

Aus der  
Orthopädischen Universitätsklinik Tübingen

**Effekte entzündungsmodulierender Substanzen auf die  
Biomechanik perizellulärer Matrizen hyalinen  
Gelenkknorpels**

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

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

**vorgelegt von**

**Sigwart, Viktor Peter Amadeus**

**2026**

Dekan:

Professor Dr. Bernd Pichler

1. Berichterstatter:

Professor Dr. U. K. Hofmann

2. Berichterstatter:

Professorin Dr. D. Alexander-Friedrich

Tag der Disputation: 11.12.2025

# 1 Inhaltsverzeichnis

1.1	Abkürzungsverzeichnis .....	5
1.2	Tabellenverzeichnis.....	5
1.3	Formelverzeichnis .....	5
1.4	Abbildungsverzeichnis.....	6
2	Einleitung .....	8
2.1	Gelenke im menschlichen Körper.....	8
2.2	Gelenknorpel im menschlichen Körper .....	12
2.3	Die Perizelluläre Matrix im menschlichen Gelenknorpel.....	14
2.4	Arthrose des menschlichen Gelenks .....	17
2.4.1	Symptome, Diagnostik und Epidemiologie .....	17
2.4.2	Einflüsse von Arthrose auf das menschliche Kniegelenk.....	19
2.4.3	Entzündungsprozesse bei Arthrose .....	23
2.5	Grundlagen Rasterkraftmikroskopie .....	26
2.5.1	Funktionsweise .....	27
2.5.2	Kraft-Spektroskopie.....	29
2.5.3	Cantilever und Spitze .....	30
2.5.4	Ermittlung der Knorpel­elastizität mit dem Youngschen Modul .....	31
2.6	Fragestellung .....	32
2.7	Ziele der Arbeit.....	33
3	Material & Methoden .....	34
3.1	Materialliste .....	34
3.2	Knorpelverarbeitung.....	37
3.2.1	Anfertigung von Kryotomschnitten, Knorpeldiscs und Knorpel­explantaten .....	37
3.2.2	Färbung mit Calcein und Propidiumiodid .....	39
3.2.3	Überlebensexperimente .....	40
3.3	Mosaikbilder .....	43
3.4	Vorbereitung und Durchführung der AFM-Messungen .....	44
3.4.1	Fixierung der Proben.....	44
3.4.2	AFM-Mikroskop.....	46
3.4.3	Cantilever .....	47
3.4.4	Microspheres.....	48
3.4.5	Kalibrierung des Cantilevers.....	50
3.4.6	AFM-Messungen.....	52
3.4.7	AFM-Baseline.....	53
3.4.8	AFM-Messungen unter Entzündungsmodulation .....	55

3.4.9	Verarbeitung der Daten .....	58
3.5	Statistische Methoden .....	61
3.5.1	Statistische Tests und deskriptive Statistik .....	61
3.5.2	Fallzahlberechnung für zweite Explantat-Messreihe .....	63
4	Ergebnisse/Auswertung .....	65
4.1	Probenkollektiv und Fallzahlberechnung .....	65
4.2	Ergebnisse Baselinemessungen .....	65
4.3	Ergebnisse Überlebensversuche .....	67
4.4	Ergebnisse Erste Messreihe .....	70
4.4.1	Deskriptive Statistik und Histogramme .....	70
4.5	Ergebnisse zweite Messreihe .....	72
4.5.1	Deskriptive Statistik und Histogramme .....	72
4.5.2	Hypothesentests der zweiten Messreihe .....	76
5	Diskussion .....	78
5.1	Überblick .....	78
5.2	Ziele und Fragestellung .....	79
5.3	Patientenkohorte .....	80
5.4	Baselinemessungen .....	81
5.5	Überlebensversuche .....	83
5.6	AFM-Messreihen .....	85
5.7	Limitationen .....	89
6	Zusammenfassung .....	95
6.1	Literaturverzeichnis .....	96
6.2	Publikationsverzeichnis .....	100
7	Erklärung zum Eigenanteil .....	101

## 1.1 Abkürzungsverzeichnis

AFM .....	<i>Atomic Force Microscopy/Rasterkraftmikroskopie</i>
Art. ....	<i>Articulatio</i>
DDR .....	<i>Discoidin Domain Rezeptor</i>
DMEM .....	<i>Dulbeccos Modified Eagle's Medium</i>
EZM .....	<i>extrazelluläre Matrix</i>
IHH.....	<i>Indian-hedgehog Protein</i>
IL-1 $\beta$ .....	<i>Interleukin-1<math>\beta</math></i>
MMPs.....	<i>Matrixmetalloproteasen</i>
NSAR.....	<i>nicht steroidale Antirheumatika</i>
PBS.....	<i>Phosphatgebufferte Salzlösung</i>
PI.....	<i>Propidiumiodid</i>
PZM .....	<i>perizelluläre Matrix</i>
TNF- $\alpha$ .....	<i>Tumornekrosefaktor-<math>\alpha</math></i>
YM.....	<i>Young's Modulus, Elastizitätsmodul</i>

## 1.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: <i>Verwendete Geräte</i> .....	34
Tabelle 2: <i>Verwendete Verbrauchsmaterialien zur Knorpelverarbeitung</i> .....	36
Tabelle 3: <i>Verbrauchsmaterialien für AFM-Messungen</i> .....	36
Tabelle 4: <i>Verwendete Software</i> .....	37
Tabelle 5: <i>Deskriptive Statistik der Baseline-Messungen</i> .....	67
Tabelle 6: <i>Messtabelle der ersten Messreihe</i> .....	71
Tabelle 7: <i>Messtabelle der zweiten Messreihe</i> .....	74

## 1.3 Formelverzeichnis

<i>Formel 1</i> .....	32
<i>Formel 2</i> .....	51
<i>Formel 3</i> .....	60
<i>Formel 4</i> .....	62
<i>Formel 5</i> .....	64
<i>Formel 6</i> .....	64

## 1.4 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Allgemeiner Gelenkaufbau. Schematische Darstellung eines gesunden Gelenks am Beispiel des Kniegelenks im Frontalschnitt</i> .....	11
Abbildung 2: <i>Schematische Darstellung hyalinen Gelenkknorpels im Längsschnitt</i> .....	13
Abbildung 3: <i>Charakteristische Arthrosezeichen in schematischer Gegenüberstellung</i> .....	20
Abbildung 4: <i>Sequenzielle Darstellung verschiedener Chondrozytenmuster mittels Fluoreszenzmikroskopie</i> .....	22
Abbildung 5: <i>Vereinfachte Schematisierung von in-vivo Signalen, die im Rahmen von Arthrose auf Chondrozyten wirken</i> .....	25
Abbildung 6: <i>Schematische Darstellung des Funktionsprinzips und der wesentlichen Bestandteile eines Rasterkraftmikroskops</i> .....	28
Abbildung 7: <i>Abbildung einer Kraft-Abstands-Kurve</i> .....	29
Abbildung 8: <i>Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Haltechip, Cantilever und Cantileverspitze</i> .....	31
Abbildung 9: <i>Verarbeitungsschritte der Knorpelproben in DMEM</i> .....	39
Abbildung 10: <i>Übersichtsaufnahme eines Kryotomschnittes von arthrotischem Gelenkknorpel in Calceinfärbung</i> .....	40
Abbildung 11: <i>Prozessabfolge der Überlebensexperimente</i> .....	41
Abbildung 12: <i>Gegenüberstellung zweier Discs mit unterschiedlichem Vitalitätsprofil</i> .....	42
Abbildung 13: <i>Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines Knorpeldisc in Calcein/PI-Anfärbung</i> .....	44
Abbildung 14: <i>Bildserie zur Fixiertechnik des Knorpels mit biokompatiblen Kleber</i> .....	45
Abbildung 15: <i>Bildaufnahme des Rasterkraftmikroskopiesystems</i> .....	46
Abbildung 16: <i>Bildaufnahmen des AFM-Kopfsystems und Fixiermechanismus des Cantilevers</i> .....	47
Abbildung 17: <i>Mikroskopaufnahme eines mit einer Microsphere beklebten Cantilevers</i> .....	50
Abbildung 18: <i>Mikroskopaufnahme eines mit einem beklebten Cantilever durchgeführten Messvorgangs eines Kryotomschnitts</i> .....	53
Abbildung 19: <i>Schematische Darstellung der Einteilung der Knorpeldiscs</i> .....	54
Abbildung 20: <i>Mikroskopaufnahme eines mit einem beklebten Cantilever durchgeführten Messvorgangs eines Kryotomschnitts</i> .....	55
Abbildung 21: <i>Schematische Darstellung der ersten Messreihe mit jeweiligen Messarmen</i> .....	56
Abbildung 22: <i>Schematische Darstellung der zweiten Messreihe mit jeweiligen Messarmen</i> .....	57
Abbildung 23: <i>Schematische Darstellung eines Kontakts zwischen Cantilever und Probe</i> ..	59
Abbildung 24: <i>Schematische Darstellung der Kurvenkorrektur</i> .....	59
Abbildung 25: <i>Graph zur Datenapproximation des Hertz-Modells</i> . 60	
Abbildung 26: <i>Schema der durchgeführten Hypothesentests der ersten und zweiten Messreihe</i> .....	62
Abbildung 27: <i>Alters- und Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs</i> .....	65
Abbildung 28: <i>Lichtmikroskopische einer Bildserie Knorpeldisc während Inkubation in Glutamax-Nährmedium und Färbung mit Calcein und Propidiumiodid (PI)</i> .....	68
Abbildung 29: <i>Liniendiagramme der Überlebenszeiten von Knorpelgewebe unter verschiedenen Inkubationsbedingungen</i> .....	69
Abbildung 30: <i>Lichtmikroskopische Bilder eines Knorpelimplantats während Inkubation in DMEM-Nährmedium und Färbung mit Calcein und Propidiumiodid</i> .....	70

Abbildung 31: <i>Histogramme der ersten Messreihe an Explantaten</i> .....	73
Abbildung 32: <i>Histogramme der zweiten Messreihe an Explantaten</i> .....	72
Abbildung 33: <i>Gruppierte Boxplots der zweiten Messreihe</i> .....	74

## 2 Einleitung

### 2.1 Gelenke im menschlichen Körper

Unter einem Gelenk versteht man eine Verbindung zwischen zwei starren Elementen, wobei diese Verbindung im menschlichen Körper zwischen den Knochen des Skelettsystems besteht [3]. Hierbei unterscheiden sich die Gelenke in ihrem möglichen Bewegungsausmaß zum Teil stark. So sind hochmobile Verbindungen wie das Schultergelenk *Articulatio (Art.) glenohumeralis* mit vielfältigen Bewegungsmöglichkeiten wie auch nahezu komplett durch den Körper natürlich versteifte Gelenke wie z.B. das Iliosakralgelenk *Art. sacroiliaca* vorhanden.

Das Zusammenspiel zwischen starren und beweglichen Gelenkeinheiten ist eine zentrale Grundvoraussetzung für die Mobilität unseres Körpers und grundlegend für die Lokomotion des Menschen. Durch diese Mobilität wird wiederum eine Vielzahl an Körperfunktionen sichergestellt bzw. unterstützt, die teils weitreichende Auswirkungen auf andere Organsysteme des Körpers haben. So sind Gelenke beispielsweise ein notwendiger Bestandteil der sog. Muskelpumpe im Rahmen derer durch wechselnde Muskelkontraktionen der orthograde Blutfluss stimuliert wird und so ein wertvoller Mechanismus gegen Blutstau und Thrombosen hergestellt wird [3]. Des Weiteren gewährleistet ein stabiler aber durch Gelenke dennoch beweglicher Brustkorb durch Entfaltung des Thorax ein adäquates Atemvolumen.

Dementsprechend wirkt sich ein Mobilitätsverlust durch eine Bewegungseinschränkung der Gelenke auf den gesamten Körper aus. Patienten mit eingeschränkter Beweglichkeit leiden postoperativ verstärkt unter Thrombose bzw. Lungenembolien [4], Delirium [5], Harnwegsinfekten [6] und Schmerzen [7].

Mobilität ist zudem bedeutend für die soziale Teilnahme an der Gesellschaft mit starken Einflüssen auf die Selbstwirksamkeit und Unabhängigkeit einer Person. Somit spielt diese auch eine wichtige Rolle für das psychische Wohlbefinden [8]. Spaziergänge, Haushaltsführung, Sport etc. werden bei einer Einschränkung des Gelenkapparates schwerer bzw. nicht mehr möglich und reduzieren die Lebensqualität des Individuums. Folglich hat ein Erhalt der Gelenkfunktion nicht nur körperliche, sondern auch psychische und soziale Auswirkungen.

Der menschliche Körper verfügt über hunderte Gelenke, die sich gemäß ihrer Morphologie und Funktion in verschiedene Subklassen einteilen lassen [3]. Man unterscheidet morphologisch beispielsweise zwischen „echten“ Gelenken, sog. Diarthrosen und „unechten“ Gelenken, den Synarthrosen. Synarthrosen stellen eine nahezu kontinuierliche Verbindung der Knochen ohne einen Gelenkspalt dar. Dementsprechend gering ist die Beweglichkeit dieses Konstrukts. Diarthrosen hingegen verbinden Knochen diskontinuierlich unter Bildung eines Gelenkspalts, was grundsätzlich eine gewisse Beweglichkeit ermöglicht. Diese ist unter anderem abhängig von der Form der knöchernen Gelenkteile, die in verschiedenen Varianten im Körper vorkommen und großen Einfluss auf das Bewegungsausmaß der jeweiligen Körperpartie haben. Man unterscheidet hier zwischen Kugelgelenken, Ellipsoidgelenken, Sattelgelenken, Scharniergelenken, Radgelenken und Drehscharniergelenken, die sich neben ihrer Morphologie auch in ihren möglichen Bewegungsausmaßen unterscheiden. [3]

Kugel- bzw. Nussgelenke wie das Schulter- bzw. Hüftgelenk besitzen beispielsweise durch ihre drei Freiheitsgrade drei Achsen, um die sich das Gelenk drehen kann und erlauben so Bewegungen in sagittaler, frontaler und axialer Ebene. Scharniergelenke wie die menschlichen Fingerendgelenke erlauben hingegen lediglich Flexion und Extension der beteiligten Partien. [3]

Eine Diarthrose besteht grundsätzlich aus zwei knöchernen Gelenkkörpern, von denen einer den annähernd konvexen Gelenkkopf stellt, der sich in die konkave Gelenkpfanne einbettet. Beide Gelenkkörper sind an ihren Gelenkflächen mit einer Schicht aus hyalinem Knorpel, dem sog. Gelenkknorpel, überzogen. Zwischen den Gelenkflächen ist ein einige zehntel Millimeter breiter Raum ausgebildet, der von Gelenkflüssigkeit, der Synovia ausgefüllt ist. Hierbei handelt es sich um eine visköse, klare Gelenkschmiere, die die Reibung der sich zueinander bewegenden Gelenkflächen reduziert und der Ernährung des physiologisch bradytrophen Knorpelgewebes dient. Umhüllt wird das Gelenk durch eine Kapsel, die den Gelenkspalt mit seinen Komponenten nach außen verschließt. Die Kapsel selbst besteht aus einer straff bindegewebigen äußeren Schicht, die z.T. durch einfließende Bänder zusätzlich verstärkt wird und einer inneren Schicht, die die Innenseite der

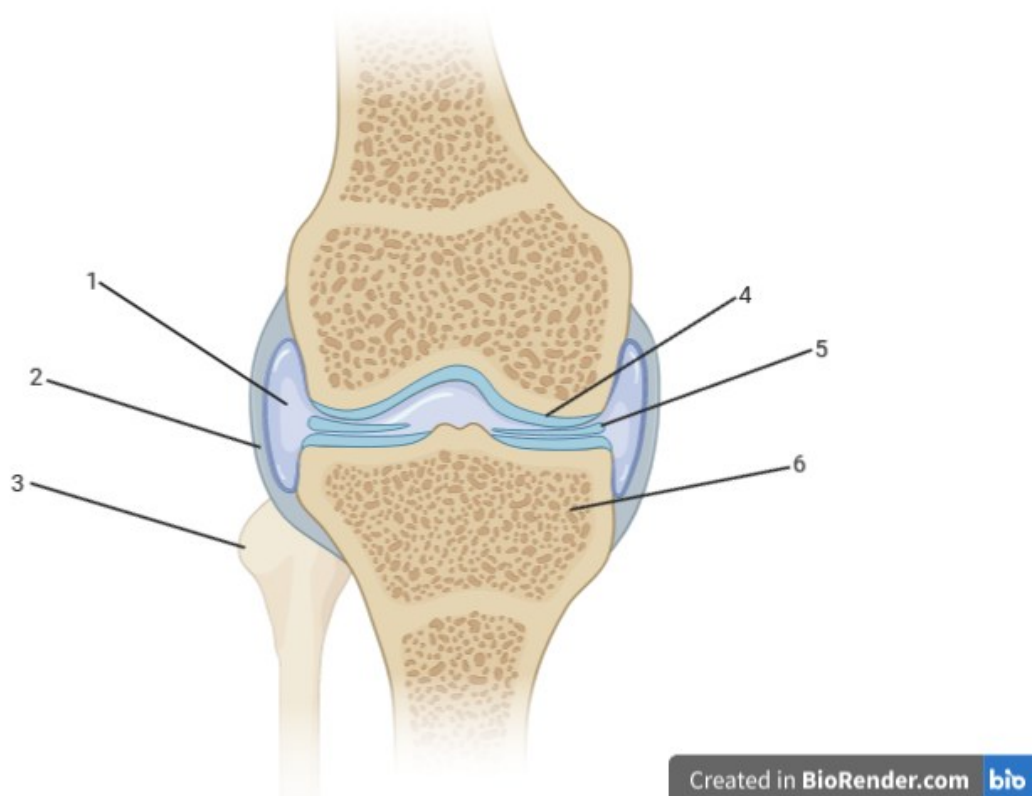
Kapsel auskleidet. Bei der dort gelegenen Synovialis handelt es sich um die Gelenkschleimhaut, die die o.g. Synovia produziert. [3]

Neben den grundsätzlichen Bestandteilen einer Diarthrose, liegen zusätzlich noch Hilfsstrukturen vor, je nach Gelenk in unterschiedlichen Ausprägungen.

Discus articulares sind intraartikuläre Scheiben bestehend aus Knorpel und Bindegewebe, die die Gelenkhöhle einiger Gelenke durchziehen und fest mit der Gelenkkapsel verwachsen sind. Eine Sonderform bilden hierbei die Menisken im Kniegelenk, die halbmondförmig von peripher in die Gelenkmitte ziehen. Durch die Einlage von Disci bzw. Menisken zwischen den Gelenkkörpern wird die Inkongruenz der Gelenkflächen reduziert, wodurch der Druck bei mechanischer Belastung gleichmäßiger auf die gesamte Gelenkfläche verteilt, und die Gefahr der Luxation reduziert wird. (Abbildung 1)

Zusätzlicher Luxationsschutz wird durch die Ausbildung von Gelenklippen gewährleistet. Hierbei handelt es sich um intraartikuläre Wülste aus Faserknorpel, die die Ränder der Gelenkflächen erweitern und vor allem im Hüftgelenk zusätzliche Stabilität bringen.

Eine weitere Hilfsstruktur sind die Bursae synoviales. Dies sind beutelförmige, mit Synovia gefüllte Polster, die zwischen Sehnen bzw. Muskeln und den knöchernen Strukturen eines Gelenks liegen. Aufgabe dieser Schleimbeutel ist das Sicherstellen einer reibungs- und schmerzarmen Bewegung von Sehnen und Knochen gegeneinander [3]. (Abbildung 1)



**Abbildung 1:** Allgemeiner Gelenkaufbau. Schematische Darstellung eines gesunden Gelenks am Beispiel des Kniegelenks im Frontalschnitt. Mit Synovialflüssigkeit gefüllter Gelenkraum (1), Gelenkkapsel (2), Fibula (3), hyaliner Gelenkknorpel (4), Meniscus interarticularis (5), Subchondraler Knochen des Tibiaanteils (6). Auf die Darstellung von Bändern und Sehnen wurde aus Übersichtsgründen verzichtet

Der komplexe Aufbau von Diarthrosen bietet eine Vielzahl möglicher Angriffspunkte für diverse Pathologien. Neben traumatischen Gelenkschäden spielen für die breite Bevölkerung v.a. Arthritiden rheumatischer Genese wie rheumatoide Arthritis oder Spondylitis ankylosans, sowie Arthrose im Rahmen degenerativen Gelenkverschleißes eine Rolle. [9]

Trotz unterschiedlicher Pathogenese haben diese Gelenkleiden eine teils starke Funktionseinschränkung des Bewegungsapparats gemeinsam, was sich als Beeinträchtigung anderer Organsystemen äußern kann [4].

## 2.2 Gelenknorpel im menschlichen Körper

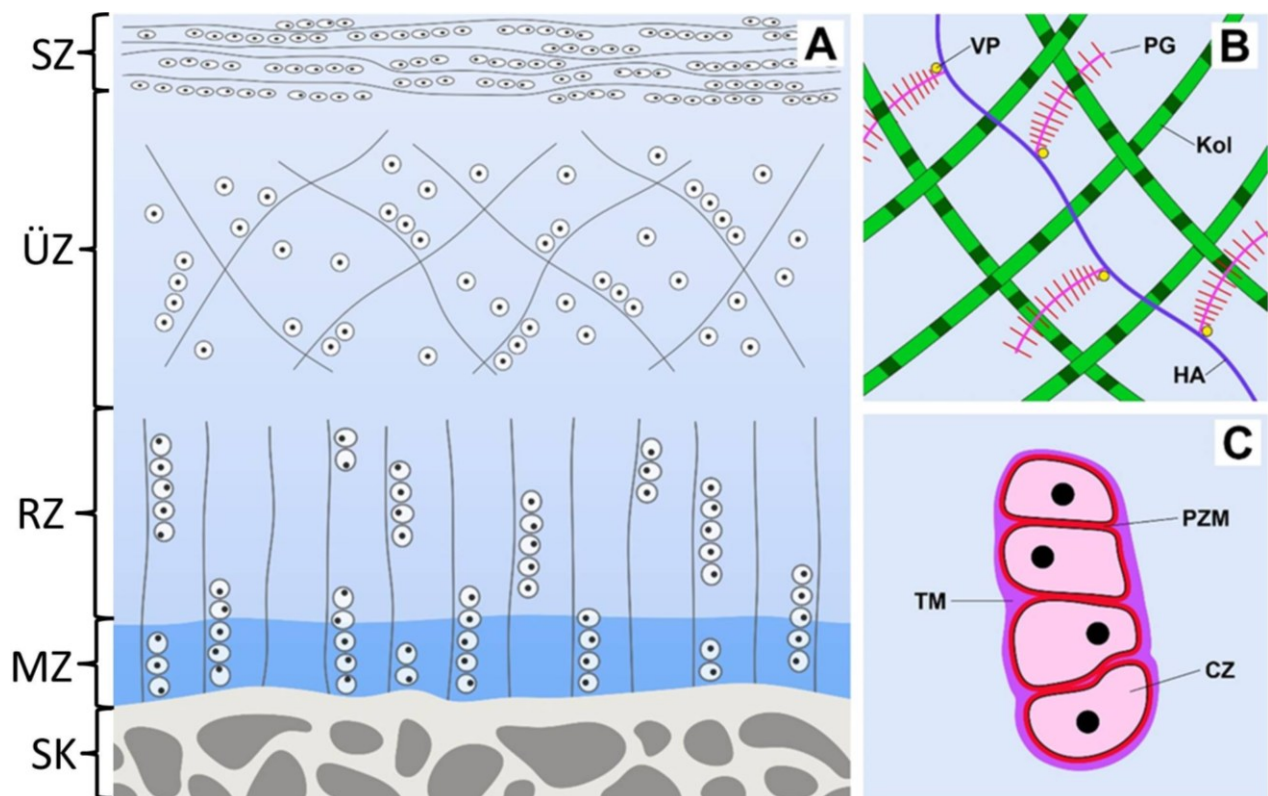
Knorpel bildet mit Knochen und Bindegewebe das Stützgewebe des menschlichen Körpers und wird u.a. gebildet, um tragende schützende und formgebende Funktionen beispielsweise im Ohr zu erfüllen. Ebenfalls dient Knorpelgewebe im Rahmen der chondralen Ossifikation bzw. in der Epiphysenfuge als Primordialskelett und Reservezone für die Entwicklung des Knochenapparats.

Gelenknorpel als Sonderform des hyalinen Knorpels überzieht die knöchernen Anteile eines Gelenks und wirkt durch seine hohe Druckelastizität als eine Art „Stoßdämpfer“ für die darunterliegenden Gelenkkörper. Er sorgt für eine gleichmäßige Verteilung der einwirkenden Kraft und reduziert durch seine glatte Oberfläche die Reibung bei Bewegungen der Gelenkpartien gegeneinander. Da Gelenknorpel kein Perichondrium besitzt erfolgt die Ernährung des Gewebes lediglich über Nährstoffe der Synovialflüssigkeit mittels Diffusion. Folglich ist Gelenknorpel bradytrophes Gewebe ohne eigene Blutversorgung, Innervation und Lymphabfluss.

Neben einem Wasseranteil von rund 70% setzt sich Knorpel aus zellulären Bestandteilen, den Chondrozyten, die sich wiederum aus Chondroblasten differenzieren, sowie protein- und kollagenreichen Matrizen, die den Zellzwischenraum ausfüllen zusammen. Das Netzwerk aus Kollagenen und hydrophilen Glykosaminoglykanen bindet und organisiert den hohen Wassernanteil des Knorpels und ist so für die Zugfestigkeit und Elastizität des Gewebes mitverantwortlich. Hierbei ist die perizelluläre Matrix (PZM), die die Chondrozyten unmittelbar umhüllt von der extrazellulären Matrix (EZM) biomechanisch, morphologisch und histologisch zu unterscheiden. [10, 11]

Histologisch charakterisiert sich Gelenknorpel durch kleine Gruppen rundlicher Chondrozyten, die sich wiederum aus Chondroblasten differenzieren und von Interzellulärschubstanz umschlossen werden. Typisch für diese Zellen ist eine ausgeprägte Basophilie als histologisches Korrelat hoher Proteinsynthese. Innerhalb des Gelenknorpels beschreibt das Chondron die Einheit aus einem oder mehreren Chondrozyten sowie der umgebenden PZM und bildet die hauptsächliche Stoffwechseleinheit im Knorpelgewebe. [12]

Ein Gelenkknorpel kann durch die arkadenförmige Verlaufsrichtung der Kollagenfibrillen in vier Zonen eingeteilt werden: In der Mineralisierungs- und Radiärzone verlaufen die Fibrillen senkrecht zunächst jeweils durch mineralisierten und nicht-mineralisierten Knochen. In der Übergangszone richten sich die Fibrillen zunehmend horizontaler aus und münden schließlich in ihrem Scheitelpunkt in der oberflächlichsten der vier Zonen, der Tangentialzone auch Superfizialzone oder Oberflächenzone genannt.



**Abbildung 2:** Schematische Darstellung hyalinen Gelenkknorpels im Längsschnitt (A). Zonale Gliederung in Superfizialzone (SZ), Übergangszone (ÜZ), Radiärzone (RZ), Mineralisationszone (MZ, dunkelblau) und subchondralen Knochen (SK). Illustration des Molekülnetzwerks der Extrazellulärmatrix des hyalinen Gelenkknorpels (B). Ein Hyaluronan-Molekül (HA) ist über Verbindungsproteine (VP) mit Proteoglykanen (PG) wie z.B. Perlecan, Biglykan oder Decorin verbunden. Dieser Verbund bildet gemeinsam mit Kollagenfasern (Kol) ein dichtes Netzwerk. Chondron (C). Chondrozyten (CZ) umhüllt von Perizellulärmatrix (PZM, rot) sowie Territorialmatrix (TM, lila). Mit freundlicher Genehmigung der Dissertation von Julius Wolfgart entnommen (Entstehung von Chondrozytenclustern bei Gonarthrose – eine explorative Analyse in Bezug auf onkogene Prozesse, 2024.)

Obwohl sich die Einteilung der Zonen nach den Unterschieden der Fibrillenverläufen des Kollagens richtet, bestehen zudem Unterschiede untereinander bzgl. Anordnung der Chondrozyten, Proteoglykangehalt und Zusammensetzung der PZM (Abbildung

2). Während sich Chondrozyten in der Radiärzone typischerweise säulenförmig Anordnen, lassen sich in der Superficialzone je nach Gelenktyp, Belastungsmaß und Lokalisation innerhalb des Gelenks im gesunden Knorpel verschiedene Anordnungsmuster identifizieren: Pairs, Strings und Double Strings [12] [13].

## **2.3 Die Perizelluläre Matrix im menschlichen Gelenkknorpel**

Jeder Chondrozyt ist saumartig von einer PZM umhüllt. Die PZM enthält viele Bestandteile, die auch in der EZM vorkommen, zeigt jedoch auch Unterschiede in ihrer Zusammensetzung. Die EZM besteht hauptsächlich aus Kollagen Typ II, sowie Proteoglykanen. (Abbildung 2)

Im Vergleich zur EZM beinhaltet die PZM hingegen hauptsächlich Kollagen vom Typ VI und IX mit Kollagen VI als Hauptkomponente, sowie eine höhere Konzentration an Proteoglykanen wie Perlecan, Decorin, Hyaluronan, Biglycan und Aggrecan-Monomeren und dem Glykoprotein Fibrillin-1. [10] Diese Bestandteile geben die biomechanischen und biochemischen Eigenschaften der PZM vor und erklären zumindest teilweise die funktionellen Unterschiede zur EZM. So konnte gezeigt werden, dass Kollagen VI ein integraler Bestandteil zur Aufrechterhaltung der PZM-Struktur ist und sich ein Verlust von Typ VI Kollagen negativ auf die Elastizität des gesamten Gelenkknorpels auswirkt [10]. Ein enger Mitspieler von Kollagen ist hierbei das Proteoglykan Perlecan. Als Bindungsstelle für diverse Wachstumsfaktoren reguliert es Chondrozytendifferenzierung sowie die enchondrale Ossifikation und hält Rollen in Zell-Matrix-Interaktionen und Matrix-Organisation inne [14]. Bei Verlust oder Mutation von Perlecan entstehen deshalb zum Teil schwerwiegende skelettale Dysplasien [10]. Perlecan weist eine starke Bindung zu Typ IV Kollagen auf und inhibiert den Abbau von Kollagenetzen durch katabole Proteasen [15], weshalb Perlecan und anderen Proteoglykanen generell eine tragende Rolle in der Stabilität und Organisation der PZM zugeschrieben werden kann [16, 17]. Des Weiteren kommt Aggrecan in hohen Mengen in der PZM vor und wirkt u.a. als wichtiger Bestandteil der Matrix-Reorganisation durch seine geringe Halbwertszeit und schnelle Auf- und Abbauraten. [10, 18]

Obwohl die genaue Funktion der PZM noch nicht vollständig geklärt ist, wird ihr eine integrale Rolle in der Regulation der Chondrozyten und somit auch des Gelenkknorpels zugewiesen. So fungiert die PZM als eine Art Depot für Wachstumsfaktoren wie FGF2, die in der Matrix gelagert sind und auch durch deren extrazelluläre Proteoglykane beeinflusst werden. [14, 19] Vergleichbar mit einem strukturellen, funktionellen und biochemischen „Pfortner“ für den Chondrozyt reguliert die PZM zudem den Kontakt zwischen Zelle und EZM und nimmt somit als physische Barriere und biochemischer Filter direkten Einfluss auf die biochemische Signaltransduktion und somit den Stoffwechselhaushalt im Gelenkknorpel [10, 14]. Dieser Stoffwechsel basiert auf einem komplexen Zusammenspiel einer Vielzahl an Faktoren [20] und eine Störung dieses Gleichgewichts führt zu einer Reorganisation bzw. Degeneration des Gewebes. Zahlreiche Rezeptoren bzw. Faktoren üben Einfluss auf Homöostase des Gelenkknorpels aus, wobei sich der Kontakt von Matrixbestandteilen mit Chondrozyten als wiederkehrendes Thema präsentiert. So herrscht in der Forschung ein breiter Konsens, dass die regulierte Wechselwirkung zwischen EZM, PZM und Chondrozyten von großer Bedeutung für Knorpelentwicklung und –erhalt ist [14, 16, 21].

Die oben beschriebene Schutzfunktion durch die PZM spiegelt sich auch in Apoptoseraten von Chondrozyten wider. In einer Gegenüberstellung von isolierten Chondrozyten und isolierten Chondronen konnte gezeigt werden, dass PZM-behüllte Chondrozyten deutlich apoptoseresistenter sind als unbehüllte Zellen [14]. Es liegt demnach nahe, dass die PZM nicht nur eine Regulation des Stoffwechsels bewirkt, sondern auch als eine Art „Schutzschild“ der Chondrozyten vor schädigenden Einflüssen, sowohl interne wie externe, fungiert.

Die PZM wirkt nicht nur auf die Freisetzung von Mediatoren bzw. Faktoren, sondern beeinflusst das Wirkspektrum eben dieser. Es wurde nachgewiesen, dass Matrilin-3 aus der Proteoglycan-assoziierten Molekülfamilie der Matrilin von einer katabolen auf eine anabole Wirkung wechselt, sobald es in die PZM integriert wird [10]. Dieser Sachverhalt unterstreicht die bereits etablierte Bedeutung der PZM für den Stoffwechselhaushalt der Chondrozyten und legt nahe, dass Beeinträchtigungen der PZM-Struktur im Rahmen degenerativer Veränderungen zu einer gestörten Beeinflussung von Stoffwechselmediatoren führen kann.

Neben der Weiterleitung von biochemischen Signalen wirkt die PZM außerdem auf die Übertragung biomechanischer Reize und spielt eine wichtige Rolle bei der Umwandlung von mechanischen Stimuli innerhalb des Gelenkknorpels. Neben chemischen Signalen spielen mechanische Reize eine große Rolle zur Steuerung von Differenzierung und Proliferation der Chondrozyten. Die PZM agiert hier als Schnittstelle zwischen mechanischen Impulsen, die auf den Knorpel wirken und biologischen Prozessen, die im Gegenzug in Chondrozyten losgetreten werden. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass mechanische Impulse zu einer erhöhten Expression des Indian-hedgehog Proteins (IHH) führen, welches wiederum die Chondrozytenproliferation stimuliert. [14, 20]

Abhängig von der räumlichen Lage der Chondrozyten innerhalb des Gelenkknorpels dämpft bzw. verstärkt die PZM in Wechselwirkung mit der EZM die mechanische Last auf die Zelle, die dadurch in ihrer Expression verschiedener Stoffwechselfaktoren beeinflusst wird. Choi und Kollegen zeigten, dass Chondrozyten in oberflächlichen Knorpelschichten von einer PZM umgeben werden, die die hier relativ hohe mechanische Last dämpft. In tieferen Schichten des Gelenkknorpels werden mechanische Stimuli des gesamten Knorpels hingegen überproportional durch die PZM an die Chondrozyten weitergegeben, obwohl die mechanische Last der EZM auf die Chondrozyten abnimmt. Es wird angenommen, dass diese Umverteilung der mechanischen Last auf die Chondrozyten durch die PZM eine Angleichung der Reizantwort von Chondrozyten verschiedener Knorpelschichten zur Folge hat [10].

Obwohl noch viele Sachverhalte ungeklärt sind, besteht in der aktuellen Forschung Einigkeit darüber, dass der PZM fundamentale Aufgaben bzgl. Erhalt und Reorganisation des Gelenkknorpels zukommen. Folglich haben strukturelle Änderungen bzw. Beeinträchtigungen der PZM unmittelbare Folgen für den Stoffwechselhaushalt der Chondrozyten und die Vitalität des Knorpelgewebes als Ganzes.

## **2.4 Arthrose des menschlichen Gelenks**

### **2.4.1 Symptome, Diagnostik und Epidemiologie**

Bei Arthrose handelt es sich um eine degenerative Gelenkerkrankung, die sich auf diarthrotische Gelenke auswirkt. Symptome der Erkrankung beinhalten Gelenkschmerzen, die sich als Anlaufschmerzen nach Ruhephasen, belastungsabhängigen Bewegungsschmerzen und auch Ruheschmerzen präsentieren können. Weitere Symptome umfassen Gelenkergüsse durch Aktivierung entzündlicher Prozesse, sowie in Spätstadien zunehmende Gelenkdeformation und Krepitationen. Da das Ausmaß und die Progression der Erkrankung maßgeblich durch mechanische Belastung beeinflusst werden, sind Gon- und Coxarthrose zwei vergleichsweise häufige Erkrankungsformen, doch auch Arthrose der Handgelenke wie Rhizarthrose und Heberden-Arthrose, sind häufige Arthroseformen. [11, 22] Arthrose beschränkt sich nicht nur auf eine Degeneration des Gelenkknorpels, sondern bezieht auch andere Bestandteile des Gelenks, wie subchondrale Knochenanteile, Gelenkkapsel und Bandapparate des Gelenks mit ein [11]. Risikofaktoren sind vielfältig und umfassen Alter, Geschlecht, BMI, vorangegangene Verletzungen, Achsenfehlstellungen und genetische Faktoren [22]. Da das Ausmaß und die Progression von Arthrose maßgeblich durch regelmäßige mechanische Belastung beeinflusst werden, sind fortgeschrittenes Alter, ein erhöhter BMI, sowie ein hohes Maß an mechanischer Belastung in Beruf oder Freizeit wichtige Risikofaktoren des Gelenkverschleißes. [22-24]

Die Prävalenz von Arthrose variiert abhängig von der verwendeten Methodik, den erfassten Gelenken sowie den isolierten Populationen teils stark [11, 22]. So wurden bisher Prävalenzen von Gonarthrose von 27% für 65-69 Jährige und 51% für über 85-Jährige berichtet, die radiologisch diagnostiziert wurden. [25] Klinisch diagnostizierte Gonarthrose liegt laut Datenlage der US Health and Nutrition Examination Survey hingegen mit 12,1% für 25-74 Jährige [26]. Erschwert wird die epidemiologische Charakterisierung der Arthrose durch eine Diskrepanz von bildgebender Diagnostik und klinischen Symptomen. Nicht alle Patienten mit radiologisch gesicherter Arthrose zeigen klinische Symptome und umgekehrt. Dennoch ist Arthrose die häufigste

Gelenkerkrankung unserer Gesellschaft und zählt zu den führenden Ursachen für eine Behinderung im Alter. [11, 22, 23]

Obwohl Arthrose eine Volkskrankheit ist, zeigen o.g. Zahlen, dass eine eindeutige Diagnosestellung schwierig sein kann. Mittlerweile existieren verschiedene Indizes und Klassifikationen, die den Diagnoseprozess vereinheitlichen sollen. Abhängig von der verwendeten Methode werden einzelne Phasen dieser mehrphasigen Erkrankung jedoch besser oder schlechter wahrgenommen. Weitverbreitet ist die Anwendung von klinischen Untersuchungen sowie Röntgendiagnostik des betroffenen Gelenks. Für Röntgenbilder wurde bereits 1957 eine radiographische Beurteilungsgrundlage eines arthrotischen Gelenks durch Kellgren und Lawrence gelegt, die in modifizierter Form noch heute Anwendung findet [27]. Zwar hilft die Bildgebung zur Diagnosesicherung bei unklaren klinischen Befunden, die mit Arthrose in Verbindung gebrachten abnormalen Bildbefunde zeigen sich jedoch auch bei einem großen Teil älterer Menschen ohne klinische Symptome und müssen dementsprechend in einen klinischen Kontext gesetzt werden. [11]

Als Volkskrankheit übt Arthrose eine große Belastung auf moderne Gesundheitssysteme aus [9]. Die in Frankreich durchgeführte „COART“-Studie beschreibt eindrücklich, in welchem Ausmaß sich Arthrose auf die Ressourcen und Strukturen eines Gesundheitssystems auswirkt. Bei 4,6 Millionen Patienten mit symptomatischer Arthrose ergaben sich direkte Kosten von über 1,3 Milliarden Euro, was rund 1,7% der gesamten Ausgaben des französischen Gesundheitssystems für das Jahr 2002 ausmachte. [28]

Konservative Therapiemaßnahmen der Arthrose beinhalten u.a. das Management der patientenspezifischen Risikofaktoren, wie z.B. regelmäßige Bewegung und Reduktion des Körpergewichts. Ggf. wird physikalische Therapie wie Ergotherapie, Massagen und Wärmebehandlungen eingesetzt, um Beschwerden zu lindern. [11]

Medikamentöse Therapieoptionen beschränken sich meistens auf Analgesie sowie Eindämmung inflammatorischer Prozesse mittels nicht steroidal Antirheumatika (NSAR), Kortikosteroiden und Paracetamol, jedoch findet sich auch die Supplementation von Glykosaminoglykanen in der Behandlung. Topische und systemische Anwendungen der Medikamente bergen dabei jeweils eigene Chancen und Risiken. [11, 29, 30]

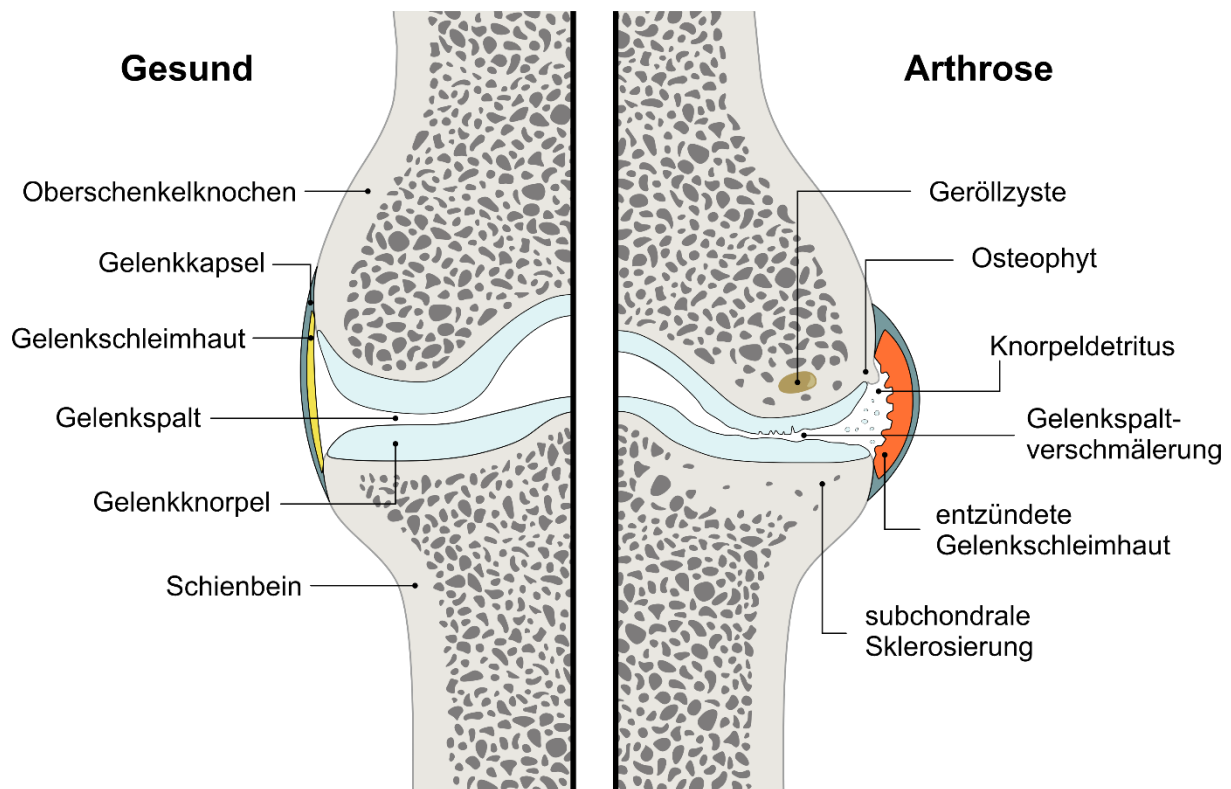
Ultima Ratio ist der chirurgische Gelenkersatz unter Einsatz von Endoprothesen. Obwohl es sich um einen radikalen Eingriff handelt, hat sich der Einsatz von

Endoprothesen als ein effektives Verfahren zur Behandlung der fortgeschrittenen Gon- und Coxarthrose etabliert und gehört mittlerweile zu den am häufigsten durchgeführten Eingriffen in Deutschland.

#### **2.4.2 Einflüsse von Arthrose auf das menschliche Kniegelenk**

Ein diarthrotisches Gelenk wird hauptsächlich auf drei Wegen durch die degenerativen Prozesse im Rahmen eines Arthroseleidens beeinflusst. Ein Umbau subchondraler Knochenanteile mit fortschreitender Sklerosierung des Knochens, Synovialitis, sowie progressiver Degeneration des Gelenkknorpels. Da sich diese Arbeit auf die Auswirkungen der degenerativen Knorpelprozesse beschäftigt wird im Folgenden ausschließlich auf diese eingegangen.

Im Zuge der Knorpeldegeneration lassen sich am Gelenkknorpel makroskopische Veränderungen beobachten. Die physiologisch straffe, druckelastische und glatte Knorpeloberfläche zerklüftet im Rahmen der Arthrose durch Abschilferung von Knorpelfragmenten mit einer subsequenten Verminderung der Knorpeldicke. In Endstadien kommt es zu einer makroskopisch sichtbaren Kalzifizierung des Knorpels sowie zur Ausbildung osteophytärer Anbauten um das Gelenk. (Abbildung 3)



**Abbildung 3:** Charakteristische Arthrosezeichen in schematischer Gegenüberstellung eines gesunden (links) und arthrotischen (rechts) Kniegelenks im Frontalschnitt. Mit freundlicher Genehmigung der Dissertation von Julius Wolfgart entnommen. (Entstehung von Chondrozytenclustern bei Gonarthrose – eine explorative Analyse in Bezug auf onkogene Prozesse, 2024)

Zwar illustrieren o.g. Effekte eindrucksvoll den degenerativen Charakter von Arthrose, häufen sich allerdings erst in späten Arthrostadien. Auf zellulärer und molekularer Ebene lassen sich hingegen pathophysiologische Vorgänge der Erkrankung beobachten, lange bevor es zu makroskopischen Manifestationen kommt. [31]

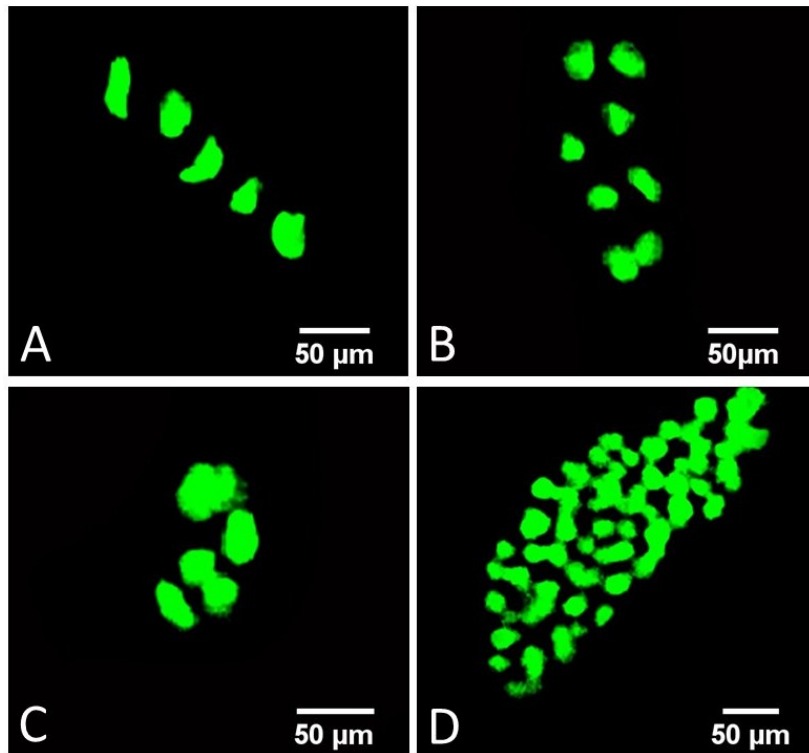
Ein Charakteristikum von Arthrose ist die räumliche Umorganisation der Chondrozyten im Gelenkknorpel. Wie bereits erwähnt, hängt die räumliche Anordnung auch von der Art des Gelenks ab. So findet im menschlichen Kniegelenk mit fortschreitender Degeneration des Knorpels ein Übergang von Chondrozytenpaaren („Pairs“) über Einzelstränge („Strings“) zu Doppelsträngen („Double strings“) und schließlich zu kleinen und großen Zellhaufen („Small Cluster“, „Big Cluster“) statt (Abbildung 4). Big Cluster umfassen über 20 Zellen und sind in einer dementsprechend große

Knorpelhöhle eingebettet. Sie häufen sich in der Nähe von Fissuren und Oberflächenschäden des Knorpels. [12]

Endpunkt der räumlichen Reorganisation der Chondrozyten ist ein diffuses Zellmuster mit Verlust einer strukturierten Zellanordnung [12, 32].

Neben der Umordnung der Chondrozyten sterben diese im Rahmen der Degeneration zudem teilweise ab. Deshalb bietet sich die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Strukturen mittels einer Calcein/Propidiumiodid-Färbung an, welche zwischen lebenden und toten Chondrozyten unterscheiden kann: In-vitro wird Calcein-AM, ein Acetoxymethylester, in lebende Zellen aufgenommen und durch Esterase-Enzyme in Calcein gespalten. Durch Komplexbildung des Calceins mit Calciumionen ist das so entstehende Molekül in der Lage, grün zu fluoreszieren. Nur lebende Zellen besitzen die Esteraseaktivität, um die grüne Fluoreszenz zu bilden. Folglich leuchten nur lebende Zellen grünlich, weshalb Calcein als Markierung lebender Zellen und zum Test der Zellvitalität verwendet werden kann. Propidiumiodid (PI) auf der anderen Seite, ist ein Nukleinsäureinterkalator und lagert sich in die Doppelhelix zellulärer DNA ein. Da es sich hierbei um ein geladenes Molekül handelt ist PI nur in der Lage, die Zellmembranen toter Zellen zu überqueren, da hier kein Zellmembranpotential mehr aufrecht gehalten wird. Dementsprechend färbt PI die Zellkerne toter Zellen an und kann somit als Markierung toter Zellen verwendet werden.

Vorangegangene Studien versuchten bereits, diese Chondrozytenkonfigurationen zur Diagnostik und Früherkennung von Arthrose zu implementieren. Auch ein Monitoring von Zellimplantaten, z.B. bei der autologen Chondrozytentransplantation scheint denkbar. [12]



**Abbildung 4:** *Sequenzielle Darstellung verschiedener Chondrozytenmuster mittels Fluoreszenzmikroskopie. Die Chondrozyten wurden mit Calcein angefärbt. Durch Arthrose und die begleitende Knorpeldegeneration kommt es zur Konfigurationsänderung der Chondrozyten von Strings (A) zu Double Strings (B), Small Cluster (C) und Large Cluster (D).*

In bisherigen Studien konnten im Kniegelenk Strings noch zu intaktem, nicht-arthrotischem Knorpel gezählt werden, wohingegen Double Strings mit beginnenden Schäden des Knorpels durch Arthrose korreliert wurden [12]. Von Danalche et. al wurde vorgeschlagen, dass Double Strings als morphologisches Korrelat von regenerativer Zellproliferation auch physiologisch in der germinativen Zone von Gelenkknorpel vorkommen kann. Dennoch bildet die Ausbildung von Double Strings im Kniegelenk einen visuellen Marker für beginnende Knorpeldegeneration im Zuge von Arthrose. [33]

Unter physiologischen Bedingungen verfügen Chondrozyten nur über eine entsprechend geringe mitotische Aktivität [11]. Als einziger Zelltyp im menschlichen Gelenkknorpel fallen Chondrozyten trotz ihres limitierten Stoffwechsels die Aufgaben der Instandhaltung und Ummodellierung des Knorpelgewebes zu. Die allmähliche und fortschreitende Anordnung zu Clustern ist hingegen Resultat einer durch verschiedene Pathomechanismen der Arthrose losgetretenen Chondrozytenproliferation. Unter physiologischen Bedingungen weisen Chondrozyten

im ausdifferenzierten Zustand keine Proliferation sowie einen stabilen Phänotyp vor. In arthrotischem Knorpel verlieren die Zellen hingegen ihre Differenzierung und zeigen Ähnlichkeiten zu Knorpelzellen des Primordialskeletts im Rahmen der enchondralen Ossifikation. [34]

### **2.4.3 Entzündungsprozesse bei Arthrose**

Arthrose ist eine Krankheit, die durch mechanische Belastung begünstigt wird. Entzündliche Komponenten sind weniger ausgeprägt als in vergleichbaren Gelenkerkrankungen wie Arthritiden rheumatischer Genese. Trotzdem tragen entzündliche Prozesse mit einer gesteigerten Produktion von Zytokinen und anderen entzündungsfördernden Faktoren maßgeblich zur Degeneration des Gelenkknorpels bei Arthrose bei (Abbildung 5).

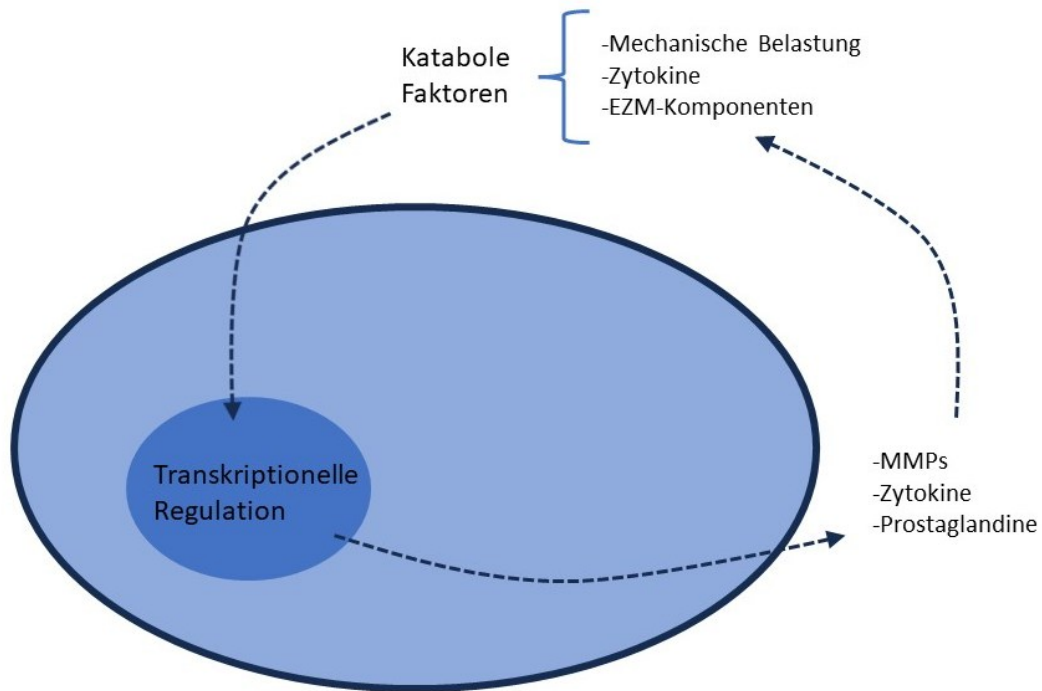
Ein Entzündungsgeschehen im Zuge der Arthrose konnte bereits mit einem signifikanten CRP-Anstieg nachgewiesen werden, doch vor allem proinflammatorische Zytokine wie Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) und Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) spielen eine wichtige Rolle in der Pathogenese [35, 36]. Chondrozyten des arthrotischen Knorpels sprechen auf Immunfärbungen für IL-1 $\beta$  an, produzieren Enzyme zur Aktivierung für IL-1 $\beta$  und exprimieren Rezeptoren des Zytokins. Über diese Rezeptoren nimmt IL-1 $\beta$  auf die Chondrozyten Einfluss und führt zu Zellproliferation, Rekrutierung von Leukozyten, Pyrogenese, sowie der Induktion von Akute-Phase-Proteinen. [36]

Unregulierte Zytokinproduktion führt zu einer Dysbalance anaboler und kataboler Stoffwechselwege und somit zu einer gestörten Homöostase der Chondrozyten [36]. So konnten erhöhte Spiegel an IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  mit einer unterdrückten Genexpression für Typ II Kollagen und einer gestörten Proteoglykansynthese in Verbindung gebracht werden. [37, 38]

Chondrozyten reagieren auf den Einfluss proinflammatorischer Zytokine mit einer gesteigerten Produktion an Matrixmetalloproteasen (MMPs)[39, 40]. MMPs sind hochkatabole, zinkabhängige Proteinase und sind aufgrund dieser Abhängigkeit von Metallionen als Kofaktoren für Reaktionen von anderen Endopeptidasen unterscheidbar. MMPs sind am Umbau der Extrazellulärmatrix im gesamten Körper beteiligt sind und finden physiologisch hauptsächlich dann Verwendung, wenn ein radikaler Umbau von Gewebe vonnöten ist, wie sie z.B. bei der Wundheilung oder der

Embryonalentwicklung [41]. Zytokine wirken hier als Aktivatoren für MMPs [36, 42, 43], vor allem bei MMP-13 laufen verschiedene proinflammatorische Aktivierungskaskaden zusammen [42]. Da MMP-13 eine hohe Affinität zu Kollagen Typ II zeigt, führt ein Zytokinanstieg im Zuge der Arthrose über eine gesteigerte enzymatische Verdauung durch MMPs zum Ab- bzw. Umbau des Knorpelgewebes [42].

MMPs sind für den Ab- bzw. Umbau verschiedenster Matrixbestandteile zuständig [41, 44, 45]. Dementsprechend verändern sich mit fortschreitender Zerstörung der physiologischen Integrität der Matrix auch deren biochemische und biomechanische Eigenschaften [18, 32]. So konnte gezeigt werden, dass sich Kollagen- und Aggrecangehalt der EZM im Rahmen von Arthrose ändern [46]. Ebenfalls kommt es zu einem Austausch von Kollagentypen: Es wird sowohl in PZM und EZM vermehrt Kollagen Typ II durch Kollagen Typ I ersetzt, was andere Interaktionen mit den benachbarten Proteoglykanen aufweist [46, 47]. Zudem konnten ein erhöhter Gehalt an Kollagen Typ VI in der PZM, eine gesteigerte Retention von Wasser sowie ein erhöhter Kollagen Typ X Gehalt der Superfizialschicht im Rahmen von Arthrose nachgewiesen werden [47, 48]. All diese pathologischen Änderungen implizieren, dass sich neben der Elastizität und strukturellen Integrität der Matrix auch die mechanischen Impulse, die an die Chondrozyten weitergegeben werden, ändern. Beispielsweise verringert der verminderte Proteoglykangehalt der arthrotischen EZM und PZM die Festigkeit der Matrix, weshalb Kompressionen des Gewebes an die umliegenden Chondrozyten weitergegeben werden, was die Chondrozyten wiederum höherer mechanischer Belastung aussetzt [46]. Diese antworten auf die erhöhte mechanische Belastung daraufhin mit einer gesteigerten Synthese von Zytokinen, Chemokinen und Proteasen, die die Progression von Arthrose wiederum weiter vorantreiben [49]. Innerhalb dieses Teufelskreises ist es schwer, einen Startpunkt des Knorpelkatabolismus auszumachen. Fest steht allerdings, dass sowohl mechanische Belastung wie auch zytokininduzierte Kaskaden eine große Rolle spielen [49]. (Abbildung 5)



**Abbildung 5:** Vereinfachte Schematisierung von in-vivo Signalen, die im Rahmen von Arthrose auf Chondrozyten wirken. Katabole Faktoren wie kontinuierliche mechanische Belastung, Zytokine und Exposition der Chondrozytenoberfläche mit extrazellulären Matrixkomponenten (EZM-Komponenten) induziert intrazelluläre Regulationsmechanismen, die zu einer erhöhten Produktion von Matrixmetalloproteasen (MMPs), Zytokinen und Prostaglandinen führen. Diese wirken wiederum als katabole Faktoren und schließen so den Kreislauf des arthrotischen Katabolismus.

Die enge räumliche Beziehung der PZM zu den Chondrozyten erlaubt es der PZM eine Art Filter- bzw. Schutzfunktion auszuüben. Jedes externe chemische oder mechanische Signal, das auf die Chondrozyten wirkt, kann von der umhüllenden PZM moduliert werden [18, 47]. Änderungen der PZM-Zusammensetzung sowie strukturelle Schäden wirken sich folglich auf die Übertragung externer Signale auf Chondrozyten und letztendlich deren Zellstoffwechsel aus. [16, 18, 46]

Kontakt mit EZM-Bestandteilen bringt Chondrozyten zu einer Abweichung von deren Phänotyp durch Hypertrophie und Proliferation bis im extremen hin zu Apoptose [50]. Durch strukturelle Schäden der PZM kommen EZM-Komponenten in Kontakt mit Chondrozyten und wirken sich auf die Progression der Arthrose aus. Beispielhaft hierfür soll die Discoidin Domain Rezeptor (DDR) - MMP13 Achse ausgeführt werden: DDRs sind Teil der Tyrosinkinase-Rezeptorfamilie und regulieren u.a. Zellproliferation und Adhäsion der Chondrozyten. Als Oberflächenrezeptoren für Kollagen Typ II mit physiologisch niedrigen Aktivitätsleveln interagieren DDRs folglich mit einem Hauptbestandteil der EZM, was bei intakter PZM jedoch nur in sehr geringem Maße

der Fall ist. Durch den Verlust bzw. die Schädigung der PZM kommt es zu einem Kontakt der DDRs mit Kollagen Typ II der EZM, was nun eine Stimulation der MMP-13 Expression in den jeweiligen Chondrozyten hervorruft. [48, 51]

Bei Verlust der strukturellen Matrixintegrität werden sowohl inflammatorische wie auch nicht-inflammatorische Kaskaden aktiviert, die die Progression der Arthrose vorantreiben. Gepaart mit der stark limitierten Regenerationsfähigkeit von Gelenkknorpel stellt der Um- bzw. Abbau der Matrix einen Punkt ohne Wiederkehr dar. [32]

Infolgedessen konzentrieren sich mehr und mehr Studien auf Aufrechterhaltung der strukturellen Integrität von PZM und EZM als eine mögliche Therapieoption gegen Arthrose.

## **2.5 Grundlagen Rasterkraftmikroskopie**

Die Therapie der Arthrose ist bisher noch limitiert durch das begrenzte Verständnis von gesundem und arthrotischem Knorpel, insbesondere auf Nano- bzw. Molekülebene, jedoch erlauben Fortschritte der Nanotechnologie mittlerweile Untersuchungen von Biomechanik und Krankheitsprogression auf einer zellulären Ebene.

Die Rasterkraftmikroskopie (engl. *Atomic Force Microscopy*; kurz *AFM*) hat sich als wertvolle Technik hervorgetan, um biomechanische Eigenschaften von verschiedenen Geweben qualitativ und quantitativ zu beurteilen. Im Gegensatz zu üblichen Messarten von Lichtmikroskopen misst das AFM nicht auf optischem Weg mittels Linsen, sondern bildet mechanische Wechselwirkungen zwischen einer Sonde und der Probe ab. Die Sonde tastet die Probenoberfläche ab und produziert so Messungen bzgl. der biomechanischen Eigenschaften und des Oberflächenprofils der Probe.

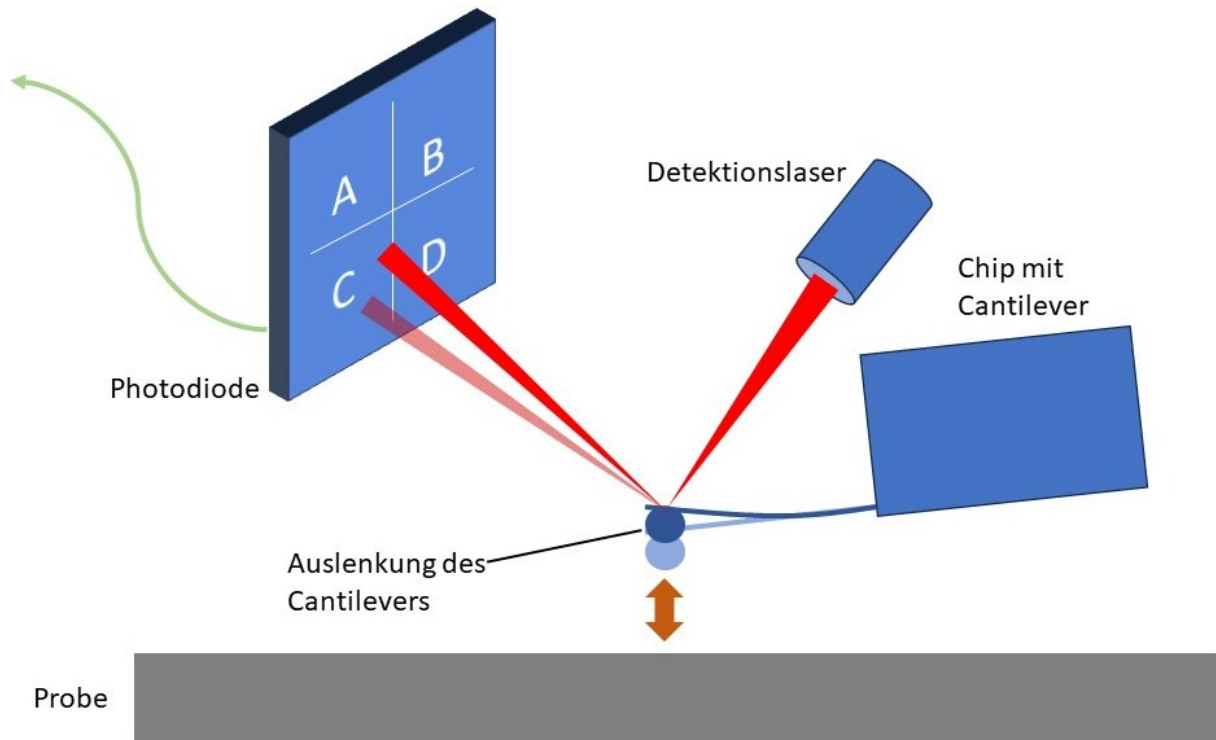
Aufgrund der hohen mechanischen Belastung, der muskuloskelettales Gewebe ausgesetzt ist sind die biomechanischen Eigenschaften hier von besonderer Relevanz. Durch Auflösungen bis in den Nanometerbereich ist das AFM prädestiniert für die Untersuchung einzelner Knorpelzellen sowie deren extrazellulären Matrizen. Dementsprechend konnten mittels Rasterkraftmikroskopie bereits erfolgreich Untersuchungen von Chondrozyten, molekularen Matrixbestandteilen und biomechanischen Eigenschaften von PZM und EZM durchgeführt werden. [32, 52]

Von Vorteil ist weiterhin, dass die Untersuchungen in biologisch aktivem Gewebe unter physiologischen Bedingungen erfasst werden können. Zellen und Gewebe können ohne Fixierung auch während Messungen in Nährmedien gehalten werden, weshalb Messungen an lebendem Gewebe durchführbar sind. Kombiniert mit der hohen Auflösung, zu der das AFM imstande ist, liefert diese Technik folglich eine neue Perspektive auf die molekularen Veränderungen des Knorpelgewebes im Zuge krankhafter Veränderungen.

### **2.5.1 Funktionsweise**

Das AFM führt Messungen mittels mechanischen „Abtastens“ der Probe durch. Dabei besteht der Detektionsmechanismus im Wesentlichen aus drei Komponenten:

- 1.) Eine biegsame Blattfeder (engl. *Cantilever*), die in einen Chip eingebettet ist. Am Cantilever ist wiederum eine scharfe Spitze angebracht, die im Rahmen der Messungen als Sonde direkt mit der Probe interagiert.
- 2.) Ein Laser, der auf die Rückseite des Cantilevers gelenkt wird.
- 3.) Ein optischer Sensor, der mittels einer Photodiode den von der Rückseite des Cantilevers reflektierten Laserstrahl erfasst.

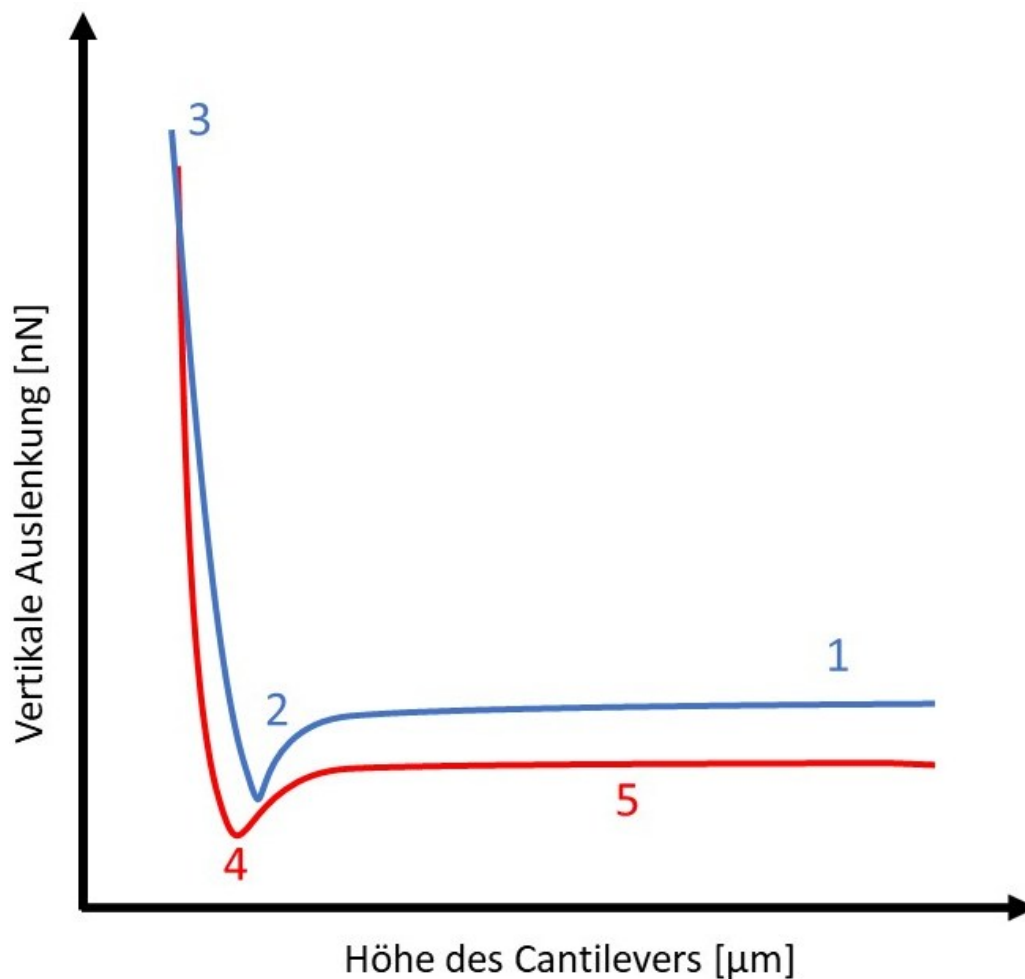


**Abbildung 6:** Schematische Darstellung des Funktionsprinzips und der wesentlichen Bestandteile eines Rasterkraftmikroskops. Die Auslenkung des Cantilevers durch Interaktion mit der Probe übersetzt sich in eine Veränderung des Reflexionswinkels des Detektionslasers. Pro Quadranten der Photodiode wird nun ein abgeändertes Stromsignal registriert. Die einfallende Lichtenergie eines Quadranten wird nun mit den anderen ins Verhältnis gesetzt, aus dem sich die Auslenkung des Cantilevers bestimmen lässt.

Durch mechanische Wechselwirkungen zwischen Probenoberfläche und Cantilever wird die mit dem Cantilever verbundene Blattfeder ausgelenkt. In Zuge dessen wird die Reflektionsbahn des auf die Rückseite der Nadel gerichteten Lasers umgelenkt. Der Laserstrahl trifft in Ruhe und unter korrekter Kalibrierung genau auf das Zentrum der viergeteilten Photodiode. Im Falle einer Auslenkung durch mechanische Manipulation fällt der Laserstrahl auf unterschiedliche Segmente der Photodiode. Mittels dieser Segmente können vertikale wie auch laterale Verbiegungen des Cantilevers durch Reflexionsänderungen des Laserstrahls erfasst werden. Elastizitätsinformationen der Probe lassen sich schließlich aus dem Verhältnis der eintreffenden Lichtenergie errechnen. (Abbildung 6)

## 2.5.2 Kraft-Spektroskopie

Neben der Abrasterung von Probenoberflächen wird die Rasterkraftmikroskopie ebenfalls zur sog. Kraft-Spektroskopie angewandt. Hierbei drückt der Cantilever mit seiner Messspitze die Probe an einem Punkt kontrolliert ein und wird anschließend wieder zurückgezogen. Der Abstand des Cantilevers zur Probe sowie dessen vertikale Auslenkung durch den Kontakt werden registriert und in einer sog. Kraft-Abstands-Kurve (engl. *Force distance curve*) gegeneinander aufgezeichnet.



**Abbildung 7:** Abbildung einer Kraft-Abstands-Kurve mit Auftragung der vertikalen Auslenkung des Cantilevers auf der Ordinate über den Abstand des Cantilevers bzgl. der Probenoberfläche auf der Abszisse. Die Annäherungs-Kurve (blau) zeigt die Annäherung des Cantilevers an die Probe, die Retraktions-Kurve (rot) das Zurückziehen des Cantilevers. In (1) wird der Cantilever abwärts Richtung Probe bewegt. (2) zeigt die Auslenkung des Cantilevers durch Adhäsionskräfte in Richtung der Probe. (3) zeigt den Schnittpunkt der Annäherungs- und Retraktions-Kurve und das vorher definierte Auslenkungsmaß. Punkte (4) und (5) zeigen das Zurückziehen des Cantilevers von der Probe, wobei bei (4) durch Adhäsionskräfte auch eine negative Auslenkung über die Neutrallinie des Cantilevers erfolgt, bis eben diese Adhäsionskräfte überwunden werden und der Cantilever zurückfedert.

Die Kraft-Abstands-Kurve besteht aus zwei Teilen, die jeweils unterschiedliche Phasen des Messvorgangs beschreiben. Die Annäherungskurve in blau bildet die Annäherung des Cantilevers an den Messpunkt ab, die *Retraktions*-Kurve in Rot das Zurückziehen des Cantilevers.

Im Rahmen der Annäherung an die Probe wird der Cantilever abwärts in Richtung Probe bewegt, berührt diese allerdings noch nicht und zeigt folglich noch keine Auslenkung der Ordinate (1). Sobald ein gewisser Abstand zur Probe unterschritten wird, wirken Adhäsionskräfte auf den Cantilever und lassen ihn in Probenrichtung schnellen, bis Kontakt mit dem Messpunkt hergestellt ist. Der Cantilever wird hierdurch nach unten gebogen und zeigt demnach auf der Kraft-Abstands-Kurve eine Auslenkung abwärts (2). Wird der Cantilever nun weiter in Richtung Probe bewegt, biegt sich das lose Ende nach oben und zeigt folglich eine Aufwärtsauslenkung. Hierbei ist die Auslenkung des losen Endes des Cantilever proportional zur Abwärtsbewegung des fixierten Teils, was einen charakteristisch linearen Anstieg der Cantileverauslenkung zur Folge hat (Abbildung 7).

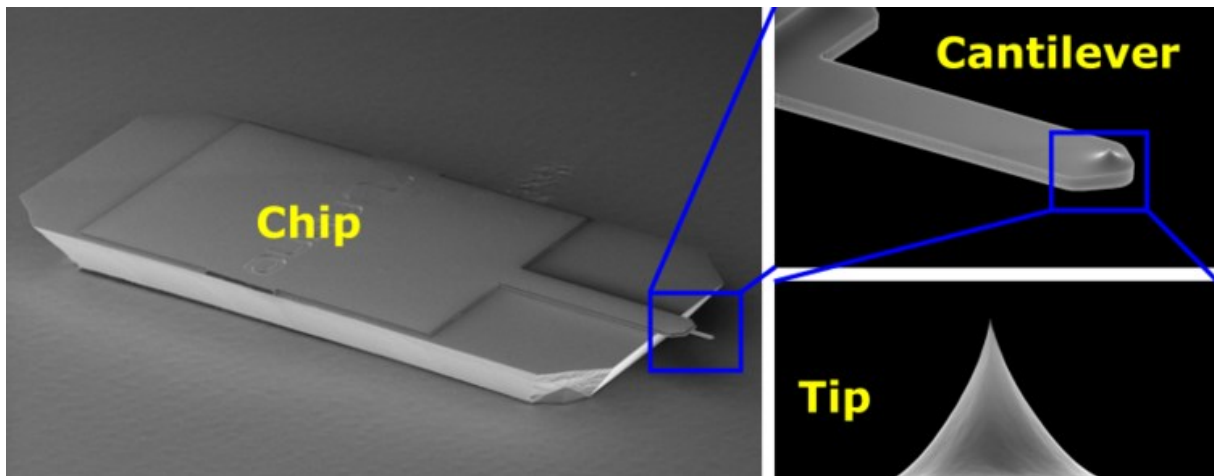
Ist eine vorher definierte Auslenkung des Cantilevers erreicht (3, wird dieser anschließend zurückgezogen (4/5). Häufig bleibt hierbei die Spitze des Cantilevers an der Probe hängen, was eine erneute Auslenkung abwärts zur Folge hat (4). Bei weiterem Zurückziehen schnellt der Cantilever schließlich in seine ursprüngliche Position zurück. Da nun kein Kontakt mehr zwischen zur Probe besteht, bewirkt jedes weitere Zurückziehen keine weitere vertikale Verbiegung (5).

### **2.5.3 Cantilever und Spitze**

Die lokale Wechselwirkung zwischen AFM und Probenoberfläche geschieht mittels des Cantilevers und einer am Cantilever angebrachten Spitze. Der Cantilever wirkt als Hebelarm, der sich durch einwirkende Kräfte auf die Spitze verbiegt und dient zudem als Reflexionsfläche des Laserstrahls. Physikalisch kann der Cantilever als Feder mit einer jeweiligen Federkonstante betrachtet werden (Abbildung 8).

Mittlerweile gibt es viele mögliche Cantileverformen, die jeweils für verschiedene Fragestellungen, Probenarten oder Operationsmodi geeignet sind und sich zum Teil stark in ihren mechanischen Eigenschaften unterscheiden.

Im Gegensatz zum biegsamen und nachgiebigen Cantilever ist dessen scharfe Messspitze meist aus harten Materialien wie Siliziumnitrid oder Diamant hergestellt. Auch hier sind je nach Fragestellung und Messgebiet verschiedene Formen möglich. Des Weiteren lassen sich die Spitzen auch nachträglich modifizieren und somit an bestimmte Messbedingungen anpassen. Dies wird auch im Rahmen dieser Arbeit vorgenommen und wird an späterer Stelle behandelt.



**Abbildung 8:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Haltechip, Cantilever und Cantileverspitze. Der Haltechip dient der Fixierung des Cantilevers im AFM-System. An seinem Ende trägt der Cantilever eine scharfe Messspitze. Mit freundlicher Genehmigung von James Vicary. [1]

#### 2.5.4 Ermittlung der Knorpel elastizität mit dem Youngschen Modul

Beim Youngschen Modul (auch Elastizitätsmodul, engl. *Young's Modulus*, YM) handelt es sich um eine Proportionalitätskonstante der Werkstofftechnik, die mittlerweile auch Anwendung an biologischem Gewebe gefunden hat. Es beschreibt den Zusammenhang zwischen der Spannung  $\sigma$ , die durch mechanischen Stress auf ein Material entsteht und der Dehnung, die dieses Material durch die subsequente Verformung erfährt. Hierbei definiert sich die Spannung  $\epsilon$  wiederum als aufgebrachte Kraft pro Fläche ( $\frac{F}{A}$ ), die Dehnung berechnet sich aus der proportionalen Längenänderung des Materials ( $\frac{\Delta L}{L}$ ). Da es sich um eine auf eine Fläche auswirkende Kraft handelt, wird der YM-Wert in Pascal bzw. Kilopascal angegeben.

### Formel 1

$$YM[Pa] = \frac{\text{Spannung } \sigma}{\text{Dehnung } \varepsilon} = \frac{\frac{F}{A}}{\frac{\Delta L}{L}} = \frac{F \times L}{A \times \Delta L}$$

Im Wesentlichen erlaubt das YM Aussagen über die Elastizität bzw. Steifheit eines Stoffes bzw. Gewebes. Je größer die Spannung  $\sigma$  die aufgebracht werden muss, um die Dehnung  $\varepsilon$  zu erreichen, desto höher der YM-Wert. Dementsprechend gilt: Je höher das YM, desto steifer das untersuchte Gewebe.

## 2.6 Fragestellung

Pathologische Auswirkungen der Arthrose auf die EZM und ihre Komponenten wurden in bisheriger Forschung bereits ausführlich beschrieben. Verglichen damit sind Effekte auf die PZM weniger gut verstanden. Danalache und Kollegen konnten bereits zeigen, dass Änderungen der biomechanischen Eigenschaften der PZM mitunter durch einen Anstieg der MMPs -2, -3 und -7 verursacht werden [32]. Mit dem Einsatz von MMP-Inhibitoren wurde bereits versucht, auf die Degeneration der Knorpelmatrix Einfluss zu nehmen [42, 53]. Da MMPs auch generell im Rahmen von entzündlichen Prozessen hochreguliert werden, ergibt sich daraus folgender Ansatz: Lässt sich mit Modulation der entzündlichen Prozesse des arthrotischen Knorpels eine signifikante Änderung des PZM-Elastizitätsmoduls erreichen?

Um diese Fragestellung zu beantworten, soll in Gewebeproben arthrotischen Knorpels die Elastizität der PZM vor und nach Applikation von Entzündungsmodulatoren mittels Rasterkraftmikroskopie gemessen werden, um den Effekt der in-vivo produzierten Enzyme zu quantifizieren. Da Entzündungen nur in lebenden Zellen voranschreiten können ist es vonnöten, die Gewebepplatten mitsamt dem beigefügten Modulator in Kultur zu halten. Um zu etablieren, wie lange das Gewebe am Leben gehalten werden kann sollen mit sog. Ausgangs-Messungen Referenzwerte für nachfolgende Messungen erstellt werden, die die Vitalität des Knorpelgewebes und die Elastizität der PZM unter experimentellen Bedingungen evaluiert.

## **2.7 Ziele der Arbeit**

Die PZM von Chondrozyten in Kniegelenksknorpel hat sich aufgrund ihrer vielfältigen Einflüsse auf Stoffwechsel und Biomechanik in aktueller Forschung als ein vielversprechender Fokus der Arthroseforschung hervorgerufen. Der Umbau von sowohl EZM wie auch PZM im Rahmen von Knorpeldegeneration und entzündlichen Prozessen ist für zahlreiche Pathomechanismen der Arthrose mitverantwortlich. Besonders in frühen Arthrostadien hat der Matrixumbau entscheidende Folgen für den weiteren Krankheitsverlauf. [12, 36, 42]

In dieser Arbeit soll mithilfe von Rasterkraftmikroskopie die PZM von lebendem Gelenkknorpel untersucht werden. Hierbei soll insbesondere auf ein frühes Arthrostadium eingegangen werden, weshalb das YM der PZM von Strings gemessen werden soll. Hierfür soll ein Protokoll erarbeitet werden, welches eine verlässliche und replizierbare Inkubation von großen Knorpelstücken erlaubt. Durch die Zugabe entzündungsmodulierender Substanzen sollen Änderungen des YM von Stringstrukturen provoziert und mittels AFM erfasst werden. Zudem soll ein Protokoll erarbeitet werden, welches eine verlässliche und replizierbare Inkubation von großen Knorpelgewebstücken erlaubt.

## 3 Material & Methoden

### 3.1 Materialliste

Beschreibung	Artikelnummer	Hersteller	Sitz des Herstellers	Kontakt
Binder ED 53 Inkubator	CB 210#02-40-42- 5	Binder GmbH	Tuttlingen, Deutschland	www.binder- world.com
Melag Typ 80 Incubator	9785238	MELAG Medizintechnik GmbH & Co. KG	Berlin, Deutschland	www.melag.com
Leica Kryotom CM3050s	3567	Leica Mikrosysteme GmbH	Wetzlar, Deutschland	www.leicabiosyste ms.com
Leica DM IL LED Mikroskop	208809	Leica Mikrosysteme GmbH	Wetzlar, Deutschland	www.leicabiosyste ms.com
CellHesion®200 Rasterkraft- Mikroskop	3833000999	Bruker Nano GmbH	Berlin, Deutschland	www.jpk.glaubeco m
Zeiss AxioPhot Fluoreszenz- mikroskop	42378	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland	www.zeiss.com
Observer Z1 Laserscan- mikroskop	2435000430	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland	www.zeiss.com
Pipetus® Elektrische Pipettierhilfe	9907200	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co. KG	Eberstadt, Deutschland	www.hirschmann- laborgeräte.de
Eppendorf Research® Plus Pipetten	3123000047	Eppendorf AG	Hamburg, Deutschland	corporate.eppend orf.com

**Tabelle 1:** Verwendete Geräte

Beschreibung	Artikelnummer	Hersteller	Sitz des Herstellers	Kontakt
DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium)	41966-029	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA	www.thermofisher.com
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline	14190-094	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA	www.thermofisher.com
Penicillin/ Streptomycin	P4333	MilliporeSigma Inc.	St. Louis, USA	www.sigmaaldrich.com
96-Well Mikrotiterplatten	655098	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich	www.gbo.com
6-Well Mikrotiterplatten	665180	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich	www.gbo.com
Biokompatibler Probenkleber	Nicht verfügbar	Bruker Nano GmbH	Berlin, Deutschland	www.jpk.com
Zellkulturschalen 145x20mm	639102	Greiner Bio-One International GmbH	Kremsmünster, Österreich	www.gbo.com
Zellkulturschalen 40x11	93040	TPP Techno Plastic Products AG	Trasadingen, Schweiz	www.tpp.ch
Tissue-Tek® O.C.T. Compound	4583	Sakura Finetek Germany GmbH	Umkirch, Deutschland	www.sakura.eu
Einmalskappell	02.001.30.021	FEATHER Safety Razor Co., Ltd.	Osaka, Japan	www.feather.co.jp

Biopsiestanzen 4,0mm	49401	Kai Industries Co. Ltd.	Tokyo, Japan	www.kai-group.com
Objektträger SuperFrost® Plus	03-0060	R.Langen- brinck GmbH	Emmendingen , Deutschland	www.langenbrick.com
Polystyrolpipetten 25ml	357525	Falcon Life Sciences Pvt. Ltd.	New York, USA	www.falconlifescience s.com
Pipettenspitzen 1000µl	VT0160C	Biozym Scientific GmbH	Oldendorf, Deutschland	www.biozym.com
Calcein AM Zellfärbung	C1430	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA	www.thermofisher.com
Propidiumiodid Zellfärbung	P1304MP	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA	www.thermofisher.com

**Tabelle 2:** *Verwendete Verbrauchsmaterialien zur Knorpelverarbeitung*

<b>Beschreibung</b>	<b>Artikel- nummer</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Sitz des Herstellers</b>	<b>Kontakt</b>
Geschliffener AFM-Glasblock	3833000999	Bruker Nano GmbH	Berlin, Deutschland	www.jpk.com
Leibovitz's L-15 Medium	11415064	Thermo Fisher Scientific, Inc.	Waltham, USA	www.thermofisher.com
Ethanol 99%	ETO-50000- 99-1	SAV Liquid Production GmbH	Flintsbach am Inn, Deutschland	www.sav-lp.de
All-in-One-AI-TL Cantilevers	AIOAI-TL- 10	Innovative Solutions Bulgaria Ltd.	Sofia, Bulgarien	www.budgetsensors.com
M-bond-610, Epoxy-Klebstoff	G3203	Micro- Measurements	Raleigh, USA	www.micro- measurements.com
Microspheres 25µm	07313-5	Polysciences, Inc.	Warrington, USA	www.polysciences.com

**Tabelle 3:** *Verbrauchsmaterialien für AFM-Messungen*

Beschreibung	Entwickler	Sitz des Entwicklers	Kontakt
EndNote X9	Clarivate Analytics Inc.	Philadelphia, USA	www.clarivate.com
Microsoft Excel	Microsoft Corporation	Redmond, USA	www.microsoft.com
Microsoft Word	Microsoft Corporation	Redmond, USA	www.microsoft.com
Microsoft Powerpoint	Microsoft Corporation	Redmond, USA	www.microsoft.com
Biorender	Biorender PC	Ontario, Kanada	www.biorender.com
Axio Vision Rel. 4.8.	Carl Zeiss Microscopy GmbH	Jena, Deutschland	www.zeiss.com
ImageJ	OpenSource	-	www.imagej.net
JPK DP Data Processing	JPK Instruments	Berlin, Deutschland	www.jpk.com
JPK SPM	JPK Instruments	Berlin, Deutschland	www.jpk.com
SampSize	epiGenesys	Sheffield, England	www.epigenesys.org.uk

**Tabelle 4:** *Verwendete Software*

## 3.2 Knorpelverarbeitung

### 3.2.1 Anfertigung von Kryotomschnitten, Knorpeldiscs und Knorpelimplantaten

Die für diese Arbeit verwendeten Knorpelstücke wurden von der Universitätsklinik für Orthopädie Tübingen sowie dem Winghofer Medicum Klinik Rottenburg bereitgestellt. Knorpelgewebe wurde ausschließlich von Patienten entnommen, die sich einer Alloarthroplastik, in diesem Fall dem Einsatz einer Knie totalendoprothese, unterzogen. Das Gewebe der distalen Femurresektion wurde ausschließlich mit dem informierten Einverständnis des Patienten entnommen. Die Zustimmung der Ethikkommission des Universitätsklinikums Tübingen bzgl. der Gewebeentnahme am

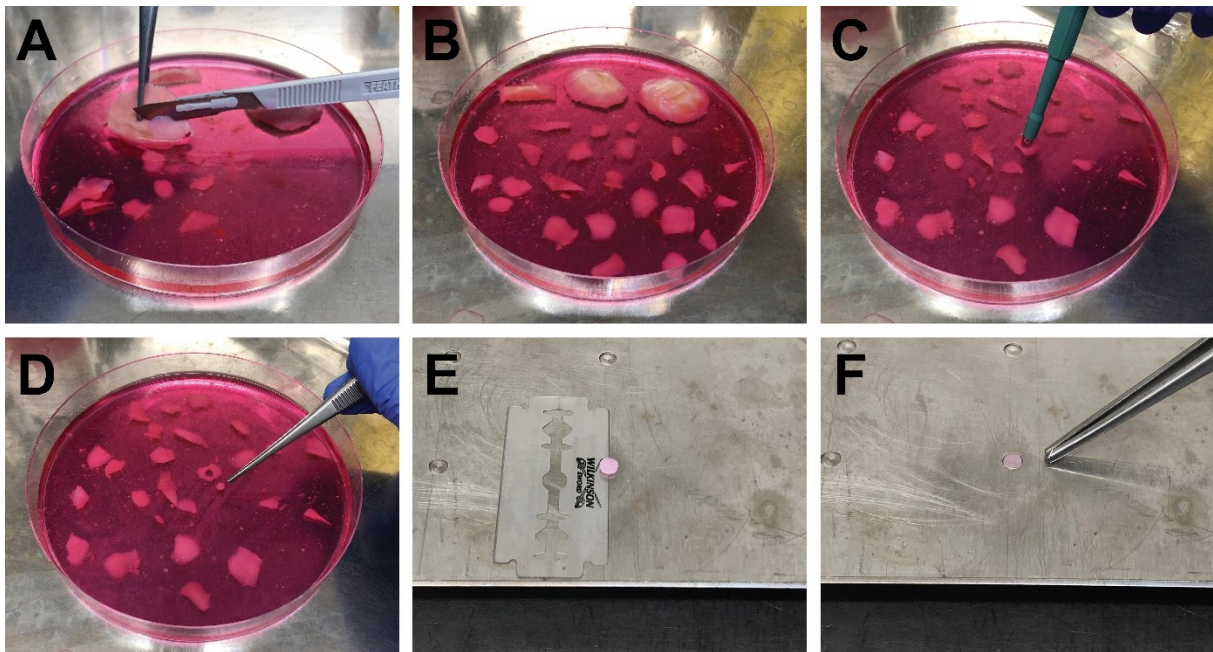
Patienten wurde vor Beginn dieser Arbeit eingeholt (Projektnummer 674/2016BO2). Nach der chirurgischen Resektion wurde das Knorpelgewebe in Sammelbecher gefüllt mit Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) gegeben. Um die Kontamination der Gewebeproben zu verhindern, wurde dem DMEM zuvor 1,2%iges Amphotericin B sowie 2%iges Penicillin/Streptomycin beigefügt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Knorpel auf drei verschiedene Arten verarbeitet. Es wurden Kryotomschnitte, Knorpelscheiben („Discs“) und Knorpelstücke („Explantate“) angefertigt. Auf die genauen Arbeitsschritte zur Herstellung dieser Probearten wird im Folgenden genauer eingegangen.

Zunächst wurde der Knorpel vom subchondralen Knochen mit Skalpell und Pinzette manuell abpräpariert. Für die Anfertigung von Explantaten wurde hierbei darauf geachtet, den Knorpel mit dem Skalpell so dünn wie möglich zu schneiden. Anschließend wurden die so erhaltenen Explantate in Medium gegeben und bis zur weiteren Verarbeitung bzw. Messung bei 37°C inkubiert (*Inkubator: Binder, Deutschland*).

Um Kryotomschnitte des Knorpelgewebes anzufertigen, wurden ebenfalls Knorpelstücke mit Skalpell und Pinzette präpariert. Danach wurden die Stücke zum Gefrierschneiden mit Tissue-Tek- Einbettungsmedium (*Tissue-Tek, Sakura, Deutschland*) überzogen und mit einem Leica-Kryotom CM3050S (*Leica Biosystems, Deutschland*) geschnitten. Die Schnitte wurden bei -27°C mit einer jeweiligen Dicke von 35µm angefertigt und nach dem Gefrierschnitt in Phosphatgepufferten Salzlösung (PBS) gewaschen. Damit diese Schnitte der 300µm Superficialzone des Gelenkknorpels zuordenbar sind, wurden pro Knorpelstück jeweils nicht mehr als 10 Schnitte angefertigt.

Um Discs aus Knorpelgewebe herzustellen, wurde nach der Abpräparation der Knorpelstücke vom subchondralen Knochen aus diesen mit Biopsiestanzen (*pfm Medical, Deutschland*) kreisrunde Ausstanzungen mit einem Durchmesser von 4mm gesammelt. Anschließend wurden die Ausstanzungen auf eine einheitliche Dicke von 300 µm zugeschnitten wurden. Hierfür wurden die ausgestanzten Discs in ein eigens hierfür konzipiertes Schneidebrett gebettet und nun mit einer Rasierklinge zugeschnitten. So konnte sichergestellt werden, dass alle hergestellten Discs über einen einheitlichen Durchmesser und eine einheitliche Dicke verfügen. (Abbildung 9)



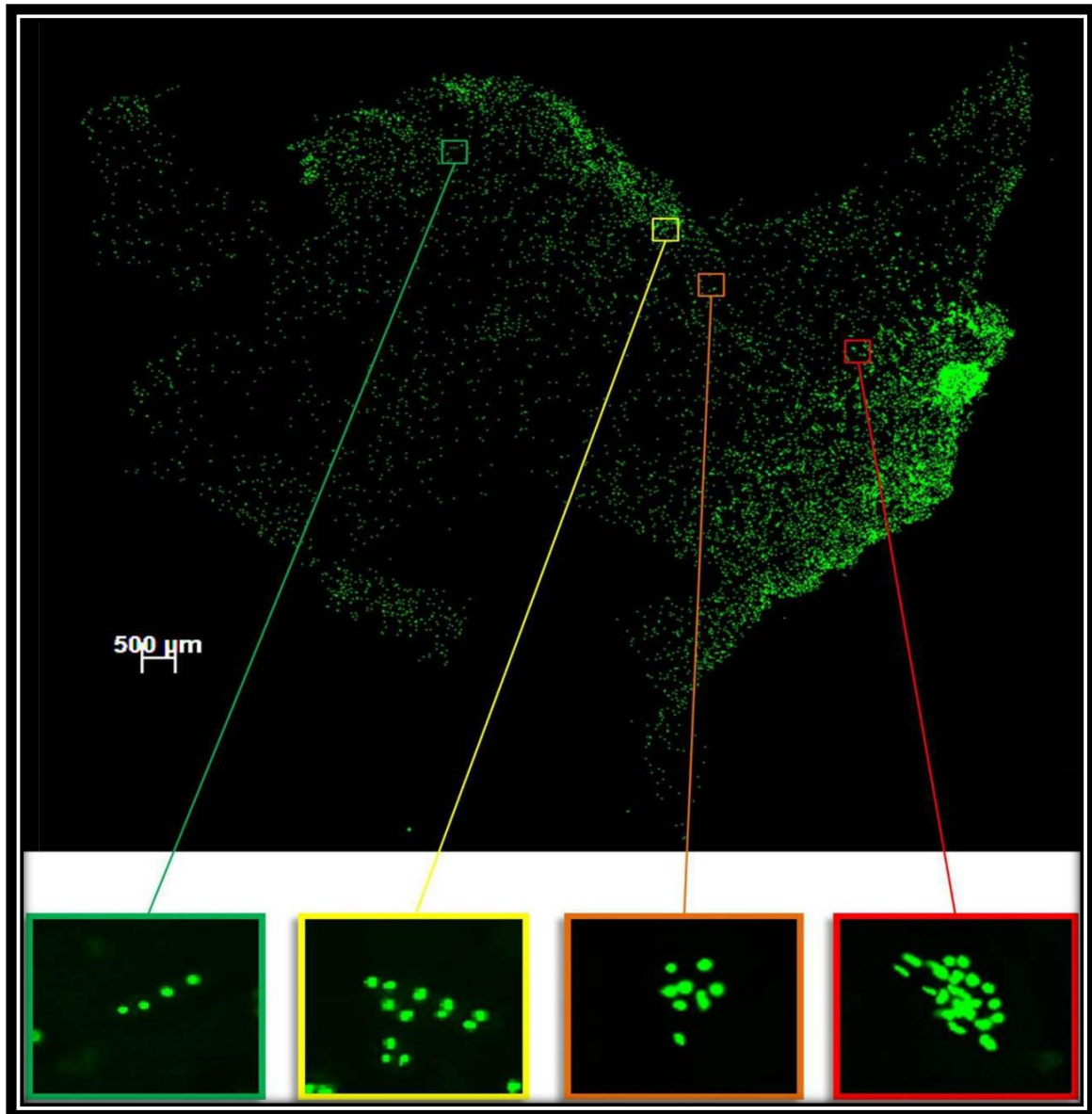
**Abbildung 9:** Verarbeitungsschritte der Knorpelproben in DMEM. Abpräparation von Knorpel-explantaten vom subchondralen Knochenanteil mit Skalpell (A). Fertig abgetrennte Explantate (B). Diese Explantate wurden als unbelassene Stücke eingefärbt und gemessen. Ausstanzen von Knorpelscheiben mit einer Biopsiestanze (C & D). Schnitt der ausgestanzten Knorpelscheibe mit einer Rasierklinge (E). Der überstand der ausgestanzten Knorpelscheibe wurde verworfen. Die Einkerbung der Schneideplatte ist exakt 300µm tief. Die Dicke der fertig geschnittenen Discs (F) beträgt somit 300 µm. Mit freundlicher Genehmigung der Dissertation von Julius Wolfgart entnommen. (Entstehung von Chondrozytenclustern bei Gonarthrose – eine explorative Analyse in Bezug auf onkogene Prozesse, 2024)

### 3.2.2 Färbung mit Calcein und Propidiumiodid

Die Färbung der Discs und Explantate erfolgte mittels eines 2-Farben-Assays, um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. Verwendet wurden Calcein-AM Lösung (*Thermo Fischer Scientific, USA*) zur Ermittlung der Zellviabilität sowie Propidiumiodid-Färbelösung (*Thermo Fischer Scientific, USA*) zum Nachweis toter bzw. nicht lebensfähiger Zellen.

Propidiumiodid- und Calcein-Lösungen wurden mit DMEM um den Faktor 1000 verdünnt. So wurden für 300µl DMEM jeweils 0,5 µl Calcein- und Propidiumiodidlösung gemischt. Dieses Färbemedium wurde im Anschluss an das oben beschriebene Zuschneiden des Knorpelgewebes auf die jeweiligen Discs bzw. Explantate appliziert. Hierfür wurden die Discs und Explantate jeweils in 96- bzw. 24-Well-Mikrotiterplatten sortiert. Anschließend wurden 300µl des Färbemediums je Disc und 500µl je Explantat in die einzelnen Wells gegeben. Die Mikrotiterplatten wurden nun für 30 Minuten

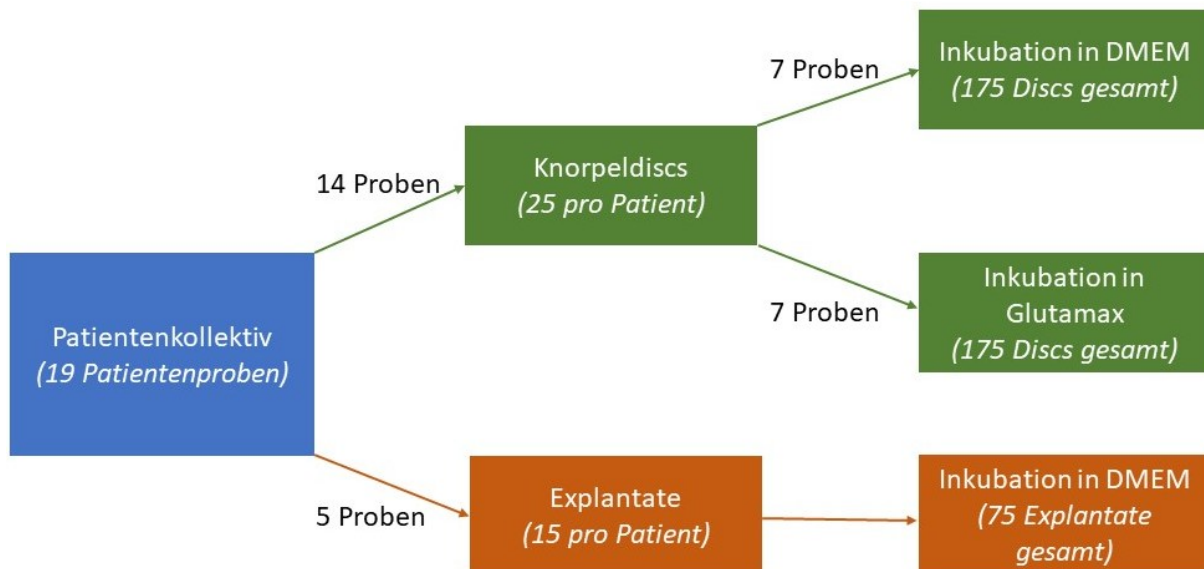
inkubiert und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie (LSM Axio Observer; Zeiss, Deutschland) mikroskopiert. Für die Mikroskopie der Gewebeproben wurde die AxioVision LE 4.8 Software (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Deutschland) verwendet.



**Abbildung 10:** Übersichtsaufnahme eines Kryotomschnittes von arthrotischem Gelenkknorpel in Calceinfärbung. In dieser Abbildung wurden zusätzlich einzelne Chondrozytenmuster in vergrößerten Ausschnitten hervorgehoben. Im Rahmen von arthrotischer Degeneration ordnen sich die Chondrozyten zunächst als Strings (grüner Kasten), Double Strings (gelber Kasten) und schließlich zu Small Clustern (orangener Kasten) und Big Clustern (roter Kasten) an. Mit freundlicher Genehmigung der Bachelorthesis von Janina Schneider entnommen. (Atomic force microscopy investigations of osteoarthritic driven changes on articular cartilage, 2018)

### 3.2.3 Überlebensexperimente

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst etabliert werden, wie lange und unter welchen Bedingungen die Gewebeproben inkubiert werden konnten. Ziel war es, nach 7-10 Tagen Inkubation so viele Chondrozyten wie möglich am Leben zu halten. Hierfür wurden Knorpeldiscs und Knorpelimplantate hinsichtlich ihrer Überlebensfähigkeit untersucht und miteinander verglichen.



**Abbildung 11:** Prozessabfolge der Überlebensexperimente. Von einem Patientenkollektiv mit insgesamt 19 Patientenproben (blau) wurden zwei Messreihen gebildet. 14 Patientenproben wurden zu Knorpeldiscs verarbeitet (grün). In dieser Messreihe erfolgte eine weitere Unterteilung in die jeweiligen Inkubationsmedien. Aus 5 Patientenproben wurden Explantate angefertigt (orange).

Insgesamt wurden für die Überlebensexperimente 19 Patientenproben verarbeitet. 14 Proben wurden dabei zu Discs verarbeitet. Diese Discs wurden entweder mit DMEM oder in GlutaMAX™-Nährmedium inkubiert. Pro Probe wurden 25 Discs angefertigt. Um die Inkubationsfähigkeit von Explantaten zu bewerten, wurden aus insgesamt 5 Proben Explantate angefertigt. Pro Knorpelprobe wurden jeweils 15 Explantate angefertigt. Für Knorpelimplantate wurde von einer Inkubation mit GlutaMAX™-Nährmedium abgesehen. Insgesamt ergaben sich für die Überlebensexperimente somit 75 untersuchte Explantate in DMEM, sowie jeweils 175 untersuchte Discs in DMEM bzw. Glutamax-Nährmedium. (Abbildung 11)

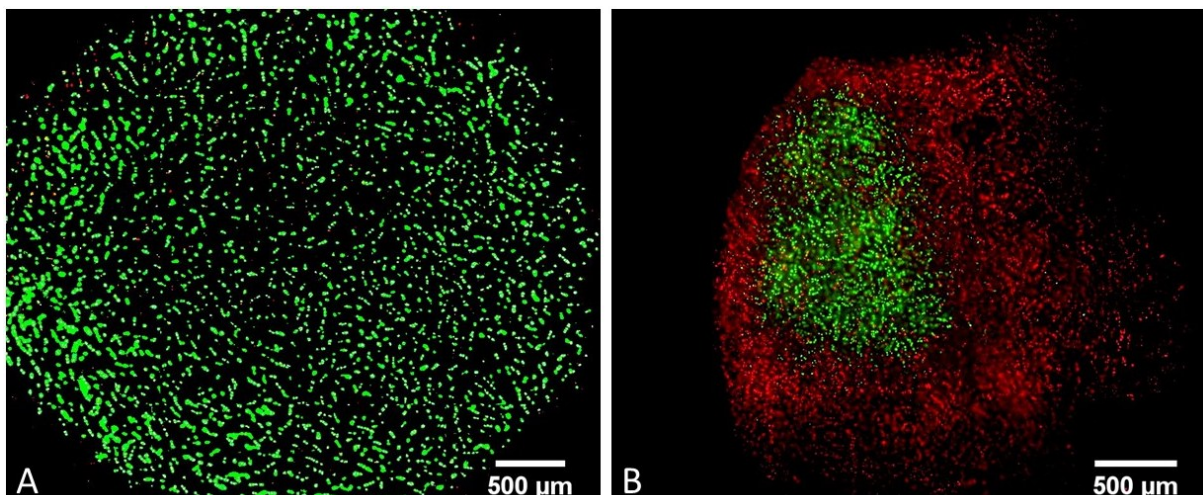
Sämtliche Gewebeproben wurden am Tag der Entnahme verarbeitet, anschließend mit Calcein-Acetoxamethylester (Calcein-AM) & Propidiumiodid wie in Kapitel 3.2.2 beschrieben eingefärbt und mikroskopiert.

Im Anschluss an die Mikroskopie wurden die Proben bei 37°C bis zum nächsten Tag inkubiert.

Die Proben wurden zunächst in DMEM inkubiert. Nach unbefriedigenden Überlebenszeiten der Discs wurde zum Vergleich ein weiterer Überlebensversuch mit einem GlutaMAX™-Nährmedium durchgeführt.

Es folgte eine tägliche visuelle Kontrolle der Chondrozytenvitalität mittels Immunfluoreszenzmikroskopie. Hierbei wurde ein täglicher Wechsel des Färbemediums je 30 Minuten vor Beginn der mikroskopischen Kontrolle durchgeführt, wobei die Menge an verwendetem Färbemedium je nach Probengröße variierte. So wurden 300µl Färbemedium für Discs und 500µl für Explantate verwendet. Die tägliche Beurteilung der Chondrozytenvitalität erfolgte subjektiv anhand des Calceinsignals. Bei einem stark sichtbaren Calceinsignal wurde die jeweilige Probe als vital gewertet (Abbildung 12).

Mittels des oben beschriebenen Vorgehens wurde so für Discs und Explantate Überlebensprofile erstellt und diese miteinander verglichen.



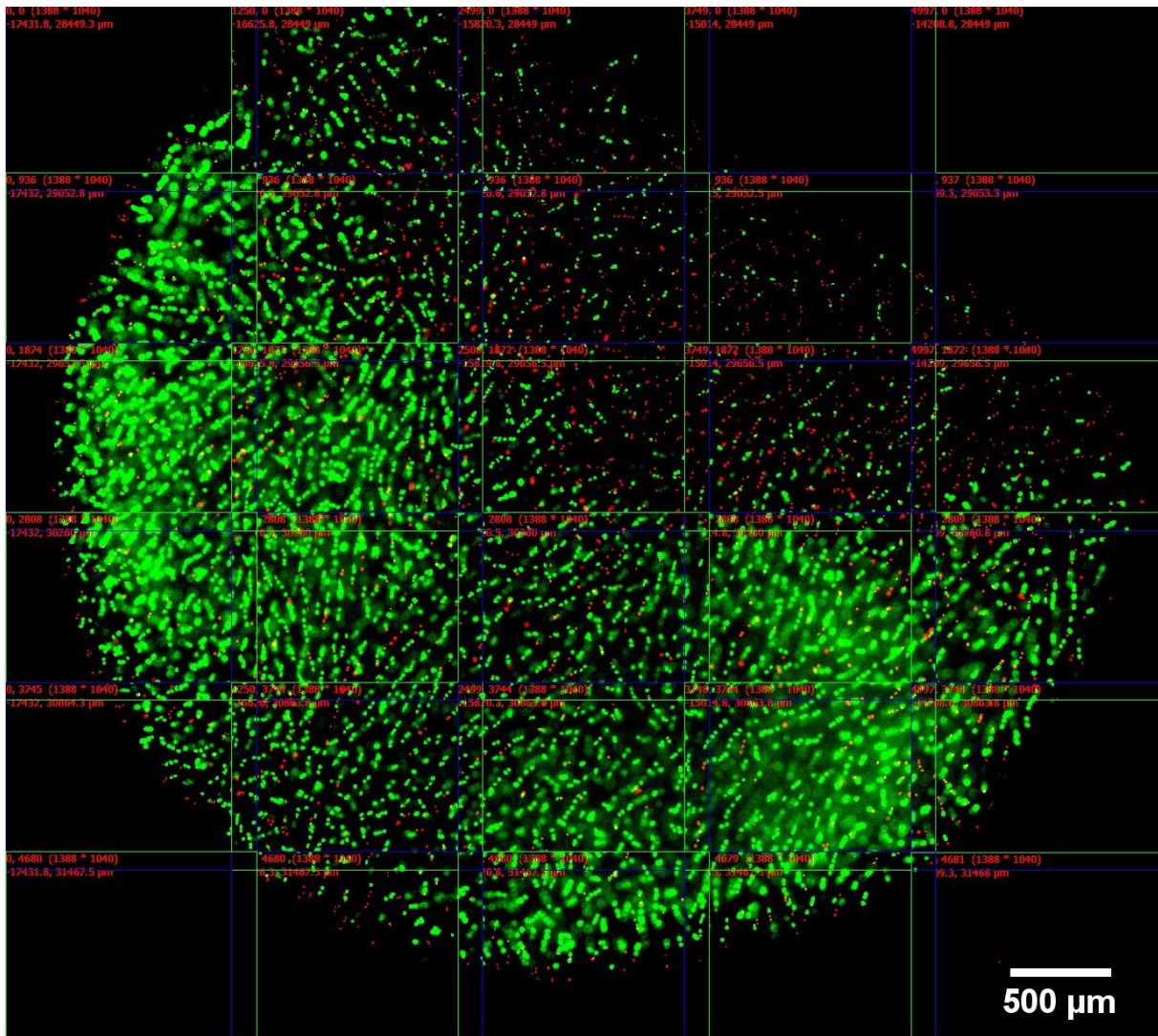
**Abbildung 12:** Gegenüberstellung zweier Discs mit unterschiedlichem Vitalitätsprofil. Beide Discs wurden unter Calcein/PI-Färbung mikroskopiert. Bild A zeigt Knorpelgewebe, das 3 Stunden nach operativer Explantation angefärbt und mikroskopiert wurde. Es zeigt sich ein deutliches Calceinsignal (grün) der Chondrozyten über das gesamte Ausmaß der Discs. Bild B zeigt Knorpelgewebe, das nach operativer Explantation 3 Tage in Kultur gehalten wurde und anschließend angefärbt und mikroskopiert wurde. In Bild B ist ein deutlich begrenztes Calceinsignal zu erkennen, das von einer großflächigen PI-Färbung (rot) der Chondrozyten umringt wird.

### 3.3 Mosaikbilder

Im Rahmen dieser Arbeit wurden großflächige Gewebeproben hyalinen Gelenkknorpels analysiert. Um diese in ihrer Vollständigkeit abzubilden, wurden Übersichtsbilder angefertigt, die sich wiederum aus mehreren Einzelbildern zusammensetzen. Diese sog. „Mosaikbilder“ ermöglichten die Darstellung von großen Gewebeflächen, wie sie in Discs, Kryotomschnitten und Explantate zu finden waren.

Für die Aufnahme von Mosaikbildern wurde in der *AxioVision* Software zunächst ein Raster erstellt, das die komplette Probe abdeckt und dem Programm als Vorlage für die Aufnahme der Einzelbilder dient. Bei besonders großen Proben wie z.B. großflächigen Kryotomschnitten oder Explantate waren so Bildraster mit weit über 100 Einzelbildern nötig, um eine vollständige Abbildung der Proben zu erreichen. Da es sich abgesehen von Kryotomschnitten bei den mikroskopierten Proben um unebenes Gewebe handelte lag für diese Proben oftmals keine einheitliche Fokusebene über die gesamte Probenoberfläche vor. Die Fokusebene wurde deshalb für diese Proben für jedes Einzelbild manuell eingestellt. Sämtliche Einzelbilder wurden mit einer Überlappung von 10% aufgenommen. Diese wurden nachträglich von der Software mittels eines „Stitching“-Algorithmus verknüpft. Hierbei wurde die Überlappung zur Kantenglättung der Einzelbilder herausgerechnet. (Abbildung 13)

Abschließend wurden manuelle Korrekturen von Bildschattierung und Weißabgleich vorgenommen, um die Zielstrukturen hervorzuheben. Das Ergebnis ist ein hochauflösendes Übersichtsbild, das den Gelenkknorpel als Einheit zwischen extrazellulärer Matrix und Chondrozyten darstellt.



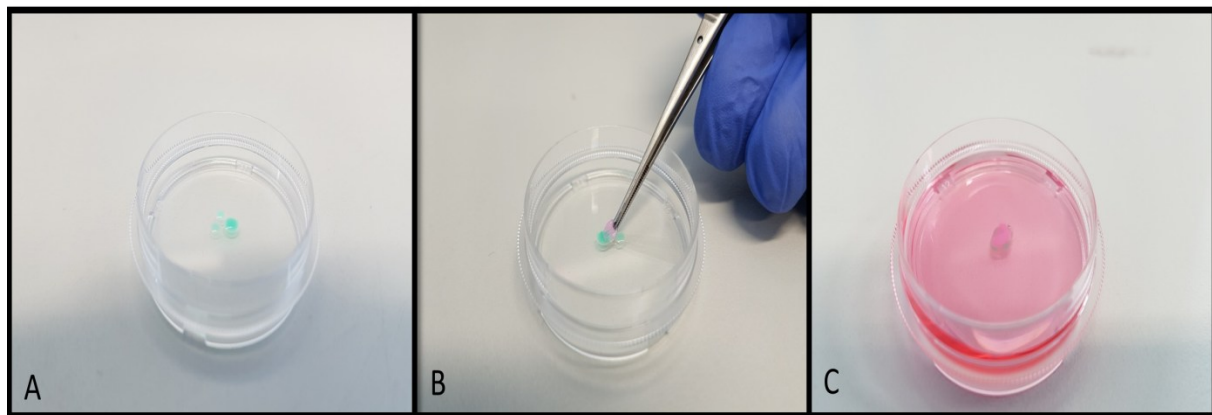
**Abbildung 13:** Fluoreszenzmikroskopisches Bild eines Knorpeldisc in Calcein/PI-Anfärbung. In diesem Bild wurden insgesamt 30 Einzelbilder mit dem Stitching-Algorithmus zu einem großflächigen Mosaikbild zusammengefügt, um die gesamte Knorpelprobe in einem Bild zu erfassen.

### 3.4 Vorbereitung und Durchführung der AFM-Messungen

#### 3.4.1 Fixierung der Proben

Sowohl Kryotomschnitte und Knorpel-Discs wie auch Knorpel-Explantate wurden mit dem AFM auf ihre biomechanischen Eigenschaften untersucht. Hierfür ist eine fixierte Probe nötig, um Verschieben bzw. Verrutschen der Probe während des Messvorgangs zu verhindern. Um die Proben dementsprechend zu fixieren, wurde das Knorpelgewebe in Zellkulturschalen (*TPP, Schweiz*) mit biokompatiblen Kleber (*JPK, Deutschland*) am Boden der Schale festgeklebt. Gelebt wurde bevorzugt an

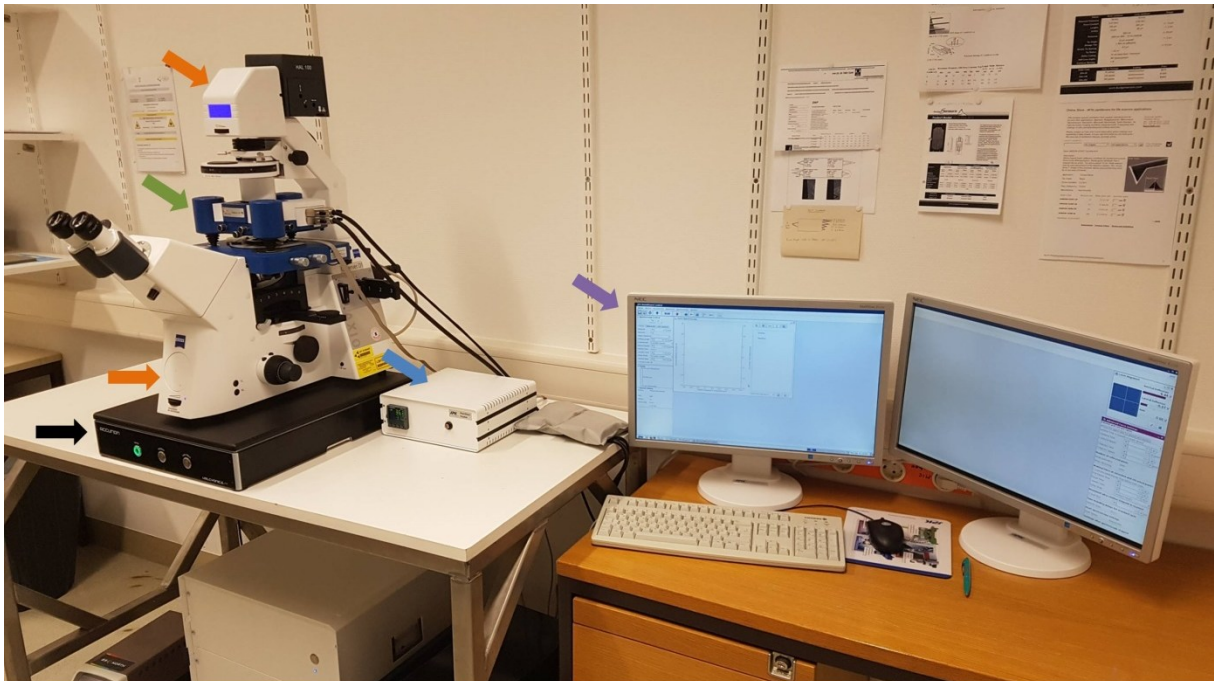
den Rändern der Probe, um die Verzerrung der mechanischen Eigenschaften des Knorpels durch den Kleber zu minimieren. Der Kleber wurde für einige Minuten an der Luft bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend wurde die nun fixierte Gewebeprobe mit 3 ml Leibovitz's L-15 Medium (*Life Technologies, USA*) bedeckt. (Abbildung 14)



**Abbildung 14:** Bildserie zur Fixiertechnik des Knorpels mit biokompatiblen Kleber. A: Der Kleber wird auf dem Boden der Petrischale aufgebracht. B: Das Knorpelstück wird mit einer Pinzette vorsichtig auf den Kleber gelegt. Die Verbindung wird anschließend für einige Minuten luftgetrocknet. C: Zugabe von Leibovitz's L-15 Medium.

### 3.4.2 AFM-Mikroskop

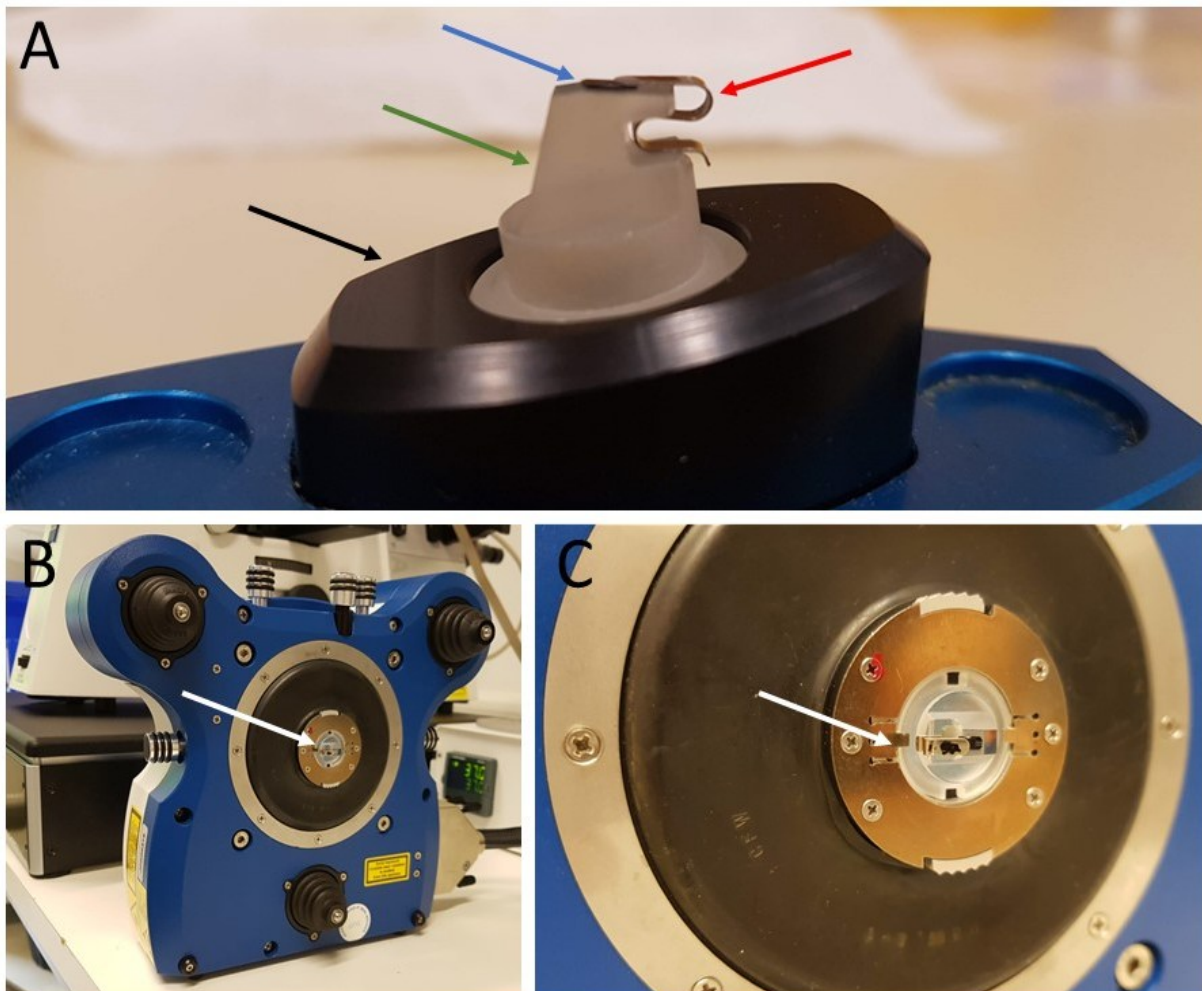
Für die AFM-Messungen wurde ein integriertes *CellHesion*®200 (*JPK Instruments*, Deutschland) bestehend aus einem motorisch betriebenen AFM-Kopf sowie einer verstellbaren Tragefläche für Gewebeproben verwendet. Hierbei wurde das *CellHesion* System mit einem Axiovert 200 (*Zeiss*, Deutschland) kombiniert und fußt auf einer Isolationsplatte, um Messfehler durch externe Vibrationsquellen so gering wie möglich zu halten. Integriert in das System ist zudem eine Heizvorrichtung für Objektträger bzw. Petrischalen, um die Probe während den Messungen auf 37°C aufzuheizen und so die physiologische Körperwärme des Menschen zu simulieren. (Abbildung 15)



**Abbildung 15:** Bildaufnahme des Rasterkraftmikroskopiesystems. Der AFM-Kopf (grüner Pfeil) auf der Tragefläche wurde in ein inverses Lichtmikroskop (orangene Pfeile) integriert, welches wiederum durch eine Isolationsplatte (schwarzer Pfeil) stabilisiert wird. Die Heizvorrichtung (blauer Pfeil) ist mit der Tragefläche des AFMs verbunden. Ein Computer mit Steuerungssoftware (lila Pfeil) dient der Bedienung des Systems.

### 3.4.3 Cantilever

Um das Elastizitätsmodul des Knorpelgewebes mittels Rasterkraftmikroskopie zu bestimmen, wurden Cantilever mit einer Federkonstante von  $(k)=7.4 \text{ N/m}$  verwendet. Um den Cantilever während den Messungen stabil zu halten wurde der Chip, in den der Cantilever eingebettet ist, auf einen entsprechenden Halter aufgebracht. Anschließend wurde der Chip mit einer Haltefeder fixiert und mittels des integrierten Verschlussmechanismus in den AFM-Kopf eingebettet. Die Motorisierung des Kopfes erlaubt diesem mitsamt dem eingebrachten Cantilever Bewegungen entlang der Vertikalachse. (Abbildung 16)



**Abbildung 16:** Bildaufnahmen des AFM-Kopfsystems und Fixiermechanismus des Cantilevers. A) Nahaufnahme des Cantilevers (blauer Pfeil), fixiert mit einer Haltefeder (roter Pfeil) auf einem speziellen Cantileverhalter (grüner Pfeil). Dieses Konstrukt ist wiederum in ein Haltevorrichtung für den Transport (schwarzer Pfeil) eingelassen. B) Übersichtsaufnahme des Cantilevers mitsamt Halter und Fixierungsfeder (weißer Pfeil) im Verschlussmechanismus des AFMs. C) Nahaufnahme des Cantilevers, Cantileverhalter und Haltefeder (weißer Pfeil) im Verschlussmechanismus.

#### 3.4.4 Microspheres

Um aus einer Kraft-Spektroskopie das Young'sche Modul zu errechnen ist die Form der Messspitze des Cantilevers von großer Bedeutung. Dem wird unter anderem dahingehend Rechnung getragen, dass je nach Spitzegeometrie verschiedene mathematische Modelle zur Berechnung des YM-Werts angewendet werden.

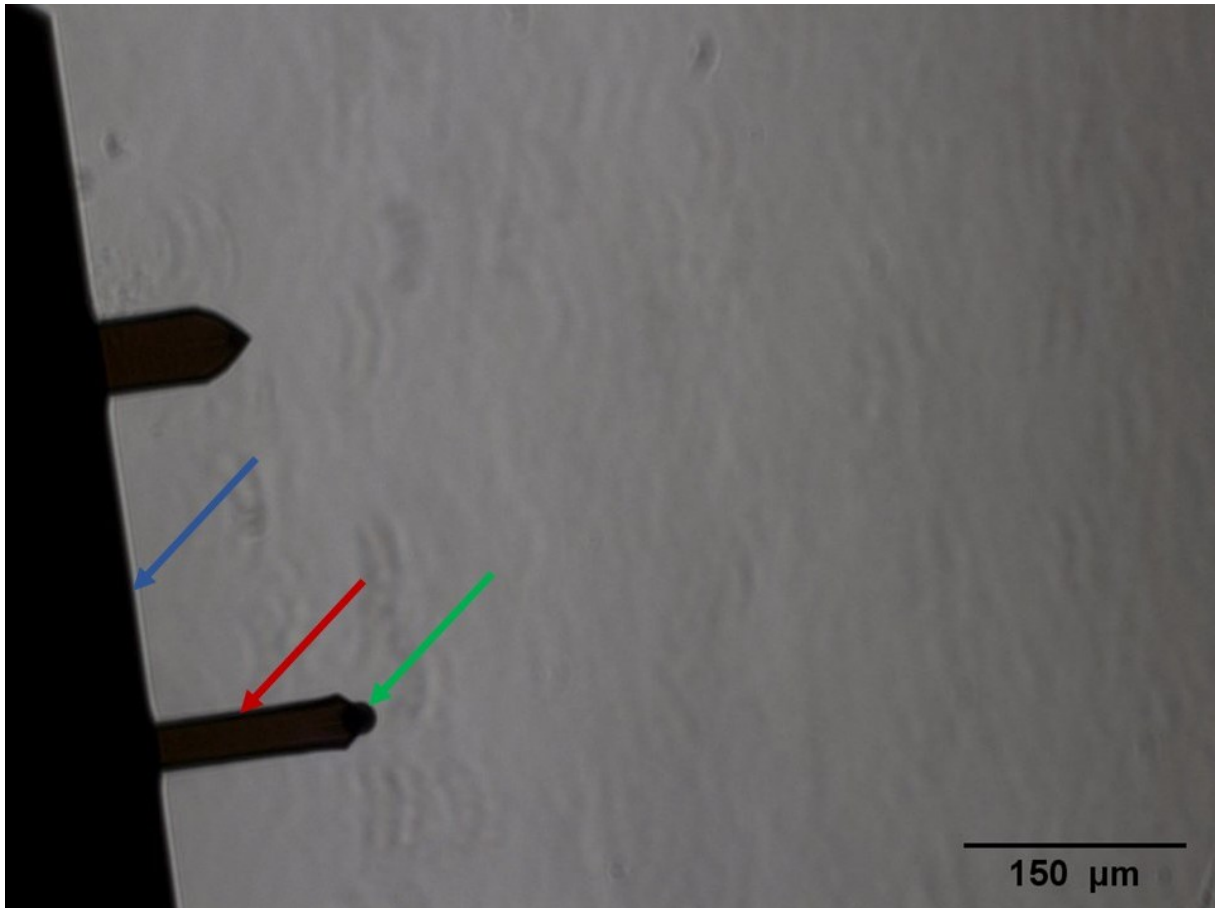
Das Ankleben von Polystyrol-Kügelchen (Microspheres) an die pyramidal geformte Messspitze ist eine gängige Methode, um die Spitzenform nachträglich zu modifizieren [32, 54]. Da die ursprüngliche Spitze für manche Fragestellungen bzw. Gewebeatypen ungeeignet ist, werden sog. *Microspheres* verwendet, um die Eindringtiefe zu reduzieren und den ausgeübten Druck des Cantilevers auf die Probe auf ein größeres Areal zu verteilen. Diese Vergrößerung der Kontaktfläche erlaubt eine adäquate Messung der PZM als Molekülmatrix sowie deren Interaktion mit Chondrozyten, anstatt lediglich einzelne Moleküle zu messen.

Die hier verwendeten Microspheres haben einen Durchmesser von 25  $\mu\text{m}$  und wurden mittels einer M-Bond-610-Klebelösung an der Cantileverspitze festgeklebt.

Die Microspheres wurden zunächst auf eine Konzentration von 50 Stück/ $\mu\text{l}$  verdünnt, um eine Verklumpung der Kügelchen während des Klebeprozesses zu verhindern. Anschließend wurde ein Objektträger mit 70%iger Ethanollösung gewaschen und mit faserarmen Tüchern getrocknet, um die Oberfläche des Objektträgers von Staubpartikeln zu befreien, die ansonsten den Klebeprozess stören können. Nun wurden 1  $\mu\text{l}$  der verdünnten Microsphere-Lösung auf den Objektträger gebracht und mit dem Mikroskop visuell identifiziert. Danach wurde der AFM-Kopf mitsamt dem eingespannten Cantilever über dem Objektträger positioniert. Laser und Photodiode des AFMs wurden so kalibriert, dass eine kontrollierte Kontaktaufnahme („*Approach*“) des Cantilevers mit dem Boden des Objektträgers durchgeführt werden konnte. Nach dem Approach wurde der Cantilever um 100  $\mu\text{m}$  zurückgezogen, sodass er nun genau 100  $\mu\text{m}$  über dem Objektträger positioniert ist. Anschließend wurde 1  $\mu\text{l}$  einer M-bond-610 Klebelösung neben die Microspheres auf den Objektträger aufgetragen. Nun wurde der Cantilever über der Klebelösung positioniert und in 10  $\mu\text{m}$ -Schritten an den Kleber geführt, bis der Cantilever in die Klebelösung eintauchte. Dieser Kontakt war im Kamerabild des Mikroskops zu sehen und konnte zudem auch an Reflexionsänderungen von Laser und Photodiode identifiziert werden. Nach dieser

Kontaktaufnahme wurde der Cantilever wieder auf seine Ausgangsposition 100µm über die Oberfläche des Objektträgers gebracht und anschließend über einer Microsphere positioniert. Der mit Kleber beschichtete Cantilever musste nun für 90 Sekunden mit einer Microsphere in Kontakt kommen, um das Kügelchen an der Cantileverspitze festzukleben. Hierfür wurde sich der Messfunktion des AFMs bedient, welche beliebig lange Kontaktzeiten zwischen Cantilever und Messobjekt erlaubt. Gegenstand der Messung war in diesem Fall die Microsphere selbst. (Abbildung 17)

Ein erfolgreicher Klebevorgang konnte durch Bewegung des Cantilevers leicht kontrolliert werden: Bewegte sich die Microsphere mit dem Cantilever an dessen Spitze war das Kleben erfolgreich. Falls nicht, wurde der oben beschriebene Prozess bis zum Gelingen wiederholt. Nach erfolgreichem Bekleben wurde der AFM-Kopf abgebaut und der Cantileverhalter mitsamt dem fixierten Cantilever aus dem Verschlussmechanismus des AFM-Kopfs gelöst. Abschließend wurde der Cantilever und dessen Halter für 2 Stunden bei 60°C inkubiert (*Inkubator: Melag, Deutschland*). Die Inkubation härtet den Kleber aus und verstärkt somit die Bindung der Microsphere an den Cantilever.



**Abbildung 17:** Mikroskopaufnahme eines mit einer Microsphere beklebten Cantilevers (unten). Am linken Rand ist der Cantileverhalter (blauer Pfeil) zu erkennen, in den der Cantilever (roter Pfeil) eingebettet ist. Die Microsphere (grüner Pfeil) ist an der Spitze des Cantilevers erkennbar. Der obere, kürzere Cantilever wurde nicht beklebt und dient als Referenz.

### 3.4.5 Kalibrierung des Cantilevers

Um die Kraft zwischen Cantilever und Probe zu messen, und diese anschließend in das Elastizitätsmodul umzurechnen wurden AFM-Messungen im Rahmen dieser Arbeit so durchgeführt, dass Auslenkungen des Cantilevers nicht als Stromänderungen auf der Photodiode in Volt sondern Kräfteinheiten in Newton wiedergegeben werden.

Wie bereits erwähnt kann der Cantilever physikalisch als Feder angesehen werden. Dementsprechend lassen sich kraftbezogene Auslenkungen des Cantilevers mit dem Hookschen Gesetz beschreiben, wobei die Auslenkung  $x$  des Cantilevers mit einer Federkonstante  $k$  proportional zur Kraft  $F$  ist, die zwischen Cantilever und Probe während des Messvorgangs herrscht.

## **Formel 2**

$$F = k * x$$

Die Auslenkung des Cantilevers wird ursprünglich in Volt als Verhältnis des einfallenden Stroms der Laserreflektion auf die verschiedenen Quadranten der Photodiode wiedergegeben. Um eine Wiedergabe der aufgebrachten Kraft in Newton zu erreichen, muss zunächst die sog. Cantileversensitivität bestimmt werden. Diese definiert sich als die Distanz, um die der Cantilever ausgelenkt werden muss, um eine Stromdifferenz von einem Volt auf der Photodiode zu erreichen. Die nun wiedergegebene Distanz entspricht der Auslenkung  $x$  aus Gleichung 2. Durch die darauffolgende Bestimmung der Federkonstante  $k$  lässt sich aus den nun bekannten Werten  $x$  und  $k$  auf die Auslenkung des Cantilevers in Abhängigkeit der Kraft zwischen Cantilever und Probe schließen.

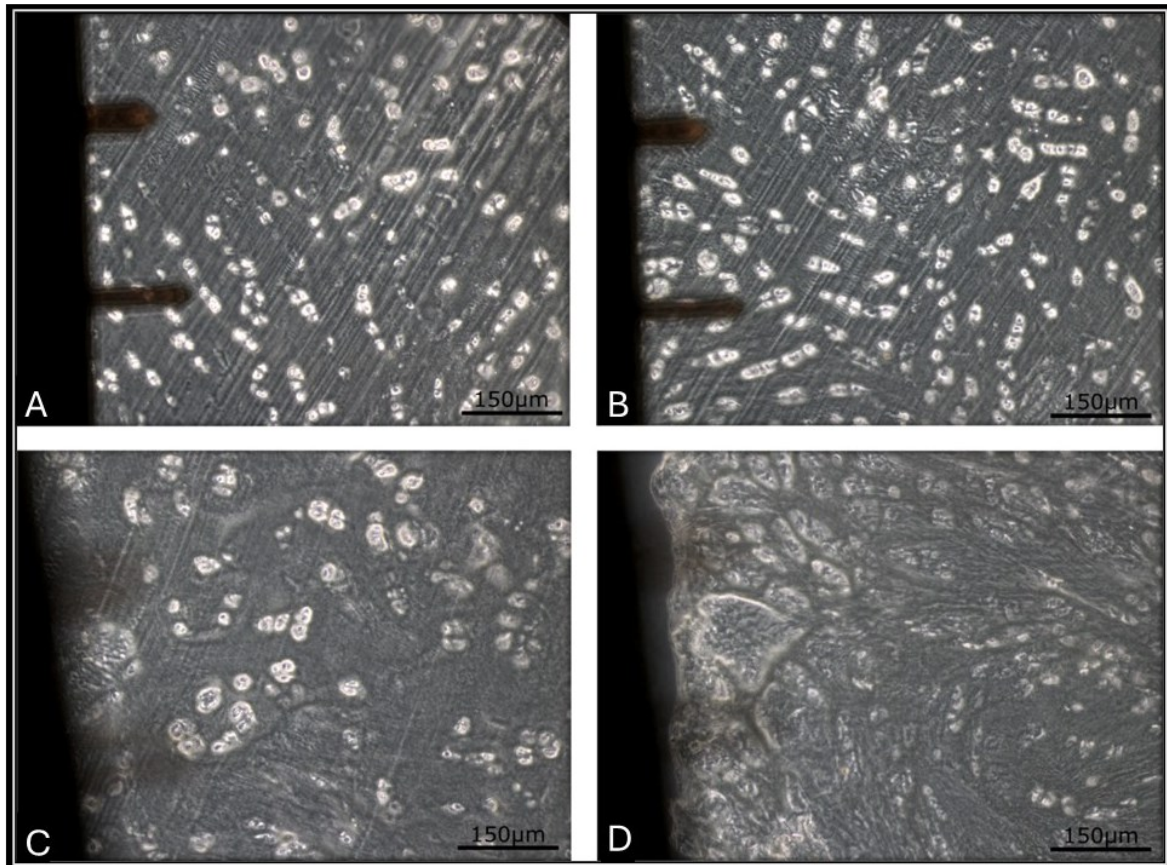
Um die Cantileversensitivität zu bestimmen wurde eine Kraft-Spektroskopie auf einer harten und glatten Oberfläche einer Zellkulturschale gefüllt mit Leibovitz's L-15 Medium durchgeführt. Der AFM-Kopf wurde mitsamt eingespanntem Cantilever über der Zellkulturschale positioniert. Der Cantilever wurde visuell identifiziert und mit dem motorisierten AFM-Kopf in 100 $\mu$ m-Schritten Richtung Boden der Zellkulturschale bewegt, bis der Cantilever die Oberfläche des Mediums durchbrach. Anschließend wurde der Laserstrahl des AFMs auf die Rückseite des Cantilevers projiziert und dessen Reflexion in das Zentrum der Photodiode gelenkt. Die Einstellung von Laser und Photodiode ermöglichte nun die Durchführung einer automatisierten Annäherung des Cantilevers an den Schalenboden. Im Rahmen dieses sog. „Approaches“ tastet sich der Cantilever von oben in Richtung Boden der Petrischale, bis ein Kontakt hergestellt wurde. Anschließend wurde der Cantilever um 100 $\mu$ m zurückgezogen. Nun wurde eine Kraft-Spektroskopie des Schalenbodens durchgeführt. Die so erhaltene Kraft-Abstands-Kurve diente als Grundlage der Sensitivitätsmessung. Anschließend wurde innerhalb der Betriebssoftware des AFMs eine Gerade durch den steilsten Teil der Kraft-Abstands-Kurve gelegt. Die Steigung dieser Geraden beschreibt die Cantileversensitivität, die sich bei den meisten handelsüblichen Cantilevern zwischen 30-100 nm/V bewegt.

Zur Berechnung der Kraft  $F$  wurde nun die Federkonstante des Cantilevers ermittelt. Zwar ist es unter Herstellern üblich, Näherungswerte der hauseigenen Cantilever bereitzustellen, allerdings bilden diese Werte auf Dauer die Federkonstante nicht zuverlässig ab. Deshalb wurden im Rahmen der Cantileverkalibrierung die Federkonstanten eigenständig ermittelt. Hierfür wurde eine sog. Wärmerauschmessung angewandt, die in der verwendeten Software integriert ist und aus der thermischen Fluktuation des Cantilevers dessen Federkonstante ableitet. Federkonstante und Cantileversensitivität wurden durch die Software schließlich miteinander verrechnet, um so die Kraft zwischen Cantilever und Probe abzuleiten.

### **3.4.6 AFM-Messungen**

Die Durchführung von Messexperimenten am Knorpelgewebe deckt sich in ihrem Ablauf zu großen Teilen mit der oben beschriebenen Kalibrierung des Cantilevers. Auch hier wurde der Cantilever zunächst in das Leibovitz's-Medium eingetaucht um danach den AFM-Laser und die Reflexion auf die Photodiode entsprechend einzustellen. Anstatt eines Approaches an den Schalenboden wurde nun jedoch ein Approach an die Probe unternommen. Hierfür wurde die Probe mit den zu messenden Strukturen zunächst visuell identifiziert. Anschließend wurde der Approach des Cantilevers durchgeführt, um den Cantilever an die Probenoberfläche zu navigieren. Nach Beendigung des Approaches und Kontaktaufnahme des Cantilevers mit der Probenoberfläche wurde der Cantilever um  $100\mu\text{m}$  zurückgezogen und befand sich somit  $100\ \mu\text{m}$  über den zu messenden Strukturen. Diese wurden mittels des integrierten Kamerasystems des AFMs identifiziert und mit einem visuellen Marker innerhalb der Software versehen. Anschließend wurde der Cantilever innerhalb seiner Horizontalebene über die Markierung bewegt. Von dieser Position aus wurden die Messvorgänge durchgeführt.

Durch Einsatz des integrierten Phasenkontrasts bzw. Differentialinterferenzkontrasts des AFM-Systems war die Visualisierung zellulärer Strukturen des Knorpels möglich und erlaubt so die Identifizierung räumlicher Chondrozytenmuster wie Strings, Double Strings, Small Clusters und Large Clusters. (Abbildung 18)



**Abbildung 18:** Mikroskopaufnahme eines mit einem beklebten Cantilever durchgeführten Messvorgangs eines Kryotomschnitts. Der Cantilever wurde mit seiner Spitze über der PZM von Stringstrukturen platziert, um diese zu messen A / B. Auf dem Bild lassen sich durch den Phasenkontrast des Mikroskops zudem andere Chondrozytenstrukturen, wie Small Clusters C und Big Clusters erkennen. Mit freundlicher Genehmigung von Leonhard Jacobi [2].

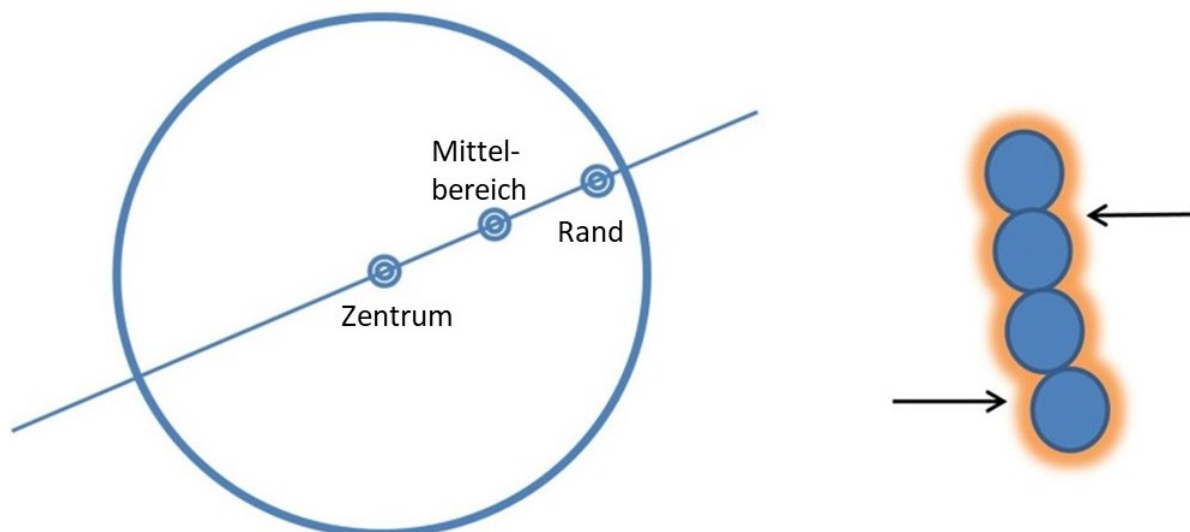
### 3.4.7 AFM-Baseline

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Baseline an AFM-Messungen für jede hergestellte Probenart etabliert. Die Baseline setzte sich aus je drei Discs und Kryotomschnitten zusammen. Ziel der Baseline-Experimente war es, intrinsische Elastizitätsunterschiede der einzelnen Proben zu identifizieren.

Die Proben wurden am Tag der Entnahme geschnitten und wie bereits in Kapitel 3.2.1. beschrieben präpariert und mit dem AFM gemessen. Hierbei wurden nicht die

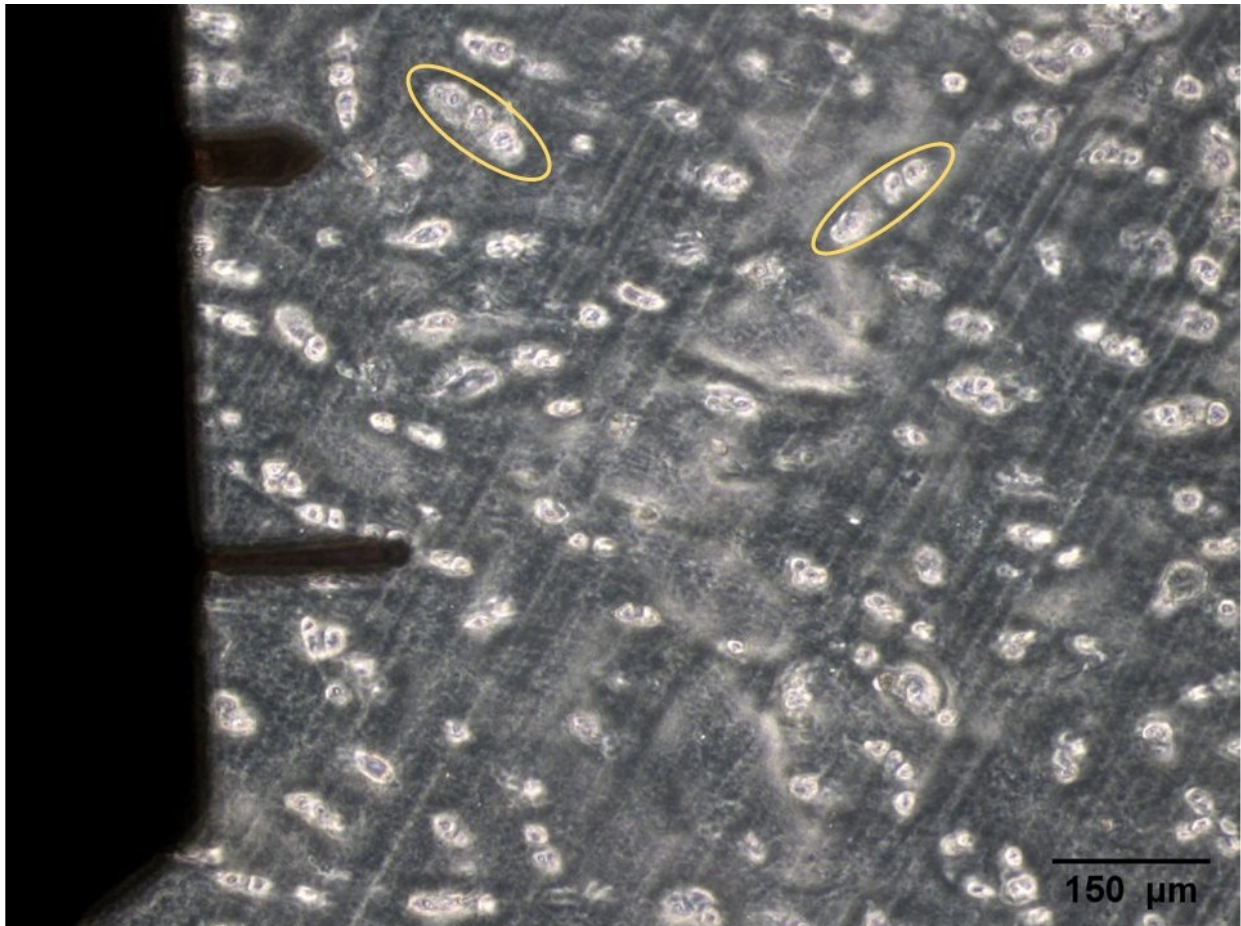
Chondrozyten selbst, sondern die umliegende PZM auf ihr Elastizitätsmodul untersucht. Je nach Probenart wurden verschiedene Kriterien zur Selektion der Messorte angewandt. Durch die einheitliche Form und Größe der Discs konnten diese zunächst in einen Zentralen-, mittleren und Randbereich eingeteilt werden, um die verschiedenen Sektionen einer Disc in ihrer Elastizität miteinander zu vergleichen. Pro Bereich wurden anschließend 2 Strings ausgewählt und die PZM der Strings an zwei jeweils gegenüberliegenden Punkten gemessen. Pro Punkt wurden jeweils 8 Messungen durchgeführt. (Abbildung 19)

Die Discs wurden nach der Messung für 48h weitere Stunden mit einem Mediumswechsel nach 24 Stunden inkubiert und anschließend erneut gemessen.



**Abbildung 19:** Schematische Darstellung der Einteilung der Knorpeldiscs in 3 Messbereiche („Zentrum“, „Mittelbereich“, „Rand“), die im Rahmen der Baseline vorgenommen wurde (A). Darstellung der angestrebten Messpositionen eines Strings. Gemessen wurden nicht die Chondrozyten (blau) selbst, sondern die umhüllende PZM (orange) (B).

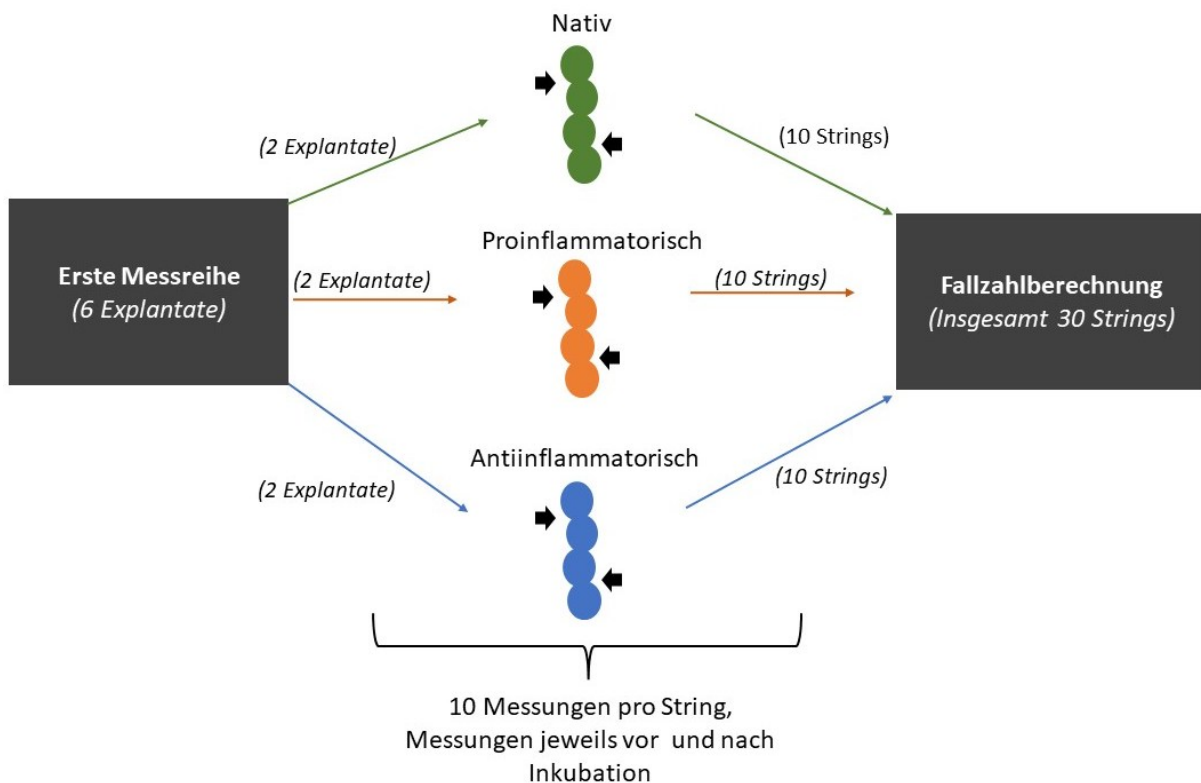
Für Messungen an Kryotomschnitten wurde keine Einteilung in Messbereiche vorgenommen. Stattdessen wurden gut identifizierbare Strings ausgesucht und gemessen. Hier wurden 3 Strings mit zwei Messpunkten á 4 Messungen gemessen. Für Explantate wurden aufgrund der Probengröße und irregulären Probenform ebenfalls keine Messbereiche zugeteilt. Wie bei Kryotomschnitten wurden auch hier gut erkennbare Strings identifiziert und gemessen. (Abbildung 20)



**Abbildung 20:** *Mikroskopaufnahme eines mit einem beklebten Cantilever durchgeführten Messvorgangs eines Kryotomschnitts. Der Cantilever wurde mit seiner Spitze über der PZM einer Stringstruktur platziert, um diese zu messen. Auf dem Bild lassen sich durch den Phasenkontrast des Mikroskops zudem andere Chondrozytenstrukturen erkennen. Zur Veranschaulichung wurden zwei Chondrozytenstrings gelb eingekreist*

### 3.4.8 AFM-Messungen unter Entzündungsmodulation

Nach Beendigung der Baseline-Experimente wurden Explantate unter verschiedenen Bedingungen inkubiert und mit dem AFM auf ihre biomechanischen Eigenschaften untersucht. Die Explantate wurden unter nativen Bedingungen, sowie unter Zugabe eines pro- und eines antiinflammatorischen Stoffes untersucht. Insgesamt wurden zwei Messreihen für native, pro- und antiinflammatorische Bedingungen durchgeführt. Die erste Messreihe diente hierbei als Pilotdatensammlung, um eine Fallzahlberechnung für eine ausgeweitete, zweite Messreihe durchzuführen.



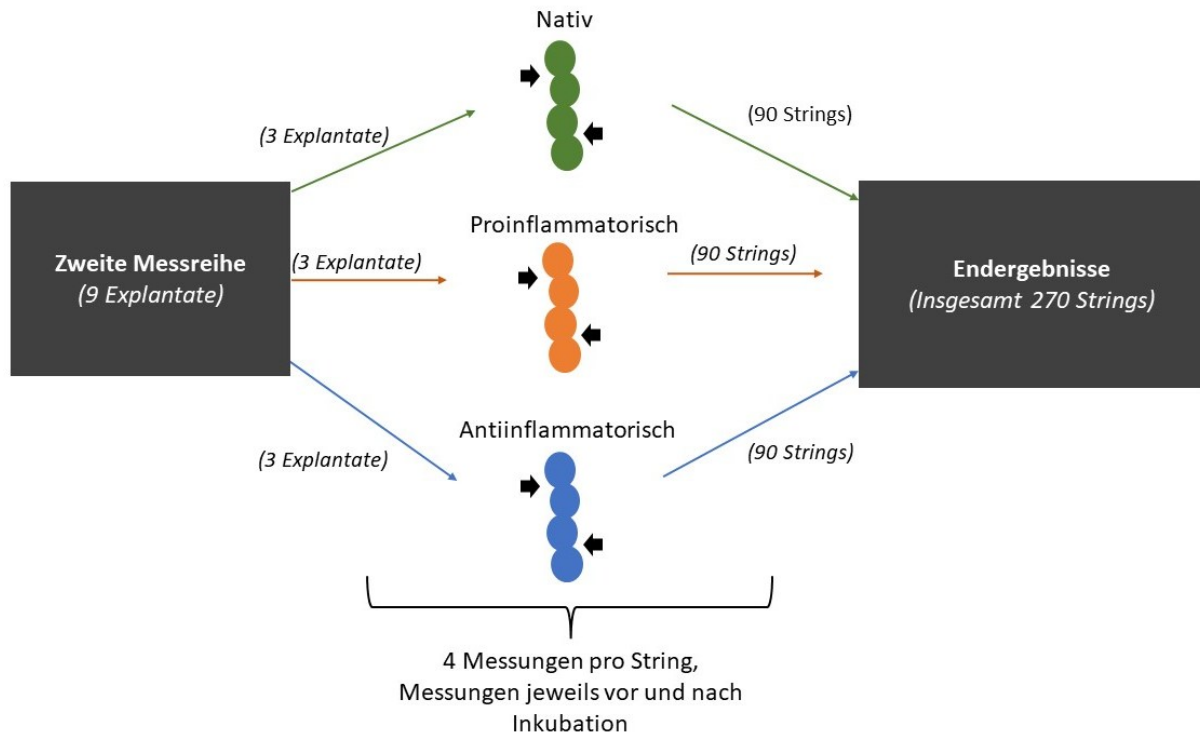
**Abbildung 21:** Schematische Darstellung der ersten Messreihe mit jeweiligen Messarmen. 6 Explantate wurden in einen nativen (grün), proinflammatorischen (orange) und antiinflammatorischen (blau) Messarm aufgeteilt. Pro Explantat wurden jeweils 5 Strings gemessen. Pro String wurden wiederum 2 Punkte (schwarze Blockpfeile) mit jeweils 5 Messungen gemessen. Sämtliche Messungen wurden jeweils vor Inkubation ( $t_0$ ) und nach Inkubation ( $t_8$ ) durchgeführt. Die so zusammengetragenen Messungen wurden als Basis der Fallzahlberechnung verwendet.

Am Tag der operativen Entnahme des Knorpelgewebes wurden diese jeweils zu Explantaten verarbeitet, mit Propidiumiodid/Calcein eingefärbt, mikroskopiert und für AFM-Messungen präpariert. Auch hier wurde die PZM von Chondrozytenstrings als Zielstruktur gemessen. Die Messungen wurden in einen proinflammatorischen, einen antiinflammatorischen und in einen nativen Messarm gegliedert. Pro Messarm wurden 2 Explantate von jeweils verschiedenen Patienten vor Beginn der Inkubation gemessen. Für jedes Explantat wurden 5 Strings gemessen. Jeder String eines Explantats wurde hierbei 10-mal gemessen. So ergaben sich insgesamt 300 Einzelmessungen vor Inkubation.

Im Anschluss an diese AFM-Messungen wurden die Explantate für insgesamt 8 Tage unter täglichem Mediumwechsel inkubiert. Hier wurde den proinflammatorischen Proben direkt zu Beginn der Inkubationsperiode  $10\mu\text{g}$  Interleukin-1 zugesetzt. Den antiinflammatorischen Explantaten wurde  $10\mu\text{g}$  eines TNF- $\alpha$  Inhibitors, Adalimumab,

zugegeben. Die nativen Explantate dienten als Kontrolle und blieben somit unbehandelt.

Nach der Inkubation wurde das o.g. Messschema wiederholt. Aus den so ermittelten Messdaten wurde eine Fallzahlberechnung für die zweite Messreihe erstellt, die in Kapitel 3.2. ausgeführt wird (Abbildung 22).



**Abbildung 22:** Schematische Darstellung der zweiten Messreihe mit jeweiligen Messarmen. 9 Explantate wurden in einen nativen (grün), proinflammatorischen (orange) und antiinflammatorischen (blau) Messarm aufgeteilt. Pro Explantat wurden jeweils 30 Strings gemessen. Pro String wurden wiederum 2 Punkte (schwarze Blockpfeile) mit jeweils 2 Messungen gemessen. Sämtliche Messungen wurden jeweils vor Inkubation ( $t_0$ ) und nach Inkubation ( $t_8$ ) durchgeführt

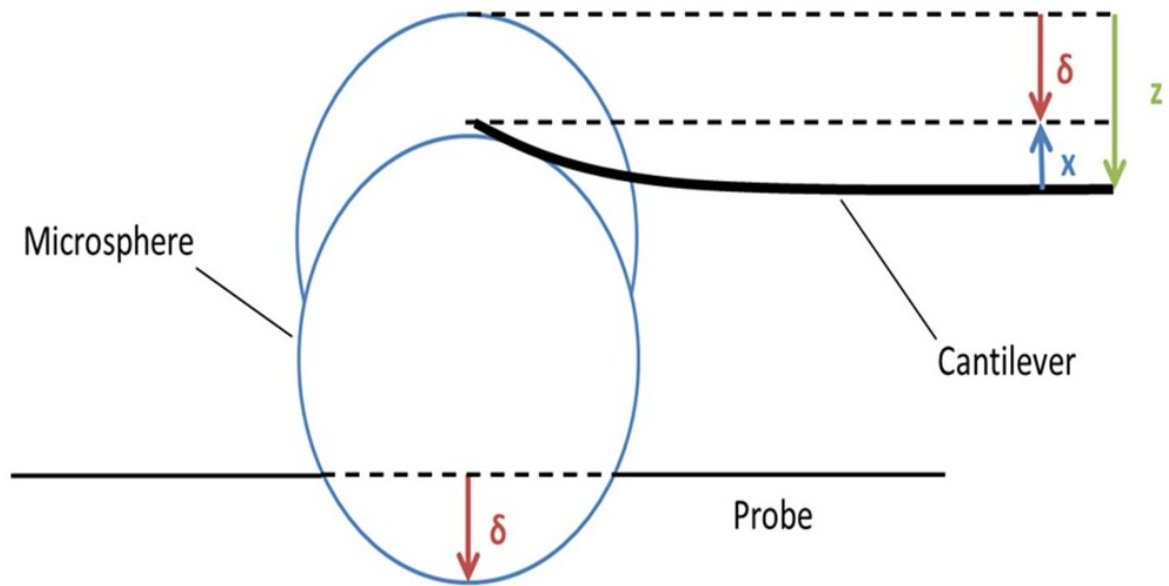
Um eine größere Fläche des Knorpels abzudecken, wurden für die zweite Messreihe pro Explantat jeweils 30 Strings gemessen. Jeder String wurde hierbei 4-mal gemessen. Insgesamt wurden so für 270 Strings 1080 Einzelmessungen vor Inkubation durchgeführt. Die anschließende Inkubation der Explantate erfolgte analog zur Inkubation der ersten Messreihe.

Anschließend wurde auch für die zweite Messreihe eine erneute Messung der Strings nach Inkubation durchgeführt. (Abbildung 21)

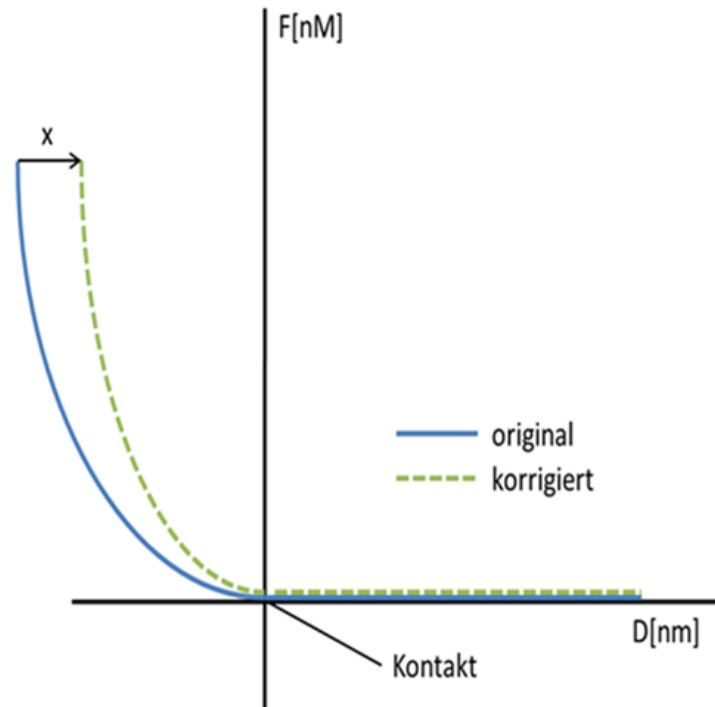
### 3.4.9 Verarbeitung der Daten

Um das Young'sche Modul aus den Kraft-Abstands-Kurven abzuleiten ist eine Umrechnung der Messdaten mittels verschiedener mathematischer Modelle vonnöten. Diese Modelle sind abhängig von der Form der Cantileverspitze sowie den mechanischen Eigenschaften der Probe. Im Falle einer flächig gleichverteilten Kompression eines Materials errechnet sich das YM unkompliziert als das bereits ausgeführte Verhältnis von Spannung  $\sigma$  zur Dehnung  $\varepsilon$  (siehe Formel 1). Im Rahmen der durchgeführten AFM-Messungen wurde das Gewebe allerdings inhomogen eingedrückt, da nur bestimmte Stellen der Probe jeweils einzeln komprimiert wurden. Für die Verarbeitung der Knorpelproben wurde deshalb das sog. Hertz-Modell zugrunde gelegt (siehe Formel 3). Als Standardmodell für die Analyse von Kraft-Abstands-Kurven kann es an die sphärische Form der Cantileverspitze durch die Microspheres angepasst werden und erlaubt so eine Berechnung des YM aus den Datenpunkten der Kraft-Abstands-Kurve. (Abbildung 23)

Im Rahmen der Anwendung des Hertz-Modells wird mittels Kurvenanpassung eine Kurve generiert, die die vorher gemessene Kraft-Abstands-Kurve bestmöglich approximiert. Hierfür trifft das Modell einige Annahmen über die mechanischen Eigenschaften der Probe und die Interaktion zwischen Cantilever und Probe. Es wird angenommen, dass der Cantilever nicht verformbar ist und keine weiteren Interaktionen zwischen Probe und Cantilever abseits des Messvorgangs bestehen. Zudem wird der Probe eine lineare Elastizität unterstellt. (Abbildung 24, Abbildung 25) Aufgrund der angenommenen Unverformbarkeit des Cantilevers muss, um das Hertz-Modell anzuwenden die Eindellung der Probe von der Krümmung des Cantilevers „bereinigt“ werden. Hierzu wird die Krümmung  $x$  von der Strecke  $z$ , die der Cantilever in Richtung Probe subtrahiert, um die Eindellung  $\delta$  zu erhalten.



**Abbildung 23:** Schematische Darstellung eines Kontakts zwischen Cantilever und Probe. Im Rahmen einer Messung bewegt sich der Cantilever um  $z$  (grüner Pfeil) in Richtung Probe. Über die Microsphere (hier zu Darstellungszwecken vergrößert) wird die Probe um  $\delta$  (roter Pfeil) eingedrückt und der Cantilever um  $x$  (blauer Pfeil) verbogen.



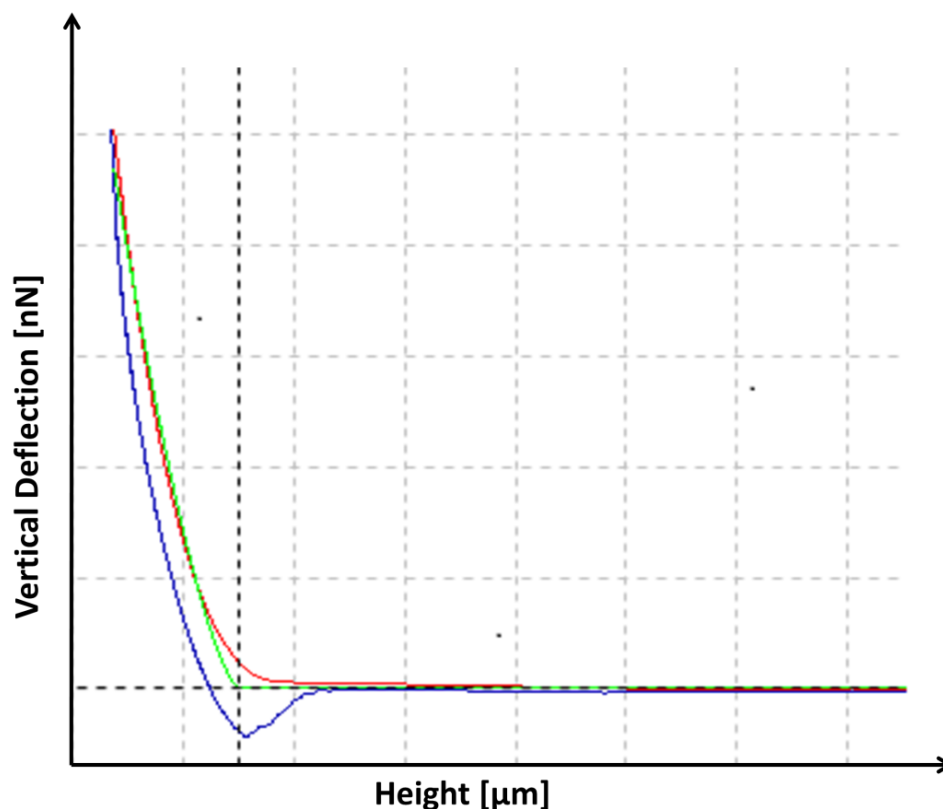
**Abbildung 24:** Schematische Darstellung der Kurvenkorrektur. Durch die Bereinigung von  $x$  ergibt sich eine neue Kraft-Abstandskurve (grün), die dem Hertz-Model als Vorlage dient.

Das Elastizitätsmodul  $E$  kann anschließend über die Datenpunkte der approximierten Kurve durch die Hertz-Formel für eine sphärische Spitzenform errechnet werden:

**Formel 3**

$$F = \frac{4}{3} * \frac{E}{1 - \nu^2} * \sqrt{R} \delta^3$$

Hierbei beschreibt  $F$  die Kraft, die während des Messvorgangs auf die Probe wirkt,  $R$  den Radius der Microsphere,  $\delta$  die Eindellung der Probe und  $\nu$  der sog. Poissonzahl. Diese ist eine Materialkonstante und wurde für die Berechnung aus der Literatur entnommen und auf 0,5 normiert.



**Abbildung 25:** Graph zur Datenapproximation des Hertz-Modells. Die roten und blauen Kurven beschreiben die Annäherungs- bzw. Rückzugskurve der eines Messvorgangs durch den Cantilever. Die in hellgrün gezeichnete Linie dient als Annäherung für das Hertz-Modell.

## 3.5 Statistische Methoden

### 3.5.1 Statistische Tests und deskriptive Statistik

Zunächst wurde eine deskriptive Statistik der Baseline-Messungen erstellt. Aufgrund der geringen Fallzahl wurde hier von Histogrammen abgesehen. Stattdessen wurden die Ergebnisse tabellarisch aufgetragen. Anschließend wurden die Überlebensexperimente der Glutamax-, DMEM- und Explantatinkubationen graphisch analysiert. Die Darstellung erfolgte hierbei mit separaten Liniendiagrammen der jeweiligen Inkubationsmedien.

Zur Überprüfung auf Normalverteilung wurden anschließend für die AFM-Messungen der ersten Explantatmessreihe Histogramme erstellt, die hinsichtlich ihrer Form analysiert wurden.

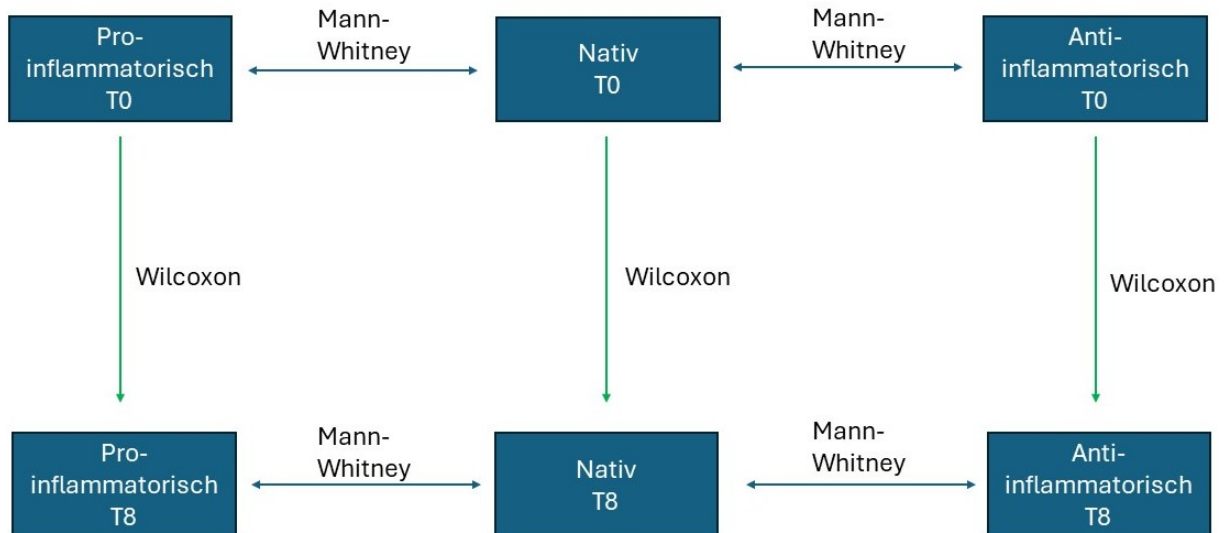
Bei fehlender Normalverteilung der Daten gemäß ihrer Histogramme (Abbildung 31, Abbildung 32) erfolgten anschließend zunächst nicht-parametrische Hypothesentests für die erste Messreihe. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die pro- und antiinflammatorischen Messarme der ersten und zweiten Messreihe mit ihren jeweiligen nativen Messarmen verglichen. Zudem wurde eine vertikale Signifikanztestung innerhalb eines Messarmes vorgenommen. Hierbei wurde angenommen, dass die Strings eines vitalen Explantats statistisch abhängig voneinander sind. Mit dieser Annahme ergibt sich auch eine statistische Abhängigkeit der t<sub>0</sub>- und t<sub>8</sub>-Messungen einer Probe, auch wenn jeweils unterschiedliche Strings gemessen wurden. Daher erfolgte die Testung eines Messarmes mittels Wilcoxon-Tests. Im Vergleich der verschiedenen Messarme miteinander sind die Messwerte hingegen statistisch unabhängig voneinander, da für jeden Messarm Proben von verschiedenen Patienten verwendet wurden. Die zugehörige Berechnung erfolgte mit dem Mann-Whitney-U-Test. (Abbildung 26)

Für sämtliche Hypothesentests wurde ein Signifikanzniveau von 0,05 festgesetzt. Von einer Alpha-Adjustierung wurde abgesehen. Die graphische Darstellung der erhobenen Messdaten erfolgte mittels Boxplots.

Anschließend wurde eine Fallzahlberechnung durchgeführt, die in Kapitel 1.1.2 ausgeführt ist. Mithilfe der Fallzahlberechnung wurde nun die zweite Messreihe durchgeführt. Danach erfolgten Hypothesentests der zweiten Messreihe, analog zu

den Testungen der ersten Messreihe. Auch hier wurden die Daten graphisch via Boxplots dargestellt.

Zusätzlich wurden für die erste und zweite Messreihe deskriptive Statistiken erstellt.



**Abbildung 26:** Schema der durchgeführten Hypothesentests der ersten und zweiten Messreihe. Die einzelnen Messarme wurden horizontal mittels Mann-Whitney U Tests vor Inkubation (T0) und nach Inkubation (T8) miteinander verglichen. Ebenfalls erfolgte mittels Wilcoxon-Tests eine vertikale Testung (grüne Pfeile) der einzelnen Messarme.

Bereits zum Zeitpunkt t0 lagen deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen vor. Um hier den Umfang der Änderung über die Zeit besser vergleichbar zu machen, erfolgte eine Verrechnung der Werte mittels eines vorher bestimmten Wichtungsfaktors, welcher den Median der t0 Messungen standardisiert auf 1 setzte.

Die Berechnung des Wichtungsfaktors  $f$  erfolgte gemäß Formel 4, wobei  $m_{t0}$  eine in t0 durchgeführte Messung eines Strings beschreibt. Die so errechneten Wichtungsfaktoren wurden mit den äquivalenten t8-Messungen des jeweiligen Messarms multipliziert, um gewichtete Messwerte zu generieren.

**Formel 4**

$$f = \frac{1}{m_{t0}}$$

### 3.5.2 Fallzahlberechnung für zweite Explantat-Messreihe

Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, natives Knorpelgewebe über mehrere Tage zu inkubieren, um anschließend Messungen an großen lebenden Knorpelstücken durchzuführen. Hierfür wurden mehrere Probenarten von Knorpelgewebe hergestellt und vermessen. Basierend auf den Pilotmessungen an Knorpel-explantaten wurde eine Fallzahlberechnung für eine zweite, endgültige Messreihe an Explantaten durchgeführt.

In einer Fallzahlberechnung wird diejenige Stichprobengröße berechnet, die notwendig ist, um einen tatsächlich existierenden Unterschied zwischen zwei oder mehreren Stichproben als statistisch signifikant nachzuweisen. Durch eine Fallzahlberechnung sollen tatsächliche Effekte bzw. Unterschiede erfasst werden und Unsicherheiten bei nicht nachgewiesenen Unterschieden reduziert werden. Im Fall dieser Arbeit soll mit der Fallzahlberechnung die mindestens erforderliche Anzahl an zu untersuchenden Strings für einen effektiven Vergleich zwischen nativen Proben und proinflammatorischen Proben erfolgen.

Fallzahlberechnungen finden breite Anwendung in klinischen Studien. Es lassen sich aber auch in der zellbiologischen Forschung Fallzahlplanungen durchführen.

Die nachfolgenden Überlegungen und Berechnungen basieren auf einem 2016 publizierten Paper von Flight und Kollegen. [55]

Die zugrundeliegende Fragestellung war, ob die Zugabe von proinflammatorischen Substanzen gegenüber der nativen Inkubation von Knorpelzellen signifikante Unterschiede zeigen.

Die tatsächliche Berechnung der Fallzahl wurde mit dem *SampSize*-Rechnertool von *epiGenesys* durchgeführt. Dabei wurde für die Errechnung der Fallzahl Formel 2 zugrunde gelegt. Für die vorliegenden Daten wurde die Zugabe proinflammatorischer Substanzen als „klinische Interventionen“ im Rahmen einer Überlegenheitsstudie behandelt. Das Signifikanzniveau  $\alpha$  wurde auf 0,05 angesetzt, die Trennschärfe  $1 - \beta$  wurde auf 0,8 angesetzt.

**Formel 5**

$$n = \frac{(r + 1)(Z_{1-\beta} + Z_{1-\alpha/2})^2 \sigma^2}{rd^2}$$

Die Fallzahl  $n$  errechnet sich aus dem Zuteilungsverhältnis  $r$ . Da in den Messarmen der endgültigen Messungen gleich viele Proben untersucht wurden ergibt sich für  $r=1$ . Für die Standardabweichung der Population  $\sigma$  wurde die Standardabweichung der Pilotmessungen verwendet. Die Differenz der Mittelwerte  $d$  wurde ebenfalls aus den Pilotmessungen berechnet. Hierbei wurde  $d$  als Differenz der Mittelwerte zwischen nativ und antiinflammatorischem Messarm berechnet.

**Formel 6**

$$\begin{aligned} |d| &= |M_{nativ,t8}| - |M_{anti,t8}| \\ |d| &= |4,57 [kPa] - 12,72 [kPa]| = \mathbf{|8,15| [kPa]} \end{aligned}$$

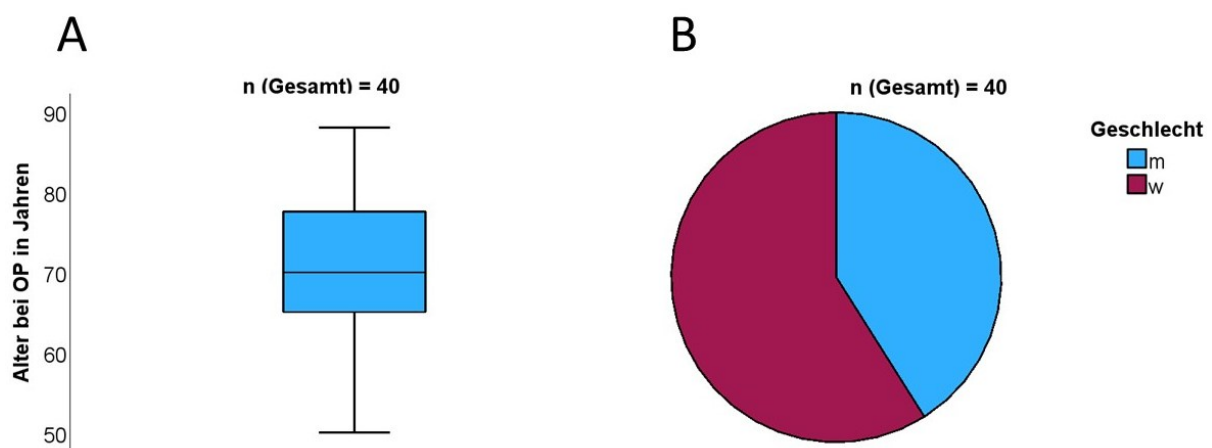
Als Endpunkt für die Fallzahlberechnung kommen sowohl ein binärer und ein kontinuierlicher Endpunkt infrage. Ein binärer Endpunkt wird dadurch definiert, ob ein Ereignis nach einer Intervention aufgetreten ist oder nicht. Allerdings liefert ein binärer Endpunkt keine Informationen über das Ausmaß einer aufgetretenen Wirkung. Daher wurde mit Hinblick auf die durchgeführten Messungen ein kontinuierlicher Endpunkt für die Fallzahlberechnung gewählt, da dieser Aussagen über die Effektstärke einer Intervention beinhaltet.

Für die Fallzahlberechnung sollte zudem die Art des Studiendesigns spezifiziert werden. In Fall dieser Arbeit wurde ein paralleles Studiendesign verwendet, da mehrere unabhängige Gruppen jeweils verschiedenen Interventionen unterzogen werden. So wurde zusätzlich parallel ein Vergleich von nativen und proinflammatorischen Proben als Begleitstudie durchgeführt. Hierfür erfolgte keine Fallzahlberechnung. Für den Vergleich von nativen und antiinflammatorischen ergab sich eine Fallzahl von  $n=12$ .

## 4 Ergebnisse/Auswertung

### 4.1 Probenkollektiv und Fallzahlberechnung

Insgesamt wurde 40 Patienten Gewebe entnommen (Abbildung 27). Das Gewebe wurde entweder zu Discs, Kryotomschnitten oder Explantaten verarbeitet. Die Methodik der jeweiligen Aufbereitungstechniken ist in Kapitel 3.2 genauer beschrieben. Das Gewebe von 17 Patienten wurde zu Discs verarbeitet. Kryotomschnitte wurden von 3 Patientenproben angefertigt. 20 Gewebeproben wurden zu Explantaten verarbeitet.



**Abbildung 27:** Alters- und Geschlechterverteilung des Patientenkollektivs. Die Altersverteilung der Patienten wird via Box-Whisker-Boxplot (A) dargestellt, das Kreisdiagramm (B) zeigt die Geschlechterverteilung (m= männlich, w= weiblich) der Patienten.

### 4.2 Ergebnisse Baselinemessungen

Wie bereits in Kapitel 3.2.1 beschrieben, dienen die Baseline-Messungen sowohl dem Vergleich von Discs und Kryotomschnitten wie auch dem Vergleich verschiedener Disc-Zonen untereinander. Mit dem AFM wurden die jeweiligen Proben auf ihre Elastizität untersucht, welche wiederum als Elastizitätsmodul oder YM ausgedrückt wurde. Das YM ist ein Kennwert dafür, wie stark ein Stoff bei einer bestimmten Krafteinwirkung nachgibt. Der Betrag des Moduls ist umso größer, je mehr Widerstand ein Material dem Verformungsdruck entgegensetzt. Je höher das YM, desto steifer bzw. härter/unelastischer die Probe. Da Arthrose mit einem Härteverlust des

Gelenkknorpels assoziiert ist spricht folglich eine Abnahme des YM für eine beginnende arthrotische Veränderung.

Tabelle 5 zeigt Messwerte der Baseline mittels deskriptiver Statistik. Aufgrund der geringen Fallzahl der Messungen konnte keine Aussage bzgl. der Normalverteilung der Daten getroffen werden. Daher werde im Folgenden sowohl Mittelwerte und Mediane der Daten dargestellt. Für Discs zeigt sich ein Mittelwert der t0-Messungen von 15,95 kPa. Nach Inkubation beträgt der Mittelwert für die t2-Messungen 10,99 kPa. Mit einem Mittelwert von 6,05 kPa liegt der Durchschnitt der Kryotommessungen deutlich unter den Messwerten der Discs. Für Disc t0 ergab sich ein Median von 6,32 kPa, Disc t2 wies einen Median von 5,53 kPa auf. Für die Kryotomschnitte ergab sich ein Median von 5,34 kPa. Es zeigten sich große Unterschiede in Spannweite und Standardabweichung zwischen Disc- und Kryotommessungen. Die Standardabweichung für Disc t0 betrug 18,60 kPa, die Spannweite 47,67 kPa. Für die t2-Messungen ergaben sich ähnliche Werte mit einer Standardabweichung von 16,19 kPa und einer Spannweite von 52,53 kPa. Die Kryotomschnitte wiesen hingegen eine deutlich geringere Standardabweichung von 5,39 kPa auf. Auch die Spannweite war mit 18,65 kPa im Vergleich zu den Discmessungen deutlich geringer.

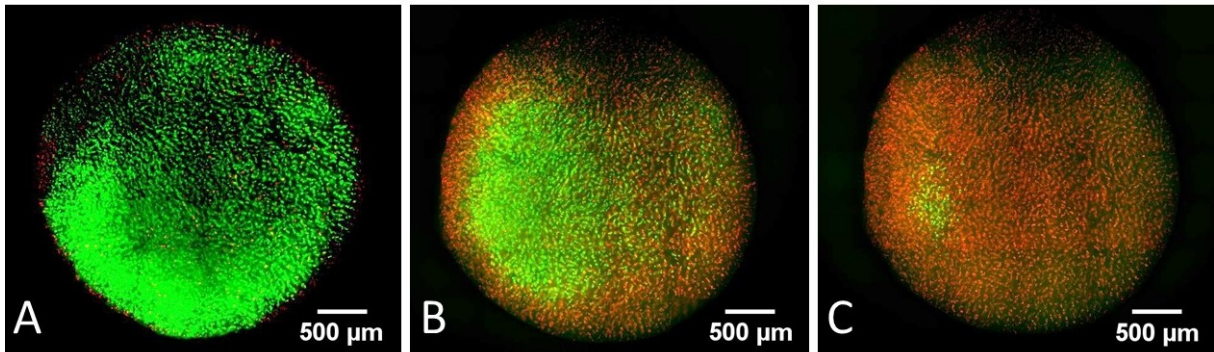
Während die Minimumwerte über alle drei Messreihen ähnliche Werte zeigten, konnten deutliche Unterschiede in den Höchstwerten festgestellt werden. Auch hier Verhalten sich die Discmessungen mit einem Maximum von 50,76 kPa für t0 und 53,56 kPa für t2 ähnlich zueinander. Das Maximum für die Kryotomschnitte war mit 19,23 kPa deutlich geringer.

	Disc t0 [kPa]	Disc t2 [kPa]	Kryo [kPa]
<b>N</b>	9	9	9
<b>Mittelwert</b>	15,95	10,99	6,05
<b>Median</b>	6,32	5,53	5,34
<b>Std.-Abweichung</b>	18,60	16,19	5,39
<b>Spannweite</b>	47,67	52,53	18,65
<b>Minimum</b>	3,09	1,03	0,58
<b>Maximum</b>	50,76	53,56	19,23
<b>25-Perzentil</b>	5,36	4,06	2,57
<b>50-Perzentil</b>	6,32	5,53	5,34
<b>75-Perzentil</b>	28,53	9,22	6,92

**Tabelle 5:** Deskriptive Statistik der Baseline-Messungen. Aufgeführt sind Durchschnittswerte von Messungen der Knorpeldiscs vor Inkubation (Disc t0), Knorpeldiscs nach Inkubation (Disc t2), sowie Messungen von Kryotomschnitten (Kryo), bei denen keine Inkubation durchgeführt wurde.

### 4.3 Ergebnisse Überlebensversuche

In Vorversuchen wurde zunächst versucht, ein möglichst belastbares Überleben der Knorpeldiscs unter Kulturbedingungen zu erreichen. Hierfür wurden verschiedene Ansätze ausprobiert. So wurden Knorpeldiscs mit DMEM- und Glutamax-Nährmedium für mehrere Tage inkubiert. Pro Knorpelprobe wurden jeweils 25 Discs abgebildet. Analog wurde für 5 verschiedene Patientenproben eine Inkubation mit Knorpelimplantaten durchgeführt. Pro Patientenprobe wurden 15 Explantate inkubiert.



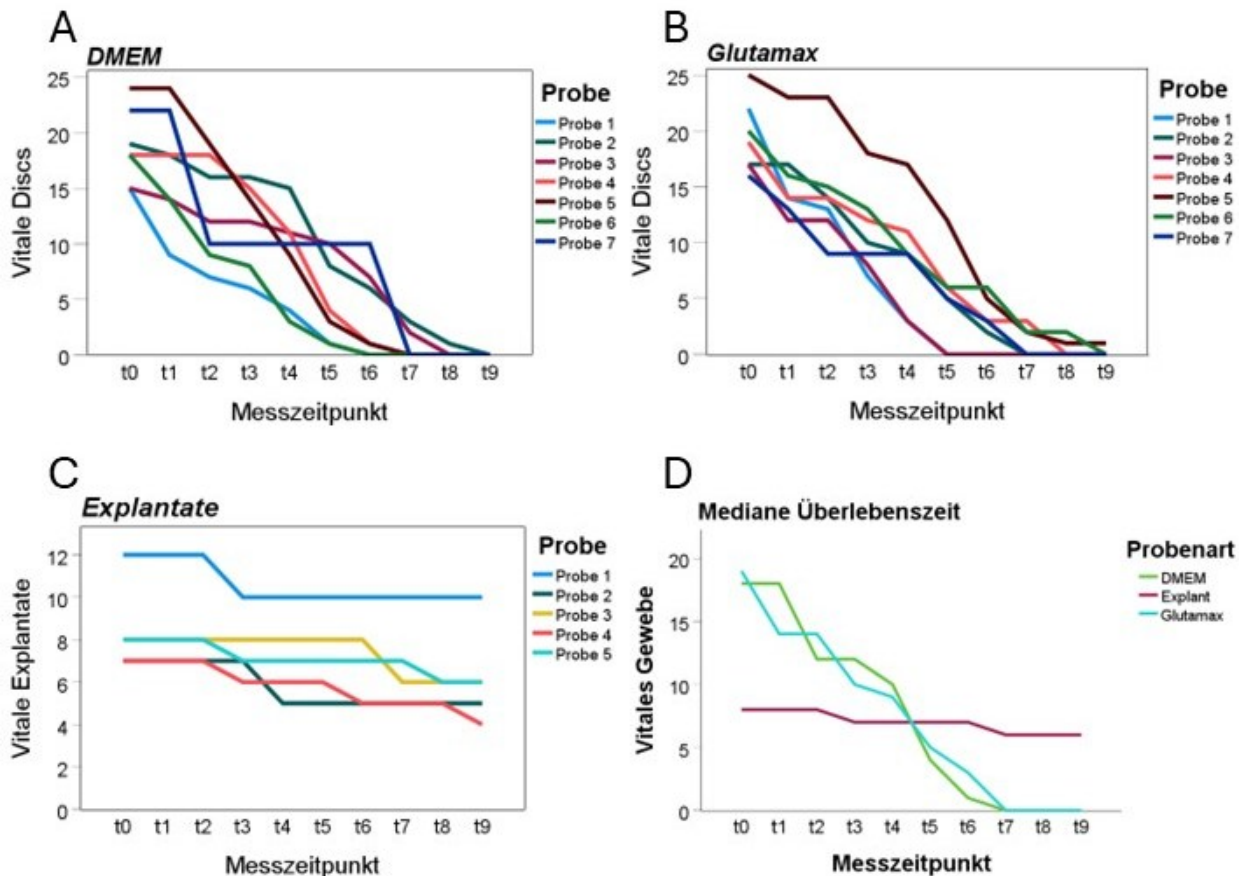
**Abbildung 28:** Lichtmikroskopische einer Bildserie Knorpeldisc während Inkubation in Glutamax-Nährmedium und Färbung mit Calcein und Propidiumiodid (PI). Die Proben wurden am Tag der Entnahme (Bild A), nach zweitägiger (Bild B) und nach fünftägiger Inkubation (Bild C) aufgenommen. In Bild A ist ein deutliches Calceinsignal zu erkennen. Leichte PI-Signale sind lediglich an den Rändern der Disc auszumachen. Bild B der Dreierserie wurde am zweiten Inkubationstag aufgenommen. Hier zeigt sich bereits ein deutliches PI-Signal. Im Vergleich zu Bild A scheint sich das Absterben der Chondrozyten vom äußeren der Disc nach zentral auszubreiten. Dennoch ist zentral eine große Insel mit Calcein-Signal auszumachen, sodass diese Disc noch als vital gewertet wurde. In Bild C ist ein klares Überwiegen der abgestorbenen Chondrozyten durch ein starkes PI-Signal erkennbar. Abgesehen von einer nun deutlich geschrumpften Insel an vitalen Chondrozyten in der linken Discshälfte, die zudem überlagert ist von PI-Signalen, sind sämtliche Zellen in anderen Bereichen der Disc avital. Ein typisches Muster, dass sich auch bei anderen Discs beobachten ließ. Insgesamt zeigt diese Dreierserie einen typischen Verlauf hinsichtlich des Absterbens von Knorpeldiscs in Inkubation.

Discs und Explantate wurden visuell auf ihre vitalen Zellen kontrolliert. Sofern sich lichtmikroskopisch eine ausreichende vitale Fläche von 50% der Gesamtfläche zeigte, wurde die Probe als noch vital gewertet. (Abbildung 28)

Die Inkubation der Discs zeigte ein klares Absterbemuster, sowohl für Glutamax und DMEM. Auffällig ist hierbei, dass bereits zum Entnahmezeitpunkt einige Knorpeldiscs in beiden Nährmedien als nicht mehr vital gewertet werden konnten. Die maximale Überlebenszeit war 8 Tage, die lediglich von einigen Discs erreicht wurden. Die Überlebenskurven zeigen ein heterogenes Erscheinungsbild und reichen von nahezu linearen Absterbemustern zu schrittweisem Absterben der Discs (Abbildung 29 A,B)

Das Absterbemuster der Glutamax-Reihe war im Vergleich zu den DMEM-Messungen homogener. Abgesehen von einem Plateau der Discs von Glutamax-Probe 7 zwischen t2 und t4 zeigen sämtliche Überlebenskurven der Glutamax-Reihe einen ähnlichen Verlauf (Abbildung 28). Während die meisten Discs während der ersten Tage der Inkubation noch vital gewertet werden konnten starb ein Großteil der

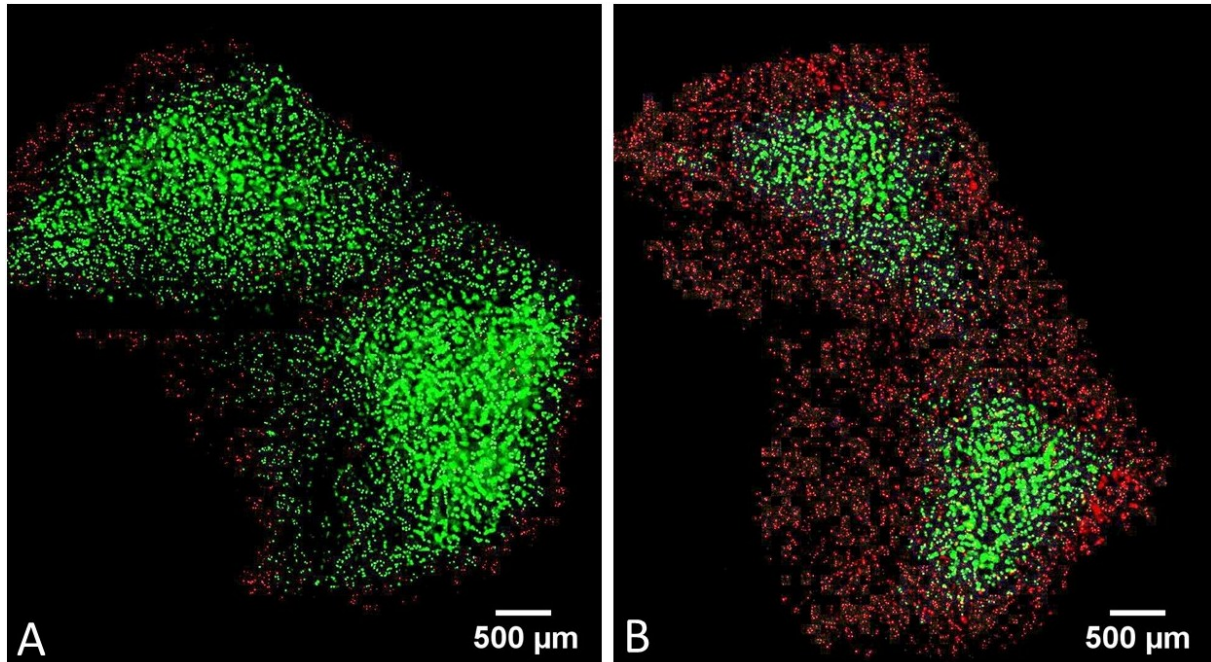
anfänglich noch vitalen Chondrozyten zwischen t3 und t5 ab, sodass die Proben als avital gewertet werden mussten.



**Abbildung 29:** Liniendiagramme der Überlebenszeiten von Knorpelgewebe unter verschiedenen Inkubationsbedingungen. A zeigt die Inkubation von Discs in DMEM-Nährmedium, B zeigt die Inkubation von Discs in Glutamax-Nährmedium. In C ist die Inkubation von Explantaten in DMEM-Medium dargestellt. D fasst die mediane Überlebenszeit der Graphen A, B und C zusammen. Die Anzahl der vitalen Discs sind auf der Ordinate über die Inkubationszeit bzw. dem Messzeitpunkt aufgetragen. T0 markiert hierbei den operativen Entnahmezeitpunkt sowie den Start der Inkubation. Discs weisen unabhängig ihres Nährmediums ein ähnliches Absterbemuster auf. In C und D wird das stabilere Überleben von Explantaten gegenüber Discs deutlich. Für sämtliche Probenarten fanden sich bereits in t0 avitale Proben.

Auch für die inkubierten Knorpelimplantate wurde bereits bei t0 avitales Gewebe festgestellt. Dennoch zeigte jede untersuchte Knorpelprobe dieser Messreihe beinhaltete Explantate, die bis einschließlich t9 als vital gewertet werden konnten. Im Vergleich zu Knorpeldiscs ergab sich für die Knorpelimplantate ein deutlich stabileres Überleben, mit häufig noch vitalen Zellinseln im Zentrum des Explantats (Abbildung 30). Ähnlich zu den inkubierten Discs zeigte sich auch bei den untersuchten Explantaten ein Absterbemuster mit Beginn an den Randzonen. Im Laufe der

Inkubation breiteten sich die Bereiche der avitalen Zellen Richtung Zentrum aus. Typischerweise zeigte sich am Ende der Inkubation ein von abgestorbenen Zellen umzäunter Bereich von vitalen Zellen.



**Abbildung 30:** Lichtmikroskopische Bilder eines Knorpelimplantats während Inkubation in DMEM-Nährmedium und Färbung mit Calcein und Propidiumiodid (PI). Die Proben wurden zu  $t_0$  (Bild A) und  $t_8$  (Bild B) aufgenommen. In  $t_0$  ist zentral ein starkes Calceinsignal mit einer avitalen Umrandung erkennbar. Einzelne PI-Signale lassen sich jedoch auch im Zentrum der Probe erkennen. In Bild B ist dasselbe Knorpelimplantat zum Zeitpunkt  $t_8$  abgebildet. Das in A noch deutlich vitale Zentrum ist in B auf zwei Inseln im Zentrum des Explantats geschrumpft. Obwohl die vitalen Bereiche im Verlauf der Inkubation stark an Größe eingebüßt haben, sind die Calceinsignale im Zentrum des Explantats auch in Bild B deutlich und nicht überlagert von PI-Signalen. Eingerahmt werden die vitalen Bereiche von einem breiten Saum von nun avitalen Chondrozyten, dargestellt durch das starke PI-Signal, was ein Absterben der Chondrozyten vom Rand des Explantats zentrumwärts impliziert.

## 4.4 Ergebnisse Erste Messreihe

### 4.4.1 Deskriptive Statistik und Histogramme

Basierend auf den Ergebnissen der Überlebensexperimente wurde eine Inkubationszeit von 8 Tagen für die erste und zweite AFM-Messreihe festgelegt. So sollte eine ausreichende Wirkung der pro- und antiinflammatorischen Stoffe, sowie ein stabiles Überleben der gemessenen Proben zum zweiten Meßzeitpunkt erreicht werden.

Die erste Messreihe umfasste die Inkubation und AFM-Messung von insgesamt 6 Explantaten. Hierbei wurden jeweils 2 Explantaten unter nativen, pro,- und antiinflammatorischen Bedingungen inkubiert. Pro Explantat wurden jeweils 5 Strings vor Inkubation (t0) und 5 Strings nach Inkubation (t8) gemessen. Die Explantate wurden jeweils am Entnahmetag (t0) und bis zur zweiten Messung am achten postoperativen Tag (t8) in Inkubation gehalten.

	Pro t0 [kPa]	Pro t8 [kPa]	Nativ t0 [kPa]	Nativ t8 [kPa]	Anti t0 [kPa]	Anti t8 [kPa]
<b>N</b>	10	10	10	10	10	10
<b>Median</b>	6,08	2,55	9,53	2,56	1,23	8,25
<b>Spannweite</b>	6,06	4,44	27,56	12,00	25,57	38,31
<b>Minimum</b>	4,40	0,97	1,76	0,35	0,30	0,44
<b>Maximum</b>	10,46	5,42	29,32	12,35	25,87	38,75
<b>Perzentile</b>						
25.	4,68	1,01	2,75	0,60	0,39	0,84
50.	6,08	2,55	9,53	2,56	1,23	8,25
75.	7,73	4,27	16,45	9,56	4,32	26,30
<b>IQR</b>	3,05	3,26	13,7	8,96	3,93	25,46

**Tabelle 6:** In Tabelle A sind Messwerte der Explantate unter nativen, pro- und antiinflammatorischen Messungen, jeweils vor Inkubation (t0) und nach Inkubation (t8) aufgeführt. Es zeigt sich ein heterogener Verlauf der Messwerte in den jeweiligen Messarmen. Antiinflammatorisch wurde eine Zunahme des Medians beobachtet. Pro- und antiinflammatorisch zeigten sich gegensätzliche Verläufe.

Im Laufe der Inkubation zeigten die Messwerte einen heterogenen Verlauf innerhalb der jeweiligen Messarme. So nahm der Median der proinflammatorischen Reihe von 6,08 kPa auf 2,55 kPa ab. Eine stärkere Abnahme wurde im nativen Messarm beobachtet, von 9,53 kPa in t0 auf 2,56 kPa in t8. Im antiinflammatorischen Messarm zeigte sich hingegen eine Zunahme des Medians von 1,23 kPa auf 8,25 kPa. Native und antiinflammatorische Messarme zeigten mit dem Interquartilabstand (IQR) eine größere Streuung als der proinflammatorische Messarm. Der IQR im nativen Messarm nahm ab, im antiinflammatorischen Arm hingegen nahm der IQR im Zuge der

Inkubation deutlich zu. Im proinflammatorischen Messarm veränderte sich die Streuung nur marginal. (Tabelle 6)

In der Analyse der gemessenen Daten auf Normalverteilung konnte in keiner der erhobenen Messarme eine Normalverteilung nachgewiesen werden (Abbildung 31). Daher wurde für die weitere statistische Analyse der ersten Messreihe von nicht normalverteilten Daten ausgegangen.

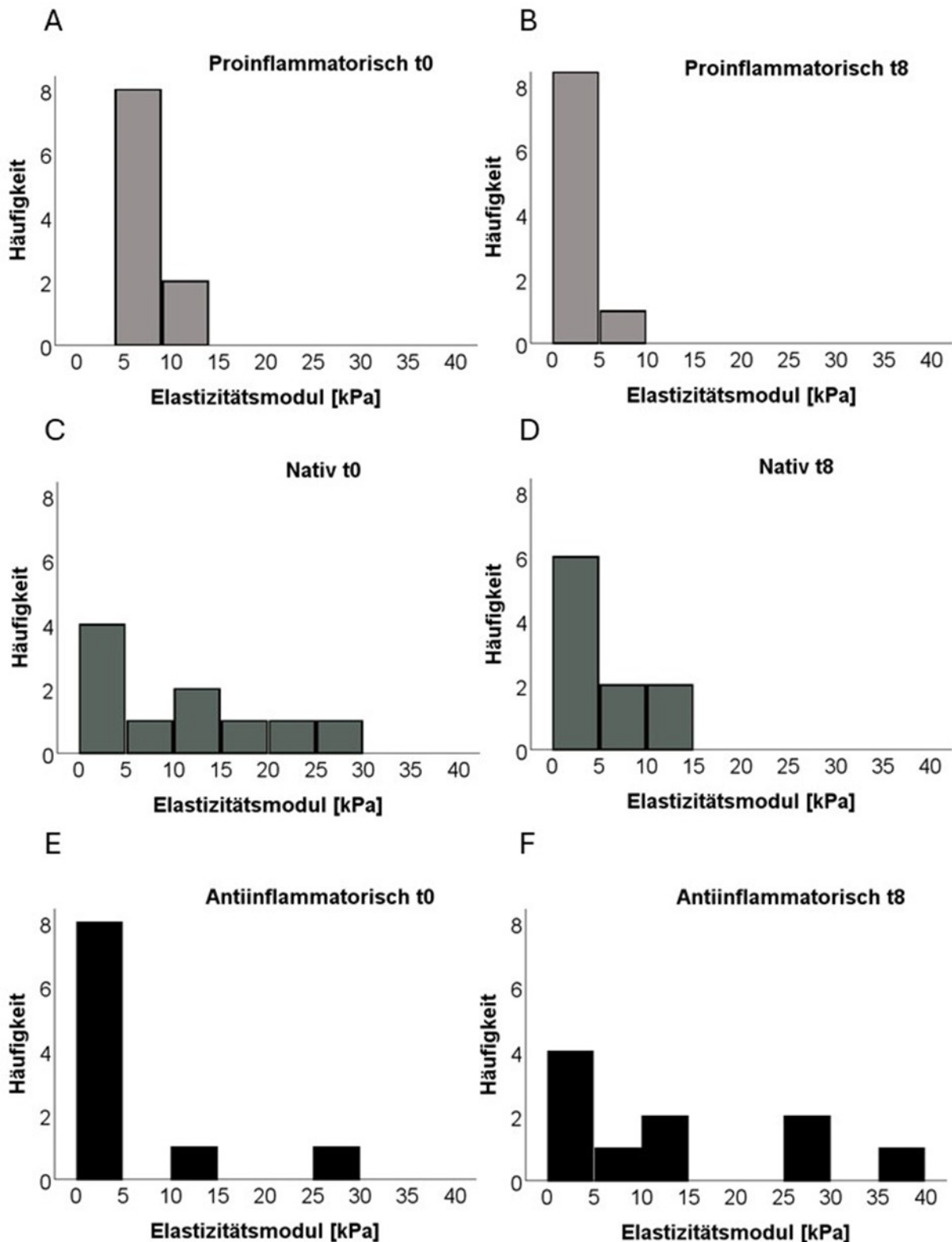
## **4.5 Ergebnisse zweite Messreihe**

### **4.5.1 Deskriptive Statistik und Histogramme**

Analog zur ersten Messreihe erfolgte auch in der zweiten Messreihe eine Inkubation und AFM-Messung von Explantaten unter nativ, pro,- und antiinflammatorischen Bedingungen. Die Explantate wurden jeweils am Entnahmetag (t0) und bis zur zweiten Messung am achten postoperativen Tag (t8) in Inkubation gehalten.

In der zweiten Messreihe wurden die Messungen basierend auf der Fallzahlberechnung aus den Ergebnissen der ersten Messreihe ausgeweitet. So wurden insgesamt 9 Explantate, 3 je Messarm, inkubiert und vor und nach Inkubation gemessen. Im Rahmen der zweiten Messreihe wurden so jeweils pro Explantat jeweils 30 Strings vor und nach Inkubation gemessen.

Im Rahmen der Hypothesentestung wurde zunächst getestet, ob ein Unterschied zwischen verschiedenen Messarmen bestand. Dies erfolgte als horizontale Testung mittels Mann-Whitney-U-Tests für unabhängige Proben. Da sich bereits in t0 signifikante Unterschiede zwischen den Messarmen zeigten, wurde ein Wichtungsfaktor gemäß Formel 4 errechnet. Die mit dem Wichtungsfaktor multiplizierten t8-Werte wurden nun für eine weitere horizontale Testung mittels Mann-Whitney-U verwendet (siehe graue Zellen in Tabelle).



**Abbildung 31:** Histogramme der ersten Messreihe an Explantaten. Es wurden jeweils Histogramme für Daten vor Inkubation ( $t_0$ ) und nach Inkubation ( $t_8$ ) erstellt. Histogramme wurden gemäß des Versuchsaufbaus in proinflammatorisch (hellgrau), nativ (grau) und antiinflammatorisch (schwarz) unterteilt. Die Histogramme der einzelnen Messarme sind mit A-F gekennzeichnet. In keiner der Messarme ließ sich eine Normalverteilung der Daten erkennen.

**A**

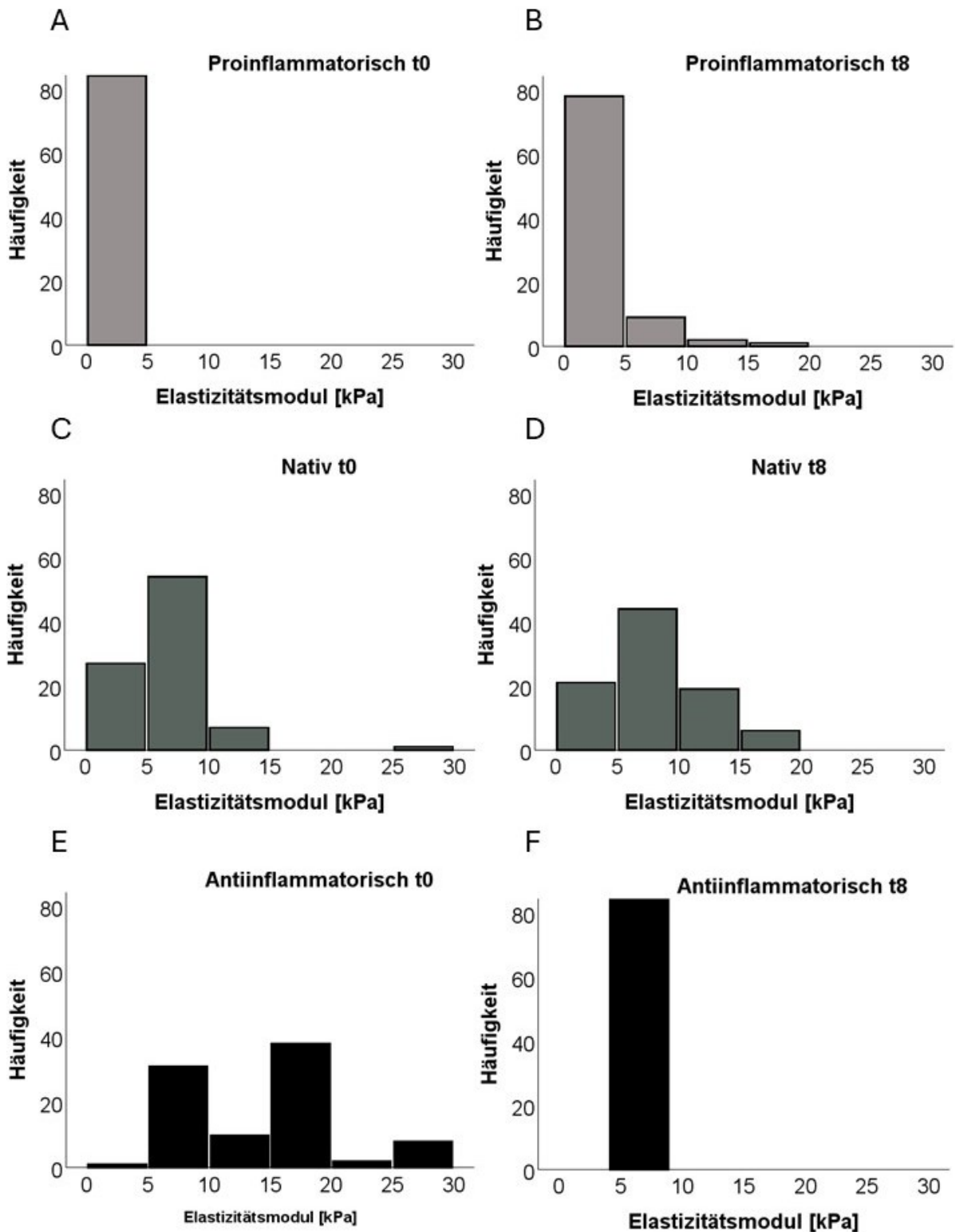
	Pro t0 [kPa]	Pro t8 [kPa]	Nativ t0 [kPa]	Nativ t8 [kPa]	Anti t0 [kPa]	Anti t8 [kPa]
<b>N</b>	90	90	90	90	90	90
<b>Median</b>	0,47	1,89	7,02	6,97	15,50	4,82
<b>Spann- weite</b>	1,45	14,95	26,65	17,94	25,10	3,24
<b>Minimum</b>	0,14	0,53	2,36	1,00	3,93	4,10
<b>Maximum</b>	1,58	15,38	29,00	18,94	29,03	7,35
<b>Perzentile</b>						
25.	0,42	0,64	4,41	5,19	8,66	4,58
50.	0,47	1,89	7,02	6,97	15,50	4,82
75.	0,85	2,62	8,45	10,50	18,27	5,06
<b>IQR</b>	0,43	1,98	4,04	5,31	9,39	0,48

**B**

Messarm Vergleich	P-Wert
Pro t0 – Nativ t0	$\leq 0,001^M$
Anti t0 – Nativ t0	$\leq 0,001^M$
Pro t8 – Nativ t8	$\leq 0,001^M$
Anti t8 – Nativ t8	$\leq 0,001^M$
Pro t0 – Pro t8	$\leq 0,001^W$
Nativ t0 – Nativ t8	0,139 <sup>W</sup>
Anti t0 – Anti t8	$\leq 0,001^W$

**Tabelle 7:** In Tabelle A sind Messwerte der Explantate unter nativen, pro- und antiinflammatorischen Messungen, jeweils vor Inkubation (t0) und nach Inkubation (t8) aufgeführt. Es zeigt sich ein heterogener Verlauf der Messwerte in den jeweiligen Messarmen. Antiinflammatorisch wurde eine Abnahme des Medians beobachtet. Proinflammatorisch zeigte sich ein gegensätzlicher Verlauf. Der Median des nativen Messarmes blieb stabil. Insgesamt können die Ergebnisse der ersten Messreihe hier nicht bestätigt werden. In Tabelle B sind die p-Werte der zugehörigen Hypothesentests aufgelistet. Hierbei wurden die p-Werte aus horizontaler Testung mittels Mann-Whitney-U-Tests mit „M“ indiziert, mit dem Index „W“ wurden die Wilcoxon-Tests der vertikalen Testung gekennzeichnet. In den grauen Zellen sind die Vergleiche der gewichteten Werte aufgeführt.

Verglichen mit der ersten Messreihe zeigten die gemessenen Werte der zweiten Messreihe deutliche Unterschiede. So nahm der Median der proinflammatorischen Messreihe von 0,47 kPa auf 1,89 kPa zu. Auch das mediane Elastizitätsmodul des nativen Messarms blieb sich im Laufe der Inkubation nahezu unverändert. Ein deutlicher Abfall der Knorpelsteifigkeit zeigte sich hingegen in den Medianen des antiinflammatorischen Armes mit 15,50 kPa in t0 und 4,82 kPa in t8. Die IQRs der proinflammatorischen und nativen Arme nahmen leicht zu, der IQR des antiinflammatorischen Armes reduzierte sich von 9,39 kPa auf 0,48 kPa deutlich. Insgesamt wiesen die Interquartilenabstände der zweiten Messreihe eine deutlich geringere Breite als die der ersten Messreihe auf. (Tabelle 7)



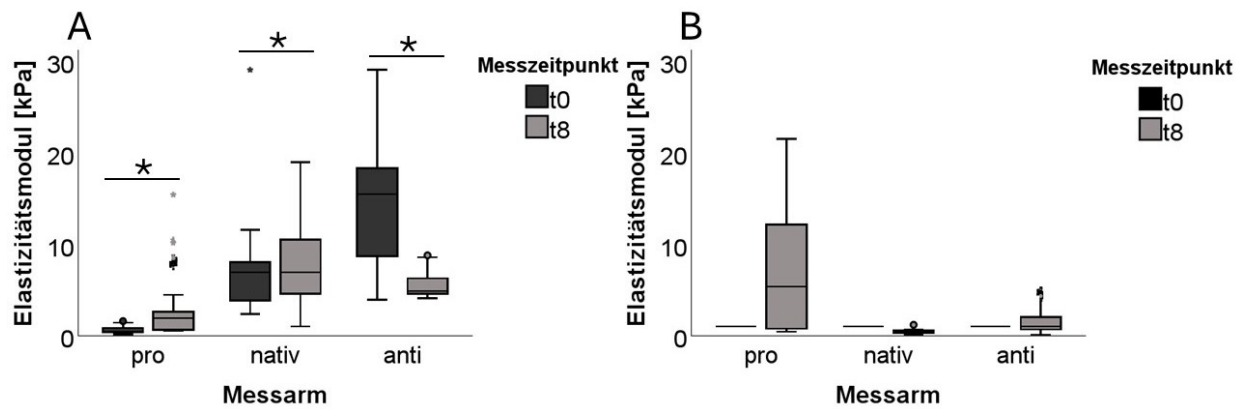
**Abbildung 32:** Histogramme der zweiten Messreihe an Explantaten. Es wurden jeweils Histogramme für Daten vor Inkubation ( $t_0$ ) und nach Inkubation ( $t_8$ ) erstellt. Histogramme wurden gemäß des Versuchsaufbaus in proinflammatorisch (hellgrau), nativ (grau) und antiinflammatorisch (schwarz) unterteilt. Die Histogramme der einzelnen Messarme sind mit A-F gekennzeichnet.

Hinsichtlich der Normalverteilung der Daten ergab sich in der zweiten Messreihe eine im wesentlichen linksschiefe Verteilung (Abbildung 33). Daher wurde auch für die zweite Messreihe die weitere statistische Analyse mit nicht-parametrischen Testverfahren durchgeführt.

#### **4.5.2 Hypothesentests der zweiten Messreihe**

Bereits zum Zeitpunkt  $t_0$  fanden sich in der horizontalen Testung mittels Mann-Whitney-U signifikante Unterschiede zwischen den proinflammatorischen und nativen bzw. dem antiinflammatorischen und nativen Messarmen (*jeweils  $p \leq 0,001$  ungewichtet*). Daher erfolgte eine mathematische Angleichung der sämtlicher Meßwerte unter Referenzierung auf  $t_0$ . Aber auch nach Gewichtung der  $t_8$ -Werte ergaben sich signifikante Unterschiede der verschiedenen Messarme untereinander (*jeweils  $p \leq 0,001$  gewichtet*).

Die Wilcoxon-Tests zeigten zudem eine signifikante Reduktion der Knorpelsteifigkeit des antiinflammatorischen Armes ( $p \leq 0,001$ ), sowie eine signifikante Erhöhung der Steifigkeit des proinflammatorischen Armes ( $p \leq 0,001$ ). Der native Messarm zeigte keine signifikante Änderung des Elastizitätsmoduls ( $p = 0,139$ ). (Tabelle 7)



**Abbildung 33:** Gruppierete Boxplots der zweiten Messreihe mit ungewichteten (A) und gewichteten (B) Werten. Signifikante Unterschiede sind mit einem Stern markiert. Erkennbar ist eine Abnahme des Medians der antiinflammatorischen und nativen Messarme im Rahmen der Inkubation. Proinflammatorisch zeigt sich eine Zunahme des Elastizitätsmoduls. Analog zur ersten Messreihe sind auch in der zweiten Messreihe die massiven Streuungsunterschiede der antiinflammatorischen Messungen zu erkennen. Die jeweiligen p-Werte sind Tabelle 7B zu entnehmen.

Die Messwerte der zweiten Messreihe verhalten sich in den pro- und antiinflammatorischen Messarmen jeweils gegensätzlich zu den analogen Werten der ersten Messreihe. Eine breite Streuung der Messwerte konnte auch für die zweite Messreihe beobachtet werden, mit einer deutlichen Zunahme der Streuung innerhalb der Inkubation des antiinflammatorischen Arms. Diese Zunahme steht im starken Kontrast zu den gemessenen Werten der ersten Messreihe (Tabelle 7, Abbildung 34).

Zusammenfassend ergibt sich ein unschlüssiges Bild aus den Messwerten der beiden Messreihen. Die in der ersten Messreihe beobachteten Verläufe konnten im erweiterten Rahmen der zweiten Messreihe nur sehr begrenzt reproduziert werden.

## 5 Diskussion

### 5.1 Überblick

Arthrose ist in der heutigen Gesellschaft eine Volkskrankheit und zählt zu den häufigsten Krankheitsbildern der Orthopädie und Unfallchirurgie. Chronische Schmerzen und Funktionseinschränkungen des betroffenen Gelenks führen zu einer teils deutlichen Reduktion der Lebensqualität betroffener Patienten. Im Zentrum der Arthrose steht hierbei der Verschleiß von Gelenkknorpel, welcher gemäß aktueller Literatur durch eine Vielzahl genetischer, metabolischer und biomechanischer Einflüsse entsteht [21].

Der genaue zelluläre Pathomechanismus ist aktuell noch ungeklärt, dennoch werden entzündlichen Prozessen, die von Chondrozyten als Antwort auf äußere Einflüsse induziert werden, eine tragende Rolle in der Krankheitsprogression zugeschrieben. Durch Schädigung des Gelenkknorpels auf molekularer Ebene kommt es zu einem Abbau struktureller Knorpel­elemente wie der PCM und ECM der Chondrozyten. Im Zuge dessen werden proinflammatorische Zytokine produziert, die den Knorpelabbau weiter vorantreiben. Durch den so entstehenden Abbau des Gelenkknorpels können wichtige biomechanische Funktionen des Knorpels wie Abschwächung von Stoßbewegungen und Reibungsminderung bei Bewegung nicht mehr bzw. nur noch eingeschränkt erfüllt werden. [31, 32, 39, 46].

Diagnostisch stehen die Patientengeschichte, klinische Untersuchung, sowie bildgebende Methoden wie Röntgenuntersuchungen bzw. Magnetresonanztomographien im Vordergrund. Es stehen eine Vielzahl verschiedener Behandlungsstrategien für Arthrose zur Verfügung, die von Lebensstiländerungen über medikamentöse Schmerzlinderung bis hin zum operativen Gelenkersatz reichen. Bei keiner dieser Therapieoptionen handelt es sich jedoch um einen kausalen Therapieansatz. [11]

Aufgrund der stark limitierten Regenerationsfähigkeit des Gelenkknorpels, sowie den bisher noch limitierten Therapiemöglichkeiten sind weitere Kenntnisgewinne vonnöten, um den zugrundeliegenden Pathomechanismus von Arthrose genauer zu

verstehen. Mit einem genaueren Verständnis der verantwortlichen Prozesse lassen sich so ggf. diagnostische Methoden entwickeln, um Arthrose bereits in den Frühstadien zu entdecken und somit den noch intakten Knorpel effektiv zu schützen.

## **5.2 Ziele und Fragestellung**

Da die PZM im Rahmen von Arthrose entzündlichen Prozessen ausgesetzt ist, war das vorrangige Ziel dieser Arbeit, eine Methode zu etablieren, mit der der Einfluss der Entzündung auf die biomechanischen Eigenschaften der PZM am lebenden Knorpelgewebe beleuchtet werden kann.

Im Zuge des angestrebten in-vivo Modells ergaben sich hinsichtlich der Durchführung und Resultate zwei Fragestellungen.

Zunächst sollte etabliert werden, welche Art der Probenaufbereitung von Kniegelenkknorpel sich am ehesten für eine mehrtägige Inkubation mit entzündungsmodulierenden Substanzen sowie anschließenden AFM-Messungen eignet. Um eine ausreichende Exposition der vitalen Chondrozyten mit pro- bzw. antiinflammatorischen Stoffen zu gewährleisten, musste zunächst eine Verarbeitungsmethode von Knorpelgewebe etabliert werden, die eine stabile Inkubation über mehrere Tage ermöglicht.

Anschließend sollte evaluiert werden, inwiefern die Entzündungsmodulation die Elastizität der PZM im inkubierten Knorpelgewebe beeinflusst. Im Zuge von Arthrose verringert sich die Steifigkeit des betroffenen Gelenkknorpels [2, 54]- Es liegt folglich die Hypothese nahe, dass die Zugabe entzündungshemmender Stoffe zu einem Erhalt der Elastizität des jeweiligen Knorpelgewebes führt.

### 5.3 Patientenkohorte

Mit einer analysierten Patientenkohorte von  $n=40$  Patienten weist diese Arbeit ein ähnlich großes Patientenkollektiv zu vergleichbaren Einzelarbeiten auf, wobei die analysierten Kohorten meistens zwischen 30-60 Patienten umfassten [32, 54, 56]. In dieser Arbeit stellten weibliche Patienten die Mehrheit der untersuchten Proben, was sich mit der Geschlechterverteilung der Arthrose in aktuellen Übersichtsarbeiten zu diesem Thema deckt (Abbildung 27). Frauen weisen eine nahezu doppelt so hohe Inzidenz von Kniegelenksarthrose über sämtliche Altersabschnitte vor als Männer, wobei die Auftretswahrscheinlichkeit der Erkrankung mit Überschreiten des 60. Lebensjahres deutlich zunimmt [9, 11]. Die hier untersuchten Proben stammen von 50-jährigen bis 88-jährigen Patienten, mit einem medianen Patientenalter von ca. 70 Jahren. Dementsprechend bilden die hier untersuchten Proben sowohl in Alter wie auch in Geschlechtsverteilung das übliche Patientenkollektiv der Kniegelenksarthrose ab.

Patienten, die für die rasterkraftmikroskopische Untersuchung des Gelenkknorpels in Frage kamen, befanden sich nicht im Anfangsstadium der Erkrankung. Das Einsetzen einer künstlichen Totalendoprothese unter Entfernung des arthrotischen Knorpels mitsamt dem unterliegenden Knochen ist für viele Patienten das Ende der Therapieleiter der Kniegelenksarthrose. Das Patientenalter bei Operation sollte daher nicht mit dem Patientenalter bei erstmaliger Diagnose gleichgesetzt werden. Somit ergeben sich dementsprechend Diskrepanzen zu gängigen epidemiologischen Ausführungen aktueller Literatur, die sich meistens auf Häufigkeitswerte ungeachtet therapeutischer Interventionen beschränkt. Hawker und Kollegen beschrieben, dass nahezu doppelt so viele Frauen als Männer potenziell für eine Knieendoprothese in Frage kommen, diese allerdings bei Frauen dennoch seltener durchgeführt werde [57]. Mit Hinblick auf die deutlich höhere Prävalenz von Arthrose bei Frauen ergibt sich somit ein potenziell noch größerer Unterschied zwischen Frauen und Männern hinsichtlich der Durchführung von operativen Eingriffen im Rahmen von Arthrose. Die in dieser Arbeit gesammelten Patientenproben sind hinsichtlich Alters- und Geschlechterverteilung mit aktueller Literatur vereinbar. Oben genannte Beobachtungen hinsichtlich therapeutischer Interventionen sollten aber in die Bewertung der Gesamtheit der aufgeführten Patientendaten einfließen.

## 5.4 Baselinemessungen

In vergleichbaren Studien wurde der entnommene Knorpel auf unterschiedliche Weise verarbeitet. Gängige Verarbeitungsformen sind hierbei Kryotomschnitte und Knorpelstanzungen verschiedener Größe. Auch freie Knorpelstücke wurden im Rahmen von AFM-Messungen angefertigt. [54, 56, 58, 59]

Aufgrund dieser verschiedenen Verarbeitungstechniken wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Baseline etabliert, in denen Knorpeldiscs aus Stanzungen mit Kryotomschnitten hinsichtlich ihrer Biomechanik verglichen wurden. Von beiden Probenarten eigneten sich lediglich Discs aufgrund der verwendeten Verarbeitungstechnik für in-vivo Messungen. Daher sollte der Vergleich zwischen Kryotomschnitten und Knorpeldiscs Aufschluss darüber geben, ob zwischen den Probenarten signifikante Unterschiede der Biomechanik bestehen. So sollten die für die AFM-Messungen vorgesehenen Knorpeldiscs AFM-Messungen anderer Verarbeitungstechniken in aktueller Literatur vergleichbar gemacht werden.

Sowohl Kryotomschnitte wie auch Knorpeldiscs weisen durch ihre jeweiligen Verarbeitungsschritte eine standardisierte Dicke auf. Durch die Stanzung des Knorpelgewebes mit normierten Biopsiestanzen konnten für Knorpeldiscs zudem eine einheitliche, kreisrunde Form, sowie ein standardisierter Durchmesser von 4mm erreicht werden. Die homogenen Dimensionen der Discs erlaubten eine Einteilung in verschiedene Messbereiche innerhalb einer Probe.

Im Rahmen der Baseline-Messungen zeigte sich eine Reduktion des medianen YMs über die zweitägige Inkubation der Knorpeldiscs. Im Vergleich mit den Discs wiesen die gemessenen Kryotomschnitte einen leicht geringeren medianen YM auf. Aufgrund der niedrigen Fallzahl konnte allerdings keine Aussage bzgl. der statistischen Signifikanz der Ergebnisse getroffen werden.

Sowohl Kryotomschnitte wie auch Knorpeldiscs fielen durch niedrigere mediane Elastizitätsmodule auf als Kryotomschnitte vergleichbarer Arbeiten. So zeigten Messungen von Danalache et al. ein medianes Elastizitätsmodul der PZM an Kryotomschnitten von 65 kPa für Single Strings mit Maximalwerten von über 200 kPa [54]. In anderen Messungen betrug der Median an Single Strings lediglich 38 kPa, was

jedoch ebenfalls ein Mehrfaches der in dieser Arbeit gemessenen Mediane von Discs und Kryotomschnitten darstellt [32].

In AFM-Messungen der PZM in arthrotischem Kniegelenksknorpel beobachteten Wilusz et. al, dass das Elastizitätsmodul der PZM vom Abstand der Messung zum umrahmten Chondrozyt abhängt. Im Zuge der Messungen nahm die gemessene Steifigkeit der PZM ab, je näher an der Chondrozytenwand gemessen wurde. So führten Abstandsunterschiede von einigen Mikrometern zu einer Multiplikation des Elastizitätsmoduls in gesundem Knorpel. Für arthrotischen Knorpel verdoppelte sich das Elastizitätsmodul durch eine Erhöhung des Messradius zur Knorpelzelle um 6 Mikrometer. In der gleichen Studie fanden sich zudem Unterschiede der Elastizitätsmoduli im Hinblick auf die Lokalisation der entnommenen Probe im Kniegelenk. So zeigten Proben, die aus der lateralen Femurkondyle entnommen wurden hinsichtlich Proben aus medialen Kondylen signifikante Unterschiede in ihren jeweiligen Elastizitätsmodulen. [21]

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Wahl von makro- und mikroskopischen Messorten einen großen Einfluss auf die Steifigkeit gemessener PZMs haben kann. Und dass lokale PZM innerhalb des Gelenkknorpels teils stark unterschiedliche biomechanische Eigenschaften vorweisen kann, indem die PZM von umliegendem Gewebe maßgeblich beeinflusst wird.

Argote et al. konnten in ihrer Studie zur Chondrozytenvitalität unter mechanischer Belastung zeigen, dass die Vitalität der Knorpelzellen, wie auch die Steifigkeit des umliegenden extrazellulären Gewebes vor allem bei abrupter mechanischer Kompression verloren geht. So zeigte Knorpelgewebe, das innerhalb einer Sekunde über 80% seiner Dicke komprimiert wurde, eine 22%ige Reduktion der Knorpelvitalität im Vergleich zu Gewebe, das langsamer komprimiert wurde. Neben dem Vitalitätsverlust wurde zudem eine Reduktion des Elastizitätsmoduls von schnell geschädigtem Knorpel beobachtet. [60]

Im Zusammenhang mit mechanischer Belastung diskutierten de Vries und Kollegen in ihrer Arbeit eine Grenze an mechanischem Schutz, den die PZM für die umrahmten Chondrozyten leisten kann. Sobald diese Schwelle durch zu große und schlagartige Belastung überschritten werde, gebe die PZM die mechanische Belastung an die Zelle selbst weiter und führe zu deren Untergang. [61]

Die obigen Ausführungen erlauben die Vermutung, dass im Rahmen der verwendeten Verarbeitungstechniken von Knorpeldiscs und Explantaten eine rapide mechanische Belastung entstand, die zum Untergang der anfänglich vitalen Chondrozyten führte. Die hierbei beobachteten Absterbemuster in Abbildungen 28 und 30 stützen diese These.

Es ist anzunehmen, dass der Zelluntergangs in Nähe der Biopsie- bzw. Schnittränder der untersuchten Probe zu einer Reduktion des YM führte und liefert somit einen möglichen Erklärungsansatz für die niedrigen Messwerte der Baselinemessungen. Vermutlich ist hier eine deutlich genauere Eingrenzung der Messpunkte vonnöten, um Messvariationen der PZM-Moduli zu verhindern. Es bleibt zudem Raum für weiterführende Untersuchungen hinsichtlich der Zellvitalität und der Rolle der PZM bei massiver mechanischer Belastung.

## **5.5 Überlebensversuche**

Im Rahmen der Inkubationsversuche dieser Arbeit sollte ein Modell zur verlässlichen Inkubation von Knorpeldiscs etabliert werden. Orientierend an vergleichbaren Einzelarbeiten sollten die Knorpeldiscs für 7-10 Tage in Kultur gehalten werden [60, 61]. Hierfür wurde zunächst DMEM als in der Literatur etabliertes Nährmedium für somatische Zellen verwendet. Es enthält Glucose als Energiequelle der Zellen, sowie eine geeignete Osmolarität und einen stabilen pH-Wert, der eine Lebensfähigkeit der Zellen zulässt. Um Kontamination der Proben zu vermeiden hat sich zudem die Zugabe von Penicillin-Streptomycin und Amphotericin B als Standard in vergleichbarer Literatur etabliert, wenngleich dadurch auch die Vitalität des inkubierten Gewebes beeinflusst werden kann. [62]

Für die Knorpeldiscs, die in dieser Arbeit inkubiert wurden, ließen sich in DMEM keine stabilen Überlebensraten erzielen. Als Hypothese der geringen Überlebensrate konnte hier die Arbeit von Rotter und Kollegen zugrunde gelegt werden. In dieser stellen die Autoren eine unzureichende Glukoseversorgung der Chondrozyten im Rahmen von Arthrose als Grund für verringerte EZM-Synthese, sowie Überexpression proinflammatorischer Gene und Moleküle dar. Unter Stimulation von Chondrozyten mit IL-1 konnte durch die Autoren nachgewiesen, dass eine hohe Glucosekonzentration im Nährmedium die Expression des proinflammatorischen

Rezeptors TLR-4 signifikant reduziert. Des Weiteren sezernierten Chondrozyten, die in hochkonzentriertem Glucosemedium inkubiert wurden vermehrt Hyaluronan, ein integraler Bestandteil für die Aufrechterhaltung der EZM. Dementsprechend kann davon ausgegangen werden, dass eine erhöhte Glucosekonzentration im Nährmedium von Chondrozyten antiinflammatorische Prozesse vorantreibt. Zudem wird unter erhöhter Glukosezufuhr die Produktion und der Erhalt der EZM gestärkt. [63]

Mit Bezug auf o.g. Studienlage wurde eine zweite Inkubationsreihe mit erhöhter Glucosekonzentration in Glutamax-Nährmedium gestartet. Es konnte allerdings auch mit diesem Nährmedium keine stabilere Überlebensrate erzielt werden. Die diesbezügliche Literatur geht mit großer Übereinstimmung von einer erhöhten Sterberate von Chondrozyten, sei es apoptotisch oder nekrotisch, unter mechanischem Trauma aus [60]. Zudem ist mechanisches Trauma ein Treiber für die Progression von Arthrose, die wiederum mit dem Absterben von Chondrozyten assoziiert ist [17].

Um die mechanische Belastung der Chondrozyten zu reduzieren, wurde eine dritte Probenart für Messungen hergestellt. Knorpelimplantate sind verglichen zu Kryotomschnitten und Discs relativ unbelassen und zeigten in Inkubation ein deutlich stabileres Überlebensprofil. So konnten Chondrozyten neun Tage in Inkubation gehalten werden. Außerdem lässt diese Art der Knorpelverarbeitung AFM-Messungen an lebenden Chondrozyten bzw. vitalem Knorpelgewebe zu.

Neben dem direkten mechanischen Schaden, der während der Präparation zur Apoptose von Chondrozyten führt, spielt die geschädigte EZM ebenfalls eine wichtige Rolle beim Zelluntergang, zumal extrazelluläre Bestandteile des Knorpels maßgeblich am Stoffwechsel der Chondrozyten beteiligt sind. [14, 19 Im Rahmen der Präparation werden durch Schädigung der EZM Integrinbindungen zwischen Chondrozyten und EZM zerstört [Tew, 2000 #123]. Diese Bindungsstellen von Integrin an Chondrozyten sind laut Hirsch et al. wiederum mitverantwortlich für Differenzierung und Überleben der Knorpelzelle. So zeigten sich durch Blockade der Integrinrezeptoren der Chondrozyten via Antikörpern die jeweiligen Chondrozyten deutlich höhere Apoptoseraten und eine verminderte Zellgröße [64]. Laut Goldring und Kollegen werden die nun unbesetzten Integrinrezeptoren der Chondrozyten von anderen EZM-Bestandteilen, wie Fibronectin oder Kollagenfragmenten besetzt und lösen dadurch eine Entzündungskaskade aus [49].

Neben dem direkten mechanischen Trauma das die Chondrozyten selbst zerstört, spielt die Zerstörung der EZM und den dadurch losgetretenen Entzündungskaskaden bei der Präparation des Knorpels möglicherweise ebenfalls eine tragende Rolle für den Zelluntergang. Von diversen Autoren wird die Präparation mit minimalem mechanischen Trauma empfohlen, da die Apoptose des Knorpelgewebes mit der Traumastärke und dem damit verbundenen EZM-Schaden korreliert [65]. In dieser Arbeit wurde daher die Präparation mit feinen Biopsiestanzen und Skalpell durchgeführt.

Die o.g. Ergebnisse unterstreichen die Herausforderung durch die Etablierung eines zuverlässigen Inkubationsmodells. Trotz Verwendung von etablierten Nährmedien konnten Anfangs keine stabilen Überlebensraten erzielt werden. Die Stabilität der Knorpelimplantate in Inkubation ist jedoch vielversprechend und eröffnet neue Forschungsmöglichkeiten zu Inkubationstechniken von Knorpelimplantaten, die wiederum für komplexere, AFM-basierte Fragestellungen verwendet werden können.

## **5.6 AFM-Messreihen**

Im Rahmen der ersten Messreihe sollte eine Erhebung von Ausgangsdaten erfolgen, um die Basis für die Schätzung einer Stichprobengröße der Endmessungen zu erhalten. Aufgrund ihrer geringen Fallzahl ließ die erste Messreihe allerdings keine statistisch relevanten Aussagen zu. Daher wurde sie als Grundlage für eine Fallzahlberechnung der zweiten Messreihe verwendet.

Auffallend sind die gemessenen Absolutwerte der AFM-Messungen, die im Vergleich zu bestehender Literatur deutlich geringer sind. So wurden YM-Werte von bis zu 500 kPa in Kryotomschnitten des Kniegelenkknorpels gemessen [21, 58]. In Messungen an Knorpeldiscs konnten von Danalache und Kollegen YM-Durchschnittswerte von 7kPa für Big Cluster bis zu 50kPa für Strings nachgewiesen werden, welche somit deutlich geringer als die Messwerte an Kryotomschnitten ausfallen [54]. Die Unterschiede der Messwerte implizieren einen starken Einfluss der Probendicke und Meßtechnik auf das YM, wobei das YM mit steigender Probendicke abnimmt. Dementsprechend lassen sich die in dieser Arbeit gemessenen Werte möglicherweise

mit der Probendicke der Knorpelimplantate erklären. Sowohl die niedrigen Minima, wie auch die breite Streuung der Werte decken sich mit bestehender Literatur [54, 66].

Im proinflammatorischen Messarm der zweiten Messreihe zeigte sich eine signifikante Zunahme des YMs im Rahmen der Inkubation. Die Rolle von IL-1 als Katalysator für entzündliche Prozesse des Gelenkknorpels, sowie dessen Einfluss auf fortschreitende Arthrose ist bereits breit untersucht und belegt [37, 42]. Dennoch ist die Entwicklung des YM von Chondrozyten unter Arthrose noch nicht abschließend geklärt und wird in aktueller Forschung diskutiert. Sowohl Steigerung, wie auch Reduktion der Chondrozytensteifigkeit werden beschrieben [67, 68].

Hinsichtlich der PZM-Biomechanik unter Arthrose findet sich in der aktuellen Literatur jedoch ein klarer Trend: Eine Reduktion des YMs durch eine erhöhte Entzündungsaktivität und den Abbau von Kollagenstrukturen ist weitreichend untersucht und belegt [18, 32, 47, 54]. Obwohl die Studienlage klare Schlussfolgerungen bzgl. einer YM-Reduktion zulässt, präsentieren einzelne Arbeiten abweichende Perspektiven. In seiner Übersichtsarbeit beschreibt Zhang die gesteigerte Expression von Typ VI Kollagen von Chondrozyten bei Arthrose [14]. Als wichtiger Bestandteil der PZM erhöht Kollagen Typ VI das Elastizitätsmodul eben dieser [16]. Folglich ist eine Steigerung des Elastizitätsmoduls im Rahmen einer gesteigerten Produktion von Kollagen Typ VI denkbar. Fredrikson und Kollegen zeigten in ihrer Arbeit, dass isolierte Chondrozyten, die aus arthrotischen Gelenken gewonnen wurden in der Lage sind, eine eigene PZM nachzubilden [69]. Diese Neubildung ist mit einer Steigerung des Elastizitätsmoduls verbunden. Zwar liefern die Autoren somit eine plausible Erklärung für den potenziellen Anstieg der Knorpelsteifigkeit unter Arthrose, allerdings wurden diese Erkenntnisse an isolierten Zellen unter speziellen Inkubationsbedingungen erzielt. Hier sind weitere in-vivo bzw. in-situ Untersuchungen nötig, um die Rolle dieser PZM-Produktion für ganzheitliches Knorpelgewebe zu erörtern. In einer vergleichbaren Einzelarbeit von Ng et al. kam es bei inkubierten Chondrozyten ebenfalls zu einer Erhöhung des Elastizitätsmodulus der PZM [70]. Hierbei wurde in den gemessenen PZMs unter Applikation von Interleukin-1 signifikant erhöhte Elastizitätsmodule gemessen. Erklärt wurde dies durch eine rapide ansteigende Konzentration von Glykosaminoglykanen und Kollagenen, vor allem innerhalb der ersten 14 Tage der Inkubation. Lekka und Kollegen führten eine

Steigerung des YM auf methodenbedingte Messvariationen zurück [71]. Diese Variationen werden auch von anderen Autoren aufgegriffen. Durch die breiten Einsatzmöglichkeiten des AFMs finden sich zahlreiche Modulationen von Messtechniken, die teils signifikant unterschiedliche YM produzieren, zumal sich noch kein einheitliches AFM-Protokoll etabliert hat. In ihrer Übersichtsarbeit zeigten Arnold et al., dass sich gemessene YM-Werte je nach verwendeter Microsphere um bis zu 1,5 MPa voneinander unterscheiden [72]. Zudem zeigen sich signifikante Unterschiede in den gemessenen YM unterschiedlicher Bestandteile hyalinen Knorpels. So zeigen sich Unterschiede in YM von EZM und PZM [2], wie auch Unterschiede einzelner Bereiche innerhalb einer PZM [21]. Aufgrund der vielen Variablen, die eine AFM-Messung beeinflussen können, wurde für diese Arbeit auf ein erprobtes Protokoll zur PZM-Messung mittels einer 25µm-Microsphere zurückgegriffen [32, 54]. Chen und Kollegen konnten in ihren Untersuchungen am Tiermodell nachweisen, dass Chondrozyten unter Zusatz von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  eine erhöhte Steifigkeit aufweisen [67]. Die Einflüsse der Mechanotransduktion von PZM auf Chondrozyt sind gut belegt. Jedoch besteht eine interessante Möglichkeit für weiterführende Forschung mit Hinblick auf den PZM-Stoffwechselhaushalt bei erhöhter Chondrozytensteifigkeit. Lee et al. zeigten, dass Chondrozyten keine einheitliche Reaktion auf einen proinflammatorischen Reiz entwickeln [73]. Insbesondere bei Chondrozyten unter langfristiger Applikation von Interleukin, nimmt das Ansprechen der Zellen auf diesen proinflammatorischen Reiz sukzessive ab. Im Rahmen der hiesigen Inkubation mit Gabe von IL-1 $\beta$  wäre eine verlangsamte Degeneration möglich. Zwar würde dies die Zunahme des proinflammatorischen YM im während der Inkubation nicht erklären, als Einzelkomponente eines multifaktoriellen Geschehens ist dieser Einfluss jedoch denkbar.

Im nativen Messarm zeigte sich eine stabile Knorpel­elastizität ohne signifikante Änderungen des YMs. Somit konnte die zweite Messreihe die vorher erhobenen Messungen der ersten Messreihe nicht bestätigen. Analog zu den Baselinemessungen wurde hier von einem Gewebetrauma während der Probenverarbeitung ausgegangen, das den Degenerationsprozess des Knorpels vorantreibt und in Kapitel 6.4 diskutiert wird. Vergleichbare Arbeiten, die

Knorpelgewebe inkubierten, konnten eine Reduktion des YMs nachweisen. Baumann et. al. zeigten eine Reduktion des YMs unter Inkubation und Gabe von MMPs [74]. Dementsprechend wurde auch im Rahmen der Inkubation der zweiten Messreihe von einem reduzierten YM ausgegangen. Da die Studienlage zu AFM-Messungen an inkubiertem Knorpelgewebe dünn ist, sind Erklärungsansätze für den konstanten YM des nativen Armes allenfalls spekulativ. Hier sind weiterführende Arbeiten vonnöten, die die Biomechanik von arthrotischen Knorpelimplantaten unter Inkubationsbedingungen weiter beleuchten.

Auch der antiinflammatorische Arm der zweiten Messreihe zeigte einen Wertverlauf, der sowohl zur ersten Messreihe wie auch zu vergleichbarer Literatur gegenläufig ist. Durch den protektiven Effekt von Adalimumab wurde eine verminderte Knorpeldegeneration bei erhaltenem oder gesteigertem YM der PZM angenommen. Stattdessen reduzierte sich der YM signifikant und stärker als in den nativen und proinflammatorischen Messarmen. Chisari und Kollegen diskutieren in deren Übersichtsarbeit den Einfluss von Adalimumab auf inkubierte Zellen [75]. Dort wird ein breites Spektrum an möglichen Einflüssen von antiinflammatorischer Entzündungsmodulation auf Chondrozyten beschrieben. Zwar wurde in den analysierten Studien ein protektiver Effekt von Adalimumab auf Knorpel berichtet, es fanden sich jedoch auch Hinweise für einen nachteiligen Effekt einer Applikation von Chondrozyten mit Adalimumab. Insbesondere bei hohen Konzentrationen des TNF-Blockers zeigten sich in mehreren Studien Verminderungen von Zellvitalität- und -proliferation. Diese Effekte wurden von Isyar und Kollegen auch für Infliximab und Etanercept nachgewiesen [76]. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung einer sorgfältigen Auswahl der antiinflammatorischen Substanz und Darreichungsform, die Zellen bzw. Gewebe zugesetzt wird. Allerdings wurden diese Effekte innerhalb einer direkten in-vitro Exposition von hohen Dosen der o.g. TNF-Blocker erzielt. Dementsprechend sollten diese Art von in-vitro Studien kritisch hinsichtlich ihrer Relevanz und Limitationen für mögliche klinische Applikationen begutachtet werden.

Obwohl die aktuelle Literatur klare Tendenzen hinsichtlich der PZM-Biomechanik unter Arthrose aufzeigt, gestaltet sich das Gesamtbild in Anbetracht der in dieser und ähnlichen Einzelarbeiten erzielten Ergebnisse als komplex und nuanciert. Der

proinflammatorische Messarm der zweiten Messreihe steht in starkem Kontrast zu den Ergebnisse der ersten Messreihe. Hierbei weichen die Messungen nicht nur voneinander ab, sondern zeigen sich jeweils gegenläufig zueinander. Durch diese unerwartete und markante Umkehrung der ursprünglichen Ergebnisse werden Fragen aufgeworfen, die eingehende Analyse erfordern. Es finden sich in der Literatur Belege für gesteigerte und verminderte YM von inkubiertem arthrotischem Knorpel. Zudem konzentrieren sich viele vergleichbare Arbeiten auf die AFM-Messungen von anderen Strukturen des Gelenkkorpels in verschiedenen Arthrosestadien in Rahmen von sehr kurzfristigen Inkubationszeiten oder beschränken sich auf punktuelle Messungen ohne inkubierte Proben. Dennoch unterscheiden sich die in dieser Arbeit die in dieser Arbeit erzielten Messergebnisse von gängiger Literatur derart stark, dass weitere Erklärungsansätze mit Hinblick auf Methodenfehler in Betracht gezogen werden müssen. Hier wird noch einmal auf die unten folgenden Limitationen verwiesen.

## **5.7 Limitationen**

Im Streben nach einem genaueren Verständnis der Biomechanik arthrotischen Knorpels wurde diese Forschungsarbeit von einer umfassenden Untersuchung der Elastizitätsmoduli der PZMs geleitet. Hierbei ist es unerlässlich, die Grenzen des durchgeführten Forschungsvorhabens anzuerkennen und zu skizzieren, inwieweit diese Limitationen die Ergebnisse der hier vorliegenden Studie haben beeinträchtigen können.

Wie bereits beschrieben, besitzen Chondrozyten durch ihre Bradytrophie eine stark limitierte Kapazität zur Zellregeneration. Deshalb müssen großflächige und beständige Defekte, wie sie bei Arthrose auftreten, häufig durch Endoprothesen versorgt werden. In vergleichbaren Arbeiten, die mit Rasterkraftmikroskopie arbeiten, haben sich zahlreiche Methoden zur Inkubation etabliert, diese beziehen sich allerdings oftmals auf isolierte Knorpelzellen. [69, 70] Es konnten bereits signifikante Unterschiede der Biomechanik von isolierten Knorpelzellen im Vergleich zu in-vivo Modellen nachgewiesen werden. Da sich diese Arbeit ohnehin auf die biomechanischen Eigenschaften der PZM und ihrer Interaktion mit den umrahmten

Chondrozyten konzentriert, durften die Proben nicht auf ihre rein zellulären Bestandteile reduziert werden.

Zwar ist die Studienlage bzgl. Kultivierung von Knorpelgewebe dünn, dennoch finden sich Arbeiten, die Knorpelimplantate oder vergleichbare Probenarten in Kultur halten. Beekhuizen und Kollegen kultivierten in ihrem Modell Knorpelimplantate für 21 Tage. Hierfür wurde pro Knorpelimplantat 1ml DMEM verwendet, deutlich mehr Nährmedium als in dieser Arbeit verwendet wurde [77]. Zudem wurde dem Knorpel bei Inkubation zusätzliches L-Prolin versetzt, welches eine Vielzahl an überlebensfördernden Wirkungen auf menschliche Zellen hat [78]. Strehl und Kollegen konnten hyalines Knorpelgewebe für 56 Tage in Kultur halten. In dieser Studie wurden die Proben allerdings nach der initialen Präparation in eine Perfusionskultur gegeben, bei der das Gewebe permanent von einem Mediumfluss durchspült wird. Somit werden ein kontinuierlicher Fluss von Nährstoffen gewährleistet und schädliche Metabolite ausgespült. bis auf die initiale Ablösung der Femurkondylen nahezu unbelassen in Kultur gegeben. Zudem wurde lediglich Knorpel von jungen, nichtarthrotischen Gelenken ohne vorherige Knorpelschäden verwendet. Dementsprechend eignen sich diese und ähnliche Methoden nur für diejenigen Fragestellungen, die ohne größere Knorpelmanipulation arbeiten. Eine Alternative zu obenstehenden Inkubationstechniken bieten Fredrikson et al. in ihrer Arbeit. So konnten Chondrozyten, die in 50 µm Alginat-Mikrogel gebettet wurden nach 10 Tagen Inkubation eine neue PCM synthetisieren. Diese ähnelt in ihrem YM den PCM in-vivo [69]. Allerdings ist noch nicht erforscht, ob diese Neubildung von PCM auch auf Chondrozyten arthrotischen Ursprungsknorpels zutrifft. Daher ist weiter Forschung erforderlich, um die Anwendbarkeit dieser Technik für arthrotisches Gewebe zu bewerten. Im Rahmen der proinflammatorischen Inkubation wurden die Knorpelproben täglich mit 10 µg IL-1 versetzt, um eine fortschreitende arthrotische Entwicklung zu induzieren. Hierbei wurde sich bzgl. der Interleukinmengen an aktueller Literatur orientiert. [63, 67] Obwohl diese Maßstäbe von Cytokinkonzentrationen in aktueller Forschung gängig sind, werden sie von einigen Autoren als unphysiologisch kritisiert. So erhöht die Zugabe von Interleukin die Steifigkeit von Kollagenfasern und birgt demnach das Potenzial für Messergebnisse, die gängiger Literatur mit Hinblick auf Knorpeldegeneration bei IL-1 Zusatz widersprechen. In ihrer Übersichtsarbeit sprechen sich Liu und Kollegen stattdessen

für ein breites Profil an zuzusetzenden Zytokinen aus, um eine physiologischere Antwort des Gewebes auf den gesetzten chemischen Reiz zu provozieren [79]. Ein großer Vorteil der IL-1 Gabe besteht jedoch in der einfachen Reproduzierbarkeit, sowie seinem als gesichert geltenden Status als einer der Hauptkatalysatoren für den Fortschritt von Arthrose. Eine genauere Kalibrierung der verwendeten IL-Konzentrationen an das zu untersuchende Gewebe und die Fragestellungen könnten so zu einer realistischeren Darstellung der pathophysiologischen Prozesse führen.

Im Rahmen der Knorpelverarbeitung scheint die initiale Präparation des Knorpels ein Katalysator für eine beschleunigte Apoptose der Chondrozyten zu sein. In bovinem Knorpel zeigten Amin und Kollegen, dass die Ablösung des hyalinen Knorpels von seinem subchondralen Knochen besonders in der Superficialzone innerhalb von 7 Tagen deutlich erhöhte Apoptoseraten nach sich zieht. Wurde der Knorpel auf seinem Knochenstück belassen, konnte dieser apoptotische Effekt deutlich abgeschwächt werden.

Für die Fixierung am Boden der Messschalen hatten die in dieser Arbeit verwendeten Proben eine ungünstige Größe. Durch die vergleichsweise große Fläche und das hohe Gewicht gestaltete sich die zuverlässige Probenfixierung als schwierig. In Bezug auf Amins Arbeit ergibt sich somit eine ungünstige Ausgangssituation für die langfristige Kultivierung des Gelenkknorpels, da der Knorpel für die Fragestellung dieser Arbeit von seiner subchondralen Knochenplatte gelöst werden muss, um die biomechanischen Messungen durchzuführen. Daher bedarf es einer Methode, auch hyalinen Knorpel, der von seinem subchondralen Knochen abgelöst ist, zuverlässig und beständig in Kultur zu halten. Alternativ bieten sich kleinflächige Proben mitsamt des subchondralen Knochen als Untersuchungsobjekt für weiterführende Arbeiten an. Hierbei muss jedoch das Trauma auf den Knorpel so gering wie möglich gehalten werden. Eine Einsatz von Trephinen wäre hier denkbar, allerdings ist der Einsatz dieser mit einer höheren Apoptoserate der Chondrozyten assoziiert [65]. Diesbezüglich sind weitere Studien vonnöten, die sich der verlässlichen Herstellung geeigneter Proben für die langfristige Kultivierung widmen und dabei das mechanische Trauma minimieren.

Ursprünglich war vorgesehen, die Inkubation und AFM-Messungen an Knorpeldiscs durchzuführen. Die Ergebnisse aus Kapitel 5.3 zeigten jedoch nur eine begrenzte Inkubationsfähigkeit dieser Probenart. Daher wurde mit Knorpelimplantaten eine

weitere Verarbeitungsmethodik eingeführt mit dem Ziel, das perioperative Trauma der Chondrozyten zu minimieren. Im Rahmen der Verarbeitung der Knorpelimplantate entstanden aufgrund der freien Schnitttechnik Probenstücke unterschiedlicher Größe und Dicke. Im Vergleich zu Knorpeldiscs, die in ihrer Dicke standardisiert waren, konnten für Implantate keine einheitlichen Dimensionen erzielt werden. Durch die deutlich dickeren Knorpelimplantate ergeben sich hierdurch abweichende Elastizitätswerte von anderen, vergleichbaren Einzelarbeiten. Stolz und Kollegen diskutierten in ihrer Studie am Tiermodell bereits Unterschiede, die zwischen mikro- und makroskopischen Elastizitätsmessungen auftreten können [80].

Desweiteren zeigten die Implantate durch die Variabilität ihrer Dicke auch teils stark variierende Elastizitäten untereinander, die nicht auf Prozesse der Arthrose zurückzuführen sind. So musste aufgrund der variierenden Implantatdicke die Fixierung mittels Gewebekleber individuell bemessen werden. Dies stellt eine zusätzliche Störvariable, die den Vergleich der Implantate miteinander erschwert.

Viele vergleichbare Arbeiten, die sich mit der Biomechanik der PZM beschäftigen wurden an isolierten Chondrozyten durchgeführt. Hierbei ist der Messort für wiederholte Messungen deutlich stärker eingrenzbar als in Messungen an ganzheitlichem Knorpelgewebe. Zwar wurde in Rahmen der Baselinemessungen versucht, eine Einteilung nach Messgebiet durchzuführen, durch die ungenügende Inkubationsfähigkeit der standardisierten Discs konnte dieser Ansatz jedoch nicht in die Endmessungen übertragen werden.

Des Weiteren herrschten für die Knorpelimplantate uneinheitliche Inkubationsbedingungen im Hinblick auf die in dieser Arbeit applizierten Stoffe. Sowohl Nährmedium wie auch pro- und antiinflammatorische Zusätze wurden den Proben jeweils pauschal beigefügt. Durch die unterschiedlichen Dimensionen der Implantate bei konstant applizierten Mengen der o.g. Stoffe ergaben sich folglich individuelle Wirkstoffkonzentrationen auf die Chondrozyten für jede Probe. Hinsichtlich beigefügter Stoffe kann es insbesondere bei Applikation von Adalimumab zu zytotoxischen Effekten auf die Chondrozyten kommen. Dieser Effekt wurde auch für andere TNF-Blocker beschrieben. Zudem diskutieren Wilusz et al., dass es selbst in homogenem, gesundem Knorpelgewebe zu lokalen Konzentrationsunterschieden kommt, die aufgrund der Sensitivität der AFM-Messungen zu Messverzerrungen führen können [16]. Dies impliziert, dass dieser Verzerrungseffekt im Falle eines arthrotischen Knorpels verstärkt wird. Ein weiterer Verzerrungseffekt wurde für

wiederholte Messungen am gleichen Messort beschrieben [71]. Da in dieser Arbeit mit repetitiven Messungen des gleichen Messortes gearbeitet wurde, wurden Mediane der Einzelmessungen gebildet, um dem Störeffekt entgegenzuwirken. Eine gewissen Restverzerrung ist dennoch anzunehmen.

Für die AFM-Messungen wurde ein beklebter Cantilever mit einer Microsphere von 25  $\mu\text{m}$  Durchmesser verwendet. Zwar wird so eine Messung ohne Kontakt zwischen Cantilever und Probe möglich, jedoch geschieht dies nicht ohne Nachteile. Durch die Microsphere wird das Manövrieren und die genaue Positionierung über dem zu messenden Areal erschwert. Demnach ist von Messverzerrungen durch ungenaue Messungen auszugehen.

In aktueller Literatur konnte zudem gezeigt werden, dass der Entnahmeort des Knorpels innerhalb eines Gelenks signifikante Auswirkungen auf die gemessenen Elastizitätswerte hat. So zeigten Wilusz und Kollegen, dass sich das YM von Knorpel der medialen Kondyle signifikant von dem der lateralen Knodyle unterscheidet [21]. Um die variablen YM der verschiedenen Entnahmeorte auszugleichen, wäre ein einheitlicher Entnahmeort, beispielsweise an der medialen oder lateralen Femurkondyle vonnöten gewesen. Aufgrund der großflächigen Probenentnahme an den Kondylen, sowie der teils starken Kalzifizierung der operativ gewonnenen Gelenke waren geeignete Entnahmestellen für Explanate schwer zu finden. Daher wurde von einem einheitlichen Entnahmeort abgesehen. In Anbetracht der in dieser Arbeit verwendeten Probengrößen ist von ähnlichen Verzerrungseffekten auszugehen.

Oben genannte Faktoren spielen womöglich eine Rolle in der vorhandenen Verteilung der Daten. In keiner Messung konnte eine Normalverteilung nachgewiesen werden. Deshalb erfolgte die Signifikanztestung mit nicht-parametrischen Hypothesentests nach Wilcoxon bzw. Mann-Whitney. Zwar stellen diese Tests weniger stringente Anforderungen an den zugrundeliegenden Datensatz, im Gegenzug ist die statistische Aussagekraft verglichen mit parametrischen Tests geringer.

Durch die aufwendige Präparation der Proben und Messtechnik dieser Arbeit sind größere Fallzahlen schwer zu realisieren. Wilusz et al. zeigten jedoch, dass die gemessenen Elastizitätsmoduli bereits ab einer Distanz von  $1\mu\text{m}$  zwischen zwei Messpunkten große Unterschiede aufweisen [21]. Dadurch ergibt sich die Annahme, dass zwei Strings einer Probe als hinreichend unabhängig sind, um sie als eigene Fälle im Rahmen einer statistischen Auswertung zu sehen. Dennoch ist diese

Annahme kein vollwertiger Ersatz für Messungen, die auf eine größere Grundgesamtheit an Patientenproben verteilt sind.

Aufgrund der o.g. Fehlerquellen muss der Einsatz von AFM in der zellbiologischen Forschung auch mit seinen Limitationen gesehen werden. Die Stärken des AFMs liegen in der Quantifizierung physiologischer und pathophysiologischer Prozesse an lebendem Gewebe, eine Perspektive, die für viele andere Untersuchungstechniken verborgen bleibt. Deshalb kommt das AFM zunehmend für komplexe Fragestellungen in aktueller Forschung zum Einsatz. Für konstante Ergebnisse, insbesondere im Rahmen klinischer Fragestellungen mit einer Vielzahl an Störvariablen bedarf es jedoch hochstandardisierter Protokolle in Bezug auf Verarbeitung und Messung des untersuchten Gewebes.

## 6 Zusammenfassung

Die perizelluläre Matrix (PZM) von Gelenkknorpel ist eine Mikrodomäne, die jeden Chondrozyten umsäumt und aus verschiedenen Kollagenen und Glykosaminglykanen besteht. Sie spielt eine tragende Rolle für die Homöostase ihres umrahmten Chondrozyten und agiert als ein Pfortner für biomechanische Signale, die bei Belastung auf das Knorpelgewebe einwirken. Im Rahmen von Arthrose und einer fortschreitenden Kaskade an Entzündungsmediatoren liegen die im Gesunden als Strings angeordneten Chondrozyten des Gelenkknorpels zunächst als Double Strings und schließlich Cluster vor. Hierbei kommt es zu einer charakteristischen Reduktion des Elastizitätsmoduls (YM) der PZM. Diese Arbeit sollte die Biomechanik von arthrotischem Knorpelgewebe im Rahmen eines *ex-vivo* Modells untersuchen. Hierzu wurde Knorpelgewebe aus menschlichem Kniegelenk verarbeitet, inkubiert und mit Interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) bzw. Adalimumab versetzt. In dieser Arbeit konnte ein Modell für eine stabile Inkubation von Knorpelgewebe durch die Verarbeitung von großflächigen Knorpelimplantaten erarbeitet werden. Die Messung des YM der PZM erfolgte mittels Rasterkraftmikroskopie (AFM). Die so erhobenen Messungen zeigten eine Zunahme des YM für Gewebe unter Zusatz von IL-1 $\beta$ . Für den antiinflammatorischen Messarm zeigte sich hingegen eine Abnahme des YM. Der unbelassene, native Messarm zeigte keine signifikanten Elastizitätsänderungen.

Diese Messergebnisse stehen in starkem Konflikt mit bisherigen Annahmen, die davon ausgehen, dass eine fortschreitende Entzündung des Knorpels mit einer Abnahme des YM einhergeht. Die Zunahme des YM im Gewebe mit IL-1 $\beta$  Zusatz könnte auf eine komplexere Wechselwirkung zwischen Entzündungsprozessen und dem biomechanischen Profil der PZM hindeuten. Im Gegensatz dazu könnte der Effekt von Adalimumab die Blockade entzündlicher Signalwege mit einer subsequenten Normalisierung oder Steigerung des YM der PZM zur Folge haben. Durch die Komplexität der Knorpelpräparation und AFM-Messungen ist die hier verwendete Methodik potenziell fehleranfällig. Dies beeinflusste möglicherweise die Messergebnisse und erklärt die Diskrepanzen zu bestehender Literatur. Demnach ist Weitere Forschung mit Berücksichtigung methodischer Unsicherheiten erforderlich.

## 6.1 Literaturverzeichnis

1. Vicary, J., *A pedant's guid to AFM probe terminology*, in *NuNano Blog*. 2016: <https://www.nunano.com/blog/tag/AFM+chips>.
2. Jacobi, L.F., *Changes in stiffness of the extracellular and pericellular matrix of chondrocytes in human articular cartilage in the course of osteoarthritis*, in *Orthopädische Universitätsklinik mit Poliklinik Tübingen*. 2023, Universitätsklinik Tübingen: Tübingen.
3. Aumüller, G.e.a., *Duale Reihe Anatomie*. 5. aktualisierte Auflage ed. 2020, Stuttgart: Thieme.
4. Chandrasekaran, S., et al., *Early mobilization after total knee replacement reduces the incidence of deep venous thrombosis*. *ANZ J Surg*, 2009. **79**(7-8): p. 526-9.
5. Schweickert, W.D., et al., *Early physical and occupational therapy in mechanically ventilated, critically ill patients: a randomised controlled trial*. *Lancet*, 2009. **373**(9678): p. 1874-82.
6. Craig, L.E., et al., *Early mobilization after stroke: an example of an individual patient data meta-analysis of a complex intervention*. 2010. **41**(11): p. 2632-2636.
7. Chair, S.Y., D.R. Thompson, and S.K. Li, *The effect of ambulation after cardiac catheterization on patient outcomes*. *J Clin Nurs*, 2007. **16**(1): p. 212-4.
8. Mammen, G. and G. Faulkner, *Physical activity and the prevention of depression: a systematic review of prospective studies*. *Am J Prev Med*, 2013. **45**(5): p. 649-57.
9. Woolf, A.D. and B. Pfleger, *Burden of major musculoskeletal conditions*. *Bull World Health Organ*, 2003. **81**(9): p. 646-56.
10. Wilusz, R.E., J. Sanchez-Adams, and F. Guilak, *The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage*. *Matrix Biol*, 2014. **39**: p. 25-32.
11. Martel-Pelletier, J., et al., *Osteoarthritis*. *Nat Rev Dis Primers*, 2016. **2**: p. 16072.
12. Aicher, W.K. and B. Rolauuffs, *The spatial organisation of joint surface chondrocytes: review of its potential roles in tissue functioning, disease and early, preclinical diagnosis of osteoarthritis*. *Ann Rheum Dis*, 2014. **73**(4): p. 645-53.
13. Mansfield, J.C., J.S. Bell, and C.P. Winlove, *The micromechanics of the superficial zone of articular cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2015. **23**(10): p. 1806-16.
14. Zhang, Z., *Chondrons and the pericellular matrix of chondrocytes*. *Tissue Eng Part B Rev*, 2015. **21**(3): p. 267-77.
15. Goldring, M.B., *Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis*. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2012. **4**(4): p. 269-85.
16. Wilusz, R.E., L.E. Defrate, and F. Guilak, *A biomechanical role for perlecan in the pericellular matrix of articular cartilage*. *Matrix Biol*, 2012. **31**(6): p. 320-7.
17. Goldring, M.B., *Chondrogenesis, chondrocyte differentiation, and articular cartilage metabolism in health and osteoarthritis*. *Therapeutic advances in musculoskeletal disease*, 2012. **4**(4): p. 269-285.
18. Wilusz, R.E., J. Sanchez-Adams, and F. Guilak, *The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage*. *Matrix biology : journal of the International Society for Matrix Biology*, 2014. **39**: p. 25-32.
19. Macri, L., D. Silverstein, and R.A.F. Clark, *Growth factor binding to the pericellular matrix and its importance in tissue engineering*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007. **59**(13): p. 1366-1381.
20. Dreier, R., *Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders*. *Arthritis Res Ther*, 2010. **12**(5): p. 216.

21. Wilusz, R.E., S. Zauscher, and F. Guilak, *Micromechanical mapping of early osteoarthritic changes in the pericellular matrix of human articular cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2013. **21**(12): p. 1895-903.
22. Palazzo, C., et al., *Risk factors and burden of osteoarthritis*. *Ann Phys Rehabil Med*, 2016. **59**(3): p. 134-138.
23. Kamekura, S., et al., *Osteoarthritis development in novel experimental mouse models induced by knee joint instability*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2005. **13**(7): p. 632-41.
24. van der Kraan, P.M. and W.B. van den Berg, *Osteoarthritis in the context of ageing and evolution. Loss of chondrocyte differentiation block during ageing*. *Ageing Res Rev*, 2008. **7**(2): p. 106-13.
25. Felson, D.T., et al., *The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study*. *Arthritis Rheum*, 1987. **30**(8): p. 914-8.
26. Cunningham, L.S. and J.L. Kelsey, *Epidemiology of musculoskeletal impairments and associated disability*. *Am J Public Health*, 1984. **74**(6): p. 574-9.
27. Kellgren, J.H. and J.S. Lawrence, *Radiological assessment of osteo-arthritis*. *Ann Rheum Dis*, 1957. **16**(4): p. 494-502.
28. Le Pen, C., C. Reygrobelle, and I. Gerentes, *Financial cost of osteoarthritis in France. The "COART" France study*. *Joint Bone Spine*, 2005. **72**(6): p. 567-70.
29. 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*. *Ann Rheum Dis*, 2015. **74**(3): p. 547-56.
30. Fransen, M., et al., *Glucosamine and chondroitin for knee osteoarthritis: a double-blind randomised placebo-controlled clinical trial evaluating single and combination regimens*. *Ann Rheum Dis*, 2015. **74**(5): p. 851-8.
31. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis*. *Ann N Y Acad Sci*, 2010. **1192**: p. 230-7.
32. Danalache, M., et al., *Changes in stiffness and biochemical composition of the pericellular matrix as a function of spatial chondrocyte organisation in osteoarthritic cartilage*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2019. **27**(5): p. 823-832.
33. Danalache, M., et al., *Exploration of changes in spatial chondrocyte organisation in human osteoarthritic cartilage by means of 3D imaging*. *Sci Rep*, 2021. **11**(1): p. 9783.
34. Tallheden, T., et al., *Proliferation and differentiation potential of chondrocytes from osteoarthritic patients*. *Arthritis Res Ther*, 2005. **7**(3): p. R560-8.
35. Pearle, A.D., et al., *Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2007. **15**(5): p. 516-23.
36. Goldring, M.B. and F. Berenbaum, *The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide*. *Clin Orthop Relat Res*, 2004(427 Suppl): p. S37-46.
37. Goldring, M.B., et al., *Interleukin 1 suppresses expression of cartilage-specific types II and IX collagens and increases types I and III collagens in human chondrocytes*. *J Clin Invest*, 1988. **82**(6): p. 2026-37.
38. Saklatvala, J., *Tumour necrosis factor alpha stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage*. *Nature*, 1986. **322**(6079): p. 547-9.
39. Goldring, M.B. and S.R. Goldring, *Osteoarthritis*. *J Cell Physiol*, 2007. **213**(3): p. 626-34.
40. Wang, Y., et al., *Combined effects of TNF-alpha, IL-1beta, and HIF-1alpha on MMP-2 production in ACL fibroblasts under mechanical stretch: an in vitro study*. *J Orthop Res*, 2011. **29**(7): p. 1008-14.
41. Rose, B.J. and D.L. Kooyman, *A Tale of Two Joints: The Role of Matrix Metalloproteases in Cartilage Biology*. *Dis Markers*, 2016. **2016**: p. 4895050.

42. Goldring, M.B., et al., *Roles of inflammatory and anabolic cytokines in cartilage metabolism: signals and multiple effectors converge upon MMP-13 regulation in osteoarthritis*. Eur Cell Mater, 2011. **21**: p. 202-20.
43. Malemud, C.J., *Matrix metalloproteinases (MMPs) in health and disease: an overview*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 1696-701.
44. Folgueras, A.R., et al., *Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies*. Int J Dev Biol, 2004. **48**(5-6): p. 411-24.
45. Shiomi, T., et al., *Matrix metalloproteinases, a disintegrin and metalloproteinases, and a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs in non-neoplastic diseases*. Pathol Int, 2010. **60**(7): p. 477-96.
46. Maldonado, M. and J. Nam, *The role of changes in extracellular matrix of cartilage in the presence of inflammation on the pathology of osteoarthritis*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 284873.
47. Guilak, F., et al., *Osteoarthritis as a disease of the cartilage pericellular matrix*. Matrix Biol, 2018. **71-72**: p. 40-50.
48. Dreier, R., *Hypertrophic differentiation of chondrocytes in osteoarthritis: the developmental aspect of degenerative joint disorders*. Arthritis research & therapy, 2010. **12**(5): p. 216-216.
49. Goldring, M.B. and K.B. Marcu, *Cartilage homeostasis in health and rheumatic diseases*. Arthritis Res Ther, 2009. **11**(3): p. 224.
50. Gao, Y., et al., *The ECM-cell interaction of cartilage extracellular matrix on chondrocytes*. Biomed Res Int, 2014. **2014**: p. 648459.
51. Xu, L., et al., *Increased expression of the collagen receptor discoidin domain receptor 2 in articular cartilage as a key event in the pathogenesis of osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2007. **56**(8): p. 2663-73.
52. Han, B., et al., *AFM-Nanomechanical Test: An Interdisciplinary Tool That Links the Understanding of Cartilage and Meniscus Biomechanics, Osteoarthritis Degeneration, and Tissue Engineering*. ACS Biomater Sci Eng, 2017. **3**(9): p. 2033-2049.
53. Wang, M., et al., *MMP13 is a critical target gene during the progression of osteoarthritis*. Arthritis Res Ther, 2013. **15**(1): p. R5.
54. Danalache, M., et al., *Assessment of biomechanical properties of the extracellular and pericellular matrix and their interconnection throughout the course of osteoarthritis*. J Biomech, 2019. **97**: p. 109409.
55. Flight, L. and S.A. Julious, *Practical guide to sample size calculations: an introduction*. Pharm Stat, 2016. **15**(1): p. 68-74.
56. Ihnatouski, M., et al., *AFM-Based Method for Measurement of Normal and Osteoarthritic Human Articular Cartilage Surface Roughness*. Materials (Basel), 2020. **13**(10).
57. Hawker, G.A., et al., *Differences between men and women in the rate of use of hip and knee arthroplasty*. N Engl J Med, 2000. **342**(14): p. 1016-22.
58. Tschaikowsky, M., et al., *Hybrid fluorescence-AFM explores articular surface degeneration in early osteoarthritis across length scales*. Acta Biomater, 2021. **126**: p. 315-325.
59. Chen, Y.C. and C.P. Brown, *Embrittlement of collagen in early-stage human osteoarthritis*. J Mech Behav Biomed Mater, 2020. **104**: p. 103663.
60. Argote, P.F., et al., *Chondrocyte viability is lost during high-rate impact loading by transfer of amplified strain, but not stress, to pericellular and cellular regions*. Osteoarthritis and Cartilage, 2019. **27**(12): p. 1822-1830.
61. de Vries, S.A., et al., *Deformation thresholds for chondrocyte death and the protective effect of the pericellular matrix*. Tissue Eng Part A, 2014. **20**(13-14): p. 1870-6.
62. Isyar, M., et al., *A practical way to prepare primer human chondrocyte culture*. J Orthop, 2016. **13**(3): p. 162-7.

63. Rotter Sopasakis, V., et al., *Elevated Glucose Levels Preserve Glucose Uptake, Hyaluronan Production, and Low Glutamate Release Following Interleukin-1 $\beta$  Stimulation of Differentiated Chondrocytes*. *Cartilage*, 2019. **10**(4): p. 491-503.
64. Hirsch, M.S., et al., *Chondrocyte survival and differentiation in situ are integrin mediated*. *Dev Dyn*, 1997. **210**(3): p. 249-63.
65. Tew, S.R., et al., *The reactions of articular cartilage to experimental wounding: role of apoptosis*. *Arthritis Rheum*, 2000. **43**(1): p. 215-25.
66. Tschaikowsky, M., et al., *Hybrid fluorescence-AFM explores articular surface degeneration in early osteoarthritis across length scales*. *Acta Biomaterialia*, 2021. **126**: p. 315-325.
67. Chen, C., et al., *Interleukin-1 $\beta$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  increase stiffness and impair contractile function of articular chondrocytes*. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2015. **47**(2): p. 121-9.
68. Pettenuzzo, S., et al., *Biomechanics of Chondrocytes and Chondrons in Healthy Conditions and Osteoarthritis: A Review of the Mechanical Characterisations at the Microscale*. *Biomedicines*, 2023. **11**(7).
69. Fredrikson, J.P., et al., *Pericellular Matrix Formation and Atomic Force Microscopy of Single Primary Human Chondrocytes Cultured in Alginate Microgels*. *Adv Biol (Weinh)*, 2023: p. e2300268.
70. Ng, L., et al., *Nanomechanical properties of individual chondrocytes and their developing growth factor-stimulated pericellular matrix*. *Journal of Biomechanics*, 2007. **40**(5): p. 1011-1023.
71. Lekka, M., *Discrimination Between Normal and Cancerous Cells Using AFM*. *Bionanoscience*, 2016. **6**: p. 65-80.
72. Arnold, K.M., et al., *Atomic Force Microscopy Micro-Indentation Methods for Determining the Elastic Modulus of Murine Articular Cartilage*. *Sensors (Basel)*, 2023. **23**(4).
73. Lee, G.M., et al., *Development of selective tolerance to interleukin-1beta by human chondrocytes in vitro*. *J Cell Physiol*, 2002. **192**(1): p. 113-24.
74. Baumann, B.T., et al., *Cracking the Pericellular Matrix Code: Exploring how MMP-2, -3, and -7 influence matrix breakdown and biomechanical properties*. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2024.
75. Chisari, E., K.M. Yaghtmour, and W.S. Khan, *The effects of TNF-alpha inhibition on cartilage: a systematic review of preclinical studies*. *Osteoarthritis Cartilage*, 2020. **28**(5): p. 708-718.
76. Isyar, M., et al., *Are biological agents toxic to human chondrocytes and osteocytes?* *J Orthop Surg Res*, 2015. **10**: p. 118.
77. Beekhuizen, M., et al., *Osteoarthritic synovial tissue inhibition of proteoglycan production in human osteoarthritic knee cartilage: establishment and characterization of a long-term cartilage-synovium coculture*. *Arthritis Rheum*, 2011. **63**(7): p. 1918-27.
78. Patriarca, E.J., et al., *The Multifaceted Roles of Proline in Cell Behavior*. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 728576.
79. Liu, S., et al., *Cartilage tissue engineering: From proinflammatory and anti-inflammatory cytokines to osteoarthritis treatments (Review)*. *Mol Med Rep*, 2022. **25**(3).
80. Stolz, M., et al., *Dynamic Elastic Modulus of Porcine Articular Cartilage Determined at Two Different Levels of Tissue Organization by Indentation-Type Atomic Force Microscopy*. *Biophysical Journal*, 2004. **86**(5): p. 3269-3283.

## 6.2 Publikationsverzeichnis

1. Danalache M., Tiwari A., Sigwart V. A., Hofmann U. K.\*: "Applications of atomic force microscopy to detect early osteoarthritis." *Journal of Visualized Experiments*, 2020. IF 1,4; Rang Multidisciplinary Sciences 49/129 JCR 2020, Q3. PMID: 32510478
2. Bonnaire F. C.\*, Danalache M., Sigwart V. A., Breuer W., Rolauffs B., Hofmann U. K.: "The intervertebral disc from embryonic development to disc degeneration: insights into spatial cellular organisation." *The Spine Journal*, 2021. IF 4,3; Rang Orthopaedics 15/86 JCR 2021, Q1. PMID: 33872805

## **7 Erklärung zum Eigenanteil**

Die Arbeit wurde in der Universitätsklinik für Orthopädie der Universität Tübingen unter Betreuung von Herrn Prof. Dr. Ulf Krister Hofmann durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Marina Danalache, Leitung des zellbiologischen Forschungslabors der Universitätsklinik für Orthopädie, sowie durch Prof. Dr. Hofmann.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch Frau Dr. Danalache von mir eigenständig durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte unter Betreuung von Prof. Dr. Hofmann durch mich.

Ich versichere, das Manuskript selbstständig nach Anleitung durch Prof. Dr. Hofmann verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Viktor Sigwart

## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank den nachstehenden Personen entgegen bringen, ohne deren Mithilfe diese Promotionsschrift nicht zustande gekommen wäre.

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Ulf Krister Hofmann, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der stets freundlichen Hilfe und seinem schier unerschöpflichen Ideenreichtum, die sich von meinen Anfängen im Zelllabor bis zu den letzten Zeilen dieser Arbeit zogen. Durch seine Geduld, seine Bereitschaft, diese Arbeit auch unter schwierigen Bedingungen zu betreuen und seiner fachlichen Kompetenz war er maßgeblich an dieser Arbeit beteiligt.

Anschließend möchte ich mich bei Frau Dr. Danalache für ihre unermüdliche Hilfestellung hinsichtlich Laborarbeiten, statistischen Analysen und dem verfassen meiner ersten Publikationen. Sie war mir besonders in den Anfängen meines Forschungsvorhabens eine große Stütze und eine lieb gewonnene Freundin.

Dank gilt auch Frau Prof. Dr. Alexander-Friedrich und Herrn Prof. Dr. Aicher für die Mitbetreuung meiner Dissertation.

Mein ganz besonderer Dank aber gilt meiner Mutter, Karin Mayer, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichte und der ich diese Arbeit widme.