et al., *Vitamin C Crosses the Blood-Brain Barrier in the Oxidized Form Through the Glucose Transporters*. Journal of Clinical Investigation, 1997. **100**(11): p. 2842-2848.
 376. Boado, R.J. and W.M. Pardridge, *The brain-type Glucose Transporter mRNA is specifically expressed at the blood-brain-barrier*. Biochemical and Biophysical research communications, 1990. **166**(1): p. 174-179.
 377. Heydel, J.M., et al., *Rat olfactory bulb and epithelium UDP-glucuronyltransferase 2A1 (UGT2A1) expression: in situ mRNA localization and quantitative analysis*. Molecular Brain Research, 2001. **90**: p. 83-92.
 378. Wahlstrom, A., et al., *Human brain-metabolism of morphine and naloxone*. Pain, 1988. **35**(2): p. 121-127.
 379. Faria, A., et al., *Insights into the putative catechin and epicatechin transport across blood-brain barrier*. Food & Function, 2011. **2**(1): p. 39-44.
 380. Youdim, K.A., et al., *Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies*. Journal of Neurochemistry, 2003. **85**(1): p. 180-192.

-
381. Tsang, C., et al., *The absorption, metabolism and excretion of flavan-3-ols and procyanidins following the ingestion of a grape seed extract by rats*. British Journal of Nutrition, 2005. **94**(2): p. 170-181.
 382. Zini, A., et al., *Do flavan-3-ols from green tea reach the human brain?* Nutritional Neuroscience, 2006. **9**(1-2): p. 57-61.
 383. Schaffer, S. and B. Halliwell, *Do polyphenols enter the brain and does it matter? Some theoretical and practical considerations*. Genes & Nutrition, 2012. **7**(2): p. 99-109.
 384. Sun, F., et al., *Change in tissue concentrations of lipid hydroperoxides, vitamin C and vitamin E in rats with streptozotocin-induced diabetes*. Clinical Science, 1999. **96**(2): p. 185-190.
 385. Virgili, F., D. Kim, and L. Packer, *Procyanidins extracted from pine bark protect alpha-tocopherol in ECV 304 endothelial cells challenged by activated RAW 264.7 macrophages: role of nitric oxide and peroxynitrite*. Febs Letters, 1998. **431**(3): p. 315-318.
 386. Youdim, K.A., A. Martin, and J.A. Joseph, *Incorporation of the elderberry anthocyanins by endothelial cells increases protection against oxidative stress*. Free Radical Biology and Medicine, 2000. **29**(1): p. 51-60.
 387. Youdim, K.A., et al., *Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults*. Journal of Nutritional Biochemistry, 2002. **13**(5): p. 282-288.
 388. Fehske, C.J., K. Leuner, and W.E. Muller, *Ginkgo biloba extract (EGb761) influences monoaminergic neurotransmission via inhibition of NE uptake, but not MAO activity after chronic treatment*. Pharmacological Research, 2009. **60**(1): p. 68-73.
 389. Ferruzzi, M.G., et al., *Bioavailability of Gallic Acid and Catechins from Grape Seed Polyphenol Extract is Improved by Repeated Dosing in Rats: Implications for Treatment in Alzheimer's Disease*. Journal of Alzheimers Disease, 2009. **18**(1): p. 113-124.
 390. Mooradian, A.D., H.C. Chung, and G.N. Shah, *GLUT-1 Expression in the Cerebra of Patients with Alzheimer's Disease*. Neurobiology of Aging 1997. **18**(5): p. 469-474.
 391. Heimann, S.W., *Pycnogenol for ADHD?* Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry, 1999. **38**(4): p. 357-358.
 392. Tenenbaum, S., et al., *An experimental comparison of Pycnogenol and methylphenidate in adults with Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder (ADHD)*. Journal of Attention Disorders, 2002. **6**(2): p. 49-60.
 393. Trebaticka, J., et al., *Treatment of ADHD with French maritime pine bark extract, Pycnogenol (R)*. European Child & Adolescent Psychiatry, 2006. **15**(6): p. 329-335.
 394. Errichi, S., et al., *Supplementation with Pycnogenol improves signs and symptoms of menopausal transition*. Panminerva medica, 2011. **53**(3 Suppl 1): p. 65-70.
 395. Yang, H.M., et al., *A randomised, double-blind, placebo-controlled trial on the effect of Pycnogenol (R) on the climacteric syndrome in peri-menopausal women*. Acta Obstetrica Et Gynecologica Scandinavica, 2007. **86**(8): p. 978-985.

-
396. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological Assessment of osteo-arthrosis*. Annals of the Rheumatic Diseases, 1957. **16**(4): p. 494-502.
397. Genomics, E. <https://ecom.mwgdna.com/services/webgist/mops.tcl>; Oligo Property Scan. 2015.
398. Bustin, S.A., *A-Z of Quantitative PCR*. International University Lane, LaJolla, CA, USA, 2004. **1**.
399. Jayadev, C., et al., *Hyaluronidase treatment of synovial fluid to improve assay precision for biomarker research using multiplex immunoassay platforms*. Journal of Immunological Methods, 2012. **386**(1-2): p. 22-30.
400. Shukla, M., et al., *Bioavailable constituents/metabolites of pomegranate (Punica granatum L) preferentially inhibit COX2 activity ex vivo and IL-1beta-induced PGE2 production in human chondrocytes in vitro*. Journal of Inflammation 2008. **5**: p. 9.
401. Stangroom, J. <http://www.socscistatistics.com/tests/pearson/Default.aspx>. Ersteller: Stangroom, J. 2015, Aufrufdatum 15.05.2015.
402. Matz, F., *Synthese und Testung von RN18-Derivaten auf der Apobec3G-Vif-Interaktionshemmung und Verknüpfung von D-Biotin mit Xanthurensäure*, University of Wuerzburg. bachelor thesis, 2010.
403. European Medicines Agency, E., *Guideline on bioanalytical method validation*; http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf, Aufrufdatum 24.10.2013. Stand 02/2012.
404. International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, I., *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), Step4 Version*, http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf, Aufrufdatum 24.10.2013. Stand 11/2005.
405. Kromidas, S., <http://www.kromidas.de/publikationen/artikel-diverses/definitionen-validierung>. Ersteller: Stavros Kromidas, Aufrufdatum: 21.10.2013.
406. Zaiontz, C., <http://www.real-statistics.com/tests-normality-and-symmetry/statistical-tests-normality-symmetry/shapiro-wilk-test/>. 2013, Aufrufdatum 23.10.2013.
407. Google, <http://calculator-fx.com/calculator/statistics/shapiro-test>. 2013, Aufrufdatum 25.10.2013.



Erklärung

Hiermit erkläre ich Eides statt, dass ich die Dissertation

„Zelluläre pharmakodynamische Effekte eines standardisierten Kiefernrintenextrakts (Pycnogenol®) bei Patienten mit schwerer Osteoarthritis“

selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher oder anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den

Steffen Jeßberger