

Aus der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der
Ludwig-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Vergleich der biologischen Aktivität von crosslinked
Polyethylenabriebpartikeln und UHMWPE Partikeln *in
vivo***

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München
vorgelegt von

Verena Lorber

aus

Garmisch-Partenkirchen

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Jürgen Manhart
Prof. Dr. Dr. Franz-Xaver Reichl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. S. Utzschneider

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser,FACR,
FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.11.2012

Widmung

In tiefer Dankbarkeit und Liebe meinen Eltern gewidmet, die mich bei meiner Dissertation und meinem gesamten Studium stets mit unermüdlicher Geduld, bedingungslosem Verständnis, einem offenen Ohr und wertvollen Ratschlägen unterstützten.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	7
I. Einleitung	8
II. Grundlagen	10
II.1. Das Kniegelenk	10
II.1.1. Makroanatomie und Biomechanik des Kniegelenks	10
II.1.2. Histologischer Aufbau des Kniegelenks	11
II.2. Knieendoprothetik	13
II.2.1. Einteilung der künstlichen Kniegelenke und Prothesendesigns	13
II.2.1.1. Unikondylärer Gelenkersatz	14
II.2.1.2. Ungekoppelter bikondylärer Oberflächenersatz	14
II.2.1.3. Teilgekoppelte Prothese	15
II.2.1.4. Achsgeführte Prothese	16
II.2.1.5. Mobile- versus fixed-bearing	17
II.2.2. Materialien in der Knieendoprothetik	18
II.2.3. Ultra-high-molecular-weight-polyethylene (UHMWPE) als tribologische Gleitflächenkomponente im künstlichen Kniegelenk	18
II.2.3.1. Polyethylen	18
II.2.3.2. UHMWPE	19
II.2.3.3. Crosslinked Polyethylen	22
II.2.3.4. Knieprothesendesigns dieser Arbeit	22
II.2.4. Abrieb im künstlichen Kniegelenk	24
II.2.4.1. Mechanismen und Erscheinungsformen des Polyethylenabriebs	24
II.2.4.2. Charakteristika der Polyethylenabriebpartikel	26
II.2.5. Ursachen des Knieendoprothesenversagens	26
II.2.6. Biologische Reaktion auf Polyethylenpartikel: aseptische Lockerung	27
II.2.7. Humorale Mediatoren der aspetischen Osteolyse	31
II.2.7.1. Adhäsionsmoleküle und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	31
II.2.7.2. Zytokine	33
II.2.7.2.1. Interleukin-1 β (IL-1 β)	34
II.2.7.2.2. Interleukin-6 (IL-6)	34
II.2.7.2.3. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)	35
II.3. Studiendesign des Gesamtprojektes	35
II.3.1. Untersuchung des tibialen Polyethylen-Inlays im Kniegelenkssimulator	

mit Gewinnung von Abriebmaterial	36
II.3.2. Separation und Analyse des Abriebmaterials und Endotoxineliminierung	36
II.3.3. Messung der biologischen Aktivität der Abriebpartikel im <i>in vivo</i> Mausmodell	37
III. Zielsetzung	39
IV. Material und Methoden	40
IV.1. Gewebeproben	40
IV.2. Verwendete Materialien	40
IV.2.1. Antikörper und Seren	40
IV.2.2. Allgemeine Reagenzien	41
IV.2.3. Verbrauchsmaterialien	42
IV.2.4. Geräte	43
IV.2.5. Herstellung von Puffern und Lösungen	44
IV.3. Methoden	45
IV.3.1. Herstellung von Paraffinblöcken	45
IV.3.1.1. Entkalkung	45
IV.3.1.2. Wässerung und Entwässerung	46
IV.3.1.3. Paraffinausgießung	46
IV.3.2. Herstellung von Paraffinschnitten	47
IV.3.3. Immunhistologie	47
IV.3.3.1. Theoretische Grundprinzipien der immunhistologischen Färbung	47
IV.3.3.2. Färbeitstechnik und Färbeprotokoll	49
IV.3.4. Auswertung	52
IV.3.4.1. Histologische Auswertung	52
IV.3.4.1.1. Beurteilung des Gelenkknorpels und des Knochenmarks	52
IV.3.4.1.2. Auswertung der Synovialmembran des Mauskniegelenks	53
IV.3.4.2. Statistische Auswertung	53
V. Ergebnisse	55
V.1. Der Gelenkknorpel	55
V.1.1. Expression des Zytokins IL-1 β im Gelenkknorpel	55
V.1.2. Expression des Zytokins IL-6 im Gelenkknorpel	58
V.1.3. Expression des Tumornekrosefaktors- α im Gelenkknorpel	59
V.1.4. „Gesamtentzündlichkeit“ des Gelenkknorpels	61
V.2. Das Knochenmark	62
V.2.1. Hochregulierung des Zytokins IL-1 β im Knochenmark	62

V.2.2. Expression des Zytokins IL-6 im Knochenmark	65
V.2.3. Hochregulierung des Tumornekrosefaktors- α im Knochenmark	66
V.2.4. „Gesamtentzündlichkeit“ des Knochenmarks	69
V.3. Die Synovialmembran	69
V.3.1. Hochregulierung des Zytokins IL-1 β in der Synovialmembran	69
V.3.2. Expression des Zytokins IL-6 in der Synovialmembran	71
V.3.3. Hochregulierung des Tumornekrosefaktors- α in der Synovialmembran	74
V.3.4. „Gesamtentzündlichkeit“ der Synovialmembran	76
V.3.5 Hochregulierung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in der Synovialmembran	76
VI. Diskussion	79
VI.1. Diskussion der Methodik	80
VI.1.1. Diskussion des <i>in vivo</i> Modells	80
VI.1.2. Diskussion der untersuchten Zytokine und Entzündungsmediatoren	83
VI.2. Diskussion der Ergebnisse	85
VI.2.1. Der Gelenkknorpel	85
VI.2.2. Die Synovialmembran	86
VI.2.3. Gefäße in dem subintimalen Gewebe der Synovialmembran	88
VI.2.4. Das Knochenmark	89
VI.2.5. Konventionelles UHMWPE versus crosslinked Polyethylen	92
VII. Zusammenfassung	96
VIII. Anhang	99
IX. Literaturverzeichnis	111
X. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	127
Danksagung	133
Lebenslauf	135

Abkürzungsverzeichnis

CR	Cruciate retaining = kreuzbanderhaltend
ECD	Equivalent circle diameter = Kreisdurchmesser
GM-CSF	Granulocyte macrophage colony-stimulating factor
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1 = interzelluläres Adhäsionsmolekül-1
IL	Interleukin
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1 = Leukozyten-funktionsassoziiertes-Antigen-1
Mac-1	Macrophage-1 antigen = Makrophagen-Adhäsions-Ligand-1
MCP-1	Monocyte chemotactic protein-1
MIP-1	Macrophage inflammatory protein-1
NO	Stickstoffmonoxid
OPG	Osteoprotegerin
PE	Polyethylen
RT	Raumtemperatur
RANK	Rezeptor-Aktivator von NF-κB
RANKL	Ligand des Rezeptor-Aktivators von NF-κB
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
UHMWPE	Ultra-high-molecular-weight-polyethylene = Ultrahochmolekulares Polyethylen
VCAM-1	Vascular adhesion molecule-1 = vaskuläres Adhäsionsmolekül-1
VLA-4	Very late antigen-4

I. Einleitung

In der heutigen Knieendoprothetik stellt die aseptische Lockerung das Hauptproblem und die häufigste Ursache für eine Prothesenrevision dar (Forster et al. 2003, Graves et al. 2004, Horwitz et al. 2009).

Auf das Schwedenregister gestützt, ist die Entstehung von Osteolysen und folglich ein Versagen des Implantats der Grund für 40% aller Revisionsoperationen (Robertsson et al. 2001).

Wie bereits vielfach gezeigt wurde, wird die aseptische Prothesenlockerung insbesondere durch Polyethylenabriebpartikel induziert (Fehring et al. 2004, Naudie et al. 2004, Naudie et al. 2007), die zu einer unspezifischen Inflammationsreaktion und zu Osteolysen infolge einer negativen Bilanz des Knochenstoffwechsels führen (Otto et al. 2006, Purdue et al. 2007, Revell et al. 2008, Holt et al. 2007, Dress et al. 2008).

Zellulär wird dieser Prozess vor allem durch Makrophagen vermittelt, die verschiedene Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α sezernieren, die zu einer autokrinen Aktivierung dieser und zu einer parakrinen sowie systemischen Aktivierung weiterer Makrophagen und Leukozyten führen (Ingham et al. 2005, Purdue et al. 2007). Außerdem werden über komplexe molekularbiologische Kaskaden Osteoklasten aktiviert und Osteoblasten gehemmt (Vermes et al. 2001, Chiu et al. 2009), was in einer Resorption von Knochensubstanz resultiert (Atkins et al. 2009, Drees et al. 2008, Gallo et al. 2008, Otto et al. 2006, Tuan et al. 2008).

Gezeigt wurde überdies, dass die Partikelanzahl, -größe und -morphologie Einfluss auf diesen Entzündungsprozess haben und weiterhin, dass Partikel unterschiedlicher Prothesenmaterialien eine in Intensität und Ausprägung unterschiedliche Reaktion hervorrufen (Fehring et al. 2004, Fisher et al. 2004, Griffin et al. 2007, McEwen et al. 2005, Purdue et al. 2007, Shanbhag et al. 1994, Yang et al. 2002).

Um diesem Problem zu begegnen, wird versucht, die Abriebfestigkeit des Kunststoffes Polyethylen unter bestmöglichem Erhalt der biomechanischen Eigenschaften zu erhöhen, indem das Herstellungsverfahren dieses Werkstoffes modifiziert und Polyethylen besonderen Vergütungsverfahren unterzogen wird (Muratoglu et al. 2003, Muratoglu et al. 2007, Ries et al. 2005a). Das derzeit am häufigsten verwendete Polyethylen ist das ultra-high-molecular-weight-polyethylene, UHMWPE. Neben diesem gibt es das hochvernetzte, so genannte crosslinked Polyethylen, das auch in der Knieendoprothetik Anwendung findet (Jacofsky et al. 2008).

Dieser Polyethylenabkömmling zeigt sich in Studien im Labor abriebresistenter als das UHMWPE (McEwen et al. 2005, Muratoglu et al. 2002, Muratoglu et al. 2003, Muratoglu et al. 2004, Muratoglu et al. 2007). Insbesondere in der Hüftendoprothetik gibt es Studien, die

die Vorteile, besonders den verminderten Abrieb dieses Polyethylens beschreiben (Digas et al. 2003a, Heisel et al. 2005, McKellop et al. 2000, Shen et al. 2005).

In der Knieendoprothetik wird die Verwendung des crosslinked Polyethylens jedoch noch kontrovers diskutiert (Gencur et al. 2003, Rodriguez et al. 2008, Ries et al. 2005a). Es gibt erste Versagensberichte (Bradford et al. 2004a, 2004b) und Hinweise darauf, dass bei diesem Polyethylen zwar eine geringere Menge an Abriebpartikeln im Simulator entsteht (Muratoglu et al. 2004, Utzschneider et al. 2009a, 2009b), die produzierten Partikel aber kleiner und folglich biologisch aktiver sind (Affatato et al. 2005, Fisher et al. 2004, Minoda et al. 2008). Eine aktuelle *in vitro* Studie zeigt eine stärker ausgeprägte inflammatorische Reaktion bei diesem PE-Abkömmling (Illgen et al. 2008).

Bezüglich der crosslinked Polyethylene existieren aber bislang keine Studien, die die Entstehung und Charakterisierung der Partikel *in vivo* und deren biologische Aktivität untersuchen. Ebenso fehlen klinische Langzeitergebnisse.

Ziel dieser Studie war es deshalb, anhand eines *in vivo* Mausmodells zu untersuchen, ob sich die *in vitro* produzierten Abriebpartikel dieser beiden Polyethylene, UHMWPE und crosslinked Polyethylene (PE), in ihrer biologischen Reaktivität unterscheiden.

Hierzu wurden in dieser Arbeit sechs verschiedene Polyethylenwerkstoffe, darunter vier crosslinked Polyethylene und zwei ultrahochmolekulare Polyethylene, getestet und die biologische Reaktion auf deren Abriebpartikel *in vivo* mittels Immunhistochemie quantifiziert, beurteilt und interpretiert.

II. Grundlagen

II.1. Das Kniegelenk

II.1.1. Makroanatomie und Biomechanik des Kniegelenks

Das Kniegelenk ist ein Drehscharniergelenk und besteht aus zwei Anteilen: dem Femorotibialgelenk zwischen den Femurkondylen und dem Tibiaplateau und dem Femoropatellargelenk zwischen Femur und Patella (Benninghoff und Drenckhahn 2008, Lippert 2003). Zwischen den mit hyalinem Gelenknorpel überzogenen Femurkondylen und dem Tibiaplateau befinden sich die aus Faserknorpel bestehenden Menisci, Meniscus medialis und Meniscus lateralis (Lippert 2003). Der Meniscus medialis ist sichelförmig und mit dem medialen Seitenband, dem Ligamentum collaterale mediale, verwachsen, der Meniscus lateralis ist halbrund. Die Menisci ermöglichen eine Vergrößerung der Kontaktfläche sowie einen Ausgleich der Inkongruenzen zwischen den Femur- und Tibiakondylen und dienen der Gelenkführung und der flächenhaften Druckverteilung vom Femur auf die Tibia (Lippert 2003). Umgeben wird das Kniegelenk von der Gelenkkapsel, die aus der äußeren Membrana fibrosa und der inneren Membrana synovialis besteht (Lippert 2003). Zwischen den beiden Schichten der Gelenkkapsel befindet sich unterhalb der Patella der so genannte Hoffasche Fettkörper, der der Unterpolsterung der Synovia dient.

Die Stabilität im Kniegelenk wird durch komplexe Bandstrukturen gewährleistet, zum einen durch die Seitenbänder, Ligamentum collaterale mediale und laterale, die das Gelenk gegenüber Varus- und Valgusstress stabilisieren sowie bei Flexion und Extension als Führungsbänder dienen. Zum anderen sichern die Kreuzbänder, Ligamentum cruciatum anterius und posterius, das Gelenk bei Innen- und Außenrotation. Unabhängig von der Gelenkstellung stehen fast immer Anteile der Kreuzbänder unter Spannung (Lippert 2003).

Das Kniegelenk hat zwei Hauptachsen, um die vier Hauptbewegungen möglich sind, Extension, Flexion, Außenrotation und Innenrotation (Lippert 2003).

Die Bewegung im Kniegelenk ist eine Kombination aus Roll- und Gleitbewegung. Bei der Flexion rollen die Femurkondylen zunächst bis ca. 25°, danach gleiten sie zunehmend nach dorsal. Die Menisci bewegen sich bei Flexion, insbesondere lateral, nach dorsal, bei Extension nach ventral (Lippert 2003). Die aktive Flexion beträgt ca. 140°, die passive Flexion ca. 160°. Aktiv erfolgt eine Extension bis 0°, passiv ist eine Hyperextension von 5-10° möglich. Bei den letzten 10° der Extension erfolgt eine Schlussrotation der Tibia von ca. 5° (Lippert 2003).

Rotationsbewegungen werden im gestreckten Kniegelenk durch die Seitenbänder eingeschränkt. Bei gebeugtem Kniegelenk ist eine Außenrotation bis zu 40° und eine

Innenrotation bis zu 10° möglich. Bei der Außenrotation bewegt sich der laterale Meniscus nach ventral, während sich der mediale Meniscus nach dorsal bewegt. Bei Innenrotation verhält es sich umgekehrt (Lippert 2003).

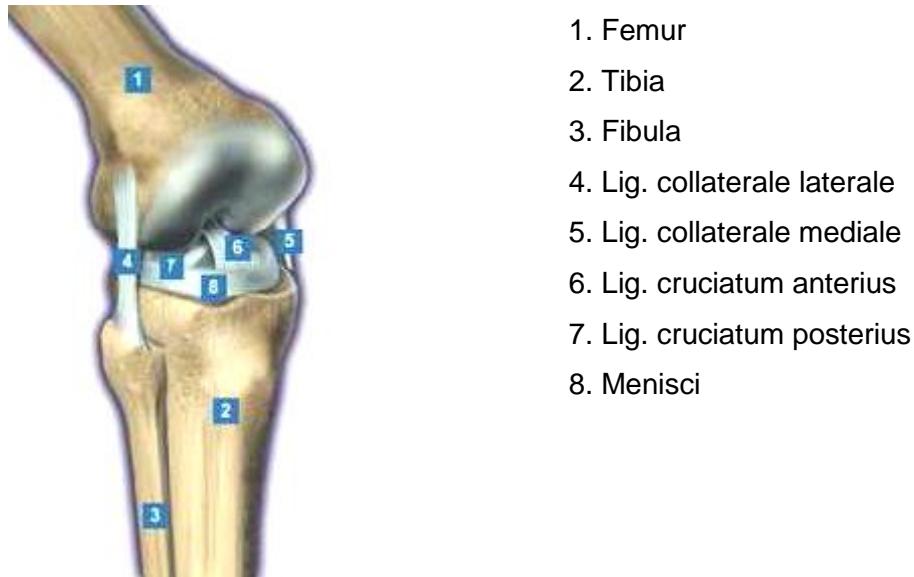


Abb. 1: Anatomie des Kniegelenks (Gray 2007)

II.1.2. Histologischer Aufbau des Kniegelenks

Das Kniegelenk besteht aus Gelenkknorpel, Knochengewebe mit Kortikalis und Knochenmark sowie Synovialgewebe (Vigorita 2010).

Der Gelenkknorpel ist ein hyaliner Knorpel, der aus Chondrozyten und Knorpelmatrix besteht. Die Chondrozyten, Knorpelzellen, liegen meist in kleinen Gruppen, eingeschlossen in einem Knorpelhof, der die Matrix in der unmittelbaren Umgebung bezeichnet (Welsch 2006). Dies wird dann als Territorium oder Chondron bezeichnet. Die Knorpelmatrix setzt sich aus Kollagen-Typ-II, -IX, -X, -XI, Hyaluronsäure, dem Proteoglycan Aggrecan und Wasser zusammen. Da der ausgereifte Knorpel keine Innervation oder Blutgefäßversorgung besitzt, erfolgt die Ernährung über Diffusion aus der Synovialflüssigkeit (Welsch 2006).

Der hyaline Gelenkknorpel lässt sich in vier Schichten gliedern. Die erste, dem Gelenkspalt am nächsten liegende Schicht, wird als Tangentialfaserschicht bezeichnet (Welsch 2006). Zahlreiche dünne Kollagenfibrillen verlaufen annähernd parallel zur Oberfläche und die Chondrozyten sind länglich und spindelförmig (Welsch 2006).

In der zweiten Schicht, der Übergangszone, treten die Chondrozyten oft einzeln oder in Paaren auf und die Kollagenfasern kreuzen sich.

In der folgenden Radiärzone verlaufen die Kollagenfasern senkrecht zur Oberfläche und die Chondrozyten liegen in länglich angeordneten Gruppen, Knorpelzellsäulen, vor (Welsch 2006).

Die vierte Schicht besteht aus mineralisiertem Knorpel, der dem subchondralen Knochen aufliegt. Hier befinden sich nur noch wenige, vereinzelte Chondrozyten.

Zwischen der dritten und der vierten Schicht liegt eine kalziumreiche Grenzzone, die so genannte „tide mark“ (Welsch 2006).

Das Knochenmark des Femurs und der Tibia stellt histologisch ein retikuläres Bindegewebe aus Kollagen-Typ-III produzierenden Fibroblasten und Fettzellen dar. Diese Fibroblasten sind blasses Zellen mit einem länglichen, hellen Kern (Welsch 2006). Ebenso wie die Makrophagen, die im Stroma verteilt sind, produzieren sie Zytokine und Wachstumsfaktoren für die Regulation der Hämatopoiese. In das Knochenmarksstroma sind außerdem zahlreiche dünnwandige Blutsinus eingebettet, deren Endothel, durch das die Auswanderung der reifen Blutzellen stattfindet, keine Basallamina besitzt (Welsch 2006, Murphy 2009).

Als Ort der Blutzellbildung, vor allem der Bildung und Reifung des spezifischen und unspezifischen zellulären Immunsystems, ist das Knochenmark von Bedeutung für Entzündungsreaktionen und Abwehrprozesse (Murphy 2009). Findet im Organismus ein inflammatorischer Prozess statt, wird im Knochenmark über Zytokine und Adhäsionsmoleküle die Differenzierung, Neubildung und transendotheliale Migration von Leukozyten angeregt (Murphy 2009).

Umgeben wird das Kniegelenk von der Gelenkkapsel, deren innere Schicht die Synovialmembran ist. Diese bildet vielgestaltige, in den Gelenkraum ragende Falten und Zotten (Welsch 2006). Die Synovialmembran besteht aus der inneren synovialen Intima und der äußeren subintimalen Schicht (Vigorita 2010). Die synoviale Intima setzt sich aus ein bis vier Schichten synovialer Deckzellen zusammen, wobei die Typ-A-Zellen (makrophagenähnliche Zellen) und die Typ-B-Zellen (fibroblastenähnliche Zellen, die die Bindegewebsmatrix und die Synovialflüssigkeit produzieren) unterschieden werden (Vigorita 2010). Das subintimale Gewebe enthält Blut- und Lymphgefäße, vegetative Nervenfasern, Fettzellen, Kollagenfibrillen und elastische Fasern (Vigorita 2010).

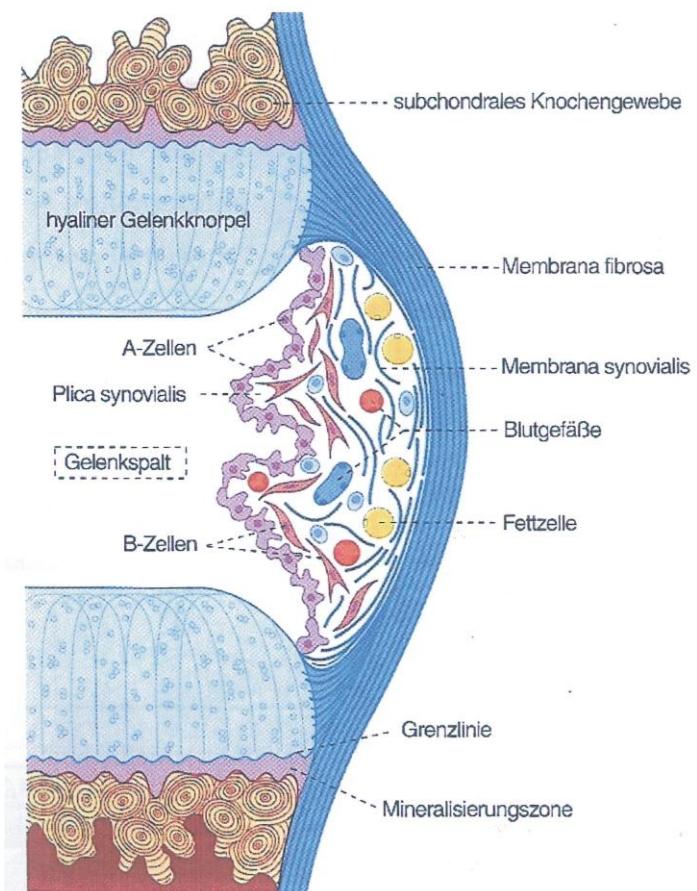


Abb. 2: Histologischer Aufbau eines Gelenks. Zu sehen sind subchondrales Knochengewebe, hyaliner Gelenkknorpel, sowie der Aufbau der Synovialmembran mit A-, B- und Fettzellen sowie Blutgefäßen (Welsch 2006)

II.2. Knieendoprothetik

II.2.1. Einteilung der künstlichen Kniegelenke und Prothesendesigns

Bei den zahlreichen verschiedenen Knieprothesenmodellen unterscheidet man grundsätzlich zwischen einem unikompartimentellen, bei dem nur ein femorotibiales Gelenkkompartiment (medial oder lateral) ersetzt wird, einem bi- (femorotibial) und einem trikompartimentellen (femorotibial und retropatellar) Gelenkersatz (Krukenmeyer 2009).

Weiterhin werden die Prothesen nach dem Grad der Kopplung in ungekoppelt, teilgekoppelt und achsgeführte Implantate eingeteilt. Entscheidend hierfür ist die gegebene ligamentäre Führung des zu operierenden Gelenks (Krukenmeyer 2009).

II.2.1.1. Unikondylärer Gelenkersatz

Das unikondyläre Implantat, die so genannte Schlittenprothese, kommt bei isolierter medialer Gelenkzerstörung zur Anwendung. Voraussetzung dafür ist ein intakter Bandapparat sowie weitgehend physiologische Achsverhältnisse. Das vordere und hintere Kreuzband müssen intakt sein, um die Stabilität in der Sagittalebene zu gewährleisten (Krukenmeyer 2009).

Daraus ergeben sich Indikationen wie die Entität der anteromedialen Gonarthrose, des Morbus Ahlbäck (ausgedehnte Osteonekrosen) oder großer osteochondraler Defekte (Krukenmeyer 2009).

Die weniger invasive Implantationstechnik, eine geringere Zahl an intra- und postoperativen Komplikationen sowie eine niedrigere peri- und postoperative Morbidität sind einige Vorteile dieses Prothesentyps (Krukenmeyer 2009).

Hinzu kommt, dass durch den Erhalt aller nicht beschädigten Strukturen des Kniegelenks eine möglichst natürliche Kinematik sichergestellt wird. Auch die Rehabilitation verläuft schneller als beim totalen Gelenkersatz und es werden längere Standzeiten erreicht (Krukenmeyer 2009).

Ein wesentlicher Nachteil liegt darin, dass die Operation technisch sehr anspruchsvoll ist und dass im Falle eines Implantatversagens ein totalendoprothetischer Ersatz aufgrund der notwendigen Knochenresektion bei der Primärimplantation nicht unproblematisch ist.

Bezüglich des Designs ähneln diese Prothesen den bikondylären Modellen mit einer Femurkomponente, die die Oberfläche des medialen oder lateralen Femurkondylus ersetzt.

Tibial wird eine Metallkomponente verwendet und als Gleitlager zwischen dem Tibiaplateau und dem Femurschild ein Polyethylen-Inlay (Krukenmeyer 2009).

Im Unterschied zur bikondylären Variante wird das femoropatelläre Gleitlager nicht mitersetzt und die Femurkomponente endet ventral am Vorderrand der in maximaler Extension belasteten Kondylenfläche (Krukenmeyer 2009).

II.2.1.2. Ungekoppelter bikondylärer Oberflächenersatz

Der ungekoppelte bikondyläre Oberflächenersatz stellt die Standardtherapie der Pangonarthrose dar und ermöglicht ein der normalen Kniegelenksfunktion ähnliches Roll-Gleitverhalten mit begrenzter Rotationsfähigkeit (Krukenmeyer 2009).

Auch hier ist eine ausreichende ligamentäre Gelenkführung erforderlich, vor allem durch die Kollateralbänder, die den Kraftschluss der Prothese ermöglichen. Das vordere Kreuzband ist nicht notwendig (Jerosch 1999).

Dieses Prothesenmodell besteht aus einem femoralen Metallschild, einem tibialen Metallplateau mit fixiertem oder mobilem Polyethylen-Inlay und optional einem Retropatellarersatz aus Polyethylen oder Polyethylen auf Metall (metal-backed) (Krukenmeyer 2009).

Die Erhaltung oder Ersetzung des hinteren Kreuzbandes ist aktuell Gegenstand kontroverser Diskussionen, wobei für die Erhaltung die stabilisierenden und propriozeptiven Eigenschaften des Ligaments sprechen. Die Erhaltung des hinteren Kreuzbandes gewährleistet beispielsweise Schutz vor Subluxation und Dislokation der Tibia nach posterior. Gegner des kreuzbanderhaltenden Vorgehens führen an, dass dieses bei einer ausgeprägten Arthrose oft strukturelle Schädigungen und funktionelle Defizite aufweist (Scott 2007).

Wird das hintere Kreuzband ersetzt, spricht man von einer Posterior-stabilisierten-Prothese. Prothesen, bei denen das hintere Kreuzband erhalten bleibt, werden als „cruciate-retaining“ (CR) bezeichnet (Kohn und Rupp 1999).

Auch über die Notwendigkeit des Retropatellarersatzes wird noch kontrovers diskutiert.

Zum Einsatz kommt dieser vor allem bei symptomatischer retropatellarer Arthrose und progredient destruierenden Gelenkerkrankungen wie beispielsweise der rheumatoïden Arthritis. Bei gut erhaltener Patellarückfläche und regelhafter Führung kann nach derzeitiger Studienlage darauf verzichtet werden.

Ein weiterer Designparameter ist die Kongruenz der Prothese, genauer gesagt die Kongruenz zwischen Metallkomponente und Kunststoff-Inlay. Man unterscheidet zwischen kongruenten Modellen nach dem „Round-on-round-“ oder „Flat-on-flat-Prinzip“ und inkongruenten Modellen nach dem „Round-on-flat-Prinzip“ (Jerosch 1999).

Auf der einen Seite bedingt eine konforme Artikulationsflächengestaltung eine geringere Kontaktbelastung, einen minimalen Verschleiß, eine erhöhte Gelenkstabilität sowie eine stärkere Belastung der Prothesen-Knochengrenze (Jerosch 1999).

Auf der anderen Seite führt weniger Konformität zu einem größeren Bewegungsspielraum des Kniegelenks, einer erhöhten, aber kleinflächigen Kompressionsbelastung und einer gesteigerten exzentrischen Belastung des Tibiaplateaus (Jerosch 1999).

II.2.1.3. Teilgekoppelte Prothesen

Ist der Bandapparat nicht mehr vollkommen intakt, werden teilgekoppelte (semi-constrained) Prothesen verwendet, die die Stabilität im Gelenk durch designspezifische Variationen des Inlays gewährleisten (Krukenmeyer 2009). Durch einen Zapfen im Polyethylen-Inlay, der sich

in einer interkondylären Box der Femurkomponente abstützt, kann beispielsweise eine Schwäche der Kollateralbänder ausgeglichen werden (Krukenmeyer 2009).

II.2.1.4. Achsgeführte Prothesen

Des Weiteren gibt es die Möglichkeit, das Kniegelenk durch achsgeführte (full-constrained) Prothesen wie Scharnierprothesen zu ersetzen, die meist sowohl femoral als auch tibial langstielig verankert sind und entweder über ein reines Scharniergegelk oder einen tibialen Zapfen, ähnlich des teilgekoppelten Modells, gekoppelt sind (Krukenmeyer 2009). Nachteil dieses Typs ist vor allem, dass die natürliche Kinematik des Kniegelenks nur begrenzt reproduziert werden kann (Krukenmeyer 2009). Die Indikation wird daher hauptsächlich gestellt, wenn eine Gonarthrose mit chronisch ligamentärer Instabilität, eine ausgeprägte Fehlstellung oder Kontraktur vorliegt oder eine Revisionsoperation notwendig ist (Krukenmeyer 2009).

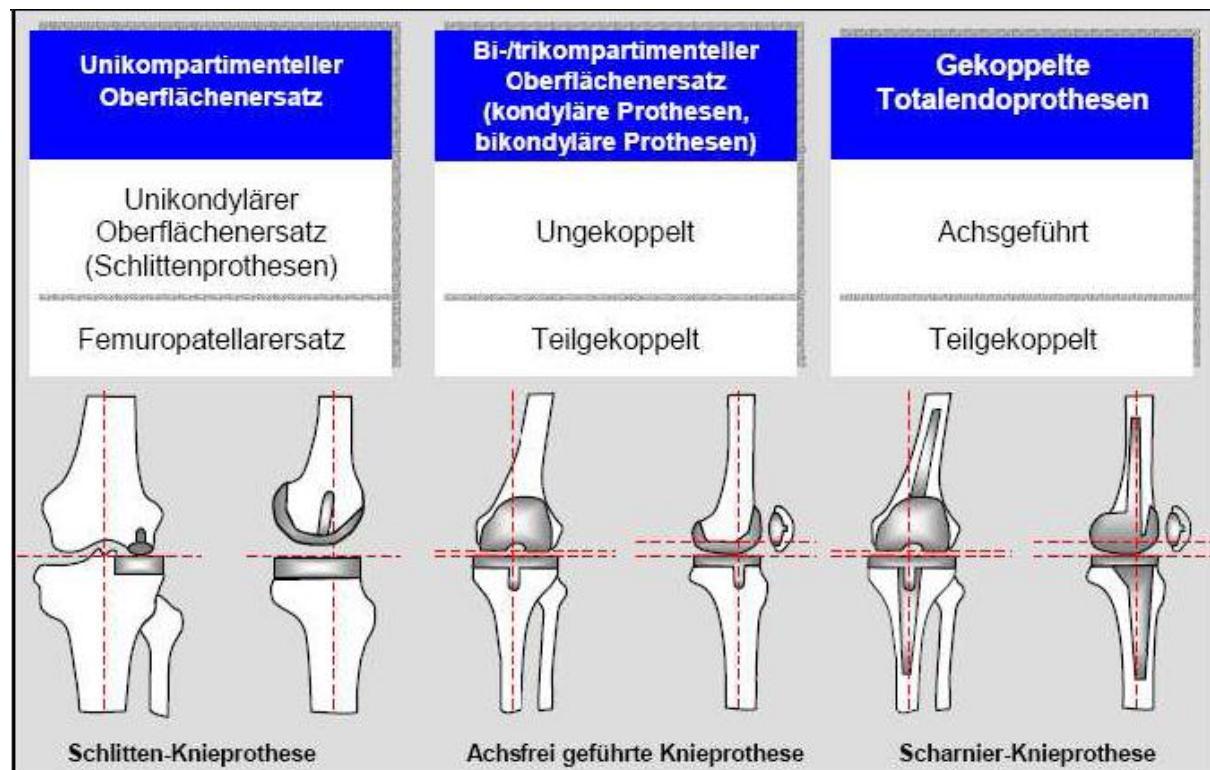


Abb. 3: Schematische Übersicht der verschiedenen Prothesenmodelle (Kohn und Rupp 1999)

II.2.1.5. Mobile- versus fixed-bearing

Zusätzlich unterteilt man die Knieendoprothesen bezüglich des Gleitlagers in mobile- und fixed-bearing-Varianten (Buechel et al. 2001, McEwen et al. 2001, McEwen et al. 2005, Fuchs 2003).

Beim Typ des mobile-bearing gleitet oder rotiert das Polyethylen-Inlay innerhalb vorgegebener Limitierungen oder auch uneingeschränkt auf der tibialen Komponente, während das Inlay beim fixed-bearing auf der tibialen Metallplatte befestigt ist (Fuchs 2003, McEwen et al. 2005). Weiterhin gibt es bei den mobilen Gleitlagern eine Unterteilung in Floating- (a.p.-Translation und Rotationsbewegungen) und Rotating-platform- (auf Innen- und Außenrotation beschränktes Design) Modelle (Fuchs 2003). Allen mobile-bearings ist gemein, dass das mobile Polyethylenplateau zum einen konform mit den Femurkondylen, zum anderen flat-on-flat mit dem Tibiaplateau artikuliert. Rotation und Translation können durch Stopps, wie Führungsrinnen oder Verankerungszapfen in der Oberfläche der Tibiakomponente, eingeschränkt werden oder unlimitiert bleiben (Fuchs 2003).

Theoretisch reduzieren mobile Gleitlager den Abrieb, da eine hohe Kongruenz zwischen Metall und Kunststoff die Kontaktbelastung und Flächenanpressung auf der Oberseite des Inlays minimiert (Fuchs 2003, Callaghan et al. 2001, Cheng et al. 2003). Auch bei starker Flexion des Kniegelenks bleibt eine große Kontaktfläche und somit die physiologische Roll-Gleitbewegung erhalten und der posteriore Spätabrieb, wie er bei fixierten Designs mit Round-on-flat-Prinzip entsteht, wird reduziert (Fuchs 2003, Sathasivam et al. 2001). Außerdem werden, wie beim normalen Kniegelenk, auftretende Dreh- und Scherkräfte auf die umgebenden Weichteile übertragen (Prinzip des „Load-Sharings“), was sich durch die verringerte Reibung in Folge reduzierter Krafteinwirkung am Knochen-Implantat-Interface positiv auf die Langlebigkeit des Implantats auswirkt (Fuchs 2003).

Allerdings wurden diese theoretischen Vorteile, eine Überlegenheit oder höhere Erfolgsquoten der mobile-bearings gegenüber den fixed-bearings in klinischen Studien bisher nicht bewiesen (NIH 2004, Jacobs et al. 2004, Kim et al. 2001, Price et al. 2003). Beide Designs weisen nach zehn Jahren Überlebensraten von bis zu 95% auf (Buechel et al. 2001, Callaghan et al. 2000, Huang et al. 2003). Außerdem entsteht bei den mobilen Polyethylenlagern im Gegensatz zum fixed-bearing durch die zusätzliche Artikulationsfläche zweiseitig Abrieb, also auch auf der Unterseite des mobile-bearings (Chapman-Sheath et al. 2002). Weitere Einschränkungen der mobilen Gleitlager stellen beispielsweise Subluxationsphänomene mit weichteiligem Impingement sowie Dislokationen der Inlays dar (Fuchs 2003, Huang et al. 2002b). Einklemmungen und folglich höherer Verschleiß kommen vor allem bei Gleitlagern vor, die mit Führungselementen ausgestattet sind. Bei Rotating-platform-Designs gilt der „Spinout“ (Subluxation) des Inlays als wesentlicher Nachteil.

Besonders bei asymmetrischem Beugespalt, der zu diesem Spinout führt, ergibt sich dadurch oft ein früheres Versagen der Prothese (Fuchs 2003). Außerdem wurde gezeigt, dass fixed-bearings zu einer vermehrten Erzeugung größerer Abriebpartikel führen, die weniger biologisch reaktiv sind (Wimmer et al. 1998), während die Partikel bei mobile-bearings kleiner und reaktiver sind (Huang et al. 2002a), was ein erhöhtes Risiko für eine aseptische Lockerung andeutet.

Zusammengefasst bestätigten sich die hypothetischen Vorteile der mobile-bearings praktisch bislang nicht, es bestehen beachtliche Nachteile und es wurde keine Überlegenheit gegenüber fixed-bearings gezeigt (Huang et al. 2007).

II.2.2. Materialien in der Knieendoprothetik

Die meist verwendeten Knieendoprothesenmodelle bestehen aus Metalloberflächen an Femur und Tibia sowie einem dazwischen geschalteten Kunststoffgleitlager (Kohn und Rupp 1999). Als Standardgleitpaarung in der Knieendoprothetik gilt heute Polyethylen-Metall. UHMWPE stellt im künstlichen Kniegelenk den Werkstoff der Wahl für das Gleitlager zwischen Femur- und Tibiakomponente dar (Kohn und Rupp 1999, Wright 2005). Im Bereich der Metalle, die die Femur- und Tibiakomponente bilden, werden insbesondere zwei große Gruppen unterschieden.

Zum einen gibt es Metalllegierungen auf Cobaltbasis, meist unter Zumischung von Chrom, Molybdän und weiteren Komponenten. Zum anderen werden Titanlegierungen, in der Regel kombiniert mit Aluminium und Vanadium eingesetzt. (Kohn und Rupp 1999, Kurtz 2004)

Am häufigsten wird heute die Kobalt-Chrom-Gusslegierung CoCr29Mo nach ISO 5832-4 für die Femur- und Tibiaimplantatkomponenten verwendet (Elke et al. 2001).

II.2.3. Ultra-high-molecular-weight-polyethylene (UHMWPE) als tribologische Gleitflächenkomponente im künstlichen Kniegelenk

II.2.3.1. Polyethylen

Polyethylen ist ein durch Polymerisation von Ethen $[CH_2=CH_2]$ herstellter thermoplastischer Kunststoff mit der vereinfachten Kettenstrukturformel $[CH_2=CH_2]_n$ (Bargel-Schulze 2000, Streicher et al. 2003).

Chemisch besteht es aus Wasserstoff und Kohlenstoff in Form hochmolekularer Alkane (Bargel-Schulze 2000).

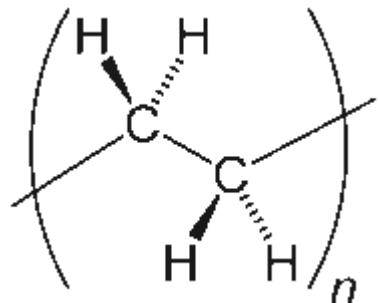


Abb. 4: Struktur eines Polyethylenmoleküls (Bargel-Schulze 2000)

Die Eigenschaften von Polyethylen hängen wesentlich vom Grad der Kristallinität und vom Polymerisationsgrad n ab (Bargel-Schulze 2000). Die Struktur des Polyethylen ist teilkristallin, es besteht aus amorphen und kristallinen Bereichen. Mit dem Grad der Kristallinität erhöht sich die Dichte, mit steigendem Polymerisationsgrad die mittlere Molekülmasse. Dichte und Molekülmasse stellen so die zentralen Unterscheidungsmerkmale der einzelnen PE-Abkömmlinge dar (Bargel-Schulze 2000).

Mit Erhöhung der Dichte wie auch der Kristallinität steigen Steifheit, Festigkeit, Zähigkeit und Härte, die chemische Beständigkeit nimmt zu und die Gasdurchlässigkeit nimmt ab. Eine zu hohe Kristallinität kann allerdings zu einer schädlichen Sprödigkeit führen (Bargel-Schulze 2000).

Des Weiteren ist der Kunststoff PE milchig-trüb und matt, besitzt eine hohe Beständigkeit gegen Säuren und Laugen und weist eine geringe Durchlässigkeit für Gas und Wasserdampf auf. Für Sauerstoff und Kohlendioxid ist es hingegen gut durchlässig (Bargel-Schulze 2000). Überdies zeichnet sich Polyethylen durch eine hohe Zähigkeit und Bruchdehnung, durch gutes Gleitverhalten, Temperaturbeständigkeit von -85°C bis +90°C und durch eine geringe Wasseraufnahme aus (Bargel-Schulze 2000). Hergestellt wird es durch Polymerisation von petrochemisch erzeugtem Ethylengas.

II.2.3.2. UHMWPE

Die Einführung des Polyethylen erfolgte durch Sir John Charnley Mitte der 50'er Jahre. Heute sind 80% aller Hüft- und 100% aller Knieendoprothesen mit UHMWPE ausgestattet (Krukenmeyer 2009).

UHMWPE ist ein semikristallines Polymer mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von $> 2 \times 10000000$ g/mol (Brach del Prever et al. 2009). Etwa 50% des Polymers sind kristallin und 50% amorph (Kurtz 2004, Ries et al. 2005b).

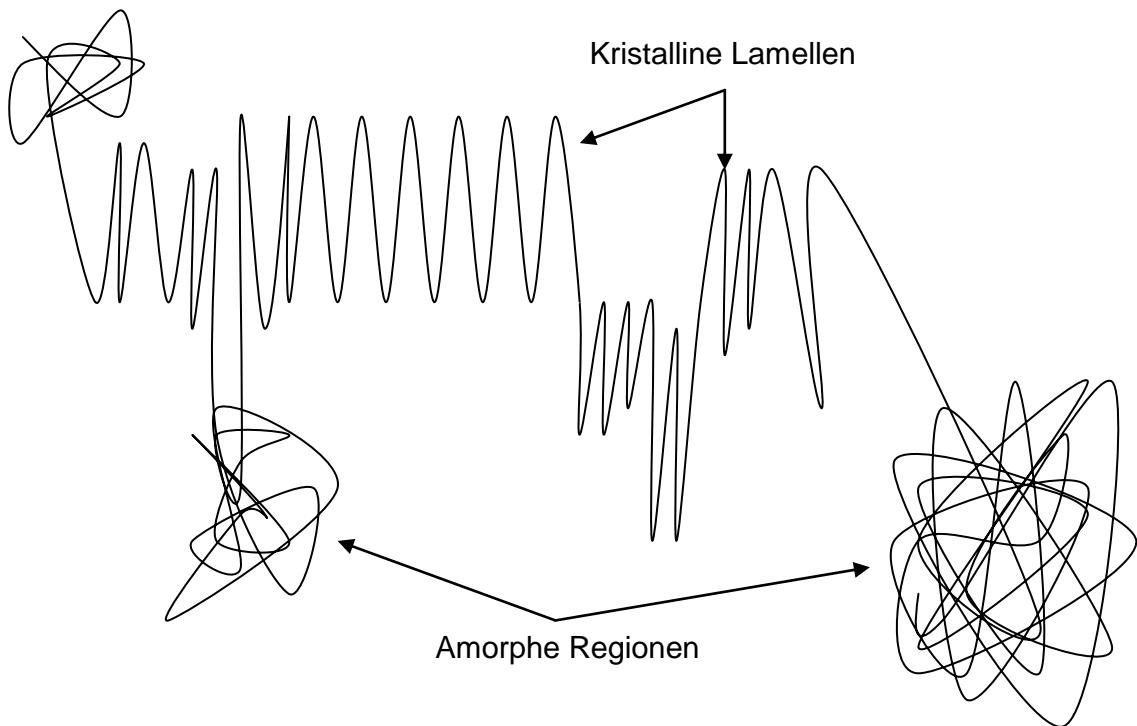


Abb. 5: Semikristalline Struktur des Polymers UHMWPE (Kurtz 2004)

Da im Polymerisat immer eine Mischung von Ketten unterschiedlicher Länge vorliegt, wird ein durchschnittliches Molekulargewicht angegeben. UHMWPE wird zunächst als Pulver durch das sog. Ziegler-Verfahren gefertigt (Streicher et al. 2003). In diesem Niederdruckverfahren wird Ethylen mittels Mischkatalysatoren bei 10-500 N/cm² Überdruck und einer Temperatur von 20-150°C unter Luft- und Feuchtigkeitsausschluss polymerisiert (Jerosch 1999). Im Pulver verbleibt allerdings immer ein Anteil an Katalysatorresten. Mittels Wasserdampfdestillation wird das Pulver gereinigt und dann getrocknet (Streicher et al. 2003). Anschließend wird das Pulverpolymerisat bei ca. 200°C zu Platten, Stangen oder Endprodukten nach Press- (compression moulding) und RAM-Extrusionsverfahren weiterverarbeitet (Streicher et al. 2003). Temperatur und Druck bei der Verarbeitung führen zu einer Variation der Materialeigenschaften, was auch den Verschleiß beeinflusst (Jerosch 1999, Streicher et al. 2003). Das Implantat-Inlay entsteht dann entweder durch Präzisionsfräsen aus PE-Platten oder durch das so genannte Formpressen (Jerosch 1999). Dabei wird das PE-Pulver direkt zu Fertigteilen gepresst (Jerosch 1999).

Abschließend wird das UHMWPE sterilisiert. Die häufigste Sterilisationsmethode ist die Gammabestrahlung mit Dosen zwischen 25 und 40 kGy (Streicher et al. 2003, Muratoglu et al. 2003a). Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der Bildung freier Radikale, die mit Umgebungssauerstoff reagieren und oxidative Kettenspaltungen hervorrufen, was zu einer Abnahme der Quervernetzungen und der mechanischen Stabilität des Werkstoffes führt (Brach del Prever et al. 2009, Ries et al. 2005a, 2005b). Allerdings kommt es auch zu einer zusätzlichen Vernetzung, da ein Teil der freien Radikale zu neuen Bindungen reagiert. Die Oxidationsprozesse werden heutzutage durch eine Sterilisation unter Sauerstoffausschluss im Vakuum oder in einer Inertgasatmosphäre (Stickstoff oder Argon) reduziert (Brach del Prever et al. 2009, Ayers 2001, Tamura et al. 2002, Lewis 1997). Für die Oxidation sind weiterhin Lagerungsbedingungen und die absorbierte Gesamtdosis entscheidend. Höhere Strahlungsdosis und Lagerung bei höherer Temperatur resultieren in einer gesteigerten Oxidation (Brach del Prever et al. 2009). Die freien Radikale können auch eine Nachoxidation bedingen, das heißt, es kommt bei der Lagerung und auch noch nach der Implantation *in vivo* zu Oxidationsprozessen mit Sauerstoff (Ries et al. 2005b). Um diese Nachoxidationen zu minimieren, gibt es spezielle Verpackungen und Lagerungsbedingungen für das Polyethylen (Brach del Prever et al. 2009). Das Implantat wird beispielsweise in Spezialtüten doppelt verpackt und in eine Aluminiumhülle eingeschweißt, wodurch der Sauerstoffgehalt in der Verpackung reduziert wird (Brach del Prever et al. 2009). Die Oxidation ist vor allem schädlich, da sie zu Zerstörungen 1-2 mm unterhalb der Oberfläche des Polyethylengleitlagers führt, die den Ausgangspunkt für spätere Ermüdungserscheinungen des Materials darstellen können (Tamura et al. 2002, Hood et al. 1983, Ayers 2001).

Neben der Gammabestrahlung gibt es auch die Gassterilisation, zum einen mit Ethylenoxid, zum anderen mit Plasmagas (Brach del Prever et al. 2009). Vorteil davon ist, dass keine Radikale entstehen, es kommt auch zu keiner weiteren Vernetzung und Veränderung in der chemischen Zusammensetzung (Sobieraj et al. 2009).

Medizinisches UHMWPE stammt hauptsächlich aus den Granulaten GUR 1020 und GUR 1050 (Kurtz 2004). GUR steht für Granulat, Ultrahochmolekular, Ruhr Chemie, die erste Ziffer für das Herstellungsland (1=USA, 4=Deutschland), die zweite Ziffer für den Zusatz von Calciumstearat (1=ja, 0=nein), die dritte für das durchschnittliche Molekulargewicht und die vierte ist eine herstellerinterne Ziffer (Streicher et al. 2003).

II.2.3.3. Crosslinked Polyethylen

Hochvernetztes, so genanntes crosslinked Polyethylen wurde aufgrund seiner erhöhten Abriebfestigkeit zu einer neuen Option in der Endoprothetik (Galvin et al. 2006, McEwen et al. 2005, Muratoglu et al. 2002, Muratoglu et al. 2003a, Muratoglu et al. 2004, Muratoglu et al. 2007). Hochvernetztes Polyethylen entsteht durch kovalente Bindungen zwischen benachbarten Polyethylenketten (Brach del Prever et al. 2009). Die Quervernetzungen im Polyethylen können entweder chemisch mit Peroxiden oder durch hochenergetische Strahlung wie Gamma- oder Elektronenstrahlung erzeugt werden (Streicher et al. 2003).

Das heute gängige Verfahren zur Erzeugung von crosslinked PE ist eine erhöhte Bestrahlungsdosis und ein anschließender Temperaturvorgang zur Reduktion der freien Radikale, die aufgrund der hohen Bestrahlungsdosis vermehrt entstehen (Brach del Prever et al. 2009, Ries et al. 2005a). Dosen für hochvernetztes UHMWPE liegen im Bereich von 3,3 bis 10 Mrad. Der Temperaturvorgang ist entweder ein Erhitzen über den Schmelzpunkt (remelting-Verfahren) oder knapp unter den Schmelzpunkt (annealing-Verfahren) (Ries et al. 2005a). Vorzug des remelting-Verfahrens ist die Beseitigung beinahe aller freien Radikale, Nachteil ist die Verschlechterung von Materialeigenschaften des Polyethylens, wie Bruchfestigkeit, Zähigkeit, Zugfestigkeit, Festigkeit an Dehngrenzen und die Erhöhung des E-Moduls (Brach del Prever et al. 2009, Ries et al. 2005a, Bradford et al. 2004a, Baker et al. 2003, Oral et al. 2004). Nachteil der annealing-Methode ist der Verbleib einer gewissen Menge an freien Radikalen und so der Entstehung von Oxidationsprozessen und folglich von Ermüdungserscheinungen des Werkstoffes (Brach del Prever et al. 2009, Oral et al. 2004). Neuere crosslinked Polyethylen werden beispielsweise nach dem annealing-Verfahren hergestellt, aber mit dem Zusatz eines pharmakologischen Antioxidans wie beispielsweise Vitamin E (Oral et al. 2007) oder in einem sequentiellen Prozess gering dosierter Bestrahlung und Erwärmung (Ries et al. 2005a, Wang et al. 2008).

Wichtiger Vorteil dieses Polyethylenabkömlings ist die durch die dreidimensionale Struktur verursachte hohe Verschleißfestigkeit (Brach del Prever et al. 2009, Streicher et al. 2003, Utzschneider et al. 2009a, 2009b).

II.2.3.4. Knieprothesendesigns dieser Arbeit

In dieser Arbeit wurden sechs unterschiedliche Polyethylen-Inlays mit den von den Herstellern dazu empfohlenen Endoprothesendesigns getestet, wobei fünf davon kommerziell erhältlich sind und eines eine experimentelle Kombination darstellt (Utzschneider et al. 2009b).

Material-kombination	Prothesendesign	Polyethylen	Herstellungsprozess
A (=X3)	Scorpio® (Stryker)	XPE (=Crosslinked PE) (X3™)	Fixed-bearing CR 24mm, GUR 1020, 3x30 kGy Gammabestrahlung, annealing und sequentielle Bestrahlung, Gasplasmasterilisation
B (=Durasul)	Natural Knee® II (Zimmer)	XPE (Durasul™)	Fixed-bearing <i>ultra-kongruent</i> CR 19mm, GUR 1050, 95 kGy Elektronenbestrahlung, Remelting, Gassterilisation mit Ethylenoxid
C (=Prolong)	Nex Gen® (Zimmer)	XPE (Prolong™)	Fixed-bearing CR 14mm, GUR 1050, 65 kGy, Elektronenbestrahlung, remelting, Gasplasmasterilisation
D (=XPE*)	LCS® (DePuy)	XPE	Mobile-bearing (rotating-platform) 15mm, GUR 1020, 50 kGy Gammabestrahlung, remelting, Gasplasmasterilisation *)
E (=UHMWPE1)	LCS® (DePuy)	Konventionelles UHMWPE	Mobile-bearing (rotating-platform) 15mm, GUR 1020, 20-40 kGy Gammabestrahlung unter Vakuum in foil (GVF)
F (=UHMWPE2)	Natural Knee® II (Zimmer)	Konventionelles UHMWPE	Fixed-bearing kongruent 13mm, GUR 1050, Gammasterilisation

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Polyethylenen, des Herstellungsverfahrens dieser sowie des Designs und der Materialkombination der entsprechenden vom Hersteller empfohlenen Prothese

*) Experimentelle Kombination, nicht kommerziell erhältlich

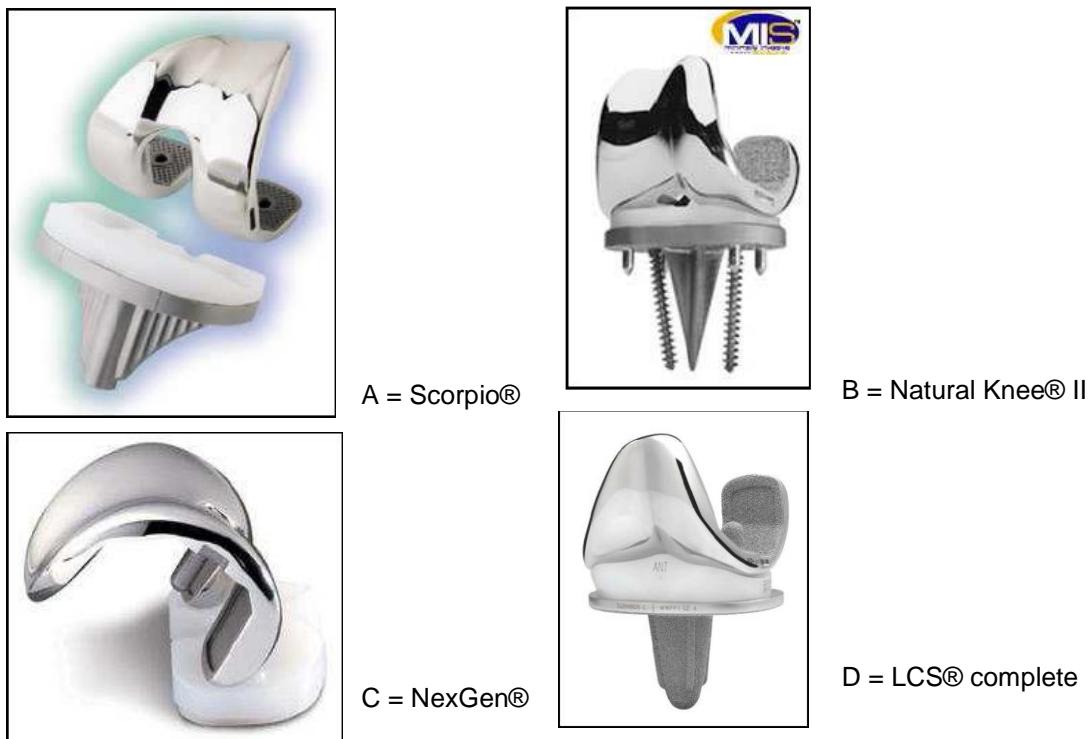


Abb. 6: Verwendete bikondyläre Knieprothesenmodelle

[A) aus <http://www.stryker.de>; B) und C) aus <http://www.zimmergermany.de>; D) aus <http://www.kneereplacement.com/DePuy>]

II.2.4. Abrieb im künstlichen Kniegelenk

II.2.4.1. Mechanismen und Erscheinungsformen des Polyethylenabriebs

Definiert wird Abrieb als Materialverlust aufgrund mechanischer Belastung einer Oberfläche (Wimmer 2000).

Faktoren, die Einfluss auf die Abriebentstehung haben, sind die auf das Material einwirkenden Kräfte, die Druckbelastung, die Kongruenz der Artikulationsflächen und somit die Größe der Kontaktflächen sowie die Dicke und Verschleißfestigkeit des Materials. Die Abriebrate wächst mit exzessiven Belastungen, wie sie bei Scheerkräften entstehen, hohem Kompressionsdruck und kleinen Kontaktflächen (Brach del Prever et al. 2009, Revell et al. 2008, Streicher et al. 2003).

Bei der Abriebentstehung werden vier verschiedene Mechanismen unterschieden (Wimmer 2000).

Zunächst gibt es den adhäsiven Abrieb, wobei zwei glatte Oberflächen gegeneinander gleiten und Partikel von einer Oberfläche auf die andere gezogen werden (Wimmer 2000). Dahinter steht die transiente Bindung der Artikulationsflächen unter mechanischer Last. Des Weiteren entsteht abrasiver Abrieb beim Kontakt zwischen einer weicheren und einer härteren Oberfläche, wobei die härtere Oberfläche Partikel aus der weicheren herauskratzt oder wenn sich härtere Partikel zwischen zwei weicheren Oberflächen befinden (McKellop et al. 2007). Tribochemischer Abrieb wird durch chemische Reaktionen des Umgebungsmediums induziert (Wimmer 2000). Von Ermüdungsabrieb spricht man, wenn beispielsweise akkumulierter Stress an der Oberfläche die intrinsische Ermüdungskraft übersteigt, es zu oberflächlichen Brüchen kommt und Partikel freigesetzt werden (Wimmer 2000, Otto et al. 2006). Hierzu zählt typischerweise die Delamination (Wimmer 2000, Kurtz 2004, Hood et al. 1983).

Durch die verschiedenen Abriebmechanismen entstehen an den Artikulationsoberflächen bestimmte Veränderungen und Schäden, die als Abrieberscheinungen bezeichnet werden (Hood et al. 1983).

Zunächst gibt es das „Polishing“ oder „Burnishing“, dabei kommt es durch die Abriebpartikel zu einer Oberfläche, die wie glatt poliert aussieht (McKellop et al. 2007). Außerdem können an den Artikulationsflächen Kratzer entstehen, was als „Scratching“ bezeichnet wird (McKellop et al. 2007). Sie entstehen durch mikroskopische Rauigkeit der Komponenten. Abrasion bezeichnet die Zerfaserung des Polyethylens durch eine raue Oberfläche (McKellop et al. 2007). Kraterähnliche Defekte auf der Kunststofffläche werden „Pitting“ genannt (Hood et al. 1983). Eine weitere Abrieberscheinung ist die Delamination. Dabei kommt es unter der Oberfläche des Polyethylens zu erhöhten Spannungs- und

Dehnungsbelastungen und konsekutiv eben dort zur Entwicklung und Fortpflanzung von Rissen und Defekten (Jerosch 1999, Hood et al. 1983). Überdies existiert die Oberflächenverformung, „plastic deformation“ oder auch Kriechen (Creeping) genannt, bei der das Inlay zwar seine Form verändert, aber keine Abriebpartikel entstehen (Wright 2005). Schließlich existiert der „Dreikörperabrieb“, der durch zwischen die Artikulationsflächen geratene Fremdkörper, wie Zementpartikel und Knochenfragmente, eine massive Schädigung der PE-Oberfläche bedingt und so die Verschleißfestigkeit herabsetzt (Jerosch 1999, Hood et al. 1983).

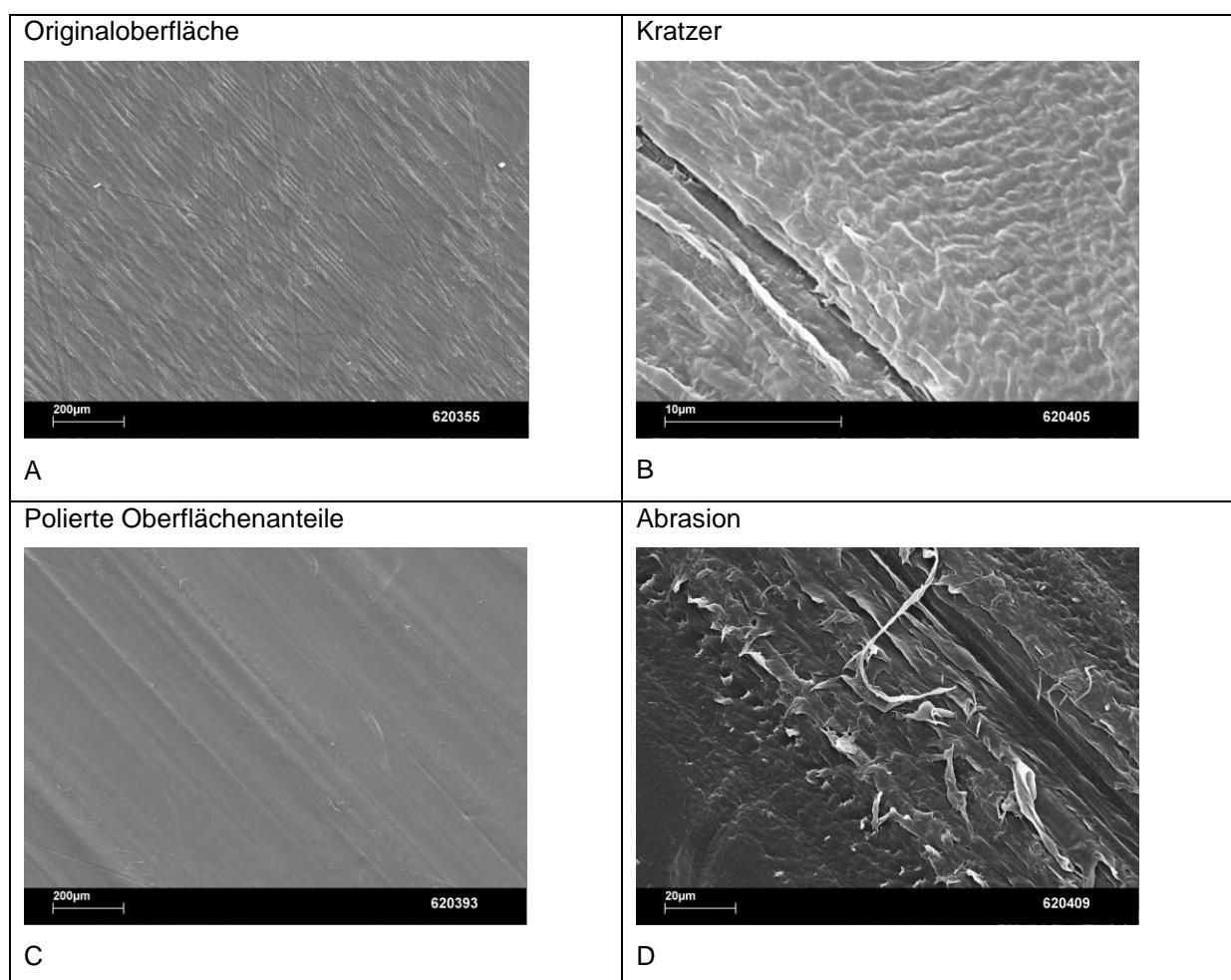


Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Bilder von Polyethylen-Inlays mit (A) Originaloberfläche, (B) Kratzern, (C) polierten Oberflächenanteilen und (D) Abrasion (aus dem Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie, Ludwig-Maximilians-Universität, München)

II.2.4.2. Charakteristika der Polyethylenabriebpartikel

Die entstehenden Abriebpartikel unterscheiden sich in Parametern wie Größe, Form, Oberfläche und Volumen, welche sich alle auf die biologische Reaktivität auswirken (Fehring et al. 2004, Fisher et al. 2004, Griffin et al. 2007, Purdue et al. 2007, Yang et al. 2002).

Partikelcharakteristika, die die Ausprägung der biologischen Reaktion, also des Inflammationsprozesses beeinflussen, sind die Menge an Partikeln, deren Morphologie, Größe, Volumen und Längenverhältnis sowie die chemische Reaktivität des Partikelmaterials. Die Entzündungsantwort steigt mit der Partikelmenge und außerdem ist bekannt, dass längliche Partikel inflammatorischer wirken als runde (Hallab et al. 2009). Die Größe der Partikel spielt eine entscheidende Rolle bei der aseptischen Prothesenlockerung (Hallab et al. 2009, Yang et al. 2002). Tribologische Untersuchungen zeigten, dass die mengenmäßig größte Fraktion der Partikel kleiner als 1 µm ist und die mittlere Größe bei 0,5 µm liegt (Hallab et al. 2009). Partikel im Nanometerbereich werden von Zellen mittels Pinozytose oder Endozytose aufgenommen (< 150 nm) und Partikel mit einer Größe zwischen 150 nm und 10 µm werden von einem breiten Spektrum an Zellen phagozytiert, wie Osteoblasten, Fibroblasten, Endothelzellen und Makrophagen (Hallab et al. 2009, Green et al. 2000). Größere Partikel werden von multinukleären Riesenzellen inkorporiert (Drees et al. 2008, Ingham et al. 2005, Otto et al. 2006, Revell et al. 2008). Insbesondere von Makrophagen phagozytierte Partikel, also bis 10 µm große Partikel, induzieren eine ausgeprägte biologische Reaktion (Drees et al. 2008, Otto et al. 2006, Revell et al. 2008, Holt et al. 2007).

II.2.5. Ursachen des Knieendoprothesenversagens

Die Zahl der Erstimplantationen beläuft sich in Deutschland auf etwa 130.000 künstliche Kniegelenke pro Jahr. In überproportionalem Maß nimmt aber auch die Zahl der Revisions- und Wechseloperationen (ca. 5% Anstieg 2006 gegenüber 2005) zu, insbesondere bei jüngeren Patienten (Graichen et al. 2007). Für eine Insuffizienz des künstlichen Kniegelenks und eine folglich notwendige Revisionsoperation gibt es verschiedene Gründe. In ca. 44% der Fälle ist das Versagen des Implantats durch Polyethylenabrieb bedingt (Robertsson et al. 2001). Die aseptische Lockerung der Endoprothese, die durch die Polyethylenabriebpartikel induziert wird, stellt somit deutlich die Hauptursache für die Notwendigkeit einer Revisionsoperation dar. Eine weitere Komplikation ist bei etwa 5,7% der Patienten die Instabilität (Robertsson et al. 2001). Bei der Implantation der Prothese kann es zu einer Verletzung des Bandapparates und infolgedessen postoperativ zu einer ligamentären

Instabilität kommen. Bei etwa 9,9% der Patienten führt eine Infektion zu einem Versagen der Prothese und bei ca. 0,9% treten periprothetische Frakturen auf (Robertsson et al. 2001). Risikofaktoren hierfür sind eine bestehende Osteoporose, eine Fehlpositionierung der Prothesenkomponenten, langstielige Implantate und Revisionssituationen (Krukenmeyer 2009). Seltene Ursachen für ein Versagen des künstlichen Kniegelenks sind weiterhin eine avaskuläre Nekrose der Patella oder eine Arthrofibrose (Callaghan et al. 2004).

	Early N	Late N	All n	%
Infection	231	86	317	9,9
Loosening	557	854	1411	44,1
Other mech.	158	237	395	12,4
Fracture	15	15	30	0,9
Patella	180	31	211	6,6
Instability	113	70	183	5,7
Progress	253	225	478	14,9
Other	91	82	173	5,4
Total	1598	1600	3198	100,0

Tab. 2: Schwedisches Knieprothesenregister 1975–1997: Indikationen für primäre Revisionsoperationen von Knieendoprothesen von 1988 bis 1997 (Median der Prothesenstandzeit = 45 Monate) (Robertsson et al. 2007)

II.2.6. Biologische Reaktion auf Polyethylenpartikel: aseptische Lockerung

Die aseptische Osteolyse stellt die Hauptursache für das Versagen von Knieendoprothesen und Revisionsoperationen dar (Forster et al. 2003, Graves et al. 2004, Horwitz et al. 2009). Die molekularbiologischen Prozesse und Kaskaden, die in mehreren komplexen Schritten Osteolysen und eine aseptische Lockerung der Prothese bewirken, sind bisher noch nicht bis ins Detail bekannt (Holt et al. 2007, Drees et al. 2008, Gallo et al. 2008, Ingham et al. 2005, Jacobs et al. 2001, Tuan et al. 2008). Zusammengefasst induzieren die Abriebpartikel eine Aktivierung von Makrophagen und weiteren Immunzellen, die über die Sekretion von Zytokinen und anderen Entzündungsmediatoren zur Knochenresorption führen, indem sie zu einer Aktivierung der Osteoklastogenese und zu einer Hemmung der Osteoblastenfunktion führen. Wie die Partikel an die Implantat-Knochen-Grenze gelangen, wo die Knochenresorption erfolgt, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Nach Schmalzried et al. werden die Polyethylenpartikel gemäß der Theorie des so genannten „Periimplantatspaltes“ mit der Synovialflüssigkeit in durch mechanische Faktoren entstandene Mikrospalten zwischen Knochen und Implantat transportiert und verteilt und lösen dort über die Aktivierung von Makrophagen lokal den Abbau von Knochensubstanz aus (Schmalzried et al. 1992). Andere Studien hingegen postulierten, dass Partikel Knochen durchwandern können (Massin

et al. 2004, Libouhan et al. 2008). Außerdem gibt es Hinweise darauf, dass Abriebpartikel auch in regionäre Lymphknoten transportiert werden (Revell et al. 2008). Überdies konnten in Organen wie Leber, Milz, Niere und Lunge Partikel nachgewiesen werden (Revell et al. 2008).

An der Kontaktfläche zwischen Knochen und Implantat kommt es zur Ausbildung der so genannten periprothetischen Membran, einer der Synovialmembran ähnlichen Pseudomembran (Drees et al 2008, Ingham et al. 2005, Otto et al. 2006, Revell et al. 2008). Dort befinden sich Zellinfiltrate, die aus Makrophagen, multinukleären Riesenzellen, Prothesenlockerungs-spezifischen Fibroblasten, Endothelzellen, Mastzellen und vereinzelt aus T-Lymphozyten bestehen (Drees et al 2008, Ingham et al. 2005, Otto et al. 2006, Revell et al. 2008, Tuan et al. 2008). Auch die Polyethylenabriebpartikel sind in dieser Membran, die das resorbierte Knochengewebe ersetzt, darstellbar (Drees et al. 2008, Otto et al. 2006, Revell et al. 2008). Überdies spiegelt die Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen aktives Geweberemodelling wieder.

Voraussetzung für die folgende osteolytische Kaskade ist die Opsonierung der Abriebpartikel. Sie werden an Proteine wie Albumin, Immunglobuline, Komplementfaktoren oder an Kollagen gebunden, wodurch die Phagozytose durch Makrophagen und multinukleäre Riesenzellen erleichtert wird (Revell et al. 2008). Auch bakterielle Produkte wie Exotoxine lagern sich an die Abriebpartikel an und verstärken die Entzündungsreaktion (Drees et al. 2008). Die Polyethylenpartikel interagieren nun mit Makrophagen, Osteoklasten und Fibroblasten und werden entweder phagozytiert oder aktivieren Rezeptoren auf der Oberfläche dieser Zellen (Gallo et al. 2008, Tuan et al. 2008). Dies führt zu einer gesteigerten Sekretion von Entzündungsmediatoren wie Zytokinen, Chemokinen, Wachstumsfaktoren und proteolytischen Enzymen. Insbesondere IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-17 und Granulozyten-Makrophagen colony-stimulating factor (GM-CSF) werden von den aktivierten Makrophagen sezerniert und wirken proinflammatorisch (Drees et al. 2008, Ingham et al. 2005, Holt et al. 2007, Purdue et al. 2007, Revell et al. 2008). Es kommt zur Rekrutierung weiterer Makrophagen und anderer Entzündungszellen (Drees et al. 2008, Wooley et al. 2004, Revell et al. 2008). Ein Grund hierfür liegt unter anderem darin, dass die Makrophagen die phagozytierten Partikel nicht verdauen können (Otto et al. 2006). Für die osteolytische Kaskade sind vor allem die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α von Bedeutung, wobei die Synthese von IL-6 hauptsächlich durch IL-1 β und TNF- α gesteigert wird. IL-1 β und TNF- α bewirken synergistisch sowohl eine Aktivierung von differenzierten Osteoklasten, als auch eine Stimulierung der Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen (Wei et al. 2005). TNF- α kann diese Prozesse allein in Gang setzen, während IL-1 β nur synergistisch mit TNF- α wirkt. Die Knochenresorption erfolgt nun zum einen direkt durch aktivierte Makrophagen, die durch periodale Knochenresorption kleine Osteolysen erzeugen, zum

anderen durch rekrutierte, zytokin-aktivierte Osteoklasten und durch aus Makrophagen differenzierte Osteoklasten (Ali et al. 1984, Fallon et al. 1983, Mundy et al. 1977, Quinn et al. 1996). Die multinukleären Osteoklasten resorbieren mittels Kathepsin K und Säure größere Areale des Knochens und bilden ausgedehnte Lakunen (Purdue et al. 2007, Tamaki et al. 2008). Intrazellulär existiert neben anderen ein Hauptsignalweg, der über TNF- α und IL-1 β zur Osteoklastogenese führt. Dieser läuft über den Transkriptionsfaktor NF- κ B, der im Zytoplasma normalerweise von einem Hemmfaktor gebunden wird. Im Rahmen von Inflammationsprozessen wird dieser Inhibitor proteolytisch abgebaut und NF- κ B gelangt in den Kern, wo er an die Promotorregion seiner Zielgene (insbesondere proinflammatorische Zytokine, Chemokine, Adhäisionsmoleküle) bindet (Drees et al. 2008, Ingham et al. 2005, Revell et al. 2008, Holt et al. 2007, Otto et al. 2006).

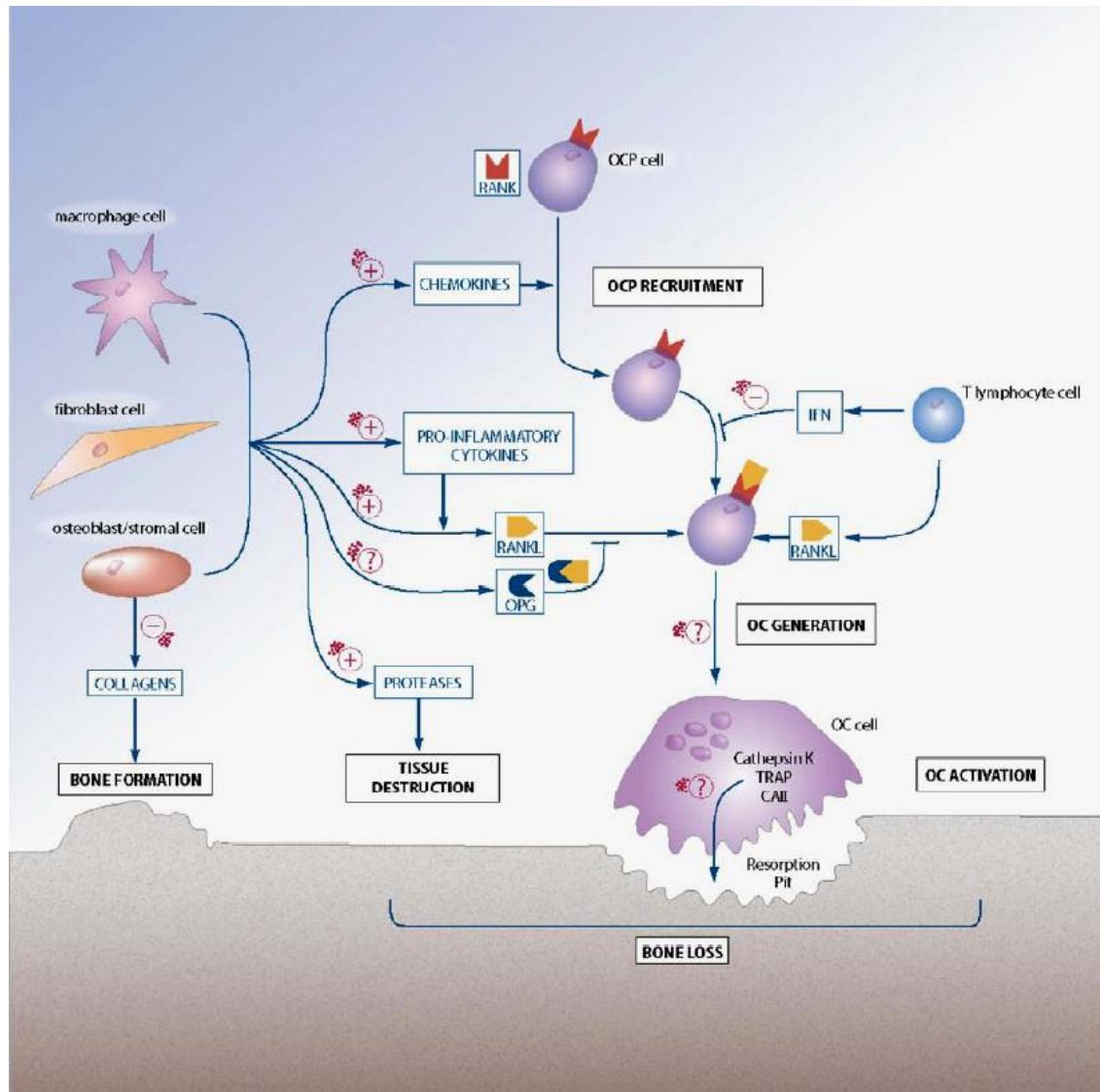


Abb. 8: Schematische Darstellung der die Entstehung aseptischer Osteolysen im Bereich künstlicher Gelenke vermittelnden Signalkaskaden einschließlich der beteiligten Zellen sowie der proinflammatorischen Mediatoren (Purdue et al. 2007)

Dieser Transkriptionsfaktor NF-κB kann durch den Rezeptor-Aktivator von NF-κB (RANK) aktiviert werden, das seinerseits vom Liganden des Rezeptor-Aktivator von NF-κB (RANKL) aktiviert wird (Drees et al. 2008, Otto et al. 2006, Gallo et al. 2008, Purdue et al. 2007). Die Aktivierung und Expression von RANKL wird wiederum von TNF-α reguliert, das zusätzlich den Gegenspieler von RANKL, Osteoprotegerin (OPG), hemmt (Baumann et al. 2005, Fuller et al. 2002, Zhang et al. 2001, Xu et al. 1996). RANKL ist ein Mitglied der TNF-Familie und stimuliert über seinen Rezeptor RANK direkt die Differenzierung und Aktivierung der Osteoklasten. Die biologische Aktivität von RANKL wird durch OPG gesteuert (Ingham et al. 2005, Otto et al. 2006, Revell et al. 2008). Das Verhältnis von RANKL und OPG ist entscheidend für den Knochenstoffwechsel und das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau. Ist dieses Gleichgewicht durch TNF-α zugunsten von RANKL verschoben, resultieren daraus eine negative Knochenbilanz, Knochenresorption und Osteolysen (Gallo et al. 2008, Purdue et al. 2006, Purdue et al. 2007, Tuan et al. 2008).

Die zentralen Funktionen von NF-κB liegen wiederum in der Steuerung der Sekretion von TNF-α durch Makrophagen und der Expression von Entzündungsgenen und Adhäsionsmolekülen (Purdue et al. 2007, Drees et al. 2008, Kouba et al. 1999, Otto et al. 2006).

Da TNF-α in diesem Prozess eine zentrale Rolle einnimmt und synergistisch mit IL-1β wirkt (Wei et al. 2005), ist der immunhistochemische Nachweis dieser Zytokine von Bedeutung für diese Arbeit.

Neben den Makrophagen wurde auch die Anwesenheit von Lymphozyten in der periprothetischen Membran nachgewiesen (Gallo et al. 2008, Tuan et al. 2008, Revell et al. 2008). Die Rolle dieser im Prozess der aseptischen Prothesenlockerung ist allerdings noch Gegenstand kontroverser Diskussion. Abriebpartikel aktivieren Makrophagen, die Mediatoren wie Macrophage inflammatory protein-1 (MIP-1) und Monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) sezernieren, die wiederum Lymphozyten anlocken (Purdue et al. 2007). Überdies wurde das Interleukin IL-15 in der Lockerungsmembran nachgewiesen, was eine spezifische Stimulierung vorhandener T-Lymphozyten andeutet (Revell et al. 1998). Außerdem exprimieren die T-Zellen RANKL (Gallo et al. 2008), ebenso ein Hinweis auf einen aktiven Einfluss auf den Knochenstoffwechsel. Die in der periprothetischen Membran nachgewiesenen Lymphozyten sind hauptsächlich T-Helferzellen, wobei die T1-Helferzellen überwiegen. Zusätzlich wurde festgestellt, dass sich das Verhältnis von CD4+-Zellen zu CD8+-Zellen bei Patienten mit aseptischer Osteolyse verändert (Landgraebel et al. 2009). Je ausgedehnter die Osteolysen, desto kleiner wird der CD4+-CD8+-Quotient (Landgraebel et al. 2009). Diesen Hinweisen auf eine Beteiligung der Lymphozyten an der aseptischen Lockerung von Endoprothesen stehen allerdings Studien gegenüber, die aseptische Osteolysen in Lymphozyten-Knockoutmäusen nachweisen (Gallo et al. 2008).

Folglich ist eine weitere Erforschung der Bedeutung der Lymphozyten für die Prothesenlockerung in der Zukunft anzustreben.

Des Weiteren spielen Fibroblasten eine aktive Rolle in dem Prozess der Osteolysenentstehung. Einerseits werden sie direkt durch Abriebpartikel aktiviert, andererseits durch die von Makrophagen sezernierten Zytokine. Sie hemmen zum einen die Osteoblastenfunktion und induzieren zum anderen direkt eine Osteoklastenaktivierung (Koreny et al. 2006, Sabokbar et al. 2005). Zuletzt gibt es Hinweise darauf, dass auch Chondrozyten an den inflammatorischen Prozessen der Prothesenlockerung beteiligt sind, indem sie Polyethylenpartikel phagozytieren und so eine erhöhte Stickstoffmonoxid (NO)- und Prostaglandin E2-Freisetzung bedingen, was wiederum die Arthroseentstehung begünstigt (Chang et al. 2008).

II.2.7. Humorale Mediatoren der aspetischen Osteolyse

II.2.7.1. Adhäsionsmoleküle und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Adhäsionsmoleküle sind eine heterogene Gruppe von Molekülen, die auf den Oberflächen der Zellen exprimiert werden und durch Bindungen Wechselwirkungen unter den Zellen regulieren. Während einige Adhäsionsmoleküle dauerhaft vorhanden sind, bedürfen andere einer vorherigen Aktivierung der Zelle, beispielsweise durch entsprechende Entzündungsmediatoren (Murphy 2009, Vollmar 2005).

Grundsätzlich werden die Adhäsionsmoleküle in drei Gruppen unterteilt, in die Selektine, die Mitglieder der Immunglobulinsuperfamilie und die Integrine (Murphy 2009, Vollmar 2005).

Für diese Arbeit ist vor allem das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1 = intercellular adhesion molecule-1) von Bedeutung. Es gehört zur Immunglobulinsuperfamilie, hat ein relatives Molekulargewicht von 75-115 kDa und besteht aus fünf extrazellulären, einer transmembranen und einer kurzen zytoplasmatischen Domäne (Murphy 2009, Vollmar 2005).

Konstitutiv wird dieses Adhäsionsmolekül in geringen Mengen auf Endothelien exprimiert, nach Induktion durch Interleukin-1 β oder TNF- α im Rahmen inflammatorischer Prozesse hingegen ist es auf einer Vielzahl von Zellen vorhanden (Murphy 2009, Vollmar 2005). Dazu zählen Lymphozyten, Monozyten und Makrophagen, aber auch Endothelien, dendritische Zellen, Fibroblasten und Epithelzellen des Thymus (Murphy 2009, Vollmar 2005).

ICAM-1 spielt eine wichtige Rolle bei der interzellulären Adhäsion und transendothelialen Migration von Leukozyten bei Entzündungsprozessen, die es durch Bindung mit Integrinen

wie Makrophagen-Adhäsions-Ligand-1 (Mac-1) oder Leukozyten-funktionsassoziiertes-Antigen-1 (LFA-1), die auf Endothelzellen und Leukozyten exprimiert sind, ermöglicht und erleichtert (Murphy 2009, Vollmar 2005, Tuan et al. 2008).

Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und transendotheliale Migration verläuft in mehreren Schritten. Voraussetzung für die Auswanderung der Immunzellen ins Gewebe ist die Aktivierung des Endothels durch Chemokine wie IL-8 und Zytokine wie IL-1 β oder TNF- α , die von aktivierte Makrophagen sezerniert werden (Murphy 2009, Vollmar 2005). Der erste Schritt der Emigration der Leukozyten, die im Blutstrom schwimmen, ist das „Rolling“ (Murphy 2009, Vollmar 2005, Revell et al. 2008). Auf Endothel- und Immunzellen befinden sich Adhäsionsmoleküle, so genannte Selektine, die ihre Liganden binden und so die Adhäsion der Leukozyten ermöglichen. Durch eine schnelle proteolytische Abspaltung der Selektine gelingt zwar eine Verringerung der Geschwindigkeit und ein Rollen der weißen Blutkörperchen, aber nicht deren Anhaften (Murphy 2009, Vollmar 2005, Tuan et al. 2008). Im weiteren Verlauf interagieren nun die endothelialen Oberflächenrezeptoren ICAM-1 und das vaskuläre Adhäsionsmolekül-1 (VCAM-1 = vascular adhesion molecule-1) mit ihren Liganden, den Integrinen Mac-1, LFA-1 und very late antigen-4 (VLA-4) (Murphy 2009, Vollmar 2005). Dadurch geht die lockere reversible Bindung in ein irreversibles „Sticking“ über und die Immunzellen können sich ausbreiten („Spreading“) und das Blutgefäß durch Lücken zwischen den Endothelzellen verlassen (Murphy 2009, Vollmar 2005). Aufgrund des chemotaktischen Gradienten, der vom Entzündungsherd ausgeht, wandern die Immunzellen dann zwischen den Endothelzellen hindurch zum Ort der Inflammation (Murphy 2009, Vollmar 2005, Tuan et al. 2008, Revell et al. 2008).

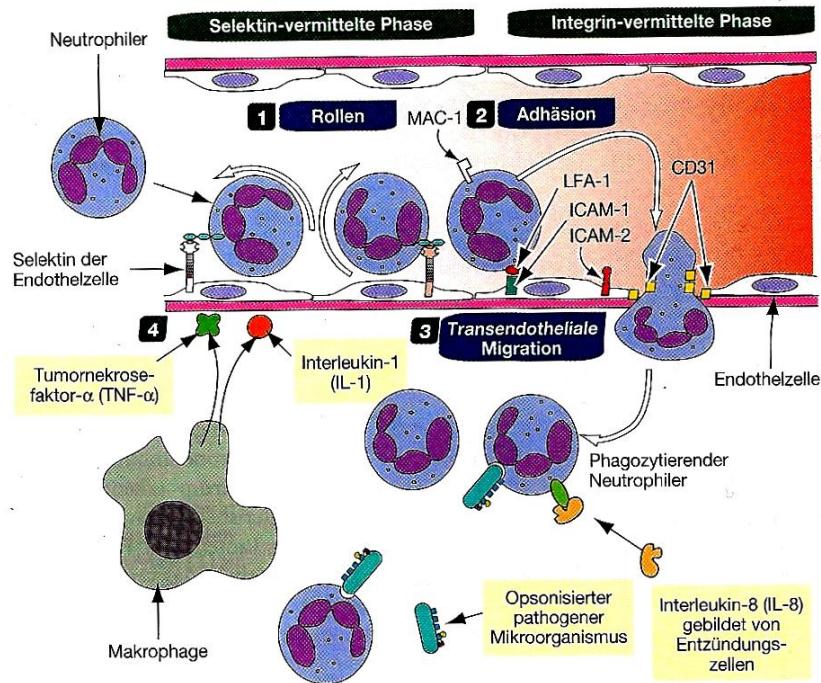


Abb. 9: Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion mit transendothelialer Migration (Welsch 2006)

II.2.7.2. Zytokine

Zytokine sind endogene Peptidhormone mit einem großen Spektrum biologischer Eigenschaften. Die heute bekannten Zytokine lassen sich entsprechend ihrer Funktionen in verschiedene Gruppen einteilen – Chemokine, Interferone, Interleukine, Tumor-Nekrose-Faktoren, Wachstumsfaktoren und Kolonie-stimulierende-Faktoren (Murphy 2009, Vollmar 2005). Ihre Wirkung ist vor allem auto- und parakrin, aber auch systemische Effekte sind möglich.

Die Interleukine sind für die Regulation der Immunabwehr und der Entzündungsreaktion sowie für die Kommunikation der daran beteiligten Zellen von immenser Bedeutung (Murphy 2009, Vollmar 2005). Weiterhin sind sie an der Bildung der Blutzellen aus Vorläuferzellen im Knochenmark beteiligt. Zum einen wirken die Interleukine im Differenzierungsprozess der Zellen der Hämatopoiese mit und zum anderen regen sie bei Entzündungsprozessen die Bildung neuer Zellen im Knochenmark an (Murphy 2009, Vollmar 2005). Auch die Stromazellen und die extrazelluläre Matrix des Knochenmarks spielen eine wichtige Rolle, da vor allem Letztere Zytokine bindet und so ein Reservoir darstellt (Murphy 2009, Vollmar 2005).

II.2.7.2.1. Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1 β ist ein Monomer aus 153 Aminosäuren und wird hauptsächlich von Makrophagen und Epithelzellen produziert (Murphy 2009, Vollmar 2005). Es spielt bei der Immunreaktion auf Fremdstoffe eine entscheidende Rolle (Murphy 2009, Vollmar 2005). Die unspezifische Abwehr und frühe Entzündungsreaktion werden verstärkt, die Durchblutung gefördert und durch Induktion einer vermehrten Produktion anderer Zytokine wie GM-CSF, IL-6 oder TNF- α werden Neutrophile Granulozyten und Makrophagen rekrutiert (Murphy 2009, Vollmar 2005). Überdies fördert IL-1 β die Hämatopoese im Knochenmark zum einen direkt, zum anderen indirekt über die Induktion anderer Wachstumsfaktoren wie IL-3 oder GM-CSF in Stromazellen des Knochenmarks (Murphy 2009, Vollmar 2005). Von zentraler Bedeutung für diese Arbeit ist auch die Verstärkung der Osteoklastogenese und Knochenresorption durch ein Zusammenwirken von IL-1 β und TNF- α (Drees et al. 2008, Tanabe et al. 2005, Wei et al 2005, Ingham et al. 2005, Otto et al. 2006). Stimuli für die Produktion dieses Interleukins sind GM-CSF, mikrobielle Stoffwechselprodukte und Zellbestandteile sowie andere Entzündungsmediatoren wie TNF- α , aber auch IL-1 β selbst (Murphy 2009, Vollmar 2005).

II.2.7.2.2. Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6, ein Monomer aus 184 Aminosäuren, wird von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems, T-Zellen und Endothelzellen produziert (Murphy 2009, Vollmar 2005). Vor allem durch andere proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF- α wird die Synthese von IL-6 gesteigert (Chiba et al. 1994, Epstein et al. 2005b, Wei et al. 2005). Zu den vielfältigen Wirkungen von IL-6 zählen unter anderem die Induktion der B-Zellreifung sowie des Zellwachstums und der Differenzierung zytotoxischer T-Lymphozyten und die Produktion von Akut-Phase-Proteinen (Murphy 2009, Vollmar 2005). Überdies ist es an der Steigerung der Granulopoese und Megakaryopoese im Knochenmark beteiligt (Murphy 2009, Vollmar 2005). Wie auch IL-1 β und TNF- α ist IL-6 an der Verstärkung der unspezifischen Immunantwort beteiligt (Murphy 2009, Vollmar 2005). Außerdem fördert IL-6 eine Proliferation von Osteoklasten und wirkt folglich ebenso negativ auf den Knochenstoffwechsel (Greenfield et al. 1999, Manolagas et al. 1998, Vermes et al. 2000, Murphy 2009, Vollmar 2005).

II.2.7.2.3. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)

TNF- α ist ein Trimer aus 157 Aminosäuren und wird überwiegend von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems gebildet, aber auch von Natürlichen Killerzellen und T-Lymphozyten (Murphy 2009, Vollmar 2005). Stimuli der Produktion von TNF- α sind virale und bakterielle Antigene, andere Wachstumsfaktoren und Zytokine wie IL-1, GM-CSF und TNF- α selbst (Murphy 2009, Vollmar 2005, Wei et al. 2005). Dieses Zytokin ist der zentrale Mediator der lokalen und systemischen Entzündungs- und Immunreaktion und übt eine Vielzahl von Wirkungen auf verschiedenste Zellen aus. Grundsätzlich kann TNF- α die Apoptose, Zelldifferenzierung und -proliferation anregen (Murphy 2009, Vollmar 2005). Zu den wichtigsten Effekten gehören die Anregung von Zellen des Monozyten-Makrophagen-Systems zur Phagozytose und zur Produktion weiterer Zytokine, die Steigerung der Myelopoiese, die Aktivierung von Granulozyten und die Produktion von Akut-Phase-Proteinen durch Hepatozyten. Überdies aktiviert TNF- α das Endothel, was zu einer erhöhten Expression von Adhäisionsmolekülen und zu einer Induktion der Gerinnungsreaktion führt (Murphy 2009, Vollmar 2005). Außerdem kommt es vor allem über IL-1 β zu einer Aktivierung der Fibroblasten der Synovia von Gelenken und zu einer Zerstörung des Gelenkknorpels, beispielsweise durch die Synthese von Kollagenasen (Murphy 2009, Vollmar 2005). Auf den Knochenstoffwechsel hat TNF- α dieselbe Wirkung wie IL-1 β und IL-6. Die Aktivität der Osteoblasten wird gehemmt und die der Osteoklasten gefördert, was zu einer negativen Bilanz und zum Verlust von Knochensubstanz führt (Murphy 2009, Vollmar 2005, Fuller et al. 2002, Holding et al. 2006, Otto et al. 2006, Zhang et al. 2001).

II.3. Studiendesign des Gesamtprojektes

Da diese Arbeit Teil eines umfassenderen Projektes ist und in dessen Zusammenhang besser verstanden werden kann, soll das Studiendesign dieses Gesamtprojektes im Folgenden näher erläutert werden.

Ziel dieses Projektes war es, die biologische Aktivität der Abriebpartikel von crosslinked Polyethylenen im Vergleich zum konventionellen UHMWPE an einem *in vivo* Modell zu untersuchen (Utzschneider et al. 2009a, 2009b).

II.3.1. Untersuchung des tibialen Polyethylen-Inlays im Kniegelenkssimulator mit Gewinnung von Abriebmaterial

Zunächst wurden die zuvor vorgestellten Knieprothesendesigns unter identischen Bedingungen im Knesimulator (Stallforth/Ungethuem, Deutschland) auf ihren Abriebmechanismus und die Abriebraten getestet (Utzschneider et al. 2009a).

Dabei verwendete man zu den Inlays die von den Herstellern empfohlenen Knieprothesen, um Vergleichbarkeit zur klinischen Praxis und zum Patienten zu gewährleisten. Von jedem Werkstoff wurden drei Inlays getestet. Als Testmedium diente ein Kälberserumgemisch (25% Neugeborenenkälberserum mit 0,1% sodium azide Lösung in sterilem Wasser) (Utzschneider et al. 2009a).

Anschließend wurden die Tribokontaktzonen gemessen, die Verschleißrate alle 0,5 Millionen Zyklen bis hin zu 5 Millionen Zyklen gravimetrisch (mg/Jahr) und volumetrisch (mm³/Jahr) ermittelt und der Mechanismus mittels Licht- und Rasterelektronenmikroskop analysiert (Utzschneider et al. 2009a).

II.3.2. Separation und Analyse des Abriebmaterials und Endotoxineliminierung

Im Anschluss wurden die Abriebpartikel nach der Methode der Säuredigestion vom Serum getrennt und auf Größe, Form und Volumen mittels Bildauswertungssoftware (Leica QWin, Image Processing) untersucht (Utzschneider et al. 2009b).

Daraufhin wurde der Endotoxingehalt unter die Nachweisgrenze gesenkt, um die biologische Aktivität im *in vivo* Modell ohne Verfälschungen messen zu können (Utzschneider et al. 2009b).

Dieser Schritt war nötig, um die selbst im Simulator produzierten, aber nicht sterilen Abriebpartikel verwenden zu können, was den Vorteil hat, dass diese den im künstlichen Kniegelenk beim Patienten erzeugten Partikeln in Form- und Größenparametern sehr viel ähnlicher sind als die sterilen, kommerziell erwerbbaren Partikel.

In dieser Arbeit lagen mindestens 85% der Partikel aller PE-Gruppen mit ihrem Durchmesser im Submikrometerbereich (Utzschneider et al. 2009b). Die sechs verschiedenen Kunststoffe wiesen ähnliche Partikelgrößenspektren mit einem Equivalent Circle Diameter (ECD) von $0,39 \pm 0,37$ bis $0,42 \pm 0,44$ µm für die UHMWPE-Partikel und einem ECD von $0,33 \pm 0,23$ bis $0,46 \pm 0,46$ µm auf. Die Mehrheit der Partikel war rund, glatt, granular, irregulär und sie hatten ähnliche Aspect-Ratio-Werte (Utzschneider et al. 2009b). Die Polyethylene X3, Durasul und XPE* produzierten im Knesimulator allerdings signifikant weniger Abriebpartikel als die Polyethylene Prolong, UHMWPE1 und UHMWPE2. X3- und Durasul erzeugten

größtenteils Partikel < 0,5 µm. Aufgrund der insgesamt geringen Anzahl an Partikeln entstand bei X3 dennoch die geringste Anzahl an Partikeln < 0,5 µm (Utzschneider et al. 2009b).

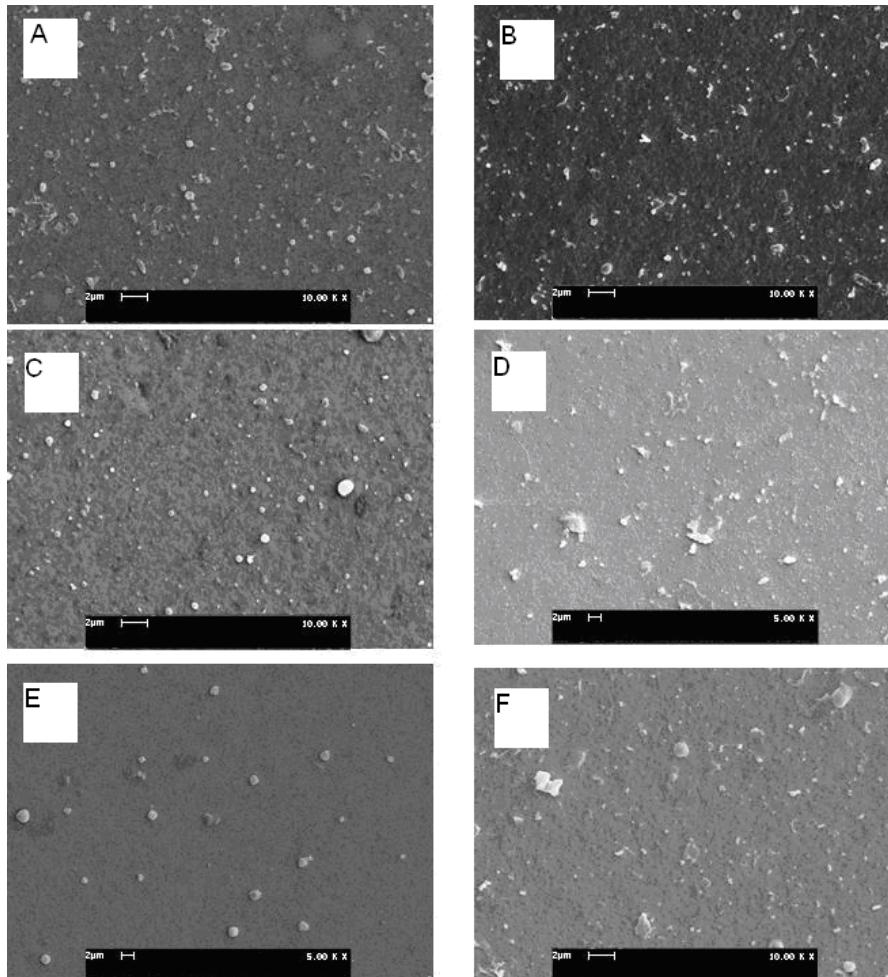


Abb. 10: Rasterelektronenmikroskopische Bilder der Abriebpartikel der verschiedenen Knieprothesendesigns (A=X3, B=Durasul, C=Prolong, D=XPE*, E=UHMWPE1, F=UHMWPE2, Originalvergrößerung: 5.000- und 10.000-fach) (Utzschneider et al. 2009b)

II.3.3. Messung der biologischen Aktivität der Abriebpartikel im *in vivo* Mausmodell

Im nächsten Schritt dieses Studiendesigns wurde nun die biologische Reaktion auf die erzeugten Abriebpartikel anhand eines Mausmodells untersucht.

Dazu standen sechs Gruppen von je acht Mäusen sowie acht Kontrolltiere und drei Positivkontrollmäuse zur Verfügung.

Zunächst wurde den Mäusen eine Partikelsuspension (0,1% Partikel-Volumen/PBS-Volumen) in das linke Kniegelenk injiziert, wobei alle Tiere einer Gruppe dieselbe

Suspension bekamen. Den Kontrolltieren wurde nur PBS injiziert, den Positivkontrollmäusen nicht aufgereinigte Partikelsuspension. Anschließend wurde am achten Tag eine Intravitalmikroskopie des Kniegelenks durchgeführt, nachdem dieses frei präpariert und Fluoreszenzmarker intravenös appliziert worden waren. Das Ziel der Intravitalmikroskopie, die ein Teilprojekt dieser Studie darstellt, war die Messung inflammatorischer Reaktionen wie der Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und der Mikrozirkulation in der Synovialmembran im Kniegelenk der Maus.

Die vorliegende Arbeit untersucht schließlich mit Hilfe immunhistochemischer Färbemethoden *in vivo* im murinen Kniegelenk die biologische Aktivität der Abriebpartikel.

III. Zielsetzung

Die Hauptursache für die Lockerung von Knieendoprothesen stellen die Polyethylenabriebpartikel dar. Aus diesem Grund wird versucht, die Abriebfestigkeit der in der Endoprothetik verwendeten Kunststoffe zu optimieren. Während UHMWPE nach wie vor als Standard-Polyethylen in der Knieendoprothetik gilt, wird die Anwendung von crosslinked Polyethylen als Prothesen-Inlay bis dato kontrovers diskutiert.

Das Ziel dieser Studie war ein Vergleich der biologischen Aktivität von Abriebpartikeln sechs unterschiedlicher, in der Knieendoprothetik verwendeter Polyethylenwerkstoffe, darunter vier crosslinked Polyethylen und zwei UHMWPE.

Hierzu wurde anhand eines *in vivo* Mausmodells die inflammatorische Reaktion auf die Polyethylenpartikel immunhistochemisch mit den Antikörpern IL-1 β , IL-6, TNF- α und ICAM-1 analysiert.

IV. Material und Methoden

IV.1. Gewebeproben

Die Gewebeproben, die die Grundlage für diese Arbeit darstellten, waren Kniegelenke von weiblichen Balb/c-Mäusen.

Insgesamt gab es sechs Versuchsgruppen sowie eine Kontrollgruppe, wobei eine Gruppe aus jeweils acht Mäusen bestand, die gleichermaßen behandelt wurden. Zusätzlich gab es drei Mäuse, die als Positivkontrolle dienten. Diese Mäuse wurden in den Tierhaltungsräumen des Walter-Brendel-Zentrums, Campus Großhadern, gehalten. Zum Zeitpunkt der Knieentnahme waren sie zwischen 10 und 16 Wochen alt, wogen etwa 20 Gramm und wurden in Käfigen bei 22°C, kontrollierter gefilterter Luftumwälzung und 12 Stunden Tag-Nacht-Rhythmus gehalten.

Alle Tiere erhielten autoklaviertes Trockenfutter und Leitungswasser. Um Verunreinigungen im Wasser zu vermeiden, bekamen die Tiere, die in den Versuchsställen verweilten, zum normalen autoklavierten Trockenfutter mit Salzsäure (1000-fach verdünnt) angereichertes Leitungswasser.

Alle Versuche wurden gemäß des Tierschutzes bei der Regierung von Oberbayern registriert und bewilligt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2531-139-07).

IV.2. Verwendete Materialien

IV.2.1. Antikörper und Seren

Material	Firma
Anti-mouse IL 1 Goat IgG*) aufgelöst mit sterilem PBS Konzentration: 0,1 mg/ml	R&D Systems Minneapolis, USA
Anti-mouse IL 6 Goat IgG*) aufgelöst mit sterilem PBS Konzentration: 0,1 mg/ml	R&D Systems Minneapolis, USA
Anti-mouse TNF Goat IgG*) aufgelöst mit sterilem PBS Konzentration: 0,2 mg/ml	R&D Systems Minneapolis, USA

Anti-mouse ICAM-1 Goat IgG*) aufgelöst mit sterilem PBS Konzentration: 0,1 mg/ml	R&D Systems Minneapolis, USA
Biotinylierter Pferd-anti-Ziege IgG*) aufgelöst mit 1ml Aquadest Konzentration: 1,5 mg/ml	Vector Laboratories Inc. Burlingame, Ca 94010, USA
Pferdeserum*) (normal horse serum)	Vector Laboratories Inc. Burlingame, Ca 94010, USA

Tab. 1: Antikörper und Seren

*) primäre Antikörper werden bei -20°C, sekundärer Antikörper und Serum bei 4°C gelagert

IV.2.2. Allgemeine Reagenzien

Material	Firma
Ethanol absolut mit Petrolether vergällt	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Ethanol 70% mit Methylketon vergällt	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Ethanol 40% mit Methylketon vergällt	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
PBS-Puffer pH 7,4 (nach 1:10 Verdünnung)	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Natriumacetat-Puffer 0,1M pH 5,5 (mit Essigsäure eingestellt) Natriumacetat-Trihydrat 13,6 g Gereinigtes Wasser zu 1 L	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Dimethylsulfoxid	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30% 1l = 1,11 kg	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Methanol 1l = 0,79 kg, M = 32,04 g/mol	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Xylol (Isomerengemisch zur Synthese) 1l = 0,86 kg M = 106,17 g/mol	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland

Saure Hämalaunlösung (nach P. Mayer) Romeis § 648 Hämatoxylin 1,0 g Natriumjodat 0,2 g Aluminiumkaliumsulfat-Dodecahydrat 50,0 g Chloralhydrat 50,0 g Citronensäuremonohydrat 1,09 g Gereinigtes Wasser zu 1000,0 g	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
AEC-Tabletten 3-Amino-9-ethyl-carbazole	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
EDTA-4Na20%-Citronensäure pH 7,1 EDTA-4Na 200,0 g Zitronensäure x 1 H ² O 37,19 g Gereinigtes Wasser zu 1,0l	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Neutral-gepufferte Formaldehydlösung 4%	Microcos GmbH Garching, Deutschland
Microscopy Aquatex pH = 7,0 1l = 1,08 kg	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
Paraffinpallets Paraplast Plus	Mc Cormick Scientific St. Louis, USA
Brij 35 Solution 30%	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Vectastain Elite ABC Kit Standard	Vector Laboratories Inc. Burlingame, Ca 94010, USA
Roti-Histol	Carl Roth GmbH + Co Karlsruhe, Deutschland

Tab. 2: Allgemeine Reagenzien

IV.2.3. Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Rotilabo Kassetten für Biopsien	Carl Roth GmbH + Co Karlsruhe, Deutschland
Faltenfilter (Dia: 185 mm)	Munktell & Filtrak GmbH Bärenstein, Deutschland

Parafilm	Pechiney Plastic Packaging Chicago, USA
Bechergläser 1000 ml, 600 ml Duran	Schott AG Mainz, Deutschland
Färbeküvetten	Wagner&Munz GmbH München, Deutschland
Färbegondeln	Wagner&Munz GmbH München, Deutschland
Glaspipetten Costar Stripette 5 ml, 25 ml	Corning Inc. New York, USA
Münchner Mappen	Wagner&Munz GmbH München, Deutschland
Rotilabo-Färbekästen	Carl Roth GmbH + Co Karlsruhe, Deutschland
5-, 15 ml-Tubes	Becton Dickinson and Company Heidelberg, Deutschland
Rotilabo-Präparatekästen	Carl Roth GmbH + Co Karlsruhe, Deutschland
Objektträger Superfrost Plus	Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Deckgläser 24x32 mm	Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Microtom Blade A35-pfm	Feather Produkte für Medizin AG Köln, Deutschland
Pipettenspitzen	Gilson International B.V. Limburg- Offenheim, Deutschland
Zentrifugenröhrchen	TTP Techno Plastic Products AG Trasadingen, Schweiz
Reagiergefäße 1,5 ml	Sarstedt AG & Co Nümbrecht, Deutschland

Tab. 3: Verbrauchsmaterialien

IV.2.4. Geräte

Gerät	Firma
Schlittenmikrotom	Jung Heidelberg, Deutschland
Paraffin-Streckbad	Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel, Deutschland

Streckbank	Medax GmbH & Co.KG Neumünster, Deutschland
Trockenschrank	Memmert GmbH & Co.KG Büchenbach, Deutschland
Abzug	Prutscher Laboratory Systems GmbH Neudörfl, Österreich
Schüttler (Certomat)	Sartorius AG Göttingen, Deutschland
Paraffinausgießstation Leica EG 1160	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Entwässerungsautomat Hypercenter XP	Thermo Shandon GmbH Frankfurt, Deutschland
Mikroliterpipetten (1-10 µl, 10-100 µl, 100-1000 µl)	Gilson International B.V. Limburg- Offenheim, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG Heilbronn, Deutschland
Gefrierschrank -20° Celsius	Robert Bosch GmbH Stuttgart, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr Hausgeräte GmbH Ochsenhausen, Deutschland
Lichtmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging GmbH Jena, Deutschland

Tab. 4: Geräte

IV.2.5. Herstellung von Puffern und Lösungen

PBS-Puffer

Um eine 10 l PBS-Puffer-Lösung herzustellen, wurde 1 l PBS-Puffer mit 9 l Aquadest verdünnt.

PBS-Brij

Es wurde 1 ml Brij 35 Solution 30% mit 1000 ml PBS-Puffer vermischt, um PBS-Brij zu erhalten.

Lösung zum Blockieren endogener Peroxidasen

Zu 160 ml PBS-Puffer wurden 20 ml Methanol sowie 20 ml Wasserstoffperoxid 30% mit Hilfe von 25 ml-Glaspipetten und einem Pipetus gegeben. Da dabei giftige Dämpfe entstanden, wurde unter dem Abzug gearbeitet.

ABC Komplex

Zu 1 ml PBS-Puffer wurden je ein Tropfen A und ein Tropfen B hinzugefügt. Der so erzeugte ABC-Komplex benötigte 30 Minuten und hielt im Kühlschrank gelagert für zwei Stunden.

AEC Färbelösung

Eine 3-Amino-9-ethyl-carbazole-Tablette (AEC) wurde mit 10 ml Dimethylsulfoxid in ein Becherglas gegeben und mit Parafilm abgedichtet. Mittels eines Schüttlers wurde die Tablette in Dimethylsulfoxid in Lösung gebracht. Etwa zehn Minuten vor Gebrauch wurden 200 ml Na-Acetat-Puffer pH 5,5 dazugegeben und die Lösung durch einen Faltenfilter filtriert. Kurz vor Anwendung wurden noch 60 µl Wasserstoffperoxid hinzugefügt.

IV.3. Methoden

IV.3.1. Herstellung von Paraffinblöcken

Die Gewebeproben, die Kniegelenke der Mäuse, wurden bis zur Weiterverarbeitung in Zentrifugenröhren, die mit neutral-gepufferter Formaldehydlösung 4% gefüllt waren, im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt. Die Formaldehydlösung diente der Fixierung der Gelenke, damit diese erhalten blieben und für die Immunhistologie verwendet werden konnten.

IV.3.1.1. Entkalkung

Zur Entkalkung der knochenhaltigen Gewebeproben, die für das spätere Schneiden notwendig war, wurde EDTA-4Na20%-Citronensäure mit einem pH-Wert von 7,1 verwendet. Aufgrund der gewebeschonenden EDTA-Entkalkung blieben die Knie histologisch gut beurteilbar.

Zunächst wurde die Formaldehydlösung abgegossen und die Zentrifugenröhren wurden mit Hilfe eines Pipetus mit etwa 2 ml der EDTA-Lösung gefüllt, sodass die Knie mit Flüssigkeit bedeckt waren.

Nach einer Woche wurde die Lösung abgegossen und durch neue EDTA-Lösung ersetzt, in der die Knie für eine weitere Woche verblieben.

IV.3.1.2. Wässerung und Entwässerung

Nach der 14-tägigen Entkalkung wurden die Knie in Vorbereitung auf die Paraffinausgießung nun zunächst gewässert und anschließend entwässert.

Zunächst wurde die EDTA-Lösung abgegossen und die Knie mittels einer Pinzette in zuvor beschriftete Einbettkassetten transferiert.

In einem Becherglas wurden die Kassetten unter laufendem Leitungswasser und zeitweiligem Umrühren mit einer Glaspipette für zwei Stunden gewässert und die EDTA-Lösung ausgewaschen.

Daraufhin wurden die Kassetten in einen Korb in den Entwässerungsautomaten Hypercenter XP gelegt, wo diese mit in der Konzentration aufsteigender Alkoholreihe (Alkohol 70% für 120 min, Alkohol 70% für 60 min, Alkohol 96% für 60 min, Alkohol 96% für 60 min, Alkohol 96% für 60 min, Alkohol 100% für 60 min, Alkohol 100% für 60 min, Alkohol 100% für 60 min) und anschließend mit zweimal Roti-Histol für je 90 Minuten entwässert wurden. Im Anschluss wurde der Korb zweimal je 90 Minuten lang mit flüssigem, 60°C heißem Paraffin gefüllt.

Bis zur folgenden Einbettung verblieben die Kassetten in diesem flüssigen Paraffin.

IV.3.1.3. Paraffinausgießung

Die Paraffineinbettung erfolgte an der Paraffinausgießstation.

Die Einbettkassetten mit den entwässerten und paraffininfiltierten Gewebeproben wurden in das Kassettenbad überführt, das mit flüssigem Wachs gefüllt und auf 60°C temperiert war, um eine frühzeitige Erstarrung der Probe zu verhindern.

Außerdem wurden die Ausgießformen in dem dafür vorgesehenen Moldbehälter bei 60°C vorgewärmt.

Nacheinander wurden die Kassetten aus dem Kassettenbad entnommen, geöffnet und das Präparat mit Hilfe einer Pinzette in eine passende Ausgießform gegeben.

Zur Orientierung des Präparates konnte die Ausgießform mit dem Präparat kurz auf die Kühlplatte der Station gestellt und das Präparat mit einer Pinzette in die gewünschte Position gebracht werden.

Daraufhin wurde der Kassettenboden auf die Form aufgelegt, diese mit flüssigem, 60°C heißem Paraffin gefüllt und auf die Kühlplatte geschoben, deren Temperatur

- 5°C betrug. Nachdem das Paraffin vollständig erstarrt war, konnte der Paraffinblock mit eingegossenem Präparat leicht aus der Ausgießform entnommen werden und überschüssiges Paraffin mit einem Messer von der Kassette entfernt werden.

Die Blöckchen wurden in Aufbewahrungskisten bei Raumtemperatur (RT) gelagert.

IV.3.2. Herstellung von Paraffinschnitten

Zur Anfertigung der Paraffinschnitte wurde ein Schlittenmikrotom verwendet.

Zunächst wurde das Paraffinblöckchen für etwa 15 Minuten in einem Gefrierschrank bei -20°C gekühlt.

Währenddessen wurde das Paraffin-Streckbad mit Aquadest befüllt und auf 45°C erwärmt sowie die Trockenbank auf 50°C eingestellt.

Nun wurde das Schlittenmikrotom mit Mikrotomöl geölt, zusammengesetzt und das Mikrotommesser eingelegt.

Nach dem Einspannen des gekühlten Blöckchens auf dem Tisch des Mikrotoms und dem Anschneiden bis zur gewünschten Ebene wurden 6 µm dicke sagittale Schnitte angefertigt, die mit Hilfe von Seidenpapier auf das Streckbad transferiert und von dort auf einen Superfrost Plus-Objektträger gezogen wurden.

Anschließend trockneten die 50 Schnitte ungefähr 30 Minuten auf der Trockenbank, bevor sie beschriftet und in Glasfärbegondeln eingesetzt wurden.

Über Nacht wurden die Präparate in den Glasfärbegondeln in einem Trockenschrank bei 50°C vollständig getrocknet, um schließlich in Präparatekästen bei Raumtemperatur aufbewahrt zu werden.

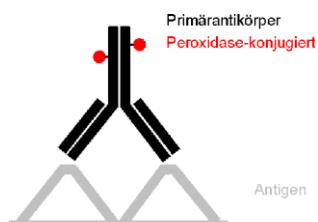
IV.3.3. Immunhistologie

IV.3.3.1. Theoretische Grundprinzipien der immunhistologischen Färbung

Grundsätzlich finden zahlreiche verschiedene Färbemethoden Anwendung. Das Ziel der immunhistochemischen Färbung ist es, antigene Komponenten in Zellen und Gewebsschnitten nachzuweisen. Dazu verwendet man spezifische Antikörper, die an das darzustellende Antigen binden und anschließend sichtbar gemacht werden. Dies wird durch mit Enzymen, Fluoreszenzfarbstoffen oder radioaktiven Isotopen markierten Antikörpern erreicht. Als Enzyme finden hauptsächlich Meerrettich-Peroxidase und alkalische Phosphatase Verwendung. In dieser Arbeit wurde Peroxidase als Enzym benutzt, das mit Hilfe eines Substrates ein farbloses Chromogen in ein farbiges Endprodukt umwandelt und so die immunchemische Reaktion sichtbar macht.

Von den einzelnen Methoden ist zunächst die direkte Methode zu nennen, bei der das zu untersuchende Antigen unter definierten Bedingungen mit einem spezifischen Antikörper zusammengebracht wird, der direkt mit einem Enzym gekoppelt ist. In einem weiteren Schritt reagiert das Enzym mit einem Substrat unter Bildung eines Farbstoffes (Abb. 11A).

A



B

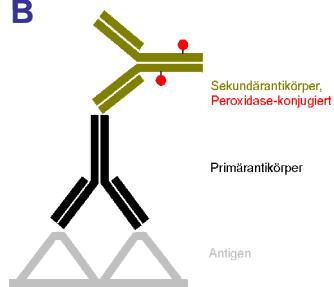


Abb. 11: Graphische Darstellung der direkten (A) und indirekten (B) immunhistochemischen Färbemethoden (Murphy 2009)

Außerdem gibt es die indirekte Zwei-Schritt-Methode, bei der ein unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen bindet (Abb. 11B). Anschließend wird ein zweiter enzymkonjugierter Antikörper, der gegen das Fc-Fragment des Primärantikörpers gerichtet ist, aufgetragen. Es folgt die Enzym-Substratreaktion. Diese Methode ist viel sensitiver, da mehrere Zweitantikörper an einen Primärantikörper binden können, was zu einer Signalverstärkung führt. Des Weiteren erlaubt es diese Methode für verschiedene Primärantikörper den gleichen markierten Sekundärantikörper zu nehmen.

Zusätzlich kann die Sensitivität der indirekten Methode noch gesteigert werden, indem man einen Tertiärantikörper dazugibt, der mit dem gleichen Enzym gekoppelt ist wie der Sekundärantikörper und gegen diesen gerichtet ist. So erhöht sich die Sensitivität durch die größere Anzahl an Enzymmolekülen. Diese Methode wird als Drei-Schritt-Methode bezeichnet.

Darüber hinaus gibt es die Avidin-Biotin-Peroxidase-Methode (ABC-Methode), die die Färbemethode dieser Arbeit darstellt (Abb. 12).

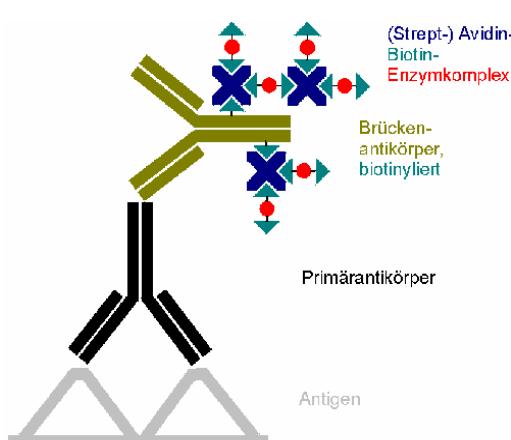


Abb. 12: Graphische Darstellung der immunhistochemischen (Strept-) Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Färbemethode (Murphy 2009)

Das Prinzip basiert auf der hohen Affinität von Streptavidin (*Streptomyces avidinii*) und Avidin (Hühnereiweiß) für Biotin. Streptavidin und Avidin besitzen jeweils vier Bindungsstellen für Biotin. Dabei wird zunächst ein unkonjugierter Primärantikörper auf das Gewebe gegeben, der an das Antigen bindet. Anschließend bindet ein biotinylierter Sekundärantikörper einer anderen Tierspezies, der im Überschuss dazugegeben wird, spezifisch an den Primärantikörper. Der

nun zugefügte enzymmarkierte Avidin-Biotin-Komplex lagert sich mit der Avidin-Komponente an das kovalent an den Sekundärantikörper gebundene Biotin an. An das Biotin des Avidin-Biotin-Komplexes ist eine Peroxidase gekoppelt. Die Peroxidase fungiert als Enzym und überträgt Elektronen vom Chromogen auf das zugegebene Substrat, das dadurch reduziert wird. Das farblose Chromogen wird zu einem Farbstoff oxidiert. In dieser Arbeit wurden als Chromogen 3-Amino-9-ethyl-carbazole (AEC) und als Substrat Wasserstoffperoxid verwendet. Es entstand ein rotes Endprodukt aus AEC und Wasserstoffperoxid wurde zu Wasser reduziert.

IV.3.3.2. Färbetechnik und Färbeprotokoll

In dieser Arbeit wurde die ABC-Methode als immunhistochemische Färbemethode angewandt und erfolgte über zwei Tage.

Vor Beginn der Färbung wurden Präparate ausgesucht, beschriftet und in die Glasfärbegondel eingesetzt.

Der erste Tag der Färbung begann mit der Entparaffinierung der Schnitte.

Dazu wurden die Färbegondeln mit den Präparaten zunächst zweimal für je zehn Minuten in mit Xylol gefüllte Färbeküvetten gestellt, wobei unter dem Abzug gearbeitet wurde. Anschließend kamen die Gondeln zur Rehydrierung für jeweils fünf Minuten in Küvetten mit in der Konzentration absteigender Alkoholreihe (Ethanol 100%, Ethanol 70%, Ethanol 40%) und wurden daraufhin für weitere fünf Minuten in PBS-Puffer gewaschen.

Um endogene Peroxidasen zu blockieren und somit unspezifische Färbungen zu verhindern, wurden die Präparate im folgenden Schritt für fünf Minuten in eine Lösung aus PBS-Puffer, Methanol und Wasserstoffperoxid gegeben. Auch dieses erfolgte unter dem Abzug, da bei der Herstellung der Lösung giftige Dämpfe entstehen.

Aufgrund der Verwendung einer Peroxidase ist es notwendig, endogene Peroxidasen zu blockieren, um unspezifische Bindungen zu vermeiden.

Im Anschluss wurden die Präparate fünf Minuten lang in einer Küvette mit PBS-Brij-Lösung gewaschen.

Bevor nun jeweils 100 µl Pferdeserum auf die Schnitte pipettiert wurden, wurden die Objektträger mit einer Pinzette aus der Färbegondel genommen, mit Zellstoff die Flüssigkeit um das Präparat herum abgewischt und die Objektträger in eine mit destilliertem Wasser benetzte Färbekammer gelegt.

Das Pferdeserum wurde 1:100 in PBS-Puffer verdünnt und auf die Schnitte pipettiert, sodass das Präparat benetzt war. Das Pferdeserum diente zur Absättigung von elektrostatischen Ladungen der Proteine, so dass der im nachfolgenden zugegebene Primärantikörper

möglichst spezifische Bindungen mit dem nachzuweisenden Antigen eingehen konnte. Die Schnitte wurden nun 30 Minuten bei Raumtemperatur mit dem Serum inkubiert.

Nachdem die Objektträger abgeklopft waren, wurden im nächsten Schritt je 100 µl des Primärantikörpers auf die Schnitte pipettiert und in der feuchten Kammer über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Als Primärantikörper wurden Anti-Maus-IL 1-β, -IL 6, -TNF-α, und -ICAM-1 verwendet, die mit PBS-Puffer verdünnt wurden, wobei IL-1β, IL 6 und TNF-α im Verhältnis 1:10 und ICAM-1 1:1000. Als Negativkontrolle wurde an Stelle des Primärantikörpers PBS verwendet.

Am zweiten Tag der Färbung wurden die Färbekammern zunächst aus dem Kühlschrank geholt, die Objektträger abgeklopft und in die Färbegondel eingesetzt.

Danach folgte für dreimal fünf Minuten ein Waschen der Präparate in PBS-Brij, anschließend wurden sie wieder mit einer Pinzette aus der Gondel genommen und abgewischt, um 60 Minuten in der Färbekammer mit 100 µl der Sekundärantikörpers inkubiert zu werden.

Als Sekundärantikörper diente ein biotinylierter Anti-Ziege IgG aus dem Pferd, der in der Verdünnung 1:200 in PBS-Puffer gelöst wurde.

Bevor die Schnitte erneut dreimal fünf Minuten in PBS-Puffer gewaschen wurden, wurden sie abgeklopft und aus der Färbekammer zurück in die Färbegondel überführt.

Nach diesem Waschschritt und dem darauf folgenden Abwischen wurden auf jedes Präparat 100 µl des ABC-Komplexes pipettiert. Die Schnitte verblieben so für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der Färbekammer.

Anschließend folgte nach erneutem Abklopfen der Objektträger ein letztes dreimal fünfminütiges Waschen in Küvetten mit PBS-Brij-Lösung.

Im nächsten Schritt wurden die Präparate unter dem Abzug für zehn Minuten in Küvetten mit der vorbereiteten AEC-Lösung gegeben, anschließend in PBS-Puffer und sofort danach wurde in Leitungswasser die Färbung gestoppt.

Abschließend wurden die Präparate zum Anfärben der Zellkerne für 30 Sekunden in saure Hämalaunlösung und dann in Leitungswasser gestellt.

Um die Präparate zu fixieren und aufzubewahren zu können, wurden sie mit einem Tropfen Aquatex und Deckgläsern eingedeckt und im Dunkeln über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

In Färbekästen eingesortiert, wurden sie bei Raumtemperatur gelagert.

1. Tag		
Xylol 100%	200 ml Küvette	10 min
Xylol 100%	200 ml Küvette	10 min
Ethanol 100%	200 ml Küvette	5 min
Ethanol 70%	200 ml Küvette	5 min
Ethanol 40%	200 ml Küvette	5 min
PBS-Puffer	200 ml Küvette	5 min
160ml PBS + 20ml Methanol + 20ml H ₂ O ₂ 30%	200 ml Küvette	5 min
PBS- Brij	200 ml Küvette	5 min
Pferdeserum 1:100 verdünnt in PBS-Puffer	100 µl pro Schnitt	30 min bei RT
1. Ak verdünnt mit PBS- Puffer IL-1β 1:10 IL-6 1:10 TNF-α 1:10 ICAM-1 1:1000 Kontrolle: PBS-Puffer	100 µl pro Schnitt	Über Nacht bei 4°C im Kühlschrank

Tab. 7: Färbeprotokoll (Teil 1) für die immunhistochemischen Untersuchungen mit IL-1β, IL-6, TNF-α und ICAM-1

2. Tag		
PBS-Brij	200 ml Küvette	3x5 min
2. Ak 1:200 verdünnt in PBS-Puffer	100 µl pro Schnitt	60 min bei RT
Horse anti Goat		
PBS-Brij	200 ml Küvette	3x5 min
ABC-Komplex	100 µl pro Schnitt	30 min bei RT
PBS-Brij	200 ml Küvette	3x5 min
AEC-Lösung	200 ml Küvette	10 min
PBS-Puffer	200 ml Küvette	
Färbung stoppen mit Leitungswasser	200 ml Küvette	
Saure Hämalaunlösung	200 ml Küvette	30 sec
Differenzieren mit Leitungswasser		
Eindecken mit Aquatex		

Tab. 8: Färbeprotokoll (Teil 2) für die immunhistochemischen Untersuchungen mit IL-1β, IL-6, TNF-α und ICAM-1

IV.3.4. Auswertung

IV.3.4.1. Histologische Auswertung

Die histologische Auswertung erfolgte an einem Lichtmikroskop.

Um das Vorkommen von IL-1 β , IL-6, TNF- α und ICAM-1 in der Synovia, dem Knochenmark und dem Gelenkknorpel des Kniegelenks nachzuweisen, wurden die insgesamt 56 Knie der sechs Versuchsgruppen und acht Kontrollknie getestet. In die 56 Versuchsgruppenknie wurde zuvor die entsprechende Poyethylenpartikelsuspension injiziert und in die Kontrollgruppenknie nur PBS. Außerdem gab es Knie, in die nicht aufgereinigte Partikelsuspension injiziert wurde und die als Positivkontrolle dienten. Von jedem Knie wurden pro Antikörper jeweils zwei Präparate immunhistochemisch gefärbt und beurteilt.

Die Präparate wurden mit Hilfe einer Aufsatzkamera in verschiedenen Vergrößerungen fotografiert. Die Darstellung der Präparate in Punkt V. erfolgt anhand von Bildtabellen. Exemplarisch zeigt dies die folgende Tabelle.

K = Kontrollgruppe	
A = Gruppe X3	B = Gruppe Durasul
C = Gruppe Prolong	D = Gruppe XPE*
E = Gruppe UHMWPE1	F = Gruppe UHMWPE2

Tab. 9: Exemplarische Darstellung der Bildtabellen in Punkt V

IV.3.4.1.1. Beurteilung des Gelenkknorpels und des Knochenmarks

Um die biologische Reaktion der Abriebpartikel auf den Gelenkknorpel zu beurteilen, wurden die Färbungen mit IL-1 β , IL-6 und TNF- α ausgewertet. Alle Präparate wurden jeweils mit den entsprechenden Negativkontrollen verglichen, wodurch unspezifische Bindungsphänomene, wie sie beispielsweise durch Bindung an Fc-Rezeptoren entstehen, zuverlässig von spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen abgegrenzt werden konnten. Außerdem wurden die Präparate mit den Positivkontrollen verglichen und das Ausmaß der positiven Reaktion der Versuchspräparate ins Verhältnis zu den Positivkontrollen gesetzt.

Als positiv galten rot angefärbte Chondrozyten des Gelenkknorpels des Femurs und der Tibia des Mauskniegelenks.

Die Präparate wurden nach dem folgenden semiquantitativen Schema ausgewertet:

Der Anteil der positiven Chondrozyten wurde im Vergleich zur Positivkontrolle in Prozent geschätzt. Die Auswertung des Anteils der gefärbten Zellen erfolgte in den Stufen (-) (= 0% positive Zellen), (+) (= >0-25% positive Zellen), + (= >25-50% positive Zellen), ++ (= >50-75% positive Zellen) und +++ (= >75% positive Zellen).

Außerdem wurde bei den Präparaten das Knochenmark des Femurs und der Tibia analysiert. Hierfür wurden ebenso die Färbungen mit den Antikörpern IL-1 β , IL-6 und TNF- α untersucht. Als Auswertungsschema wurde das des Knorpels verwendet. Auch hier wurden rot angefärbte Zellen als positiv gewertet. Da das Knochenmark aus einer Vielzahl verschiedener reifer Zellen und Vorstufen, die entweder Zytokine wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α sezernieren oder exprimieren, und aus einer Matrix, die als Zytokinreservoir für die Zellinteraktion und -differenzierung dient, besteht, wurde in dieser Arbeit der prozentuale Anteil an positiven Zellen des Knochenmarks beurteilt ohne die Zellen speziell zu differenzieren.

IV.3.4.1.2. Auswertung der Synovialmembran des Mauskniegelenks

Von wesentlicher Bedeutung ist in dieser Arbeit die Beurteilung der Reaktion der Synovialmembran auf die injizierten Polyethylenpartikel.

Dazu wurden die Präparate der Färbungen mit IL-1 β , IL-6 und TNF- α ausgewertet, indem jeweils mindestens 100 Synovialzellen ausgezählt wurden und die Prozanzahl der davon positiven, das heißt rot angefärbten Zellen ermittelt wurde. Dieser Wert wurde für die statistische Auswertung verwendet.

Des Weiteren fand bei den mit dem Antikörper ICAM-1 gefärbten Präparaten eine semiquantitative Auswertung der Gefäße im subintimalen Gewebe der Synovialmembran statt. Auch hier wurde eine Analyse nach dem Schema der Knorpelauswertung durchgeführt. Ausgewertet wurde aber hier nicht die Zahl positiver Zellen, sondern positiver, rot angefärbter Gefäße.

IV.3.4.2. Statistische Auswertung

Die aus den Versuchsdurchführungen erhobenen Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2003 von Microsoft erfasst, die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe des Statistikprogramms XLSTAT.

Für die statistische Auswertung wurde beim Gelenkknorpel, Knochenmark und bei den Gefäßen im Synovialmembrangewebe jeweils der Mittelwert (M) der Auswertungsstufen als numerischer Wert angenommen. Das heißt (-) entspricht dem Mittelwert M=0%, (+) dem Wert M=12,5%, + dem Wert M=37,5%, ++ dem Wert M=62,5% und +++ dem Wert M=87,5%. Bei der Synovialmembran wurde die Prozentzahl positiver Zellen direkt als numerischer Wert verwendet. Zur Berechnung der so genannten „Gesamtentzündlichkeit“ wurden die prozentualen Werte der positiven Zellen der Färbungen der verschiedenen Primärantikörper addiert und die Summe diente als numerischer Wert für die folgenden statistischen Tests. Da keine Normalverteilung angenommen werden konnte ($p < 0,05$), wurde als statistischer Test der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet. Mit diesem Test wurde untersucht, ob zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied besteht. Um den festgestellten Unterschied zu lokalisieren, wurde im Anschluss daran als Post-hoc-Test eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Als statistisch signifikant galten die Ergebnisse bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$.

Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse wurden Säulendiagramme gewählt.

V. Ergebnisse

Bei allen statistischen Tests in den immunhistochemischen Untersuchungen lag das Bonferroni korrigierte Signifikanzniveau bei $p = 0,0024$.

V.1. Der Gelenkknorpel

V.1.1. Expression des Zytokins IL-1 β im Gelenkknorpel

Aus der Analyse aller Präparate der Färbung mit dem Primärantikörper IL-1 β ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,0024$) zwischen den einzelnen Gruppen sowie zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 11*, * = Tab. 10 – 33 im Anhang).

Der Mittelwert der Kontrollgruppe lag bei 21,9% positiven Chondrozyten, der der Gruppe X3 bei 46,9% und der der Gruppe Durasul bei 37,5%. Bei der Gruppe mit dem Werkstoff Prolong ergab sich ein Mittelwert von 21,9%, bei XPE* von 40,6%, bei UHMWPE1 von 26,6% und bei UHMWPE2 von 32,8% (Abb. 13).

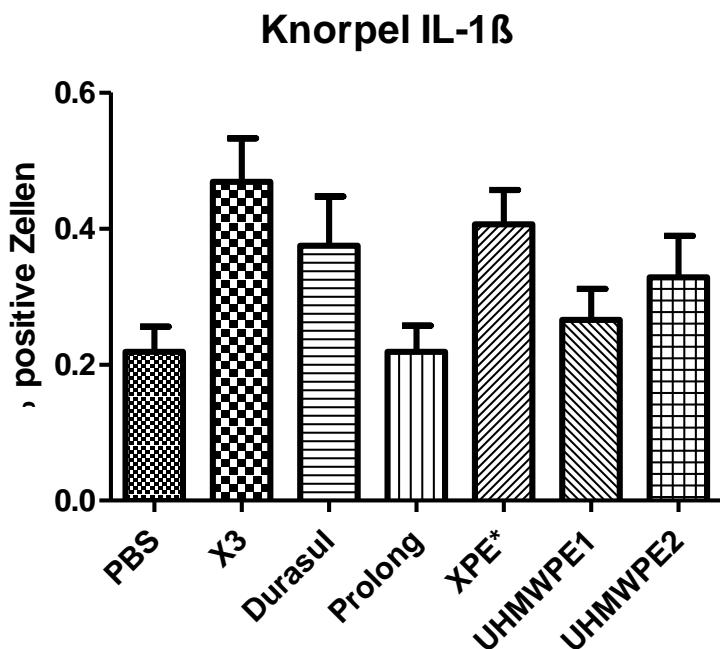


Abb. 13 zeigt die nicht signifikant ($p > 0,0024$) vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 11*) von IL-1 β in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) im murinen Gelenkknorpel 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion

In den Bildausschnitten der Abb. 14 lässt sich erkennen, dass sich in den Präparaten Chondrozyten in allen vier Schichten des Gelenkknorpels rot anfärbten, wobei der Großteil der positiven Knorpelzellen in der zweiten und dritten Schicht lag. Außerdem wird deutlich, dass sich die Chondrozyten rot anfärbten, während weder der Knorpelhof noch Strukturen in der interterritorialen Matrix positiv reagierten.

Überdies ist zu sehen, dass sowohl in den Präparaten der mit Polyethylen behandelten Mäuse (Abb. 14A-F) als auch im Kontrollpräparat (Abb. 14K) Chondrozyten des Gelenkknorpels positiv reagierten und sich rot anfärbten.

Die Bilder der Abb. 14 verdeutlichen zusätzlich, dass die Anzahl der positiven Chondrozyten in allen Polyethylengruppen vergleichbar war.

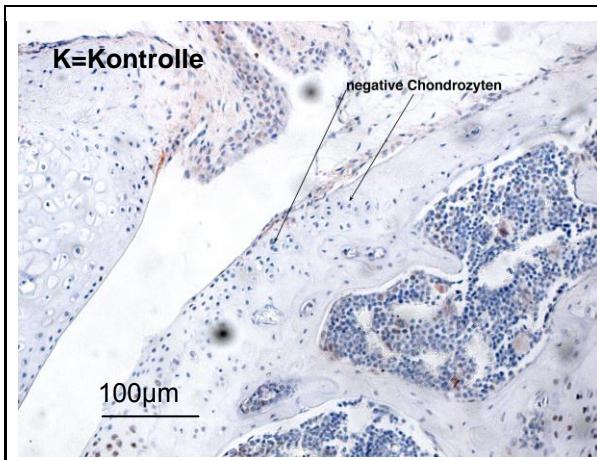
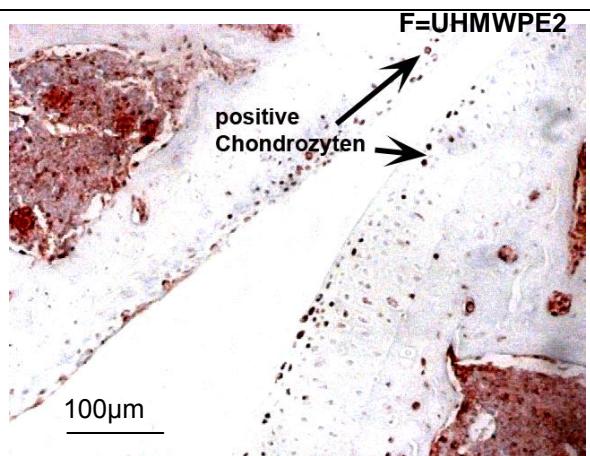
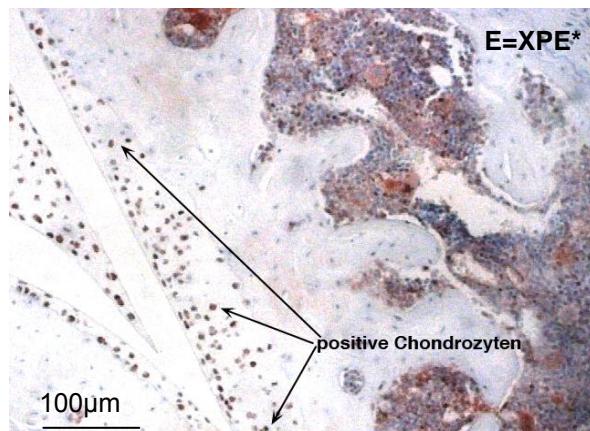
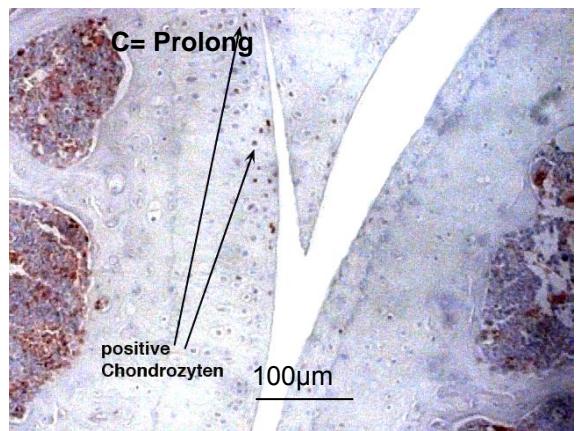
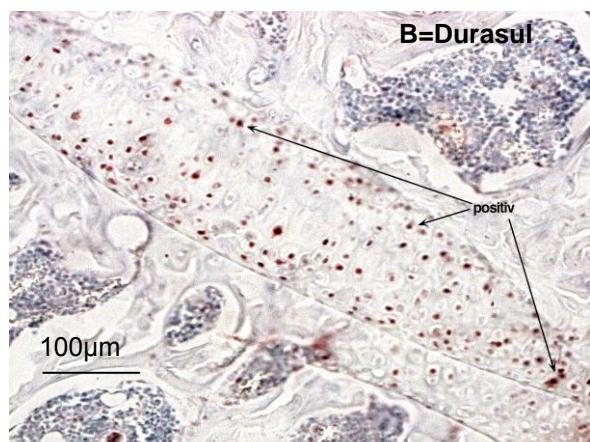
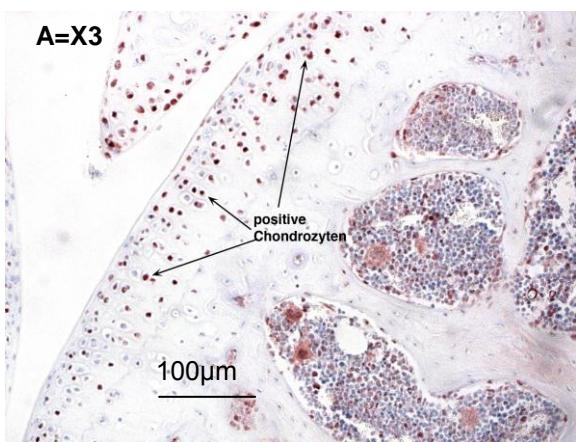


Abb. 14 zeigt mit IL-1 β gefärbte Präparate des murinen Kniegelenkknorpels der Kontrollgruppe sowie der Versuchsgruppen X3-UHMWPE2. In Abb. 14K und A-F sind sowohl negative als auch positive, rot angefärbte Chondrozyten zu erkennen. Die Anzahl der positiven Knorpelzellen ist in allen Präparaten vergleichbar.
Vergrößerung K und A-F: 200x



V.1.2. Expression des Zytokins IL-6 im Gelenkknorpel

Beim Zytokin IL-6 wurde in den Polyethylengruppen gegenüber der Kontrollgruppe keine signifikant ($p > 0,0024$) vermehrte Expression festgestellt. Bei den verschiedenen Polyethylengruppen unterschieden sich nur Prolong und X3 signifikant ($p = 0,002$, Abb. 15). Bei der Kontrollgruppe betrug der Mittelwert 32,8% positive Knorpelzellen, bei der Gruppe mit dem Polyethylen X3 35,9%. Die Gruppen mit den Werkstoffen Durasul und XPE* hatten einen Mittelwert von 29,7%, Prolong hatte 14,1%, UHMWPE1 31,3% und UHMWPE2 23,4%.

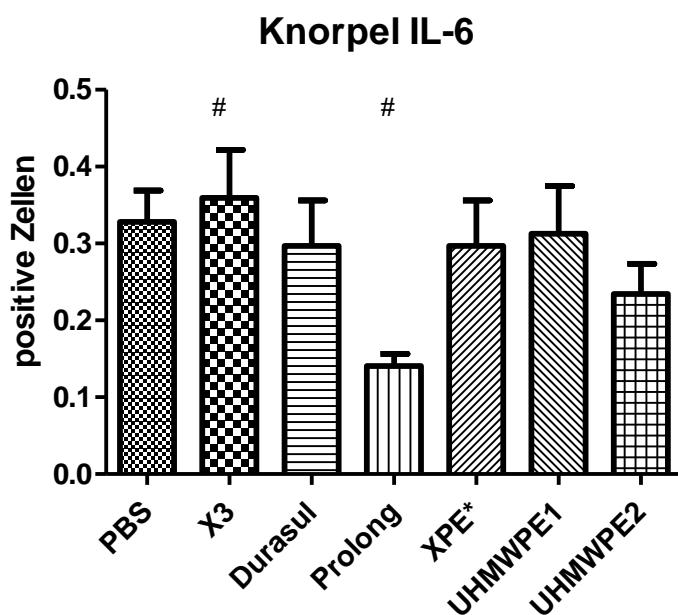
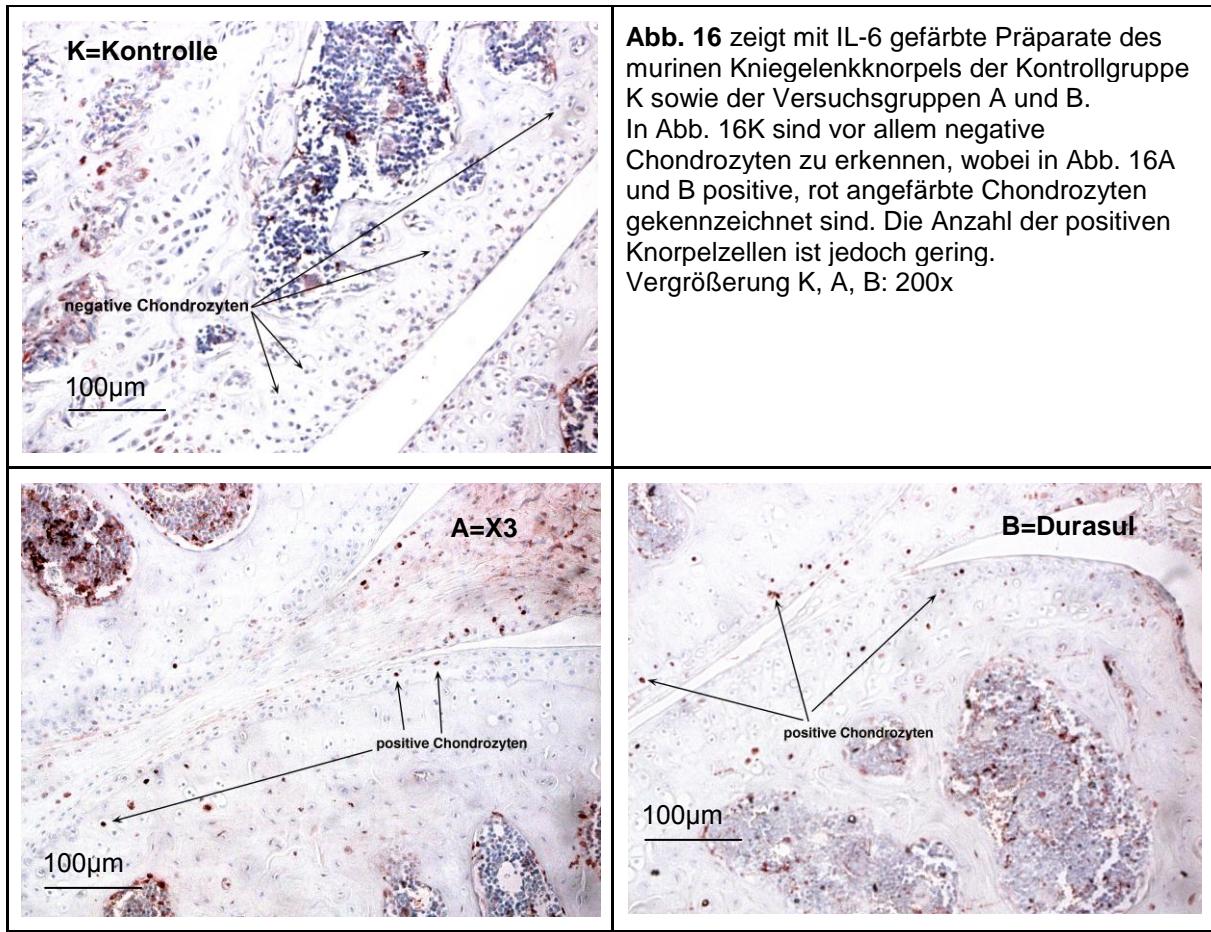


Abb. 15 zeigt die nicht signifikant ($p > 0,0024$) vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 13*) von IL-6 im murinen Gelenkknorpel in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion. Ein signifikanter Unterschied bestand nur zwischen den Gruppen X3 und Prolong ($p = 0,002$)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ($p = 0,002$)

Abb. 16 zeigt mit dem Primärantikörper IL-6 gefärbte Präparate, darunter ein Präparat der Kontrollgruppe (Abb. 16K) und je ein Präparat der Gruppen X3 (Abb. 16A) und Durasul (Abb. 16B), die repräsentativ für alle Werkstoffgruppen sind. In allen drei Bildausschnitten, auch in der Kontrollgruppe, sind positive Chondrozyten zu erkennen, wobei die Anzahl der positiven Chondrozyten in den einzelnen Präparaten vergleichbar ist. Insgesamt färbten sich in allen Präparaten nur vereinzelt Knorpelzellen rot an.

Außerdem fällt auf, dass in diesen mit IL-6 gefärbten Präparaten im Vergleich zur Färbung mit dem Primärantikörper IL-1 β tendenziell weniger Chondrozyten positiv reagierten.



V.1.3. Expression des Tumornekrosefaktors- α im Gelenkknorpel

Bei der Färbung mit dem Primärantikörper TNF- α lag der Mittelwert in der Kontrollgruppe bei 26,6% positiven, rot angefärbten Chondrozyten, während die Werte für die Gruppen X3 64,1%, Durasul 64,1%, Prolong 31,3%, XPE* 34,4%, UHMWPE1 39,1% und UHMWPE2 35,9% betrugen.

Daraus folgte bei den Werkstoffen X3 und Durasul ein signifikanter Unterschied sowohl zur Kontrollgruppe als auch zur Prolong-Gruppe ($p = 0,000$ und $p = 0,001$; Abb. 17).

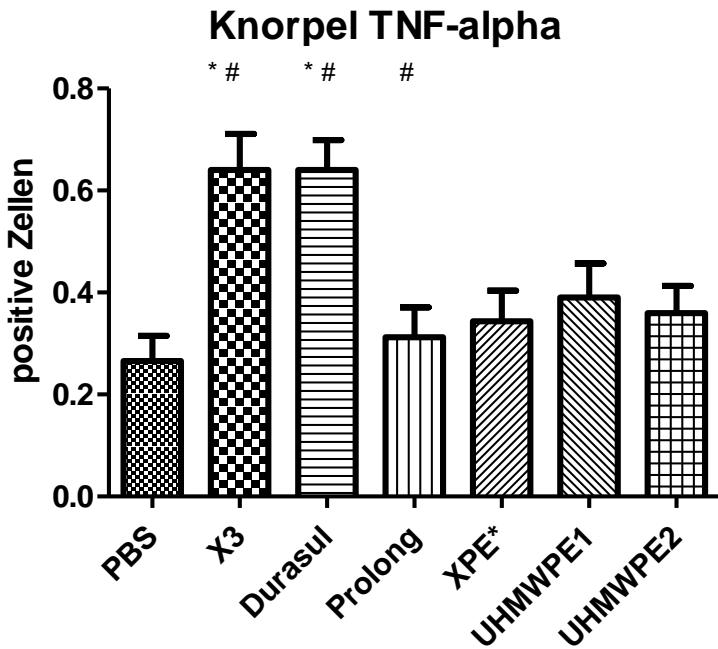


Abb. 17 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 15*) von TNF- α im murinen Gelenkknorpel in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion. Zwischen den Versuchsgruppen unterschieden sich nur X3 und Durasul signifikant von Prolong (p-Werte siehe Tab. 15*).

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 15*)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (p-Werte siehe Tab. 15*)

Abb. 18 zeigt Präparate aus der Kontrollgruppe (Abb. 18K) und allen Polyethylengruppen (Abb. 18A,B,D+F), die mit dem Primärantikörper TNF- α gefärbt wurden.

In allen Bildausschnitten, auch in dem der Kontrollgruppe, sind positive Chondrozyten zu erkennen. Auffällig ist, dass sich in den Präparaten der Gruppen X3 (Abb. 18A) und Durasul (Abb. 18B) deutlich mehr positive Chondrozyten befanden als in den Präparaten der Kontrollgruppe (Abb. 18K) und der Gruppen XPE* und UHMWPE2 (Abb. 18D+F), in denen nur vereinzelte Knorpelzellen positiv reagierten. In dem Ausschnitt der Gruppe Durasul (Abb. 18B) ist zu erkennen, dass sich die Chondrozyten stark positiv anfärbten.

Verglichen mit den Färbungen IL-1 β und IL-6, reagierte bei der Färbung mit TNF- α tendenziell insgesamt eine größere Anzahl an Chondrozyten positiv.

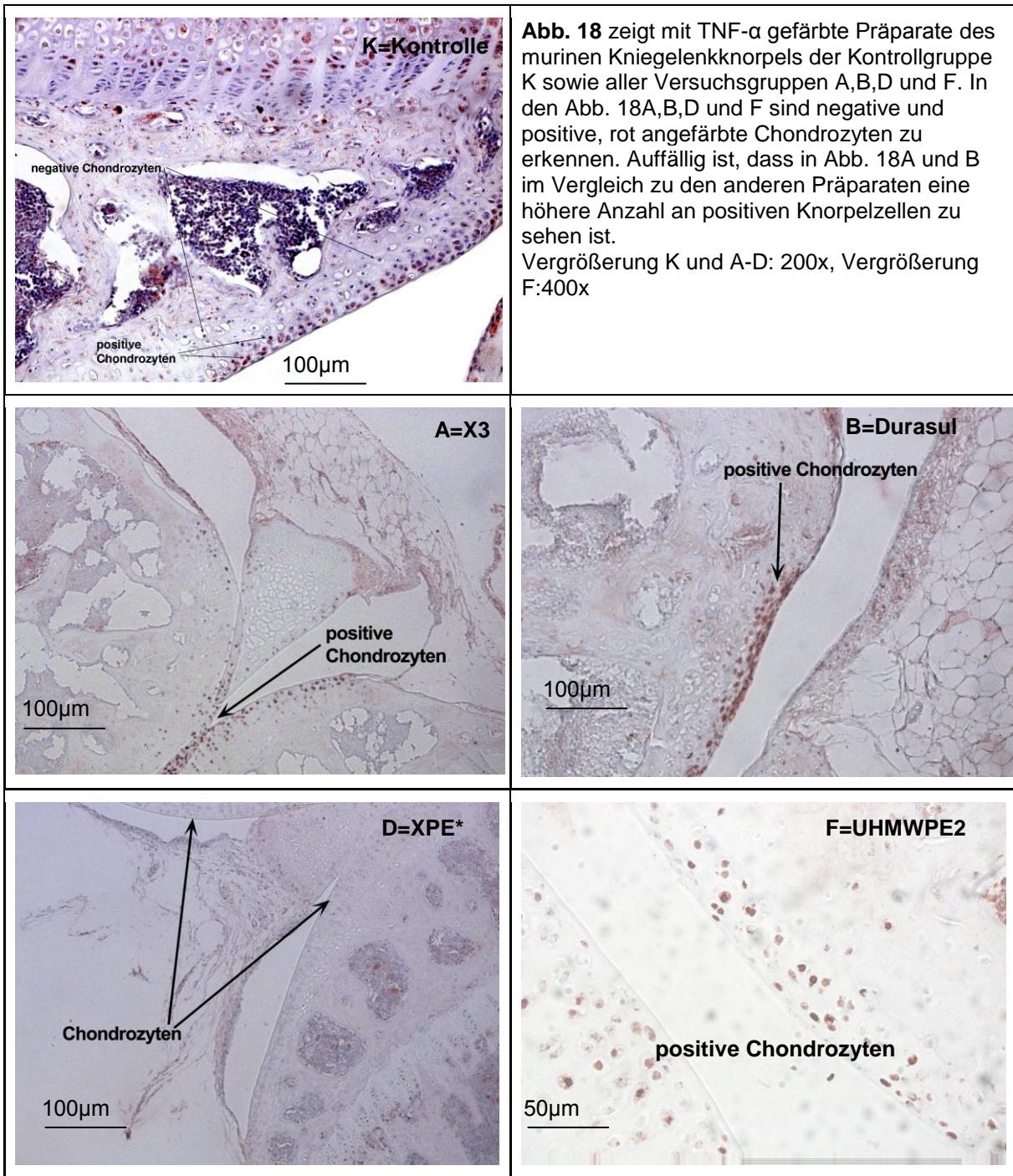


Abb. 18 zeigt mit TNF- α gefärbte Präparate des murinen Kniegelenkknorpels der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A,B,D und F. In den Abb. 18A,B,D und F sind negative und positive, rot angefärbte Chondrozyten zu erkennen. Auffällig ist, dass in Abb. 18A und B im Vergleich zu den anderen Präparaten eine höhere Anzahl an positiven Knorpelzellen zu sehen ist.
Vergrößerung K und A-D: 200x, Vergrößerung F:400x

V.1.4. „Gesamtentzündlichkeit“ des Gelenkknorpels

Die „Gesamtentzündlichkeit“ des Gelenkknorpels bildet die synergistische Wirkung der Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α ab.

Es resultierte ein signifikanter Unterschied der Gruppen X3 und Durasul zur Gruppe Prolong ($p < 0,0001$ und $p = 0,001$). Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten nur die mit X3

behandelten Mäuse eine signifikant erhöhte „Gesamtentzündlichkeit“ des Gelenkknorpels ($p = 0,001$; Abb.19).

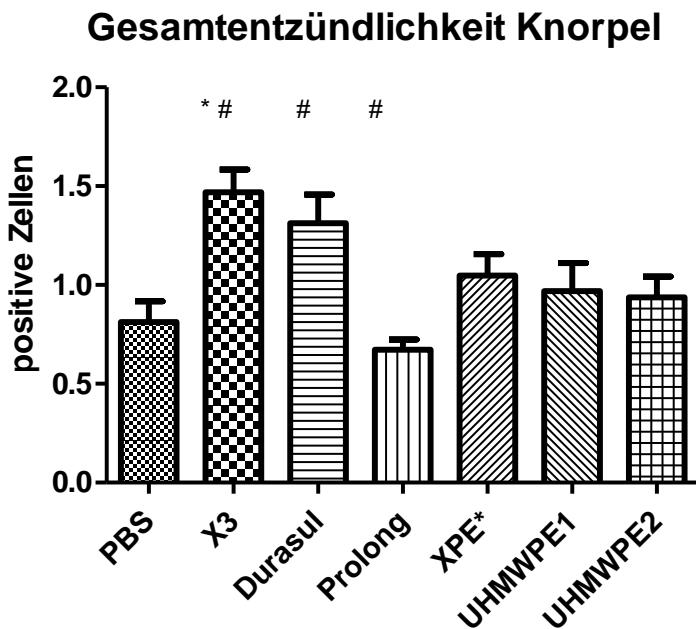


Abb. 19 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 16*) von IL-1 β , IL-6 und TNF- α im murinen Gelenkknorpel aller Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion. Zwischen den Versuchsgruppen unterschieden sich nur X3 und Durasul signifikant von Prolong (p-Werte siehe Tab. 16*).

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 16*)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (p-Werte siehe Tab. 16*)

V.2. Das Knochenmark

V.2.1. Hochregulierung des Zytokins IL-1 β im Knochenmark

Bei den Färbungen mit dem Erstantikörper IL-1 β wurde im Knochenmark festgestellt, dass in allen Werkstoffgruppen die Prozentzahl der positiven Zellen signifikant höher war als in der Kontrollgruppe ($p < 0,0024$). Zwischen den einzelnen Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied verzeichnet ($p > 0,0024$) (p-Werte siehe Tab. 18*; Abb. 20).

Der Mittelwert der Kontrollgruppe lag bei 9,4% positiven Zellen, während dieser Wert bei den Gruppen X3 40,6%, Durasul 37,5%, Prolong 46,9%, XPE* 59,4%, UHMWPE1 43,8% und UHMWPE2 64,1% betrug.

Knochenmark IL-1 β

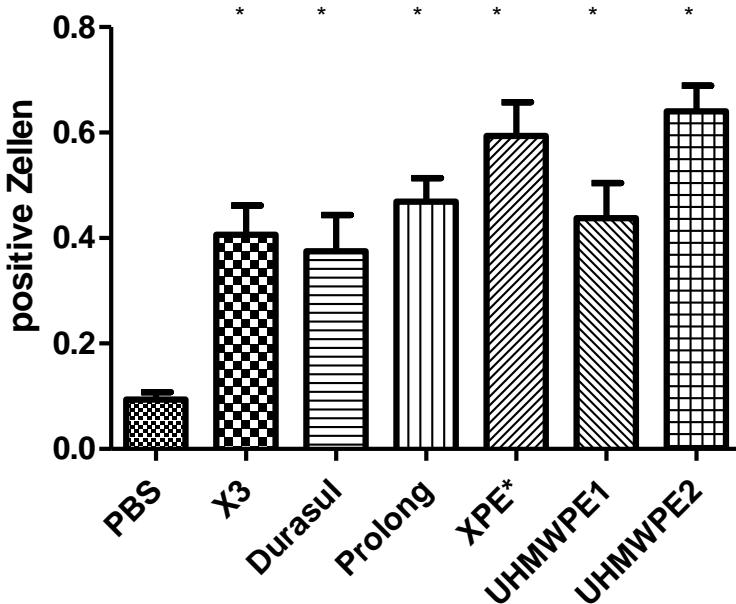


Abb. 20 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 18*) von IL-1 β in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) im murinen Knochenmark 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 18)

Abb. 21 zeigt Ausschnitte aus dem Knochenmark der Kontrollgruppe (Abb. 21K) und aller Polyethylengruppen (Abb. 21A-F). Das Bild der Kontrollgruppe (Abb. 21K) enthält im Knochenmark nur vereinzelt positive, rot angefärbte Zellen, während in den Präparaten der Werkstoffgruppen (Abb. 21A-F) deutlich mehr positive Zellen zu erkennen sind.

In allen Bildausschnitten der Abb. 21 ist zu sehen, dass verschiedene Zellen im Knochenmark positiv reagierten. Die großen rot angefärbten Zellen in den Präparaten entsprechen beispielsweise unreifen Vorstufen, während die kleineren Zellen reife Zellen darstellen. Insbesondere auf den Bildern der Gruppen X3, Durasul, XPE* (Abb. 21A+B+D) und UHMWPE1 (Abb. 21E) kann man sehr eindrücklich große positive Zellen sehen, deren Zytoplasma intensiv rot angefärbt ist. Teilweise ist der eigentlich blaue Kern auch vom rot angefärbten Zytoplasma überdeckt. Insgesamt wird anhand der Abbildungen deutlich, dass das Knochenmark der mit Polyethylenpartikeln behandelten Mäuse (Abb. 21A-F) deutlich mehr angefärbte Zellen aufweist als das der Kontrollgruppe (Abb. 21K). Diese Hochregulation der Zytokinexpression entspricht einer entzündlichen Aktivierung des Knochenmarks. Die positiven Zellen waren über das gesamte Knochenmark des Femurs und der Tibia verteilt, sowohl proximal als auch distal. Auffällig ist, dass vor allem im Bereich der Blutsinus des Knochenmarks zahlreiche positive Zellen liegen, wie beispielsweise auf den Bildern der Prolong (Abb. 21C) und UHMWPE2 Gruppe (Abb. 21F) zu sehen ist.

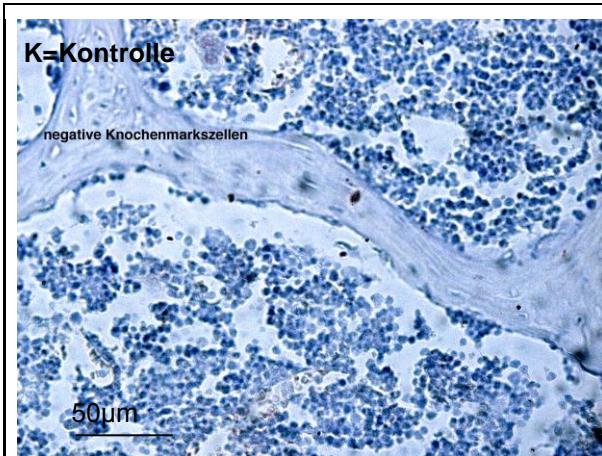
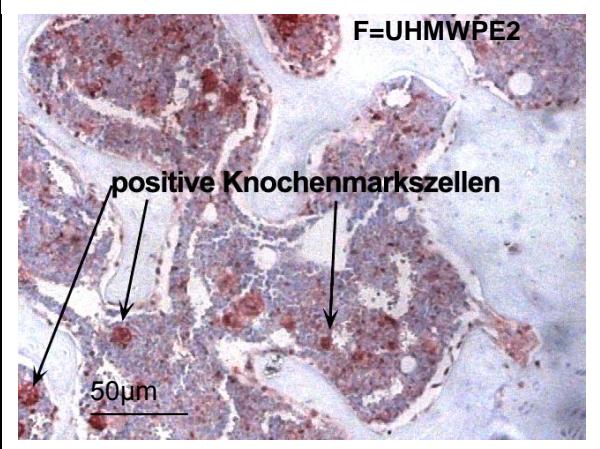
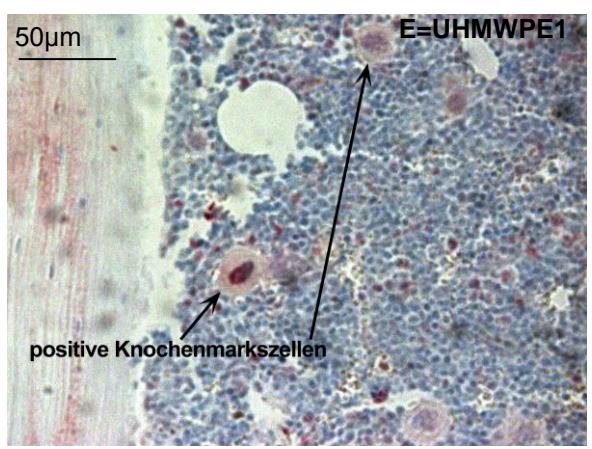
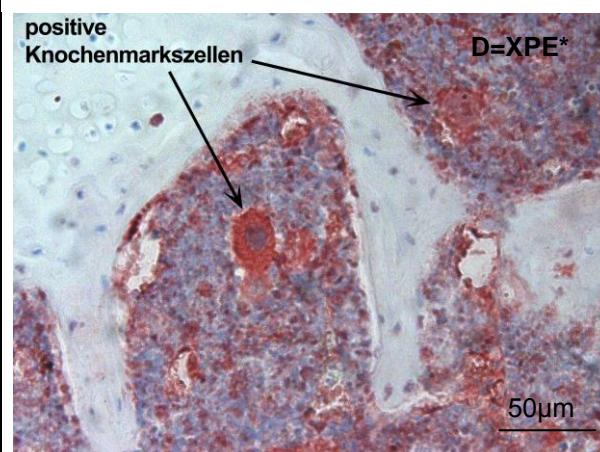
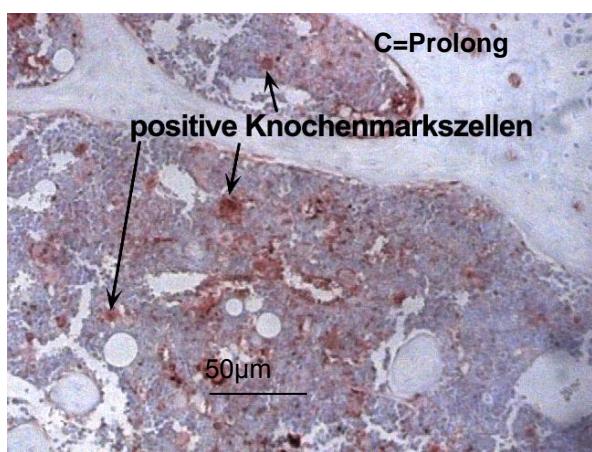
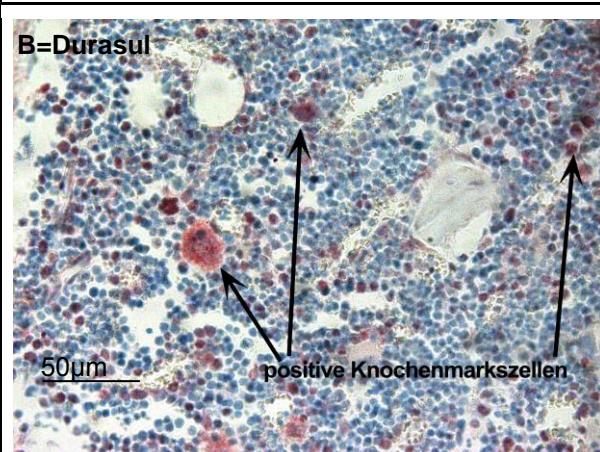
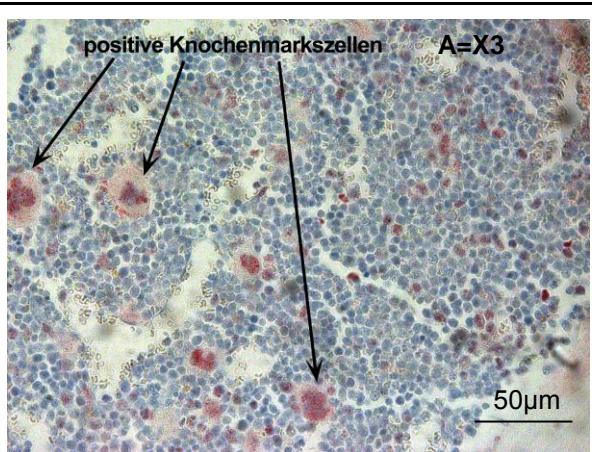


Abb. 21 zeigt die mit IL-1 β gefärbten Präparate des Knochenmarks des murinen Kniegelenks der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A-F.
Vergrößerung K+A-F: 400x



V.2.2. Expression des Zytokins IL-6 im Knochenmark

Wie bei der Färbung mit dem Antikörper IL-1 β , ergab sich bei der Färbung mit IL-6 kein signifikanter Unterschied ($p > 0,0024$) zwischen den einzelnen Polyethylengruppen (p-Werte siehe Tab. 20*). Im Gegensatz zu IL-1 β reagierten im Vergleich zur Kontrollgruppe nur bei den Mäusen, denen eine Suspension mit XPE*-Partikeln injiziert wurde, signifikant mehr Zellen positiv ($p = 0,000$, Abb. 22).

Der Primärantikörper IL-6 färbte, den Mittelwert betrachtet, in der Kontrollgruppe 24,2% der Zellen an. Bei der Gruppe mit dem Polyethylen X3 und XPE* waren 48,4% und 56,3% der Knochenmarkszellen positiv, während sich bei den Kunststoffen Durasul 42,2%, Prolong 46,9%, UHMWPE1 37,5% und UHMWPE2 42,2% der Zellen rot anfärbten.

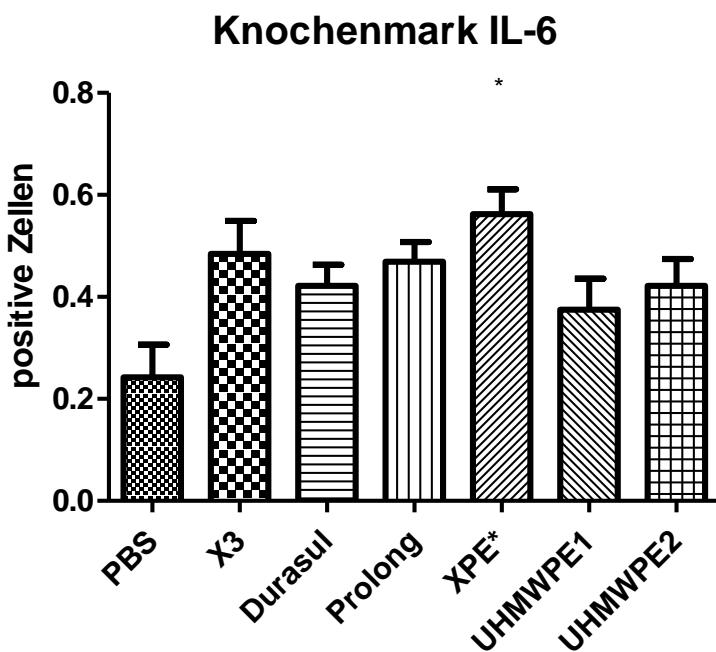


Abb. 22 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 20*) von IL-6 in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) im murinen Knochenmark 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion.

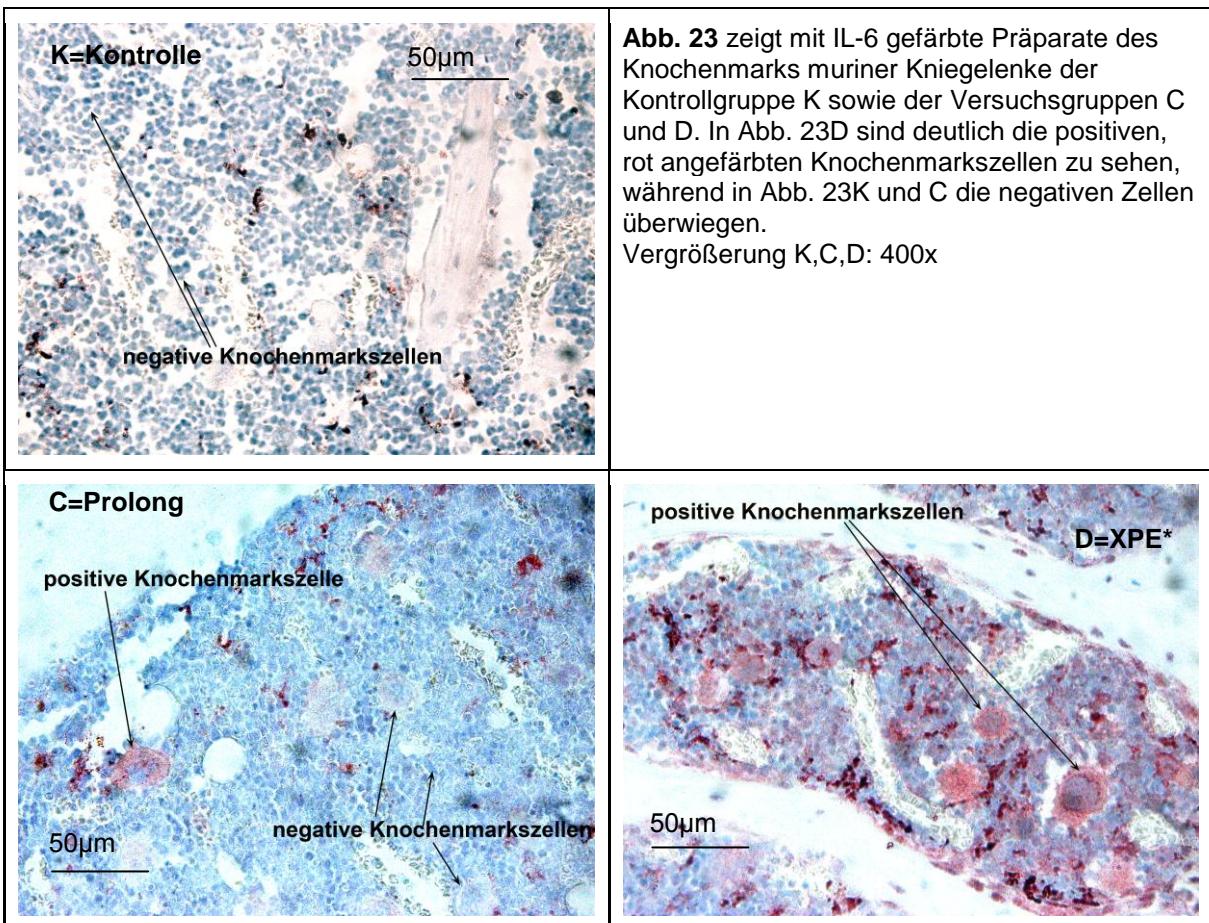
* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($p = 0,000$)

Abb. 23 zeigt Ausschnitte aus dem mit IL-6 gefärbten Knochenmark der Kontrollgruppe (Abb. 23K) und der Gruppen Prolong und XPE* (Abb. 23C+D).

Wie bei der Färbung mit IL-1 β färbten sich auch hier im Kontrollpräparat (Abb. 23K) Knochenmarkszellen rot an. Sowohl in der Kontrollgruppe (Abb. 23K) als auch in den Polyethylengruppen X3, Durasul, Prolong, UHMWPE1 und UHMWPE2 reagierten jedoch nur vereinzelte Knochenmarkszellen positiv. In dem Bildausschnitt der Prolong-Gruppe (Abb.

23C), der auch stellvertretend für die genannten Gruppen ausgewählt wurde, ist eine rot angefärbte unreife Vorläuferzelle zu sehen. In dem XPE*-Präparat (Abb. 23D) sind hingegen deutlich zahlreiche positive unreife und reife Knochenmarkszellen zu sehen.

Zusätzlich fiel bei allen mit IL-6 gefärbten Präparaten auf, dass im Knochenmark weniger die kleinen Zellen positiv reagierten als viel mehr die größeren. Bei der Färbung mit IL-1 β oder TNF- α wurde dieser Aspekt nicht in diesem Maß beobachtet.



V.2.3. Hochregulierung des Tumornekrosefaktors- α im Knochenmark

Bei der Auswertung der mit TNF- α gefärbten Präparate ergab sich bezüglich des Knochenmarks ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0024$) aller Polyethylengruppen außer der Gruppe UHMWPE2 zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 22*). Zwischen den einzelnen Polyethylengruppen bestanden keine signifikanten Unterschiede (p-Werte siehe Tab. 22*; Abb. 24).

Der Mittelwert der Kontrollgruppe war 10,2% positive Zellen. Bei X3 und XPE* färbten sich 57,8% und 56,3% Zellen positiv an, bei Durasul 51,6%, bei Prolong 40,6%, bei UHMWPE1 45,3% und bei UHMWPE2 37,5%.

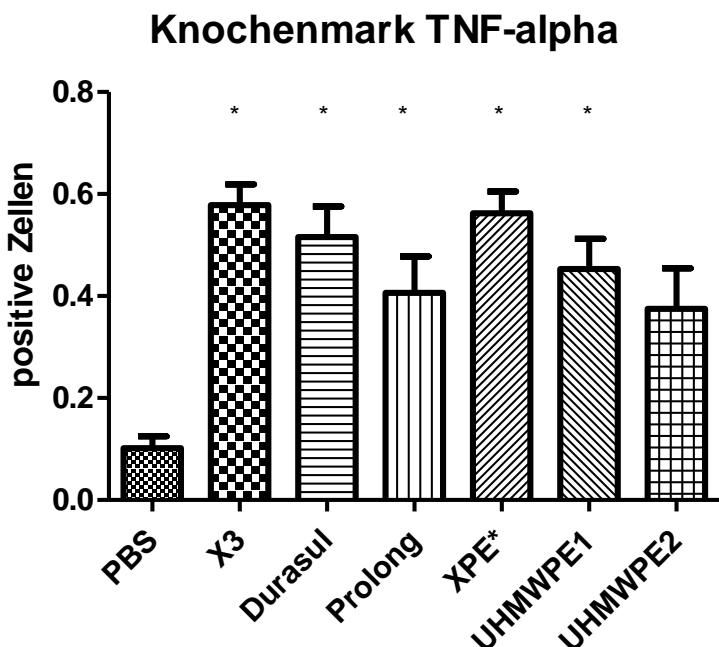


Abb. 24 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 22*) von TNF- α im murinen Knochenmark aller Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 22*)

Abb. 25 zeigt Ausschnitte aus dem Knochenmark der Kontrollgruppe (Abb. 25K) und aller Polyethylengruppen (Abb. 25A-F).

Das Bild der Kontrollgruppe (Abb. 25K), ähnlich wie das der UHMWPE2-Gruppe (Abb. 25F), zeigt einen Ausschnitt aus dem Knochenmark mit nur vereinzelten positiven Zellen. Besonders im Bild der PBS-Gruppe (Abb. 25K) sind nur sehr wenige große unreife Zellen positiv.

Vor allem in den Bildern der Gruppen X3, Durasul, Prolong und XPE* (Abb. 25A-D) sind zahlreiche positive Zellen, sowohl große Vorstufen, als auch kleine reife Zellen zu sehen.

In den Knochenmarksausschnitten der Gruppen X3 und Durasul (Abb. 25A+B) sind beispielsweise zahlreiche kleine reife Zellen rot angefärbt, während bei XPE* und Prolong (Abb. 25D+C) die großen positiven Zellen sehr prominent erscheinen. Die positiven Zellen liegen sowohl in den proximalen, als auch in den distalen Bereichen des Knochenmarks des Femurs und der Tibia, aber auch hier fällt eine Nähe, vor allem der großen Zellen, zu den Knochenmarksinus auf. Exemplarisch zeigen dies die Bilder der Gruppen Prolong und XPE* (Abb. 25C/D).

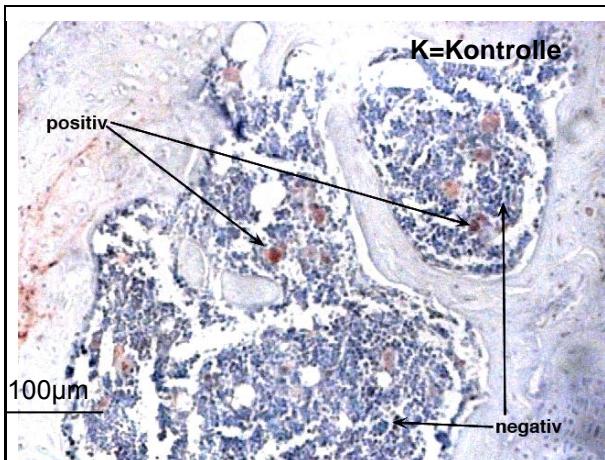
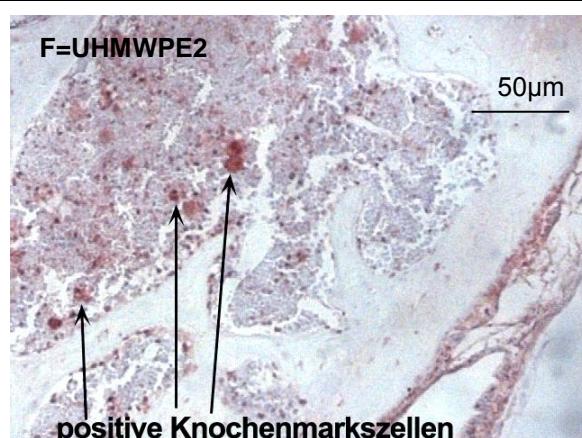
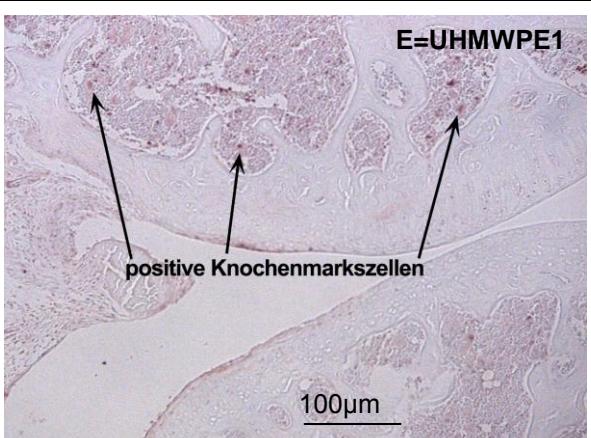
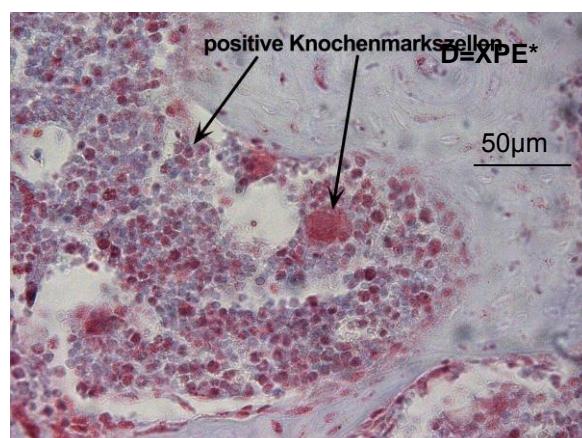
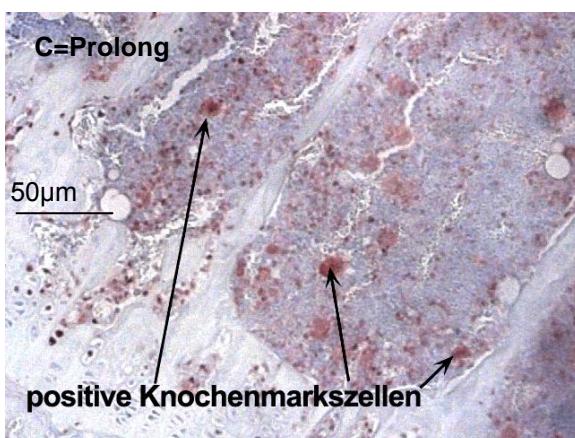
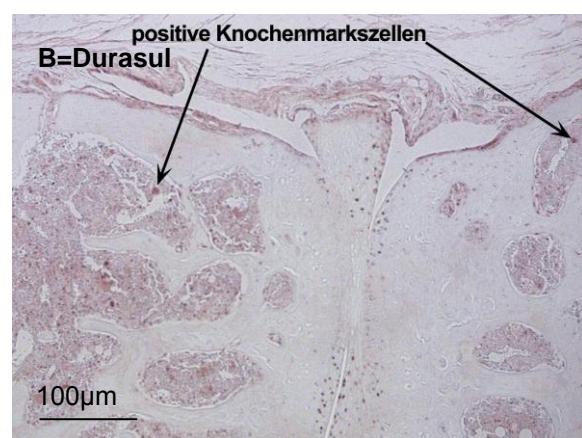
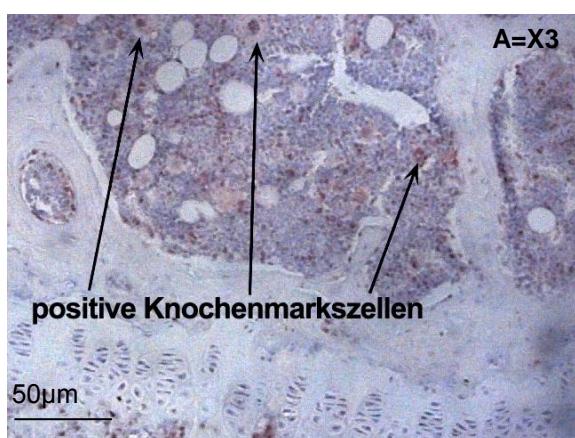


Abb. 25 zeigt mit TNF- α gefärbte Präparate des Knochenmarks muriner Kniegelenke der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A-F. In allen Präparaten der Abb. 25K und A-F sind positive, rot angefärbte Knochenmarkszellen zu sehen. Es fällt jedoch auf, dass in der Kontrollgruppe K und in der UHMWPE2-Gruppe (Abb. 25F) weniger positive Zellen zu erkennen sind als in Abb. 25A-E. Vergrößerung K+B+E: 200x, Vergrößerung A+C+D+F: 400x



V.2.4. „Gesamtentzündlichkeit“ des Knochenmarks

Auch beim Knochenmark wurde die „Gesamtentzündlichkeit“ untersucht, da die drei Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α das Knochenmark in ähnlicher Weise beeinflussen und in dem Prozess der aseptischen Osteolyse synergistisch wirken.

Aus dieser Analyse folgte, dass das Knochenmark in allen Präparaten der Polyethylengruppen signifikant ($p < 0,0024$) entzündlicher war als in den Präparaten der Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 23*). Aus dem Vergleich der einzelnen Werkstoffgruppen resultierten keine signifikanten Unterschiede (p-Werte siehe Tab. 23*; Abb. 26).

Gesamtentzündlichkeit Knochenmark

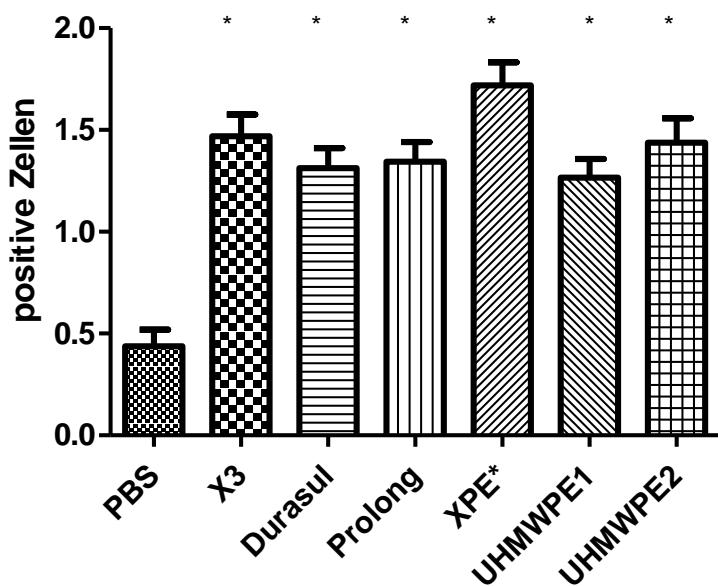


Abb. 26 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 23*) von IL-1 β , IL-6 und TNF- α im murinen Knochenmark aller Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 23*)

V.3. Die Synovialmembran

V.3.1. Hochregulierung des Zytokins IL-1 β in der Synovialmembran

Zunächst ergab sich bei der Auswertung der mit IL-1 β gefärbten Präparate eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant höhere Expression ($p < 0,0024$) dieses Zytokins bei allen

Mäusen, die mit den verschiedenen Polyethylenabkömmlingen behandelt wurden (p-Werte siehe Tab. 25*).

Bei der Kontrollgruppe war der Mittelwert 0% angefärzte Synovialzellen und bei den Gruppen X3 9,9%, Durasul 6,5%, Prolong 4,9%, XPE* 12,1%, UHMWPE1 und UHMWPE2 je 6,7%.

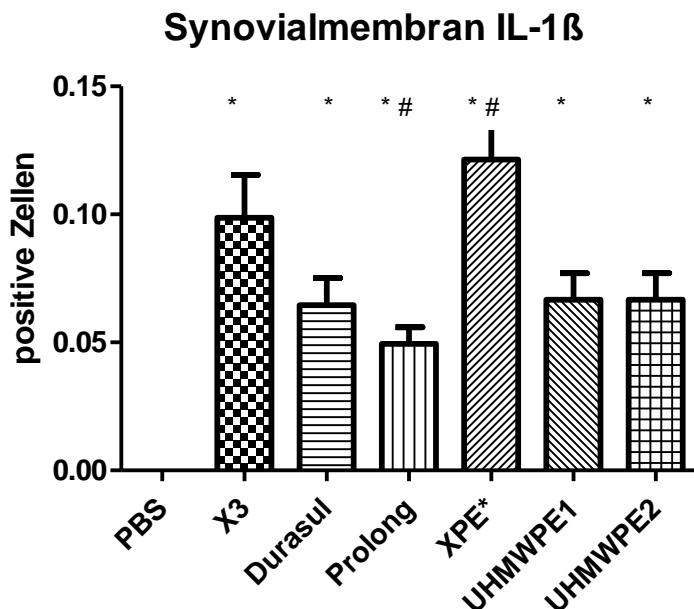


Abb. 27 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 25*) von IL-1 β in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) in der murinen Kniegelenksynovialmembran. Zwischen den Versuchsgruppen war lediglich bei Prolong und XPE* ein signifikanter Unterschied ($p = 0,001$) vorhanden.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 25*)

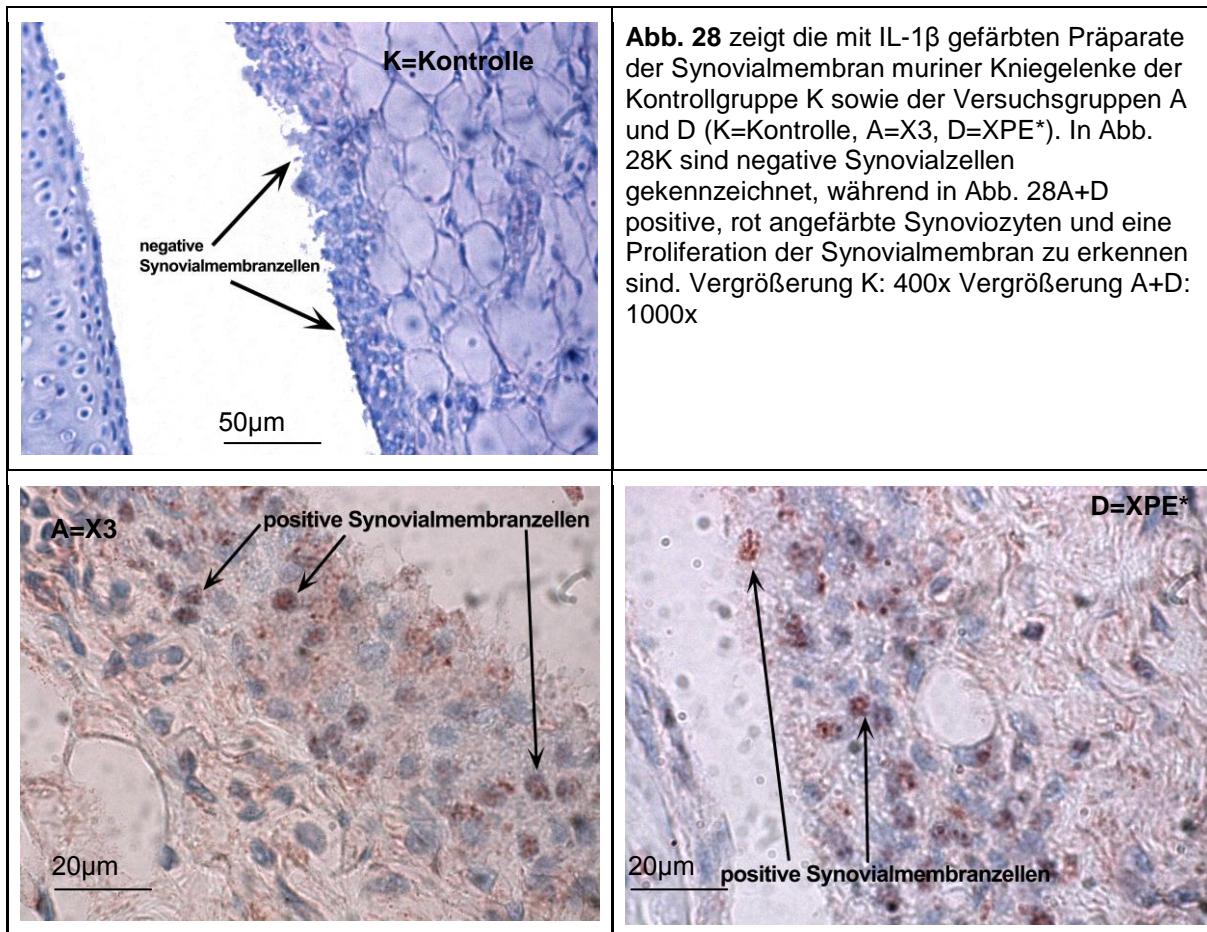
= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (p-Werte siehe Tab. 25*)

Abb. 28 zeigt einen Bildausschnitt der mit IL-1 β gefärbten Synovialmembran der Kontrollgruppe (Abb. 28K) und Bilder der X3- und XPE*-Gruppe (Abb. 28A+D). Die Präparate der anderen Werkstoffe entsprachen in der IL-1 β -Expression der X3- und XPE*-Gruppe. Die Bilder sind folglich repräsentativ und verdeutlichen den signifikanten Unterschied in der Zytokinfreisetzung.

Auf dem Bild der Kontrollgruppe (Abb. 28K) ist die Synovialmembran mit Intima und subintimaler Schicht zu sehen. Es sind blau angefärbte synoviale Deckzellen sowie das subinitimale Fettgewebe zu erkennen. Es wird deutlich, dass die synoviale Intima schmal ist und aus wenigen Zellschichten besteht. Rote, positive Zellen sind nicht zu erkennen.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe sind auf beiden Bildern der PE-Gruppen (Abb. 28A+D) rot angefärbte, positive Synovialmembranzellen zu sehen. Außerdem wird anhand beider Bilder die Proliferation der Synovialmembran deutlich. Die positiven Zellen sind über die vielschichtige Synovialmembran verteilt und begrenzen sich nicht auf die oberflächlichste

Deckzellschicht. Auch in der Subintima befinden sich IL-1 β -exprimierende Zellen. Exemplarisch wird anhand der Bilder der X3- und XPE*-Gruppe (Abb. 28A+D) deutlich, dass die Synovialmembran in den Präparaten der Polyethylengruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 28K) zum einen proliferierte und zum anderen zahlreiche positive, IL-1 β -exprimierende Zellen aufwies.



V.3.2. Expression des Zytokins IL-6 in der Synovialmembran

Die Auswertung der IL-6-Färbungen ergab bei der Kontrollgruppe einen Mittelwert von 1,7% und bei den Gruppen X3 einen Mittelwert von 22,3%, bei Durasul von 3,3%, bei Prolong von 4,7%, bei XPE* von 20,3%, bei UHMWPE1 von 11,8% und bei UHMWPE2 von 4,2%.

Ein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe resultierte deshalb bei den Gruppen X3, XPE* und UHMWPE1. Betrachtet man die einzelnen Gruppen, so unterscheiden sich XPE* und UHMWPE1 signifikant von Durasul und UHMWPE2, UHMWPE1 zusätzlich von Prolong und X3 nur von Durasul (p-Werte siehe Tab. 27^{*}; Abb. 29).

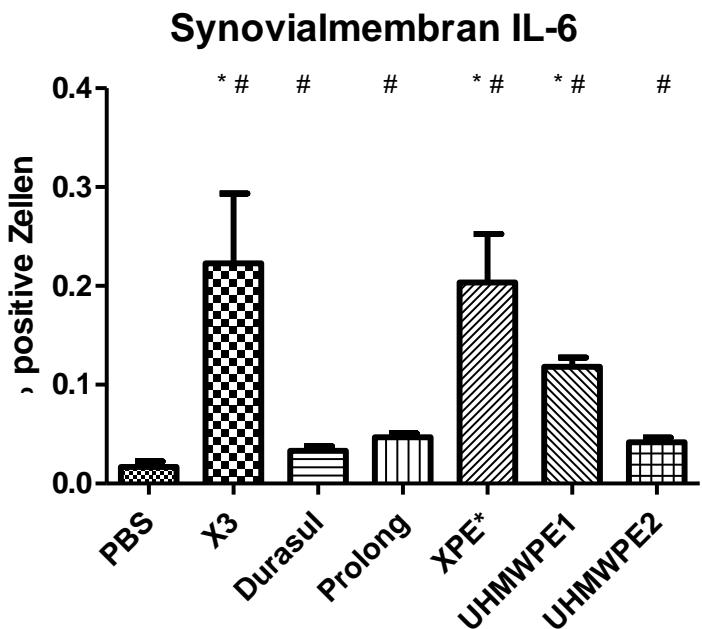


Abb. 29 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 27*) von IL-6 in der murinen Kniegelenkssynovialmembran in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS).

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 27*)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (p-Werte siehe Tab. 27*)

Abbildung 30 zeigt Bilder der Kontrollgruppe und aller Polyethylengruppen, die Ausschnitte aus der mit IL-6 gefärbten Synovialmembran des Kniegelenks darstellen. Im Kontrollpräparat (Abb. 30K) ist die synoviale Intima schmal und enthält keine positiven Zellen. Das subintimale Gewebe besteht zum Großteil aus Fettzellen. Eine Proliferation der Gefäße oder Kollagenfasern liegt hier nicht vor. Positive Synovialmembranzellen sind nicht zu erkennen.

Das Bild der Gruppe X3 (Abb. 30A) stellt einen Ausschnitt aus dem proliferierten subintimalen Gewebe der Synovialmembran dar. Sehr deutlich sind hier die zahlreichen positiven roten Zellen zu sehen. Abb. 30B ist ein Präparat der Durasul-Gruppe. Die synoviale Intima ist hier mittelgradig verdickt und weist einzelne positive Zellen auf.

Der Ausschnitt aus der Synovialmembran einer mit Prolong behandelten Maus (Abb. 30C) zeigt eine proliferierte Deckzellschicht, die aus sehr dicht aneinander gelagerten Zellen besteht. Positive Zellen sind allerdings nur wenige zu erkennen.

Das Bild der XPE*-Gruppe (Abb. 30D) zeigt eine sehr stark proliferierte Synovialmembran mit zahlreichen positiven Zellen. Auch in der unmittelbaren Umgebung der Gefäße liegen viele IL-6-exprimierende Zellen.

Anhand der Ausschnitte aus der Synovialmembran der Gruppen UHMWPE1 und UHMWPE2 (Abb. 30E+F) wird deutlich, dass bei beiden Präparaten eine proliferierte Intima vorliegt, aber das UHMWPE2-Gelenk eine weniger positive Reaktion mit einer geringeren Anzahl an rot angefärbten Zellen aufweist als das UHMWPE1-Gelenk.

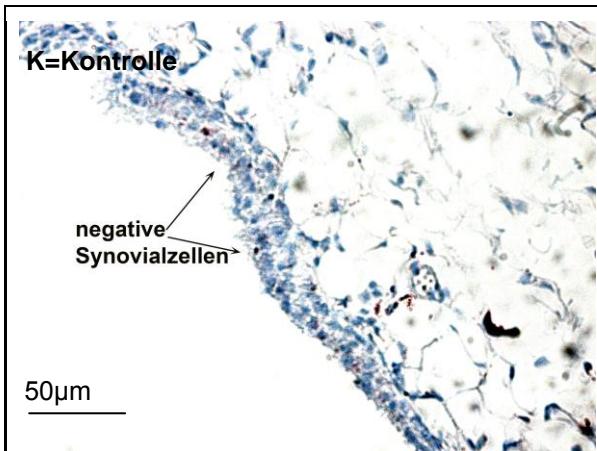
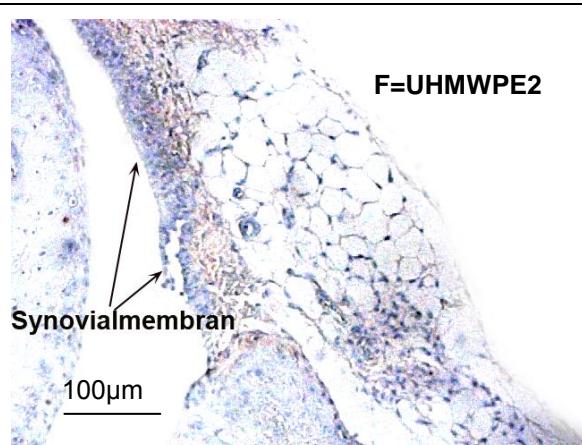
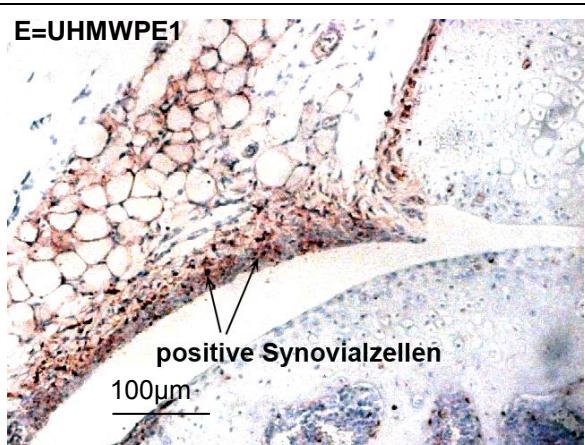
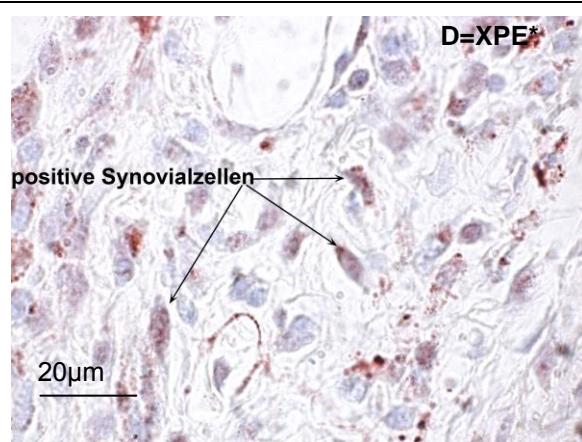
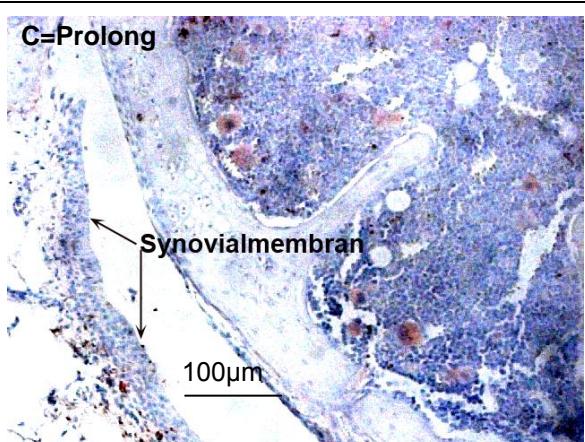
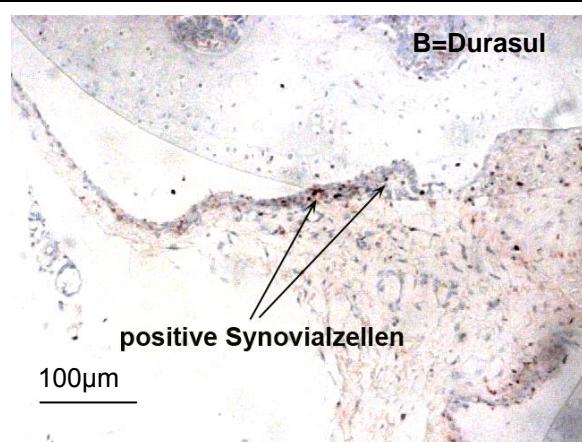
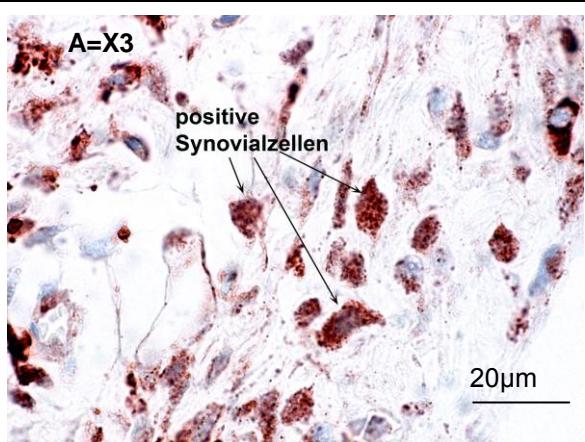


Abb. 30 zeigt mit IL-6 gefärbte Präparate der Synovialmembran muriner Kniegelenke der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A-F.

In Abb. 30K sind negative Synovialzellen zu sehen, während in den Abb. 30A-F positive, rot angefärbte Synoviozyten erkennbar sind.
Vergrößerung K: 400x, Vergrößerung A+D: 1000x, Vergrößerung B+C+E+F: 200x



V.3.3. Hochregulierung des Tumornekrosefaktors- α in der Synovialmembran

Bei den mit TNF- α gefärbten Präparaten lag der Mittelwert der Kontrollgruppe bei 3,3% positiven Zellen, der der Gruppen X3 bei 22,3%, Durasul bei 15,6%, Prolong bei 10,4%, XPE* bei 15,2%, UHMWPE1 bei 15,6% und UHMWPE2 bei 9,0%. Während zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede bestanden, wurde bei den Polyethylengruppen, außer bei der Prolong- und UHMWPE2-Gruppe, eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,0024$) erhöhte TNF- α -Expression festgestellt (p-Werte siehe Tab. 29*; Abb. 31).

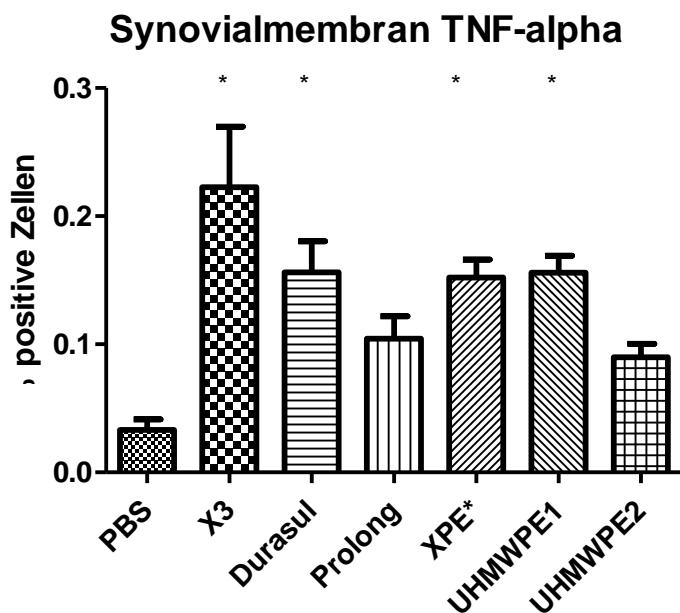
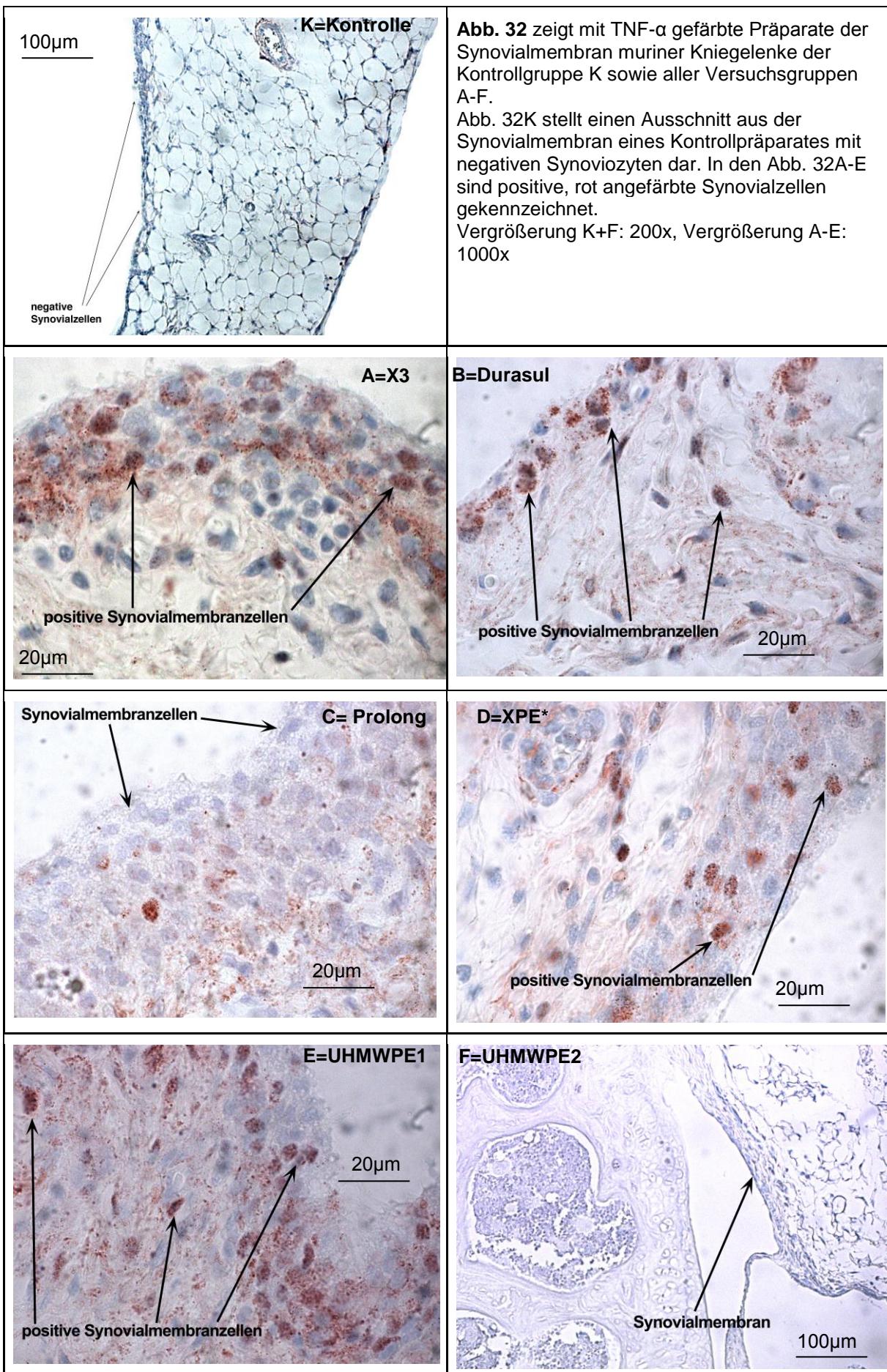


Abb. 31 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 29) von TNF- α in der murinen Kniegelenkssynovialis in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS).
* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 29)

Abb. 32 zeigt Bildausschnitte aus der mit TNF- α gefärbten Synovialmembran der Kontrollgruppe und aller Polyethylengruppen. Das Bild der Kontrollgruppe (Abb. 32K) weist eine sehr dünne Synovialmembran aus wenigen Zellschichten und ein subintimales Gewebe aus hauptsächlich Fettzellen auf. Positive Zellen liegen nicht vor. Auf den Bildern der Gruppen X3 (Abb. 32A), Durasul (Abb. 32B), XPE* (Abb. 32D) und UHMWPE1 (Abb. 32E) sind die Proliferation der Synovialmembran und zahlreiche positive Synovialmembranzellen zu erkennen. Die positiven Zellen liegen sowohl in allen Schichten der Synovialmembran, als auch in der Subintima. Im Vergleich zu den anderen Werkstoffgruppen sind in der Synovialmembran der Gruppen Prolong (Abb. 32C) und UHMWPE2 (Abb. 32F) weniger positive Zellen zu erkennen. Im Bild der Gruppe Prolong (Abb. 32C) sieht man beispielsweise nur eine eindeutig positive Synovialzelle. Der auf den Bildern vorhandene rosafarbene Hintergrund ist unspezifisch und wurde nicht gewertet.



V.3.4. „Gesamtentzündlichkeit“ der Synovialmembran

Da im Prozess der aseptischen Lockerung vor allem die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α synergistisch wirken, wurde eine „Gesamtentzündlichkeit“ der Synovia aus diesen drei Inflammationsmarkern ermittelt. Wie bei Knorpel und Knochenmark wurden hierfür die Prozentwerte der positiven Zellen addiert.

Dabei konnte ein signifikanter Unterschied aller Gruppen außer der Prolong-Gruppe zur Kontrollgruppe festgestellt werden (p-Werte siehe Tab. 30*). Bei den einzelnen Polyethylengruppen unterschied sich nur XPE* signifikant von Prolong ($p = 0,001$) und von UHMWPE2 ($p = 0,001$; Abb. 33).

Gesamtentzündlichkeit Synovialmembran

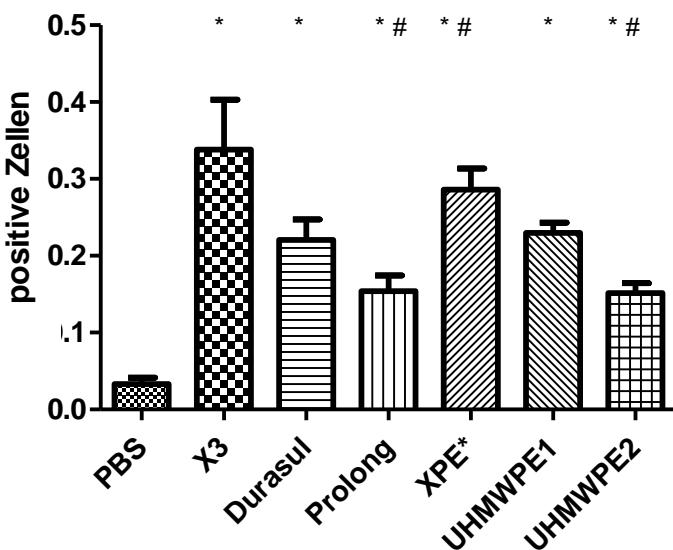


Abb. 33 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 30*) von IL-1 β , IL-6 und TNF- α in der murinen Kniegelenkssynovialmembran aller Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion. Zwischen den Versuchsgruppen bestand nur bei Prolong und XPE* ein signifikanter Unterschied ($p = 0,001$)

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 30*)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ($p = 0,001$)

V.3.5. Hochregulierung des Adhäsionsmoleküls ICAM-1 in der Synovialmembran

Das Adhäsionsmolekül ICAM-1 färbte insbesondere die Gefäße im subintimalen Gewebe an. Bei den ICAM-1-Färbungen wurde ein signifikanter Unterschied ($p < 0,0024$) aller Gruppen zur Kontrollgruppe festgestellt (p-Werte siehe Tab. 32*). Die Polyethylengruppen unterschieden sich untereinander hingegen nicht (p-Werte siehe Tab. 32*).

Der Mittelwert der Kontrollgruppe lag bei 18,8% positive Synovialgefäß, während dieser Wert bei den Gruppen X3 bei 73,4%, Durasul bei 67,2%, Prolong bei 70,3%, XPE* und UHMWPE1 bei 73,4% und bei UHMWPE2 67,2% betrug (Abb. 34).

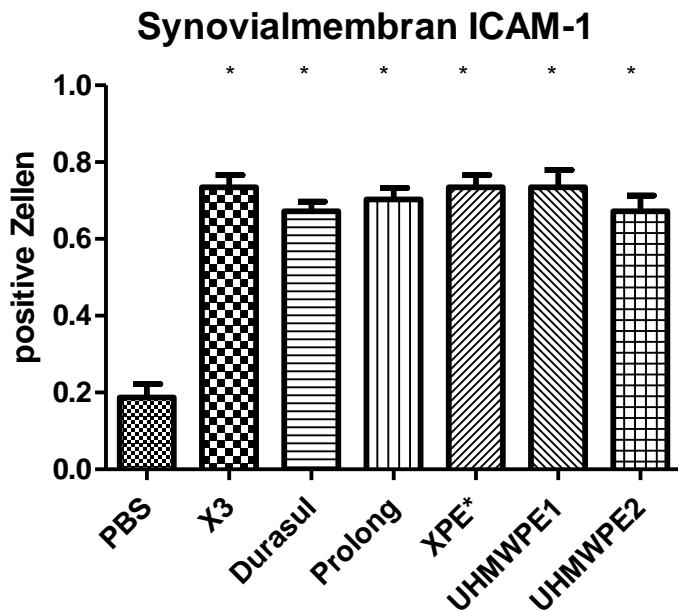


Abb. 34 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 32*) von ICAM-1 in den Gefäßen der murinen Kniegelenkssynovialmembran in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS).

* = signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 32*)

Abb. 35 zeigt Bildausschnitte aus Präparaten der Kontrollgruppe und aller Polyethylengruppen, die mit dem Primärantikörper ICAM-1 gefärbt wurden.

Auf dem Bild der Kontrollgruppe (Abb. 35K) sind überwiegend negative Gefäße im subintimalen Gewebe der Synovialmembran zu erkennen.

Im Vergleich dazu sind in den Bildausschnitten der Werkstoffgruppen (Abb. 35A-F) sehr deutlich die positiven, rot angefärbten Gefäße im Bereich der synovialen Subintima zu sehen. In den Präparaten der Gruppen X3 (Abb. 35A), XPE* (Abb. 35D) und UHMWPE2 (Abb. 35F) sind nahezu alle Gefäße positiv und intensiv rot angefärbt.

Zu beachten ist, dass die ICAM-1-exprimierenden Gefäße sowohl unmittelbar unterhalb der synovialen Deckzellschicht, als auch im gesamten subintimalen Gewebe lokalisiert sind. Überdies war auffällig, dass neben der gesteigerten Expression von ICAM-1 in den Präparaten der Polyethylengruppen in dem Synovialmembrangewebe insgesamt mehr Gefäße vorhanden waren.

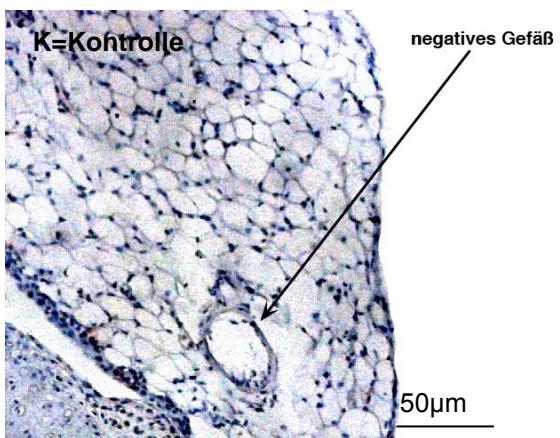
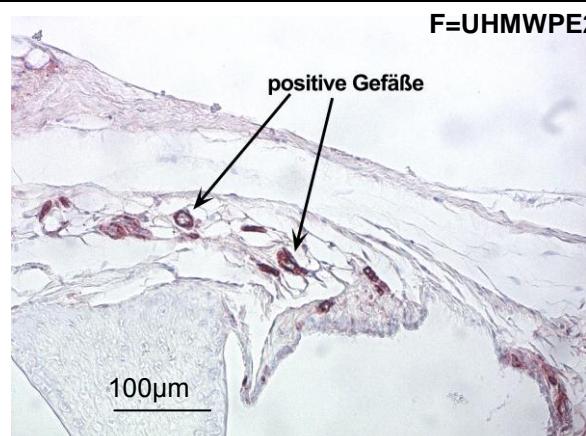
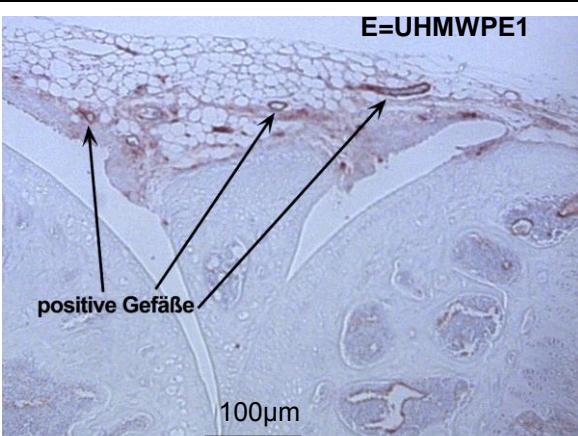
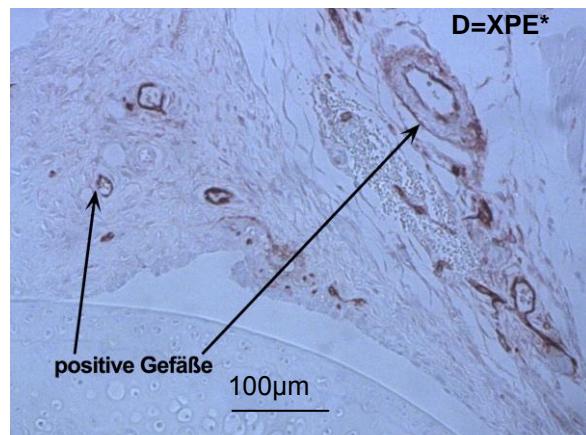
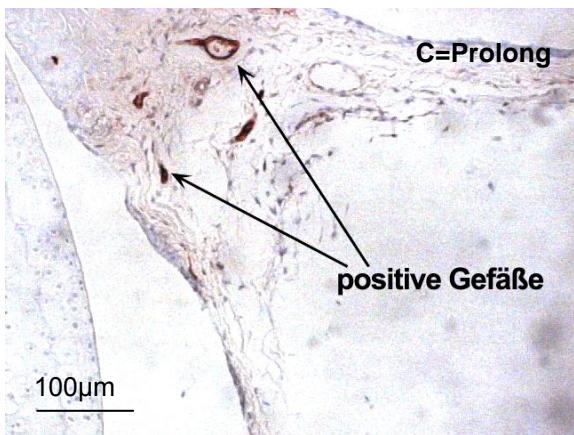
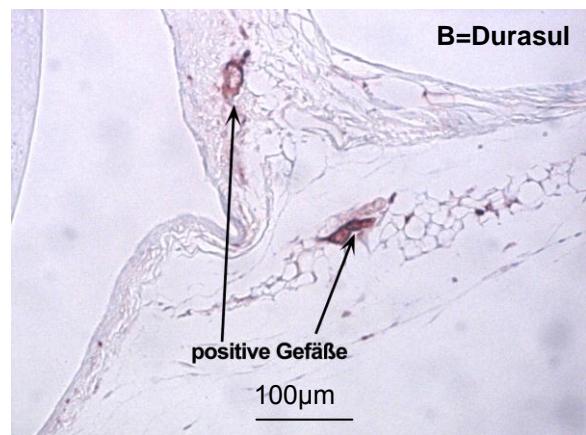
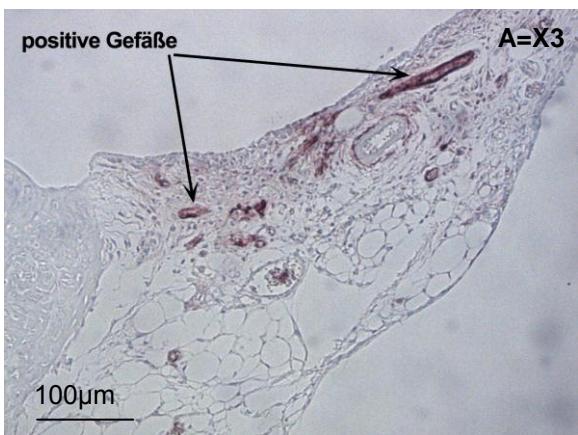


Abb. 35 zeigt mit ICAM-1 gefärbte Präparate des Synovialmembrangewebes muriner Kniegelenke der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A-F.
In Abb. 35K sind vor allem negative Gefäße zu sehen. Die Abb. 35A-F zeigen hingegen zahlreiche positive Gefäße und auch eine im Vergleich zur Kontrolle höhere Anzahl an Gefäßen im Synovialmembrangewebe.
Vergrößerung K: 400x und A-F: 200x



VI. Diskussion

Die aseptische Osteolyse ist heute nach wie vor das Hauptproblem in der Knieendoprothetik und der häufigste Grund für das Versagen des Kniegelenkersatzes (Gallo et al. 2008, Graves et al. 2004, Tuan et al. 2008). Im künstlichen Kniegelenk steht hier der Polyethylenabrieb im Vordergrund (Fehring et al. 2004, Naudie et al. 2004, Purdue et al. 2006, Green et al. 2000), da Polyethylen in der Knieendoprothetik nach wie vor den Gleitpaarungswerkstoff der Wahl darstellt. Um diesen zu minimieren, wurden zahlreiche Versuche unternommen mit dem Ziel, den Werkstoff Polyethylen und dessen Abriebfestigkeit unter bestmöglichem Erhalt der biomechanischen Eigenschaften zu optimieren (Muratoglu et al. 2007, Ries et al. 2005a, 2005b, Simis et al. 2006, Streicher et al. 2003). Aktuell existiert diesbezüglich das crosslinked Polyethylen als Alternative zum konventionellen UHMWPE.

Die Abriebpartikel induzieren einen inflammatorischen Prozess, der über komplexe und noch nicht bis ins letzte Detail geklärte biomechanische und molekularbiologische Kaskaden, zellulär insbesondere vermittelt durch Makrophagen, multinukleäre Fremdkörperriesenzellen, Osteoblasten und Osteoklasten, zu einem Ungleichgewicht im Knochenstoffwechsel und folglich zu Osteolysen und zur aseptischen Prothesenlockerung führt (Drees et al. 2008, Ingham et al. 2005, Revell et al. 2008, Purdue et al. 2007, Holt et al. 2007). Die zentrale Rolle der Zytokine, Wachstumsfaktoren und Adhäsionsmoleküle im Rahmen dieser unspezifischen Entzündungsreaktion ist in vielen Studien bereits nachgewiesen (Drees et al. 2008, Holt et al. 2007, Otto et al. 2006, Purdue et al. 2007).

Das Ziel dieser Studie war ein Vergleich sechs verschiedener Polyethylenwerkstoffe, darunter vier crosslinked Polyethylen und zwei UHMWPEs, und die Quantifizierung und Interpretation von deren biologischer Aktivität anhand immunhistochemischer Untersuchungen an einem *in vivo* Mausmodell.

Dies ist die erste Studie, die in Kombination zum einen die biologische Reaktion auf sechs verschiedene Polyethylenabriebpartikel, darunter sowohl vier crosslinked PEs als auch zwei konventionelle UHMWPEs, direkt im Kniegelenk *in vivo* untersucht und beurteilt und zum anderen Polyethylenpartikel benutzt, die im Kniesimulator gewonnen wurden.

VI.1. Diskussion der Methodik

VI.1.1. Diskussion des *in vivo* Modells

In dieser Arbeit wurde Mäusen eine Polyethylenpartikelsuspension intraartikulär ins Kniegelenk injiziert und anschließend die biologische Reaktion mittels immunhistochemischen Färbungen untersucht. Dieses Modell ist aus zahlreichen Gründen geeignet, um die biologische Aktivität von Polyethylenabriebpartikeln im Hinblick auf den Prozess der aseptischen Osteolyse zu analysieren.

Zunächst arbeitete diese Studie mit einem *in vivo* Modell, das den zahlreichen *in vitro* Modellen gegenüber den Vorteil besitzt, dass multiple Zellen und Gewebearten sowie deren Wechselwirkungen und die reziproken Einflüsse analysiert werden können. Der Vorteil gegenüber anderen *in vivo* Modellen besteht außerdem darin, dass dieses Modell ein murines Kniegelenk war und folglich alle für den Prozess der aseptischen Osteolyse spezifischen Gewebearten und Zellen enthielt, vergleichbar mit dem menschlichen Kniegelenk. Die Partikel wurden intraartikulär injiziert und befanden sich deshalb eben dort, wo sie im künstlichen Kniegelenk durch Abrieb des Polyethylengleitlagers entstehen. Die intraartikuläre Applikationsform hat im Gegensatz zu der intramuskulären oder intrakutanen den Vorteil, dass die Freisetzung von Abriebpartikeln in den Gelenkkraum durch implantierte Endoprothesen inklusive der Verteilung im Gelenk durch die Synovialflüssigkeit simuliert werden kann. Die Erkenntnisse können daher gut auf die Physiologie des humanen Gelenks und Organismus und die klinische Praxis übertragen werden.

Es gibt außerdem Studien, die im Zusammenhang mit der biologischen Aktivität von Abriebpartikeln zeigten, dass die Reaktionen von Maus und Mensch übereinstimmen oder zumindest ähnlich sind, was die Verwendung der Maus als Tiermodell bekräftigt (Matthews et al. 2000, Sethi et al. 2003). Die Vorteile der Maus, auch im Gegensatz zu größeren Versuchstieren, bestehen des Weiteren in der guten Verfügbarkeit, den vergleichsweise niedrigen wirtschaftlichen Kosten, der hervorragenden Reproduzierbarkeit und dem gut erforschten Genom und Immunsystem, das mit dem humanen Organismus vergleichbar ist (Yang et al. 2007). Zahlreiche weitere *in vivo* Modelle verwenden ebenso die Maus, aber injizieren die Polyethylenpartikel in einen chirurgisch konstruierten Hohlraum über der Schädelkalotte oder im Bereich des Mausrückens, in den wahlweise ein Stück Knochen einer genetisch identischen Maus implantiert wurde (Illgen et al. 2009, Ren et al. 2004, Ren et al. 2006a, Yang et al. 2002, Yang et al. 2004, Wooley et al. 2002). Es wurde zwar gezeigt, dass die Modelle sensitiv für Unterschiede bezüglich verschiedener Partikelmaterialien und -formen sind, ein Nachteil dieser Modelle ist aber die Lokalisation der Partikelinjektion, das

heißt, dass die Partikel nicht mit den für das Kniegelenk spezifischen Gewebearten in Kontakt kommen und Prozesse gemessen werden, die im Bereich des Rückens oder des Schädelns und nicht im Gelenk stattfinden.

Die Arbeitsgruppe Ma et al. spritzte beispielsweise über vier Wochen UHMWPE-Partikel in das distale Mäusefemur (Ma et al. 2008). Zunächst wurde über einen parapatellären Zugang ein Loch in das distale Mäusefemur gebohrt und dann zwischen den Schulterblättern eine Pumpe implantiert, über welche hinweg die Partikel infundiert wurden. Es folgten eine Mikro-CT-Analyse sowie histologische und immunhistochemische Untersuchungen (Ma et al. 2008). Vorteilhaft an diesem Modell ist mit Sicherheit die wiederholte Partikelapplikation, die dem natürlichen Partikelanfall im menschlichen künstlichen Kniegelenk am ähnlichsten ist. Allerdings fehlt wiederum der Kontakt der Partikel zu den spezifischen Gewebearten eines Gelenks und die Größenverhältnisse implizieren eine gewisse Störanfälligkeit. Die Publikation erklärt überdies nicht ausreichend, wie gewährleistet wird, dass der Pumpmechanismus regelrecht funktioniert und die Partikelapplikation am richtigen Ort stattfindet.

Ein weiteres Modell wurde von Yang et al. etabliert. Bei Balb/c-Mäusen wurden über einen parapatellären Zugang Titan-Pins zentral ins proximale Tibiaplateau implantiert, 20 µl Partikelsuspension injiziert und die Mäuse je nach Gruppe nach zwei bis 26 Wochen getötet. Im Anschluss wurden Mikro-CTs und immunhistochemische Analysen gemacht (Yang et al. 2007). Dieses Modell erscheint geeignet, da ein längerer Zeitraum besteht und eine Art Prothesenschaft implantiert wurde. Es bleibt jedoch zu diskutieren, in wie weit es möglich ist, bei den Größenverhältnissen eines Mausmodells diese Maßnahmen ohne größere Schäden durchzuführen.

Als Untersuchungszeitraum wurde in dem Modell dieser Arbeit eine Woche im Anschluss an die erfolgte intraartikuläre Injektion der Partikel gewählt, da vergleichbar mit dieser Studie zahlreiche andere *in vivo* Studien auch Kurzzeitstudien sind, was einen Untersuchungszeitraum der biologischen Reaktion des Organismus auf die Abriebpartikel von ein bis vier Wochen meint (Ma et al. 2008, Illgen et al. 2009, Ren et al. 2006a, Ren et al. 2006b, Wooley et al. 2002, Yang et al. 2002, Yang et al. 2004). Trotz der Anwendung unterschiedlicher Methoden und Materialien weisen nahezu alle Studien bereits nach diesem Zeitraum einen inflammatorischen Prozess, teilweise mit Aktivierung von Osteoklasten und folglich Osteolysen, als Reaktion auf Polyethylenpartikel nach (Ren et al. 2004, Illgen et al. 2009, Yang et al. 2002, Yang et al. 2004, Wooley et al. 2002), was den Kurzzeitcharakter des Modells dieser Arbeit unterstützt.

Die Arbeitsgruppe Zysk et al. arbeitete bereits mit dem Modell dieser Arbeit, untersuchte histologisch die biologische Reaktion auf intraartikulär injizierte Polystyrol- und Polystyrenpartikel und zeigte eine inflammatorische Reaktion im Kniegelenk, vor allem im

Bereich der Synovialmembran (Zysk et al. 2003, Zysk et al. 2004, Zysk et al. 2005). Als Untersuchungszeitraum wurden ebenfalls sieben Tage gewählt (Zysk et al. 2003, Zysk et al. 2004, Zysk et al. 2005). Zysk et al. zeigten außerdem, dass das Modell sensitiv genug ist, um zwischen Abriebpartikeln verschiedener Materialien bezüglich der inflammatorischen Reaktion zu unterscheiden (Zysk et al. 2003, Zysk et al. 2004, Zysk et al. 2005). Dadurch wird bekräftigt, dass dieses Modell funktioniert und adäquat für die Untersuchung der Reaktion auf Abriebpartikel im Hinblick auf den Prozess der aseptischen Lockerung ist.

Eine Studie der Arbeitsgruppe Sacomen et al., die die Wirkung von UHMWPE-Partikeln an einem Kanichenmodell untersuchte, wählte einen Zeitraum von sechs Monaten mit allerdings auch nur einer einmaligen Partikelapplikation zu Beginn (Sacomen et al. 1998). Der fehlende Nachweis von IL-6 und der nicht vorhandene Unterschied der IL-1 β -Sekretion zwischen Werkstoff- und Kontrollgruppe deutet darauf hin, dass die Analyse der Zytokinfreisetzung nach diesem Zeitraum zur Beurteilung der inflammatorischen Reaktion weniger geeignet ist (Sacomen et al. 1998). Ursache dafür könnte die nur einmal stattfindende Partikelapplikation sein.

Als Limitation des Modells dieser Arbeit ist zu erwähnen, dass der Prozess der aseptischen Osteolyse bei einer Knieprothese beim Menschen über mehrere Jahre verläuft und die Polyethylenpartikel kontinuierlich durch Abrieb und Verschleiß aufgrund der Kinematik und Belastung des Kniegelenks entstehen (Krukenmeyer 2009, Jerosch 1999). Wie oben beschrieben ist der Prozess der aseptischen Osteolyse eine komplexe Kaskade verschiedener molekularbiologischer Reaktionen, die zu einer negativen Bilanz des Knochenstoffwechsels und folglich zur Resorption von Knochensubstanz führt (Drees et al. 2008, Gallo et al. 2008, Otto et al. 2006, Purdue et al. 2007, Revell et al. 2008, Holt et al. 2007).

Das Modell dieser Studie ahmt den einmaligen, akuten Prozess nach, den die Kunststoffpartikel im Kniegelenk auslösen und der ein Entzündungsgeschehen in Gang setzt, wie es sich bei der aseptischen Prothesenlockerung durch kontinuierlich entstehenden Abrieb auf vergleichbare Weise, aber wiederholt abspielt. Nach der Kenntnis des Autors wurde bis jetzt noch nicht bewiesen, dass es sich bei der aseptischen Osteolyse um eine chronische Entzündungsreaktion handelt und es besteht daher die Möglichkeit, dass eine Häufung akuter Inflammationen vorliegt, die in einer Resorption der Knochensubstanz resultiert.

Obwohl es sicher sinnvoll und wichtig ist, im weiteren Verlauf auch Langzeitmodelle mit wiederholter Partikelapplikation zu etablieren, scheint der Zeitraum von einer Woche für die Untersuchung der Zytokinfreisetzung im Hinblick auf den Prozess der aseptischen Osteolyse adäquat zu sein.

Ein weiterer positiver Aspekt dieser Studie ist die Tatsache, dass zur biologischen Aktivität von UHMWPE-Partikeln bereits zahlreiche *in vivo* Studien existieren (Ma et al. 2008, Ren et al. 2004, Ren et al. 2008, Yang et al. 2002, Yang et al. 2004), während neben dieser Arbeit zum Vergleich mit den crosslinked Polyethylenen aktuell nur eine *in vivo* Studie vorliegt (Illgen et al. 2009).

Zusammengefasst liegen die Vorteile dieses Modells insbesondere in der Wahl des Kniegelenks als Untersuchungsgewebe, in der Verwendung von im Simulator erzeugten Abriebpartikeln aus in der klinischen Praxis benutzten Werkstoffen und Prothesendesigns sowie in der *in vivo* Analyse der biologischen Reaktivität verschiedener crosslinked Polyethylene. Außerdem wird die bedeutendste Limitation, der kurze Untersuchungszeitraum, durch das Funktionieren anderer Kurzzeitmodelle sowie das Modell der Arbeitsgruppe Zysk et al. relativiert (Zysk et al. 2003, Zysk et al. 2004, Zysk et al. 2005).

VI.1.2. Diskussion der untersuchten Zytokine und Entzündungsmediatoren

Das Zytokin IL-1 β ist ein proinflammatorisches Zytokin, dem in dem Prozess der aseptischen Osteolyse eine zentrale Bedeutung zukommt (Archibeck et al. 2001, Holt et al. 2007, Ingham et al. 2005, Jacobs et al. 2001, Purdue et al. 2007, Revell et al. 2008). Die durch den IL-1-Rezeptor vermittelte Signalkaskade resultiert ähnlich wie bei TNF- α in einer Aktivierung von NF- κ B (Ingham et al. 2005). Im Knochenstoffwechsel induziert es die Aktivierung und Differenzierung von Osteoklasten und Osteoklastenvorläuferzellen (Neale et al. 1999). Außerdem steigert es die Expression von RANKL auf Knochenmarksstromazellen und Osteoblasten (Gallo et al. 2008, Zwerina et al. 2004). Synergistisch mit TNF- α stimuliert es die Osteoklastogenese und folglich die Resorption von Knochensubstanz (Kobayashi et al. 2000). Es ist ein wichtiger Kofaktor von TNF- α , kann aber alleine nach bisherigen Erkenntnissen keine Osteoklastendifferenzierung auslösen (Wei et al. 2005). Außerdem unterstützt IL-1 β das Überleben von Osteoklasten, indem es die Apoptose hemmt (Gallo et al. 2008). Wichtig ist überdies noch, dass es die Produktion von OPG hemmt und so wiederum die Knochenresorption durch eine Einschränkung der Funktion der Osteoblasten begünstigt (Drees et al. 2008). In zahlreichen *in vitro* und *in vivo* Studien wurde die durch Polyethylenabriebpartikel gesteigerte Sekretion von IL-1 β gezeigt (Matthews et al. 2000, Illgen et al. 2008, Wilke et al. 2005, Wooley et al. 2002). Überdies wurde es auch in der periprothetischen Pseudomembran von Patienten, die eine Revisionsoperation aufgrund einer aseptischen Lockerung benötigten, nachgewiesen (Drees et al. 2008, Stea et al. 2000, Ingham et al. 2005, Kim et al. 1993, Holt et al. 2007). Die Bedeutung von IL-1 β wird überdies an einer Studie deutlich, die anhand eines Nagermodells zeigte, dass Retroviren mit der

genetischen Information für IL-1-Rezeptorantagonisten den Spiegel von Kathepsin K senkten und so Osteolysen minimierten (Yang et al. 2004).

Das Zytokin IL-6 wird ebenso in der periprothetischen Lockerungsmembran exprimiert (Stea et al. 2000, Stea et al. 1999, Sabokbar et al. 1995, Punt et al. 2009). Zur Entstehung der aseptischen Osteolyse trägt es vor allem dadurch bei, dass es die Osteoklastogenese induziert und in Osteoblasten eine Suppression der Genexpression der Prokollagene und folglich eine Störung der Biosynthese des Knochenkollagens bedingt (Manolagas et al. 1998, Greenfield et al. 1999, Vermes et al. 2000). Zahlreiche Studien zeigten bereits, dass die IL-6-Freisetzung von IL-1 β und TNF- α verstärkt wird (Wei et al. 2005, Chiba et al. 1994, Epstein et al. 2005b). TNF- α stimuliert beispielsweise die IL-6 Sekretion von Osteoblasten (Vermes et al. 2000). Die wichtige Rolle von IL-6 im Knochenstoffwechsel bekräftigt die Eignung dieses Zytokins zur Untersuchung der aseptischen Osteolyse.

Wie IL-1 β spielt TNF- α eine zentrale Rolle in dem Prozess der aseptischen Lockerung (Drees et al. 2008, Fuller et al. 2002, Holding et al. 2006, Holt et al. 2007, Ingham et al. 2005, Otto et al. 2006, Purdue et al. 2007). Seine Funktionen sind die Vermittlung einer unspezifischen Abwehrreaktion, die Aktivierung der Osteoklastogenese, die Aktivierung von NF- κ B, die synergistische Wirkung mit RANKL sowie die Regulation von dessen Genexpression und die Induktion weiterer proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und des GM-CSF (Merkel et al. 1999, Archibeck et al. 2001, Baumann et al. 2005, Zhang et al. 2001, Xu et al. 1996, Wei et al. 2005). Auch TNF- α befindet sich in der periprothetischen Pseudomembran des humanen künstlichen Kniegelenks und Partikelkontakt führt bei Makrophagen zu einer gesteigerten Expression dieses Faktors (Xu et al. 1996, Stea et al. 1999, Stea et al. 2000, Holding et al. 2006, Chiba et al. 1994). Es wurde außerdem gezeigt, dass eine genetische oder pharmakologische Blockade der TNF- α -Signalkaskade die Entstehung von Osteolysen vermindert (Childs et al. 2001, Algan et al. 1996, Ingham et al. 2005, Schwarz et al. 2000). Merkel et al. stellten beispielsweise fest, dass Knochenmarkszellen aus TNF-Rezeptor-Knockout-Mäusen nicht in reife Osteoklasten differenzieren können (Merkel et al. 1999). Fuller et al. wiesen zusätzlich nach, dass sehr geringe Mengen an TNF- α (100pg/ml) ausreichen, um Osteoklasten zu aktivieren (Fuller et al. 2002). Auch die Verhinderung der Apoptose von Osteoklasten und die Verlängerung von deren Lebenszeit wird TNF- α zugeschrieben, was wiederum eine verstärkte Osteolyse bedeutet (Gallo et al. 2008, Lee et al. 2001). Überdies gibt es Studien, die andeuten, dass TNF- α neben der synergistischen Wirkung mit RANKL auch unabhängig davon die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen zu reifen, Knochensubstanz resorbierenden Osteoklasten induzieren kann (Azuma et al. 2000, Kobayashi et al. 2000). Dennoch steht *in vivo* das Zusammenspiel dieser beiden Mediatoren im Prozess der aseptischen Osteolyse im Vordergrund (Holding et al. 2006, Clohisy et al. 2003).

VI.2. Diskussion der Ergebnisse

VI.2.1. Der Gelenkknorpel

Die Bedeutung des Gelenkknorpels in der Knieendoprothetik liegt vor allem in dem Bereich der unikompartimentellen Prothesen (Chang et al. 2008). Beim unikondylären Gelenkersatz wird der intakte Gelenkknorpel in dem nicht ersetzen Kompartiment erhalten und soll überdies funktionsfähig bleiben (Scott 2007).

Die Polyethylenabriebpartikel, die mit dem hyalinen Knorpel in Kontakt kommen, lösen auch hier eine entzündliche Reaktion aus, eine Exprimierung und Sezernierung von proinflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α , die den Prozess der aseptischen Lockerung in Gang setzen und begünstigen. Überdies führt eine Inflammationsreaktion zu einer weiteren Degradation des verbliebenen Gelenkknorpels und es gibt Studien, die belegen, dass eine fortschreitende Arthrose des nicht ersetzen Kompartiments die häufigste Ursache für ein Versagen der unikondylären Prothese darstellt (Dalldorf et al. 1995, Jackson et al. 1994, Ridgeway et al. 2002).

In dieser Arbeit konnte bei den Gruppen X3 und Durasul eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,0024$) erhöhte Freisetzung von TNF- α festgestellt werden. Bei den Zytokinen IL-1 β und IL-6 bestätigte sich dies jedoch nicht.

Die vermehrte Freisetzung von TNF- α in den Gruppen X3 und Durasul kann darauf zurückgeführt werden, dass die Abriebpartikel dieser beiden Werkstoffe im Gelenkknorpel eine Entzündungsreaktion auslösen. Unterstützt wird dies durch eine Studie der Arbeitsgruppe Chang et al., die anhand eines Zellkulturmodells zeigte, dass Chondrozyten auf UHMWPE-Partikel entzündlich reagieren und überdies in der Lage sind, die Partikel zu phagozytieren (Chang et al. 2008). Außerdem führten die Abriebpartikel zu einer reduzierten Überlebensfähigkeit der Knorpelzellen und zu einer gesteigerten Sekretion von Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin E2, die eine weitere Degradation des Knorpels und eine verstärkte Inflammation bewirkten (Chang et al. 2008).

Die von Chang et al. gezeigte Fähigkeit der Chondrozyten zur Phagozytose von Polyethylenpartikeln und die vermehrte TNF- α -Freisetzung in dieser Studie bekräftigen die Annahme, dass die Knorpelzellen durch Zytokinfreisetzung und Phagozytose an dem Entzündungsgeschehen im Rahmen der aseptischen Osteolyse beteiligt sind. Die Chondrozyten hatten in dem Modell dieser Arbeit überdies direkten Kontakt zu den Abriebpartikeln, da diese intraartikulär injiziert wurden. Dies ist vergleichbar mit den

unikompartimentellen Prothesen im humanen Kniegelenk, bei denen der Abrieb des Polyethylengleitlagers auch direkten Kontakt zum verbliebenen Gelenkknorpel hat.

Da die anderen Werkstoffe auch Polyethylen sind, kann eine Abwehrreaktion auf den Kunststoff Polyethylen allein nicht als Begründung ausreichen.

Auch das Crosslinking an sich bewirkte in dieser Studie keine erhöhte Zytokinfreisetzung durch die Chondrozyten, da dies bei der Prolong- und XPE*-Gruppe nicht zutraf.

Eine mögliche Erklärung für die vermehrte TNF- α -Freisetzung bei den Gruppen X3 und Durasul liegt darin, dass diese beiden Werkstoffe mit einer höheren Dosis bestrahlt wurden als die anderen Polyethylen. X3 wurde insgesamt mit 90 kGy bestrahlt und Durasul mit 95 kGy, während die Bestrahlungsdosis bei den anderen Werkstoffen 40 bis 65 kGy betrug (Utzschneider et al. 2009b).

Es ist allerdings zu berücksichtigen, dass sich die in dieser Arbeit verwendeten Polyethylenne neben dem Crosslinking und der Bestrahlungsdosis in einer Reihe weiterer Parameter unterscheiden, deren spezifischer Einfluss auf die biologische Reaktivität für die Zukunft geklärt werden muss. Die beiden Polyethylenne X3 und Durasul sind in Bezug auf das Herstellungs- und Crosslinking-Verfahren bis auf die ähnliche Bestrahlungsdosis vollkommen unterschiedlich (siehe II.2.3.4.) und es kann letztlich nicht vollständig geklärt werden, warum nur sie eine TNF- α -Freisetzung in den Chondrozyten induzierten.

Im Hinblick auf die Anwendung der Werkstoffe X3 und Durasul beim unikompartimentellen Kniegelenkersatz und beim Ersatz anderer Gelenke mit Erhalt von Gelenkknorpel ist es interessant und relevant festzuhalten, dass sie eine gesteigerte Sekretion von TNF- α bewirkten.

VI.2.2. Die Synovialmembran

Für die Beurteilung der biologischen Aktivität der Polyethylenabriebpartikel ist weiterhin die Reaktion der Synovialmembran auf diese von Bedeutung.

Im menschlichen künstlichen Kniegelenk sind an dem Prozess der aseptischen Lockerung die Synovialmembran und die periprothetische Membran beteiligt (Otto et al. 2006). Der histologische Aufbau der Synovialmembran ist mit dem der periprothetischen Pseudomembran vergleichbar, die im Bereich der Implantat-Knochen-Grenze entsteht (Ingham et al. 2005, Revell et al. 2008). Die Fibroblasten der Pseudomembran entsprechen den Typ-B-Synoviozyten und die Makrophagen den Typ-A-Synoviozyten der Synovialmembran. Außerdem enthalten beide Membranen Fibronectin, Kollagen Typ IV und V, Laminin und Heparansulfat (Mapp et al. 1985, Mayston et al. 1984, Pollock et al. 1990). Die Präsenz der Zytokine und Entzündungsmediatoren IL-1 β , IL-6, TNF- α und ICAM-1 in der

periprothetischen Lockerungsmembran wurde bereits vielfach nachgewiesen, sowohl anhand von Tiermodellen, als auch durch die Analyse von humanen Pseudomembranpräparaten im Rahmen von Prothesenrevisionsoperationen (Stea et al. 2000, Stea et al. 1999, Drees et al. 2008, Holding et al. 2006, Ingham et al. 2005).

In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass alle Polyethylengruppen in der Synovialmembran signifikant ($p < 0,0024$) mehr IL-1 β exprimierten als die Kontrollgruppe. Dies bestätigte sich auch bei der Freisetzung von TNF- α , außer bei der Prolong- und der UHMWPE2-Gruppe. Eine signifikant ($p < 0,0024$) vermehrte Freisetzung von IL-6 wurde nur bei der X3-, der XPE*- und der UHMWPE1-Gruppe gefunden.

Die Bedeutung dieser Entzündungsmediatoren im Prozess der aseptischen Endoprothesenlockerung wurde wie bereits beschrieben in zahlreichen Studien nachgewiesen (Drees et al. 2008, Ingham et al. 2005, Otto et al. 2006, Holt et al. 2007, Purdue et al. 2007). Die nach Polyethylenpartikelkontakt erhöhte Freisetzung der genannten Zytokine in der murinen Kniegelenkssynovialmembran in dieser Studie lässt sich im Rahmen der partikelinduzierten Inflammationsreaktion erklären. Überdies begünstigen die durch diese Zytokine in Gang gesetzten Signalkaskaden die Entstehung aseptischer Osteolysen.

Die insgesamt im Vergleich zu IL-1 β und TNF- α geringere IL-6-Expression kann unterschiedlich begründet und interpretiert werden. Eine vermehrte IL-1 β Freisetzung und gleichzeitig kein signifikanter Anstieg der Sekretion von IL-6 wurde in einer Studie der Arbeitsgruppe Wooley et al. gezeigt und stimmt zum Teil mit den Ergebnissen dieser Arbeit überein (Wooley et al. 2004). Die Sekretion von IL-6 wird vor allem durch IL-1 β und TNF- α induziert und verstärkt (Wei et al. 2005, Chiba et al. 1994, Epstein et al. 2005b). Daher steigt dieses Zytokin umso mehr und umso schneller an, je mehr IL-1 β und TNF- α vorhanden sind. Eine Studie der Arbeitsgruppe Epstein et al. zeigte, dass es in der periprothetischen Membran unter der Wirkung von IL-1 β zu einer Expression von IL-6 kommt (Epstein et al. 2005b). Außerdem wurde gezeigt, dass die IL-6 Freisetzung von Makrophagen der periprothetischen Membran nach UHMWPE-Partikelexposition nach vier Wochen ihr Maximum erreichte, während TNF- α bereits initial deutlich anstieg (Epstein et al. 2005a). Der langsamere Anstieg und das erst nach vier Wochen erreichte Maximum der IL-6-Freisetzung stimmen damit überein, dass in dieser Arbeit die IL-6-Expression im Vergleich zu IL-1 β und TNF- α generell geringer war. Der Untersuchungszeitraum von nur eine Woche könnte für die Hochregulierung von IL-6 relativ zu früh sein. Es wurde gezeigt, dass durch IL-6 vor allem chronische inflammatorische Prozesse unterhalten werden (Kaufmann et al. 2008).

Die Gruppen X3, XPE* und UHMWPE1 exprimierten allerdings bereits nach einer Woche signifikant mehr IL-6 in der Synovialmembran als die Kontroll- und die anderen Polyethylengruppen. Hierfür kann nicht allein das Crosslinking ursächlich sein, da UHMWPE1 ein konventionelles Polyethylen ist. Da sich die sechs Polyethylenen neben dem

Crosslinking in zahlreichen anderen Herstellungsparametern unterscheiden, kann letztlich nicht vollständig geklärt werden, welche Kunststoffeigenschaft ausschlaggebend ist. Überdies muss auch das Zusammenwirken einzelner Werkstoffeigenschaften sowie der mögliche Einfluss von Oberflächeneigenschaften oder -ladungen berücksichtigt werden. Eine mögliche Erklärung wäre allerdings die Tatsache, dass die GUR 1020 Polyethylene X3, XPE* und UHMWPE1 gammabestrahlt wurden, während die GUR 1050 Werkstoffe Durasul, Prolong und UHMWPE2 elektronenbestrahlt wurden.

VI.2.3. Gefäße in dem subintimalen Gewebe der Synovialmembran

Die Bedeutung der Gefäße im subintimalen Gewebe der Synovialmembran liegt in Bezug auf die aseptische Lockerung zum einen in der Hochregulierung der Anzahl der Gefäße und Kapillaren und zum anderen in der Aktivierung des Gefäßendothels, da zur Unterhaltung dieses entzündlichen Prozesses die Neubildung von Gefäßen sowie das Einwandern und die Akkumulation immunkompetenter Zellen erforderlich sind (Murphy 2009). Die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 ermöglicht die Leukozytenadhäsion und deren transendotheliale Migration an den Ort des Entzündungsgeschehens (Murphy 2009). Im Prozess der aseptischen Osteolyse spielt insbesondere die Migration von Makrophagen eine zentrale Rolle (Ingham et al. 2005, Purdue et al. 2007). Al Saffar et al. zeigten bereits eine Gefäßneubildung und Leukozyteneinwanderung in die Pseudomembran, wofür die Hochregulierung von ICAM-1 eine Grundlage bildet (Al Saffar et al. 1995).

In dieser Arbeit wurde in allen Polyethylengruppen eine gegenüber der Kontrollgruppe signifikant ($p < 0,0024$) erhöhte Expression von ICAM-1 an den Endothelzellen der Gefäße im subintimalen Gewebe der Synovialmembran festgestellt. Zwischen den einzelnen Werkstoffgruppen wurde kein signifikanter ($p > 0,0024$) Unterschied gefunden. Die erhöhte Expression lässt sich durch eine entzündliche Aktivierung des Endothels im Rahmen der Abwehrreaktion auf die Kunststoffpartikel erklären. Eine gesteigerte Expression von ICAM-1 wird auch durch IL-1 β und TNF- α induziert (Gallo et al. 2008). Die festgestellte Steigerung der ICAM-1 Expression stimmt mit den Ergebnissen der Intravitalmikroskopie dieser Studie überein, die eine im Vergleich zur Kontrolle signifikant erhöhte funktionelle Kapillardichte und Fraktion der rollenden Leukozyten zeigten (Utzschneider, Habilitationsschrift 2010, LMU). Diese Arbeit zeigte in den immunhistochemischen Untersuchungen mit ICAM-1 auch eine Erhöhung der Gefäßanzahl im Synovialmembrangewebe, was im Hinblick auf die funktionelle Kapillardichte wiederum eine Parallelität zu den intravitalmikroskopischen Ergebnissen darstellt (Utzschneider, Habilitationsschrift 2010, LMU).

Es ist außerdem bereits nachgewiesen, dass ICAM-1 in der menschlichen Lockerungsmembran exprimiert wird und dass dort Gefäßneubildungen auftreten (Clarke et al. 2001). Auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit aseptischer Lockerung und nötiger Revisionsoperation befand sich vermehrt lösliches ICAM-1 (Sabokbar et al. 1995).

Die auch in anderen Studien festgestellte gesteigerte Expression von ICAM-1 kann auf den von den Partikeln ausgelösten Entzündungsprozess und die damit einhergehende Endothelaktivierung und Leukozytenmigration zurückgeführt werden (Otto et al. 2001, Otto et al. 2006). Da dadurch Leukozyten in den Bereich der Synovialmembran gelangen, wird so durch ICAM-1 die Entstehung der aseptischen Lockerung mitgebahnt und begünstigt.

Die geringgradige Expression von ICAM-1 in der Synovialmembran des normalen Kniegelenks wurde bereits gezeigt und erklärt die moderate Freisetzung in der Kontrollgruppe (Hale et al. 1989, Koch et al. 1991).

VI.2.4. Das Knochenmark

Neben dem Gelenkknorpel und der Synovialmembran wurde außerdem das Knochenmark des Femurs und der Tibia ausgewertet. Für die Knieendoprothetik spielt das Knochenmark zum einen eine zentrale Rolle, da es unmittelbaren Kontakt zum Implantat hat, insbesondere bei zementfrei verankerten Prothesen. Unsere Arbeitsgruppe wies nach, dass die Polyethylenabriebpartikel bereits nach einer Woche durch die Synovialmembran ins Synovialgewebe und schließlich ins Knochenmark wandern bzw. transportiert werden (Utzschneider, Habilitationsschrift 2010, LMU). Bis dato war es unklar, wie die Abriebpartikel zur Implantat-Knochen-Grenze, dem Ort der Knochenresorption, gelangen. Es gab Studien, die postulierten, dass die Abriebpartikel mittels der Synovialflüssigkeit über Mikrospalten, die durch mechanische Faktoren entstehen, an die Implantat-Knochen-Grenze kommen (Anthony et al. 1990, Aspenberg et al. 1998). Es wurde davon ausgegangen, dass die Abriebpartikel dort Makrophagen aktivieren und somit der Prozess der aseptischen Lockerung in Gang gesetzt wird (Drees et al. 2008, Gallo et al. 2008, Ingham et al. 2005, Otto et al. 2006, Revell et al. 2008). Andere Autoren nahmen aber auch an, dass Partikel Knochen durchwandern können bzw. durch Knochen transportiert werden (Massin et al. 2004, Libouhan et al. 2009). Überdies wurden bereits Partikel in Lymphknoten und entfernten Organen nachgewiesen (Burian et al. 2006, Urban et al. 2000), was mit dem Transport durch Knochen und Synovialgewebe, wie ihn unsere Arbeitsgruppe feststellte, übereinstimmt.

Zum anderen ist das Knochenmark als Ort der Blutzellbildung und -reifung, also auch der Immunzellen, wie der Makrophagen und anderen Leukozyten, den zellulären Mediatoren der

aseptischen Osteolyse, von Bedeutung (Dexter et al. 1977, Calvi et al. 2003, Lemischka et al. 1997, Lemischka et al. 2003, Zhang et al. 2003). Findet ein Entzündungsprozess statt, werden Abwehrzellen aus dem Knochenmark rekrutiert und eine Neubildung wird angeregt (Murphy 2009). Vermittelt werden diese Prozesse durch Zytokine und Wachstumsfaktoren, deren Produktion und Sekretion durch das Inflammationsgeschehen induziert werden (Murphy 2009, Vollmar 2005). Außerdem dient die Matrix des Knochenmarks als Zytokinreservoir, da diese Botenstoffe zur Zellinteraktion, -differenzierung und -rekrutierung notwendig sind. Neben den Vorläuferzellen der Blutzellen enthält das Knochenmark beispielsweise auch Vorstufen von Osteoblasten und Osteoklasten, die im Knochenstoffwechsel und folglich im Prozess der aseptischen Osteolyse eine wichtige Rolle spielen (Welsch 2006). Aufgrund dessen ist das Knochenmark essentieller Bestandteil für die Entstehung und den Verlauf des Prozesses der aseptischen Prothesenlockerung.

In dieser Arbeit unterschied sich die Expression der Zytokine IL-1 β und IL-6 sowie TNF- α im Knochenmark hinsichtlich der verwendeten Polyethylenpartikel nicht. Der Vergleich der sechs verschiedenen Polyethylenabkömmlinge ergab keine signifikanten ($p > 0,0024$) Abweichungen. In Bezug auf die Kontrollgruppe zeigte sich aber eine signifikant ($p < 0,0024$) höhere Expression von IL-1 β in allen mit Polyethylen behandelten Gruppen. Auch die TNF- α -Freisetzung war außer in der UHMWPE2-Gruppe in allen Gruppen signifikant ($p < 0,0024$) erhöht. Bei IL-6 hingegen bestätigte sich dies nicht.

In dem dieser Arbeit zugrunde liegenden Modell hatten die Abriebpartikel keinen direkten Kontakt zum Knochenmark. Sie lösten als Fremdkörper und Entzündungsreiz einen inflammatorischen Prozess mit der Exprimierung und Sezernierung von Botenstoffen wie IL-1 β und TNF- α im Bereich des Gelenkknorpels und der Synovialmembran aus. Ein Entzündungsgehehen im Bereich des Gelenkknorpels und der Synovialmembran regt im Knochenmark die Produktion von humoralen und zellulären Entzündungsmediatoren an, da das Knochenmark als Organ des Immunsystems im Rahmen inflammatorischer Prozesse aktiviert wird. Da unsere Arbeitsgruppe nachwies, dass sich nach einer Woche Abriebpartikel im Knochenmark befanden (Utzschneider, Habilitationsschrift 2010, LMU), ist es möglich, dass diese hier einen Entzündungsprozess induzierten.

Sowohl in *in vitro*, als auch in *in vivo* Studien wurde bereits nachgewiesen, dass der Kontakt von Knochenmarkszellen mit Polyethylenpartikeln zu einer Steigerung der Sekretion von Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α führt (Tamaki et al. 2008, Sethi et al. 2003, Wilke et al. 2005). Resultat der Freisetzung dieser Entzündungsmediatoren ist unter anderem die Aktivierung von Makrophagen und die Induktion der Osteoklastogenese sowie die Hemmung der Funktion der Osteoblasten, gleichbedeutend mit einer Lockerung der Prothese (Wilke et al. 2005). Überdies werden durch die Zytokine nicht nur reife Makrophagen und Osteoklasten aktiviert, sondern auch die Differenzierung von deren Vorstufen und eine

Differenzierung von Makrophagen zu knochenresorbierenden Zellen mit osteoklastenähnlichen Eigenschaften stimuliert (Tamaki et al. 2008, Tanabe et al. 2005, Wei et al. 2005, Zhang et al. 2001).

Tamaki et al. zeigten beispielsweise, dass Monozyten bzw. Makrophagen aus dem Knochenmark nach Aktivierung oder nach Kontakt mit Polyethylenpartikeln eine gesteigerte Fähigkeit besitzen, Knochen zu resorbieren (Tamaki et al. 2008). Die Kathepsin K-positiven Makrophagen wiesen Eigenschaften der Osteoklasten auf und wirkten synergistisch mit diesen (Tamaki et al. 2008). Folglich wird der Knochenabbau, besonders die proteolytische Degradation der Knochenmatrix durch das Enzym Kathepsin K, im Prozess der aseptischen Osteolyse auch von Makrophagen bewirkt, die auto- und parakrin von Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α aktiviert werden (Revell et al. 2008). Die Arbeitsgruppe Tamaki et al. zeigte überdies, dass die Stimulation der Makrophagen mit den Kunststoffpartikeln zu einer erhöhten Expression der Entzündungsmediatoren IL-1 β , IL-6 und TNF- α führt (Tamaki et al. 2008). Außerdem bewirken diese Zytokine nicht nur eine Aktivierung der Makrophagen, sondern stimulieren auch die Differenzierung, Reifung und Aktivierung von Osteoklastenprogenitorzellen und führen so zu einer Knochenresorption durch Osteoklasten (Tanabe et al. 2005, Wei et al. 2005, Zhang et al. 2001). Im Knochenstoffwechsel spielen außerdem die Osteoblasten eine zentrale Rolle, indem sie durch Knochenaufbau der osteoklastischen Resorption entgegenwirken. Die Osteoprogenitorzellen, Vorstufen der reifen Osteoblasten, sind Zellen des Knochenmarks und sind deshalb ebenso den erhöhten Zytokinspiegeln exponiert (Murphy 2009). *In vitro* Studien zeigten anhand einer verminderten Mineralisierung, Proliferation und Aktivität der alkalischen Phosphatase, dass die Partikelexposition die osteogene Aktivität der Osteoprogenitorzellen hemmt und folglich eine periprothetische Knochenregeneration beeinträchtigt (Chiu et al. 2009).

Polyethylenabriebpartikel induzieren aber nicht nur eine verminderte Aktivität und Differenzierung der Osteoblastenvorstufen, sondern führen bei Osteoblasten selbst zu einer erhöhten Sekretion des Zytokins IL-6 und zu einer verminderten Prokollagen- α 1-Genexpression und folglich zu einer verminderten Kollagen-Typ-I Synthese (Vermes et al. 2001). Vermes et al. zeigten außerdem, dass exogenes TNF- α diese beiden Prozesse verstärkt und so bei der aseptischen Osteolyse nicht nur aufgrund der Aktivierung der Osteoklasten und folglich der Knochenresorption, sondern auch aufgrund verminderten Knochenaufbaus durch die Osteoblasten eine zentrale Rolle spielt (Vermes et al. 2001).

Die in dieser Arbeit im Knochenmark festgestellte Steigerung der Expression und Sekretion der Entzündungsmediatoren IL-1 β und TNF- α gegenüber der Kontrollgruppe korreliert mit den Ergebnissen der genannten Studien.

Bei dem Zytokin IL-6 konnte hingegen nur in der XPE*-Gruppe eine signifikant ($p < 0,0024$) höhere Expression als in der Kontrollgruppe nachgewiesen werden.

Auch in der Synovialmembran wurde IL-6 vermehrt in der XPE*-Gruppe und in den Gruppen X3 und UHMWPE1 sezerniert ($p > 0,0024$). Dies könnte eine entweder stärkere oder schneller beginnende inflammatorische Wirkung der XPE*-Abriebpartikel andeuten. Der zentrale Aspekt das Knochenmark betreffend ist allerdings mit Sicherheit die erhöhte Freisetzung von IL-1 β und TNF- α und folglich dessen inflammatorische Aktivierung. Zusammengefasst kann folglich aus den Ergebnissen dieser Arbeit das Knochenmark betreffend abgeleitet werden, dass alle Polyethylenwerkstoffe gleichermaßen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante ($p < 0,0024$) erhöhte entzündliche Aktivierung des Knochenmarks bewirkten, die durch Stimulation von Zytokin induzierten Signalkaskaden den Prozess der aseptischen Lockerung durch Osteoklastenaktivierung und Osteoblastenhemmung begünstigt.

VI.2.5. Konventionelles UHMWPE versus crosslinked Polyethylen

Um dem Problem der abriebinduzierten Osteolysenentstehung zu begegnen, wurden in der Knieendoprothetik zahlreiche Versuche unternommen, um die Abriebfestigkeit des UHMWPE zu erhöhen (Ries et al. 2005a, Muratoglu et al. 2007).

Eine neue und viel diskutierte Entwicklung ist das hochvernetzte, so genannte crosslinked Polyethylen. In der Hüftendoprothetik ist dieser Polyethylenabkömmling aufgrund sehr guter Ergebnisse sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bereits ein fester Bestandteil (McKellop et al. 1999, Muratoglu et al. 2001, Ries et al. 2001, Engh et al. 2006, Dorr et al. 2005). Diverse Hüftsimulatorstudien zeigen eine starke Reduzierung der Menge an Abriebpartikeln, bis zu 90%, und auch frühe klinische Studien belegen radiographisch eine signifikant reduzierte (50%-72%) Femurkopfpenetration (Muratoglu et al. 2001, McKellop et al. 1999, Martell et al. 2003, Digas et al. 2003a). Auch Kniesimulatorstudien mit crosslinked Polyethylen weisen im Vergleich zum konventionellen Polyethylen einen geringeren Abrieb auf (Muratoglu et al. 2004, Utzschneider et al. 2009a).

Dennoch gibt es sowohl in der Hüft- als auch in der Knieendoprothetik bezüglich des crosslinked Polyethylens bisher noch sehr wenige *in vivo* Studien oder Langzeitergebnisse (Utzschneider et al. 2009a, 2009b).

Diese Studie ist bis dato die erste *in vivo* Studie, die die biologische Aktivität von Abriebpartikeln von verschiedenen konventionellen und crosslinked Polyethylenen vergleicht. Aus diesem Vergleich konnte unsere Arbeitsgruppe eine ähnliche biologische Reaktivität und folglich Biokompatibilität der sechs verschiedenen Polyethylene ableiten. Bezuglich der Zytokinsekretion bestanden zum Beispiel im Knochenmark keine signifikanten ($p > 0,0024$) Unterschiede zwischen den einzelnen Polyethylengruppen. Daraus lässt sich schließen,

dass alle Werkstoffe eine vergleichbare Aktivierung des Knochenmarks induzierten. Die Analyse der „Gesamtentzündlichkeit“ des Kniegelenks bekräftigte ebenso die vergleichbare biologische Reaktivität der sechs Polyethylene. Folglich konnte in dieser Arbeit immunhistochemisch ein Unterschied zwischen crosslinked PE und UHMWPE nicht bestätigt werden. Des Weiteren ergaben sowohl die Intravitalmikroskopie, als auch die histologische Auswertung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung keine signifikanten Unterschiede zwischen crosslinked PE und UHMWPE (Utzschneider, Habilitationsschrift 2010, LMU). Die sechs verwendeten Polyethylene dieser Studie unterscheiden sich aber nicht nur durch das Crosslinking an sich, sondern auch in anderen Punkten, wie der Sterilisationsmethode, der Art des Crosslinkings sowie des anschließenden Temperaturvorgangs, die alle einen Einfluss auf die Partikelzahl und deren biologische Reaktivität ausüben können (Utzschneider et al. 2009a, 2009b). Der Prozess des „Crosslinkings“ einschließlich des Temperaturvorgangs (remelting oder annealing) verändert die chemischen und mechanischen Eigenschaften des Polyethylen und führt zwar zu erhöhter Abriebresistenz, aber gleichzeitig zu erniedrigter Härte, Bruch-, Streck-, Dehnungs- und Ermüdungsfestigkeit (Bradford et al. 2004a, Gomoll et al. 2002, Medel et al. 2007, Naudie et al. 2004, Oral et al. 2006, Ries et al. 2005 a, 2005b). Es gibt Studien, die zeigten, dass, je höher die „crosslinking-Dichte“, also je höher die Bestrahlungsdosis ist, desto geringer sind Bruch- und Ermüdungsfestigkeit (Bradford et al. 2004a, 2004b). Bezuglich der mechanischen Eigenschaften gibt es Studien, die beispielsweise das „annealing“ als Temperaturvorgang als am günstigsten ansehen (Medel et al. 2007). Da mit höherer Bestrahlungsdosis die Menge an Abrieb sinkt, sich aber auch die mechanischen Werkstoffeigenschaften verschlechtern, sieht die Arbeitsgruppe Baker et al. eine geringere „Crosslinking-Dosierung“ als passenden Mittelweg (Baker et al. 2003). Crosslinking wirkt sich zwar positiv auf die Abriebrate aus, verändert aber die mechanischen Eigenschaften und führt zu einem spröderen und brüchigeren Kunststoff (Ries et al. 2005a, 2005b).

Neben den mechanischen Eigenschaften und der Abriebrate der Werkstoffe sind Größe, Form und Morphologie der Abriebpartikel wichtig (Purdue et al. 2007, Fisher et al. 2004). Es wurde bereits mehrfach gezeigt, dass kleinere Partikel, vor allem im Bereich < 0,5 µm, eine stärker ausgeprägte biologische Reaktion, also Inflammation, hervorrufen (Fisher et al. 2004, Huang et al. 2002, Jacobs et al. 2001). Außerdem stellte sich vielfach heraus, dass crosslinked Polyethylene zu einer verminderten Abriebrate sowohl im Hüft-, als auch im Kniegelenk führen, aber zusätzlich oft kleinere Partikel produzieren als konventionelles UHMWPE (Affatato et al. 2005, Ingram et al. 2004, McEwen et al. 2005, Minoda et al. 2008, Muratoglu et al. 2002, Muratoglu et al. 2003a, Muratoglu et al. 2004, Muratoglu et al. 2007). Ein Vergleich von crosslinked PE und UHMWPE Partikeln, die aus der Synovia von Patienten ein Jahr nach der Implantation eines künstlichen Kniegelenks gewonnen wurden,

zeigte, dass die Partikel der crosslinked Polyethylene weniger in der Anzahl, aber auch kleiner und runder waren (Iwakiri et al. 2009). Es existieren jedoch auch Studien, die zeigten, dass sich die Abriebpartikel von crosslinked PE und konventionellem UHMWPE in ihrer Größe und Morphologie nicht unterscheiden (Utzschneider et al. 2009a, 2009b).

Studien, die bisher die biologische Aktivität von crosslinked Polyethylenpartikeln untersuchten, sind mehrheitlich *in vitro* Studien (Illgen et al. 2008, Ingram et al. 2004, Smith et al. 2009). Eine *in vitro* Studie der Arbeitsgruppe Illgen et al. zeigt zum einen, dass die Partikel des crosslinked Polyethylen kleiner und runder sind als die des UHMWPEs (Illgen et al. 2008). Zum anderen geht aus dieser Studie hervor, dass die biologische Reaktion konzentrationsabhängig ist und, dass erst bei der höchsten der getesteten Dosierungen bei den crosslinked PE Partikeln eine stärker ausgeprägte Entzündung als bei den UHMWPE Partikeln entsteht. Ingram et al. zeigten, dass crosslinked Partikel bereits in einer geringeren Konzentration als UHMWPE-Partikel zu einer Freisetzung von TNF- α durch murine Makrophagen führen (Ingram et al. 2004). Andere Studien hingegen zeigten, dass die beiden Polyethylene zu ähnlichen Zytokinspiegeln von IL-1 β , IL-6 und TNF- α führen (Sethi et al. 2003) und auch, dass das Ausmaß an Knochensubstanzverlust bei Verwendung von crosslinked PE im Vergleich zu UHMWPE geringer ist (Leung et al. 2007). Sethi et al. fanden in ihrem *in vitro* Makrophagenmodell bezüglich der Sekretion von IL-1 β , IL-6 und TNF- α keinen Unterschied zwischen crosslinked PE und konventionellem UHMWPE (Sethi et al. 2003). Sie untersuchten sowohl murine als auch humane Makrophagen. Einschränkend ist zu erwähnen, dass die Verwendung von Polyethylen nicht in Partikelform, sondern als Block auch gegenüber der Kontrolle zu keiner gesteigerten Zytokinsekretion führte (Sethi et al. 2003).

Aktuell gibt es eine *in vivo* Studie der Arbeitsgruppe Illgen et al., die anhand eines Mausmodells zeigte, dass crosslinked PE Partikel inflammatorischer wirken als konventionelles Polyethylen (Illgen et al. 2009). Limitierend ist darauf hinzuweisen, dass in dieser Studie sehr hochbestrahltes PE sowie industriell gefertigte, kugelförmige Partikel verwendet wurden (Illgen et al. 2009). Es bestehen jedoch auch Hinweise darauf, dass crosslinked Polyethylene kurz- und mittelfristig zu weniger Osteolysen und nötigen Revisionsoperationen als UHMWPE führen und folglich weniger inflammatorisch wirken (Hodrick et al. 2008).

Zu den in dieser Arbeit verwendeten Polyethylenen gibt es aktuell nur einzelne Studien. Die Arbeitsgruppe Minoda et al. verglich bei ca. 200 Patienten radiologische und klinische Resultate von konventionellem UHMWPE und crosslinked Prolong zwei Jahre nach der Implantation des Polyethylen-Inlays mit demselben Prothesendesign (Minoda et al. 2009). Es zeigten sich weder klinisch noch radiologisch statistisch signifikante Unterschiede zwischen konventionellem und crosslinked PE und es trat bei beiden keine aseptische Lockerung auf

(Minoda et al. 2009). Allerdings ist zu beachten, dass der Zeitraum von zwei Jahren relativ kurz und zur Beurteilung von frühem Prothesenversagen eher als von aseptischer Lockerung geeignet ist. Die klinischen Ergebnisse des crosslinked Polyethylens Durasul als Knieendoprothesen-Inlay wurden von Hodrick et al. untersucht (Hodrick et al. 2008). Diese Arbeitsgruppe untersuchte ca. 200 Patienten, wobei 100 eine Knieendoprothese mit Durasul bekamen und 100 eine mit konventionellem PE. Dabei zeigten die Patienten mit Durasul weniger Osteolysen und tibiale Lockerungen als jene mit dem konventionellen UHMWPE (Hodrick et al. 2008). In der Durasul-Gruppe war keine Revisionsoperation nötig, während in der Gruppe mit dem konventionellen PE drei Revisionsoperationen aufgrund tibialer Lockerung durchgeführt werden mussten. Aber auch in dieser Studie wurde nur ein kurz- bis mittelfristiger Zeitraum beobachtet. Zu dem crosslinked Polyethylen X3 gibt es eine Kniesimulatorstudie, die eine Verringerung des Abriebs gegenüber dem konventionellen UHMWPE von ca. 65% feststellte (Wang et al. 2008). Die Kniesimulatorversuche unserer Arbeitsgruppe zeigten signifikant verminderte Abriebraten der crosslinked Polyethylene X3, Durasul, Prolong und XPE* im Vergleich zu den konventionellen UHMWPE1 und UHMWPE2 ($p < 0,05$) (Utzschneider 2009a, 2009b). Bezüglich der Partikelanzahl produzierten die Polyethylene X3, Durasul und XPE* signifikant weniger Partikel als die Polyethylene Prolong, UHMWPE1 und UHMWPE2 ($p < 0,05$) (Utzschneider 2009a, 2009b).

Diese Studie ist aktuell die erste Studie, die *in vivo* die biologische Aktivität von Abriebpartikeln sechs verschiedener Polyethylene, darunter vier crosslinked PEs und zwei UHMWPEs, vergleicht. Für die Zukunft sind weitere Studien und vor allem Langzeituntersuchungen anzustreben.

VII. Zusammenfassung

Heutzutage stellt der Prozess der aseptischen Lockerung in der Knieendoprothetik nach wie vor die Hauptursache für eine Prothesenrevision dar. Induziert wird dieser Prozess vor allem durch Polyethylenabriebpartikel, die eine Entzündungsreaktion mit der Aktivierung von Makrophagen und weiteren Immunzellen sowie der Freisetzung von verschiedenen Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF- α hervorrufen. Dieser Prozess verläuft über komplexe und noch nicht bis ins letzte Detail bekannte Signalkaskaden, die schließlich zu einer Stimulation der Osteoklastogenese sowie einer Inhibierung der Osteoblastenfunktion und folglich zu einer Resorption von Knochensubstanz und Osteolysen führen.

Ein Ziel in der Endoprothetik besteht daher darin, Gleitlagerkunststoffe herzustellen, bei deren Verwendung zum einen eine geringe Anzahl und zum anderen biologisch wenig aktive Abriebpartikel entstehen. Nach wie vor gilt in der Knieendoprothetik der Polyethylenabkömmling UHMWPE als Standardmaterial für das Prothesengleitlager. Es wurden zahlreiche Versuche unternommen, um die Abriebfestigkeit dieses Kunststoffes unter bestmöglichem Erhalt der biomechanischen Eigenschaften zu erhöhen. Unter diesem Aspekt wird in der Knieendoprothetik hochvernetztes Polyethylen, so genanntes crosslinked PE als Alternative zu UHMWPE kontrovers diskutiert. Crosslinked Polyethylene entstehen aus UHMWPE zunächst durch einen Bestrahlungs- und anschließend durch einen Temperaturvorgang ober- oder unterhalb des Schmelzpunktes. Dadurch wird das Material zwar abriebresistenter, es verändern sich aber auch die biomechanischen Eigenschaften, wie beispielsweise die Ermüdungsfestigkeit. Dies ist insbesondere in der Knieendoprothetik aufgrund des Roll-Gleit-Mechanismus des Kniegelenks von zentraler Bedeutung, da hier im Vergleich zum reinen Gleitmechanismus des Hüftgelenks Ermüdungserscheinungen im Vordergrund stehen. Diverse Studien zeigten reduzierte Abriebraten bei der Verwendung von crosslinked PE als Prothesen-Inlay und deuteten eine Verminderung der aseptischen Prothesenlockerung durch diesen Polyethylenabkömmling an. Bisher existieren allerdings nur vereinzelte Studien zur *in vivo* Analyse der biologischen Aktivität von crosslinked PE Abriebpartikeln.

Das Ziel dieser Studie war es deshalb, anhand eines *in vivo* Mausmodells zu untersuchen, ob sich die *in vitro* produzierten Abriebpartikel der beiden Polyethylenen, UHMWPE und crosslinked PE, in ihrer biologischen Reaktivität unterscheiden.

Hierzu wurden 56 Balb/c Mäuse randomisiert einer von sieben Testgruppen zugewiesen: X3 (3x30 kGy Gamma, annealed und sequentiell bestrahlt; n=8), Durasul (95 kGy E-beam, remelted; n=8), Prolong (65 kGy E-beam, remelted; n=8), XPE* (50 kGy Gamma, remelted; n=8), UHMWPE1 (n=8), UHMWPE2 (n=8) und Kontrolle (n=8). Die Mäuse erhielten unter

sterilen Bedingungen eine Injektion mit 50 µl einer 0,1 Vol%-igen Partikelsuspension in das linke Kniegelenk. Die Partikel dieser Suspension wurden zuvor in einem Kniesimulator erzeugt, anschließend isoliert und von Endotoxinen gereinigt. Die Kontrolltiere erhielten eine Injektion mit 50 µl PBS. Nach sieben Tagen wurden die Tiere getötet und die linken Kniegelenke in Paraffin eingebettet. Aus den Paraffinblöcken wurden 6 µm dicke Schnitte gefertigt und diese immunhistochemisch mit den Primärantikörpern IL-1β, IL-6, TNF-α und ICAM-1 angefärbt. Die immunhistochemischen Schnitte wurden mittels eines Lichtmikroskops semiquantitativ ausgewertet. Hierzu wurden die spezifischen Gewebe Gelenkknorpel, Knochenmark und Synovialmembran evaluiert und die Präparate je nach Ausmaß der Zytokinexpression spezifischen Auswertungsstufen zugeordnet. Zur statistischen Auswertung erfolgte eine Kruskal-Wallis-Analyse zur Feststellung, ob zwischen den Gruppen ein signifikanter Unterschied besteht. Im Anschluss wurde zur Lokalisation des detektierten Unterschiedes eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt. Das korrigierte Signifikanzniveau lag bei $p < 0,0024$.

Die Auswertung der immunhistochemischen Färbungen zeigte keinen Unterschied zwischen den crosslinked PE und den UHMWPE Gruppen in der Expression der untersuchten Entzündungsmediatoren IL-1β, IL-6, TNF-α und ICAM-1 in dem murinen Knochenmark und Synovialmembrangewebe ($p > 0,0024$). In allen Testgruppen bestand jedoch gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant erhöhte Zytokinsekretion in den genannten Geweben ($p < 0,0024$).

Im murinen Gelenkknorpel zeigten sich generell geringere Zytokinexpressionen. Es ergab sich nur in den Untersuchungsgruppen X3 und Durasul eine gegenüber der Kontrollgruppe und den übrigen PE-Gruppen signifikant gesteigerte TNF-α-Sekretion ($p = 0,000$).

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen auf eine vergleichbare biologische Aktivität von crosslinked PE und UHMWPE Abriebpartikeln *in vivo* hin. Insofern stellt crosslinked PE eine attraktive Alternative zu UHMWPE als Kunststoff für Endoprothesengleitlager dar und kann zur klinisch endoprothetischen Anwendung empfohlen werden.

Betrachtet man überdies die in zahlreichen Studien nachgewiesene Verminderung der Abriebraten bei der Verwendung von crosslinked Polyethylenen, so deutet die vergleichbare Biokompatibilität in Kombination mit den reduzierten Abriebraten eine Verminderung der osteolytischen Potenz dieses Polyethylenabkömlings und folglich der aseptischen Prothesenlockerung an.

Interessant ist die erhöhte Expression von TNF-α im murinen Gelenkknorpel der Gruppen X3 und Durasul im Hinblick auf die Verwendung dieser crosslinked PEs als Gleitlager in unikompartimentellen Knieprothesen oder anderen Endoprothesen, bei denen ein Teil des

Gelenkknorpels nach der Prothesenimplantation im Gelenk verbleibt. Eine mögliche Erklärung für die gesteigerte TNF- α -Sekretion stellt die im Vergleich zu den anderen Polyethylenen höhere Bestrahlungsdosis der Werkstoffe X3 und Durasul dar.

Da zahlreiche crosslinked Polyethylene existieren, die sich, wie auch die in dieser Arbeit untersuchten crosslinked PEs, in verschiedenen Eigenschaften wie der Bestrahlungsdosis, dem Temperaturvorgang und dem Herstellungsverfahren unterscheiden, sind für die Zukunft weitere Studien anzustreben, die den spezifischen Einfluss der einzelnen Werkstoffcharakteristika auf die biologische Aktivität des Kunststoffes analysieren. Überdies ist es sinnvoll und wichtig, die biologische Reaktivität und inflammatorische Potenz der verschiedenen Polyethylenabkömmlinge in Langzeitstudien zu evaluieren.

VIII. Anhang

PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
0	0,125	0,625	0,125	0,375	0,375	0,125
0,375	0,625	0,125	0,375	0,125	0,625	0,125
0,125	0,625	0,125	0,125	0,125	0,375	0,125
0,375	0,625	0,125	0,125	0,625	0,125	0,125
0,375	0,375	0,125	0,125	0,625	0,125	0,375
0,125	0,875	0,375	0,125	0,125	0,125	0,125
0,125	0,625	0,875	0,125	0,375	0,375	0,875
0,125	0,375	0,375	0,125	0,625	0,125	0,375
0	0,125	0,875	0,125	0,375	0,125	0,375
0,375	0,125	0,375	0,375	0,375	0,125	0,375
0,125	0,625	0,125	0,375	0,625	0,375	0,375
0,375	0,375	0,375	0,125	0,625	0,125	0,125
0,375	0,625	0,375	0,125	0,625	0,125	0,125
0,125	0,125	0,125	0,125	0,375	0,125	0,375
0,375	0,875	0,875	0,375	0,125	0,625	0,875
0,125	0,375	0,125	0,625	0,375	0,375	0,375

Tab. 10 zeigt die Prozentzahlen der Chondrozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-1 β im murinen Gelenkknorpel positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
X3	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Durasul	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Prolong	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
XPE*	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
p-Werte:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	0,003	0,102	0,958	0,012	0,541	0,211
X3	0,003	1	0,186	0,003	0,654	0,019	0,089
Durasul	0,102	0,186	1	0,092	0,382	0,307	0,703
Prolong	0,958	0,003	0,092	1	0,011	0,507	0,192
XPE*	0,012	0,654	0,382	0,011	1	0,058	0,210
UHMWPE1	0,541	0,019	0,307	0,507	0,058	1	0,522
UHMWPE2	0,211	0,089	0,703	0,192	0,210	0,522	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024

Tab. 11 zeigt die nicht signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Gelenkknorpels mit dem Primärantikörper IL-1 β

PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
0,125	0,375	0,625	0,125	0,375	0,375	0,125
0,625	0,125	0,375	0,125	0,125	0,625	0,125
0,125	0,125	0,125	0,125	0,125	0,875	0,375
0,375	0,625	0,875	0,125	0,125	0,125	0,125
0,375	0,375	0,125	0,125	0,875	0,125	0,125
0,125	0,875	0,125	0,125	0,125	0,125	0,375
0,375	0,125	0,125	0,125	0,625	0,375	0,625
0,375	0,125	0,125	0,375	0,625	0,625	0,375
0,125	0,375	0,625	0,125	0,125	0,125	0,125
0,375	0,375	0,375	0,125	0,125	0,125	0,375
0,375	0,375	0,125	0,125	0,125	0,125	0,375
0,375	0,375	0,375	0,125	0,375	0,125	0,125
0,375	0,375	0,125	0,125	0,375	0,125	0,125
0,125	0,875	0,125	0,125	0,125	0,125	0,125
0,375	0,125	0,375	0,125	0,125	0,375	0,125
0,625	0,125	0,125	0,125	0,375	0,625	0,125

Tab. 12 zeigt die Prozentzahlen der Chondrozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-6 im murinen Gelenkknorpel positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein
X3	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein
Durasul	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Prolong	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
XPE*	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
p-Werte:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	0,951	0,323	0,001	0,323	0,393	0,110
X3	0,951	1	0,354	0,002	0,354	0,428	0,124
Durasul	0,323	0,354	1	0,027	1,000	0,893	0,542
Prolong	0,001	0,002	0,027	1	0,027	0,019	0,110
XPE*	0,323	0,354	1,000	0,027	1	0,893	0,542
UHMWPE1	0,393	0,428	0,893	0,019	0,893	1	0,457
UHMWPE2	0,110	0,124	0,542	0,110	0,542	0,457	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024

Tab. 13 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Gelenkknorpels mit dem Primärantikörper IL-6

PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
0	0,875	0,875	0,125	0,125	0,625	0,125
0,375	0,625	0,875	0,125	0,375	0,375	0,375
0,125	0,875	0,375	0,125	0,125	0,625	0,375
0,375	0,125	0,625	0,125	0,625	0,125	0,375
0,125	0,875	0,625	0,625	0,125	0,125	0,875
0	0,875	0,625	0,625	0,875	0,125	0,625
0,625	0,875	0,875	0,625	0,125	0,875	0,375
0,125	0,375	0,125	0,375	0,625	0,125	0,375
0,125	0,875	0,875	0,125	0,125	0,625	0,125
0,375	0,125	0,875	0,125	0,125	0,375	0,375
0,375	0,375	0,625	0,125	0,125	0,375	0,125
0,625	0,625	0,375	0,375	0,625	0,375	0,375
0,375	0,875	0,625	0,625	0,375	0,125	0,125
0,125	0,875	0,375	0,625	0,375	0,125	0,375
0,375	0,625	0,875	0,125	0,375	0,875	0,625
0,125	0,375	0,625	0,125	0,375	0,375	0,125

Tab. 14 zeigt die Prozentzahlen der Chondrozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper TNF-α im murinen Gelenkknorpel positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
X3	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein
Durasul	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein
Prolong	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
XPE*	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
p-Werte:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	0,000	0,000	0,619	0,400	0,190	0,286
X3	0,000	1	0,910	0,001	0,004	0,015	0,008
Durasul	0,000	0,910	1	0,001	0,003	0,011	0,005
Prolong	0,619	0,001	0,001	1	0,731	0,416	0,569
XPE*	0,400	0,004	0,003	0,731	1	0,639	0,821
UHMWPE1	0,190	0,015	0,011	0,416	0,639	1	0,808
UHMWPE2	0,286	0,008	0,005	0,569	0,821	0,808	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024

Tab. 15 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Gelenkknorpels mit dem Primärantikörper TNF-α

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
X3	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein
Durasul	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein
Prolong	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
XPE*	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

p-Werte:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	0,001	0,017	0,296	0,217	0,554	0,563
X3	0,001	1	0,313	< 0,0001	0,031	0,005	0,005
Durasul	0,017	0,313	1	0,001	0,251	0,073	0,071
Prolong	0,296	< 0,0001	0,001	1	0,023	0,102	0,105
XPE*	0,217	0,031	0,251	0,023	1	0,521	0,512
UHMWPE1	0,554	0,005	0,073	0,102	0,521	1	0,989
UHMWPE2	0,563	0,005	0,071	0,105	0,512	0,989	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024

Tab. 16 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des murinen Gelenkknorpels mit den Primärantikörpern IL-1 β , IL-6 und TNF- α

PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
0	0,125	0,125	0,375	0,125	0,875	0,625
0,125	0,625	0,125	0,625	0,125	0,875	0,625
0,125	0,625	0,375	0,375	0,375	0,625	0,875
0,125	0,625	0,625	0,375	0,375	0,625	0,375
0,125	0,125	0,375	0,375	0,625	0,625	0,875
0,125	0,375	0,875	0,375	0,375	0,125	0,875
0,125	0,375	0,875	0,375	0,625	0,625	0,875
0,125	0,375	0,875	0,375	0,625	0,625	0,875
0	0,375	0,625	0,125	0,625	0,375	0,625
0	0,125	0,125	0,625	0,625	0,125	0,625
0,125	0,125	0,125	0,875	0,875	0,125	0,375
0,125	0,375	0,375	0,625	0,875	0,125	0,375
0,125	0,625	0,125	0,625	0,875	0,375	0,375
0,125	0,375	0,625	0,375	0,875	0,625	0,875
0,125	0,375	0,125	0,375	0,875	0,125	0,625
0	0,875	0,375	0,625	0,625	0,375	0,625
0,125	0,375	0,125	0,375	0,625	0,375	0,625

Tab. 17 zeigt die Prozentzahlen der Zellen, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-1 β im murinen Knochenmark positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
X3	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Durasul	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Prolong	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
XPE*	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

p-Werte:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	0,001	0,002	< 0,0001	< 0,0001	0,000	< 0,0001
X3	0,001	1	0,694	0,487	0,058	0,765	0,016
Durasul	0,002	0,694	1	0,276	0,022	0,489	0,005
Prolong	< 0,0001	0,487	0,276	1	0,230	0,692	0,085
XPE*	< 0,0001	0,058	0,022	0,230	1	0,110	0,603
UHMWPE1	0,000	0,765	0,489	0,692	0,110	1	0,034
UHMWPE2	< 0,0001	0,016	0,005	0,085	0,603	0,034	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024

Tab. 18 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Knochenmarks mit dem Primärantikörper IL-1β

PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
0	0,125	0,625	0,375	0,625	0,125	0,375
0,625	0,125	0,375	0,375	0,375	0,375	0,625
0,375	0,375	0,125	0,125	0,625	0,125	0,625
0,625	0,625	0,375	0,625	0,375	0,125	0,125
0,125	0,125	0,375	0,625	0,625	0,125	0,125
0,125	0,875	0,375	0,625	0,125	0,375	0,625
0	0,625	0,375	0,375	0,375	0,125	0,375
0,125	0,375	0,125	0,375	0,625	0,125	0,625
0	0,375	0,625	0,375	0,625	0,625	0,375
0,625	0,625	0,375	0,625	0,625	0,625	0,375
0,375	0,625	0,375	0,625	0,625	0,625	0,625
0,625	0,625	0,625	0,375	0,375	0,125	0,125
0	0,125	0,375	0,625	0,875	0,375	0,125
0	0,875	0,625	0,375	0,625	0,375	0,625
0,125	0,625	0,625	0,625	0,875	0,625	0,375
0,125	0,625	0,375	0,625	0,625	0,875	0,625

Tab. 19 zeigt die Prozentzahlen der Zellen, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-6 im murinen Knochenmark positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein
X3	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Durasul	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Prolong	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
XPE*	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

p-Werte:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	0,005	0,048	0,009	0,000	0,149	0,036
X3	0,005	1	0,399	0,825	0,337	0,167	0,467
Durasul	0,048	0,399	1	0,534	0,071	0,590	0,909
Prolong	0,009	0,825	0,534	1	0,238	0,246	0,612
XPE*	0,000	0,337	0,071	0,238	1	0,019	0,091
UHMWPE1	0,149	0,167	0,590	0,246	0,019	1	0,513
UHMWPE2	0,036	0,467	0,909	0,612	0,091	0,513	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024							
---	--	--	--	--	--	--	--

Tab. 20 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Knochenmarks mit dem Primärantikörper IL-6

PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
0	0,625	0,375	0,375	0,625	0,875	0,375
0,125	0,125	0,875	0,125	0,375	0,625	0,125
0,125	0,375	0,625	0,125	0,375	0,125	0,125
0,125	0,625	0,375	0,625	0,625	0,375	0,125
0	0,625	0,875	0,625	0,375	0,625	0,625
0,125	0,625	0,625	0,125	0,375	0,375	0,875
0	0,625	0,875	0,125	0,625	0,125	0,875
0,125	0,625	0,375	0,375	0,375	0,375	0,125
0	0,625	0,125	0,125	0,625	0,625	0,125
0,125	0,625	0,375	0,125	0,625	0,625	0,625
0,125	0,625	0,375	0,625	0,375	0,375	0,125
0,125	0,375	0,375	0,125	0,875	0,375	0,125
0	0,625	0,625	0,625	0,625	0,375	0,125
0,125	0,625	0,625	0,875	0,625	0,375	0,625
0,125	0,875	0,625	0,625	0,875	0,875	0,875
0,375	0,625	0,125	0,875	0,875	0,125	0,125

Tab. 21 zeigt die Prozentzahlen der Zellen, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper TNF- α im murinen Knochenmark positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
X3	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Durasul	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Prolong	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
XPE*	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

p-Werte:

	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	< 0,0001	< 0,0001	0,001	< 0,0001	0,000	0,003
X3	< 0,0001	1	0,451	0,061	0,823	0,159	0,026
Durasul	< 0,0001	0,451	1	0,262	0,595	0,514	0,139
Prolong	0,001	0,061	0,262	1	0,098	0,639	0,722
XPE*	< 0,0001	0,823	0,595	0,098	1	0,236	0,045
UHMWPE1	0,000	0,159	0,514	0,639	0,236	1	0,409
UHMWPE2	0,003	0,026	0,139	0,722	0,045	0,409	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024

Tab. 22 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Knochenmarks mit dem Primärantikörper TNF-α

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
X3	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Durasul	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Prolong	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
XPE*	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

p-Werte:

	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	0,000	< 0,0001
X3	< 0,0001	1	0,381	0,531	0,185	0,238	0,852
Durasul	< 0,0001	0,381	1	0,803	0,028	0,762	0,490
Prolong	< 0,0001	0,531	0,803	1	0,051	0,581	0,660
XPE*	< 0,0001	0,185	0,028	0,051	1	0,012	0,131
UHMWPE1	0,000	0,238	0,762	0,581	0,012	1	0,321
UHMWPE2	< 0,0001	0,852	0,490	0,660	0,131	0,321	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024

Tab. 23 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des murinen Knochenmarks mit den Primärantikörpern IL-1β, IL-6 und TNF-α

PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE1
0	0	0,0594	0	0,09	0,0571	0,0571
0	0,0227	0,0636	0,0648	0,03	0,0194	0,0194
0	0,1524	0,0263	0,0351	0,0648	0,04	0,04
0	0,1217	0,0792	0,0471	0,1217	0,0744	0,0744
0	0,0855	0,0198	0,0192	0,1613	0,0789	0,0789
0	0,0672	0,02	0,0333	0,1607	0,01	0,01
0	0,2044	0,1339	0,0758	0,1554	0,1316	0,1316
0	0,1165	0,1143	0,0896	0,1905	0,1089	0,1089
0	0	0,0587	0,046	0,087	0,0523	0,0523
0	0,0267	0,0621	0,0755	0,0287	0,0378	0,0378
0	0,1489	0,0278	0,0389	0,0665	0,0266	0,0266
0	0,1299	0,0799	0,0267	0,1239	0,0911	0,0911
0	0,0634	0,0224	0,0317	0,1601	0,0624	0,0624
0	0,0856	0,0135	0,0536	0,1629	0,0179	0,0179
0	0,2189	0,1367	0,0601	0,1527	0,1406	0,1406
0	0,1354	0,1155	0,0938	0,1858	0,1173	0,1173

Tab. 24 zeigt die Prozentzahlen der Synoviozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-1 β in der murinen Kniegelenkssynovialmembran positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE1
PBS	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
X3	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Durasul	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Prolong	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein
XPE*	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
p-Werte:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE1
PBS	1	< 0,0001	< 0,0001	0,000	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
X3	< 0,0001	1	0,196	0,055	0,194	0,241	0,241
Durasul	< 0,0001	0,196	1	0,534	0,010	0,904	0,904
Prolong	0,000	0,055	0,534	1	0,001	0,458	0,458
XPE*	< 0,0001	0,194	0,010	0,001	1	0,013	0,013
UHMWPE1	< 0,0001	0,241	0,904	0,458	0,013	1	1,000
UHMWPE1	< 0,0001	0,241	0,904	0,458	0,013	1,000	1
Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024							

Tab. 25 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung der murinen Kniegelenkssynovialmembran mit dem Primärantikörper IL-1 β

PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
0	0,968	0	0,0435	0,099	0,1346	0,0381
0	0,0185	0,0261	0,0446	0,0198	0,1417	0,04
0,0375	0,0874	0,0338	0,0196	0,0566	0,1176	0,066
0,0178	0,0476	0,0472	0,049	0,1782	0,1731	0,0187
0,0267	0,0476	0,0294	0,0556	0,6694	0,0377	0,0165
0	0,7442	0,0283	0,0762	0,229	0,1333	0,0413
0	0,6729	0,0588	0,0396	0,2214	0,1034	0,048
0,0534	0,0923	0,0385	0,0496	0,16	0,0965	0,075
0	0,1189	0,0034	0,0467	0,0876	0,1389	0,0289
0	0,0367	0,0344	0,0389	0,0234	0,1635	0,0538
0,0758	0,0514	0,0312	0,0278	0,0567	0,0923	0,0645
0	0,0623	0,0501	0,0536	0,1634	0,1687	0,0201
0	0,0401	0,0268	0,0491	0,6701	0,0586	0,019
0,0198	0,7045	0,0277	0,0701	0,2367	0,1252	0,0377
0,0167	0,6578	0,0735	0,0222	0,2178	0,0989	0,0489
0,0199	0,0856	0,0199	0,0656	0,1655	0,1066	0,0539

Tab. 26 zeigt die Prozentzahlen der Synoviozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-6 in der murinen Kniegelenkssynovialmembran positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Signifikante Differenzen:

	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein
X3	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein
Durasul	Nein	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein
Prolong	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein
XPE*	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja
UHMWPE1	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja
UHMWPE2	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja	Nein

p-Werte:

	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	< 0,0001	0,145	0,006	< 0,0001	< 0,0001	0,026
X3	< 0,0001	1	0,001	0,046	0,301	0,266	0,011
Durasul	0,145	0,001	1	0,189	< 0,0001	< 0,0001	0,439
Prolong	0,006	0,046	0,189	1	0,002	0,002	0,588
XPE*	< 0,0001	0,301	< 0,0001	0,002	1	0,937	0,000
UHMWPE1	< 0,0001	0,266	< 0,0001	0,002	0,937	1	0,000
UHMWPE2	0,026	0,011	0,439	0,588	0,000	0,000	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024

Tab. 27 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung der murinen Kniegelenkssynovialmembran mit dem Primärantikörper IL-6

PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
0	0,1333	0,0857	0,0594	0,1593	0,2475	0,0684
0,0276	0,0439	0,3279	0,0732	0,0806	0,1727	0,0536
0,0156	0,2308	0,0435	0,0909	0,0783	0,1485	0,0268
0,0738	0,0531	0,0392	0,04	0,0959	0,22	0,049
0,0423	0,1404	0,2029	0,0971	0,2231	0,0952	0,1495
0	0,24	0,2143	0,2353	0,2389	0,1364	0,1373
0	0,6535	0,248	0,0294	0,1818	0,1481	0,1456
0,1167	0,2653	0,0882	0,2167	0,1651	0,0752	0,099
0,0378	0,1567	0,0823	0,0425	0,1378	0,2289	0,0367
0	0,0289	0,3067	0,0838	0,0961	0,1977	0,0761
0,0197	0,2388	0,0534	0,1001	0,0823	0,1845	0,0456
0,0637	0,0872	0,0628	0,0388	0,1067	0,1836	0,0611
0,0221	0,1212	0,1826	0,0951	0,2001	0,0967	0,1178
0,0429	0,2089	0,2362	0,2051	0,2178	0,1211	0,1213
0,0067	0,6634	0,2289	0,0567	0,1929	0,1567	0,1189
0,0623	0,2979	0,0945	0,2056	0,1789	0,0823	0,1301

Tab. 28 zeigt die Prozentzahlen der Synoviozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper TNF- α in der murinen Kniegelenkssynovialmembran positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
X3	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Durasul	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Prolong	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
XPE*	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
p-Werte:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	< 0,0001	< 0,0001	0,004	< 0,0001	< 0,0001	0,012
X3	< 0,0001	1	0,417	0,019	0,669	0,788	0,007
Durasul	< 0,0001	0,417	1	0,124	0,701	0,588	0,059
Prolong	0,004	0,019	0,124	1	0,055	0,038	0,728
XPE*	< 0,0001	0,669	0,701	0,055	1	0,875	0,023
UHMWPE1	< 0,0001	0,788	0,588	0,038	0,875	1	0,015
UHMWPE2	0,012	0,007	0,059	0,728	0,023	0,015	1
Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024							

Tab. 29 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung der murinen Kniegelenkssynovialmembran mit dem Primärantikörper TNF- α

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja
X3	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Durasul	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Prolong	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein
XPE*	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Ja
UHMWPE1	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein

p-Werte:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	< 0,0001	< 0,0001	0,003	< 0,0001	< 0,0001	0,002
X3	< 0,0001	1	0,096	0,005	0,634	0,900	0,006
Durasul	< 0,0001	0,096	1	0,255	0,032	0,073	0,277
Prolong	0,003	0,005	0,255	1	0,001	0,003	0,959
XPE*	< 0,0001	0,634	0,032	0,001	1	0,726	0,001
UHMWPE1	< 0,0001	0,900	0,073	0,003	0,726	1	0,004
UHMWPE2	0,002	0,006	0,277	0,959	0,001	0,004	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024

Tab. 30 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der murinen Kniegelenkssynovialmembran mit den Primärantikörpern IL-1β, IL-6 und TNF-α

PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
0,375	0,875	0,875	0,875	0,875	0,625	0,625
0,125	0,625	0,625	0,875	0,625	0,625	0,625
0,125	0,625	0,625	0,875	0,875	0,875	0,625
0,125	0,625	0,625	0,625	0,875	0,875	0,625
0,125	0,625	0,625	0,625	0,875	0,875	0,875
0,375	0,875	0,625	0,625	0,625	0,375	0,875
0,125	0,875	0,875	0,625	0,625	0,875	0,875
0,125	0,875	0,875	0,625	0,625	0,875	0,875
0,125	0,875	0,625	0,625	0,625	0,875	0,375
0,375	0,625	0,625	0,625	0,875	0,625	0,625
0,375	0,625	0,625	0,625	0,875	0,625	0,625
0,125	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625	0,625
0	0,875	0,625	0,875	0,625	0,875	0,625
0,125	0,875	0,625	0,875	0,625	0,875	0,625
0,375	0,625	0,875	0,625	0,625	0,375	0,875
0,125	0,625	0,625	0,625	0,875	0,875	0,875
0	0,875	0,625	0,625	0,625	0,875	0,375

Tab. 31 zeigt die Prozentzahlen der Gefäße, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper ICAM-1 im murinen Kniegelenkssynovialmembrangewebe positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Signifikante Differenzen:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
X3	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Durasul	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Prolong	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
XPE*	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE1	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
UHMWPE2	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein

p-Werte:							
	PBS	X3	Durasul	Prolong	XPE*	UHMWPE1	UHMWPE2
PBS	1	< 0,0001					
X3	< 0,0001	1	0,275	0,585	1,000	0,873	0,351
Durasul	< 0,0001	0,275	1	0,585	0,275	0,210	0,873
Prolong	< 0,0001	0,585	0,585	1	0,585	0,480	0,700
XPE*	< 0,0001	1,000	0,275	0,585	1	0,873	0,351
UHMWPE1	< 0,0001	0,873	0,210	0,480	0,873	1	0,275
UHMWPE2	< 0,0001	0,351	0,873	0,700	0,351	0,275	1

Bonferroni-korrigiertes Signifikanzniveau: 0,0024

Tab. 32 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Gefäße des murinen Kniegelenkssynovialmembrangewebes mit dem Primärantikörper ICAM-1

IX. Literaturverzeichnis

NIH Consensus Statement on total knee replacement December 8-10, 2003 3 *J Bone Joint Surg Am.* 2004;86-A:1328-1335.

Affatato S, Bersaglia G, Rocchi M et al. Wear behaviour of cross-linked polyethylene assessed in vitro under severe conditions 1. *Biomaterials.* 2005;26:3259-3267.

al-Saffar N, Mah JT, Kadoya Y et al. Neovascularisation and the induction of cell adhesion molecules in response to degradation products from orthopaedic implants 2. *Ann Rheum Dis.* 1995;54:201-208.

Algan SM, Purdon M, Horowitz SM. Role of tumor necrosis factor alpha in particulate-induced bone resorption 2. *J Orthop Res.* 1996;14:30-35.

Ali NN, Jones SJ, Boyde A. Monocyte-enriched cells on calcified tissuesm2. *Anat Embryol (Berl).* 1984;170:169-175.

Anthony PP, Gie GA, Howie CR et al. Localised endosteal bone lysis in relation to the femoral components of cemented total hip arthroplasties 2. *J Bone Joint Surg Br.* 1990;72:971-979.

Archibeck MJ, Jacobs JJ, Roebuck KA et al. The basic science of periprosthetic osteolysis 5. *Instr Course Lect.* 2001;50:185-195.

Aspenberg P, Van d, V. Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening 6. *Clin Orthop Relat Res.* 1998;75-80.

Atkins GJ, Welldon KJ, Holding CA et al. The induction of a catabolic phenotype in human primary osteoblasts and osteocytes by polyethylene particles. *Biomaterials.* 2009;30:3672-3681.

Ayers DC. Maximizing ultra high molecular weight polyethylene performance in total knee replacement. *Instr Course Lect* 2001; 50:421-429.

Azuma Y, Kaji K, Katogi R et al. Tumor necrosis factor-alpha induces differentiation of and bone resorption by osteoclasts 14. *J Biol Chem.* 2000;275:4858-4864.

Baker DA, Bellare A, Pruitt L. The effects of degree of crosslinking on the fatigue crack initiation and propagation resistance of orthopedic-grade polyethylene 1. *J Biomed Mater Res A.* 2003;66:146-154.

Bargel-Schulze. *Werkstoffkunde*. 2000; Springer.

Baumann B, Seufert J, Jakob F et al. Activation of NF-kappaB signalling and TNFalpha-expression in THP-1 macrophages by TiAlV- and polyethylene-wear particles 4. *J Orthop Res*. 2005;23:1241-1248.

Benninghoff A und Drenckhahn D. *Anatomie*, Band I. 17. Auflage, 2008, Urban und Fischer, München - Jena.

Brach Del Prever EM, Bistolfi A, Bracco P et al. UHMWPE for arthroplasty: past or future? 1. *J Orthop Traumatol*. 2009;10:1-8.

Bradford L, Baker D, Ries MD et al. Fatigue crack propagation resistance of highly crosslinked polyethylene 17. *Clin Orthop Relat Res*. 2004 a;68-72.

Bradford L, Baker DA, Graham J et al. Wear and surface cracking in early retrieved highly cross-linked polyethylene acetabular liners 53. *J Bone Joint Surg Am*. 2004 b;86-A:1271-1282.

Buechel FF, Sr., Buechel FF, Jr., Pappas MJ et al. Twenty-year evaluation of meniscal bearing and rotating platform knee replacements 1. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;41-50.

Burian B, Wimmer MA, Kunze J, Sprecher CM, Pennekamp PH, von Engelhardt LV, Diedrich O, Kraft CN. Systemic spread of wear debris - an in-vivo study. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*. 2006; 144(5):539-544.

Callaghan JJ, Insall JN, Greenwald AS et al. Mobile-bearing knee replacement: concepts and results 12. *Instr Course Lect*. 2001;50:431-449.

Callaghan JJ, O'Rourke MR, Saleh KJ. Why knees fail: lessons learned 8. *J Arthroplasty*. 2004;19:31-34.

Callaghan JJ, Squire MW, Goetz DD et al. Cemented rotating-platform total knee replacement. A nine to twelve-year follow-up study 7. *J Bone Joint Surg Am*. 2000;82:705-711.

Calvi LM, Adams GB, Weibreht KW et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche 1. *Nature*. 2003;425:841-846.

Chang CH, Fang HW, Ho YC et al. Chondrocyte acting as phagocyte to internalize polyethylene wear particles and leads to the elevations of osteoarthritis associated NO and PGE2 2. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;369:884-888.

Chapman-Sheath P, Cain S, Bruce WJ, Chung WK, Walsh WR. Surface roughness of the proximal and distal bearing surface of mobile bearing total knee prostheses. *J Arthroplasty* 2002; 17(6):713-717.

Cheng CK, Huang CH, Liau JJ, Huang CH. The influence of surgical malalignment on the contact pressures of fixed and mobile bearing knee prostheses - a biomechanical study. *Clinic Biomech* (Bristol, Avon) 2003; 18(3):231-236.

Chiba J, Rubash HE, Kim KJ et al. The characterization of cytokines in the interface tissue obtained from failed cementless total hip arthroplasty with and without femoral osteolysis 8. *Clin Orthop Relat Res*. 1994;304-312.

Childs LM, Goater JJ, O'Keefe RJ et al. Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis 2. *J Bone Miner Res*. 2001;16:338-347.

Chiu R, Ma T, Smith RL et al. Ultrahigh molecular weight polyethylene wear debris inhibits osteoprogenitor proliferation and differentiation in vitro 18. *J Biomed Mater Res A*. 2009;89:242-247.

Clarke SA, Revell PA. Integrin expression at the bone/biomaterial interface 3. *J Biomed Mater Res*. 2001;57:84-91.

Clohisy JC, Frazier E, Hirayama T et al. RANKL is an essential cytokine mediator of polymethylmethacrylate particle-induced osteoclastogenesis 63. *J Orthop Res*. 2003;21:202-212.

Dalldorf PG, Banas MP, Hicks DG et al. Rate of degeneration of human acetabular cartilage after hemiarthroplasty 1. *J Bone Joint Surg Am*. 1995;77:877-882.

Dexter TM, Allen TD, Lajtha LG. Conditions controlling the proliferation of haemopoietic stem cells in vitro 5. *J Cell Physiol*. 1977;91:335-344.

Digas G, Karrholm J, Thanner J et al. Highly cross-linked polyethylene in cemented THA: randomized study of 61 hips 1. *Clin Orthop Relat Res*. 2003 a;126-138.

Digas G, Thanner J, Nivbrant B et al. Increase in early polyethylene wear after sterilization with ethylene oxide: radiostereometric analyses of 201 total hips 2. *Acta Orthop Scand*. 2003 b;74:531-541.

Drees P, Eckardt A, Gay RE et al. [Molecular pathways in aseptic loosening of orthopaedic endoprosthesis] 2. *Biomed Tech (Berl)*. 2008;53:93-103.

Elke R. [Particle disease. Is tribology a topic in revision surgery?] 9. *Orthopade*. 2001;30:258-265.

Epstein NJ, Bragg WE, Ma T et al. UHMWPE wear debris upregulates mononuclear cell proinflammatory gene expression in a novel murine model of intramedullary particle disease 1. *Acta Orthop*. 2005 a;76:412-420.

Epstein NJ, Warne BA, Spanogle J et al. Interleukin-1 modulates periprosthetic tissue formation in an intramedullary model of particle-induced inflammation 2. *J Orthop Res*. 2005 b;23:501-510.

Fallon MD, Teitelbaum SL, Kahn AJ. Multinucleation enhances macrophage-mediated bone resorption 1. *Lab Invest*. 1983;49:159-164.

Fehring TK, Murphy JA, Hayes TD et al. Factors influencing wear and osteolysis in press-fit condylar modular total knee replacements 13. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;40-50.

Fisher J, McEwen HM, Tipper JL et al. Wear, debris, and biologic activity of cross-linked polyethylene in the knee: benefits and potential concerns. *Clin Orthop Relat Res*. 2004;114-119.

Forster MC. Survival analysis of primary cemented total knee arthroplasty: which designs last? *J Arthroplasty*. 2003;18:265-270.

Fuchs S, Tibesku CO. *Neues in der Knieendoprothetik*. 2003; Darmstadt: Steinkopff Verlag.

Fuller K, Murphy C, Kirstein B et al. TNFalpha potently activates osteoclasts, through a direct action independent of and strongly synergistic with RANKL 6. *Endocrinology*. 2002;143:1108-1118.

Gallo J, Raska M, Mrazek F et al. Bone remodeling, particle disease and individual susceptibility to periprosthetic osteolysis 13. *Physiol Res*. 2008;57:339-349.

Galvin A, Kang L, Tipper J et al. Wear of crosslinked polyethylene under different tribological conditions 2. *J Mater Sci Mater Med*. 2006;17:235-243.

Gencur SJ, Rimnac CM, Kurtz SM. Failure micromechanisms during uniaxial tensile fracture of conventional and highly crosslinked ultra-high molecular weight polyethylenes used in total joint replacements 1. *Biomaterials*. 2003;24:3947-3954.

Gomoll A, Wanich T, Bellare A. J-integral fracture toughness and tearing modulus measurement of radiation cross-linked UHMWPE1. *J Orthop Res*. 2002;20:1152-1156.

Graichen H, Strauch M, Katzhammer T et al. [Ligament instability in total knee arthroplasty--causal analysis] 2. *Orthopade*. 2007;36:650, 652-650, 656.

Graves SE, Davidson D, Ingerson L et al. The Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry 1. *Med J Aust*. 2004;180:S31-S34.

Gray H. Anatomy of the Human Body. <http://www.bartleby.com/107/93.html>. 2007.

Ref Type: Electronic Citation

Green TR, Fisher J, Matthews JB et al. Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles 3. *J Biomed Mater Res*. 2000;53:490-497.

Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A. Regulation of osteoclast activity 2. *Life Sci*. 1999;65:1087-1102.

Griffin WL, Fehring TK, Pomeroy DL et al. Sterilization and wear-related failure in first- and second-generation press-fit condylar total knee arthroplasty 6. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;464:16-20.

Hale LP, Martin ME, McCollum DE et al. Immunohistologic analysis of the distribution of cell adhesion molecules within the inflammatory synovial microenvironment 4. *Arthritis Rheum*. 1989;32:22-30.

Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris 2. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2009;67:182-188.

Heisel C, Silva M, Schmalzried TP. In vivo wear of bilateral total hip replacements: conventional versus crosslinked polyethylene. *Arch Orthop Trauma Surg*. 2005;125:555-557.

Hodrick JT, Severson EP, McAlister DS et al. Highly crosslinked polyethylene is safe for use in total knee arthroplasty 1. *Clin Orthop Relat Res*. 2008;466:2806-2812.

Holding CA, Findlay DM, Stamenkov R et al. The correlation of RANK, RANKL and TNFalpha expression with bone loss volume and polyethylene wear debris around hip implants 1. *Biomaterials*. 2006;27:5212-5219.

Holt G, Murnaghan C, Reilly J et al. The biology of aseptic osteolysis 3. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;460:240-252.

Hood RW, Wright TM, Burstein AH. Retrieval analysis of total knee prostheses: a method and its application to 48 total condylar prostheses. *J Biomed Mater Res* 1983; 17(5):829-842.

Horwitz MD, Awan S, Chatoo MB et al. An 8- to 10-year review of the Rotaglide total knee replacement 1. *Int Orthop.* 2009;33:111-115.

Huang CH, Ho FY, Ma HM et al. Particle size and morphology of UHMWPE wear debris in failed total knee arthroplasties--a comparison between mobile bearing and fixed bearing knees 13. *J Orthop Res.* 2002;20:1038-1041.

Huang CH, Liau JJ, Cheng CK. Fixed or mobile-bearing total knee arthroplasty. *J Orthop Surg Res.* 2007;2:1.

Huang CH, Ma HM, Lee YM et al. Long-term results of low contact stress mobile-bearing total knee replacements 8. *Clin Orthop Relat Res.* 2003;265-270.

Huang CH, Ma HM, Liau JJ et al. Late dislocation of rotating platform in New Jersey Low-Contact Stress knee prosthesis 8. *Clin Orthop Relat Res.* 2002;189-194.

Ilgen RL, Bauer LM, Hotujec BT et al. Highly crosslinked vs conventional polyethylene particles: relative in vivo inflammatory response 1. *J Arthroplasty.* 2009;24:117-124.

Ilgen RL, Forsythe TM, Pike JW et al. Highly crosslinked vs conventional polyethylene particles--an in vitro comparison of biologic activities2. *J Arthroplasty.* 2008;23:721-731.

Ingham E, Fisher J. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials.* 2005;26:1271-1286.

Ingram JH, Stone M, Fisher J et al. The influence of molecular weight, crosslinking and counterface roughness on TNF-alpha production by macrophages in response to ultra high molecular weight polyethylene particles 1. *Biomaterials.* 2004;25:3511-3522.

Iwakiri K, Minoda Y, Kobayashi A et al. In vivo comparison of wear particles between highly crosslinked polyethylene and conventional polyethylene in the same design of total knee arthroplasties 6. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2009;91:799-804.

Jackson M, Sarangi PP, Newman JH. Revision total knee arthroplasty. Comparison of outcome following primary proximal tibial osteotomy or unicompartmental arthroplasty 14. *J Arthroplasty.* 1994;9:539-542.

Jacobs JJ, Roebuck KA, Archibeck M et al. Osteolysis: basic science 1. *Clin Orthop Relat Res.* 2001;71-77.

Jacobs W, Anderson P, Limbeek J et al. Mobile bearing vs fixed bearing prostheses for total knee arthroplasty for post-operative functional status in patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis 22. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;CD003130.

Jacofsky DJ. Highly cross-linked polyethylene in total knee arthroplasty: in the affirmative 3. *J Arthroplasty*. 2008;23:28-30.

Jerosch J, Heisel J. *Knieendoprothetik*. Springer Verlag 1999, Berlin - Heidelberg.

Kaufmann AM, Alabre CI, Rubash HE, Shanbhag AS. Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays. *J Biomed Mater Res A* 2008; 84(2):464-474.

Kim KJ, Rubash HE, Wilson SC et al. A histologic and biochemical comparison of the interface tissues in cementless and cemented hip prostheses 14. *Clin Orthop Relat Res*. 1993;142-152.

Kim YH, Kook HK, Kim JS. Comparison of fixed-bearing and mobile-bearing total knee arthroplasties 2. *Clin Orthop Relat Res*. 2001;101-115.

Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction 1. *J Exp Med*. 2000;191:275-286.

Koch AE, Burrows JC, Haines GK et al. Immunolocalization of endothelial and leukocyte adhesion molecules in human rheumatoid and osteoarthritic synovial tissues 4. *Lab Invest*. 1991;64:313-320.

Kohn D, Rupp S. Allo-arthroplasty of the knee joint. *Orthopäde* 1999; 28(11):975-995.

Koreny T, Tunyogi-Csapo M, Ga'li, Vermes C, Jacobs JJ, Giant TT. The Role of Fibroblasts and Fibroblast-derived Factors in Periprosthetic Osteolysis. *Arthritis and Rheumatism* 2006; 54(10):3321-3232.

Kouba DJ, Chung KY, Nishiyama T et al. Nuclear factor-kappa B mediates TNF-alpha inhibitory effect on alpha 2(I) collagen (COL1A2) gene transcription in human dermal fibroblasts 1. *J Immunol*. 1999;162:4226-4234.

Krukenmeyer, Möllenhoff. *Endoprothetik Leitfäden für Praktiker*. 2009; Berlin: Walter de Gruyter GmbH & Co KG.

Kurtz SM. The UHMWPE Handbook - ultra high molecular weight polyethylene in total joint replacement. Elsevier Academic Press. 2004.

Landgraeb S, von KM, Loer F et al. Association between apoptosis and CD4(+)CD8(+) T-lymphocyte ratio in aseptic loosening after total hip replacement. *Int J Biol Sci.* 2009;5:182-191.

Lee SE, Chung WJ, Kwak HB et al. Tumor necrosis factor-alpha supports the survival of osteoclasts through the activation of Akt and ERK 6. *J Biol Chem.* 2001;276:49343-49349.

Lemischka IR. Microenvironmental regulation of hematopoietic stem cells 4. *Stem Cells.* 1997;15 Suppl 1:63-68.

Lemischka IR, Moore KA. Stem cells: interactive niches 1. *Nature.* 2003;425:778-779.

Leung SB, Egawa H, Stepniewski A et al. Incidence and volume of pelvic osteolysis at early follow-up with highly cross-linked and noncross-linked polyethylene 2. *J Arthroplasty.* 2007;22:134-139.

Lewis G. Polyethylene wear in total hip and knee arthroplasties. *J Biomed Mater Res* 1997; 38 (1): 55-75.

Libouhan H, Massin P, Gaudin C, Mercier P, Basle MF, Chappard D. Migration of wear debris of polyethylene depends on bone microarchitecture. *J Biomed Mater Res B. Appl Biomater* 2009; 90:730-737.

Lippert, Lehrbuch Anatomie, 6. Auflage 2003, Urban und Fischer Verlag, München - Jena

Ma T, Huang Z, Ren PG et al. An in vivo murine model of continuous intramedullary infusion of polyethylene particles. *Biomaterials.* 2008;29:3738-3742.

Manolagas SC. The role of IL-6 type cytokines and their receptors in bone 7. *Ann N Y Acad Sci.* 1998;840:194-204.

Mapp PI, Revell PA. Fibronectin production by synovial intimal cells 43. *Rheumatol Int.* 1985;5:229-237.

Martell JM, Verner JJ, Incavo SJ. Clinical performance of a highly cross-linked polyethylene at two years in total hip arthroplasty: a randomized prospective trial 1. *J Arthroplasty.* 2003;18:55-59.

Massin P, Chappard D, Flautre B, Hardouin P. Migration of polyethylene particles around nonloosend cemented femoral components from a total hip arthroplasty - an autopsy study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2004; 69:205-215.

Matthews JB, Green TR, Stone MH et al. Comparison of the response of primary murine peritoneal macrophages and the U937 human histiocytic cell line to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles 124. *Biomed Mater Eng*. 2000;10:229-240.

Mayston V, Mapp PI, Davies PG et al. Fibronectin in the synovium of chronic inflammatory joint disease. *Rheumatol Int*. 1984;4:129-133.

McEwen HM, Barnett PI, Bell CJ et al. The influence of design, materials and kinematics on the in vitro wear of total knee replacements 1. *J Biomech*. 2005;38:357-365.

McEwen HM, Fisher J, Goldsmith AA, Auger DD, Hardacker C, Stone MH. Wear of fixed bearing and rotating platform mobile bearing knees subjected to high levels of internal and external tibial rotation. *J Mater Sci Mater Med* 2001; 12(10-12):1049-1052.

McKellop H, Shen FW, Lu B et al. Development of an extremely wear-resistant ultra high molecular weight polyethylene for total hip replacements 7. *J Orthop Res*. 1999;17:157-167.

McKellop H, Shen FW, Lu B et al. Effect of sterilization method and other modifications on the wear resistance of acetabular cups made of ultra-high molecular weight polyethylene. A simulator study. 1. *J Bone Joint Surg Am*. 2000;82A:1708-1725

McKellop HA. The lexicon of polyethylene wear in artificial joints 2. *Biomaterials*. 2007;28:5049-5057.

Medel FJ, Pena P, Cegonino J et al. Comparative fatigue behavior and toughness of remelted and annealed highly crosslinked polyethylenes 1. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2007;83:380-390.

Merkel KD, Erdmann JM, McHugh KP et al. Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis 37. *Am J Pathol*. 1999;154:203-210.

Minoda Y, Aihara M, Sakawa A et al. Comparison between highly cross-linked and conventional polyethylene in total knee arthroplasty 7. *Knee*. 2009;16:348-351.

Minoda Y, Kobayashi A, Sakawa A et al. Wear particle analysis of highly crosslinked polyethylene isolated from a failed total hip arthroplasty 4. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;86B:501-505.

Mundy CR, Altman AJ, Gondek MD et al. Direct resorption of bone by human monocytes 1. *Science*. 1977;196:1109-1111.

Muratoglu OK, Bragdon CR, Jasty M et al. Knee-simulator testing of conventional and cross-linked polyethylene tibial inserts 31. *J Arthroplasty*. 2004;19:887-897.

Muratoglu OK, Bragdon CR, O'Connor DO et al. A novel method of cross-linking ultra-high-molecular-weight polyethylene to improve wear, reduce oxidation, and retain mechanical properties. Recipient of the 1999 HAP Paul Award. *J Arthroplasty*. 2001;16:149-160.

Muratoglu OK, Bragdon CR, O'Connor DO et al. Aggressive wear testing of a cross-linked polyethylene in total knee arthroplasty 1. *Clin Orthop Relat Res*. 2002;89-95.

Muratoglu OK, Mark A, Vittetoe DA et al. Polyethylene damage in total knees and use of highly crosslinked polyethylene 7. *J Bone Joint Surg Am*. 2003;85-A Suppl 1:S7-S13.

Muratoglu OK, Merrill EW, Bragdon CR et al. Effect of radiation, heat, and aging on in vitro wear resistance of polyethylene 35. *Clin Orthop Relat Res*. 2003;253-262.

Muratoglu OK, Rubash HE, Bragdon CR et al. Simulated normal gait wear testing of a highly cross-linked polyethylene tibial insert 5. *J Arthroplasty*. 2007;22:435-444.

Murphy K, Travers P, Walport M. *Janeway Immunologie*. 7. Auflage, 2009; Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

Naudie DD, Ammeen DJ, Engh GA et al. Wear and osteolysis around total knee arthroplasty 2. *J Am Acad Orthop Surg*. 2007;15:53-64.

Naudie DD, Rorabeck CH. Sources of osteolysis around total knee arthroplasty: wear of the bearing surface 4. *Instr Course Lect*. 2004;53:251-259.

Neale SD, Athanasou NA. Cytokine receptor profile of arthroplasty macrophages, foreign body giant cells and mature osteoclasts 1. *Acta Orthop Scand*. 1999;70:452-458.

Oral E, Malhi AS, Muratoglu OK. Mechanisms of decrease in fatigue crack propagation resistance in irradiated and melted UHMWPE 14. *Biomaterials*. 2006;27:917-925.

Oral E, Wannomae KK, Hawkins N, Harris WH, Muratoglu OK. Alpha-tocopherol-doped irradiated UHMWPE for high fatigue resistance and low wear. *Biomaterials* 2004; 25(24):5515-5522.

Oral E, Wannomae KK, Rowell SL, Muratoglu OK. Diffusion of vitamin E in ultra-high-molecular weight polyethylene. *Biomaterials* 2007; 28(35):5225-5237.

Otto M, Bittinger F, Kriegsmann J et al. Differential adhesion of polymorphous neutrophilic granulocytes to macro- and microvascular endothelial cells under flow conditions 2. *Pathobiology*. 2001;69:159-171.

Otto M, Kriegsmann J, Gehrke T et al. [Wear particles: key to aseptic prosthetic loosening?] 22. *Pathologe*. 2006;27:447-460.

Pollock LE, Lalor P, Revell PA. Type IV collagen and laminin in the synovial intimal layer: an immunohistochemical study. *Rheumatol Int*. 1990;9:277-280.

Price AJ, Rees JL, Beard D et al. A mobile-bearing total knee prosthesis compared with a fixed-bearing prosthesis. A multicentre single-blind randomised controlled trial 1. *J Bone Joint Surg Br*. 2003;85:62-67.

Punt IM, Cleutjens JP, de BT et al. Periprosthetic tissue reactions observed at revision of total intervertebral disc arthroplasty 2. *Biomaterials*. 2009;30:2079-2084.

Purdue PE, Koulouvaris P, Nestor BJ et al. The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis 2. *HSS J*. 2006;2:102-113.

Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG et al. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis 5. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;454:251-261.

Quinn JM, Sabokbar A, Athanasou NA. Cells of the mononuclear phagocyte series differentiate into osteoclastic lacunar bone resorbing cells 5. *J Pathol*. 1996;179:106-111.

Ren W, Markel DC, Schwendener R et al. Macrophage depletion diminishes implant-wear-induced inflammatory osteolysis in a mouse model. *J Biomed Mater Res A*. 2008;85:1043-1051.

Ren W, Wu B, Peng X et al. Implant wear induces inflammation, but not osteoclastic bone resorption, in RANK(-/-) mice. *J Orthop Res*. 2006;24:1575-1586.

Ren W, Yang SY, Wooley PH. A novel murine model of orthopaedic wear-debris associated osteolysis. *Scand J Rheumatol*. 2004;33:349-357.

Ren WP, Markel DC, Zhang R et al. Association between UHMWPE particle-induced inflammatory osteoclastogenesis and expression of RANKL, VEGF, and Flt-1 in vivo 2. *Biomaterials*. 2006;27:5161-5169.

Revell PA. The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses 1. *J R Soc Interface*. 2008;5:1263-1278.

Revell PA, Jellie SE. Interleukin 15 production by macrophages in the implant interface membrane of aseptically loosened joint replacements 14. *J Mater Sci Mater Med*. 1998;9:727-730.

Ridgeway SR, McAuley JP, Ammeen DJ et al. The effect of alignment of the knee on the outcome of unicompartmental knee replacement 1. *J Bone Joint Surg Br*. 2002;84:351-355.

Ries MD. Highly cross-linked polyethylene: the debate is over--in opposition 5 200. *J Arthroplasty*. 2005 a;20:59-62.

Ries MD, Pruitt L. Effect of cross-linking on the microstructure and mechanical properties of ultra-high molecular weight polyethylene 1 201. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 b;440:149-156.

Robertsson O, Knutson K, Lewold S et al. The Swedish Knee Arthroplasty Register 1975 1997: an update with special emphasis on 41,223 knees operated on in 1988-1997 1. *Acta Orthop Scand*. 2001;72:503-513.

Rodriguez JA. Cross-linked polyethylene in total knee arthroplasty: in opposition 11. *J Arthroplasty*. 2008;23:31-34.

Sabokbar A, Rushton N. Role of inflammatory mediators and adhesion molecules in the pathogenesis of aseptic loosening in total hip arthroplasties 1. *J Arthroplasty*. 1995;10:810-816.

Sacomen D, Smith RL, Song Y et al. Effects of polyethylene particles on tissue surrounding knee arthroplasties in rabbits 1. *J Biomed Mater Res*. 1998;43:123-130.

Sathasivam S, Walker PS, Campbell PA et al. The effect of contact area on wear in relation to fixed bearing and mobile bearing knee replacements 2. *J Biomed Mater Res*. 2001;58:282-290.

Schmalzried TP, Campbell P, Schmitt AK, Brown IC, Amstutz HC. Shapes and dimensional characteristics of polyethylene wear particles generated in vivo by total knee replacements compared to total hip replacements. *J Biomed Mater Res* 1997; 38(3):203-210.

Schwarz EM, Looney RJ, O'Keefe RJ. Anti-TNF-alpha therapy as a clinical intervention for periprosthetic osteolysis 4. *Arthritis Res*. 2000;2:165-168.

Scott RD. *Totale Kniearthroplastik*. 2007; München, Jena: ELSEVIER GmbH, URBAN&FISCHER Verlag.

Sethi RK, Neavyn MJ, Rubash HE et al. Macrophage response to cross-linked and conventional UHMWPE 1. *Biomaterials*. 2003;24:2561-2573.

Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J et al. Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area. *J Biomed Mater Res*. 1994;28:81-90.

Shen FW, McKellop H. Surface-gradient cross-linked polyethylene acetabular cups: oxidation resistance and wear against smooth and rough femoral balls 1 202. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;80-88.

Simis KS, Bistolfi A, Bellare A et al. The combined effects of crosslinking and high crystallinity on the microstructural and mechanical properties of ultra high molecular weight polyethylene 1. *Biomaterials*. 2006;27:1688-1694.

Smith RA, Hallab NJ. In vitro macrophage response to polyethylene and polycarbonate-urethane particles. *J Biomed Mater Res A*. 2009.

Sobieraj MC, Rimnac CM. Ultra high molecular weight polyethylene: mechanics, morphology, and clinical behavior 2. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2009;2:433-443.

Stea S, Visentin M, Granchi D et al. Cytokines and osteolysis around total hip prostheses 1. *Cytokine*. 2000;12:1575-1579.

Stea S, Visentin M, Granchi D et al. Wear debris and cytokine production in the interface membrane of loosened prostheses 5. *J Biomater Sci Polym Ed*. 1999;10:247-257.

Streicher RM, Thomsen M. [Polyethylene as an implant material] 3. *Orthopade*. 2003;32:23-31.

Tamaki Y, Sasaki K, Sasaki A et al. Enhanced osteolytic potential of monocytes/macrophages derived from bone marrow after particle stimulation 1. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2008;84:191-204.

Tamura J, Clarke IC, Kawanabe K et al. Micro-wear patterns on UHMWPE tibial inserts in total knee joint simulation. *J Biomed Mater Res* 2002; 61(2):218-225.

Tanabe N, Maeno M, Suzuki N et al. IL-1 alpha stimulates the formation of osteoclast-like cells by increasing M-CSF and PGE2 production and decreasing OPG production by osteoblasts. *Life Sci*. 2005;77:615-626.

Tuan RS, Lee FY, Kontinen T et al. What are the local and systemic biologic reactions and mediators to wear debris, and what host factors determine or modulate the biologic response to wear particles? 6. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008;16 Suppl 1:S42-S48.

Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilovic J, Black J, Peroch M. Dissemination of wear particles to the liver, spleen and abdominal lymph nodes of patients with hip and knee replacement. *J Bone Joint Surg* 2000; 82-A (4):457-477.

Utzschneider S, Harrasser N, Schroeder C et al. Wear of contemporary total knee replacements--a knee simulator study of six current designs. *Clin Biomech (Bristol , Avon)* 2009 a;24:583-588.

Utzschneider S, Paulus A, Datz JC et al. Influence of design and bearing material on polyethylene wear particle generation in total knee replacement 4. *Acta Biomater.* 2009 b ;5:2495-2502.

Utzschneider S, Habilitationsschrift 2010, LMU.

Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ et al. The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts 6. *J Bone Joint Surg Am.* 2001;83-A:201-211.

Vermes C, Roebuck KA, Chandrasekaran R et al. Particulate wear debris activates protein tyrosine kinases and nuclear factor kappaB, which down-regulates type I collagen synthesis in human osteoblasts 2. *J Bone Miner Res.* 2000;15:1756-1765.

Vigorita. *Orthopaedic Pathology.* Second edition, 2008. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.

Vollmar A, Dingermann T. *Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe.* 2005; Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Wang A, Yau SS, Essner A et al. A highly crosslinked UHMWPE for CR and PS total knee arthroplasties. *J Arthroplasty.* 2008;23:559-566.

Wei S, Kitaura H, Zhou P et al. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *J Clin Invest.* 2005;115:282-290.

Welsch U. Sobotta - Lehrbuch Histologie. 2. Auflage, 2006. Urban und Fischer, München - Jena

Wilke A, Bartsch I, Kratz M et al. [Cytokine profile of a human bone marrow cell culture under the influence of UHMW-PE wear particles] 4. *Biomed Tech (Berl)*. 2005;50:330-336.

Wimmer MA, Andriacchi TP, Natarajan RN et al. A striated pattern of wear in ultrahigh-molecular-weight polyethylene components of Miller-Galante total knee arthroplasty 3. *J Arthroplasty*. 1998;13:8-16.

Wimmer MA. Wear of the Polyethylene Component Created by Rolling Motion of the Artificial Knee Joint. Shaker, Aachen; 2000.

Wooley PH, Morren R, Andary J et al. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch 51. *Biomaterials*. 2002;23:517-526.

Wooley PH, Schwarz EM. Aseptic loosening 10. *Gene Ther*. 2004;11:402-407.

Wright TM. Polyethylene in knee arthroplasty: what is the future? 5. *Clin Orthop Relat Res*. 2005;440:141-148.

Xu JW, Konttinen YT, Lassus J et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in loosening of total hip replacement (THR) 1. *Clin Exp Rheumatol*. 1996;14:643-648.

Yang SY, Ren W, Park Y et al. Diverse cellular and apoptotic responses to variant shapes of UHMWPE particles in a murine model of inflammation 1. *Biomaterials*. 2002;23:3535-3543.

Yang SY, Wu B, Mayton L et al. Protective effects of IL-1Ra or vIL-10 gene transfer on a murine model of wear debris-induced osteolysis. *Gene Ther*. 2004;11:483-491.

Yang SY, Yu H, Gong W et al. Murine model of prosthesis failure for the long-term study of aseptic loosening. *J Orthop Res*. 2007;25:603-611.

Zhang J, Niu C, Ye L et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size 1. *Nature*. 2003;425:836-841.

Zhang YH, Heulsmann A, Tondravi MM et al. Tumor necrosis factor-alpha (TNF) stimulates RANKL-induced osteoclastogenesis via coupling of TNF type 1 receptor and RANK signaling pathways 32. *J Biol Chem*. 2001;276:563-568.

Zwerina J, Hayer S, Tohidast-Akrad M et al. Single and combined inhibition of tumor necrosis factor, interleukin-1, and RANKL pathways in tumor necrosis factor-induced arthritis: effects on synovial inflammation, bone erosion, and cartilage destruction 7. *Arthritis Rheum*. 2004;50:277-290.

Zysk SP, Gebhard H, Plitz W et al. Influence of orthopedic particulate biomaterials on inflammation and synovial microcirculation in the murine knee joint 1. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;71:108-115.

Zysk SP, Gebhard HH, Kalteis T et al. Particles of all sizes provoke inflammatory responses in vivo 1. *Clin Orthop Relat Res.* 2005;258-264.

Zysk SP, Gebhard HH, Pellengahr C et al. [Inflammatory responses to wear particles in vivo: a novel model in the murine knee joint] 7. *Orthopade.* 2003;32:305-311.

X. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Anatomie des Kniegelenks (Gray 2007)

Abb. 2: Histologischer Aufbau eines Gelenks. Zu sehen sind subchondrales Knochengewebe, hyaliner Gelenkknorpel, sowie der Aufbau der Synovialmembran mit A-, B- und Fettzellen sowie Blutgefäßen (Welsch 2006)

Abb. 3: Schematische Übersicht der verschiedenen Prothesenmodelle (Kohn und Rupp 1999)

Abb. 4: Struktur eines Polyethylenmoleküls (Bargel-Schulze 2000)

Abb. 5: Semikristalline Struktur des Polymers UHMWPE (Kurtz 2004)

Abb. 6: Verwendete bikondyläre Knieprothesenmodelle [A) aus <http://www.stryker.de>; B) und C) aus <http://www.zimmergermany.de>; D) aus <http://www.kneereplacement.com/DePuy>]

Abb. 7: Rasterelektronenmikroskopische Bilder von Polyethylen-Inlays mit (A) Originaloberfläche, (B) Kratzern, (C) polierten Oberflächenanteilen und (D) Abrasion (aus dem Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie, Ludwig-Maximilians-Universität, München)

Abb. 8: Schematische Darstellung der die Entstehung aseptischer Osteolysen im Bereich künstlicher Gelenke vermittelnden Signalkaskaden einschließlich der beteiligten Zellen sowie der proinflammatorischen Mediatoren (Purdue et al. 2007)

Abb. 9: Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion mit transendothelialer Migration (Welsch 2006)

Abb. 10: Rasterelektronenmikroskopische Bilder der Abriebpartikel der verschiedenen Knieprothesendesigns (A=X3, B=Durasul, C=Prolong, D=XPE*, E=UHMWPE1, F=UHMWPE2, Originalvergrößerung: 5.000- und 10.000-fach) (Utzschneider et al. 2009b)

Abb. 11: Graphische Darstellung der direkten (A) und indirekten (B) immunhistochemischen Färbemethoden (Murphy 2009)

Abb. 12: Graphische Darstellung der immunhistochemischen (Strept-) Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Färbemethode (Murphy 2009)

Abb. 23 zeigt die nicht signifikant ($p > 0,0024$) vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 2*) von IL-1 β in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) im murinen Gelenkknorpel 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion.

Abb. 14 zeigt mit IL-1 β gefärbte Präparate des murinen Kniegelenkknorpels der Kontrollgruppe sowie der Versuchsgruppen X3-UHMWPE2. In Abb. 14K und A-F sind sowohl negative als auch positive, rot angefärbte Chondrozyten zu erkennen. Die Anzahl der positiven Knorpelzellen ist in allen Präparaten vergleichbar.

Vergrößerung K und A-F: 200x

Abb. 15 zeigt die nicht signifikant ($p > 0,0024$) vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 4*) von IL-6 im murinen Gelenkknorpel in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage

nach intraartikulärer Partikelinjektion. Ein signifikanter Unterschied bestand nur zwischen den Gruppen X3 und Prolong ($p = 0,002$)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ($p = 0,002$)

Abb. 16 zeigt mit IL-6 gefärbte Präparate des murinen Kniegelenkknorpels der Kontrollgruppe K sowie der Versuchsgruppen A und B.

In Abb. 16K sind vor allem negative Chondrozyten zu erkennen, wobei in Abb. 16A und B positive, rot angefärbte Chondrozyten gekennzeichnet sind. Die Anzahl der positiven Knorpelzellen ist jedoch gering.

Vergrößerung K, A, B: 200x

Abb. 17 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 6*) von TNF- α im murinen Gelenkknorpel in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion. Zwischen den Versuchsgruppen unterschieden sich nur X3 und Durasul signifikant von Prolong (p-Werte siehe Tabelle 6*).

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 6*)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (p-Werte siehe Tab. 6*)

Abb. 18 zeigt mit TNF- α gefärbte Präparate des murinen Kniegelenkknorpels der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A,B,D und F. In den Abb. 18A,B,D und F sind negative und positive, rot angefärbte Chondrozyten zu erkennen. Auffällig ist, dass in Abb. 18A und B im Vergleich zu den anderen Präparaten eine höhere Anzahl an positiven Knorpelzellen zu sehen ist.

Vergrößerung K und A-D: 200x, Vergrößerung F:400x

Abb. 19 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 7*) von IL-1 β , IL-6 und TNF- α im murinen Gelenkknorpel aller Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion. Zwischen den Versuchsgruppen unterschieden sich nur X3 und Durasul signifikant von Prolong (p-Werte siehe Tab. 7*).

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 7*)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (p-Werte siehe Tab. 7*)

Abb. 20 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 9*) von IL-1 β in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) im murinen Knochenmark 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 9*)

Abb. 21 zeigt die mit IL-1 β gefärbten Präparate des Knochenmarks des murinen Kniegelenks der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A-F.

Vergrößerung K+A-F: 400x

Abb. 22 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 11*) von IL-6 in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) im murinen Knochenmark 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe ($p = 0,000$)

Abb. 23 zeigt mit IL-6 gefärbte Präparate des Knochenmarks muriner Kniegelenke der Kontrollgruppe K sowie der Versuchsgruppen C und D. In Abb. 23D sind deutlich die positiven, rot angefärbten Knochenmarkszellen zu sehen, während in Abb. 23K und C die negativen Zellen überwiegen.

Vergrößerung K,C,D: 400x

Abb. 24 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 13*) von TNF- α im murinen Knochenmark aller Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 13*)

Abb. 25 zeigt mit TNF- α gefärbte Präparate des Knochenmarks muriner Kniegelenke der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A-F. In allen Präparaten der Abb. 25K und A-F sind positive, rot angefärbte Knochenmarkszellen zu sehen. Es fällt jedoch auf, dass in der Kontrollgruppe K und in der UHMWPE2-Gruppe (Abb. 25F) weniger positive Zellen zu erkennen sind als in Abb. 25A-E.

Vergrößerung K+B+E: 200x, Vergrößerung A+C+D+F: 400x

Abb. 26 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 14*) von IL-1 β , IL-6 und TNF- α im murinen Knochenmark aller Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 14*)

Abb. 27 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 16*) von IL-1 β in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) in der murinen Kniegelenkssynovialmembran. Zwischen den Versuchsgruppen war lediglich bei Prolong und XPE* ein signifikanter Unterschied ($p = 0,001$) vorhanden.

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 16*)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (p-Werte siehe Tab. 16*)

Abb. 28 zeigt die mit IL-1 β gefärbten Präparate der Synovialmembran muriner Kniegelenke der Kontrollgruppe K sowie der Versuchsgruppen A und D (K=Kontrolle, A=X3, D=XPE*). In Abb. 28K sind negative Synovialzellen gekennzeichnet, während in Abb. 28A+D positive, rot angefärbte Synoviozyten und eine Proliferation der Synovialmembran zu erkennen sind. Vergrößerung K: 400x Vergrößerung A+D: 1000x

Abb. 29 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 18*) von IL-6 in der murinen Kniegelenkssynovialmembran in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS).

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 18*)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (p-Werte siehe Tab. 18*)

Abb. 30 zeigt mit IL-6 gefärbte Präparate der Synovialmembran muriner Kniegelenke der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A-F.

In Abb. 30K sind negative Synovialzellen zu sehen, während in den Abb. 30A-F positive, rot angefärbte Synoviozyten erkennbar sind.

Vergrößerung K: 400x, Vergrößerung A+D: 1000x, Vergrößerung B+C+E+F: 200x

Abb. 31 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 20) von TNF- α in der murinen Kniegelenkssynovialis in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS).

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 20)

Abb. 32 zeigt mit TNF- α gefärbte Präparate der Synovialmembran muriner Kniegelenke der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A-F.

Abb. 32K stellt einen Ausschnitt aus der Synovialmembran eines Kontrollpräparates mit negativen Synoviozyten dar. In den Abb. 32A-F sind positive, rot angefärbte Synovialzellen gekennzeichnet.

Vergrößerung K+D: 200x, Vergrößerung A-F: 1000x

Abb. 33 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 23*) von IL-1 β , IL-6 und TNF- α in der murinen Kniegelenkssynovialmembran aller Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS) 7 Tage nach intraartikulärer Partikelinjektion. Zwischen den Versuchsgruppen bestand nur bei Prolong und XPE* ein signifikanter Unterschied ($p = 0,001$)

* = signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 23*)

= signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen ($p = 0,001$)

Abb. 34 zeigt die vermehrte Expression (p-Werte siehe Tab. 25*) von ICAM-1 in den Gefäßen der murinen Kniegelenkssynovialmembran in allen Versuchsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe (PBS).

* = signifikant gegenüber der Kontrollgruppe (p-Werte siehe Tab. 25*)

Abb. 35 zeigt mit ICAM-1 gefärbte Präparate des Synovialmembrangewebes muriner Kniegelenke der Kontrollgruppe K sowie aller Versuchsgruppen A-F.

In Abb. 35K sind vor allem negative Gefäße zu sehen. Die Abb. 35A-F zeigen hingegen zahlreiche positive Gefäße und auch eine im Vergleich zur Kontrolle höhere Anzahl an Gefäßen im Synovialmembrangewebe.

Vergrößerung K: 400x und A-F: 200x

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Übersicht der verwendeten Polyethylenen, des Herstellungsverfahrens dieser sowie des Designs und der Materialkombination der entsprechenden vom Hersteller empfohlenen Prothese

*) Experimentelle Kombination, nicht kommerziell erhältlich

Tab. 2: Schwedisches Knieprothesenregister 1975–1997: Indikationen für primäre Revisionsoperationen von Knieendoprothesen von 1988 bis 1997 (Median der Prothesenstandzeit = 45 Monate) (Robertsson et al. 2007)

Tab. 3: Antikörper und Seren

Tab. 4: Allgemeine Reagenzien

Tab. 5: Verbrauchsmaterialien

Tab. 6: Geräte

Tab. 7: Färbeprotokoll (Teil 1) für die immunhistochemischen Untersuchungen mit IL-1 β , IL-6, TNF- α und ICAM-1

Tab. 8: Färbeprotokoll (Teil 2) für die immunhistochemischen Untersuchungen mit IL-1 β , IL-6, TNF- α und ICAM-1

Tab. 9: Exemplarische Darstellung der Bildtabellen in Punkt V

Tab. 30 zeigt die Prozentzahlen der Chondrozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-1 β im murinen Gelenkknorpel positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Tab. 11 zeigt die nicht signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Gelenkknorpels mit dem Primärantikörper IL-1 β

Tab. 12 zeigt die Prozentzahlen der Chondrozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-6 im murinen Gelenkknorpel positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Tab. 13 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Gelenkknorpels mit dem Primärantikörper IL-6

Tab. 14 zeigt die Prozentzahlen der Chondrozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper TNF- α im murinen Gelenkknorpel positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Tab. 15 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Gelenkknorpels mit dem Primärantikörper TNF- α

Tab. 16 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des murinen Gelenkknorpels mit den Primärantikörpern IL-1 β , IL-6 und TNF- α

Tab. 17 zeigt die Prozentzahlen der Zellen, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-1 β im murinen Knochenmark positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Tab. 18 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Knochenmarks mit dem Primärantikörper IL-1 β

Tab. 19 zeigt die Prozentzahlen der Zellen, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-6 im murinen Knochenmark positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Tab. 20 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Knochenmarks mit dem Primärantikörper IL-6

Tab. 21 zeigt die Prozentzahlen der Zellen, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper TNF- α im murinen Knochenmark positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Tab. 22 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung des murinen Knochenmarks mit dem Primärantikörper TNF- α

Tab. 23 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen des murinen Knochenmarks mit den Primärantikörpern IL-1 β , IL-6 und TNF- α

Tab. 24 zeigt die Prozentzahlen der Synoviozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-1 β in der murinen Kniegelenkssynovialmembran positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Tab. 25 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung der murinen Kniegelenkssynovialmembran mit dem Primärantikörper IL-1 β

Tab. 26 zeigt die Prozentzahlen der Synoviozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper IL-6 in der murinen Kniegelenkssynovialmembran positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Tab. 27 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung der murinen Kniegelenkssynovialmembran mit dem Primärantikörper IL-6

Tab. 28 zeigt die Prozentzahlen der Synoviozyten, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper TNF- α in der murinen Kniegelenkssynovialmembran positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Tab. 29 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung der murinen Kniegelenkssynovialmembran mit dem Primärantikörper TNF- α

Tab. 30 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbungen der murinen Kniegelenkssynovialmembran mit den Primärantikörpern IL-1 β , IL-6 und TNF- α

Tab. 31 zeigt die Prozentzahlen der Gefäße, die bei der Färbung mit dem Primärantikörper ICAM-1 im murinen Kniegelenkssynovialmembrangewebe positiv reagierten, wobei sich die Werte 1-8 auf den ersten Färbedurchlauf und die Werte 9-16 auf die zweite Färbung beziehen

Tab. 32 zeigt die signifikanten Differenzen und entsprechenden p-Werte der statistischen Auswertung der immunhistochemischen Färbung der Gefäße des murinen Kniegelenkssynovialmembrangewebes mit dem Primärantikörper ICAM-1

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei **Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson**, Direktor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die Überlassung des Themas und seiner Unterstützung dieser Dissertation bedanken.

Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Betreuerin **Frau PD Dr. med. S. Utzschneider**, Orthopädische Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München, die mir diese Dissertation ermöglichte und mich herzlich und offen in ihre Arbeitsgruppe aufnahm. Mit ihrer großen Erfahrung, ihrer unermüdlichen Unterstützung und vielen Anregungen stand sie mir stets zur Seite und ermöglichte mir wissenschaftliches Arbeiten auch über den Rahmen der Dissertation hinaus.

Bedanken möchte ich mich außerdem bei der Biologin **Frau Dr. rer. nat. B. Sievers**, Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die freundliche Aufnahme und Einführung in das Labor und die Unterstützung bei den immunhistochemischen Färbungen und Auswertungen meiner Dissertation.

Mein Dank geht auch an **Herrn Dr. med. A. Crispin** vom Institut für Medizinische Informatikverarbeitung, Biometrie und Epidemiologie der Ludwig-Maximilians-Universität München für seine unermüdliche Unterstützung bei allen Fragen im Rahmen der Statistik.

Bei **Herrn Dr. med. M. Niederhagen**, Pathologisches Institut der Ludwig-Maximilians-Universität München, möchte ich mich ganz herzlich für die fachliche Beratung bei der mikroskopischen Auswertung der histologischen Schnitte bedanken.

Großer Dank gebührt auch den medizinisch technischen Assistentinnen **Frau B. Schmitt** und **Frau M. Traunbauer** für die Einführung in die Methodik der Immunhistochemie und die unermüdliche Unterstützung bei der histologischen Aufarbeitung und Auswertung der Präparate meiner Dissertation. Vor allem **Frau B. Schmitt** möchte ich für ihre herzliche Aufnahme in das Team des Labors und ihr jederzeit offenes Ohr, ihren Rat und ihre Hilfe bei Problemen danken.

Mein ganz besonderer Dank gilt auch den Doktoranden **Frau A. Buschmann** und **Herrn M. Dedic** für die Unterstützung und die gute Zusammenarbeit im Labor.

Danken möchte ich allen Mitarbeitern des Labors für Biomechanik und experimentelle Orthopädie der Ludwig-Maximilians-Universität München, die mit ihrer Hilfsbereitschaft und ihrem Engagement zur Durchführung dieser Dissertation beigetragen haben.

Großer Dank gebührt meiner Familie und meinem Freund für ihre unermüdliche Unterstützung meiner Arbeit, die aufmunternden Worte und Ratschläge bei Schwierigkeiten sowie ihre Geduld und ihr bedingungsloses Verständnis.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Freundinnen, vor allem bei **Frau K. Wurmer**, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mich unterstützten.

Lebenslauf

Verena Lorber
Hermann-Barth-Weg 8
D - 82481 Mittenwald
Mobil D + 49 - 177 - 6726128
E-Mail verena.lorber@freenet.de

Persönliche Daten

Geboren am 06. Februar 1986 in Garmisch-Partenkirchen, Nationalität: deutsch,
Familienstand: ledig

Studium und Schule

10/2005 - 11/2011	Ludwig-Maximilians-Universität München Studium der Humanmedizin Ärztliche Prüfung, Gesamtnote: 1,66
09/1996 - 06/2005	Werdenfels-Gymnasium, Garmisch-Partenkirchen Abitur, Note: 1,0
09/1992 - 07/1996	Grundschule Mittenwald
Praktika	
04/2011 - 07/2011	Klinikum Großhadern Praktisches Jahr Neurologie
12/2010 - 03/2011	Bürgerspital Solothurn, Schweiz Praktisches Jahr Chirurgie
10/2010 - 12/2010	Klinikum Garmisch-Partenkirchen Praktisches Jahr Innere Medizin
08/2010 - 10/2010	Princess Alexandra Hospital Brisbane, Australien Praktisches Jahr Innere Medizin
02/2010	Prince of Wales Hospital Hong Kong Famulatur Pädiatrie
03/2009	Klinikum Garmisch-Partenkirchen Famulatur Innere Medizin
09/2008	Klinikum Garmisch-Partenkirchen

	Famulatur Pädiatrie
08/2008	Klinikum Schwaz (Universität Innsbruck) Famulatur Chirurgie
03/2008	Allgemeines Krankenhaus Wien Famulatur Innere Medizin (Kardiologie)
09/2005	Klinikum Garmisch-Partenkirchen
09/2006	Pflegepraktikum
02/2007	

Dissertation und wissenschaftliche Tätigkeit

02/2009 – 02/2012	Klinikum Großhadern Orthopädische Klinik und Poliklinik Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson
05/2010 - 07/2010	Klinikum Großhadern Labor für Biomechanik und experimentelle Orthopädie Studentische Hilfskraft Wissenschaftliche Arbeit
04/2011	VSOU 59. Jahrestagung Baden Baden Referentin
06/2011	12 th Efort Kongress, Kopenhagen Referentin

Weitere Tätigkeiten

02/2009 – 02/2010	Klinikum Großhadern Studentische Hilfskraft Sitzwache und Pflege von Patienten nach Koronarangiographie
02/2009 - 04/2010	Schülerhilfe Milbertshofen, München Nachhilfeunterricht in den Fächern Deutsch, Englisch, Französisch, Mathematik

Sprachkenntnisse

Deutsch	Muttersprache
Englisch	verhandlungssicher
Französisch	gut

Akademische Auszeichnungen

Stipendium Onlinestipendium „e-fellows“ zur Förderung qualifizierter Studierender

Außerkurriculäres Engagement

08/2009 - 07/2010	Ärzte der Welt München Mitarbeit in Sprechstunde
09/2000 - 07/2005	Turn- und Sportverein Mittenwald Übungsleiterassistenz Geräteturnen
10/2000 - 07/2004	SOS-Kinderzentrum Garmisch-Partenkirchen Betreuung behinderter Kinder an Spielnachmittagen und Ausflügen
09/2001 - 07/2002	Katholische Jugend Mittenwald Gruppenstundenleitung

Hobbies und Interessen

Mountainbike, Skifahren, Schwimmen, Lesen, Reisen und Sprachen