

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik Würzburg, König-Ludwig-Haus
Lehrstuhl für Orthopädie der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. Jochen Eulert

**Molekularbiologische Untersuchungen zur Unterscheidung
zwischen septischer und aseptischer Hüftendoprothesenlockerung**

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius - Maximilians - Universität zu Würzburg

vorgelegt von
Alexander Wind
aus Tettwang

Würzburg, November 2006

Referent: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze

Koreferent: Professor Dr. med. Arnulf Weckbach

Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Mai 2007

Der Promovend ist Arzt

Gewidmet
meiner Familie
und Teresa

Inhaltsverzeichnis

1 ALLGEMEINER TEIL	1
1.1 Einführung in die Endoprothetik	1
1.2 Prothesenlockerung	1
1.3 Aseptische Lockerung	2
1.3.1 Epidemiologie.....	2
1.3.2 Pathogenese	2
1.3.3 Pseudomembran.....	2
1.4 Septische Prothesenlockerung.....	3
1.4.1 Epidemiologie.....	3
1.4.2 Pathogenese	3
1.4.3 Toxine.....	4
1.4.4 Invasion	4
1.4.5 Zelluläre Immunantwort bei bakterieller Infektion	4
1.5 Mediatoren der Osteolyse.....	6
1.5.1 Zytokine.....	6
1.5.2 Interleukin -1 (IL -1).....	7
1.5.3 Interleukin 1 Rezeptoren	8
1.5.4 Tumor Nekrose Faktor (TNF).....	9
1.5.5 TNF Rezeptoren.....	9
1.5.6 Chemokine	10
1.5.7 CCR1.....	11
1.6 Zielsetzung der Arbeit.....	12
2 MATERIAL UND METHODEN	13
2.1 Patientengut.....	13
2.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials	13
2.3 RNA - Isolierung	15
2.4 cDNA - Synthese.....	16
2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	17
2.6 Gelelektrophorese	19
2.7 Semiquantitative Densitometrie.....	19
2.8 Statistik.....	20
2.9 Verwendetes Material.....	20
3 ERGEBNISSE	23
3.1 Etablierung der RNA - Isolierung	23
3.2 Reproduzierbarkeit der RNA - Isolierung.....	23
3.2.1 Aktin	24
3.2.2 IL-1 alpha	25

3.2.3 IL-1 RA	26
3.2.4 IL-1 R1.....	27
3.2.5 TNF-alpha	28
3.2.6 TNF-R1.....	29
3.2.7 TNF-R2.....	30
3.2.8 CCR1.....	31
3.3 Vergleich der Zytokinmuster septischer und aseptischer Gewebeproben.....	32
3.3.1 Aktin	32
3.3.2 IL-1 alpha	33
3.3.3 IL-1 beta	34
3.3.4 IL-1 RA	35
3.3.5 IL-1 R1.....	36
3.3.6 TNF-alpha	37
3.3.7 TNF-R1.....	38
3.3.8 TNF-R2.....	39
3.3.9 CCR1.....	40
4 DISKUSSION	41
4.1 Einleitung	41
4.2 Variabilität der Ergebnisse	41
4.3 Bedeutung der untersuchten Zytokine für die Osteolyse.....	44
4.4 Bewertung der Ergebnisse.....	48
5 ZUSAMMENFASSUNG	49
6 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	50
7 LITERATURVERZEICHNIS	51

1 Allgemeiner Teil

1.1 Einführung in die Endoprothetik

Degenerative Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis oder Osteoarthrose führen zur Zerstörung des betroffenen Gelenkes. Hierbei ist der Ersatz eines geschädigten Hüftgelenkes durch eine Alloarthroplastik eine der bedeutendsten Therapiemöglichkeiten.

Endoprothesen aus Elfenbein, die es seit 1890 als Knieprothesen gab, wurden 1922 zum ersten Mal von Grooves für den Hüftkopfersatz verwendet. Bei der Weiterentwicklung der Endoprothesen gab es Schwierigkeiten, die Endoprothesen sicher und dauerhaft im Knochen zu verankern, auch die Paarung der gegeneinander gleitenden Gelenkanteile stellten große Probleme dar [65]. Zum Ende der 1950er Jahre führte Charnley die Hüfttotalendoprothese aus Teflon ein, die eine hohe Versagerquote aufwies. Die unbefriedigenden Ergebnisse resultierten aus einer hohen Infektionsrate und aus dem vermehrten Teflonabrieb [13]. Die Verwendung von antibiotikahaltigem Knochenzement und der Einsatz von Polyethylen ermöglichte längere Tragezeiten und eine Senkung der Infektionsrate [12, 54]. Aseptische Lockerungen, die in den Siebziger Jahren auftraten, wurden als Reaktion auf Zementbrüche und daraus entstehenden Partikeln gewertet. Hierfür wurde der Begriff „Cement Disease“ definiert [30]. Als auch aseptische Lockerungen bei zementfreien Prothesen auftraten, wurde nun der Begriff „Particle Disease“ eingeführt.

1.2 Prothesenlockerung

Ein Hauptproblem der Endoprothetik ist neben perioperativen Komplikationen die Prothesenlockerung. Dabei unterscheidet man zwischen septischer und aseptischer Prothesenlockerung, deren gemeinsames pathologisches Korrelat eine Pseudomembran ist, die die gelockerte Prothese umgibt. Unterschiedliche pathophysiologische Vorgänge führen zur Ausbildung dieser Pseudomembran [40].

1.3 Aseptische Lockerung

1.3.1 Epidemiologie

Die aseptische Lockerung von Hüftprothesen tritt in etwa 10 % der Fälle innerhalb von 15 Jahren nach der Implantation auf. Dabei ist die Inzidenz bei zementierten und unzementierten Prothesen in etwa gleich [9].

1.3.2 Pathogenese

Abriebpartikel entstehen an Prothesenoberflächen durch mechanische Verschleißmechanismen [56]. Diese Partikel rufen eine Fremdkörperreaktion und chronische Entzündung des periprothetischen Gewebes hervor [67]. Dabei versuchen Makrophagen, große Mengen von Partikeln durch Phagozytose zu eliminieren. Aufgrund der Unverdaulichkeit der anorganischen Partikel werden verstärkt zahlreiche Zytokine und Entzündungsmediatoren durch die aktivierten Makrophagen sezerniert [3, 10, 33]. Es werden unter anderem Tumor Nekrose Faktor α (TNF- α), Interleukin-1 (IL-1), Interleukin-3 (IL-3), Interleukin-6 (IL-6), Prostaglandin E₂ (PGE₂), Platelet Derived Growth Factor (PDGF), Macrophage Colony Stimulating Factor (M-CSF), Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor (GM-CSF), C-C Chemokine und Metalloproteinasen freigesetzt [3, 43, 46, 47, 57, 61]. Diese Akkumulation von Faktoren, die die Knochenresorption fördern, führt schließlich zur Osteolyse durch aktivierte Makrophagen und Osteoklasten [21, 29].

1.3.3 Pseudomembran

Als Folge der Fremdkörperreaktion entsteht am Ort der granulomatösen Entzündung eine Pseudomembran [29]. Die Pseudomembran um die gelockerte Prothese besteht zu großen Teilen aus Bindegewebe, Fibroblasten, Makrophagen, Riesenzellen und T-Lymphozyten [26, 41, 57]. Dabei können Zellanordnung und -dichte je nach Lokalisation und Prothesentyp heterogen sein [26].

1.4 Septische Prothesenlockerung

1.4.1 Epidemiologie

Die Inzidenz septischer Prothesenlockerungen bei Hüftprothesen beträgt etwa 1 %, bei Knieprothesen liegt sie bei ungefähr 2 % [22, 69]. Die am häufigsten dabei vorkommenden Bakterien sind koagulase-negative Staphylokokken in etwa 40 % der Fälle, *Staphylokokkus aureus* (etwa 20 %), gefolgt von Mischfloren (10 %), Streptokokken (10 %), gram-negativen Bakterien (etwa 5 %), Enterokokken (5 %) und Anaerobiern (3 %) [50]. Keine Mikroorganismen können in etwa 10 % der klinisch vorhandenen Infektionen isoliert werden [69].

1.4.2 Pathogenese

Der Ablauf bakterieller Infektionen folgt einem bestimmtem Muster (Abb. 1). Durch zwei voneinander unabhängige Mechanismen, die Toxinproduktion und die Invasion, wird der Entzündungsprozess hervorgerufen.

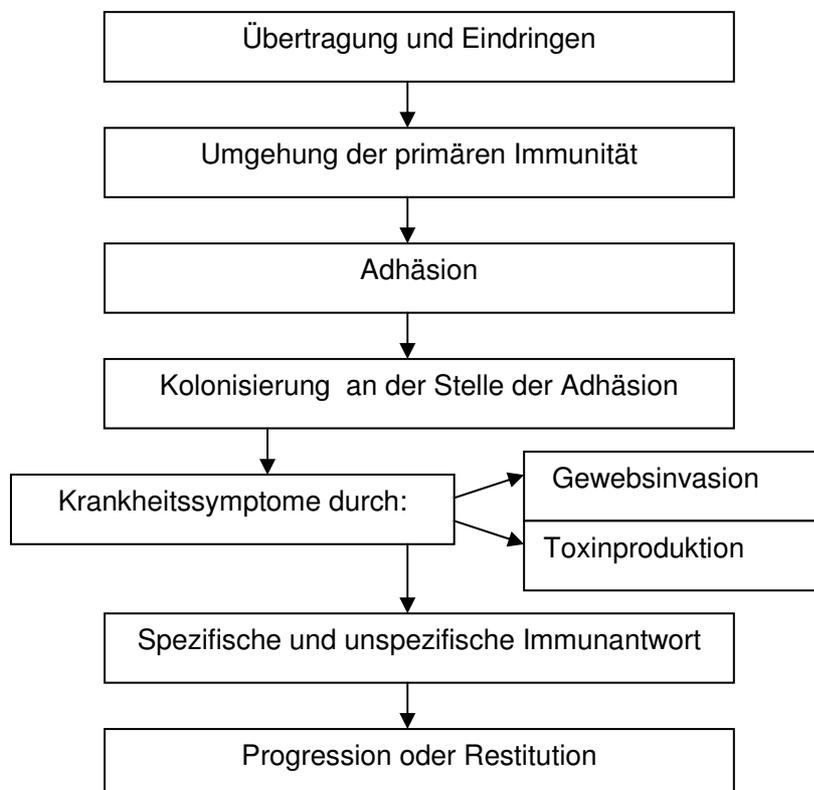


Abb. 1: Stadien der bakteriellen Infektion

1.4.3 Toxine

Toxine werden in zwei Kategorien unterschieden: Exotoxine und Endotoxine. Exotoxine sind Polypeptide, die von der Bakterienzelle sezerniert werden. Sie werden von vielen gram-positiven und gram-negativen Bakterien produziert. Charakteristische Erkrankungen sind z. B. Tetanus oder Botulismus. Endotoxine sind Lipopolysaccharide, die Bestandteile der Zellwand von gram-negativen Bakterien sind und nicht aktiv ausgeschüttet werden. Endotoxine binden an Rezeptoren von Makrophagen und aktivieren die Produktion von Zytokinen wie Interleukin-1 und TNF- α . Zudem wird das Komplement-System aktiviert. Als biologische Effekte sind Fieber, Hypotension, septischer Schock, Gewebeschädigung und lokale Entzündung zu verzeichnen. Endotoxinähnliche pathophysiologische Effekte können auch bei Infektionen mit gram-positiven Bakterien (z. B. mit *S. aureus*) auftreten. Hier spielen wahrscheinlich andere Zellwandbestandteile wie Peptidoglykane oder Teicoplanin eine Rolle [11].

1.4.4 Invasion

Invasive Bakterien dringen in den Wirt ein, verbreiten sich und wachsen in großer Zahl am Ort der Adhäsion. Meistens rufen sie eine zelluläre Immunantwort hervor. Die Ausprägung der Entzündungsreaktion ist abhängig von vielen Faktoren, unter anderem vom Ort des Eintritts, der Virulenz des Bakteriums und dem Zustand des Immunsystems [11].

1.4.5 Zelluläre Immunantwort bei bakterieller Infektion

Die zelluläre Immunität in Folge einer bakteriellen Infektion wird hauptsächlich durch aktivierte T-Lymphozyten und Makrophagen vermittelt. Die Entzündungsreaktion beginnt mit der Aktivierung einer antigen-spezifischen TH-Zelle durch eine Bakterienantigen – präsentierende Zelle, hier meist ein Makrophage. Diese TH-Zelle gibt zahlreiche entzündungsfördernde Zytokine und

Chemokine (Abb. 2) in das umgebende Gewebe ab.

Diese Substanzen fördern das klonale Wachstum der TH-Zelle und ziehen weitere

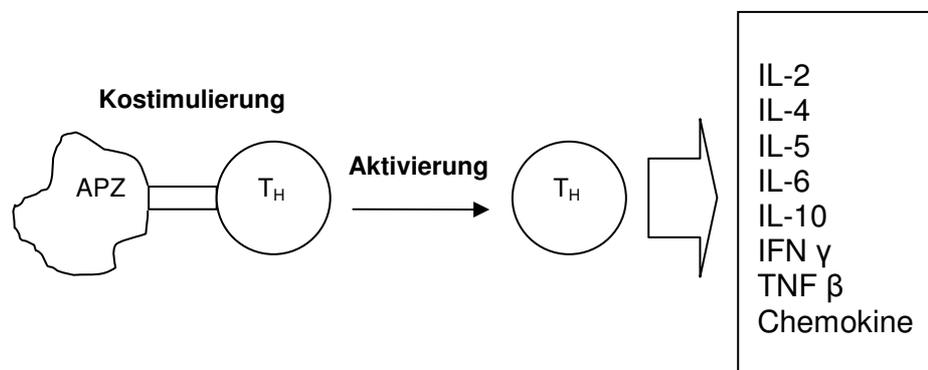


Abb. 2: Schematische Darstellung der Zytokinsekretion aktivierter T-Helferzellen [62]

APZ: Antigen-Präsentierende Zelle; TH: T-Helferzelle;
IL: Interleukin; IFN: Interferon; TNF: Tumor Nekrose Faktor

Entzündungszellen herbei. Zu diesen Entzündungszellen gehören alle Formen von T- und B- Lymphozyten, neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten und Monozyten.

Der direkte Antigenkontakt und Zytokine stimulieren die Differenzierung und Aktivierung von Makrophagen. Die aktivierten Makrophagen phagozytieren verstärkt die Bakterienzellen und wirken als antigen-präsentierende Zellen. Zudem sezernieren sie IL-1, TNF- α , Chemokine, Prostaglandine und Leukotriene. Diese Entzündungsmediatoren rufen mannigfaltige Reaktionen (s. Kap. Zytokine) hervor und verstärken so die Immunantwort. Adhäsionsmoleküle wie Selektine und Integrine werden verstärkt auf Endothelzellen exprimiert und fördern die Diapedese von Leukozyten. Die Leukozyten wandern an den Ort der Entzündung und phagozytieren die Mikroorganismen [45, 62].

1.5 Mediatoren der Osteolyse

1.5.1 Zytokine

Zytokine sind interzelluläre Signalpeptide, die lokale und systemische Entzündungsvorgänge und Immunantworten regulieren. Sie übernehmen wichtige Steuerfunktionen in vielen biologischen Prozessen, z. B. bei der Hämatopoese und bei der Wundheilung [49, 66].

Zytokine haben unterschiedliche Ursprungs- und Zielzellen. Ihre Wirkung entfalten sie sowohl auf benachbarte Zellen (parakrine Wirkung) als auch auf Zellen, durch die sie sezerniert werden (autokrine Wirkung). Manche Zytokine (z. B. TNF- α , IL-1), die im Blut zirkulieren, beeinflussen zudem entfernt liegende Organe und Gewebe. Verschiedene Zytokine sind in der Lage, die gleichen Funktionen an Zielgeweben zu übernehmen. Sie können synergistisch und antagonistisch wirken, induzieren oder hemmen aber auch die Synthese anderer Zytokine [49].

Zytokine wirken über spezielle Oberflächenrezeptoren der Zellmembranen. Die Rezeptoren arbeiten über Proteinkomplexe, die aus mehreren Membranpolypeptiden, den Untereinheiten, aufgebaut sind. Eine Untereinheit besteht aus einer extra-zellulären Domäne, die der Zytokinbindung dient, und einer intra-zellulären Domäne, die die Signaltransduktion steuert. Durch die Zytokinbindung an den Rezeptor werden über Kinase-Kaskaden letztlich Transkriptionsfaktoren aktiviert, die spezifische Gene aktivieren oder supprimieren und somit die Proteinsynthese steuern [49].

Tabelle 1: Einzelne Zytokine und ihre Funktionen [49]

Name	Herkunft	Rezeptoren	Wirkung
Interleukin-1 α + β (IL-1)	Makrophagen Fibroblasten andere	IL-1 R1 IL-1 R2	<ul style="list-style-type: none"> ▪ B- und T-Zell-Proliferation ▪ Chemotaktischer Faktor für Phagozyten ▪ Induktion von Fieber und Entzündung ▪ Synthese von Akute-Phase-Proteinen ▪ Hämatopoese ▪ Knochenresorption
Tumor Faktor α (TNF- α)	Nekrose aktivierte Makrophagen andere somatische Zellen	TNF R1 (p55) TNF R2 (p75)	<ul style="list-style-type: none"> wie IL-1 ▪ Toxizität gegen Tumorzellen ▪ Gewebereaktion beim septischen Schock ▪ vaskuläre Thrombose ▪ Knochenresorption
Tumor Faktor β (TNF- β)	Nekrose aktivierte TH ₁ -Zellen		<ul style="list-style-type: none"> wie TNF-α ▪ Entwicklung peripherer Lymphorgane

1.5.2 Interleukin-1 (IL-1)

Zwei agonistisch wirksame Formen von Interleukin-1 sind bislang identifiziert worden, IL-1 α und IL-1 β , die von verschiedenen Genen kodiert werden. Obwohl sie nur in etwa ein Viertel Sequenzähnlichkeit aufweisen, besitzen sie annähernd die gleiche biologische Funktion und Aktivität (Tab. 1). Sie binden zudem an die gleichen Oberflächenrezeptoren. Interleukin-1 α und -1 β spielen bei Entzündungen als Akute-Phase-Proteine und Regulierung der Immunantwort eine wichtige Rolle, indem sie die T- und B-Lymphozyten und die natürlichen Killerzellen (NK) aktivieren [49, 60]. Die Produktion von IL-1 wird durch verschiedene exogene Auslöser stimuliert, insbesondere nach Phagozytose von Abriebpartikeln durch Makrophagen [3, 43].

Sowohl die Knochenresorption durch Osteoklasten als auch die Alkalische Phosphatase-Aktivität der Osteoblasten wird durch IL-1 verstärkt. Hierbei wird die Zellzahl der Osteoklasten erhöht [28]; besonders die Differenzierung der Vorläuferzellen der Osteoklasten wird angeregt [26]. Zudem aktiviert IL-1 die Genexpression osteolytisch wirksamer Produkte, unter anderem wird durch die

Aktivitätserhöhung der Cyclooxygenase-2 die Ausschüttung von Prostaglandin E₂ angeregt, das die Knochenresorption durch Osteoklasten fördert [16, 57].

Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1 RA) ist ein biologisch inaktiver Agonist, der mit IL-1 α und β um die Bindungsstellen der IL-1 Rezeptoren konkurriert [16, 49]. Er ist somit ein kompetitiver Inhibitor der Signaltransduktion, dessen Konzentration aber das Hundertfache der Konzentration von IL-1 betragen muß, um effektiv konkurrieren zu können [4, 17]. IL-1 RA wird in vielen Geweben, insbesondere in Monozyten, in Reaktion auf entzündliche Vorgänge produziert [4]. Dabei scheint ein Gleichgewicht zwischen Agonist und Antagonist wichtig zu sein, um eine überschießende entzündliche Reaktion zu vermeiden [19].

1.5.3 Interleukin 1 Rezeptoren

IL-1 bindet an zwei unterschiedliche Rezeptoren, IL-1 Rezeptor Typ I und Typ II. IL-1 R1 ist ein transmembranes Glykoprotein, mit drei extrazellulär gelegenen Bindungsdomänen. Grundsätzlich findet man diesen Rezeptor in allen durch IL-1 ansprechbaren Zellen. Dessen Expression wird durch Botenstoffe wie GM-CSF moduliert und erhöht die Ansprechbarkeit auf IL-1 [49]. Man findet eine erhöhte IL-1R1 - Dichte bei lokalen Entzündungen [63].

Die der Rezeptorbindung folgende intrazelluläre Signaltransduktion geschieht anscheinend durch die Phosphorylierung von Serin- und Threonin-Resten in zytoplasmatischen Proteinen, die wiederum spezifische Transkriptionsfaktoren wie NF κ B aktivieren. In der Folge werden dadurch Gene, die für die Ansprechbarkeit auf IL-1 notwendig sind, vermehrt transkribiert [49].

1.5.4 Tumor Nekrose Faktor (TNF)

TNF existiert in zwei unterschiedlichen Formen, TNF- α und TNF- β , deren Funktionen sich voneinander unterscheiden (Tab.1). TNF- α wird hauptsächlich von aktivierten Makrophagen produziert [49, 66]. Neben dem Kontakt mit Lipopolysacchariden wird die Produktion von TNF- α unter anderem durch den Kontakt von Makrophagen mit Abriebpartikeln induziert [49, 66]. Sowohl die Proliferation wie auch die Differenzierung von Osteoklastenvorläufern werden durch TNF- α stimuliert [41, 53, 55]. Eine Zunahme der Osteoklastendichte und dementsprechend eine Abnahme der mineralisierten Knochenmatrix wird *in-vitro* durch TNF- α vermittelt. Zudem stimuliert TNF- α zusammen mit IL-1 in Osteoblasten die Produktion der alkalischen Phosphatase, von PGE2 und IL-6, einem weiteren die Knochenresorption fördernden Zytokin [31, 35, 64]. TNF- α fördert in niedrigen Konzentrationen die Proliferation der Osteoblasten-ähnlichen Zellen und moduliert deren Funktion. In hohen Konzentrationen hat es einen inhibitorischen Effekt auf die Osteoblastenproliferation [18, 31].

TNF- β wird von aktivierten TH₁-Zellen sezerniert und wirkt insbesondere auf die Entwicklung peripherer Lymphorgane [49].

1.5.5 TNF Rezeptoren

Zwei Rezeptoren, TNF-R1 (p75) und TNF-R2 (p55), binden TNF- α und TNF- β . Beide Rezeptoren sind transmembrane Glykoproteine und besitzen eine große extrazelluläre Bindungsdomäne. Die Rezeptoren kommen ubiquitär in Körperzellen vor. TNF-R1 fördert im Besonderen die Aktivität von zytotoxischen Zellen und spielt eine Rolle bei durch Endotoxin (LPS) vermitteltem septischem Schock. TNF-R2 aktiviert verstärkt die Proliferation von T-Lymphozyten [49]. Die Liganden binden als so genannte Trimere an die Bindungsdomänen von drei Rezeptoren gleichzeitig und initiieren so die Rezeptorantwort. Die Signaltransduktion erfolgt ähnlich wie bei den IL-1 Rezeptoren durch die

Phosphorylierung von Proteinen und der daraus resultierenden Aktivierung von Transkriptionsfaktoren[49].

1.5.6 Chemokine

Die Familie der Chemokine umfasst eine große Anzahl sich in ihrer Struktur ähnelnder Zytokine. Gemeinsames Merkmal ist die Fähigkeit, Chemokinese und Chemotaxis zu stimulieren. Daraus ergibt sich auch der Name Chemokine: Chemotaktische Zytokine.

Chemokine haben ein Molekulargewicht von etwa 8-16 kD und binden an 7-Transmembran-Rezeptoren. Strukturell lassen sich zwei Unterformen unterscheiden: CC (alpha) und CXC-Chemokine (beta). In CC-Chemokinen liegen die zwei terminalen Cysteinreste (Abb. 3), die die Bindungsfähigkeit spezifizieren, unmittelbar nebeneinander, während in CXC-Chemokinen noch eine Aminosäure eingefügt ist. Chemokine werden von verschiedenen Zellarten, insbesondere von Endothelzellen und aktivierten Makrophagen produziert.

Bislang sind 16 Chemokin-Rezeptoren identifiziert worden. Sie gehören zur Familie der Rhodopsin-Rezeptoren. Jeder einzelne der 16 bekannten CC-Rezeptoren (CCR 1-16) kann unterschiedliche Liganden binden, die wahrscheinlich auch verschiedene Wirkungen hervorrufen [6, 49].

Die Genexpression der Chemokine wird durch eine Vielzahl von Faktoren induziert, darunter finden sich Zytokine (z.B. IL-1, TNF- α , PDGF), T-Zellen-aktivierende Antigene und Lipopolysaccharide.

Chemokine scheinen in der Lage, alle Formen von Leukozyten an den Ort der Entzündung heranzuziehen. Sie aktivieren die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und begünstigen die transendotheliale Migration [6, 8, 49].

1.6 Zielsetzung der Arbeit

In vorangehenden Untersuchungen wurden mit Hilfe eines *In-vitro*-Makrophagenmodells Zytokinmuster von Entzündungsmediatoren dokumentiert, die durch Partikelkontakt induziert wurden [51]. In einer weiteren Arbeit wurde die Genexpression eines Chemokinrezeptors beschrieben, die im Zusammenhang mit der Expression bekannter Entzündungsmediatoren eine mögliche Unterscheidung einer aseptisch und septisch bedingten Prothesenlockerung aufzeigen könnte [52]. In dieser *In-vivo*-Studie sollten Pseudomembranen aseptischer und septischer Genese auf die mRNA-Expression vorbeschriebener Zytokine und ihrer Rezeptoren untersucht werden, um eine Abgrenzung der aseptischen Lockerung von einer septischen Lockerung zu ermöglichen.

Dazu sollte eine Technik der effizienten mRNA-Isolierung aus den gewonnenen inhomogenen Gewebeproben etabliert werden.

Weiter sollte die notwendige mRNA-Menge bestimmt werden, die nach cDNA-Synthese eine aussagekräftige PCR mit anschließender semiquantitativer Auswertung ermöglicht.

Daran anschließend sollte die Vergleichbarkeit von Gewebeproben aus einer Pseudomembran überprüft werden, um die Auswirkung der Heterogenität der Pseudomembran auf die Messergebnisse zu bestimmen.

Anschließend sollten Gewebeproben aus Pseudomembranen aseptischer Genese und septischer Genese auf die mRNA-Expression der verschiedenen Zytokine und Rezeptoren untersucht werden, um einen möglichen Unterschied zwischen den Zytokinmustern darzustellen.

2 Material und Methoden

2.1 Patientengut

27 Patienten (9 männlich, 18 weiblich) wurden untersucht, davon 21 mit aseptischer und sechs mit septischer Endoprothesenlockerung (Tab. 2). Die aseptischen Gewebeproben wurden weiter unterteilt in solche mit (n=12) Zementfixation und ohne (n=9) Zementfixation. Präoperativ wurde eine Einverständniserklärung der Patienten eingeholt. Die Ursache der Prothesenlockerung wurde postoperativ anhand histopathologischer Befunde und mikrobiologischer Abstrichuntersuchungen bestimmt.

Das Durchschnittsalter bei Revision betrug $72,5 \pm 6,6$ Jahre. Der Median der Zeitspanne zwischen Erstoperation und Revision betrug bei septischen Prothesenlockerungen 22 Monate, bei aseptischen 143 Monate.

2.2 Gewinnung des Untersuchungsmaterials

Die Gewebeproben wurden aus dem radiologisch nachgewiesenen periprothetischen Osteolysesaum intraoperativ gewonnen und sofort in sterilen Eppendorf-Cups in flüssigem Stickstoff bei -195° Celsius schockgefroren und zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

Tabelle 2: Patientendaten

Name	Geschlecht	Alter bei Revision in Jahren	Zeit bis Revision (in Monaten)	Grund der Prothesenlockerung	OP-Indikation	Fixation
S.W.	m	68	103	aseptisch	COA li	Zement
G.M.	w	76	159	septisch	COA li n. Dysplasie	Zement
G.M.	m	69	119	aseptisch	COA bds	Zement
K.H.	w	72	182	aseptisch	Hüftkopfnekrose li	kein Zement
B.W.	m	80	213	aseptisch	COA li	Zement
S.W.	m	68	189	aseptisch	COA re	Zement
H.F.	m	75	159	aseptisch	COA re	Zement
R.T.	m	76	131	aseptisch	COA re	Zement
H.G.	w	59	69	aseptisch	COA li n. Dysplasie	kein Zement
H.M.	w	77	176	aseptisch	COA bds	kein Zement
D.G.	w	63	202	aseptisch	COA li n. Dysplasie	Zement
S.G.	m	76	109	aseptisch	COA bds	Zement
F.E.	w	77	91	aseptisch	COA re	Zement
S.M.	m	70	3	aseptisch	COA li	kein Zement
B.T.	w	71	18	septisch	COA re	Zement
F.E.	w	85	144	aseptisch	COA li	Zement
H.K.	m	68	24	septisch	COA re	Zement
B.H.	w	78	143	aseptisch	COA re	kein Zement
P.I.	w	78	338	aseptisch	COA bds	kein Zement
H.I.	w	69	188	aseptisch	COA li	kein Zement
S.I.	w	65	107	aseptisch	COA li	Zement
R.B.	w	66	170	aseptisch	COA li	kein Zement
S.E.	w	84	20	septisch	COA re	Zement
W.I.	w	67	78	aseptisch	COA re	kein Zement
F.K.	w	81	8	septisch	Schenkelhalsfr. li	Zement
S.B.	w	70	96	septisch	COA li	Zement
E.M.	w	70	109	aseptisch	COA li	Zement

COA: Coxarthrose; Schenkelhalsfr.: Schenkelhalsfraktur; li: links; re: rechts; bds: beidseits

2.3 RNA-Isolierung

- 1) Unter Stickstoff-gekühlten Bedingungen wurden etwa 80 mg inhomogenes Gewebematerial zusammen mit einer Mahlkugel in einen Schüttelbehälter eingebracht und im Dismembrator bei 2500 U/min 4x für 1 min, mit intermittierender Kühlung in flüssigem Stickstoff, zerkleinert.
- 2) 2 ml RLT - Puffer wurden mit 20 µl β-Mercaptoethanol vermischt.
- 3) Jeweils 1 ml der RLT - Puffer - Mercaptoethanol - Lösung wurden in eine Hälfte des geöffneten, mit pulverisiertem Gewebematerial gefüllten Schüttelbehälters gegeben. Darin gefror die Lösung, taute auf und konnte dann bei Raumtemperatur weiter verarbeitet werden.
- 4) Die Weiterverarbeitung erfolgte nach dem abgewandelten Protokoll des RNEasy-Kits (Quiagen, Hilden):
 - a. Zentrifugation des Lysats in der Zentrifuge über 3 min bei 12000 Umdrehungen / Minute.
 - b. Abpipettieren des Überstandes in ein 15-ml Reagenzröhrchen
 - c. Zugabe von 2 ml Ethanol (70 %) und Mischen mit Hilfe der Pipette.
 - d. Einbringen von jeweils 700 µl auf die RNEasy Minisäule, die auf einem 2-ml-Sammelröhrchen sitzt, und zentrifugieren über 15 Sekunden bei 8000 Umdrehungen / Minute, Abwurf des Überstandes.
 - e. Wiederholen des Vorgangs bis zur vollständigen Verwendung des Ethanol-Lysat-Gemisches
 - f. 700 µl RW1-Puffer auf die RNEasy Minisäule pipettieren, Zentrifugation über 15 Sekunden bei 8000 Umdrehungen / Minute.
 - g. Abwurf von Überstand und Sammelröhrchen
 - h. Verwendung eines neuen Sammelröhrchens und Pipettierung von 500 µl RPE-Puffer auf die RNEasy Minisäule, Zentrifugation über 2 Minuten bei 12000 Umdrehungen / Minute.
 - i. Abwurf von Überstand und Sammelröhrchen

- j. Verwendung eines neuen Sammelröhrchens. Zentrifugation über 1 Minute bei 12000 Umdrehungen / Minute.
 - k. Einbringen der RNEasy Minisäule auf ein 1,5-ml-Sammelröhrchen . Pipettieren von 50 μ l RNase-freiem Wasser auf die Minisäule und Zentrifugation über 1 Minute bei 8000 Umdrehungen / Minute.
- 5) Einfrieren des Sammelröhrchens mit RNA bei -80° Celsius.

Die Konzentration der gewonnenen Gesamt-RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm bestimmt. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm gab Auskunft über die Reinheit und Unversehrtheit der RNA. Dafür wurden 5 μ l des RNA-haltigen Wassers in eine Eppendorf-Kuvette pipettiert, mit 45 μ l Aqua dest. gründlich vermischt, und, nach Abgleich mit einer Leerprobe, im BioPhotometer gemessen. Eine Absorption von 1,0 entsprach dabei einer Konzentration von 40,0 μ g RNA/ml.

2.4 cDNA – Synthese

Jeweils 13 μ l RNA / Aqua dest. Gemisch mit identischer RNA-Konzentration ($c=501,8$ ng / μ l) wurde mit 1 μ l Oligo- dt-Primer in einem sterilen Eppendorf-Cup (1,5 ml) bei 70° C für 10 Minuten inkubiert, auf Eis für 5 min gekühlt und anschließend zentrifugiert (1000 Umdrehungen / Minute, 15 Sekunden).

Nach Zugabe von je 4 μ l 5x – Puffer, 1 μ l dNTP-Mix und 1 μ l Reverse Transcriptase, wurde das Reagenz bei 42° C für 50 Minuten inkubiert. Danach wurde die gewonnene cDNA sofort weiterverwendet oder bei -20° C zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation der untersuchten cDNA - Abschnitte erfolgte mit der Polymerase - kettenreaktion (Saiki, 1988), deren drei Phasen (Denaturierung, Annealing, Extension) in einem Thermocycler zyklisch durchlaufen wurden.

Zunächst wurde die zu amplifizierende cDNA durch Hitzezufuhr (94 °C) denaturiert und in Einzelstränge überführt, wobei zum ersten Zyklus die cDNA schon einsträngig vorlag, und die Denaturierung somit erst in den nachfolgenden Zyklen notwendig war.

Den Startpunkt der Neusynthese bildeten synthetische Oligonukleotide (Primer), die die entsprechende cDNA - Region flankierten. Durch primerspezifische Senkung der Temperatur auf Werte zwischen 50 und 65 °C wurde ihnen die Anlagerung, das sog. Annealing an die Ursprungs - DNA ermöglicht. Die Annealingtemperatur ergab sich aus den Schmelztemperaturen T_m der jeweils verwendeten Primer (Tab. 3), und wurde so gewählt, daß sie 4 °C unter der niedrigeren der beiden Schmelztemperaturen lag.

Die Extension erfolgte durch die Synthese eines komplementären Stranges an der DNA - Matrix bei 72 °C, dem Temperaturoptimum der hitzestabilen Taq-Polymerase. Aus der Anlagerung der hinzugefügten dNTPs (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) resultierte die exponentielle Vervielfältigung des Amplifikationsbereiches.

Die Zykluszahl wurde so gewählt, daß die Reaktion nicht in der Sättigungsphase der exponentiellen Vervielfältigung endete. Dies war die Voraussetzung für die Auswertung mit Hilfe der semiquantitativen Densitometrie.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Primer

Gen	Primersequenz	Größe PCR-Produkt	Accession Nr.	Genabschnitt
β-Aktin (sense)	5' CGGGAAATCGTGCGTGACAT 3'	712 bp	NM_001101	698-716
β-Aktin (antisense)	5' GAACTTTGGGGGATGCTCGC 3'			1381-1400
IL-1α (sense)	5' GGCCATCGCCAATGACTCAGAGG 3'	324 bp	NM_000575	1254-1276
IL-1α (antisense)	5' GCACTGGTTGGTCTTCATCTTGG 3'			1545-1567
IL-1β (sense)	5' GAAGTACCTGAGCTCGCCATGGAA 3'	376 bp	NM_000576	94-112
IL-1β (antisense)	5' CGTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG 3'			439-462
IL-1 RA (sense)	5' GGGATGTTAACCAGAAGACC 3'	300 bp	NM_000577	194-213
IL-1 RA (antisense)	5' CGGGGCAGGCGGCAGACT 3'			482-499
IL-1 R1 (sense)	5' GCCAAGAGTTCTTTAGGTGCC 3'	450 bp	NM_000877	1805-1825
IL-1 R1 (antisense)	5' CTCACTGCAACCTCCGTCTC 3'			2226-2245
TNF-α (sense)	5' AGCTGCCAGGCAGGTTCTCTTCC 3'	450 bp	NM_000594	97-119
TNF-α (antisense)	5' GGTTATCTCTCAGCTCCACGCCA 3'			514-536
TNF R1 (sense)	5' CACCTCCAGCTCCACCTATAC 3'	222 bp	NM_001065	1160-1180
TNF R1 (antisense)	5' ACCACGGCGTACAGCGTCGC 3'			1300-1319
TNF R2 (sense)	5' CTTACCCCCAGCCAGTGTCCA 3'	287 bp	NM_001066	738-753
TNF R2 (antisense)	5' TTATCGGCAGGCAAGTGAGG 3'			990-1009
CCR1 (sense)	5' CAACTCCGTGCCAGAAGGTGAA 3'	209 bp	NM_001295	133-154
CCR1 (antisense)	5' CCAGAAGGGAAGCGTGAACAGGAAGAGCA 3'			313-341

IL-1α: Interleukin-1α; IL-1β: Interleukin-1β; IL-1 RA: Interleukin-1 Rezeptorantagonist; IL-1 R1: Interleukin-1 Rezeptor 1

TNF-α: Tumor Nekrose Faktor α; TNF R1: Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 1; TNF R2: Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 2

CCR1: CC-Chemokinrezeptor 1

Die PCR wurde unter folgenden Bedingungen (Tab. 4 und 5) durchgeführt:

Tabelle 4: PCR-Bedingungen

Vorgang	Bedingungen
Denaturierung	94 °C, 3 Min
Denaturierung	94 °C, 30 Sek.
Annealing	55 - 64 °C, 30 Sek.
Extension	72 °C, 1 Min.
Abschlussexension	72 °C, 5 Min
Zykluszahl	35 / 25 für β -Aktin

Tabelle 5: Pipettierschema (Mastermix)

Reagenzien	Volumen
Taq – Polymerase	0,5 μ l
Primermix	2 μ l (je 1 μ l genspezifischen Sense / Antisense – Primer, 5 pmol / μ l)
dNTP	1 μ l
10 x Puffer	3 μ l
Aqua dest.	22,5 ml

2.6 Gelelektrophorese

Die cDNA-Fragmente wurden je nach ihrer Größe auf 1,5 prozentigen Agarosegelen aufgetrennt. Die Agarose wurde in 1xTBE durch kurzes Aufkochen gelöst und mit Ethidiumbromid (1 μ g/ml) versetzt. Nach dem Erhärten in einer entsprechenden Form wurde das Gel in einer Elektrophoresekammer mit 1xTBE überschichtet. Die cDNA wurde mit 1/10 Vol. DNA – Farbpuffer gemischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Auftrennung erfolgte in der Elektrophorese – Kammer bei 140 V für 45 min parallel zu DNA-Markern bekannter Größe.

2.7 Semiquantitative Densitometrie

Durch Vorversuche wurde sichergestellt, daß sich die Amplifikationsreaktion der PCR nicht in der Sättigungsphase der exponentiellen Vervielfältigung befand.

Die DNA – Produkte wurden mit dem UV – Licht - Transilluminator der Firma LTF sichtbar gemacht und digitalisiert. Die densitometrische Auswertung der Gel - Bilder erfolgte mit dem Programm Bio I.D.

2.8 Statistik

Für die statistische Auswertung der Ergebnisse wurden der zweiseitige U-Test nach Mann, Whitney und Wilcoxon mit $p < 0,05$, sowie der Median-Test mit Chi-Quadrat-Verteilung verwendet.

Zur Berechnung und Aufbereitung der Ergebnisse wurde das Programm Microsoft Excel 2000 genutzt.

2.9 Verwendetes Material

RNA-Isolierung

RNEasy-Kit Nr. 74106	Quiagen, Hilden
β -Mercaptoethanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Ethanol 70 %	Merck, Darmstadt
Analysenwaage SPO 51	Scaltec, Heiligenstadt
Mikrodismembrator Braun Biotech S	B.Braun Biotech, Melsungen
Schüttelbehälter PTFE 3 ml	B.Braun Biotech, Melsungen
Mahlkugel, Chromstahl, \varnothing 3 mm	B.Braun Biotech, Melsungen
Mirkozentrifuge – Biofuge	Heraeus , Osterode

Spektrometrie

BioPhotometer	Eppendorf, Hamburg
Thermalprinter DPU 414	Seiko, Japan
UV-Kuvette	Eppendorf, Hamburg

cDNA-Synthese

Oligo-dt-Primer	Promega, Mannheim
5 x Puffer	Promega, Mannheim
dNTP - Mix	Promega, Mannheim
Reverse-Transcriptase	Promega, Mannheim

Primer	MWG Biotech
Heizblock BBA2	Grant-Boeckel, England

Polymerase Chain Reaction

dNTP – Mix	Promega, Mannheim
10 x Puffer	Amersham, Freiburg
Taq-Polymerase Nr. 27-0799	Amersham, Freiburg
PCR-Multicycler PTC 200	MJ Research, USA

Gelelektrophorese

10 x TBE-Puffer (1000 ml):	
108 g Tris-Base	Merck, Darmstadt
55 g Basic Acid	Merck, Darmstadt
40 ml EDTA 0,5 ml pH 8,0	Sigma Aldrich, Steinheim
Aqua dest. 1000 ml	
Agarose GTQ	Carl Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid 10mg / ml	Sigma Aldrich, Steinheim

DNA-Farbstoff (Dye):

30 % Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim
0,1 M EDTA pH 8,0	Sigma Aldrich, Steinheim
1 % SDS	Sigma Aldrich, Steinheim
0,25 % Bromphenolblau	Sigma Aldrich, Steinheim
0,25 % Xylene Cyanol	Sigma Aldrich, Steinheim
Aqua dest.	
Elektrophorese-Kammer	Owl Separation System, USA
Spannungsgerät Consort E 835	Consort, Belgium

Bildgebende Verfahren

UV-Transilluminator mit Video Camera Modul LTF, Wasserburg

Thermoprinter P 91 LTF, Wasserburg

Computer Pentium III, 750 mHz LTF, Wasserburg

Software:

Windows 98 Microsoft, USA

BioProfil Bio I.D., Version 99 LTF, Wasserburg

BioCapt MW, Version 99 LTF, Wasserburg

Verbrauchsmaterial

Reaktionsgefäße 2 ml, 15 ml, steril Sarstedt, Nümbrecht

Pipetten, autoklaviert Brand, Wertheim

Nitril – Handschuhe Ansell, USA

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung der RNA-Isolierung

In Voruntersuchungen wurde die optimale mRNA-Isolieretechnik bestimmt. Hierbei wurden die Gewebeproben unter Stickstoff-gekühlten Bedingungen mit Hilfe eines Mahlbehälters zerkleinert, da aufgrund der Inhomogenität der Gewebeproben mit teilweise knöchernen Bestandteilen eine mRNA-Isolierung durch lediglich Zugabe von Lysepuffer nicht hinreichend war. Hiermit konnte dann die notwendige mRNA-Konzentration von > 30 ng/ml erreicht werden. Die Unversehrtheit der danach gewonnenen cDNA wurde mit Hilfe der Bestimmung von Aktin nachgewiesen. Die densitometrischen Werte von Aktin wurden auch zur Normierung der einzelnen Proben verwendet, indem ein Probenwert als Referenzwert bestimmt wurde und die anderen Werte dazu in Relation gesetzt wurden.

3.2 Reproduzierbarkeit der RNA - Isolierung

Um die Vergleichbarkeit von Gewebeproben aus einer Pseudomembran zu überprüfen, wurden jeweils drei Gewebeabschnitte einer Pseudomembran untersucht. Geprüft wurden die Pseudomembranen sowohl von septischen als auch von zementierten und unzementierten aseptischen Prothesenlockerungen. Der Mittelwert des relativen Variationskoeffizienten aller untersuchten Gewebetripel betrug $\mu_{\text{ges}}=0,22$, die Standardabweichung $\sigma_{\text{ges}}=0,12$ (vgl. Abb. 4 – 11). Nachfolgend sind die einzelnen PCR-Produkte für Zytokine und Rezeptoren dargestellt. Die Spezifität der Banden wurde durch DNA-Sequenzierung sichergestellt.

3.2.1 Aktin

Die Genexpression von Aktin (Abb. 4 a/b) zeigte sowohl die Unversehrtheit der eingesetzten cDNA als auch eine geringe Variationsbreite der septischen Proben. Die aseptischen Proben zeigten eine deutlichere Schwankungsbreite.

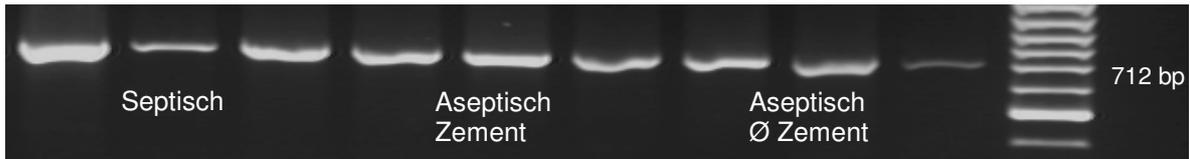


Abb. 4a: Genexpression von Aktin in jeweils drei Gewebeabschnitten von Pseudomembranen, deren Genese einer septischen, einer zementierten und einer unzementierten Prothesenlockerung zugrunde liegt.

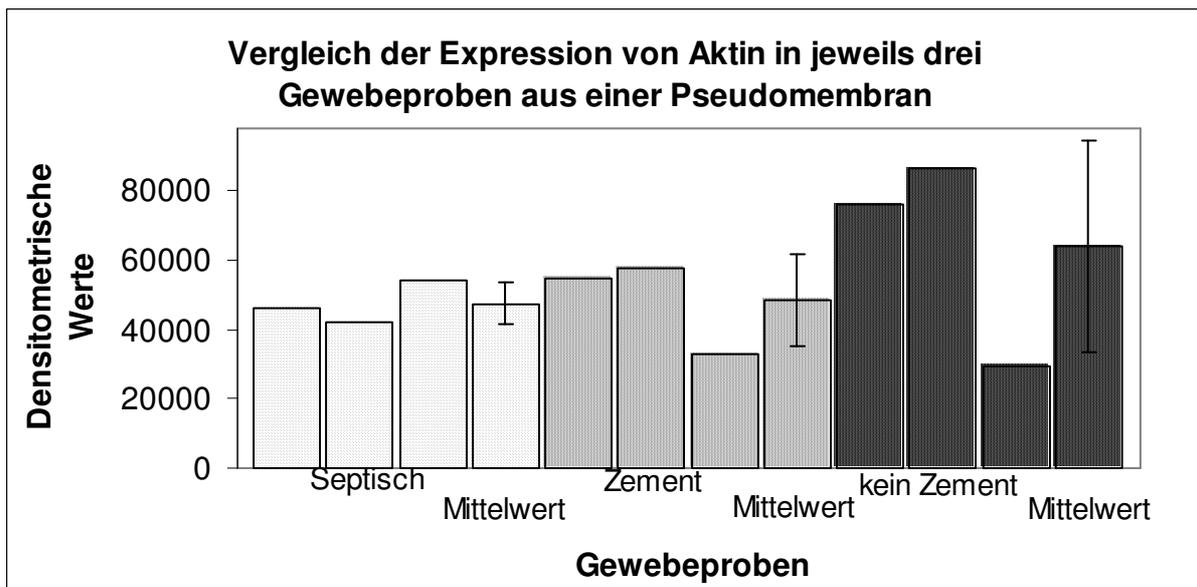


Abb. 4b: Densitometrisch ausgewertet auf die Aktin-Expression wurden drei Gewebeabschnitte einer Pseudomembran jeweils einer septischen, einer zementierten und einer unzementierten Prothesenlockerung. Dargestellt sind die Einzelwerte der Mittelwert und die Standardabweichung der drei Proben. $V_r(\text{sep})=0,06$; $V_r(\text{zem})=0,16$; $V_r(\text{unzem})=0,27$

3.2.2 IL-1 alpha

Die Genexpression von IL-1 α (Abb. 5 a/b) zeigte eine geringe Variationsbreite bei den aseptischen Proben, während die septischen Proben stärker variierten.

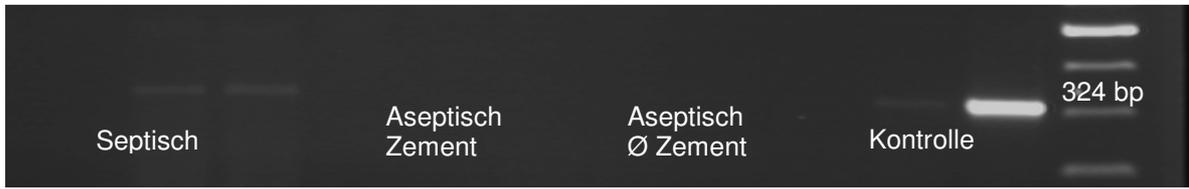


Abb. 5a: Genexpression von IL-1 α in jeweils drei Gewebeabschnitten von Pseudomembranen, die einer septischen, einer zementierten und einer unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Kontrolle: Genexpression von IL-1 α im *In-vitro*-Makrophagenmodell nach Partikelkontakt, nach 1 h und 6 h Kontaktzeit.

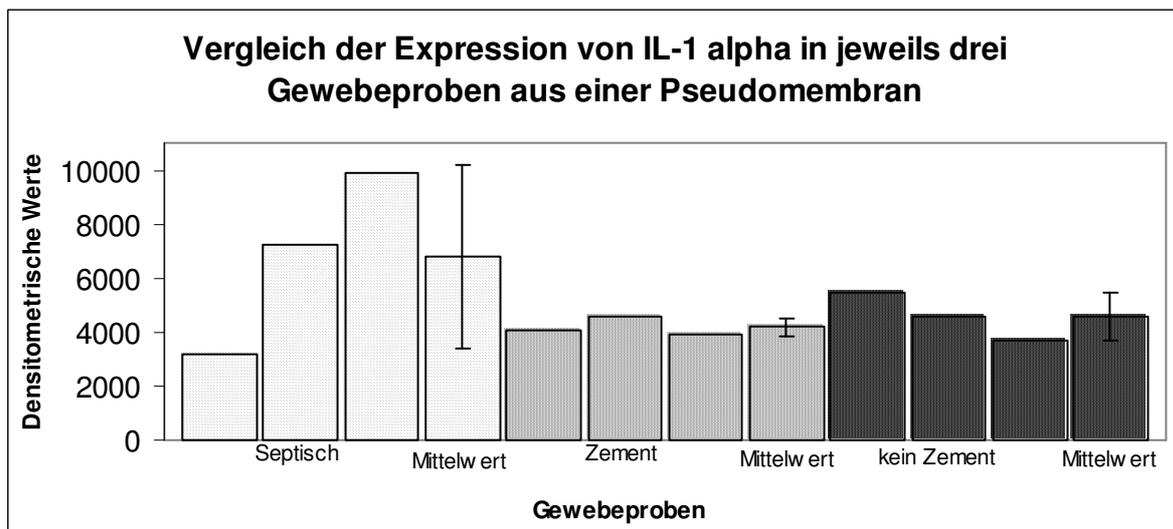


Abb. 5b: Die Genexpression von IL-1 α wurde bei drei Gewebeabschnitten einer Pseudomembran densitometrisch ausgewertet, die jeweils einer septischen, zementierten und unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte, der Mittelwert und die Standardabweichung der drei Proben. $V_r(\text{sep})=0,29$; $V_r(\text{zem})=0,05$; $V_r(\text{unzem})=0,11$

3.2.3 IL-1 RA

Der Variationskoeffizient von 0,22 bei den septischen Proben war höher (Abb. 6 a/b) als die Variationskoeffizienten (jeweils 0,13) des aseptischen Untersuchungsmaterials.

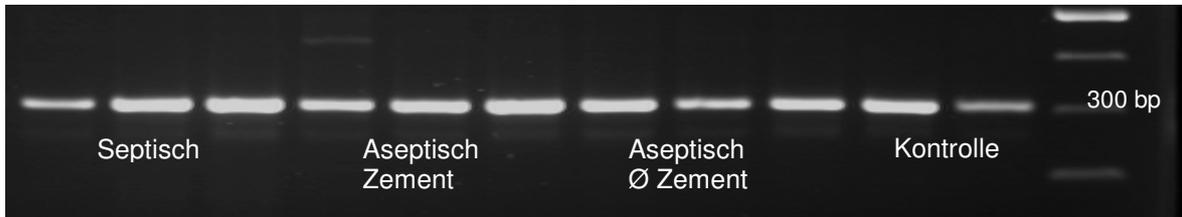


Abb. 6a: Genexpression von IL-1 RA in jeweils drei Gewebeabschnitten von Pseudomembranen, die einer septischen, einer zementierten und einer unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Kontrolle: Genexpression von IL-1 RA im *In-vitro*-Makrophagenmodell nach Partikelkontakt, nach 1 h und 6 h Kontaktzeit.

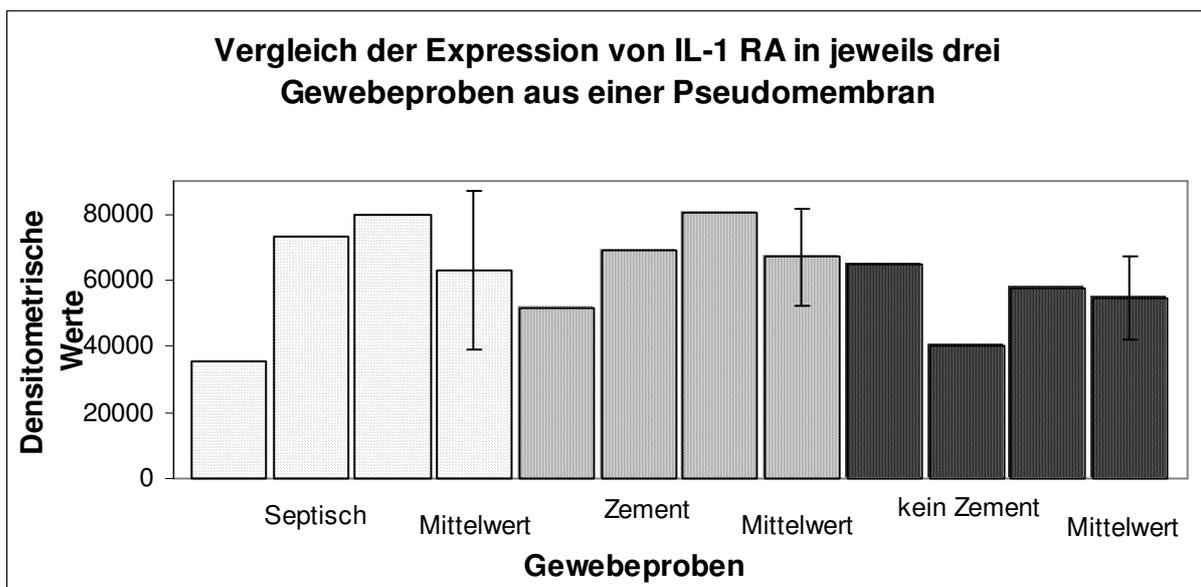


Abb. 6b: Densitometrisch ausgewertet auf die IL-1 RA Expression wurden drei Gewebeabschnitte einer Pseudomembran, die jeweils einer septischen, zementierten und unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte, der Mittelwert und die Standardabweichung der drei Proben. $V_r(\text{sep})=0,22$; $V_r(\text{zem})=0,13$; $V_r(\text{unzem})=0,13$

3.2.4 IL-1 R1

Die Variationsbreite der Genexpression (Abb. 7 a/b) fiel bei den unzementierten Proben am geringsten aus. Die zementierten und septischen Proben variierten stärker.

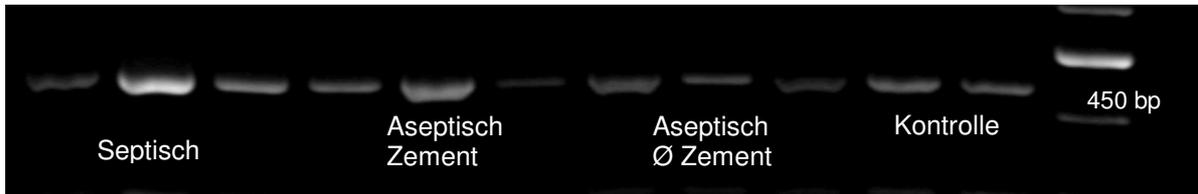


Abb. 7a: Genexpression von IL-1 R1 in jeweils drei Gewebeabschnitten von Pseudomembranen, die einer septischen, einer zementierten und einer unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Kontrolle: Genexpression von IL-1 R1 im *In-vitro*-Makrophagenmodell nach Partikelkontakt, nach 1 h und 6 h Kontaktzeit.

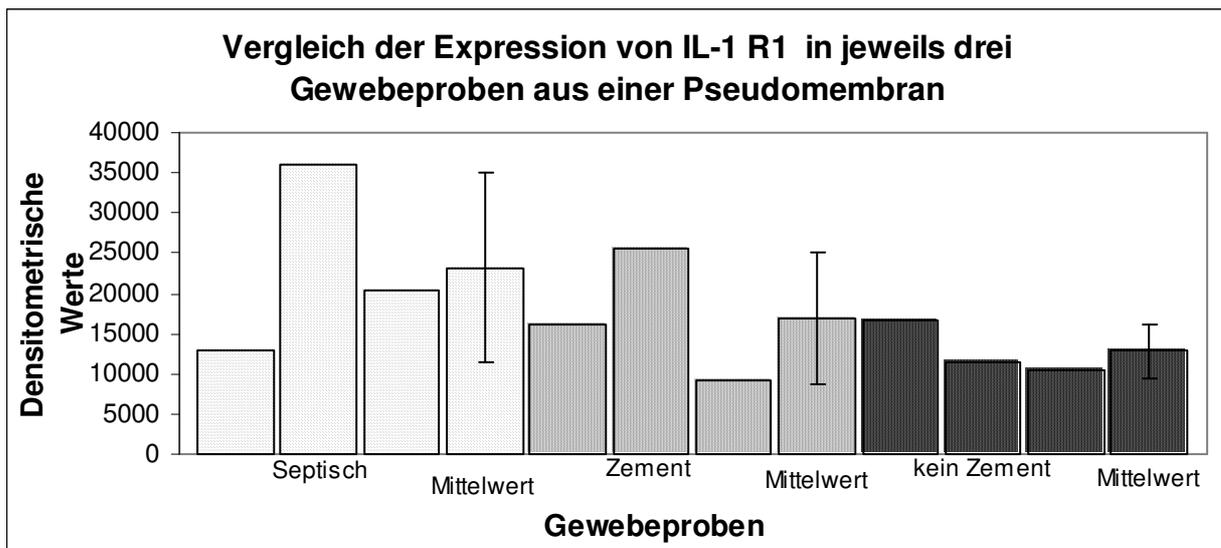


Abb. 7b: Die Genexpression von IL-1 R1 wurde bei drei Gewebeabschnitten einer Pseudomembran densitometrisch ausgewertet, die jeweils einer septischen, zementierten und unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Dargestellt sind jeweils die Einzelwerte, der Mittelwert und die Standardabweichung der drei Proben. $V_r(\text{sep})=0,29$; $V_r(\text{zem})=0,28$; $V_r(\text{unzem})=0,15$

3.2.5 TNF-alpha

Beim Vergleich der Expression von TNF- α (Abb. 8 a/b) zeigte sich ein Variationskoeffizient von 0,22 der septischen Proben. Die aseptischen Proben wiesen ähnliche Variationskoeffizienten (0,31; 0,20) auf.

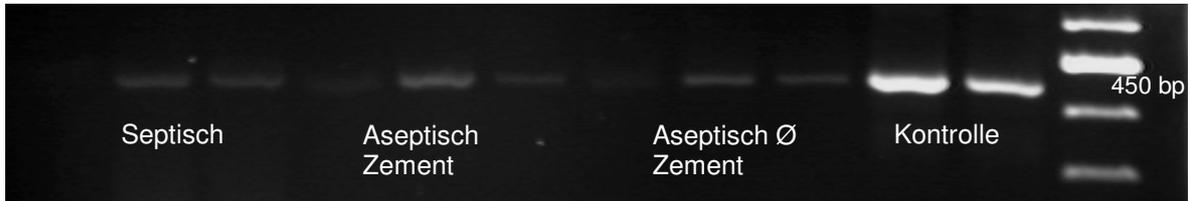


Abb. 8a: Genexpression von TNF- α in jeweils drei Gewebeabschnitten von Pseudomembranen, die einer septischen, einer zementierten und einer unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Kontrolle: Genexpression von TNF- α im *In-vitro*-Makrophagenmodell nach Partikelkontakt, nach 1 h und 6 h Kontaktzeit.

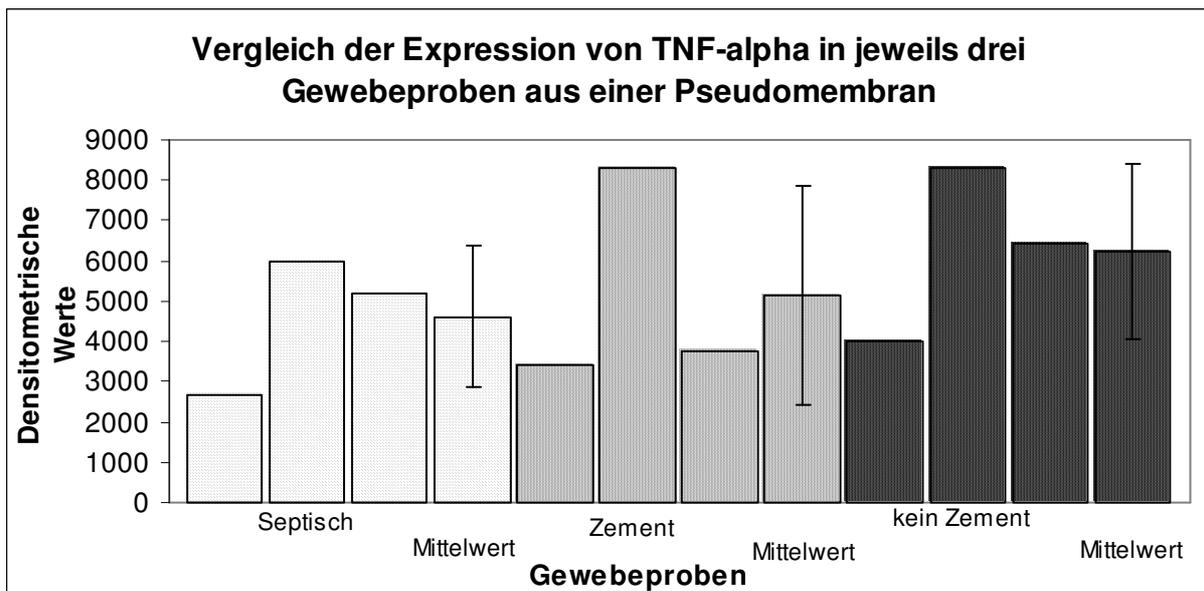


Abb. 8b: Densitometrisch ausgewertet auf die TNF- α -Expression wurden drei Gewebeabschnitte einer Pseudomembran jeweils einer septischen, zementierten und unzementierten Prothesenlockerung. Dargestellt sind die Einzelwerte, der Mittelwert und die Standardabweichung der drei Proben. $V_r(\text{sep})=0,22$; $V_r(\text{zem})=0,31$; $V_r(\text{unzem})=0,20$

3.2.6 TNF-R1

Die Genexpression von TNF-R1 (Abb. 9 a/b) zeigte eine starke Variationsbreite bei den septischen Proben im Vergleich mit den aseptischen.

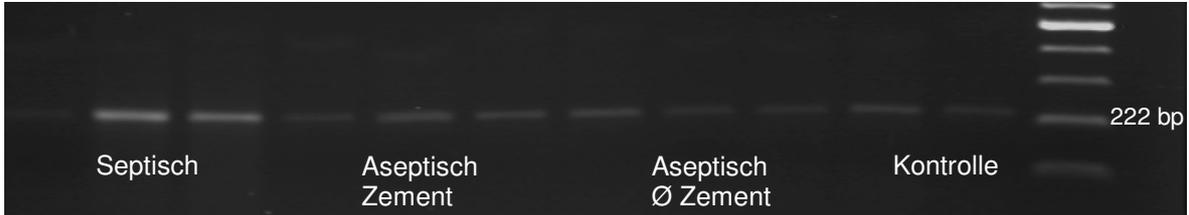


Abb. 9a: Genexpression von TNF-R1 in jeweils drei Gewebeabschnitten von Pseudomembranen, die einer septischen, einer zementierten und einer unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Kontrolle: Genexpression von TNF-R1 im *In-vitro*-Makrophagenmodell nach Partikelkontakt, nach 1 h und 6 h Kontaktzeit.

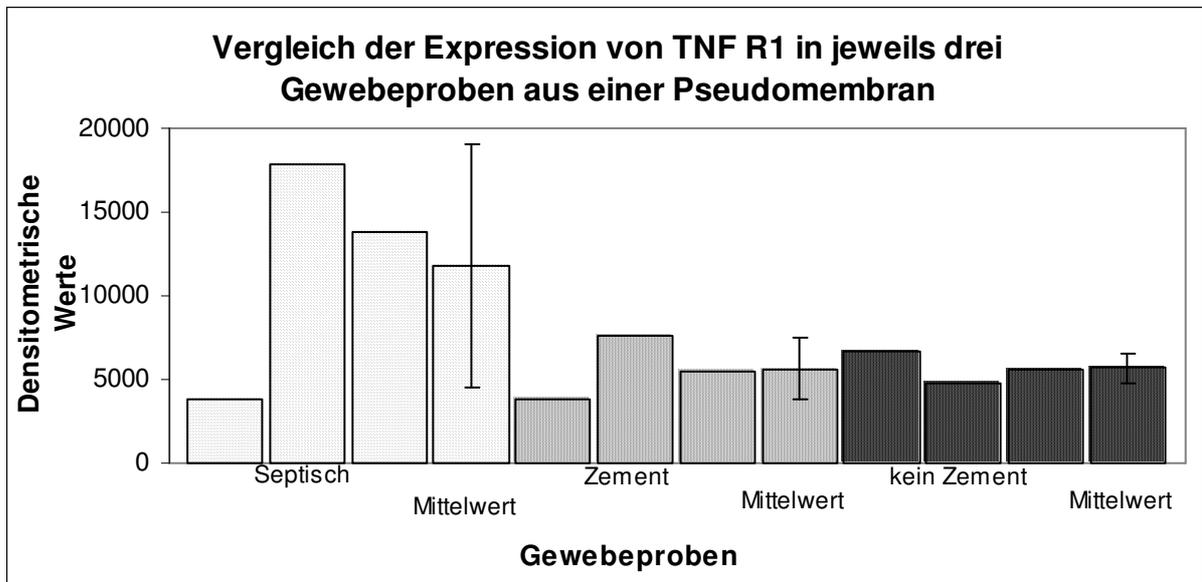


Abb. 9: Die Genexpression von TNF-R1 wurde bei drei Gewebeabschnitten einer Pseudomembran densitometrisch ausgewertet, die jeweils einer septischen, zementierten und unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Dargestellt sind die Einzelwerte, der Mittelwert und die Standardabweichung der drei Proben. $V_r(\text{sep})=0,36$; $V_r(\text{zem})=0,19$; $V_r(\text{unzem})=0,09$

3.2.7 TNF-R2

Der Variationskoeffizient (Abb.10a/b) von 0,46 bei den septischen Proben war erhöht, verglichen mit den Variationskoeffizienten (0,30; 0,06) der aseptischen Proben.

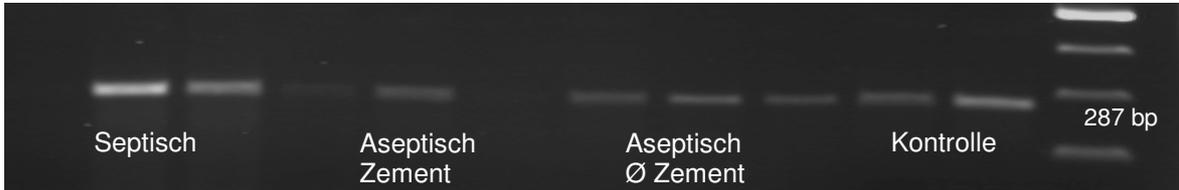


Abb. 10a: Genexpression von TNF-R2 in jeweils drei Gewebeabschnitten von Pseudomembranen, die einer septischen, einer zementierten und einer unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Kontrolle: Genexpression von TNF-R2 im *In-vitro*-Makrophagenmodell nach Partikelkontakt, nach 1 h und 6 h Kontaktzeit.

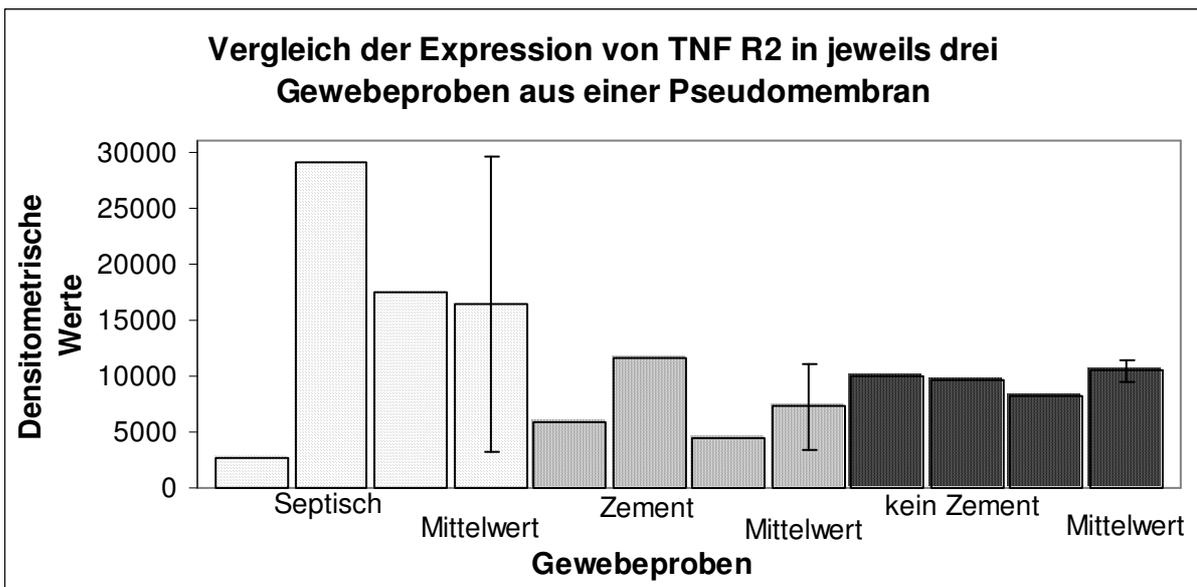


Abb. 10b: Densitometrisch ausgewertet auf die TNF R2-Expression wurden drei Gewebeabschnitte einer Pseudomembran jeweils einer septischen, zementierten und unzementierten Prothesenlockerung. Dargestellt sind die Einzelwerte, der Mittelwert und die Standardabweichung der drei Proben. $V_r(\text{sep})=0,46$; $V_r(\text{zem})=0,30$; $V_r(\text{unzem})=0,06$

3.2.8 CCR1

Beim Vergleich der Expression von CCR1 (Abb. 11 a/b) zeigte sich ein Variationskoeffizient von 0,40 der septischen Proben. Die aseptischen Proben wiesen einen niedrigeren Variationskoeffizienten (0,25; 0,03) auf.

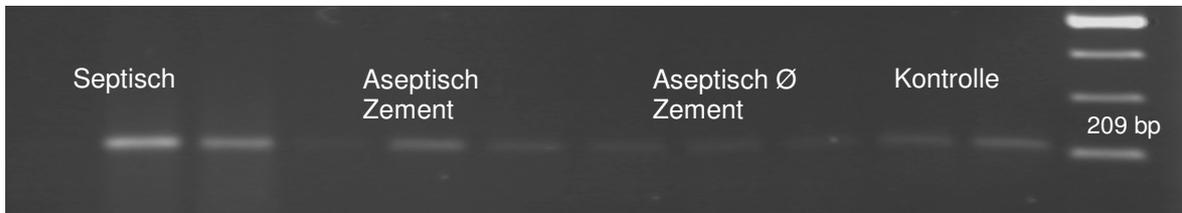


Abb. 11a: Genexpression von CCR1 in jeweils drei Gewebeabschnitten von Pseudomembranen, die einer septischen, einer zementierten und einer unzementierten Prothesenlockerung entstammen. Kontrolle: Genexpression von CCR1 im *In-vitro*-Makrophagenmodell nach Partikelkontakt, nach 1 h und 6 h Kontaktzeit.

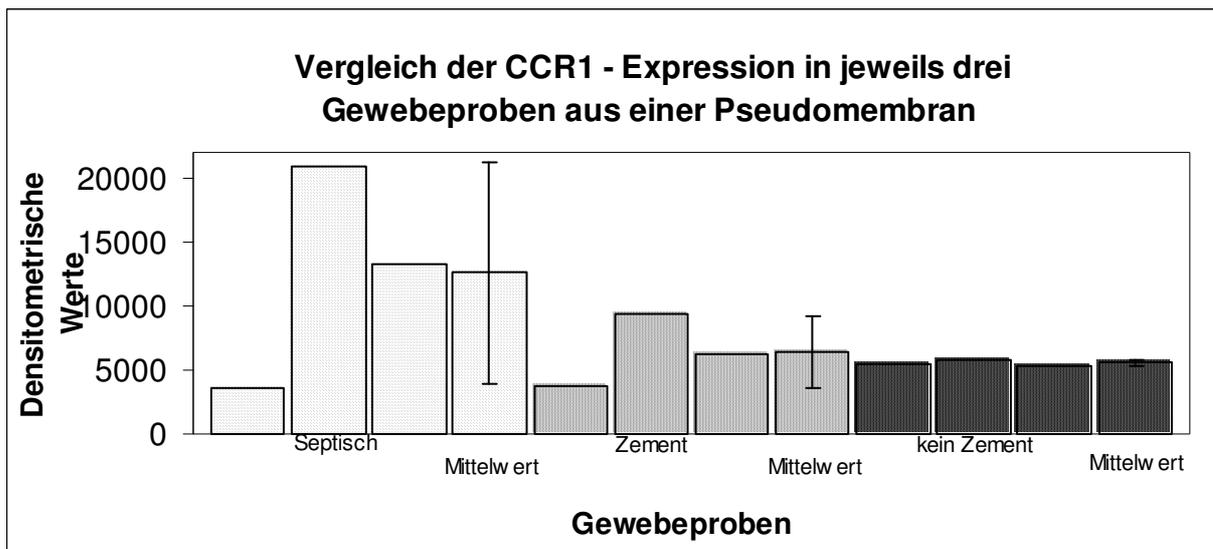


Abb. 11b: Densitometrisch ausgewertet auf die CCR1-Expression wurden drei Gewebeabschnitte einer Pseudomembran jeweils einer septischen, zementierten und unzementierten Prothesenlockerung. Dargestellt sind die Einzelwerte, der Mittelwert und die Standardabweichung der drei Proben. $V_r(\text{sep})=0,40$; $V_r(\text{zem})=0,25$; $V_r(\text{unzem})=0,03$

3.3 Vergleich der Zytokinmuster septischer und aseptischer Gewebeproben

21 Gewebeproben aus Pseudomembranen aseptischer Genese und 6 Gewebeproben septischer Genese wurden auf die mRNA-Expression der verschiedenen Zytokine und Rezeptoren untersucht. Die aseptischen Gewebeproben wurden nochmal differenziert in solche mit (n=12) und ohne (n=9) Zement-Fixation.

3.3.1 Aktin

In allen Vergleichsgruppen wurde Aktin (Abb. 12 a/b) auf hohem Niveau exprimiert. Signifikante Unterschiede waren nicht zu verzeichnen.

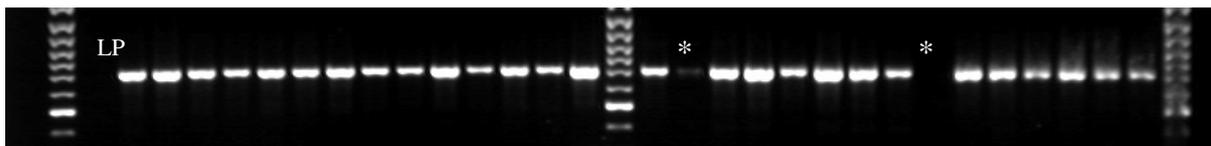


Abb. 12a: Genexpression von Aktin in insgesamt 28 Gewebeproben aus Pseudomembranen, davon 21 aseptischer Genese und 6 septischer Genese. LP: Leerprobe; * Unzureichende Genexpression, nicht in Versuchsreihe einbezogen

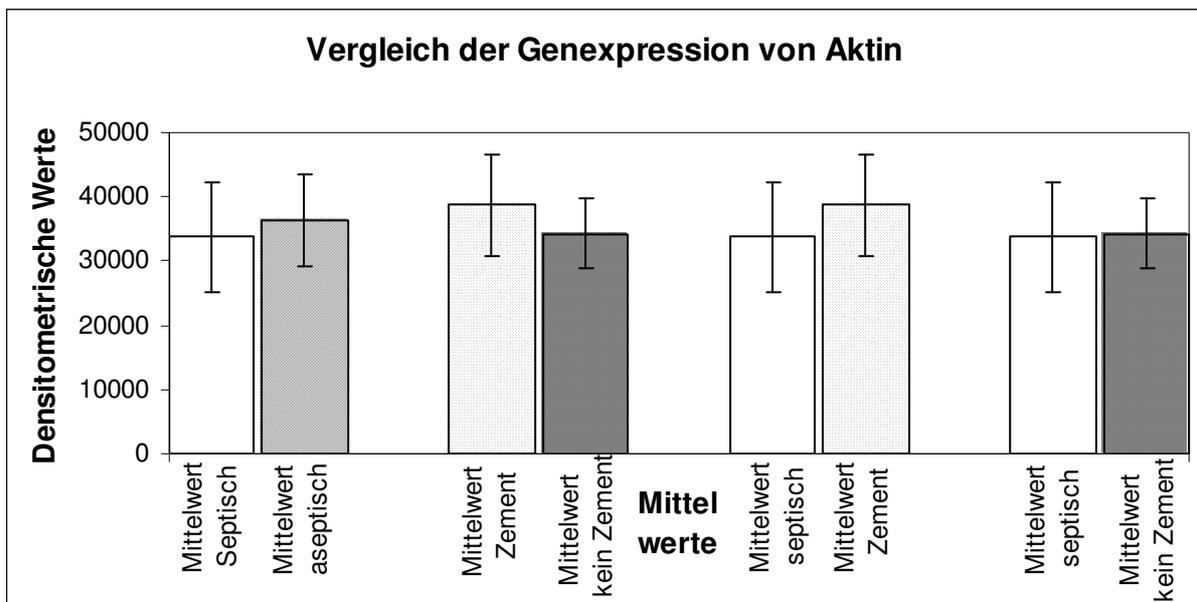


Abb. 12b: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen densitometrischer Werte, die die Genexpression von Aktin im Untersuchungsmaterial zeigen. n(septisch)=6; n(aseptisch)=21; n(Zement)=12; n(ØZement)=9

3.3.2 IL-1 alpha

In allen Vergleichsgruppen wurde IL-1 alpha (Abb.13 a/b) exprimiert. Der Mittelwert septisch war im Vergleich mit dem Mittelwert aseptisch sowie mit dem Mittelwert Zement um das 1,5fache signifikant ($p < 0,05$) erhöht.

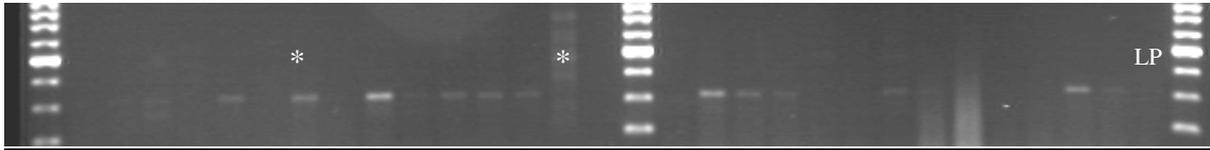


Abb. 13a: Genexpression von IL-1 α in insgesamt 28 Gewebeproben aus Pseudomembranen, davon 21 aseptischer Genese und 6 septischer Genese. LP: Leerprobe; * Unzureichende Aktin-Genexpression, nicht in Versuchsreihe einbezogen

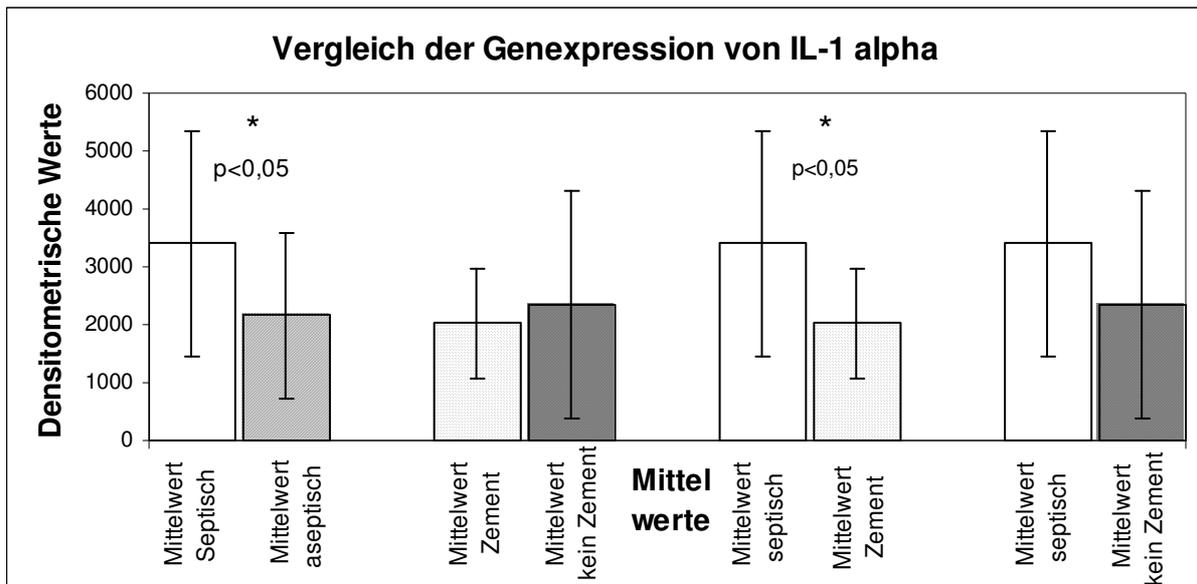


Abb. 13b: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen densitometrischer Werte, die die Genexpression von IL-1 α im Untersuchungsmaterial zeigen. Die Unterschiede von MW septisch – MW aseptisch, sowie MW septisch – MW Zement sind signifikant ($p < 0,05$). $n(\text{septisch})=6$; $n(\text{aseptisch})=21$; $n(\text{Zement})=12$; $n(\emptyset\text{Zement})=9$

3.3.3 IL-1 beta

Die Expression von IL-1 β (Abb. 14 a/b) war sich in allen vier Gruppen nachweisbar. Die Standardabweichung in der septischen Gruppe war erhöht aufgrund deutlicher Extremwerte.

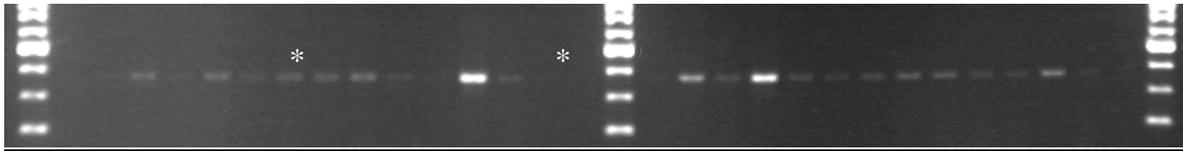


Abb. 14a: Genexpression von IL-1 β in insgesamt 28 Gewebeproben aus Pseudomembranen, davon 21 aseptischer Genese und 6 septischer Genese.
* Unzureichende Aktin-Genexpression, nicht in Versuchsreihe einbezogen

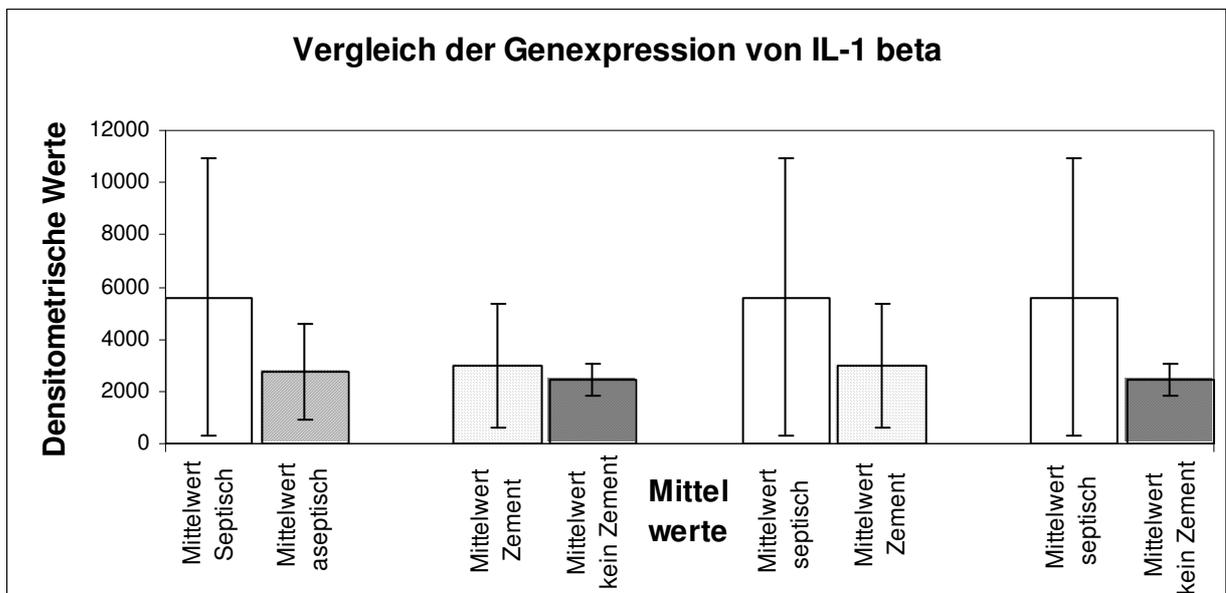


Abb. 14: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen densitometrischer Werte, die die Genexpression von IL-1 β im Untersuchungsmaterial zeigen. n(septisch)=6; n(aseptisch)=21; n(Zement)=12; n(ØZement)=9

3.3.4 IL-1 RA

In allen Vergleichsgruppen wurde IL-1 RA (Abb. 15 a/b) auf hohem Niveau exprimiert. Signifikante Unterschiede waren nicht zu verzeichnen.

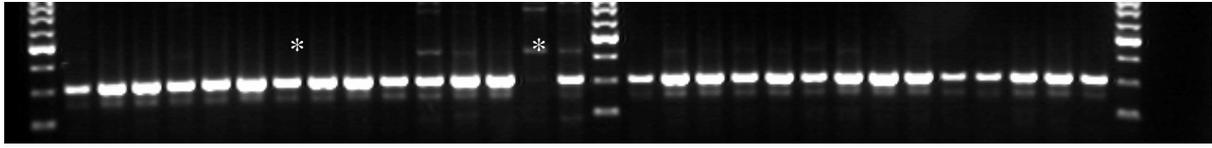


Abb. 15a: Genexpression von IL-1 RA in insgesamt 28 Gewebeproben aus Pseudomembranen, davon 21 aseptischer Genese und 6 septischer Genese.
* Unzureichende Aktin-Genexpression, nicht in Versuchsreihe einbezogen

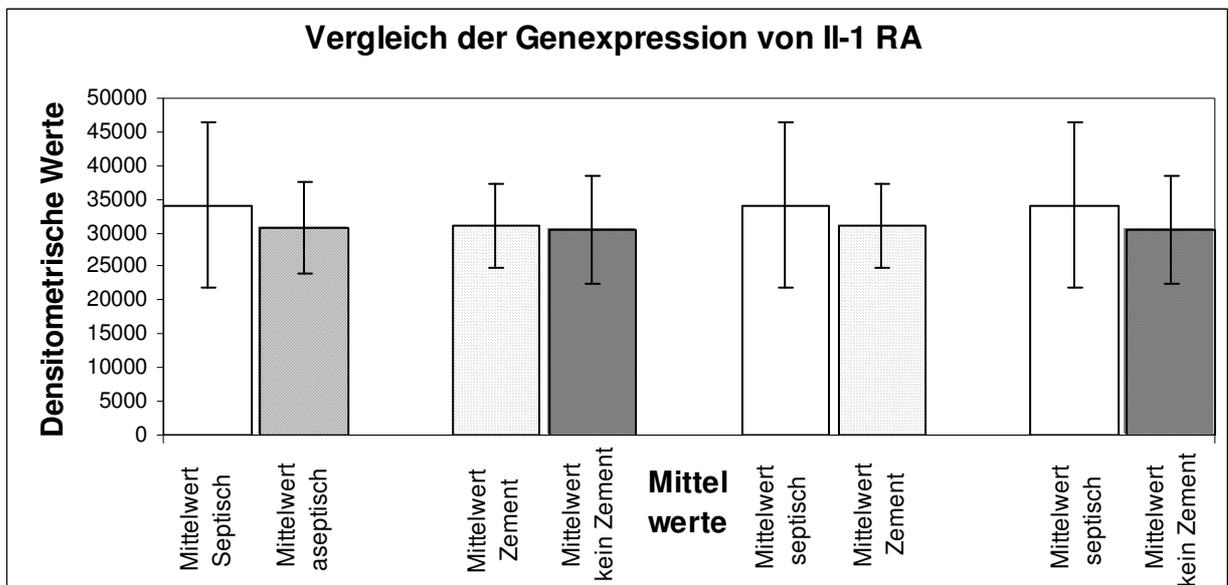


Abb. 15b: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen densitometrischer Werte, die die Genexpression von IL-1 RA im Untersuchungsmaterial zeigen. n(septisch)=6; n(aseptisch)=21; n(Zement)=12; n(ØZement)=9

3.3.5 IL-1 R1

Die Expressionsmuster von IL-1 R1 (Abb. 16 a/b) wiesen keine großen Unterschiede auf.

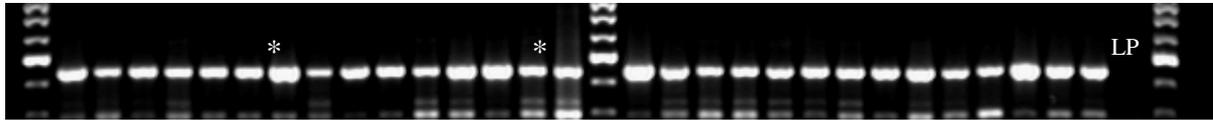


Abb. 16a: Genexpression von IL-1 R1 in insgesamt 28 Gewebeproben aus Pseudomembranen, davon 21 aseptischer Genese und 6 septischer Genese.

LP: Leerprobe; * Unzureichende Aktin-Genexpression, nicht in Versuchsreihe einbezogen

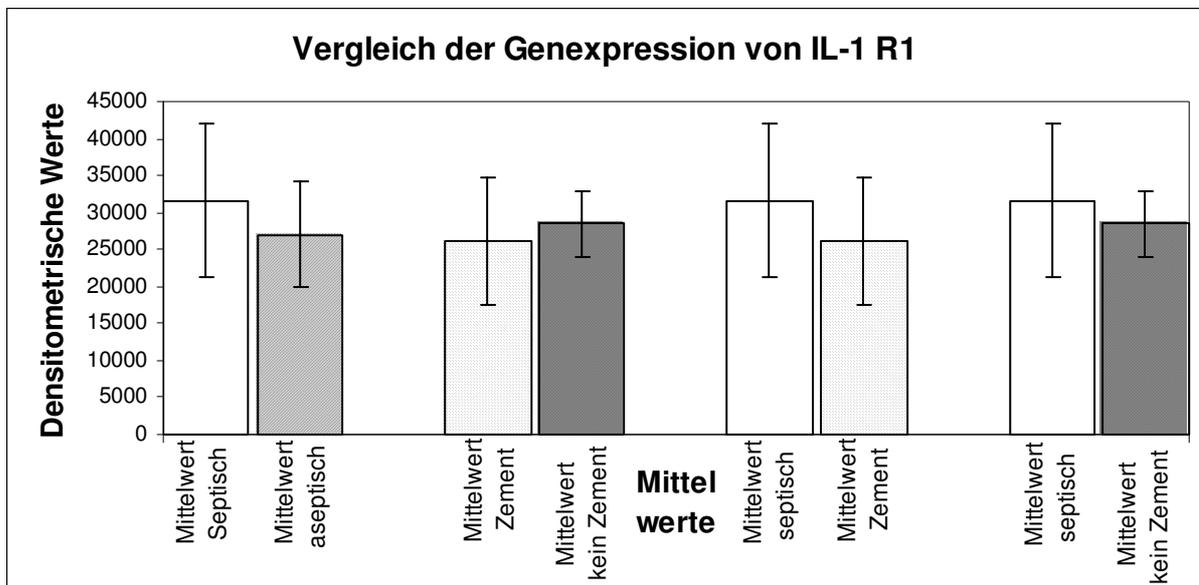


Abb. 16b: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen densitometrischer Werte, die die Genexpression von IL-1 RA im Untersuchungsmaterial zeigen. n(septisch)=6; n(aseptisch)=21; n(Zement)=12; n(ØZement)=9

3.3.6 TNF-alpha

Die Genexpression von TNF- α (Abb. 17 a/b) zeigte einen signifikanten Unterschied ($p < 0,05$) in den Gruppen Zement – kein Zement.

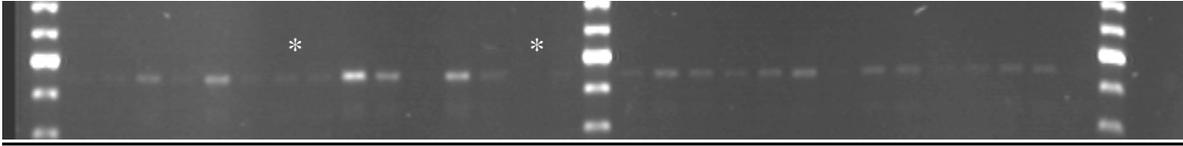


Abb. 17a: Genexpression von TNF- α in insgesamt 28 Gewebeproben aus Pseudomembranen, davon 21 aseptischer Genese und 6 septischer Genese.

* Unzureichende Aktin-Genexpression, nicht in Versuchsreihe einbezogen

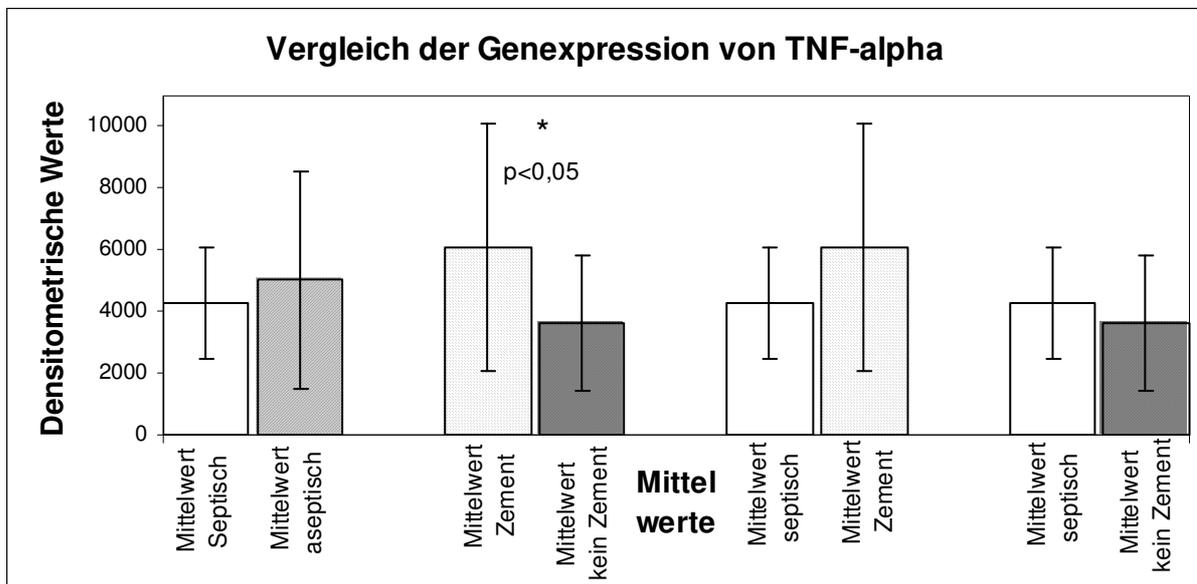


Abb. 17b: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen densitometrischer Werte, die die Genexpression von TNF- α im Untersuchungsmaterial zeigen. Der Unterschied MW Zement – MW kein Zement ist signifikant ($p < 0,05$). $n(\text{septisch})=6$; $n(\text{aseptisch})=21$; $n(\text{Zement})=12$; $n(\text{ØZement})=9$

3.3.7 TNF-R1

Bei allen vier Gruppen ließ sich die Genexpression von TNF-R1 (Abb. 18 a/b) nachweisen. Dabei wiesen die Vergleichsgruppen ähnliche Werte auf.

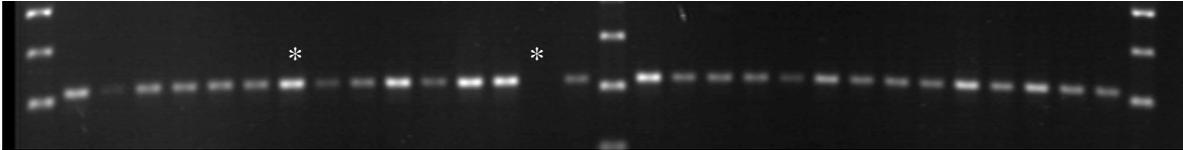


Abb. 18a: Genexpression von TNF-R1 in insgesamt 28 Gewebeproben aus Pseudomembranen, davon 21 aseptischer Genese und 6 septischer Genese.

* Unzureichende Aktin-Genexpression, nicht in Versuchsreihe einbezogen

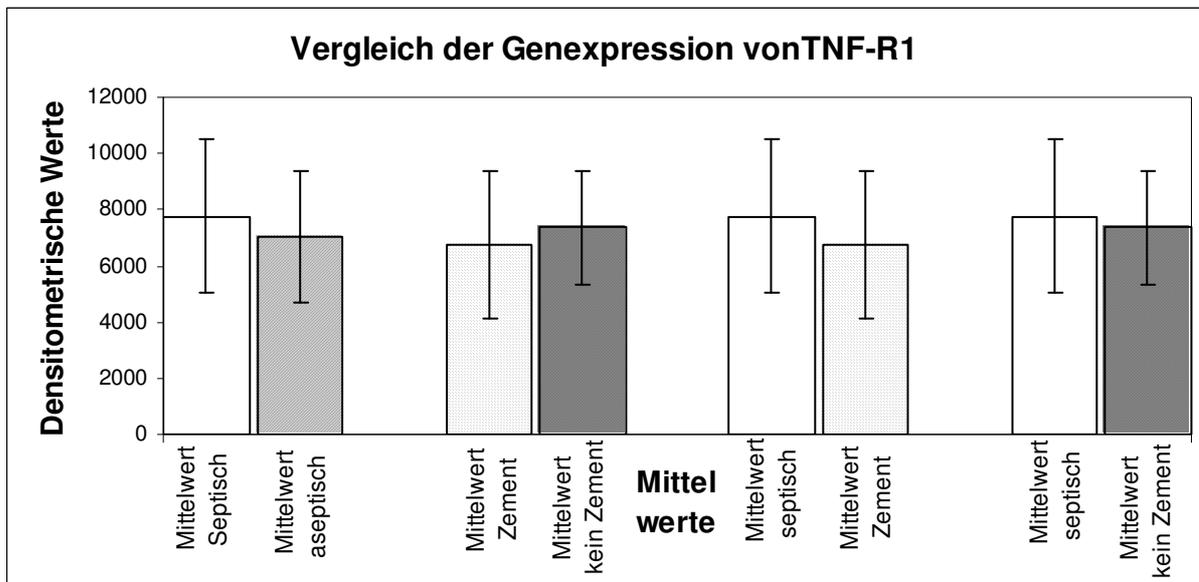


Abb. 18b: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen densitometrischer Werte, die die Genexpression von TNF-R1 im Untersuchungsmaterial zeigen. n(septisch)=6; n(aseptisch)=21; n(Zement)=12; n(ØZement)=9

3.3.8 TNF-R2

In allen Vergleichsgruppen stellte sich die Genexpression von TNF-R2 (Abb. 19 a/b) dar. Der Unterschied zwischen den Gruppen Zement - kein Zement war nicht signifikant.

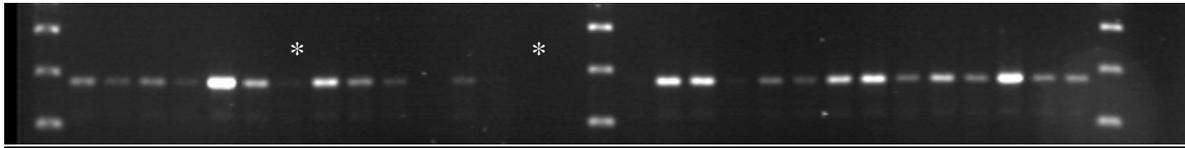


Abb. 19a: Genexpression von TNF-R2 in insgesamt 28 Gewebeproben aus Pseudomembranen, davon 21 aseptischer Genese und 6 septischer Genese.
* Unzureichende Aktin-Genexpression, nicht in Versuchsreihe einbezogen

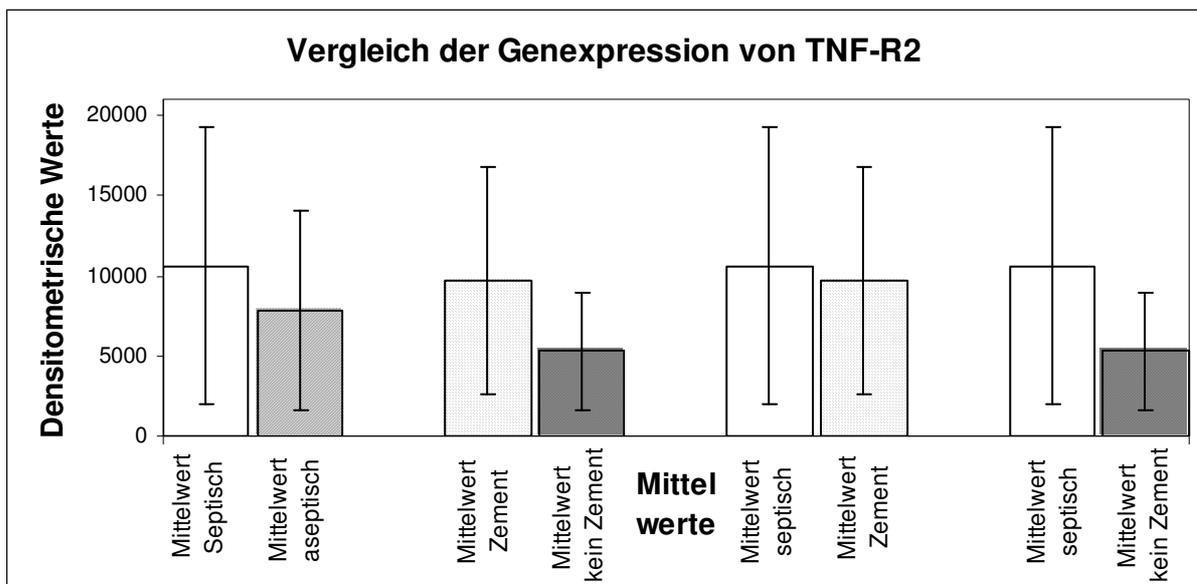


Abb. 19b: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen densitometrischer Werte, die die Genexpression von TNF-R2 im Untersuchungsmaterial zeigen. n(septisch)=6; n(aseptisch)=21; n(Zement)=12; n(ØZement)=9

3.3.9 CCR1

Bei allen vier Gruppen ließ sich die Genexpression von CCR1 (Abb. 20 a/b) nachweisen. Dabei wiesen die Vergleichsgruppen ähnliche Werte auf.

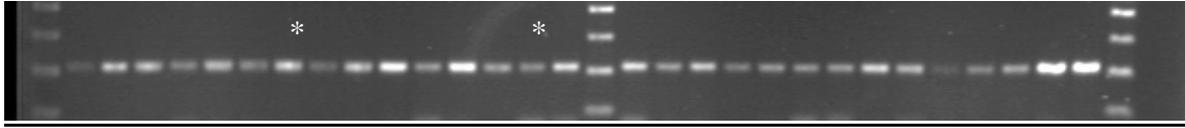


Abb. 20a: Genexpression von CCR1 in insgesamt 28 Gewebeproben aus Pseudomembranen, davon 21 aseptischer Genese und 6 septischer Genese.

* Unzureichende Aktin-Genexpression, nicht in Versuchsreihe einbezogen

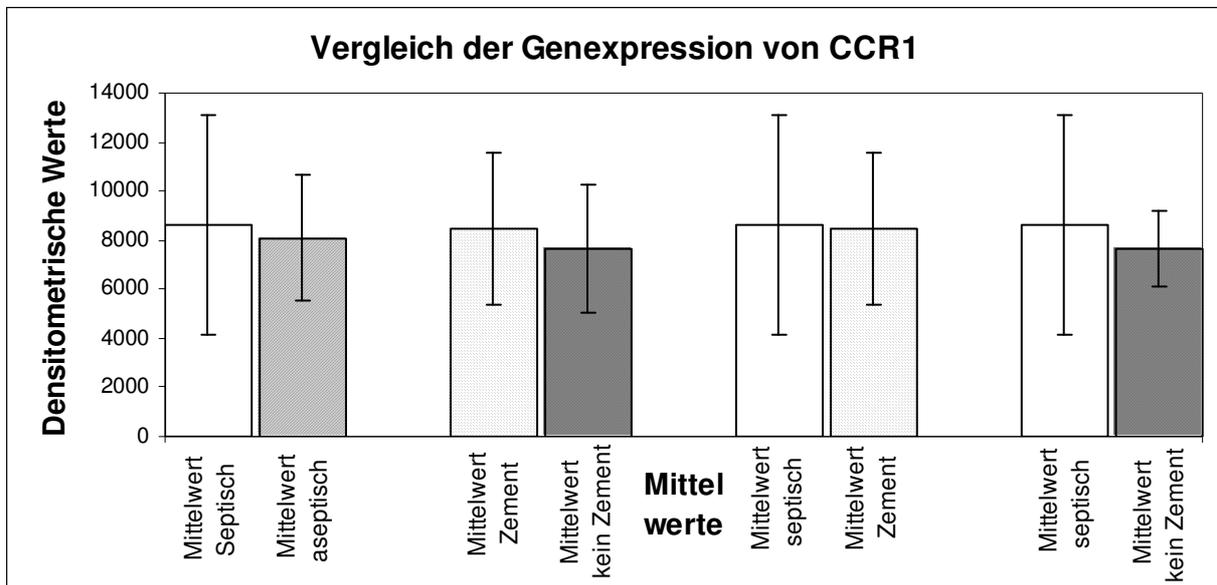


Abb. 20 b: Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen densitometrischer Werte, die die Genexpression von CCR1 im Untersuchungsmaterial zeigen. n(septisch)=6; n(aseptisch)=21; n(Zement)=12; n(ØZement)=9

4 Diskussion

4.1 Einleitung

Ziel dieser *In-vivo*-Studie war es, Pseudomembranen aseptischer und septischer Genese auf die mRNA-Expression vorbeschriebener Zytokine und ihrer Rezeptoren zu untersuchen, um eine Abgrenzung der aseptischen Lockerung von einer low-grade Infektion zu ermöglichen. Dazu mußte als Grundlage eine Technik der effizienten mRNA-Isolierung aus den gewonnenen Gewebeproben gefunden werden. Weiter bestimmten wir die notwendige mRNA-Menge, die eine aussagekräftige cDNA-Synthese mit anschließender semiquantitativer Auswertung ermöglichte. Daran anschließend wurde die Vergleichbarkeit von Gewebeproben aus einer Pseudomembran überprüft, um die Auswirkung der Heterogenität der Pseudomembran auf die Meßergebnisse zu bestimmen.

4.2 Variabilität der Ergebnisse

Die Variabilität in den Expressionsmustern der untersuchten Gewebeproben kann prinzipiell auf verschiedene Gründe zurückgeführt werden. Die Gewebeproben sind heterogen in ihrer Struktur, und unterschiedliche Zellmuster finden sich in einzelnen Gewebeabschnitten aus einer Pseudomembran. Die Entnahme der Membranen findet zu einem bestimmten Zeitpunkt statt, so daß die chronische Entzündung nur in einer Momentaufnahme dargestellt wird, d.h. der Prozeß der Entzündung kann sich in einer Anfangsphase oder in einer fortgeschrittenen Phase befinden. Zudem können Faktoren wie die Zeitspanne zwischen Implantation und Revision, Alter, körperliche Aktivität und Immunstatus des Patienten, Unterschiede in Zusammensetzung und Design der Prothesen eine wichtige Rolle spielen. Die experimentellen Verfahren können auch zu einer möglichen Abweichung beitragen.

Die möglichst geringe patientenspezifische Variabilität von Alter, Krankheitsgenese, Immunstatus und Zeitspanne zwischen Implantation und Revision wurde durch genaue Evaluation der Patientendaten sichergestellt. Um die prozeßabhängige Variabilität möglichst gering zu halten, wurde bei der Probeentnahme darauf geachtet, die Gewebeabschnitte aus identischen Operationsarealen zu entnehmen. Hierbei wurden die Proben aus den radiologisch und makroskopisch nachgewiesenen Osteolysesäumen entnommen und rasch unter sterilen, gekühlten Bedingungen verarbeitet.

Die mRNA der Proben wurde durch Dismembrieren und mit Hilfe eines abgewandelten Protokolls des RNeasy Kit isoliert. Dabei war die jeweilige mRNA-Ausbeute limitiert. Die Intaktheit und Reinheit der mRNA wurde durch die photometrische Messung bei 260 und 280 nm Wellenlänge überprüft.

Die Unversehrtheit und Integrität der nachfolgend gewonnenen cDNA wurde mit Hilfe der Genexpression von Aktin kontrolliert. Nur bei einwandfreier Beurteilung der jeweiligen Probe wurde diese weiter verwendet, gegebenenfalls wurde die Isolierung wiederholt.

Die cDNA-Synthese aus der gewonnenen mRNA erfolgte parallel unter gleichen Bedingungen, um experimentell bedingte Störgrößen zu minimieren.

Ebenso wurden die jeweiligen PCRs zur Untersuchung der Genexpression parallel mit allen Proben gleichzeitig durchgeführt. Dabei wurde die Zykluszahl so gewählt, daß sich die Amplifikationsreaktion der PCR nicht in der Sättigungsphase der exponentiellen Vervielfältigung befand.

Die vorgenannten experimentellen Prozeßbedingungen wurden verwendet, um den Einfluß möglicher Störgrößen gering zu halten und die Verwertbarkeit der Ergebnisse zu sichern.

Um den Einfluß der Heterogenität auf die Untersuchungsergebnisse und den Grad der Heterogenität der einzelnen Gewebeproben zu bestimmen, verglichen wir drei konsekutive Abschnitte je einer Gewebeprobe auf die jeweilige mRNA-Expression. Es ergaben sich Variationskoeffizienten in einer Bandbreite von 0,03 bis 0,40, mit einem Mittelwert von $0,22 \pm 0,16$. d.h. wir konnten eine maximale prozentuale Abweichung von 40 Prozent nachweisen, mit einem durchschnittlichen Wert von etwa 22 %.

Die periprothetische Pseudomembran besteht aus Bindegewebe, Fibroblasten, Makrophagen, Riesenzellen und T-Lymphozyten [26, 41, 57]. Dabei können Zellanordnung und – dichte je nach Lokalisation und Prothesentyp heterogen sein [26]. Die Heterogenität der Gewebeproben zeigte keine extremen Unterschiede, wie auch Goodman et al. in ihren Untersuchungen periprothetischer Pseudomembranen nachweisen konnten [25, 26]. Kim et al. untersuchten die Pseudomembran zementierter und unzementierter Prothesenlockerungen und beschrieben geringe Unterschiede in der histologischen und biochemischen Zusammensetzung [37]. Ähnliche Feststellungen konnten Chiba et al. bei ihrer Analyse periprothetischer Osteolysesäume machen [14]. In einer weiteren Untersuchung zeigten Goodman et al., daß Proben aus Pseudomembranen, die an unterschiedlichen Entnahmestellen gewonnen wurden, im Vergleich prozentuale Abweichungen von 30 – 50 % für die Zytokinkonzentration von IL-1 α , IL- β und TNF- α aufwiesen [27]. Zu ähnlichen Resultaten kamen Stea et al. bei ihren Analysen von Pseudomembranen [59].

Die Heterogenität von Pseudomembranen unserer Proben hat somit Einfluß auf die Zytokinmuster, wobei die Abweichungen keine Extremwerte erreichen. Die gefundenen Abweichungen finden sich in der Bandbreite, die bei Voruntersuchungen gefunden wurden und stellen Variationen im Rahmen der normalen biologischen Aktivität dar. Sie erlauben damit eine vorsichtige Abschätzung der Relevanz und Differenzierung der Zytokinmuster.

Die Pseudomembranen aseptischer und septischer Prothesenlockerungen weichen in ihrer zellulären Zusammensetzung von einander ab. Bei den septischen Lockerungen stehen neutrophile Granulozyten und in geringerem Maße Makrophagen als Zeichen einer chronischen Entzündung im Vordergrund, während die aseptische Pseudomembran verstärkt Makrophagen, Riesenzellen und Fibroblasten aufweist [50]. Dieser Unterschied könnte, neben der unterschiedlichen Anzahl der Gewebeproben in den jeweiligen Vergleichsgruppen, eine Rolle spielen bei unserer Beobachtung, daß die Genexpression der septischen Gewebeproben eine größere Abweichung aufweist ($dV_{r, \text{septisch}}=0,32$; $dV_{r, \text{aseptisch}}= 0,16$).

4.3 Bedeutung der untersuchten Zytokine für die Osteolyse

Biochemisch zeigen die Pseudomembranen ähnliche Zytokinmuster: IL-1 und TNF- α sind wichtige Mediatoren der Entzündung und spielen beide eine wesentliche Rolle beim Unterhalt der chronischen Prozesse aseptischer [3, 47, 57] und septischer Genese [45, 62]. IL-1 α + β und TNF- α fördern die Knochenresorption und werden von Entzündungszellen sezerniert [3, 14, 21, 25, 29, 36].

Vorhergehende *In-vitro*-Versuche der Arbeitsgruppe haben bestätigt, daß Makrophagen-ähnliche Zellen beim Kontakt mit Partikeln dosisabhängig IL-1 und TNF- α sezernieren [51]. Kim et al. beschrieben erhöhte IL-1 Konzentrationen in aseptischen Pseudomembranen [37], ebenso konnte Chiba et. al eine gesteigerte IL-1 Aktivität in Osteolysessäumen darlegen [14]. In Untersuchungen von Shanbag et. al wurde IL-1 α in Pseudomembranen signifikant erhöht nachgewiesen [57].

Auch die Arbeitsgruppe um Horikoshi konnte bei ihrem Vergleich von Hüft- und Knieprothesenlockerungen den Nachweis erbringen, daß die Konzentration von IL-1 α + β in Membranen von Prothesenlockerungen gesteigert waren [32].

Desgleichen legten Stea et al. dar, daß IL-1 $\alpha+\beta$ in Pseudomembranen exprimiert werden [59]. In einer weiteren Studie wurde zwar die regelmäßige Genexpression von IL-1 β , aber nicht von IL-1 α demonstriert [34]. Goodman et al. dagegen dokumentierten keinen Nachweis von IL-1 β in Gewebeproben, die bei Revisionen von Prothesenlockerungen gewonnen wurden [25]. Unsere Studie bestätigt die Genexpression von IL-1 $\alpha+\beta$ in aseptischen als auch septischen Pseudomembranen, wobei ein signifikanter Unterschied in der IL-1 α -Expression zwischen septischen und aseptischen Gewebeproben sowie zwischen septischen und aseptischen zementierten Gewebeproben zu verzeichnen ist. Die statistische Signifikanz, die sich auf die Mittelwerte der Vergleichsgruppen bezieht, läßt dennoch keinen Rückschluß auf die Genese einer Prothesenlockerung bei einem einzelnen Patienten zu

Interleukin 1 Rezeptor Antagonist (IL-1 RA) ist ein biologisch inaktiver Agonist, der mit IL-1 α und β um die Bindungsstellen der IL-1 Rezeptoren konkurriert [16, 49]. Ein Gleichgewicht zwischen Agonist und Antagonist mag wichtig zu sein, um eine überschießende entzündliche Reaktion zu vermeiden [4, 19]. Nabae et al. zeigten in ihrer Untersuchung, daß IL-1 RA in aseptischen Pseudomembranen erhöht im Vergleich zu Gewebeproben aus osteoarthritisch veränderten Gelenken exprimiert werden [44]. Unsere Resultate belegen die Genexpression von IL-1 RA sowohl in aseptischen als auch in septischen Gewebeproben auf konstant hohem Niveau.

IL-1 bindet an den Rezeptor IL-1 R1, den man grundsätzlich in allen durch IL-1 ansprechbaren Zellen findet. [49]. Man findet eine erhöhte IL-1R1 - Dichte bei lokalen Entzündungen [63]. Wir konnten die Expression von IL-1 R1 ohne große Unterschiede in allen von uns untersuchten Gewebeproben darstellen, wie auch Nabae et. al eine ubiquitäre Expression dieses Rezeptors nachwiesen [44].

Die Produktion von TNF- α wird unter anderem durch den Kontakt von Makrophagen mit Abriebpartikeln einerseits und mit Lipopolysacchariden andererseits induziert [49, 66]. Algan et al. belegten die besondere Bedeutung von TNF- α für die partikelabhängige Knochenresorption unter Verwendung eines Mäusemakrophagen – Modells [2]. Merkel et al. erbrachten den Beweis anhand von knock-out Mäusen, daß TNF- α ein essentieller Mediator für die Entwicklung einer osteolyseabhängigen Prothesenlockerung ist [39]. Auch andere Arbeitsgruppen bekräftigten diese Ergebnisse und zeigten, daß TNF- α die Osteoklastenproliferation und damit die Knochenresorption fördert [5, 38, 55].

In den Untersuchungen von aseptischen zementfreien Pseudomembranen fanden Chiba et al. eine erhöhte Konzentration von TNF- α [14]. Goodman et al. sowie Horikoshi et al. stellten in ihren Analysen periprothetischer Osteolysesäumen dar, daß die TNF- α Konzentration in unzementierten Gewebeproben im Vergleich mit zementierten gesteigert war. [26, 32].

Zwischen zementierten und zementfreien Pseudomembranen konnten von Shanbag et al. in der TNF- α Aktivität keine Unterschiede festgestellt werden [57]. Unsere Studie zeigt einen signifikanten Unterschied in der Genexpression von TNF- α zwischen zementierten und zementfreien Prothesenlockerungen, wobei die Expression bei den zementierten Gewebeproben erhöht ist. Zudem konnten wir bestätigen, daß TNF- α in allen Gewebeproben exprimiert werden, ohne eine Differenzierung zwischen aseptischer und septischer Genese zu ermöglichen.

TNF- α bindet an zwei Rezeptoren, TNF-R1 (p55) und TNF-R2 (p75). Mit Hilfe des Rezeptor TNF-R1 wird die Proliferation von Osteoklasten nach Stimulation durch Lipopolysaccharid (LPS) angeregt [1, 49]. TNF-R2 aktiviert verstärkt die Produktion von T-Lymphozyten und ist beteiligt an der Pathogenese des septischen Schocks [49]. Merkel et al. erbrachten den Beweis, daß TNF-R1 eine Schlüsselfunktion in der partikelinduzierten Osteolyse zukommt [39]. Dies

unterstrichen auch Azuma et al. in ihren Studien, hierbei fand sich auch eine Teilfunktion von TNF-R2.[5].

Die Genexpression aseptischer und septischer Genese von TNF-R1 und -R2 wick bei vorangehenden *In-vitro*-Untersuchungen nicht signifikant voneinander ab [52]. Diese Beobachtungen werden durch unsere Resultate bestätigt. Die Expression von TNF-R1 zeigt eine verhältnismäßig homogenes Muster in den Vergleichsgruppen, während TNF-R2 einen schwachen Trend zeigt, zwischen zementierten und zementfreien Pseudomembranen zu differenzieren.

CCR1 ist ein Rezeptor für CC-Chemokine. Die Liganden für diesen Rezeptor sind fast ubiquitär in chronischem Entzündungsgewebe vorhanden und werden von Gewebezellen sezerniert, die durch Entzündungsmediatoren wie TNF- α aktiviert sind. [6, 24]. Yu et al. sowie Okamoto et al. dokumentierten in ihren Studien, daß CCR1 und seine Liganden die Aktivierung von Osteoklasten [48, 68] förderte. An Versuchen mit knock-out Mäusen zeigten Gao et al., daß CCR1 bei chronischen granulomatösen Entzündungen eine Schlüsselfunktion zukommt[23]. In vorherigen Experimenten wurde die verstärkte mRNA - Expression von CCR1 bei Kontakt mit Lipopolysacchariden im Makrophagenmodell beschrieben, während bei Partikelkontakt eine geringere Genexpression zu verzeichnen war [52]. Sica et al. beobachteten eine Verringerung der CCR1 - Expression in mononukleären Phagozyten bei Kontakt mit Lipopolysacchariden [58]. In unseren Versuchen läßt sich die Genexpression von CCR1 in allen Vergleichsgruppen nachweisen. Der Vergleich zwischen septischen und aseptischen Gewebeproben verdeutlicht eine Genexpression ohne große Unterschiede. Eine Differenzierungsmöglichkeit zwischen septischer und aseptischer Genese einer Prothesenlockerung anhand der CCR1 - Expression stellt sich in unserer Analyse nicht dar.

4.4 Bewertung der Ergebnisse

In unserer Studie vergleichen wir ein Patientenkollektiv, dessen Größe (n = 27) in anderen Untersuchungen, die nur sehr geringe Fallzahlen aufweisen, nicht erreicht wird (vgl. [34, 42]).

Morawitz et al. untersuchten Gewebeproben (n = 3) von aseptischen und septischen Prothesenlockerungen und fanden deutliche Unterschiede in der Genexpression, insbesondere megakaryocyte stimulating factor (msf) zeigte eine signifikante Hochregulierung bei aseptischen Gewebeproben. Eine erhöhte Genexpression bei IL-1 α oder anderen Entzündungsmediatoren konnte diese Arbeitsgruppe nicht nachweisen [42].

Wir überprüften Zytokinmuster in periprothetischen Osteolysesäumen, die bei septischen und aseptischen Prothesenlockerungen auftreten. Unsere Resultate belegen, daß sowohl in septischen als auch in aseptischen Pseudomembranen die Zytokine IL-1 α + β , IL-1 RA, TNF- α und ihre Rezeptoren exprimiert werden, wobei die Heterogenität der Gewebeproben keine extremen Unterschiede aufweist. Diese Entzündungsmediatoren zeigen eine osteolytische Wirkung. Einzelne signifikante Unterschiede bei den Mittelwerten der mRNA-Expression von IL-1 α und TNF- α lassen eine Differenzierungsmöglichkeit zwischen aseptischer und septischer Genese in individuellen Fällen nicht zu. Die Möglichkeit einer Unterscheidung anhand der CCR1-Genexpression können unsere Ergebnisse nicht bekräftigen.

5 Zusammenfassung

Die aseptische Prothesenlockerung ist die bedeutendste Komplikation des künstlichen Gelenkersatzes. Eine geringere Bedeutung kommt der septischen Lockerung zu, doch diese hat schwerwiegende Folgen für den Patienten.

Die aseptische und septische Prothesenlockerung können anhand charakteristischer histologischer Merkmale und mikrobiologischer Untersuchungen in den meisten Fällen voneinander unterschieden werden. So genannte low-grade Infektionen werden aber durch herkömmliche Methoden oft nicht diagnostiziert. Um diese Art von Infektion nachzuweisen, ist ein Lösungsansatz die Charakterisierung von Zytokinmustern, die eine Differenzierung auf molekularbiologischer Ebene erlauben.

In der vorliegenden *In-vivo*-Studie wurden Pseudomembranen von 27 Patienten mit Prothesenlockerungen aseptischer (n=21, davon n=12 mit und n=9 ohne Zementfixation) und septischer Genese (n=6) auf die mRNA-Expression vorbeschriebener Zytokine IL-1 α + β , IL-1RA, TNF- α und ihrer Rezeptoren IL-1R1, TNFR1+R2, sowie CCR1, ein vermutlich mit der Osteolyse assoziierter Chemokinrezeptor, untersucht.

Zu diesem Zweck wurde aus intraoperativ gewonnenen Gewebeproben mRNA isoliert, aus welcher cDNA synthetisiert und mit Hilfe der PCR-Reaktion amplifiziert wurde. Die sichtbar gemachten PCR-Produkte wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und semiquantitativ densitometrisch ausgewertet.

Unsere Resultate belegen, daß sowohl in septischen als auch in aseptischen Pseudomembranen die vorgenannten Zytokine mit osteolytischer Wirkung und ihre Rezeptoren exprimiert werden, wobei die Heterogenität der Gewebeproben mit einem durchschnittlichen Variationskoeffizienten von $V_r=0,22 \pm 0,12$ keine extremen Unterschiede aufweist.

Einzelne signifikante Unterschiede bei den Mittelwerten der mRNA-Expression von IL-1 α und TNF- α lassen eine Differenzierung zwischen aseptischer und septischer Genese in individuellen Fällen nicht zu. Die Möglichkeit einer Unterscheidung anhand der CCR1-Genexpression können unsere Ergebnisse nicht bekräftigen. Eine weitere Erhöhung der Fallzahl in Verbindung mit einem Genexpressionsarray könnte genauere Aussagen ermöglichen.

6 Abkürzungsverzeichnis

APZ	Antigen-präsentierende Zelle
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CCR	CC-Chemokinrezeptor
cDNA	Komplementäre DNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
dVr	durchschnittlicher Variationskoeffizient
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GM-CSF	Granulocyte Macrophagen Colony Stimulating Factor
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL1-RA	Interleukin-1 Rezeptorantagonist
kD	Kilo-Dalton
LPS	Lipopolysaccharid
M-CSF	Macrophagen Colony Stimulating Factor
MIP	Macrophage Inflammatory Protein
MCP-1	Macrophage Chemoattractant Protein 1
mRNA	messenger - Ribonukleinsäure
MSF	Megacaryocyte Stimulating Factor
MW	Mittelwert
NFκB	Nuclear Factor κB
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PGE2	Prostaglandin E2
RANTES	Regulated on Activation, Normal T Cell Expressed and Secreted
RNA	Ribonukleinsäure
RT-PCR	Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Trisbase-EDTA-Puffer
TH	T-Helfer
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U/min	Umdrehungen pro Minute
Vr	Variationskoeffizient

7 Literaturverzeichnis

1. Abu-Amer Y, Ross F, Edwards J, Teitelbaum SL, Lipopolysaccharide-stimulated osteoclastogenesis is mediated by tumor necrosis factor via its p55 receptor. *J Clin Invest*, 1997. 100(6): p. 1557-1565.
2. Algan SM, Purdon M, Horowitz SM, Role of tumor necrosis factor alpha in particulate-induced bone resorption. *J Orthop Res*, 1996. 14(1): p. 30-35.
3. Amstutz HC, Campbell P, Kossovsky N, Clarke IC, Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis. *Clin Orthop*, 1992. 276: p. 7-18.
4. Arend WP, Gabay C, Physiologic role of interleukin-1 receptor antagonist. *Arthritis Res*, 2000. 2(4): p. 245-248.
5. Azuma Y, Kaji K, Katogi R, Takeshita S, Kudo A, Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts. *J Biol Chem*, 2000. 275(7): p. 4858 - 4864.
6. Baggiolini M, Chemokines in pathology and medicine. *J Intern Med*, 2001. 250(2): p. 91-104.
7. Baggiolini M, Dewald B, Moser B, Interleukin 8 and related chemotactic cytokines - CXC and CC-Chemokines. *Adv Immunol*, 1994. 55: p. 97-179.
8. Ben-Baruch A, Michiel DF, Oppenheim JJ, Signals and receptors involved in recruitment of inflammatory cells. *J Biol Chem.*, 1995. 270(20): p. 11703-11706.
9. Berry DJ, Harmsen WS, Cabanela ME, Morrey BF, Twenty-five survivorship of two thousand consecutive primary Charnley total hip replacements factors: factors affecting survivorship of acetabular and femoral components. *J Bone Joint Surg Am*, 2002. 84-A(2): p. 171-177.
10. Blaine TA, Rosier RN, Puzas JE, Looney JE, Reynoldy PR, Reynolds SD, O'Keefe RJ, Increased levels of TNF-alpha and Interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles. *J Bone Joint Surg Am*, 1996. 78(8): p. 1181-1192.
11. Brooks GF, Butel JS, Morse SA, Pathogenesis of Bacterial Infection, in Jawetz, Meinnick & Adelberg's Medical Microbiology. 2001, Appleton & Lange: New York. p. 133-143.
12. Buchholz H, Engelbrecht H, Über die Depotwirkung einiger Antibiotika bei Vermischung mit dem Kunstharz Palacos. *Chirurg*, 1970. 41(11): p. 511 - 515.
13. Charnley J, Low friction arthroplasty of the hip : theory and practice. 1979. Springer Verlag: Berlin, New York. p. 13 - 21.

14. Chiba J, Rubash HE, Kim K, Iwaki Y, The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis. *Clin Orthop*, 1994. 300: p. 304-312.
15. Choy EH, Panayi GS, Cytokine pathways and joint inflammation in rheumatoid arthritis. *N Engl J Med*, 2001. 344(12): p. 907-916.
16. Dinarello C, The IL-1 family and inflammatory diseases. *Clin Exp Rheumatol*, 2002. 20(5 Suppl 27): p. S1-13.
17. Dinarello C, Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism. *Blood*, 1991. 77(8): p. 1627-1652.
18. Frost A, Jonsson KB, Nilsson O, Ljunggren O, Inflammatory cytokines regulate proliferation of cultured human osteoblasts. *Acta Orthop Scand*, 1997. 68(2): p. 91-96.
19. Fukumoto T, Matsukawa A, Ohkawara S, Takagi K, Yoshinaga M, Administration of neutralizing antibody against rabbit IL-1 receptor antagonist exacerbates lipopolysaccharide-induced arthritis in rabbits. *Inflamm Res*, 1996. 45(9): p. 479-485.
20. Furie MB, Randolph GJ, Chemokines and tissue injury. *Am J Pathol*, 1995. 146(6): p. 1287-1301.
21. Gallo J, Kaminek P, Ticha V, Rihakova P, Ditmar R, Particle disease. A comprehensive theory of periprosthetic osteolysis: a review. *Biomed Papers*, 2002. 146(2): p. 21-28.
22. Gallo J, Kolar M, Novotny R, Rihakova P, Ticha V, Pathogenesis of prosthesis-related infection. *Biomed Papers*, 2003. 147(1): p. 27-35.
23. Gao JL, Wynn TA, Chang Y, Lee EJ, Broxmeyer HE, Cooper S, Tiffany HL, Westphal H, Kwon-Chung J, Murphy PM, Impaired host defense, hematopoiesis, granulomatous inflammation and type 1-type 2 cytokine balance in mice lacking CC chemokine receptor 1. *J Exp Med*, 1997. 185(11): p. 1959-1968.
24. Gerard C, Rollins BJ, Chemokines and disease. *Nat Immunol*, 2001. 2(2): p. 108-115.
25. Goodman SB, Chin RC, Chiou SS, Schurman DJ, Woolson ST, Masada MP, A clinical-pathologic-biochemical study of the membrane surrounding loosened and nonloosened total hip arthroplasties. *Clin Orthop*, 1989. 244: p. 182-187.
26. Goodman SB, Huie P, Song Y, Schurman D, Maloney W, Woolson S, Sibley R, Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements. *J Bone Joint Surg Br*, 1998. 80(3): p. 531-539.

27. Goodman SB, Knoblich G, O'Connor M, Song Y, Huie p, Sibley R, Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses. *J Biomed Mater Res*, 1996. 31(3): p. 421-428.
28. Gowen M, Mundy GR, Actions of recombinant interleukin 1, interleukin 2, and interferon-gamma on bone resorption in vitro. *J Immunol*, 1986. 136(7): p. 2478-2482.
29. Harris WH, Osteolysis and particle disease in hip replacement. A review. *Acta Orthop Scand*, 1994. 65(1): p. 113-123.
30. Harris WH, Schiller AL, Scholler JM, Freiberg RA, Scott R, Extensive localized bone resorption in the femur following total hip replacement. *J Bone Joint Surg Am*, 1976. 58(5): p. 612-618.
31. Haynes DR, Hay SJ, Rogers SD, Ohta S, Howie DW, Graves SE, Regulation of bone cells by particle-activated mononuclear phagocytes. *J Bone Joint Surg Br*, 1997. 79(6): p. 988-994.
32. Horikoshi M, Macaulay W, Booth RE, Crosset LS, Rubash HE, Comparison of interface membranes obtained from failed cemented and cementless hip and knee prostheses. *Clin Orthop*, 1994. 309: p. 69 - 87.
33. Howie DW, Vernon-Roberts B, Oakeshott R, Manthey B, A rat model of resorption of bone at the cement-bone interface in the presence of polyethylene wear particles. *J Bone Joint Surg Am*, 1988. 70(2): p. 257-263.
34. Ishiguro N, Kojima T, Ito T, Saga S, Anma H, Kurokouchi K, Iwahori Y, Iwase T, Iwata H, Macrophage activation and migration in interface tissue around loosening total hip arthroplasty components. *J Biomed Mater Res*, 1997. 35(3): p. 399-406.
35. Jacobs JJ, Roebuck KA, Archibeck M, Hallab NJ, Glant TT, Osteolysis: basic science. *Clin Orthop*, 2001. 393: p. 71-77.
36. Jiranek WA, Machado M, Jasty M, Jevsevar D, Wolfe HJ, Goldring SR, Goldberg MJ, Harris WH, Production of cytokines around loosened cemented acetabular components. *J Bone Joint Surg Am*, 1993. 75(6): p. 863 - 879.
37. Kim KJ, Rubash HE, Wilson SS, D'Antonio JA, McClain EJ, A histologic and biochemical comparison of the interface tissues in cementless and cemented hip prostheses. *Clin Orthop*, 1993. 287: p. 142-152.
38. Lader CS, Flanagan AM, Prostaglandin E2, interleukin 1alpha, and tumor necrosis factor-alpha increase human osteoclast formation and bone resorption in vitro. *Endocrinology*, 1998. 139(7): p. 3157-3164.
39. Merkel KD, Erdmann JM, McHugh KP, Abu-Amer Y, Ross FP, Teitelbaum SL, Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *Am J Pathol*, 1999. 154(1): p. 203-210.

40. Mirra JM, Amstutz HC, Matos M, Gold R, The pathology of the joint tissues and its clinical relevance in prosthesis failure. *Clin Orthop*, 1976. 117: p. 221-240.
41. Mohanty M, Cellular basis for failure of joint prosthesis. *Biomed Mater Eng*, 1996. 6(3): p. 165-172.
42. Morawitz L, Gehrke T, Frommelt L, Gratze P, Bosio A, Möller J, Gerstmayer B, Krenn V, Differential gene expression in the periprosthetic membrane: lubricin as a new possible pathogenetic factor in prosthesis loosening. *Virchows Arch*, 2003. 443: p. 57-66.
43. Murray DW, Rushton N, Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. *J Bone Joint Surg Br*, 1990. 72(6): p. 988-992.
44. Nabae M, Inoue K, Ushiyama T, Hukuda S, Gene expression of antiinflammatory mediators in THR retrieved interfacial membranes. *Acta Orthop Scand*, 1999. 70(2): p. 149-154.
45. Nairn R, *Immunology*, in *Jawetz, Meinick & Adelberg's Medical Microbiology*. 2001, Appleton & Lange: New York. p. 79-88.
46. Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Chun LE, Song Y, Goodman SB, Schurman DJ, Maloney WJ, Smith RL, Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles. *J Bone Joint Surg Br*, 1999. 81(1): p. 155-162.
47. Neale SD, Athanasou NA, Cytokine receptor profile of arthroplasty macrophages, foreign body giant cells and mature osteoclasts. *Acta Orthop Scand*, 1999. 70(5): p. 452-458.
48. Okamatsu Y, Kim D, Battaglini R, Sasaki H, Späte U, Stashenko P, MIP-1gamma promotes receptor activator of NF-kappa-B-ligand-induced osteoclast formation and survival. *J Immunol*, 2004. 173(3): p. 2084-2090.
49. Oppenheim JJ, Ruscetti FW, *Cytokines*, in *Medical Immunology*, Stites DP, Ferr AI, and Parslow TG, Editors. 1997, Appleton & Lange: Stanford, Connecticut. p. 146 - 168.
50. Pandey R, Berendt AR, Athanasou NA, Histological and microbiological findings in non-infected and infected revision arthroplasty tissues. The OSIRIS Collaborative Study Group. *Arch Orthop Trauma Surg*, 2000. 120(10): p. 570-574.
51. Rader CP, Sterner T, Franz J, Schütze N, Eulert J, Cytokine response of human Macrophage-like cells after contact with polyethylene and pure titanium particles. *J Arthroplasty*, 1999. 14(7): p. 840-848.
52. Rader CP, Baumann B, Rolf O, Radke S, Hendrich C, Schutze N, Seufert J, Jakob F, Detection of differentially expressed genes in particle disease using array-filter analysis. *Biomed Tech (Berl)*, 2002. 47(5): p. 111-116.

53. Roodman GD, Advances in bone biology: The Osteoclast. *Endocr Rev*, 1996. 17(4): p. 308-332.
54. Ruckelshausen M, Technische Entwicklung der Hüftendoprothese, in *Der totale Hüftgelenkersatz*, H. Cotta and K. Schulitz, Editors. 1973, Thieme Verlag: Stuttgart. p. 1-15.
55. Sabokbar A, Kudo O, Athanasou NA, Two distinct cellular mechanisms of osteoclast formation and bone resorption in periprosthetic osteolysis. *J Orthop Res*, 2003. 21(1): p. 73-80.
56. Schmalzried TP, Callaghan JJ, *Wear in total hip and knee replacements*. *J Bone Joint Surg Am*, 1999. 81(1): p. 115-136.
57. Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT, Cellular mediators secreted by interfacial membranes obtained at revision total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*, 1995. 10(4): p. 498-506.
58. Sica A, Sacconi A, Borsatti A, Power CA, Wells TN, Luini W, Polentarutti N, Sozzani S, Mantovani A, Bacterial lipopolysaccharide rapidly inhibits expression of C-C chemokine receptors in human monocytes. *J Exp Med*, 1997. 185(5): p. 969-974.
59. Stea S, Visentin M, Granchi D, Ciapetti G, Donati ME, Sudanese A, Zanotti C, Toni A, Cytokines and osteolysis around total hip prostheses. *Cytokine*, 2000. 12(10): p. 1575-1579.
60. Takacs L, Kovacs EJ, Smith MR, Young HA, Durum SK, Detection of IL-1 alpha and IL-1 beta gene expression by in situ hybridization. Tissue localization of IL-1 mRNA in the normal C57BL/6 mouse. *J Immunol*, 1988. 141(9): p. 3081-3095.
61. Takagi M, Konttinen YT, Santavirta S, Sorsa T, Eisen AZ, Nordsletten L, Suda A, Extracellular matrix metalloproteinases around loose total hip prostheses. *Acta Orthop Scand*, 1994. 65(3): p. 281-286.
62. Terr AI, *Inflammation*, in *Medical Immunology*, Stites DP, Ferr AI, and Parslow TG, Editors. 1997, Appleton & Lange: Stanford, Connecticut. p. 182-195.
63. van der Laken CJ, Boerman OC, Oyen WJ, Laverman P, van de Ven MT, Corstens FH, van de Meer JW, In vivo expression of interleukin-1 receptors during various experimentally induced inflammatory conditions. *J Infect Dis*, 1998. 177(5): p. 1398-1401.
64. Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ, Galante JO, Roebuck KA, Glant TT, The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *J Bone Joint Surg Am*, 2001. 83-A(2): p. 201-211.
65. Wessinghage D, *Historische Aspekte des Gelenkersatzes - Eine bibliographische Studie*. *Der Orthopäde*, 2000. 29(12): p. 1067-1071.

66. Whicher JT, Evans SW, Cytokines in disease.
Clin Chem, 1990. 36(7): p. 1269-1281.
67. Willert HG, Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. J Biomed Mater Res, 1977. 11(2): p. 157-164.
68. Yu X, Huang Y, Collin-Osdoby P, Osdoby P, CCR1 chemokines promote the chemotactic recruitment, RANKL development, and motility of osteoclasts and are induced by inflammatory cytokines in osteoblasts.
J Bone Miner Res, 2004. 19(12): p. 2065-2077.
69. Zimmerli W, Trampuz A, Ochsner PE, Prosthetic-Joint Infections.
N Engl J Med, 2004. 351(16): p. 1645-1654.

Danksagung

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Christof Rader danke ich für die Möglichkeit, dieses Thema bearbeiten zu dürfen und die Untersuchungen im Wissenschaftlichen Labor des König-Ludwig-Hauses durchführen zu können.

Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Norbert Schütze danke ich für die großartige Unterstützung während der Ausführung dieser Arbeit, insbesondere für die wissenschaftlichen Anregungen und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Arnulf Weckbach danke ich für die Übernahme des Koreferats.

Dem Team des Wissenschaftlichen Labors gilt mein besonderer Dank für die technische und moralische Unterstützung im Verlauf der Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Alexander Wind
Geburtsdatum	2. August 1976
Geburtsort	Hanau / Main

Schulbildung

09/1983 – 08/1987	Grundschule Kahl /Main
09/1987 – 08/1990	Franziskanergymnasium Großkrotzenburg / Main
09/1990 – 06/1997	Graf-Zeppelin-Gymnasium Friedrichshafen
08/1994 – 07/1995	Auslandsaufenthalt Sabino High School, Tucson, USA

Zivildienst

07/1997 -10/1998	Rettungssanitäter, DRK-Rettungsdienst in Tettngang
------------------	---

Studium

11/1998 – 9/2005	Studium der Humanmedizin Julius-Maximilians-Universität Würzburg
9/2000	Ärztliche Vorprüfung,
8/2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung,
4/2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
5/2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2001 – 03/2004	Fernstudium der Betriebswirtschaftslehre Fernuniversität Hagen

Weiterbildung

10/2005 bis heute	Arzt in Weiterbildung für Innere Medizin Mainklinik Ochsenfurt
-------------------	---