

*Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und
Rehabilitation Klinik der Ludwigs-Maximilians-Universität München
Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson*

Inflammatorische Potenz verschiedener Crosslinked Polyethylene im Mausmodell



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

vorgelegt von
Mirza Dedic
aus
Prijedor
2019

**Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-
Universität München**

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Thomas Grupp

Prof. Dr. Franz-Xaver Reichl

Betreuung durch Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

Mitbetreuung durch die

promovierte Mitarbeiterin: Prof. Dr. med. Sandra Utzschneider

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 07.11.2019

Meinem Bruder
Nedžad Dedic (1984-1989)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1 Das Kniegelenk.....	5
1.1.1 Anatomie.....	5
1.1.2 Histologie.....	6
1.1.3 Pathologie der Gonarthrose.....	8
1.1.4 Therapie der Gonarthrose.....	9
1.2 Prothesen.....	10
1.2.1 Verschiedene Designs.....	10
1.2.2 Polyethylene und deren Eigenschaften.....	12
1.2.3 Abriebinduzierter Pathomechanismus und Leukozyten- Endothelzell-Reaktion.....	15
2. Zielsetzung.....	19
3. Material und Methoden.....	20
3.1 Verwendete Polyethylene.....	21
3.2 Tierversuch.....	22
3.2.1 Versuchstiere.....	22
3.2.2 Versuchsablauf.....	23
3.2.2.1 Narkose.....	24
3.2.2.2 Intraartikuläre Injektion.....	25
3.2.2.3 Mikrochirurgische Präparation.....	25
3.2.2.4 Intravitalmikroskopie.....	26
3.2.2.5 Auswertung und Datenerhebung der Intravitalmikroskopie.....	27
3.3 Histologie.....	29
3.3.1 Präparatentnahme und Fixierung.....	29
3.3.2 Entkalkung und Entwässerung.....	29
3.3.3 Einbettung in Paraffinblöcke.....	30
3.3.4 Herstellung von Schnittpräparaten.....	30
3.3.5 Übersichtsfärbung.....	31
3.3.6 Mikroskopische Auswertung.....	32
3.4 Statistische Auswertung.....	33
3.5 Geräte- und Verbrauchsmittelliste.....	34
6. Ergebnisse.....	38
6.1 Kniegelenkdurchmesser.....	38
6.2 Mikrozirkulatorische Parameter.....	39
6.3 Leukozyten-Endothelzell-Reaktion.....	40
6.3.1 Fraktion rollender Leukozyten.....	40
6.3.2 Fraktion adhärenter Zellen.....	41
6.4 Histologie.....	42
6.4.1 Histopathologischer Synovialitis-Score und Dicke der Synovialmembran.....	42
7. Diskussion.....	45
7.1 Diskussion der Methodik.....	46
7.2 Diskussion der Ergebnisse.....	53
8. Zusammenfassung.....	55
9. Literaturverzeichnis.....	56
10. Danksagung.....	76

11. Lebenslauf.....	77
---------------------	----

1. Einleitung

Der häufigste Grund chronischer Leiden sowie der zweithäufigste Grund für einen Arztbesuch sind muskuloskelettale Beschwerden [Orthoworld 2013]. Hierbei ist Arthrose der häufigste Grund für orthopädische Interventionen [Havelin 2000, Lucht 2000, Puolakka 2001]. Hinsichtlich des demografischen Wandels, der Zunahme an Übergewicht und der steigenden Lebenserwartung, steigt die Anzahl orthopädischer Eingriffe weiterhin an [Orthoworld 2013, Wengler 2014, Wooley 2004]. 2014 zählte in Deutschland die Implantation von Endoprothesen im Kniegelenk zu den 30 häufigsten Operationen und die Implantation von Endoprothesen in der Hüfte zu den 10 häufigsten Operationen [Statistisches Bundesamt 2015]. Dabei waren bei Frauen die Gonarthrose und Koxarthrose die häufigsten Hauptdiagnosen [Statistisches Bundesamt 2014].

Die Implantation von Endoprothesen ist über die Jahre hinweg ein zunehmend erfolgreiches Verfahren in der Orthopädie geworden [Löhr 2005, Scior 2016]. Dennoch kommt es weiterhin zu Revisionen, die in Deutschland unter die 20 häufigsten Operationen fallen [Statistisches Bundesamt 2015, Wengler 2014]. Die häufigste Ursache dafür ist die aseptische Prothesenlockerung in Form von Osteolysen [Löhr 2005, Lucht 2000, Puolakka 2001, Wooley 2004]. Durch Akkumulation von Abriebpartikeln im periprosthetischen Spalt kommt es zu Entzündungsreaktionen, die von Makrophagen dominiert werden [Bader 2006, Goldring 1983, Kaddick 2009, Schmalzried 1992]. Es entsteht eine der Synovia ähnlichen Membran (synovial-like membrane) mit Abriebpartikeln und Entzündungszellen, die zwischen Knochen und Implantat vorzufinden ist [Goldring 1986, Goldring 1983, Schmalzried 1992]. Die durch Abriebpartikel getriggerten Makrophagen sezernieren Zytokine (u.a. IL1, IL6 und TNF), was zu einer Aufrechterhaltung der Inflammationsreaktion und zur Osteoklastendifferenzierung führt [al-

Saffar 1995, Green 1998, Ingham 2005, Tuan 2008, Wooley 2002, Wooley 2004].

Derzeit werden auch noch weitere Mechanismen zur Entstehung der aseptischen Prothesenlockerung diskutiert. Auf der einen Seite steht das NALP3 oder auch NLRP3 Inflammasom [Burton 2013, Cobelli 2011, Landgraeber 2014, St Pierre 2010]. Das Inflammasom ist ein intrazellulärer Multiproteinkomplex, der aus NALP3 (NACHT-, LRR-, and pyrin domain-containing protein 3) und ASC (Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD) besteht [Burton 2013, Landgraeber 2014, St Pierre 2010]. Die Aktivierung des Inflammasoms durch Abriebpartikel führt dazu, dass Pro-Caspase-1 zu Caspase-1 aktiviert wird, was wiederum die inaktiven Vorstufen von unter anderem IL1 β zur aktiven Form überführt [Burton 2013, Landgraeber 2014, St Pierre 2010]. Dies führt zur Rekrutierung von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen sowie zur Ausschüttung von RANKL [Burton 2013, Landgraeber 2014, St Pierre 2010].

Dem gegenüber stehen die Toll-like-Rezeptoren (TLR), die hauptsächlich auf Makrophagen und Monozyten [Gu 2012, Valladares 2014], aber auch auf Fibroblasten, Osteoblasten, Osteoklasten und Lymphozyten zu finden sind [Gu 2012]. Sie gehören zu den Pattern Recognition Receptors (PRR) und sind Bestandteil der angeborenen Immunantwort [Gu 2012, Pajarinen 2014, Paulus 2014, Pearl 2011, Valladares 2014]. Sie sind in der Lage, sowohl PAMPs (Pathogen-associated molecular patterns) als auch DAMPs (Damage-associated molecular patterns) zu erkennen, also von Pathogenen stammende Strukturen (wie Endotoxin) oder durch von geschädigten Zellen ausgeschüttete Proteine (wie S100) [Gu 2012, Pajarinen 2014, Paulus 2014, Pearl 2011, Valladares 2014].]. Dadurch wird die humorale und zelluläre Abwehr aktiviert [Gu 2012, Pajarinen 2014, Paulus 2014, Pearl 2011, Valladares 2014]. Es kommt vor allem zur Ausschüttung von Zytokinen (u.a. IL1 β und TNF- α), Wachstumsfaktoren (M-CSF-1) und Chemokinen (u.a. MCP-1) sowie zur Aktivierung von NF- κ B [Gu 2012, Pearl 2011, Valladares

2014]. Dies führt wiederum zu einer Aktivierung von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen, was zu einer gesteigerten Knochenresorption führt [Gu 2012, Pearl 2011, Valladares 2014]. Vor allem TLR2 [Paulus 2014, Valladares 2014] und TLR4 [Valladares 2014] werden in periprothetischen Membranen vermehrt exprimiert.

Auch wird die Rolle der Matrix-Metalloproteinasen (MMP) erforscht. Matrix-Metalloproteinasen sind eine Gruppe von Enzymen, die für den Gewebeumbau und eine gesteigerte Knochenresorption zuständig sind [Chen 2012, Laquerriere 2004]. Es wurde gezeigt, dass es eine erhöhte Aktivität an MMPs in periprothetischem Gewebe gibt [Laquerriere 2004]. De Jong et al. postulierte, dass es in Gegenwart von Polyethylenpartikeln zu keiner signifikanten Erhöhung an MMP2 und MMP9 kommt [De Jong 2011]. Allerdings gibt es in der Literatur bisher nur wenig zur Rolle der Matrix-Metalloproteinasen, die noch weiter diskutiert wird und Gegenstand weiterer Studien sein muss.

Es wurde gezeigt, dass es verschiedene Einflüsse auf den Entzündungsprozess gibt. Darunter zählen das Material der Partikel, deren Größe, Form und Anzahl [Gelb 1994, Green 1998, Matthews 2000, Murray 1990, Shanbhag 1994, Sieving 2003, Zysk 2004, Zysk 2005]. Auf diese Erkenntnisse gestützt, ist es erstrebenswert, ein Gleitpaarungsmaterial zu finden, das zu einer reduzierten Entzündungsreaktion aufgrund verminderten Abriebs, ohne Größen- und Formveränderungen der Partikel, führt und sich somit die Standzeit der Prothesen verlängert.

Derzeit wird am häufigsten das ultra-high-molecular-weight-polyethylene (UHMWPE) als Gleitpaarungsmaterial eingesetzt [Jacofsky 2008, Kurtz 2009]. Daneben wurde 1998 das cross-linked Polyethylen (XPE) für den klinischen Gebrauch eingeführt [Jacofsky 2008]. Studien im Simulator zeigten, dass XPE abriebresistenter ist als UHMWPE [McKellop 2000, Muratoglu 2004, Muratoglu 2002, Ries 2005b, Utzschneider 2010a, Utzschneider 2009a]. Auch neuere Studien zeigten einen geringeren Abrieb

im Patienten verglichen mit UHMWPE [Bischoff 2015]. Auch in der Hüftendoprothetik wurden Vorteile mit XPE verzeichnet. So zeigten Digas et al., Manning et al. und Mutimer et al. in vivo einen signifikant geringeren Verschleiß im Vergleich zu konventionellen Polyethylenen [Digas 2003, Manning 2005, Mutimer 2010].

Obwohl der Einsatz von XPE in der Knieendoprothetik kontrovers diskutiert wurde [Ries 2005a, Rodriguez 2008], zeigte de Steiger et al. in einer neuesten Studie, dass es eine geringere Revisionsrate bei XPE Prothesen gibt [de Steiger 2015]. Kurz- und mittelfristig wurde XPE als sicher für die Knieendoprothetik eingestuft, jedoch fehlen dazu Langzeitergebnisse [Hodrick 2008, Massin 2017, Meneghini 2016].

1.1 Das Kniegelenk

1.1.1 Anatomie

Das größte Gelenk des menschlichen Körpers ist die *Articulatio genus* (Kniegelenk) [Platzer 1991, Prescher 2011]. Es gehört zu den Diarthrosen und ist ein Drehscharniergelenk [Halcour 2006, Platzer 1991]. Gebildet wird es aus den Gelenkflächen der Kondylen des Femur und der Tibia (*Condyli femoris* und *Condyli tibiae*) sowie der Patella [Halcour 2006, Menche 2007, Platzer 1991, Prescher 2011]. Umgeben wird das Gelenk von einer mit Bändern verstärkten Kapsel (*Capsula articularis*), in deren vordere Wand die Patella eingelassen ist [Platzer 1991, Prescher 2011]. Zwischen den Gelenkflächen befinden sich, zum Ausgleich derer Inkongruenz sowie zum Schutz des Gelenkknorpels und Ausgleich der Belastungen, die auf das Knie wirken, zwei Menisken (Außen- und Innenmeniskus) [Menche 2007, Platzer 1991, Prescher 2011]. Sie bestehen aus kollagenhaltigem Bindegewebe und sind im verdickten Außenrand mit der Gelenkkapsel beweglich verwachsen, im Gelenkspalt fest mit dem Innenband [Halcour 2006, Menche 2007, Platzer 1991]. Je nach Gelenkstellung, bieten die Menisken dem Oberschenkelknochen eine angepasste Pfanne [Menche 2007]. Zwischen den Menisken verlaufen dorsal und ventral zwei sich überkreuzende Bänder (vorderes und hinteres Kreuzband), die eine Verschiebung des Femurs und der Tibia nach ventral und dorsal verhindern [Halcour 2006, Menche 2007, Platzer 1991, Prescher 2011]. Lateral wird das Gelenk im gestreckten Zustand durch die inneren und äußeren Seitenbänder stabilisiert, in der Beugung durch den *Musculus (M.) biceps femoris* (zweiköpfiger Oberschenkelmuskel), dem *Tractus iliotibialis* (Faserzug der *Fascia lata* (Oberschenkelbinde)) und der Sehne des *M. popliteus* (Kniekehlenmuskel) [Halcour 2006, Menche 2007, Prescher 2011]. Um die Reibung der Sehnen an den Knochen zu vermindern, sind an den stärksten Reibungspunkten

Schleimbeutel (Bursae) eingelassen [Menche 2007, Platzer 1991].

Für die Roll-Gleitbewegung des Kniegelenks dient in der Gelenkhöhle und im Gelenkspalt die Synovia (Gelenkflüssigkeit), die von der Membrana synovialis (Synovialmembran) der Gelenkkapsel gebildet wird, als Schmiermittel [Halcour 2006, Menche 2007, Prescher 2011].

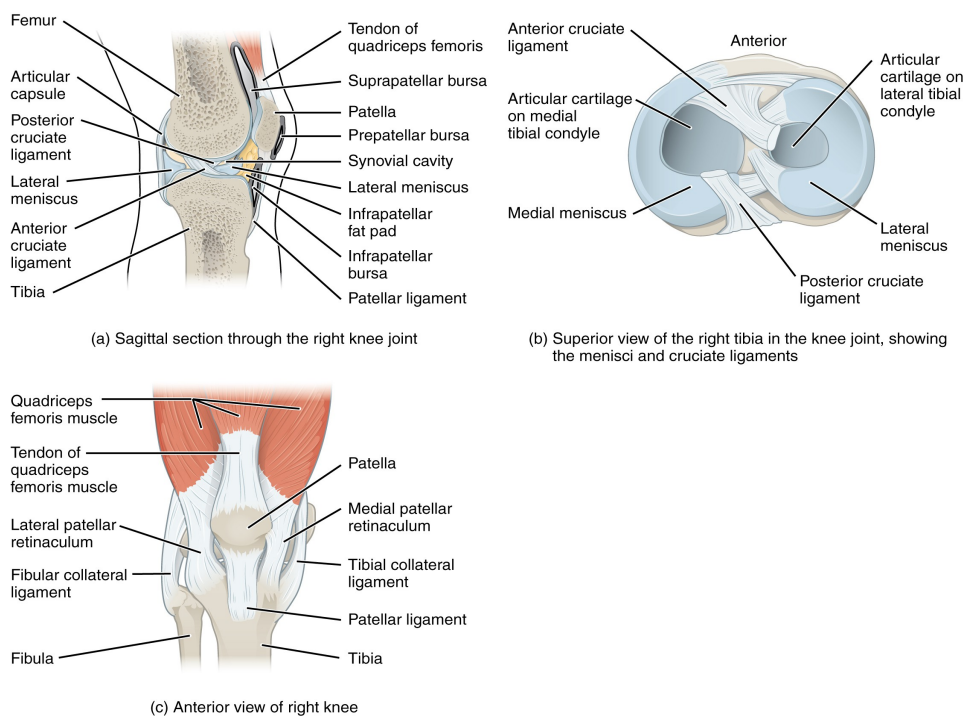


Abbildung 1: Anatomie des Kniegelenks [Singh 2016]

1.1.2 Histologie

Der Gelenkknorpel der Gelenkflächen besteht aus hyalinem Knorpel ohne Perichondrium, wodurch er nicht mehr zur Regeneration befähigt ist und über die Synovia ernährt werden muss [Junqueira 1984, Voss 1957]. Im hyalinen Knorpel bilden die Kollagenfasern eine oberflächliche Tangentialfaserschicht, um den Druck- und Scherkräften an den Gelenkflächen entgegenzuwirken [Junqueira 1984]. Eine schmale verkalkte Knorpelzone verbindet den

Gelenkknorpel mit dem darunterliegenden Knochen [Junqueira 1984, Voss 1957].

Die Gelenkkapsel verbindet Femur und Tibia, indem sie sich von Periost zu Periost spannt, und besteht aus zwei Schichten [Junqueira 1984, Voss 1957].

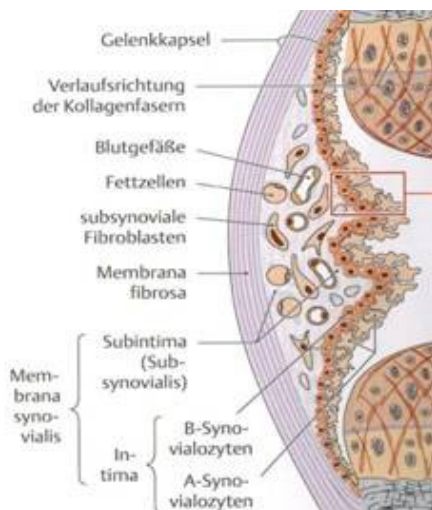


Abbildung 2: Aufbau der Gelenkkapsel [Guenter 2015]

Das Stratum fibrosum ist die äußere faserreiche Schicht aus straffem kollagenem Bindegewebe mit Blutgefäßen und Nervenfasern [Junqueira 1984, Prescher 2011, Voss 1957]. Von außen wird sie teils durch Bänder verstärkt und tritt ventral mit der Patellarsehne in Beziehung [Junqueira 1984, Prescher 2011]. Das Stratum synoviale besteht aus lockerem, zellreichen Bindegewebe und ist ebenfalls nerven- und gefäßreich [Junqueira 1984, Prescher 2011, Voss 1957]. Zwischen Stratum synoviale und Stratum fibrosum liegt unterhalb der Patella ein pyramidenförmiger Fettkörper (Corpus adiposum infrapatellare Hoffa) [Prescher 2011].

In den Gelenkspalt hinein bildet das Stratum Synoviale Zotten mit platten bis kubischen Bindegewebszellen, die sich in zwei Zelltypen unterscheiden lassen [Junqueira 1984, Voss 1957]. Die M-Zellen ähneln Makrophagen und die F-Zellen Fibroblasten [Junqueira 1984]. Beide sind dazu befähigt, Synovia zu sezernieren und zu resorbieren [Junqueira 1984]. Diese besteht

aus seröser Flüssigkeit [Voss 1957].

Die Bänder des Gelenks sind straffes Bindegewebe, aus parallel verlaufenden kollagenen Faserbündeln aufgebaut [Voss 1957]. Die Bursae sind Säckchen aus Bindegewebe, die eine synoviaähnliche Masse enthalten [Voss 1957].

1.1.3 Pathologie der Gonarthrose

Als Gonarthrose wird die Gelenkerkrankung Arthrosis deformans im Kniegelenk bezeichnet [Thomas 2003]. Es ist eine degenerative Gelenkerkrankung mit Einschränkungen der Gelenkfunktion sowie Schmerzen, bei der zunächst eine Schädigung des Gelenkknorpels entsteht und Veränderungen des Knochengewebes sowie der Gelenkkapsel nach sich zieht [Pap 2011, Thomas 2003, 2006]. Makroskopisch zeigen sich starke Deformationen mit aufgerautem bis vollständig abgeriebenen Gelenkknorpel (Abb. 3) [Pap 2011, Thomas 2003].



Abbildung 3: Degeneration des Gelenkknorpels
[Sarang 2017]

Histologisch finden sich asbestfaserige Degenerationen mit Demaskierung der Kollagenfasern, was sich als Rissbildungen im Gelenkknorpel zeigt [Pap

2011, Thomas 2006]. Als Regenerationsversuch kommt es kompensatorisch zu Ausbildungen atypischer Chondrone mit Brutkapseln (herdförmige Anlagerung von Knorpelzellen) [Pap 2011, Thomas 2006]. An der Knorpel-Knochengrenze kommt es zu unterminierenden Ossifikationen des Gelenkknorpels in Form eines ossifizierenden Bindegewebes [Thomas 2006]. Als Folge der erhöhten Druckbelastung auf das Gelenk durch die verlorene Stoßdämpferfunktion des untergegangenen Knorpels kommt es zu einer reaktiven Hyperostose der subchondralen Knochenplatte mit verdickten Knochenbälkchen und einer Fibrose des örtlichen Knochenmarks [Pap 2011, Thomas 2006]. Weitere histologische Kriterien sind Randosteophyten (knöcherne Randwülste) und Geröllzysten (Pseudozysten mit nekrotischem Knochengewebe und amorphem Material) [Pap 2011, Thomas 2006]. Auch lässt sich eine Synovialitis mit unspezifischen Entzündungen feststellen [Thomas 2006]. Diese kann bis zur Fibrose führen [Thomas 2006].

1.1.4 Therapie der Gonarthrose

Neben der konservativen Therapie der Gonarthrose stehen auch operative Maßnahmen zur Verfügung [Diehl 2013, Krämer 2005]. Die konservative Behandlung der Gonarthrose umfasst eine Gewichtsreduktion, da pro Kilogramm Körpergewicht die Mehrbelastung des Knies etwa 3 kg entspricht, eine Aktivitätsmodifikation zur Vermeidung übermäßiger Gelenksbelastung sowie physikalische Therapie und Physiotherapie zur Schmerzlinderung und dem Erhalt der Gelenkfunktion [Diehl 2013].

Bei der operativen Behandlung wird, je nach Zerstörung des Kniegelenks, ein künstlicher Oberflächenersatz implantiert [Krämer 2005]. Während bei der Totalprothese das gesamte Gelenk durch ein künstliches ersetzt wird, werden bei geringeren oder lokal begrenzten Knorpelzerstörungen Teilprothesen als mono- oder bikondyläre Schlitten eingesetzt [Krämer 2005].

1.2 Prothesen

1.2.1 Verschiedene Designs

In der Endoprothetik werden Prothesen in drei Gruppen eingeteilt [Kohn 1999, Krukemeyer 2013]. Der unikompartimentellen Oberflächenersatz besteht aus einer Femurkomponente, bei der die Oberfläche eines Femurcondylus ersetzt wird, und der korrespondierenden Tibiakomponente, als Ersatz für das Tibiaplateau [Flören 2011, Kohn 1999, Krukemeyer 2013]. Indiziert ist der unikondyläre Oberflächenersatz bei isolierter Zerstörung eines femorotibialen Kompartiments, wobei ein intakter Kapsel-Band-Apparat sowie eine physiologische Achsführung Voraussetzung ist [Flören 2011, Kohn 1999, Krukemeyer 2013].

Bei einer bi- oder trikompartimentellen Gelenkzerstörung ohne die Möglichkeit einer gelenkerhaltenden Operation, ist ein bi-/trikompartimenteller Oberflächenersatz indiziert [Kohn 1999]. Der Unterschied liegt beim Ersatz der Patella [Flören 2011, Jerosch 1999, Kohn 1999]. Weiterhin wird zwischen der ungekoppelten und der teilgekoppelten Prothese unterschieden [Flören 2011, Kohn 1999, Krukemeyer 2013]. Bei der ungekoppelten Prothese werden die Oberflächen des Gelenks ersetzt, wobei der Kapsel-Band-Apparat intakt sein muss [Flören 2011, Kohn 1999, Krukemeyer 2013]. Andernfalls wird die teilgekoppelte Prothese verwendet, die einen Teil des Kapsel-Band-Apparates mit ersetzt [Flören 2011, Kohn 1999, Krukemeyer 2013]. Das Design eines bi-/trikompartimentellen Oberflächenersatzes ist abhängig von der Oberflächengeometrie der Femur- und Tibiakomponente [Flören 2011, Kohn 1999]. Hierbei wird zwischen kongruenten „round-on-round“, „flat-on-flat“ sowie „curved-on-curved“ und inkongruenten „round-on-flat“ Prinzipien unterscheiden [Flören 2011, Jerosch 1999, Kohn 1999]. Des weiteren können auch bewegliche tibiale Einsätze (Mobile bearings) zum Erhalt einer möglichst physiologischen Kinematik

eingesetzt werden [Flören 2011, Kohn 1999].

Gekoppelte Totalendoprothesen sind indiziert, wenn ein kondylärer Oberflächenersatz, durch beispielsweise eine schwerwiegende Gonarthrose oder einem insuffizienten bis zerstörten Bandapparat, nicht möglich ist [Flören 2011, Kohn 1999]. Femur- und Tibiakomponente sind über einen langen Zapfen gekoppelt und werden langstielig in Tibia und Femur verankert [Flören 2011, Kohn 1999]. Dies geht mit einem interkondylären Knochensubstanzverlust einher und erschwert dadurch eine Rückzugsmöglichkeit nach Implantation [Flören 2011, Kohn 1999].



Abbildung 4: Endoprothesendesigns: 1. unikondylärer Oberflächenersatz; 2. bikompartimenteller Oberflächenersatz; 3. achsgeführte Totalendoprothese [Ring 2016]

1.2.2 Polyethylene und deren Eigenschaften

Als Gleitpartner der Femurkomponente wird in der Knieendoprothetik Polyethylen, ein Polymer aus Ethylenmonomeren $((C_2H_4)_n)$, verwendet [Bellare 2005, Kurtz 2009]. Lässt man Ethylen gas bei hohem Druck und hoher Temperatur mit Sauerstoff als Katalysator reagieren, erhöht sich das Molekulargewicht zunächst auf 200.000 g/mol, wobei high density Polyethylen (HDPE) entsteht [Kurtz 2009]. Bei weiterer Erhöhung des Molekulargewichts auf 6 million g/mol entsteht UHMWPE [Bellare 2005, Kurtz 2009]. Im Gegensatz zu HDPE hat UHMWPE eine signifikant höhere Abriebs- und Verschleißfestigkeit gegenüber Metallen und Keramik, weswegen es als Oberflächenmaterial verwendet wird [Bellare 2005, Kurtz 2009].

Damit UHMWPE für die Endoprothetik verwendet werden kann, muss es zunächst sterilisiert werden, was einen Einfluss auf die Festigkeit, das Verschleißverhalten und Alterungs- sowie Ermüdungsverhalten hat [Bellare 2005, Crowninshield 2008, Kurtz 2009, McKellop 2000]. Es gibt verschiedene Verfahren, um UHMWPE zu sterilisieren. Zum einen über Gassterilisation (Ethylenoxid, Gasplasma) und zum anderen über Bestrahlung (β - und γ -Strahlung) [Kurtz 2009].

Ethylenoxid führt weder zu einer Verschlechterung der mechanischen Eigenschaften des Kunststoffes, noch zu einer Verbesserung [Kurtz 2009]. Nachteilig an dieser Sterilisation ist die lange Prozesszeit von über 12 Stunden, da Ethylenoxid nicht nur bakterizid, viruzid und fungizid, sondern auch reizend, toxisch, kanzerogen und mutagen wirkt und dadurch im UHMWPE keine schädigenden Konzentrationen mehr nachgewiesen werden dürfen [Kurtz 2009]. Die Sterilisation mit Gasplasma ist im Vergleich zu Ethylenoxid weniger zeitaufwendig [Kurtz 2009]. Bei dieser Sterilisation wird das Gas mittels eines hochfrequenten elektrischen Felds ionisiert, wodurch die Sterilisation erfolgt [Kurtz 2009].

Bei der Sterilisation mit ionisierender Strahlung wird zwischen der β -Strahlung (Beschuss mit Elektronen) und der γ -Strahlung (Bestrahlung mit energiereichen Photonen) unterschieden [Kurtz 2009]. Dabei ist die Sterilisation über β -Strahlung zeitlich effektiver als die γ -Strahlung. Auch dringen die Elektronen leicht tief in das Material ein, wohingegen sich die Wirkung der γ -Strahlung auf die äußeren Randschichten konzentriert [Bellare 2005, Kurtz 2009]. Der Nachteil in der Behandlung mit ionisierender Strahlung liegt darin, dass sich in Anwesenheit von Sauerstoff die Materialeigenschaften durch Entstehung von Radikalen, die zu einer oxidativen Kettenreaktion führen, verschlechtern [Bellare 2005, Kurtz 2009]. Das Material versprödet schneller und zeigt frühere Ermüdungserscheinungen [Bellare 2005, Kurtz 2009]. Die negativen Folgen der Oxidation konnten durch eine Veränderung des Verfahrens in sauerstoffreduzierter Atmosphäre reduziert werden [Bellare 2005, Kurtz 2009].

Durch zusätzliche Quervernetzung der Polyethylenketten über kovalente Bindungen entsteht XPE [Kurtz 2009]. Induziert wird die Quervernetzung durch ionisierende Strahlung ab 40 kGy [Kurtz 2009]. Dadurch verbessert sich die Abrieb- und Verschleißfestigkeit [Gencur 2003, MacDonald 2011, Sobieraj 2009]. Die mechanischen Eigenschaften hingegen verschlechtern sich [Gencur 2003, Sobieraj 2009, Utzschneider 2010b], worunter die Festigkeit, die Kerbschlagzähigkeit, Bruchdehnung und die Beständigkeit gegenüber Ermüdung bei entsprechender Belastung zählen [Huot 2011]. Zudem entstehen bei der Bestrahlung Radikale, die jahrelang überdauern können und durch Reaktion mit dem Umgebungssauerstoff zur Alterung des Polyethylens führen [Kurtz 2009, Sobieraj 2009]. Zur Verhinderung oder Reduktion der Oxidation von cross-linked Polyethylen werden diese nachbehandelt [Kurtz 2009]. Beim Annealing wird das Polyethylen bis unterhalb der Schmelztemperatur erhitzt [Ries 2005b]. Dabei werden die Radikale reduziert, allerdings nicht vollständig eliminiert [Ries 2005b]. Die

mechanischen Eigenschaften werden dabei nicht verschlechtert [Ries 2005b]. Beim Remelting wird das Polyethylen bis oberhalb der Schmelztemperatur erhitzt, wobei die Radikale vollständig eliminiert werden [Ries 2005b]. Die mechanischen Eigenschaften hingegen werden weiter verschlechtert [Kurtz 2006, Ries 2005b].

Eine zweite Generation der crosslinked Polyethylene wurde entwickelt, um den nachteiligen Eigenschaften beizukommen [Kurtz 2009]. Diese werden als oxidativ stabile gecrosslinkte UHMWPE-Werkstoffe mit gutem Verschleiß- sowie Abriebverhalten und ungeschwächten mechanischen Eigenschaften beschrieben [Kurtz 2009]. Es existieren dafür drei Methoden [Kurtz 2009, Ries 2005b]. Zum einen wird das Polyethylen sequentiell mit niedrigen Dosen bestrahlt, wonach jeweils ein Annealing folgt [Dumbleton 2006]. Zum anderen wird Vitamin E als Antioxidationsmittel verwendet, in welchem das Polyethylen nach der Bestrahlung getaucht wird [Rowell 2011]. Studien zeigten, dass in Vitamin E getauchtes Polyethylen abriebresistenter war [Gul 2017, Oral 2017, Rowell 2011]. Bichara et al. zeigte, dass mit Vitamin E behandeltes XPE im Vergleich zu unbehandeltem XPE weniger Osteolysen hervorriefen [Bichara 2014]. Die dritte Methode bedient sich mechanischer Verformung durch hydrostatische Extrusion des gecrosslinkten Polyethylens im erhitzten Zustand unterhalb der Schmelztemperatur [Kurtz 2006].

1.2.3 Abriebinduzierter Pathomechanismus und Leukozyten-Endothelzell-Reaktion

Der häufigste Grund einer Prothesenlockerung ist die aseptische Osteolyse, hervorgerufen durch Akkumulation von Abriebpartikeln im periprosthetischen Spalt [Bader 2006, Goldring 1983, Kaddick 2009, Löhr 2005, Schmalzried 1992, Wooley 2002]. Durch eine von Makrophagen dominierte Entzündungsreaktion entsteht zwischen Knochen und Implantat eine synovial-like membrane bestehend aus Entzündungszellen und Abriebpartikeln [Bader 2006, Goldring 1986, Goldring 1983, Kaddick 2009, Nich 2014, Ren 2011, Revell 2008, Schmalzried 1992, Tuan 2008]. Durch Zytokinausschüttung wird der Entzündungsprozess aufrecht erhalten und die Osteoklastogenese innerviert [Ingham 2005, MacQuarrie 2004, Nich 2014, Purdue 2007, Wooley 2002]. In Gänze sind die molekularpathologischen Prozesse und Kaskaden jedoch noch nicht erforscht [Drees 2008, Gallo 2013, Nich 2014, Noordin 2012, Tuan 2008]. Auch wird der Weg der Partikel an die Knochen-Implantat-Grenze, dem Ort der Knochenresorption, kontrovers diskutiert. So postulieren Studien, dass es zu einer Migration der Partikel durch den Knochen kommen kann [Libouban 2009, Massin 2004]. In Schmalzried et al. Theorie des sogenannten Periimplantatspaltes gelangen Partikel über die Synovialflüssigkeit in mechanisch verursachte Mikrospalten zwischen Knochen und Implantat, wo sie Makrophagen aktivieren, die die Knochenresorption auslösen [Schmalzried 1992]. Wiederum andere Studien zeigten, dass Abriebpartikel in regionale Lymphknoten transportiert werden und in den Organen Lunge, Milz, Leber und Niere nachgewiesen werden konnten [Revell 2008, Urban 2004].

Die Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α sind am bedeutensten für die osteolytische Kaskade [Noordin 2012, Wei 2005]. Dabei wird die Synthese von IL-6 hauptsächlich durch IL-1 β und TNF- α gesteigert, die wiederum Osteoklasten aktivieren und eine Stimulierung der Differenzierung von

Osteoklastenvorläuferzellen bewirken können [Noordin 2012, Wei 2005]. Die aktivierten und differenzierten Osteoklasten produzieren Kathepsin K und Säure, wodurch große Areale des Knochens resorbiert werden und sich ausgedehnte Lakunen bilden [Purdue 2008, Purdue 2006, Tamaki 2008].

Ein weiterer wichtiger Signalweg, der vor allem über TNF- α und IL-1 β zur Osteoklastogenese führt, läuft über den Transkriptionsfaktor nuclear factor-kappaB (NF- κ B). NF- κ B ist im Zytoplasma unter physiologischen Umständen an einen Inhibitor gebunden, der bei Inflammationsprozessen proteolytisch abgebaut wird, wodurch NF- κ B in den Zellkern gelangt und an die Promotorregion seiner Zielgene, die vor allem für proinflammatorische Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle codieren, bindet [Drees 2008, Holt 2007, Ingham 2005, Nich 2014, Noordin 2012].

Osteoklasten und deren Vorläuferzellen besitzen auf der Oberfläche den Rezeptor-Aktivator von NF- κ B (RANK), der durch Bindung seines Liganden (RANKL) die Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen aktiviert und die Knochenresorption durch Osteoklasten innerviert [Drees 2008, Nich 2014, Purdue 2006, Purdue 2007]. Ein natürlicher Antagonist zu RANKL ist Osteoprotegerin (OPG), der durch Bindung von RANKL den Knochenabbau hemmt und den Knochenaufbau fördert [Drees 2008, Ingham 2005, Nich 2014, Revell 2008]. Um das Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau zu halten, ist das Verhältnis von RANKL zu OPG entscheidend. Verschiebt sich dieses Gleichgewicht in Anwesenheit von TNF- α zu Gunsten von RANKL, kommt es zu vermehrten Osteolysen und zu einer gesteigerten Knochenresorption [Gallo 2013, Kitaura 2005, Purdue 2006, Purdue 2007, Tuan 2008].

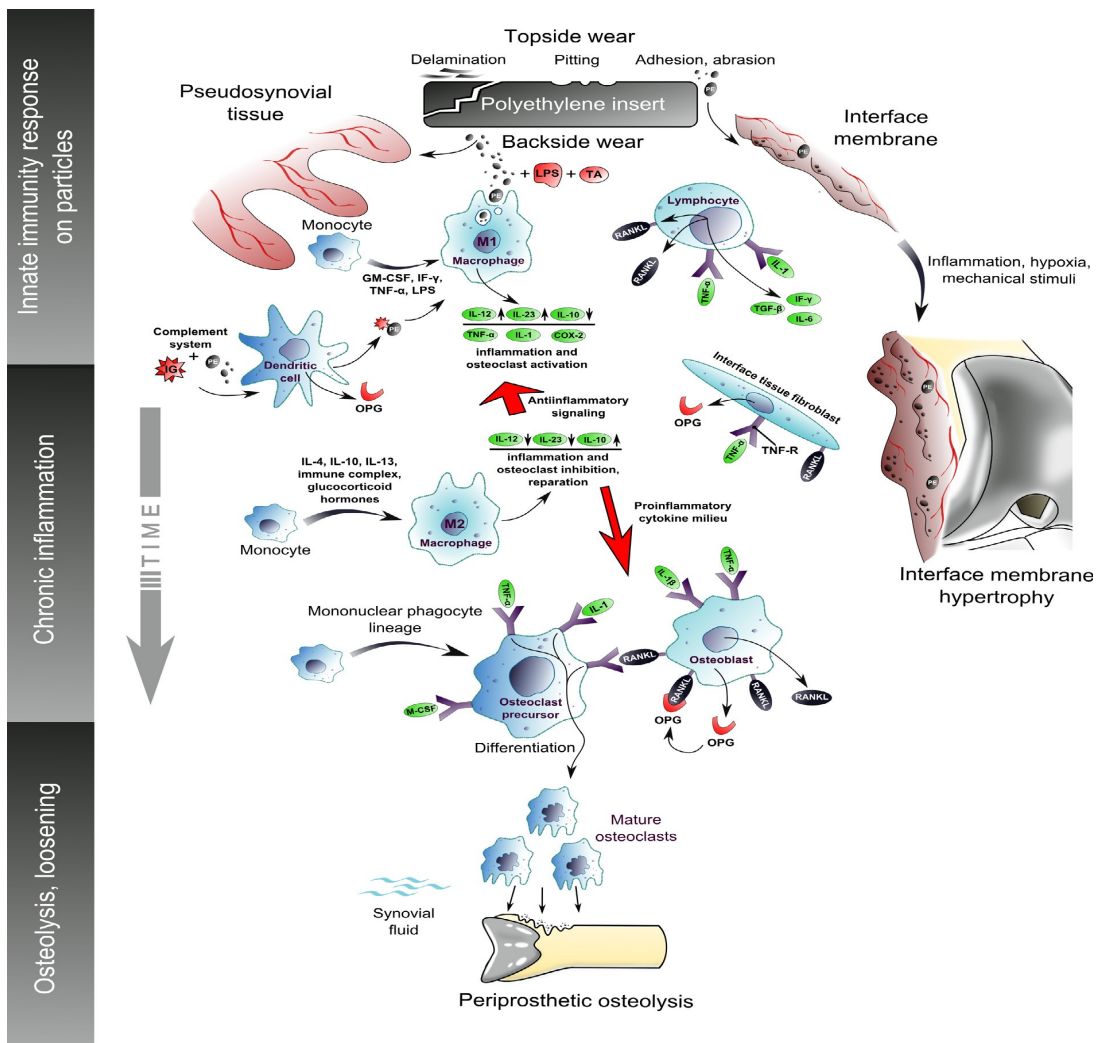


Abbildung 5: Von TKA-Oberflächen abgelöste Polyethylenpartikel aktivieren mehrere Zelllinien der angeborenen und adaptiven Immunantwort. Makrophagen sind verantwortlich für die Auslösung und Aufrechterhaltung der chronischen Entzündung, wodurch es zum Wachstum der interface membrane kommt. Durch Aktivierung von Osteoklasten und Differenzierung von Osteoklastenvorläuferzellen kommt es zu periprosthetischen Osteolysen. [Gallo 2013]

Die in mehreren Schritten ablaufende Leukozyten-Endothelzell-Interaktion beschreibt die Interaktion zwischen Blutzellen und Gefäßwand [Murphy 2016].

Die Voraussetzung für die Emigration der Leukozyten aus dem Blutstrom ins Gewebe ist die Aktivierung des Endothels durch von aktivierten Makrophagen sezernierte Zytokine wie TNF- α oder IL-1 β [Murphy 2016]. Im vorbeifließenden Blutstrom kommt es zu einem zufälligen Berühren des Endothels durch einen Leukozyten [Carlos 1994, Radi 2001]. Es entstehen

reversible Bindungen zwischen Leukozyt und Endotheloberfläche, wodurch es zum sogenannten „Rolling“ des Leukozyts kommt [Carlos 1994, Murphy 2016, Revell 2008, Steeber 1998, Steeber 2000]. Verantwortlich für das Rollen des Leukozyten sind Adhäsionsmoleküle (Selektine), die sowohl auf der Leukozyten- als auch auf der Endothelzelloberfläche exprimiert werden [Murphy 2016, Radi 2001]. Selektine binden an ihre Liganden und ermöglichen somit ein Anheften der Leukozyten an die Endothelzelloberfläche [Murphy 2016, Radi 2001]. Allerdings wird lediglich die Geschwindigkeit des Leukozyten im Blutstrom verringert [Murphy 2016, Radi 2001]. Die irreversible Adhäsion (Sticking) des Leukozyten erfolgt durch die Interaktion der Adhäsionsmoleküle intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) und vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) mit ihren Liganden [Carlos 1994, Murphy 2016, Radi 2001, Steeber 1998, Steeber 2000]. Es folgt die transendotheliale Migration (Diapedese) der Leukozyten durch Endothelzelllücken ins Gewebe über Integrine und platelet and endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) [Murphy 2016, Radi 2001].

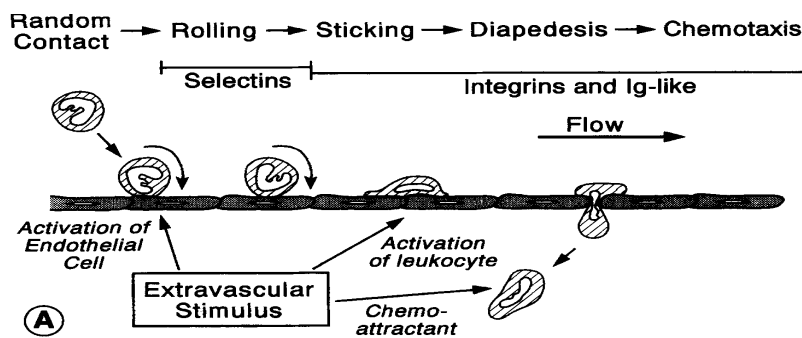


Abbildung 6: Leukozyten-Endothelzell-Interaktion [Carlos 1994]

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Abriebpartikel der gängigsten modernen Knieendoprothesendesigns aus konventionellen und crosslinked Polyethylenen auf ihre inflammatorische Potenz hin zu untersuchen. Erfolgen sollte dies über ein *in vivo* Mausmodell mittels Intravitalmikroskopie. Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie sollte die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie die synoviale Mikrozirkulation untersucht werden. Anschließend erfolgte eine histologische Beurteilung der Synovialmembran auf mikroskopischer Ebene.

3. Material und Methoden

Die im folgenden beschriebenen Versuche führte der Verfasser dieser Arbeit im Zeitraum 2008-2009 durch. Die Tierversuche, unter dem Aktenzeichen 55.2-1-54-2531-139-07 bei der Regierung von Oberbayern registriert und bewilligt, wurden gemäß der Tierschutz-Versuchstierverordnung durchgeführt. Die Haltung der Tiere mitsamt des operativen Teils fand im Walter-Brendel-Zentrum der LMU München am Standort Großhadern statt. Die histologische Weiterverarbeitung der Proben erfolgte im Institut für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie.

3.1 Verwendete Polyethylene

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Polyethylenen handelte es sich, mit Ausnahme eines experimentellen Typs (Gruppe D), um handelsübliche Produkte (Tab.1) [Utzschneider 2010a, Utzschneider 2009a]. Im Rasterelektronenmikroskop zeigten 85% der Partikel eine durchschnittliche Partikelgröße von $< 1 \mu\text{m}$, wobei die kleinsten Partikel tendenziell in den cross-linked-(XPE)-Gruppen zu finden waren [Utzschneider 2010a, Utzschneider 2009b]. Die Morphologie der Partikel war zum Großteil, glatt, rund granulär und irregulär [Utzschneider 2010a, Utzschneider 2009b].

Tabelle 1: Im Versuch verwendete Polyethylentypen und Prothesendesigns

Gruppe	PE-Typ	Prothesendesign	Herstellung	Inlaytyp
A	X3™ GUR 1020 XPE	Scorpio®	annealed und sequentiell bestrahlt 3x30 kGy Gamma, Gasplasma	fixed
B	Durasul™ GUR 1050 XPE	Natural Knee® II	remelted 95 kGy E-beam, Eto	fixed
C	Prolong™ GUR 1050 XPE	NexGen®	remelted 65 kGy E-beam, Gasplasma	fixed
D	GUR 1020 XPE	LCS complete®	remelted 50 kGy Gamma, Gasplasma (experimenteller Typ)	mobile
E	GUR 1020 konventionelles UHMWPE	LCS complete®	20-40 kGy Gamma unter Vakuum in Folie (GVF)	mobile
F	GUR 1050 konventionelles UHMWPE	Natural Knee® II	40 kGy Gamma	fixed

3.2 Tierversuch

1998 entwickelte Veihelmann et al. ein Tiermodell zur Darstellung der Mikrozirkulation im Synovialgewebe von Mäuseknien [Veihelmann 1998]. Dieses wurde von Zysk et al. zur Untersuchung inflammatorischer Prozesse, hervorgerufen durch intraartikulär appliziertes Partikelmaterial, mittels Intravitalmikroskopie weiterentwickelt [Zysk 2004, Zysk 2003]. Zusammengefasst ermöglicht das Tiermodell die *in vivo* Untersuchung partikelinduzierter Entzündungsreaktionen und die Darstellung der synovialen Mikrozirkulation sowie Leukozyten-Endothelzell-Interaktion [Zysk 2004, Zysk 2005, Zysk 2003].

3.2.1 Versuchstiere

Verwendet wurden 8-10 Wochen alte, weibliche Balb/c-Mäuse mit einem Gewicht von 17-25g. In die Versuche wurden ausschließlich Mäuse mit unauffälligem Fress-, Putz- und Spielverhalten eingeschlossen, was direkt nach deren Anlieferung ins Walter-Brendel-Zentrum überprüft wurde. Erst dann wurden die Tiere randomisiert in sieben Gruppen zu je neun Tieren eingeteilt.

Die Haltung erfolgte artgerecht in mit Sägespänen eingestreuten Kunststoffkäfigen, die in klimatisierten Räumen mit automatisiertem Hell-/Dunkelzyklus standen. Als Verpflegung erhielten die Mäuse Laborfutter für Nager und zu jederzeit in ausreichender Menge verfügbares Trinkwasser. Während der Versuche verblieben die Versuchstiere in Einzelkäfigen. Des Weiteren erfolgten in der Versuchszeit Kontrollen zum Gewicht, Fress-, Spiel- und Putzverhalten.

Vor den Versuchen erhielt jedes Tier eine Nummer, die während der *in-vivo*-Untersuchungen und auch nach der Euthanasierung für die nachfolgenden

Untersuchungen beibehalten wurde.

3.2.2 Versuchsablauf

Die Versuche fanden an zwei durch eine siebentägige Inkubationszeit voneinander getrennten Tagen statt. Am ersten Tag erfolgte die intraartikuläre Partikelinjektion in die linken Knie der Mäuse. Am achten Tag post applicationem wurde die Intravitalmikroskopie durchgeführt (Abb. 7). Im direkten Anschluss erfolgte die Euthanasierung mit Präparatentnahme des linken Kniegelenks zur weiteren histologischen Untersuchung.

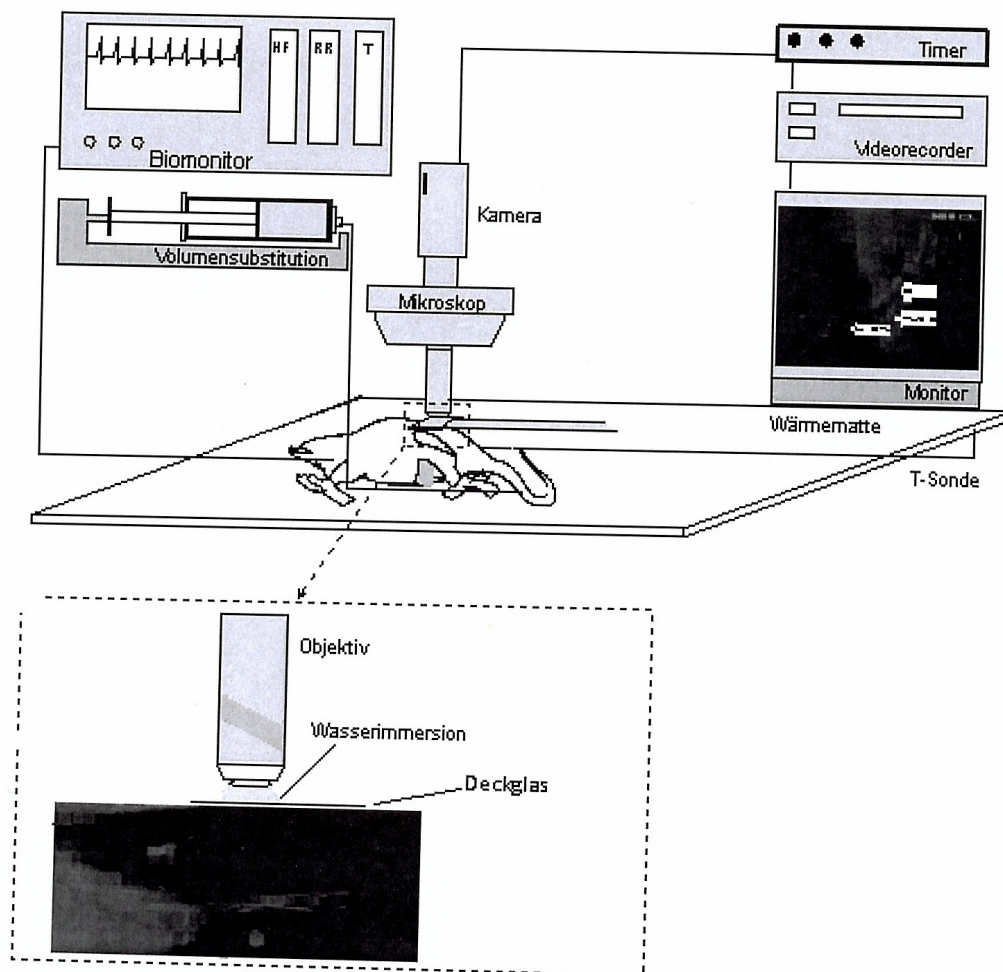


Abbildung 7: Versuchsaufbau

3.2.2.1 Narkose

Um eine konstante Körpertemperatur der Maus während der Narkose gewährleisten zu können, wurde diese auf eine Wärmematte gelegt. Überprüft wurde die Körpertemperatur während des Versuchs über eine rektale Temperatursonde (Zielwerte zwischen 36,5°C und 38,0°C).

Die Narkose wurde mittels Vapor-Vernebler eingeleitet. Das Inhalationsgemisch bestand aus Isofluran 1,2% mit einem Gemisch aus 35%igem Sauerstoff und Lachgas. Zur kontinuierlichen Überwachung der Vitalparameter wurde ein arterieller Katheter am proximalen Drittel des Mäuseschwanzes appliziert. Mit Hilfe eines Drucktransducers konnte der Blutdruck überwacht werden. Um ein Austrocknen der Augen zu verhindern, wurde eine 5%ige Dexpanthenol-Salbe aufgetragen.

Die Anästhesie der Mäuse erfolgte am Tag der Partikelinjektion sowie am Tag der Intravitalmikroskopie. Für die Intravitalmikroskopie wurde, mit einem an einer Insulinnadel befestigten Polyethylenschlauch, ein venöser Zugang in eine Schwanzvene gelegt. Durch diesen war die Gabe der Fluoreszenzfarbstoffe sowie isotoner Kochsalzlösung, zur Vorbeugung einer Dehydratation, möglich.

3.2.2.2 Intraartikuläre Injektion

Für die Partikelinjektion wurden die luft- und wasserdicht verschlossenen Partikelsuspensionen zuvor für 20 Minuten in ein Ultraschallbad gelegt. Somit wurde die Aggregation der Partikel verhindert und eine optimale Verteilung der Teilchen in der Lösung erzielt. Vor der Injektion in das linke Kniegelenk wurde dessen Durchmesser mit einem Messschieber gemessen und protokolliert. Im Anschluss wurde das Knie auf einen speziell angefertigten Kunststoffblock in 45° Flexionsstellung fixiert. Mit einem alkoholischen Desinfektionsmittel wurde das Knie desinfiziert, ehe der Kniegelenkspalt mit einer Mikrokanüle unter mikroskopischer Kontrolle anterior durch das Ligamentum patellae punktiert wurde. Die intraartikuläre Injektion erfolgte dann über eine Insulinspritze. Es wurden 50µl einer 0,1 volumenprozentigen (Vol.-%) Partikelsuspension, bei der Kontrollgruppe 50µl steriles PBS (Phosphat-Buffered-Saline), appliziert. Bei korrekter Applikation zeigte sich eine prall gefüllte Gelenkkapsel.

Nach Beendigung der Narkose wurde das Tier zum Aufwachen in einen mit der Versuchsnummer versehenen Einzelkäfig gelegt.

3.2.2.3 Mikrochirurgische Präparation

An Tag 8 wurde, nach Einleitung der Narkose, erneut der Kniegelenkdurchmesser gemessen und protokolliert. Nach bereits beschriebener Positionierung des linken Knies auf dem Kunststoffblock erfolgte die Desinfektion des Gelenks. Zur Freilegung des Hoffa'schen Fettkörpers wurde das Kniegelenk semisteril unter mikroskopischer Kontrolle präpariert. Hierzu erfolgte eine Inzision der Haut von der Pfote bis zum mittleren Oberschenkel hin reichend. Nach Freilegung der Patellarsehne, wurde diese durch einen vertikal verlaufenden Schnitt mobilisiert und cranial aufgeklappt (Abb.8).

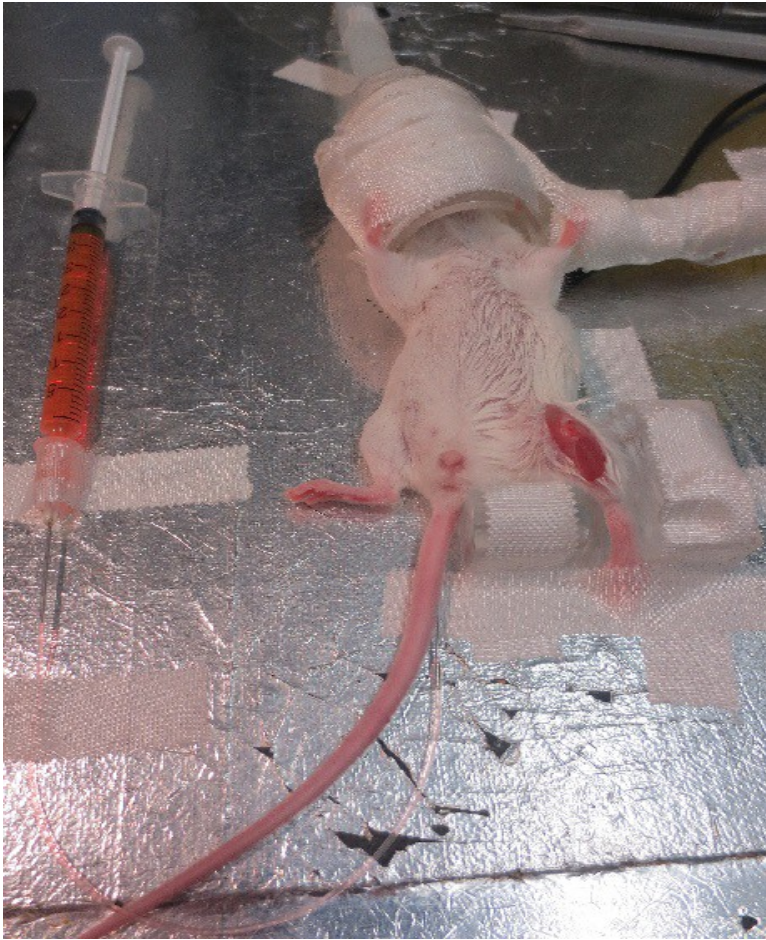


Abbildung 8: Versuchsaufbau mit mikrochirurgischer Präparation des Kniegelenks

3.2.2.4 Intravitalmikroskopie

Für die intravitalmikroskopische Untersuchung wurde der freigelegte Hoffa'sche Fettkörper mit isotonischer Kochsalzlösung besprüht und ein Deckglas aufgelegt. Als seitliche Stütze diente jeweils ein Tropfen Silikonpaste, die zu beiden Seiten des Knies aufgetragen wurde. Auf die Oberseite des Deckglases wurde ebenfalls ein Tropfen isotonischer Kochsalzlösung aufgetragen und anschließend das Immersionsobjektiv des Auflichtmikroskops angelegt. Durch das besagte Objektiv war eine bis zu 550fache Gesamtvergrößerung möglich. Um eine optimale Aufnahmequalität zu erreichen, wurde das Deckglas wiederholt von beiden Seiten

angefeuchtet. Eine Silberdampfcurzbogenlampe wurde als Lichtquelle verwendet. Im Genauen war das verwendete Mikroskop von Harris et al. beschrieben worden [Harris 1997].

Für die Fluoreszenzmarkierung der Leukozyten wurde 0,15ml/kg Körpergewicht Rhodamin 6G (0,05%) über den Schwanzvenenkatheter injiziert. Zuvor war der Farbstoff lichtgeschützt in einer sterilen Kochsalzlösung gelöst und in Insulinspritzen aufgezogen worden. Angeregt im grünen Wellenlängenbereich wurden die Leukozyten mit Hilfe der zuvor beschriebenen HBO Quecksilberdampflampe und des Filter Set 15 von Zeiss (band pass 546/12, Farbteiler 580, long pass 590) dargestellt. Mit einem Videorecorder, an den ein Videozeitgenerator angeschlossen war, wurden für jedes Tier drei 30 Sekunden lange Videoaufnahmen gemacht. Hierdurch wurden Flussgeschwindigkeit des Blutes sowie die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im Bereich postkapillärer Venolen auf Videokassetten dokumentiert.

Um das kapilläre Netzwerk darzustellen, wurde das Plasma mittels 5% Fluoresceinisothiocyanat-Dextran (FITC-Dextran) kontrastiert. Für eine optimale Darstellung des Kapillarbetts bedurfte es einer Dosis von 15mg/kg Körpergewicht. Auch dieser Plasma-Farbstoff war zuvor in isotonischer Kochsalzlösung gelöst worden. Die Plasmakontrastierung erfolgte im blauen Wellenlängen-Bereich durch eine variable Halogenlichtquelle (12V/100W) und das Filter Set 09 (band pass 450-490, Farbteiler 510, long pass 520). Auch hier wurden je drei Videoaufnahmen zu 30 Sekunden gemacht.

3.2.2.5 Auswertung und Datenerhebung der Intravitalmikroskopie

Über die Auswertungssoftware CapImage™, einem Computerprogramm für die Bildanalyse in der Mikrozirkulationsforschung, wurden die aufgenommenen Videosequenzen ausgewertet. Parameter der Mikrozirkulation waren die Flussgeschwindigkeit des Blutes, der

Gefäßdurchmesser des untersuchten Gefäßabschnitts, sowie dessen Länge. Die Erhebung dieser Daten erfolgte anhand der rhodaminkontrastierten Aufnahmen.

Mit der Line-Shift-Diagram-Methode der Auswertungssoftware wurde die Geschwindigkeit der sich im Gefäß bewegenden Erythrozyten gemessen und daraus die Flussgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ bestimmt. Der Gefäßdurchmesser in Micrometer (μm) errechnete sich durch die Mittelwertbestimmung des Abstands zweier parallel zueinander liegender Gefäßwände, gemessen an sechs Punkten. Die Gefäßlänge (μm) ermittelte sich über die Einzeichnung der gesamten Länge des Gefäßendothels.

Die Leukozyten-Endothelzell-Reaktion umfasste folgende Parameter, bezogen auf den Beobachtungszeitraum der 30-sekündigen Videosequenz:

1. Passierende Zellen: Summe aller in Flussgeschwindigkeit vorbeiziehender Leukozyten ohne Endothelkontakt
2. Rollende Zellen: Summe aller Leukozyten, die intermittierenden Kontakt zum Endothel hatten und sich unterhalb der Flussgeschwindigkeit bewegten
3. Adhärente Zellen: Summe aller permanent an einer Stelle verharrender Leukozyten mit ständigem Kontakt zum Endothel
4. Fraktion rollender Leukozyten: Quotient aus rollenden und passierenden Zellen
5. Fraktion adhärenter Leukozyten: Quotient aus adhärenter Zellen und Gefäßvolumen (Produkt aus Gefäßlänge, Faktor π und Gefäßdurchmesser)

Aus den mit FITC-Dextran kontrastierten Aufnahmen ließ sich die funktionelle Kapillardichte in cm/cm^2 berechnen. Dazu bedurfte es der Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren in Bezug auf den betrachteten Abschnitt (Gesichtsfeld).

3.3 Histologie

3.3.1 Präparatentnahme und Fixierung

Nach der Tötung der Versuchstiere und dem Entfernen der Gerätschaften, erfolgte innerhalb von 20 Minuten die Präparatentnahme für die weiterführenden histologischen Ausarbeitungen. Zunächst erfolgte, unter einer Sterilwerkbank, die komplette Desinfektion des Versuchstiers durch dreimaliges Tauchen in 70%igen Ethanol. Anschließend wurde der zuvor gesetzte Hautschnitt erweitert und das Fell der linken unteren Extremität entfernt. Ohne den Bandapparat des Kniegelenks zu verletzen, wurde die Muskulatur entfernt und Tiba sowie Femur jeweils mittig durchtrennt. Das so entnommene Kniegelenk wurde zur Fixierung in 4%iges Formalin überführt. Für weitere histologische und immunhistochemische Untersuchungen für weiterführende Studien, hier nicht weiter ausgeführt, wurden das rechte Kniegelenk sowie Leber, Lunge, Milz und Nieren entnommen.

3.3.2 Entkalkung und Entwässerung

Nach einer Fixierzeit von 24 Stunden wurden die linken Kniegelenke zur Entkalkung in 4%iges EDTA überführt und sieben Tage lang entkalkt. Die Entwässerung der entkalkten Gewebe erfolgte im Entwässerungsautomaten über eine aufsteigende Alkoholreihe mit nachgeschaltetem Xylol und anschließendem Paraffinbad. Hierfür wurden sie zur korrekten Zuordbarkeit in mit ihrer Versuchsnummer beschriftete Einbettkassetten gelegt.

3.3.3 Einbettung in Paraffinblöcke

Nach Entnahme der Proben aus dem Entwässerer, wurden die Kassetten in eine Wärmekammer der Ausgießstation gelegt, um vorzeitiges Aushärten des Paraffins zu vermeiden.

In vorgewärmte metallische Gussformen wurden die Knie, für eine spätere Anfertigung von Schnittpräparaten in sagittaler Ebene, auf der Seite liegend orientiert und mit 60°C heißen Paraffin übergossen. Zur besseren Positionierung wurde die Gussform auf einen Kühlstempel gestellt, wodurch das Paraffin zu erstarren begann. Nun konnte das Präparat fest angedrückt werden, sodass die gewünschte Lage erhalten blieb. Der beschriftete Boden der Einbettkassette wurde auf die Gussform gelegt und bis zum Rand mit Paraffin aufgefüllt. Zum vollständigen Erstarren des Paraffins wurde die Gussform auf eine Kühlplatte (-5°C) gestellt. Nach Aushärtung der Blöcke konnten diese aus der Gussform zur Weiterverarbeitung gelöst werden.

3.3.4 Herstellung von Schnittpräparaten

Der angefertigte Block wurde in die Blockhalterung des Rotationsmikrotoms eingespannt. Als Klinge dienten für hartes Gewebe geeignete Einmalklingen. Nach dem Anschneiden des Paraffinblocks bis zur Schnittebene, auf der das Präparat in Gänze zu sehen war, wurden 6µm dicke Feinschnitte angefertigt. Diese wurden auf ein 36°C warmes Wasserbad gegeben, um der durch das Schneiden hervorgerufenen Stauchung und möglicher Faltenbildung entgegenzuwirken. Im Anschluss wurden die Schnitte auf beschriftete und beschichtete Objektträger gezogen und zur Trocknung auf eine Heizplatte (60°C) gelegt. Um das überschüssige Paraffin ablaufen zu lassen, wurden die Schnitte anschließend in Objektträgerhalter bei 60°C in den Trockenschrank gestellt.

3.3.5 Übersichtsfärbung

Zur Darstellung der feingeweblichen Strukturen wurde eine Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) der Schnittpräparate angefertigt. Pro Versuchstier wurden drei Schnitte gefärbt, um eine repräsentative Aussage über die verschiedenen Schnittebenen hinweg zu erhalten.

Für eine optimale Anfärbung wurden die Schnitte in Xylol entparaffiniert und über eine absteigende Alkoholreihe ins wässrige Milieu der Farblösungen gebracht. Es erfolgte die Kernfärbung in Hämalaun mit anschließender Bläuung in Leitungswasser. Das Cytoplasma wurde mit Eosin gegengefärbt. Zum Erhalt der Färbung wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe geführt und über Xylol mittels eines Eindeckmediums eingedeckt.

Das Protokoll war wie folgt (Tab. 2):

Tabelle 2: Protokoll HE-Färbung

Lösung	Verweildauer
Xylol	3 Minuten (3x)
100% Ethanol	3 Minuten (3x)
96% Ethanol	2 Minuten (2x)
80% Ethanol	2 Minuten (2x)
70% Ethanol	3 Minuten
50% Ethanol	3 Minuten
Aqua destillata	3 Minuten (2x)
Hämalaun nach Maver	5 Minuten
Leitungswasser	1 Minute
Eosin G	2 Minuten
70% Ethanol	1 Minute
80% Ethanol	2 Minuten
100% Ethanol	2 Minuten
Xylol	5 Minuten (2x)

3.3.6 Mikroskopische Auswertung

Für die mikroskopische Auswertung wurden pro Versuchstier je drei repräsentative Schnitte ausgewählt [Zysk 2004, Zysk 2005].

Zur bildlichen Dokumentation wurde das Mikroskop mit einer Digitalkamera konnektiert. Mittels Bildanalyseprogramm wurde an jedem Schnitt eine 6-Punkt-Messung durchgeführt, mit je vier Messpunkten an der ventralen und zwei Messpunkten an der dorsalen Kniegelenkscapsel. Gemessen wurde die Dicke der Synovialmembran, wobei nur die synoviale Zellschicht und das synoviale Bindegewebe erfasst wurden. Perikapsuläres Fettgewebe und Muskulatur blieben unerfasst. Aus den gewonnen Messwerten wurde der mausspezifische Mittelwert der Membrandicke in Mikrometer (μm) berechnet [Zeintl 1989].

Zusätzlich erfolgte eine deskriptive Beurteilung der Präparate. Im Vordergrund standen die Synovialproliferation, Bildung von leukozytären Infiltraten und Kochen-/Knorpeldestruktionen.

Zur Graduierung der induzierten Inflammation wurde der von Brackertz et al. etablierte histologische Score verwendet [Brackertz 1978]:

- Score 0: unauffälliges Kniegelenk
- Score 1: normale Synovia mit vereinzelt verteilten mononukleären Zellen
- Score 2: zwei- bis dreischichtiges Synovium mit diffuser mononukleärer Infiltration
- Score 3: deutliche Hyperplasie der Synovia mit mehr als drei Zellschichten und dichter Infiltration mononukleärer Zellen
- Score 4: starke Arthritis mit Pannusbildung, chondrale und subchondrale Destruktion

3.4 Statistische Auswertung

Das Statistikprogramm zur statistischen Auswertung der Versuchsergebnisse war SigmaStat™. Die Daten der mikrozirkulatorischen Parameter, Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowie der funktionellen Kapillardichte wurden als Mittelwerte (MW) mit Standardfehler (SEM = standard error of the mean) je Maus berechnet. Bei dem histologischen Score nach Brackertz et al. [Brackertz 1978] wurde der Median ermittelt.

Zur statistischen Analyse der Tierversuche, nach Überprüfung auf Normalverteilung, wurde eine Kruskal-Wallis-Analyse gemacht. Zusätzlich wurden für die histologischen Ergebnisse mit dem Student-Newman-Keuls-Test multiple paarweise Vergleiche der Versuchsgruppen durchgeführt. Das definierte Signifikanzniveau war $p < 0,05$. Die Auswertung entsprach dem zuvor eingeholten statistischen Gutachten.

3.5 Geräte- und Verbrauchsmittelliste

Die Reihenfolge wurde bestimmt durch die Nennung der Materialien und Geräte.

Tabelle 3: Geräte und Verbrauchsmittel

Produkte	Hersteller
Balb/c-Mäuse	Charles-River-Wiga GmbH Sulzfeld, Deutschland
Tiernahrung Ssniff Standarddiät für Ratten u. Mäuse	Ssniff Spezialdiäten GmbH Soest, Deutschland
Wärmematte	KE-Gerätebau Effenberger München, Deutschland
Temperatursonde	Hugo Sachs, Elektronik – Harvard Apparatus GmbH March-Hugstetten, Deutschland
Dräger Isofluran-Vapor	Drägerwerk AG CO.KgaG Lübeck, Deutschland
Forene® Isofluran	Abbott GmbH Co. KG Wiesbaden, Deutschland
Arterieller Katheter	SIMS Portex Ltd., Smith Medical Kent, United Kingdom
Drucktransducer	Sirecust 300 D, Siemens AG München, Deutschland
Dexpanthenol-Salbe 5% Bepanthen®-Augensalbe	Bayer Vital GmbH Leverkusen, Deutschland
Insulinnadeln	Becton Dickinson GmbH S.A. Madrid, Spanien
Polyethylenschlauch Portex® Polyethylen-Tubing 0,4mm ID/0,8mm OD	Smith Medical International Ltd. Kent, United Kingdom
Isotonische Kochsalzlösung	Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland

Messschieber 150mm Genauigkeit 0,1mm	Mitutoyo Deutschland GmbH Neuss, Deutschland
Ultraschallbad Sonorex Super RK510H	Bandelin electronic GmbH & Co.KG Berlin, Deutschland
Hautdesinfektionsmittel Cutasept	Bode Chemie Hamburg, Deutschland
Mikrokanüle Gauge 33	Fine Science Tools GmbH Heidelberg, Deutschland
OP Mikroskop Wild M650, max. Vergrößerung: 40x	Wild Heerbrugg, Schweiz
Insulinspritze 1ml/40 IE	Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline	Biochrom GmbH Berlin, Deutschland
Deckglas	Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Silikonpaste Baysilone Paste mittelviskös	Bayer AG Leverkusen, Deutschland
Immersionsobjektiv Archoplan 20x/0,5 W	Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland
Auflichtmikroskop Axiotech Vario	Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland
Rhodamin 6G	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Filter Set 15	Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland
Video Kamera FK 6990 IQ-S	Pieper Schwerte, Deutschland
S-VHS Videorecorder SVO-9500 MDP	Sony GmbH Köln, Deutschland
Videozeitgenerator VT 633	Fora Company Ltd. Tokio, Japan
Videokassetten KCA 180min	Sony GmbH, Köln, Deutschland
Fluoresceinisothiocyanat-Dextran	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

Filter Set 09	Carl Zeiss AG Oberkochen, Deutschland
CapImage™	Dr. Zeintl Ingenieurbüro Heidelberg, Deutschland
Sterilwerkbank LaminAir	Heraeus Holding GmbH Hanau, Deutschland
Ethanol 70% vollständig vergällt mit Methylketon	Merck KgaA Darmstadt, Deutschland
Formalin 4% neutral gepuffert pH7	Apotheke, Campus Innenstadt, LMU München, Deutschland
EDTA 4%, Zitronensäure 20% pH7	Apotheke, Campus Innenstadt, LMU München, Deutschland
Entwässerungsautomat Hypercenter XP	Thermo Shandon GmbH Frankfurt, Deutschland
Ethanol 96% vollständig vergällt mit Methylketon	Apotheke, Campus Innenstadt, LMU München, Deutschland
Ethanol 100% vollständig vergällt mit Methylketon	Apotheke, Campus Innenstadt, LMU München, Deutschland
Xylol reinst >98%	PanReac AppliChem Darmstadt, Deutschland
Paraffin	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Einbettkassetten Tissue Tec Uni Cassette	Sakura Heppenheim, Deutschland
Ausgießstation Gießstation Leica EG 1160	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom Leica RM 2255	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Mikrotommesser Microtom Blade A35	Feather Safety Razor Co. Ltd. Osaka, Japan
Wasserbad Paraffin-Streckbad	Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel, Deutschland
Objektträger Superfrost® Plus	Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Färbeküvetten Objektträgerhalter	inkl. Wagner & Munz GmbH München, Deutschland

50% Ethanol vollständig vergällt mit Methylketon	Apotheke, Campus Innenstadt, LMU München, Deutschland
80% Ethanol vollständig vergällt mit Methylketon	Apotheke, Campus Innenstadt, LMU München, Deutschland
Hämalaunlösung sauer nach Mayer	Carl Roth GmbH & Co. KG Karlsruhe, Deutschland
Eosin Y Solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Eindeckmedium Eukitt	O. Kindler GmbH Freiburg, Deutschland
Deckgläser 24x32 mm	Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Mikroskop Olympus BX 41	Olympus Hamburg, Deutschland
Digitalkamera Olympus Camedia c-5060	Olympus Hamburg, Deutschland
Bildanalyseprogramm Olympus DP Software	Olympus Hamburg, Deutschland
Statistikprogramm SigmaStat™	Systat Software GmbH Deutschland

6. Ergebnisse

Die Auswertung erfolgte bei insgesamt 6 Gruppen (A - F) zu je 8 Versuchstieren sowie der Kontrollgruppe (PBS), die ebenfalls 8 Versuchstiere umfasste.

6.1 Kniegelenkdurchmesser

In Tabelle 4 wurden die Mittelwerte der gemessenen Kniegelenkdurchmesser vor und nach der Injektion dargestellt.

Tabelle 4: Mittelwerte sowie Minimum (min) und Maximum (max) der gemessenen Kniegelenkdurchmesser vor und nach der Injektion

Gruppe [n = 8]	Mittelwert sowie Minimum und Maximum (min-max) der Kniegelenkdurchmesser vor Injektion [mm]	Mittelwert sowie Minimum und Maximum (min-max) der Kniegelenkdurchmesser nach Injektion [mm]
PBS	4,1 (3,9 – 4,1)	4,2 (4,0 – 4,3)
A	4,0 (3,9 – 4,1)	4,0 (3,9 – 4,1)
B	4,1 (3,9 – 4,2)	4,1 (3,9 – 4,3)
C	4,2 (4,0 – 4,4)	4,3 (4,1 – 4,5)
D	4,2 (3,9 – 4,5)	4,4 (4,1 – 4,9)
E	4,1 (3,8 – 4,3)	4,1 (4,0 – 4,3)
F	4,1 (3,9 – 4,4)	4,3 (4,0 – 4,5)

Es konnte kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) der Kniegelenkdurchmesser zwischen der Kontrollgruppe und den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden. Auch unter den einzelnen Versuchsgruppen ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

6.2 Mikrozirkulatorische Parameter

Die mikrozirkulatorischen Parameter werden in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: Mittelwerte und Standardfehler der Blutflussgeschwindigkeit, Durchmesser der Venolen und der funktionalen Kapillardichte (* = $p < 0,05$)

Gruppe [n = 8]	Mittelwert und Standardfehler Blutfluss- geschwindigkeit [mm/s]	Mittelwert und Standardfehler Durchmesser der Venolen [μm]	Mittelwert und Standardfehler funktionelle Kapillardichte [cm/cm ²]
PBS	0,28 $\pm 0,02$	19 $\pm 1,2$	368 ± 10
A	0,33 $\pm 0,03$	22 $\pm 1,2$	412* ± 10
B	0,34 $\pm 0,02$	20 $\pm 0,7$	423* ± 8
C	0,30 $\pm 0,03$	24 $\pm 1,0$	409* ± 6
D	0,31 $\pm 0,03$	21 $\pm 1,0$	414* ± 7
E	0,31 $\pm 0,03$	22 $\pm 0,7$	420* ± 9
F	0,35 $\pm 0,02$	24 $\pm 0,7$	394* ± 11

Es konnte eine signifikante Zunahme der Kapillardichte der Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe festgestellt werden ($p < 0,05$). Die Versuchsgruppen untereinander verglichen, ergaben keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$).

6.3 Leukozyten-Endothelzell-Reaktion

6.3.1 Fraktion rollender Leukozyten

Im Vergleich zur Kontrollgruppe ergaben sich signifikant erhöhte Werte bei den Versuchsgruppen ($p < 0,05$). Innerhalb der Gruppen konnten keine signifikanten Unterschiede beobachtet werden ($p > 0,05$).

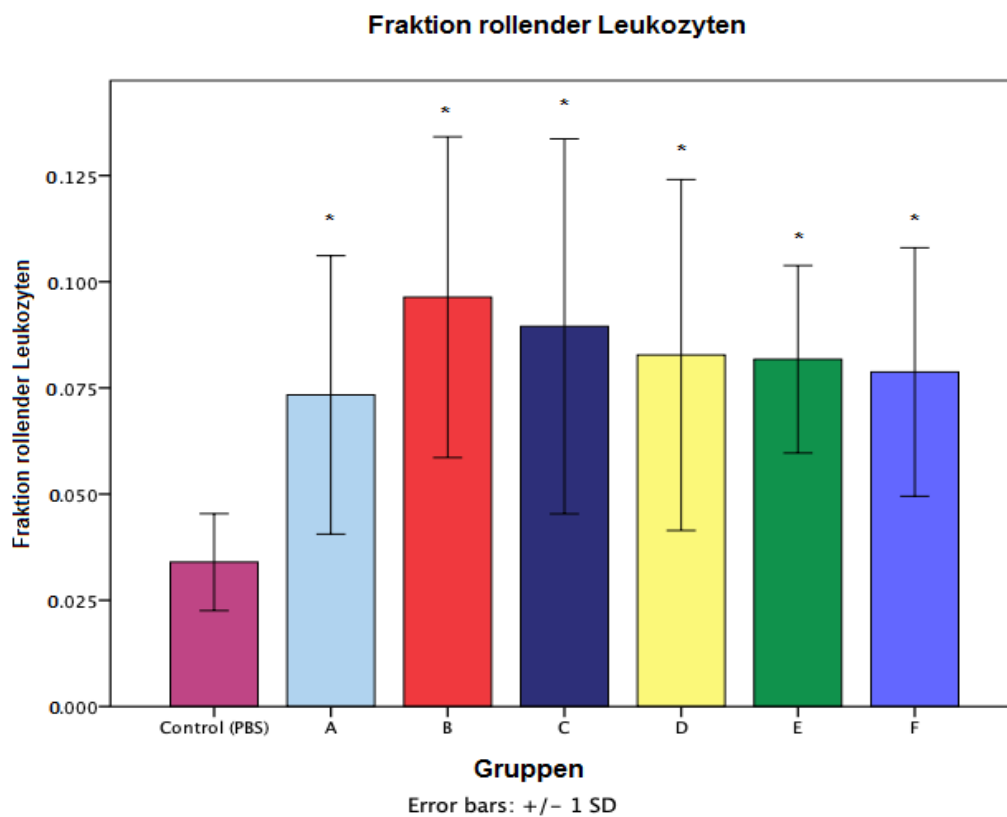


Abbildung 9: Fraktion rollender Leukozyten der Versuchsgruppen sowie Kontrollgruppe. Angegeben sind die Daten Als Mittelwert und Standardfehler. * = $p < 0,05$

6.3.2 Fraktion adhärenter Zellen

Die Versuchsgruppen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikante Unterschiede ($p < 0,05$), wohingegen untereinander keine signifikanten Abweichungen zu finden waren ($p > 0,05$).

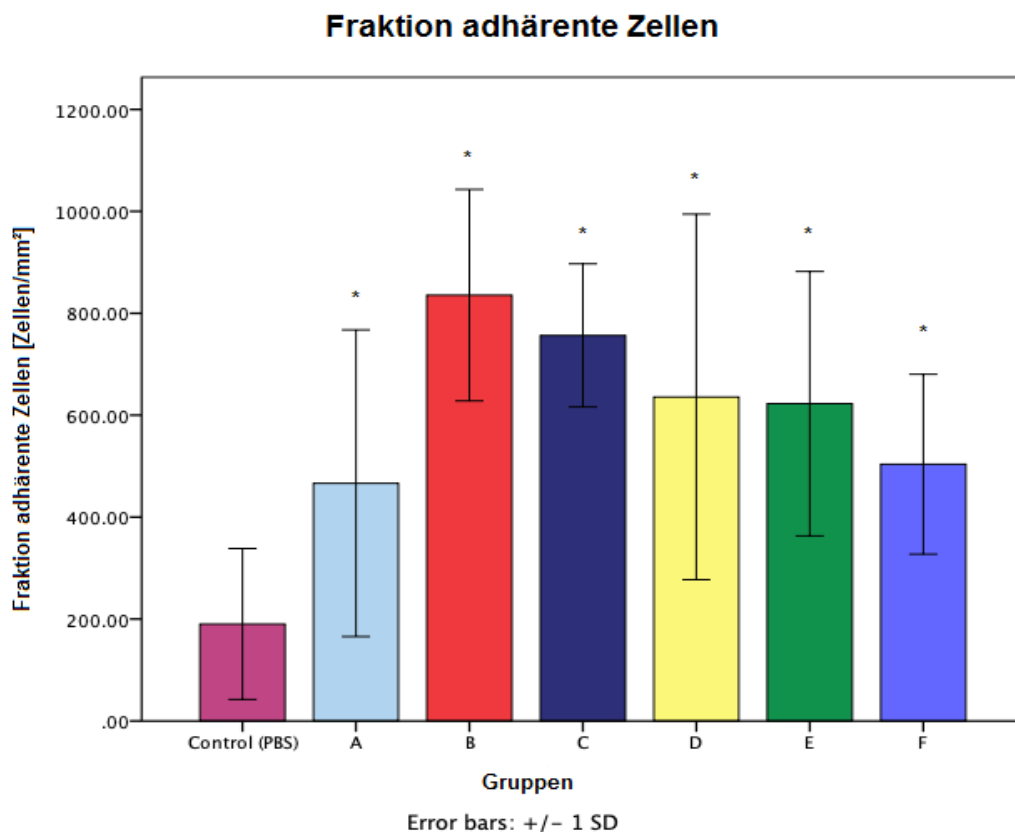


Abbildung 10: Fraktion adhärenter Zellen in Zellen/mm² der Kontrollgruppe sowie der Versuchsgruppen. Angegeben sind die Daten als Mittelwert und Standardfehler. * = $p < 0,05$

6.4 Histologie

6.4.1 Histopathologischer Synovialitis-Score und Dicke der Synovialmembran

In Tabelle 6 wurden die Ergebnisse der Auswertung der histologischen Parameter dargestellt.

Tabelle 6: Messwerte der Synovialmembrandicke und Histopathologischer Synovialitis-Score nach Brackertz et al. im Vergleich zur Kontrollgruppe (= $p < 0,05$)*

Gruppe [n = 8]	Mittelwert und Standardfehler Synovialmembrandicke [μm]	Mittlerer Histopathologischer Synovialitis-Score
PBS	46 ± 6	0
A	100* ± 5	1,3*
B	120* ± 6	1,5*
C	118* ± 4	1,8*
D	121* ± 6	1,8*
E	115* ± 6	1,5*
F	91* ± 3	1,5*

Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Versuchsgruppen einen signifikanten Unterschied in der Synovialmembrandicke und beim Histopathologischen Synovialitis-Score ($p < 0,05$). Innerhalb der Versuchsgruppen ergaben sich keine signifikanten Unterschiede ($p > 0,05$). Abbildung 9 zeigt die histologischen Schnitte. Gezeigt sind repräsentative Ausschnitte der Synovialis der Kniegelenke 7 Tage nach intraartikulärer Applikation der Partikelsuspensionen der unterschiedlichen Polyethylene (A -

F) sowie PBS als Kontrolle.

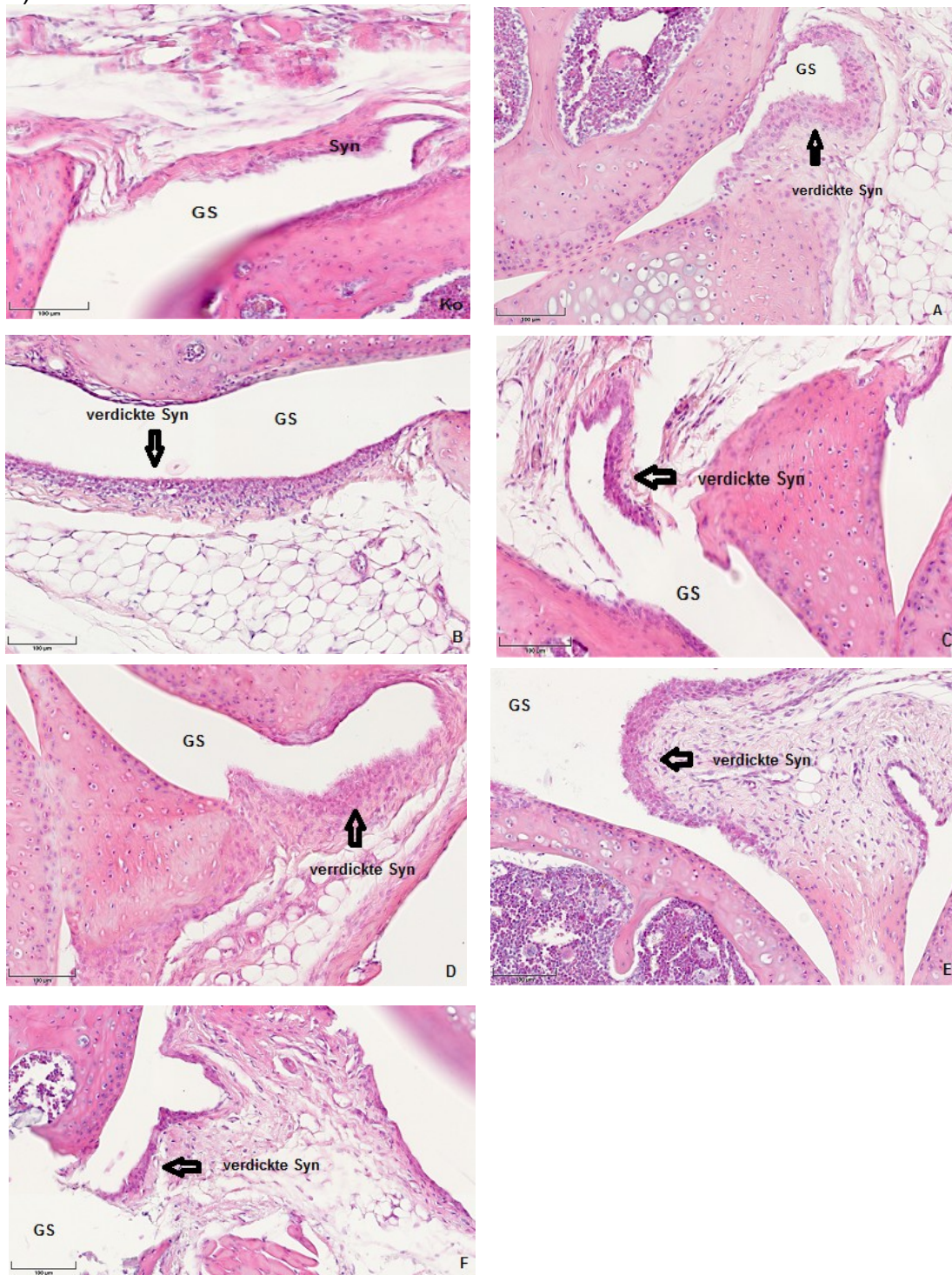


Abbildung 11: Histologische Darstellung der verdickten murinen Synovialmembran 7 Tage nach Partikelapplikation (A - F) im Vergleich zur PBS-Kontrolle (Ko). Vergrößerung 200-fach, Maßstab 100 µm

GS = Gelenkspalt; Syn = Synovia

Eine dünne synoviale Zellschicht mit lockerem Zellinfiltrat ist in der Kontrollgruppe zu sehen. In den Versuchsgruppen hingegen ist eine deutliche Zunahme der Synovialis mit erhöhter zellulärer Infiltration (Pfeil) zu erkennen.

7. Diskussion

Der häufigste Grund einer Revision in der Endoprothetik ist die aseptische Prothesenlockerung [Gallo 2013, Kaddick 2009, Tuan 2008, Wengler 2014, Wooley 2004, Yang 2007]. Die Ursache für diesen Prozess wird im Abrieb der Materialien von Gleitpaarungen gesehen [Fehring 2004, Naudie 2004, Purdue 2006, Wooley 2002]. Diese lösen im umgebenden Gewebe Entzündungsprozesse aus, die zu periprothetischen Osteolysen und schließlich zum Versagen der Prothese führen [Drees 2008, Holt 2007, Purdue 2006, Wooley 2004]. Auf zellulärer Ebene geschieht eine Aktivierung von Makrophagen, die durch Ausschüttung von Zytokinen und Chemokinen zu einer Aktivierung von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen führt [Gallo 2013, Goodman 2007, Ingham 2005, Nich 2014, Purdue 2008, Purdue 2007]. Das Ausmaß der durch den Abrieb hervorgerufenen Entzündungsreaktion ist dabei von der Anzahl, der Größe und Form der Partikel abhängig [Campbell 1995, Gelb 1994, Green 1998, Matthews 2000, Murray 1990, Shanbhag 1994, Sieving 2003, Zysk 2004, Zysk 2005]. Die stärksten Reaktionen wurden durch eine große Anzahl [Szivek 1996], kleiner [Bauer 2014, Hinarejos 2012, Zysk 2004] und deformierter [Zysk 2005] Partikel hervorgerufen.

Aufgrund dieser Erkenntnisse ist es ein dauerhaftes Bestreben, Materialien zu entwickeln, deren Abrieb möglichst minimal und wenig inflammatorisch ist. Seit den 60er Jahren wird hauptsächlich UHMWPE als Gleitpaarungsmaterial verwendet [Bellare 2005]. Allerdings fielen im Laufe der klinischen Anwendung Schwachstellen auf [Bellare 2005]. Diese umfassten einen hohen Verschleiß und eine rasche Materialermüdung des Werkstoffs [Bellare 2005, Crowninshield 2008, Kurtz 2009, McKellop 2000]. Eine Erhöhung der Verschleiß- und Abriebfestigkeit schaffte die zusätzliche Quervernetzung des UHMWPE zu cross-linked Polyethylen (XLPE) [Gencur 2003, MacQuarrie 2004, Sobieraj 2009].

7.1 Diskussion der Methodik

In der Literatur lassen sich verschiedene Möglichkeiten zur Untersuchung von Abriebpartikeln auf deren biologische Aktivität finden. Zum einen wurde mit *in vitro* Modellen gearbeitet, zum anderen mit *in vivo* Modellen [Catelas 1998, Dowd 1995, Green 2000, Harboe 2015, Illgen 2009, Illgen 2008, Kaufman 2008, Merkel 1999, Nakashima 1999, Rao 2013, Taki 2005, Timperley 2010, Yang 2007, Zhang 2009].

Bei *in vitro* Versuchen wurden die zu untersuchenden Partikel auf Makrophagen gegeben und in Kulturflaschen inkubiert [Catelas 1998, Green 1998, Illgen 2008, Kaufman 2008, Matthews 2000, Nakashima 1999]. Bei dieser Methode wurde die biologische Aktivität durch die von den Makrophagen in das Nährmedium abgegebenen Zytokinen und Chemokinen evaluiert [Green 2000, Illgen 2008, Kaufman 2008, Matthews 2000, Shanbhag 1994]. Auch bei fibroblastenähnlichen Synoviozyten (fibroblast-like synoviocytes (FLS)) wurden die biologische Aktivität durch von den FLS sezernierten Zytokinen evaluiert [Silverstein 2017]. Bei den zuvor genannten *in vitro* Modellen handelte es sich um Inflammationsmodelle [Green 2000, Green 1998, Illgen 2008, Kaufman 2008, Matthews 2000, Silverstein 2017]. Ein Osteolysemodell verwendeten Sartori et al., in welchem Partikel auf Osteoklastenvorläuferzellen gegeben wurden [Sartori 2017]. Untersucht wurde neben der inflammatorischen Potenz der Partikel auch die spontane Differenzierung der Vorläuferzellen zu aktiven Osteoklasten [Sartori 2017].

In vitro Modelle erlauben eine grundsätzliche Erforschung pathologischer Mechanismen, sind allerdings bei der Wechselwirkung mit anderen Zellen und der Erforschung von systemischen Reaktionen limitierend.

Ein etabliertes *in vivo* Modell stellt die subkutane Rückenlamina bei Mäusen [Ren 2004, Sieving 2003, Wang 2011, Wooley 2002] oder Goldhamstern [Kraft 2005, Kraft 2003] dar. Die Partikel wurden in die Rückenlamina gespritzt und inkubiert [Kraft 2005, Kraft 2003, Ren

2004, Sieving 2003, Wang 2011, Wooley 2002]. Das histologisch untersuchte Gewebe war subkutanes Fettgewebe [Sieving 2003, Wang 2011, Wooley 2002] oder Skelettmuskulatur [Kraft 2005, Kraft 2003] im Bereich des Rückens. Vorteilhaft ist die relativ einfache Durchführbarkeit und die leichte Zugänglichkeit des Orts der applizierten Partikel [Ren 2004]. Die Problematik dieses Modells besteht in der fehlenden Vergleichbarkeit der Rückenhautkammer mit dem Gelenkspalt. Osteolytische Auswirkungen der Partikel konnten somit nicht untersucht werden.

Das Calvaria-Osteolyse-Modell berücksichtigt die Knochenresorption [Illgen 2009, Merkel 1999, Rao 2013, Taki 2005]. Die zu untersuchenden Partikel wurden unter das Periost auf die Kortikalis der Calvaria von Versuchstieren appliziert [Illgen 2009, Merkel 1999, Rao 2013]. Durch histologische und immunhistochemische Untersuchungen wurde die biologische Aktivität der Abriebpartikel auf das Gewebe und die Schädelkalotte bestimmt [Merkel 1999, Rao 2013, Taki 2005]. Die Vorteile dieses Modells sind die einfache Durchführung sowie die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Verglichen mit den *in vitro* Modellen und den Rückenkammer-Modellen werden die Auswirkungen der Abriebpartikel auf die Knochenresorption berücksichtigt, wodurch sich Informationen über das Ausmaß der Osteolyse gewinnen lassen [Rao 2013, Taki 2005]. Allerdings ist die Anatomie der Schädelkalotte nicht vergleichbar mit einem Gelenk, wodurch die Wirkung der Partikel in einem sich bewegenden Gelenk nicht berücksichtigt wird [Merkel 1999, Rao 2013, Taki 2005].

Ein aufwendigeres Modell etablierte Yang et al. [Yang 2007]. In die Tibia von Mäusen wurde ein Kanal gebohrt, in welchen ein Titan- oder Stahlstift so eingesetzt wurde, dass der Kopf des Stifts bündig mit der knorpeligen Oberfläche des Tibia-Plateaus und der angrenzenden Gelenkfläche war [Yang 2007]. Abriebpartikel wurden vor dem Einsetzen des Stifts in den Kanal und nach Einsetzen intraartikulär appliziert [Yang 2007]. Über Mikro-CT wurde in regelmäßigen Abständen die Lage des Implantats und die

Veränderung der Knochendichte überprüft [Yang 2007]. Durch Messung der Kraft, die zur Extraktion des Stifts benötigt wurde, wurde die Verankerung des Implantats überprüft [Yang 2007]. Die an der Knochen-Implantat-Grenze gebildete Interface-Membran wurde histologisch aufgearbeitet und auf Osteolyseparameter untersucht [Yang 2007]. Mit diesem Modell konnten sowohl Veränderungen an der Knochen-Implantat-Grenze, der Knochendichte sowie das Ausmaß der Osteolyse als auch die Auswirkungen auf die knöcherne Verankerung des Implantats untersucht werden [Yang 2007]. Auch von Zhang et al. wurde diese Methode mehrmals benutzt [Zhang 2010, Zhang 2009]. Als Vorteil dieses Modells wird die intraartikuläre und intramedulläre Partikelapplikation gesehen, wodurch exakt das betroffene Gewebe untersucht werden kann [Yang 2007, Zhang 2010, Zhang 2009]. Auch wird die Knochen-Implantat-Grenze berücksichtigt, an der es zur Lockerung und schließlich auch Versagen von Implantaten kommt, sowie die Verankerung des Implantats [Yang 2007]. Allerdings erfordert das Einsetzen des Stifts, bedingt durch die geringe Größe der Tibia einer Maus, großes operatives Geschick, was für eine hohe Fehleranfälligkeit spricht [Yang 2007, Zhang 2010, Zhang 2009]. Zudem ist die Prozedur sehr zeitintensiv, was das Erreichen hoher Fallzahlen erschwert [Yang 2007, Zhang 2010, Zhang 2009]. Des Weiteren müssen die Stifte für Mäuse eigens angefertigt werden, was ebenfalls Zeit und auch Kosten beansprucht [Yang 2007].

Die Implantation von Gelenkprothesen ist nur bei größeren Tieren möglich. So wurden Hemiarthroplastiken in den Knien von Kaninchen [Sacomen 1998] und totale bei Kaninchen Hüftarthroplastiken [Dowd 1995, Shanbhag 1997], Hunden [Wise 2005] und Schafen [Harboe 2015, Timperley 2010] durchgeführt. Die periprothetische Osteolyse wurde mit radiologischen und histologischen Methoden gemessen [Dowd 1995, Harboe 2015, Shanbhag 1997, Timperley 2010, Wise 2005]

.Dieses aufwändige Versuchsmodell ist zum einen mit hohen Kosten, zum anderen mit einem hohen organisatorischen, technischen und zeitlichen Aufwand verbunden [Harboe 2015, Timperley 2010]. Auch lassen sich hohe Fallzahlen nur schwer erreichen, obwohl das Modell Ursache und Mechanismus periprothetischer Osteolysen gut wiedergibt [Harboe 2015].

Veihelmann et al. etablierten im Rahmen der Arthritisforschung ein Mausmodell, welches die Messung der synovialen Mikrozirkulation und der Leukozyten-Endothel-Interaktion am lebenden Tier mittels Intravitalmikroskopie ermöglichte [Veihelmann 1998]. Das Kniegelenk wurde als zu untersuchendes Gelenk ausgewählt, da der chirurgische Zugang ohne großes Trauma erfolgte [Veihelmann 1998]. Zysk et al. verwendete dieses Modell erstmals weiter, um die synoviale Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach Partikelapplikation zu untersuchen [Zysk 2003]. Die Migration von Leukozyten aus postkapillären Venolen stellt einen essentiellen Mechanismus in der Entzündungsreaktion dar [Murphy 2016]. Diese Migration der Leukozyten und die Veränderungen der Synovialmembran wurden von Zysk et al. beschrieben [Zysk 2004, Zysk 2005, Zysk 2003]. Es konnte gezeigt werden, dass die stärkste Entzündungsaktivität der Synovia am achten Tag nach Partikelapplikation gemessen wurde [Zysk 2003]. Im weiteren Verlauf klang die Entzündungsreaktion wieder ab [Zysk 2003]. Dies deutet darauf hin, dass der Körper dynamisch auf das Vorhandensein von Abriebpartikeln reagiert [Zysk 2003].

In dieser Studie wurde die Messung der synovialen Mikrozirkulation sowie der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion mittels Intravitalmikroskopie nach intraartikulärer Partikelapplikation nach dem Modell von Zysk durchgeführt [Zysk 2004, Zysk 2003]. Dieses Verfahren eignet sich zur quantitativen Analyse von akuten sowie chronisch entzündlichen Vorgängen im murinen Kniegelenk [Veihelmann 1999] und ermöglicht die Untersuchung der

inflammatorischen Potenz von Abriebpartikeln nach intraartikulärer Applikation [Zysk 2004, Zysk 2003].

Die gemessene funktionelle Kapillardichte ist ein Parameter für die Darstellung der Gewebepfusion [Nolte 1995, Veihelmann 1998], die gesteigert ein charakteristisches Merkmal entzündlicher Prozesse bildet [Murphy 2016]. Zugleich wurde bei periprothetischen Entzündungen und osteolytischen Prozessen eine verstärkte Neovaskularisierung beobachtet [al-Saffar 1995, Jell 2001, Tunyogi-Csapo 2007], die zusammen mit einer gesteigerten Angiogenese bei gelockerten Prothesen nachgewiesen wurde [al-Saffar 1995, Jell 2001, Tunyogi-Csapo 2007, Zysk 2003]. Somit eignet sich die Messung der funktionalen Kapillardichte zur Darstellung der Angiogenese und Gewebepfusion [Veihelmann 1999, Veihelmann 1998].

In Anwesenheit von Abriebpartikeln ließen sich Veränderungen der Mikrozirkulation und der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion feststellen [Kraft 2003, Zysk 2004]. So zeigten intravitalmikroskopische Untersuchungen, dass Partikel unterschiedlichen Materials [Kraft 2005, Kraft 2003] und auch unterschiedlicher Form und Größe [Kraft 2005, Kraft 2003, Zysk 2005] zu einer Veränderung der Mikrozirkulation und einer gesteigerten Migration von Leukozyten ins Gewebe führten [Kraft 2005, Kraft 2003, Zysk 2005].

Neben der Darstellung der synovialen Mikrozirkulation sowie der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden auch histologische Methoden zur Beurteilung der Synovialmembran und deren Dicke herangezogen. Brackertz et al. stellte einen histopathologischen Score zur Graduierung der induzierten Inflammation vor [Brackertz 1978], der ein anerkannter Parameter für entzündliche Veränderungen des Kniegelenks ist [Brackertz 1977, Brackertz 1978, Utschneider 2010a, Zysk 2004, Zysk 2005, Zysk 2003].

Es ist bekannt, dass Abriebpartikel zur Ausbildung einer Periimplantatmembran führen, bestehend aus Entzündungszellen und Abriebmaterial [Goldring 1986, Goldring 1983, Schmalzried 1992]. Zysk et al. beschrieben reaktive entzündliche Veränderungen der Synovialmembran

acht Tage nach intraartikulärer Applikation von Abriebpartikeln [Zysk 2004, Zysk 2005, Zysk 2003]. Die histologische Auswertung der Synovialmembran zeigte eine Zunahme der Dicke der synovialen Zell- und Bindegewebsschicht einhergehend mit einer Zunahme an monozytären Infiltraten [Zysk 2004, Zysk 2005]. Dies bestätigt die Vermutung, dass Abriebpartikel zu einer direkten Reaktion des umgebenden Gewebes führen, wodurch die Intravitalmikroskopie kombiniert mit einer histologischen Aufarbeitung des zu untersuchenden Gewebes ein geeignetes Verfahren darstellt, um die initialen biologischen Reaktionen festzustellen, zu messen und zu untersuchen [Utzschneider 2014, Utzschneider 2009b]. Im Gegensatz zu dem häufig angewandten Calvarienmodell können bei diesem Modell die biologischen Reaktionen direkt am betroffenen Gelenk und der Gelenkkapsel erfasst und gemessen werden. Es wird vermutet, dass neben den Makrophagen auch andere Zellen am Pathomechanismus periprothetischer Osteolysen beteiligt sind [al-Saffar 1999, Bauer 2014, Jiang 2013]. Darunter zählen Lymphozyten, Plasmazellen und eosinophile Leukozyten [Bauer 2014, Jiang 2013] sowie Osteo- und Fibroblasten [Fujii 2011, Jiang 2013, Koreny 2006, Vermes 2001] und Mast- und Endothelzellen [al-Saffar 1999, Purdue 2007]. So liegt der Vorteil des im Versuch gewählten Modells gegenüber *in vitro* Modellen darin, dass nicht nur einzelne Zelllinien in ihrer biologischen Reaktion untersucht werden können, sondern auch im direkten Zusammenspiel mit anderen vorhandenen Zelllinien sowie die Reaktion im Zellverbund.

Es ist jedoch zu sagen, dass das verwendete Versuchsmodell keine quantitativen Untersuchungen periprothetischer Osteolysen erlaubt. Zwar kann eine qualitative Aussage über das Vorhandensein von Osteolysen, hervorgerufen durch Abriebmaterial, getroffen werden, jedoch fehlt eine Knochen-Implantat-Grenze, an der die Mechanismen einer periprothetischen Osteolyse untersucht werden können, da es lediglich zu einer intraartikulären Partikelapplikation, jedoch zu keiner Implantation von endoprothetischem Material in den Knochen kommt. Bisher existiert allerdings noch kein Modell,

welches alle Parameter der periprothetischen Osteolyse umfasst und wiedergeben kann. Das verwendete Versuchsmodell umfasst die initiale Reaktion des artikulären Gewebes auf Abriebpartikel. Es konnte gezeigt werden, dass es sich bei dieser Reaktion um entzündliche Prozesse einhergehend mit Veränderungen am synovialen Gewebe handelt [Zysk 2004, Zysk 2003]. Auch ist bekannt, dass diese entzündlichen Prozesse zu einer Entzündungskaskade durch Ausschüttung proinflammatorischer Chemo- und Zytokine, die zu einer Aktivierung von Osteoklasten und deren Vorläuferzellen und somit zum osteolytischen Geschehen führen [Drees 2008, Gallo 2013, Holt 2007, Kaddick 2009, Purdue 2007, Wooley 2004].

Der gewählte Zeitraum zwischen Partikelinjektion und intravitalmikroskopischer Untersuchung war von Zysk et al. etabliert worden [Zysk 2003]. Die meisten in der Literatur etablierten Modelle verwenden ähnliche Zeiträume [Illgen 2009, Ren 2004, Taki 2005]. Auch hier sollte der Zeitraum nach der primären Fragestellung gewählt werden, wobei im Schädelkalottenmodell bereits nach 5 – 7 Tagen Osteolysen auftraten, sodass auch der schnelle Stoffwechsel der Maus bei der Wahl des Zeitraums berücksichtigt werden sollte [Taki 2005].

Da dem Partikelvolumen bei der inflammatorischen Reaktion auf Abriebpartikel eine bedeutende Rolle zukommt [Catelas 1998, Green 2000, Green 1998, Matthews 2000], wurde von Zysk et al. für das vorliegende Modell ein konstantes Partikelvolumen von 0,1 Vol% gewählt [Zysk 2004, Zysk 2005, Zysk 2003]. Margevicius et al. analysierten Abriebpartikel in der Pseudomembran gelockerter Endoprothesen, deren Volumenanteil in etwa 0,1 % betragen [Margevicius 1994], worauf sich Zysk et al. beriefen. Auch in anderen Studien wurde die Partikelkonzentration von 0,1 Vol% gewählt [Vermees 2001, Yao 1997].

7.2 Diskussion der Ergebnisse

Es kann gesagt werden, dass XPE und UHMWPE, die sich in Größe und Form gleichen [Paulus 2015], eine ähnliche inflammatorische Potenz besitzen. Die inflammatorischen Reaktionen der Synovialmembran zeigten dabei, keine Abhängigkeit zum Herstellungsprozess der Partikel.

Der Kniegelenkdurchmesser erhöhte sich im Vergleich zur Kontrollgruppe weder signifikant ($p > 0,05$) bei den UHMWPE- noch bei den XPE-Gruppen, was auf eine schwache inflammatorische Potenz hindeutet, da Schwellung ein deutlicher Parameter für eine Entzündung ist [Murphy 2016]. Eine signifikante Zunahme gab es hingegen bei der Synovialmembrandicke. Diese erhöhte sich signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings ließen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen UHMWPE und XPE ausmachen. Dies spiegelte sich auch bei den mikrozirkulatorischen Parametern wieder. Daraus lässt sich schließen, dass, bezogen auf die im Versuchsmodell verwendeten Partikel, die Quervernetzung keine Auswirkungen auf das inflammatorische Potential hat. Bischoff et al. zeigte in einer Simulatorstudie, dass der Abrieb von XPE um 74% geringer war als der von konventionellem Polyethylen [Bischoff 2015]. Dies zeigt den Vorteil von XPE gegenüber konventionellem PE [Bischoff 2015]. Auch konnte in Kurzzeitstudien eine verminderte Revisionsrate bei XPE verglichen zu konventionellem UHMWPE verzeichnet werden [de Steiger 2015, Meneghini 2016].

Kontrovers dazu hingegen stehen andere Studien, die keinen verringerten Abrieb von XPE im Patienten ausmachen konnten [Hinarejos 2013, Hinarejos 2012]. In diesen Studien wurden Patienten randomisiert konventionelles Polyethylen oder XPE als Gleitpaarungsmaterial eingesetzt [Hinarejos 2013, Hinarejos 2012]. Nach zwölf Monaten wurde Synovialflüssigkeit entnommen und elektronenmikroskopisch auf Abriebpartikel getestet [Hinarejos 2013, Hinarejos 2012]. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede in der

Anzahl der Abriebpartikel zwischen konventionellem Polyethylen und XPE festgestellt werden [Hinarejos 2013, Hinarejos 2012]. Hier ist zu bemerken, dass es sich um einen sehr kurzen Zeitraum handelt. Es wurden lediglich Proben nach einem Jahr entnommen. So ließen sich nur Aussagen über ein kurzfristiges Abriebverhalten machen. Es fehlen jedoch Aussagen über das langfristige Abriebverhalten der verschiedenen Polyethylene.

Lachiewicz et al. untersuchten in einem Nachsorgeuntersuchungszeitraum von durchschnittlich 4,5 Jahren Patienten mit implantiertem Oberflächenersatz aus konventionellem PE oder XPE auf Exsudate im Knie, Osteolysen und die Beweglichkeit der unteren Extremitäten [Lachiewicz 2016]. Dabei konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden [Lachiewicz 2016].

Die Entwicklung von XPE der zweiten Generation, die mit Vitamin E stabilisiert wurden, wird immer mehr diskutiert. In *in vitro* Studien konnte bereits gezeigt werden, dass Vitamin E sich positiv auf die Abriebfestigkeit auswirkt und die Oxidation des Materials, also die Materialermüdung, vermindert [Affatato 2012, Micheli 2012, Oral 2017, Oral 2011]. Dennoch fehlen hier repräsentative *in vivo* Studien und Langzeitergebnisse, was zukünftig weiter diskutiert werden muss.

Es bedarf also weiterer Studien, vor allem klinischer Langzeitstudien, die XPE auf Abriebfestigkeit, Osteolysen und Prothesenlockerungen hin untersuchen. Die Frage, ob XPE der bessere Werkstoff für Endoprothesen ist, ist noch nicht abschließend geklärt und wird für Knie-Endoprothesen noch weiter diskutiert werden und Bestandteil weiterer Studien sein. Es kann jedoch gesagt werden, dass die von uns untersuchten XPEs im Gegensatz zum eingesetzten konventionellen Polyethylen keine gesteigerte inflammatorische Potenz besitzen. Hinsichtlich der Abriebfestigkeit zeigt es sich auf jeden Fall als geeigneter und könnte konventionelles Polyethylen vom Markt drängen. Doch wird dies der klinische Einsatz langfristig zeigen.

8. Zusammenfassung

Die aseptische Prothesenlockerung ist nach wie vor der Hauptgrund einer Revision. Aus diesem Grund ist es wichtig, nach den Ursachen des Versagens zu forschen. Es ist bekannt, dass Abriebpartikel zu einer Entzündungsreaktion führen, in deren Folge eine gesteigerte Osteolyse zu einer Lockerung und schließlich einem Versagen der Endoprothese kommt. Der am häufigsten verwendete Werkstoff für Gleitpaarungen ist das ultra-high-molecular-weight-polyethylene (UHMWPE). Die Problematik dieses Werkstoffs liegt im hohen Verschleiß. Durch Quervernetzungen entstand ein verbesserter Werkstoff mit vermindertem Abrieb, dessen biologische Aktivität noch zu klären ist. Das Augenmerk dieser Arbeit liegt auf dem Vergleich von Partikeln sechs verschiedener Polyethylenpartikel, wovon zwei konventionelle und vier cross-linked Polyethylene waren, auf ihre inflammatorische Potenz hin zu untersuchen.

Die applizierten Polyethylenpartikel führten im Vergleich zur Kontrollgruppe zu einem etwa gleich hohen Anstieg der funktionellen Kapillardichte bei den Versuchsgruppen, wobei ein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) zwischen den Gruppen nicht festgestellt werden konnte. Auch die Untersuchung der Leukozyten-Endothelzell-Reaktion lieferte vergleichbare Ergebnisse. Zusätzlich erbrachten die histopathologischen Untersuchungen Hinweise darauf, dass es unter den Polyethylengruppen keine Unterschiede in der Intensität der hervorgerufenen Entzündungsreaktion gab. Zusammengefasst zeigten die intravitalmikroskopischen und histopathologischen Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Abriebpartikel von cross-linked Polyethylenen im Vergleich zur Kontrollgruppe eine inflammatorische Reaktion der Synovialmembran hervorrufen. Des Weiteren konnte nicht nachgewiesen werden, dass cross-linked Polyethylene die inflammatorische Potenz der Abriebpartikel im Vergleich zu konventionellen Polyethylenen erhöhen.

9. Literaturverzeichnis

1. Affatato, S., Bracco, P., Costa, L., Villa, T., Quaglini, V., Toni, A. In vitro wear performance of standard, crosslinked, and vitamin-E-blended UHMWPE. *Journal of biomedical materials research. Part A* 100 (2012) 554-560
2. al-Saffar, N., Mah, J.T., Kadoya, Y., Revell, P.A. Neovascularisation and the induction of cell adhesion molecules in response to degradation products from orthopaedic implants. *Annals of the rheumatic diseases* 54 (1995) 201-208
3. al-Saffar, N., Revell, P.A. Pathology of the bone-implant interfaces. *Journal of long-term effects of medical implants* 9 (1999) 319-347
4. Bader, R., Mittelmeier, W., Steinhauser, E. [Failure analysis of total knee replacement. Basics and methodological aspects of the damage analysis]. *Der Orthopade* 35 (2006) 896, 898-900, 902-893
5. Bauer, T.W., Campbell, P.A., Hallerberg, G. How have new bearing surfaces altered the local biological reactions to byproducts of wear and modularity? *Clinical orthopaedics and related research* 472 (2014) 3687-3698
6. Bellare, A., Spector, M. The Polyethylene History. (2005) In: "Total Knee Arthroplasty: A Guide to Get Better Performance", Bellemans J, Ries MD, Victor JMK (eds) Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg, 2005, vol, pp 45-50
7. Bichara, D.A., Malchau, E., Sillesen, N.H., Cakmak, S., Nielsen, G.P., Muratoglu, O.K. Vitamin E-diffused highly cross-linked UHMWPE particles induce less osteolysis compared to highly cross-linked virgin UHMWPE particles in vivo. *The Journal of arthroplasty* 29 (2014) 232-237
8. Bischoff, J.E., Fryman, J.C., Parcell, J., Orozco Villasenor, D.A.

- Influence of crosslinking on the wear performance of polyethylene within total ankle arthroplasty. *Foot & ankle international* 36 (2015) 369-376
9. Brackertz, D., Mitchell, G.F., Vadas, M.A., Mackay, I.R., Miller, J.F. Studies on antigen-induced arthritis in mice. II. Immunologic correlates of arthritis susceptibility in mice. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) 118 (1977) 1639-1644
 10. Brackertz, D., Mitchell, G.F., Vadas, M.A., Miller, J.A. [Antigen-induced arthritis in mice: genetic and immunologic studies]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Rheumatologie* 5 (1978) 154-159
 11. Burton, L., Paget, D., Binder, N.B., Bohnert, K., Nestor, B.J., Sculco, T.P., Santambrogio, L., Ross, F.P., Goldring, S.R., Purdue, P.E. Orthopedic wear debris mediated inflammatory osteolysis is mediated in part by NALP3 inflammasome activation. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 31 (2013) 73-80
 12. Campbell, P., Ma, S., Yeom, B., McKellop, H., Schmalzried, T.P., Amstutz, H.C. Isolation of predominantly submicron-sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *Journal of biomedical materials research* 29 (1995) 127-131
 13. Carlos, T., Harlan, J. Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84 (1994) 2068-2101
 14. Catelas, I., Huk, O.L., Petit, A., Zukor, D.J., Marchand, R., Yahia, L. Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: effects of size, concentration, and composition. *Journal of biomedical materials research* 41 (1998) 600-607
 15. Cobelli, N., Scharf, B., Crisi, G.M., Hardin, J., Santambrogio, L. Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices. *Nature reviews. Rheumatology* 7 (2011) 600-608
 16. Crowninshield, R.D., Muratoglu, O.K. How have new sterilization

- techniques and new forms of polyethylene influenced wear in total joint replacement? The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons 16 Suppl 1 (2008) S80-85
17. de Steiger, R.N., Muratoglu, O., Lorimer, M., Cuthbert, A.R., Graves, S.E. Lower prosthesis-specific 10-year revision rate with crosslinked than with non-crosslinked polyethylene in primary total knee arthroplasty. *Acta orthopaedica* 86 (2015) 721-727
 18. Diehl, P., Gerdesmeyer, L., Schauwecker, J., Kreuz, P.C., Gollwitzer, H., Tischer, T. Konservative Therapie der Gonarthrose. *Der Orthopade* 42 (2013) 125-139
 19. Digas, G., Karrholm, J., Thanner, J., Malchau, H., Herberts, P. Highly cross-linked polyethylene in cemented THA: randomized study of 61 hips. *Clinical orthopaedics and related research* (2003) 126-138
 20. Dowd, J.E., Schwendeman, L.J., Macaulay, W., Doyle, J.S., Shanbhag, A.S., Wilson, S., Herndon, J.H., Rubash, H.E. Aseptic loosening in uncemented total hip arthroplasty in a canine model. *Clinical orthopaedics and related research* (1995) 106-121
 21. Drees, P., Eckardt, A., Gay, R.E., Gay, S., Huber, L.C. [Molecular pathways in aseptic loosening of orthopaedic endoprosthesis]. *Biomedizinische Technik. Biomedical engineering* 53 (2008) 93-103
 22. Dumbleton, J.H., D'Antonio, J.A., Manley, M.T., Capello, W.N., Wang, A. The basis for a second-generation highly cross-linked UHMWPE. *Clinical orthopaedics and related research* 453 (2006) 265-271
 23. Fehring, T.K., Murphy, J.A., Hayes, T.D., Roberts, D.W., Pomeroy, D.L., Griffin, W.L. Factors influencing wear and osteolysis in press-fit condylar modular total knee replacements. *Clinical orthopaedics and related research* (2004) 40-50
 24. Flören, M., Reichel, H. Implantate. (2011) In: "AE-Manual der Endoprothetik: Knie", Wirtz DC (ed) Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg, 2011, vol, pp 57-71

25. Fujii, J., Niida, S., Yasunaga, Y., Yamasaki, A., Ochi, M. Wear debris stimulates bone-resorbing factor expression in the fibroblasts and osteoblasts. *Hip international : the journal of clinical and experimental research on hip pathology and therapy* 21 (2011) 231-237
26. Gallo, J., Goodman, S.B., Konttinen, Y.T., Wimmer, M.A., Holinka, M. Osteolysis around total knee arthroplasty: a review of pathogenetic mechanisms. *Acta biomaterialia* 9 (2013) 8046-8058
27. Gelb, H., Schumacher, H.R., Cuckler, J., Ducheyne, P., Baker, D.G. In vivo inflammatory response to polymethylmethacrylate particulate debris: effect of size, morphology, and surface area. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 12 (1994) 83-92
28. Gencur, S.J., Rimnac, C.M., Kurtz, S.M. Failure micromechanisms during uniaxial tensile fracture of conventional and highly crosslinked ultra-high molecular weight polyethylenes used in total joint replacements. *Biomaterials* 24 (2003) 3947-3954
29. Goldring, S.R., Jasty, M., Roelke, M.S., Rourke, C.M., Bringham, F.R., Harris, W.H. Formation of a synovial-like membrane at the bone-cement interface. Its role in bone resorption and implant loosening after total hip replacement. *Arthritis and rheumatism* 29 (1986) 836-842
30. Goldring, S.R., Schiller, A.L., Roelke, M., Rourke, C.M., O'Neil, D.A., Harris, W.H. The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 65 (1983) 575-584
31. Goodman, S.B. Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials* 28 (2007) 5044-5048
32. Green, T.R., Fisher, J., Matthews, J.B., Stone, M.H., Ingham, E. Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles.

- Journal of biomedical materials research 53 (2000) 490-497
33. Green, T.R., Fisher, J., Stone, M., Wroblewski, B.M., Ingham, E. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials* 19 (1998) 2297-2302
 34. Gu, Q., Shi, Q., Yang, H. The role of TLR and chemokine in wear particle-induced aseptic loosening. *Journal of biomedicine & biotechnology* 2012 (2012) 596870
 35. Guenter, U. (2015) Die Synovialitis.
 36. Gul, R.M., Fung, K., Doshi, B.N., Oral, E., Muratoglu, O.K. Surface cross-linked UHMWPE using peroxides. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* (2017)
 37. Halcour, A. Wie Ligamente das Knie stabilisieren. *physiopraxis* 4 (2006) 24-27
 38. Harboe, K., Ellingsen, C.L., Sudmann, E., Gjerdet, N.R., Soreide, K., Indrekvam, K. Can bone apposition predict the retention force of a femoral stem? An experimental weight-bearing hip-implant model in goats. *BMC musculoskeletal disorders* 16 (2015) 102
 39. Harris, A.G., Hecht, R., Peer, F., Nolte, D., Messmer, K. An improved intravital microscopy system. *International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation* 17 (1997) 322-327
 40. Havelin, L.I., Engesaeter, L.B., Espehaug, B., Furnes, O., Lie, S.A., Vollset, S.E. The Norwegian Arthroplasty Register: 11 years and 73,000 arthroplasties. *Acta orthopaedica Scandinavica* 71 (2000) 337-353
 41. Hinarejos, P., Pinol, I., Torres, A., Prats, E., Gil-Gomez, G., Puig-Verdie, L. Highly crosslinked polyethylene does not reduce the wear in total knee arthroplasty: in vivo study of particles in synovial fluid. *The*

- Journal of arthroplasty 28 (2013) 1333-1337
42. Hinarejos, P., Torres, A., Pinol, I., Valverde, D., Prats, E., Puig, L. [Polyethylene particles in synovial fluid after knee arthroplasty with a conventional or highly cross-linked polyethylene. Preliminary study]. *Revista espanola de cirugia ortopedica y traumatologia* 56 (2012) 210-215
 43. Hodrick, J.T., Severson, E.P., McAlister, D.S., Dahl, B., Hofmann, A.A. Highly crosslinked polyethylene is safe for use in total knee arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research* 466 (2008) 2806-2812
 44. Holt, G., Murnaghan, C., Reilly, J., Meek, R.M. The biology of aseptic osteolysis. *Clinical orthopaedics and related research* 460 (2007) 240-252
 45. Huot, J.C., Van Citters, D.W., Currier, J.H., Collier, J.P. The effect of radiation dose on the tensile and impact toughness of highly cross-linked and remelted ultrahigh-molecular weight polyethylenes. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 97 (2011) 327-333
 46. Illgen, R.L., 2nd, Bauer, L.M., Hotujec, B.T., Kolpin, S.E., Bakhtiar, A., Forsythe, T.M. Highly crosslinked vs conventional polyethylene particles: relative in vivo inflammatory response. *The Journal of arthroplasty* 24 (2009) 117-124
 47. Illgen, R.L., 2nd, Forsythe, T.M., Pike, J.W., Laurent, M.P., Blanchard, C.R. Highly crosslinked vs conventional polyethylene particles--an in vitro comparison of biologic activities. *The Journal of arthroplasty* 23 (2008) 721-731
 48. Ingham, E., Fisher, J. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials* 26 (2005) 1271-1286
 49. Jacofsky, D.J. Highly cross-linked polyethylene in total knee arthroplasty: in the affirmative. *The Journal of arthroplasty* 23 (2008)

28-30

50. Jell, G.M., Al-Saffar, N. Does a pro-angiogenic state exist in the bone-implant interface of aseptically loosened joint prosthesis? *Journal of materials science. Materials in medicine* 12 (2001) 1069-1073
51. Jerosch, J., Heisel, J. Grundlagen der Knieendoprothetik. (1999) In: "Knieendoprothetik", Springer, 1999, vol, pp 45-74
52. Jiang, Y., Jia, T., Wooley, P.H., Yang, S.Y. Current research in the pathogenesis of aseptic implant loosening associated with particulate wear debris. *Acta orthopaedica Belgica* 79 (2013) 1-9
53. Junqueira, L.C., Carneiro, J. "Histologie, Lehrbuch der Cytologie, Histologie und mikroskopischen Anatomie des Menschen" Springer-Verlag, Tokyo, 1984
54. Kaddick, C., Catelas, I., Pennekamp, P.H., Wimmer, M.A. [Implant wear and aseptic loosening. An overview]. *Der Orthopade* 38 (2009) 690-697
55. Kaufman, A.M., Alabre, C.I., Rubash, H.E., Shanbhag, A.S. Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays. *Journal of biomedical materials research. Part A* 84 (2008) 464-474
56. Kitaura, H., Zhou, P., Kim, H.J., Novack, D.V., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *The Journal of clinical investigation* 115 (2005) 3418-3427
57. Kohn, D., Rupp, S. Alloarthroplastik des Kniegelenkes. *Der Orthopade* 28 (1999) 975-995
58. Koreny, T., Tunyogi-Csapo, M., Gal, I., Vermes, C., Jacobs, J.J., Glant, T.T. The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis. *Arthritis and rheumatism* 54 (2006) 3221-3232
59. Kraft, C.N., Burian, B., Diedrich, O., Gessmann, J., Wimmer, M.A., Pennekamp, P.H. Microvascular response of striated muscle to

- common arthroplasty-alloys: A comparative in vivo study with CoCrMo, Ti-6Al-4V, and Ti-6Al-7Nb. *Journal of biomedical materials research. Part A* 75 (2005) 31-40
60. Kraft, C.N., Diedrich, O., Burian, B., Schmitt, O., Wimmer, M.A. Microvascular response of striated muscle to metal debris. A comparative in vivo study with titanium and stainless steel. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 85 (2003) 133-141
 61. Krämer, G. Kniegelenk. (2005) In: "Orthopädie", Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg, 2005, vol, pp 241-257
 62. Krukemeyer, M.G., Möllenhoff, G. "Endoprothetik: ein Leitfaden für den Praktiker" Walter de Gruyter 2013
 63. Kurtz, S.M. "UHMWPE biomaterials handbook: ultra high molecular weight polyethylene in total joint replacement and medical devices" Academic Press 2009
 64. Kurtz, S.M., Mazzucco, D., Rimnac, C.M., Schroeder, D. Anisotropy and oxidative resistance of highly crosslinked UHMWPE after deformation processing by solid-state ram extrusion. *Biomaterials* 27 (2006) 24-34
 65. Lachiewicz, P.F., Soileau, E.S. Is There a Benefit to Highly Crosslinked Polyethylene in Posterior-stabilized Total Knee Arthroplasty? A Randomized Trial. *Clinical orthopaedics and related research* 474 (2016) 88-95
 66. Landgraeber, S., Jager, M., Jacobs, J.J., Hallab, N.J. The pathology of orthopedic implant failure is mediated by innate immune system cytokines. *Mediators of inflammation* 2014 (2014) 185150
 67. Libouban, H., Massin, P., Gaudin, C., Mercier, P., Basle, M.F., Chappard, D. Migration of wear debris of polyethylene depends on bone microarchitecture. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 90 (2009) 730-737
 68. Lühr, J.F., Katzer, A. Die aseptische Hüftendoprothesenlockerung.

- (2005) In: "Hüftchirurgie in der Praxis", Meyer R-P, Gächter A, Kappeler U (eds) Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg, 2005, vol, pp 235-246
69. Lucht, U. The Danish Hip Arthroplasty Register. *Acta orthopaedica Scandinavica* 71 (2000) 433-439
 70. MacDonald, D., Sakona, A., Ianuzzi, A., Rimnac, C.M., Kurtz, S.M. Do first-generation highly crosslinked polyethylenes oxidize in vivo? *Clinical orthopaedics and related research* 469 (2011) 2278-2285
 71. MacQuarrie, R.A., Fang Chen, Y., Coles, C., Anderson, G.I. Wear-particle-induced osteoclast osteolysis: the role of particulates and mechanical strain. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 69 (2004) 104-112
 72. Manning, D.W., Chiang, P.P., Martell, J.M., Galante, J.O., Harris, W.H. In vivo comparative wear study of traditional and highly cross-linked polyethylene in total hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty* 20 (2005) 880-886
 73. Margevicius, K.J., Bauer, T.W., McMahon, J.T., Brown, S.A., Merritt, K. Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 76 (1994) 1664-1675
 74. Massin, P., Achour, S. Wear products of total hip arthroplasty: The case of polyethylene. *Morphologie : bulletin de l'Association des anatomistes* 101 (2017) 1-8
 75. Massin, P., Chappard, D., Flautre, B., Hardouin, P. Migration of polyethylene particles around nonloosened cemented femoral components from a total hip arthroplasty-an autopsy study. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 69 (2004) 205-215
 76. Matthews, J.B., Besong, A.A., Green, T.R., Stone, M.H., Wroblewski, B.M., Fisher, J., Ingham, E. Evaluation of the response of primary

- human peripheral blood mononuclear phagocytes to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles of known size and dose. *Journal of biomedical materials research* 52 (2000) 296-307
77. McKellop, H., Shen, F.W., Lu, B., Campbell, P., Salovey, R. Effect of sterilization method and other modifications on the wear resistance of acetabular cups made of ultra-high molecular weight polyethylene. A hip-simulator study. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 82-a (2000) 1708-1725
 78. Menche, N. "Biologie Anatomie Physiologie" Elsevier Urban & Fischer 2007
 79. Meneghini, R.M., Ireland, P.H., Bhowmik-Stoker, M. Multicenter Study of Highly Cross-linked vs Conventional Polyethylene in Total Knee Arthroplasty. *The Journal of arthroplasty* 31 (2016) 809-814
 80. Merkel, K.D., Erdmann, J.M., McHugh, K.P., Abu-Amer, Y., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *The American journal of pathology* 154 (1999) 203-210
 81. Micheli, B.R., Wannomae, K.K., Lozynsky, A.J., Christensen, S.D., Muratoglu, O.K. Knee simulator wear of vitamin E stabilized irradiated ultrahigh molecular weight polyethylene. *The Journal of arthroplasty* 27 (2012) 95-104
 82. Muratoglu, O.K., Bragdon, C.R., Jasty, M., O'Connor, D.O., Von Knoch, R.S., Harris, W.H. Knee-simulator testing of conventional and cross-linked polyethylene tibial inserts. *The Journal of arthroplasty* 19 (2004) 887-897
 83. Muratoglu, O.K., Bragdon, C.R., O'Connor, D.O., Perinchief, R.S., Jasty, M., Harris, W.H. Aggressive wear testing of a cross-linked polyethylene in total knee arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research* (2002) 89-95
 84. Murphy, K., Weaver, C. "Janeway's immunobiology" Garland

Science2016

85. Murray, D.W., Rushton, N. Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 72 (1990) 988-992
86. Mutimer, J., Devane, P.A., Adams, K., Horne, J.G. Highly crosslinked polyethylene reduces wear in total hip arthroplasty at 5 years. *Clinical orthopaedics and related research* 468 (2010) 3228-3233
87. Nakashima, Y., Sun, D.H., Trindade, M.C., Maloney, W.J., Goodman, S.B., Schurman, D.J., Smith, R.L. Signaling pathways for tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 expression in human macrophages exposed to titanium-alloy particulate debris in vitro. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 81 (1999) 603-615
88. Naudie, D.D., Rorabeck, C.H. Sources of osteolysis around total knee arthroplasty: wear of the bearing surface. *Instructional course lectures* 53 (2004) 251-259
89. Nich, C., Goodman, S.B. Role of macrophages in the biological reaction to wear debris from joint replacements. *Journal of long-term effects of medical implants* 24 (2014) 259-265
90. Nolte, D., Zeintl, H., Steinbauer, M., Pickelmann, S., Messmer, K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation* 15 (1995) 244-249
91. Noordin, S., Masri, B. Periprosthetic osteolysis: genetics, mechanisms and potential therapeutic interventions. *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie* 55 (2012) 408-417
92. Oral, E., Doshi, B.N., Gul, R.M., Neils, A.L., Kayandan, S., Muratoglu, O.K. Peroxide cross-linked UHMWPE blended with vitamin E. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 105 (2017) 1379-1389

93. Oral, E., Muratoglu, O.K. Vitamin E diffused, highly crosslinked UHMWPE: a review. *International orthopaedics* 35 (2011) 215-223
94. Orthoworld (2013) *The Orthopaedic Industry Annual Report - Executive Summary - 7.*
95. Pajarinen, J., Jamsen, E., Konttinen, Y.T., Goodman, S.B. Innate immune reactions in septic and aseptic osteolysis around hip implants. *Journal of long-term effects of medical implants* 24 (2014) 283-296
96. Pap, G., Meinecke, I. Ätiologie und Pathogenese der Gonarthrose. (2011) In: "AE-Manual der Endoprothetik: Knie", Wirtz DC (ed) Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg, 2011, vol, pp 33-46
97. Paulus, A.C., Frenzel, J., Ficklscherer, A., Rossbach, B.P., Melcher, C., Jansson, V., Utzschneider, S. Polyethylene wear particles induce TLR 2 upregulation in the synovial layer of mice. *Journal of materials science. Materials in medicine* 25 (2014) 507-513
98. Paulus AC, Franke M, Kraxenberger M, Schroder C, Jansson V, Utzschneider S. PMMA third-body wear after unicondylar knee arthroplasty decouples the UHMWPE wear particle generation in vitro. *BioMed research international*. 2015;2015:575849.
99. Pearl, J.I., Ma, T., Irani, A.R., Huang, Z., Robinson, W.H., Smith, R.L., Goodman, S.B. Role of the Toll-like receptor pathway in the recognition of orthopedic implant wear-debris particles. *Biomaterials* 32 (2011) 5535-5542
100. Platzer, W., Kahle, W., Leonhardt, H. *Taschenatlas der Anatomie.* (1991) In: "Bewegungsapparat", Thieme Stuttgart, 1991, vol 1,
101. Prescher, A. *Anatomie des Kniegelenks (Articulatio genus).* (2011) In: "AE-Manual der Endoprothetik: Knie", Wirtz DC (ed) Springer Berlin Heidelberg Berlin, Heidelberg, 2011, vol, pp 1-18
102. Puolakka, T.J., Pajamaki, K.J., Halonen, P.J., Pulkkinen, P.O., Paavolainen, P., Nevalainen, J.K. The Finnish Arthroplasty Register: report of the hip register. *Acta orthopaedica Scandinavica* 72 (2001) 433-441

103. Purdue, P.E. Alternative macrophage activation in periprosthetic osteolysis. *Autoimmunity* 41 (2008) 212-217
104. Purdue, P.E., Koulouvaris, P., Nestor, B.J., Sculco, T.P. The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis. *HSS journal : the musculoskeletal journal of Hospital for Special Surgery* 2 (2006) 102-113
105. Purdue, P.E., Koulouvaris, P., Potter, H.G., Nestor, B.J., Sculco, T.P. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clinical orthopaedics and related research* 454 (2007) 251-261
106. Radi, Z.A., Kehrl, M.E., Jr., Ackermann, M.R. Cell adhesion molecules, leukocyte trafficking, and strategies to reduce leukocyte infiltration. *Journal of veterinary internal medicine* 15 (2001) 516-529
107. Rao, A.J., Zwingenberger, S., Valladares, R., Li, C., Lane Smith, R., Goodman, S.B., Nich, C. Direct subcutaneous injection of polyethylene particles over the murine calvaria results in dramatic osteolysis. *International orthopaedics* 37 (2013) 1393-1398
108. Ren, P.G., Irani, A., Huang, Z., Ma, T., Biswal, S., Goodman, S.B. Continuous infusion of UHMWPE particles induces increased bone macrophages and osteolysis. *Clinical orthopaedics and related research* 469 (2011) 113-122
109. Ren, W., Yang, S.Y., Wooley, P.H. A novel murine model of orthopaedic wear-debris associated osteolysis. *Scandinavian journal of rheumatology* 33 (2004) 349-357
110. Revell, P.A. The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses. *Journal of the Royal Society, Interface* 5 (2008) 1263-1278
111. Ries, M.D. Highly cross-linked polyethylene: the debate is over--in opposition. *The Journal of arthroplasty* 20 (2005a) 59-62
112. Ries, M.D., Pruitt, L. Effect of cross-linking on the microstructure and mechanical properties of ultra-high molecular weight polyethylene.

- Clinical orthopaedics and related research 440 (2005b) 149-156
113. Ring, K.a. (2016) Knieendoprothese.
 114. Rodriguez, J.A. Cross-linked polyethylene in total knee arthroplasty: in opposition. *The Journal of arthroplasty* 23 (2008) 31-34
 115. Rowell, S.L., Oral, E., Muratoglu, O.K. Comparative oxidative stability of alpha-tocopherol blended and diffused UHMWPEs at 3 years of real-time aging. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 29 (2011) 773-780
 116. Sacomen, D., Smith, R.L., Song, Y., Fornasier, V., Goodman, S.B. Effects of polyethylene particles on tissue surrounding knee arthroplasties in rabbits. *Journal of biomedical materials research* 43 (1998) 123-130
 117. Sarang (2017)
 118. Sartori, M., Vincenzi, F., Ravani, A., Cepollaro, S., Martini, L., Varani, K., Fini, M., Tschon, M. RAW 264.7 co-cultured with ultra-high molecular weight polyethylene particles spontaneously differentiate into osteoclasts: an in vitro model of periprosthetic osteolysis. *Journal of biomedical materials research. Part A* 105 (2017) 510-520
 119. Schmalzried, T.P., Jasty, M., Harris, W.H. Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. Polyethylene wear debris and the concept of the effective joint space. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 74 (1992) 849-863
 120. Scior, W., Kafchitsas, K., Drees, P., Graichen, H. Hip arthroplasty - All problems solved or still place for improvement? *Journal of orthopaedics* 13 (2016) 327-330
 121. Shanbhag, A.S., Hasselman, C.T., Rubash, H.E. The John Charnley Award. Inhibition of wear debris mediated osteolysis in a canine total hip arthroplasty model. *Clinical orthopaedics and related research* (1997) 33-43
 122. Shanbhag, A.S., Jacobs, J.J., Black, J., Galante, J.O., Glant, T.T.

- Macrophage/particle interactions: effect of size, composition and surface area. *Journal of biomedical materials research* 28 (1994) 81-90
123. Sieving, A., Wu, B., Mayton, L., Nasser, S., Wooley, P.H. Morphological characteristics of total joint arthroplasty-derived ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) wear debris that provoke inflammation in a murine model of inflammation. *Journal of biomedical materials research. Part A* 64 (2003) 457-464
 124. Silverstein, A.M., Stefani, R.M., Sobczak, E., Tong, E.L., Attur, M.G., Shah, R.P., Bulinski, J.C., Ateshian, G.A., Hung, C.T. Toward understanding the role of cartilage particulates in synovial inflammation. *Osteoarthritis and cartilage* 25 (2017) 1353-1361
 125. Singh, D.A.P. (2016) *Knee Joint Anatomy*.
 126. Sobieraj, M.C., Rimnac, C.M. Ultra high molecular weight polyethylene: mechanics, morphology, and clinical behavior. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 2 (2009) 433-443
 127. St Pierre, C.A., Chan, M., Iwakura, Y., Ayers, D.C., Kurt-Jones, E.A., Finberg, R.W. Periprosthetic osteolysis: characterizing the innate immune response to titanium wear-particles. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 28 (2010) 1418-1424
 128. Statistisches Bundesamt (2014) Die 20 häufigsten Hauptdiagnosen bei Frauen.
 129. Statistisches Bundesamt (2015) *Gesundheit; Fallpauschalenbezogene Krankenhausstatistik (DRG-Statistik) Diagnosen, Prozeduren, Fallpauschalen und Case Mix der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern*. p 88
 130. Steeber, D.A., Campbell, M.A., Basit, A., Ley, K., Tedder, T.F. Optimal selectin-mediated rolling of leukocytes during inflammation in vivo requires intercellular adhesion molecule-1 expression. *Proceedings of*

the National Academy of Sciences of the United States of America 95 (1998) 7562-7567

131. Steeber, D.A., Tedder, T.F. Adhesion molecule cascades direct lymphocyte recirculation and leukocyte migration during inflammation. *Immunologic research* 22 (2000) 299-317
132. Szivek, J.A., Anderson, P.L., Benjamin, J.B. Average and peak contact stress distribution evaluation of total knee arthroplasties. *The Journal of arthroplasty* 11 (1996) 952-963
133. Taki, N., Tatro, J.M., Nalepka, J.L., Togawa, D., Goldberg, V.M., Rinnac, C.M., Greenfield, E.M. Polyethylene and titanium particles induce osteolysis by similar, lymphocyte-independent, mechanisms. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 23 (2005) 376-383
134. Tamaki, Y., Sasaki, K., Sasaki, A., Takakubo, Y., Hasegawa, H., Ogino, T., Konttinen, Y.T., Salo, J., Takagi, M. Enhanced osteolytic potential of monocytes/macrophages derived from bone marrow after particle stimulation. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 84 (2008) 191-204
135. Thomas, C. "Makropathologie, Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzialdiagnostik" Schattauer GmbH2003
136. Thomas, C. "Histopathologie, Lehrbuch und Atlas zur Befunderhebung und Differenzialdiagnostik" Schattauer GmbH2006
137. Timperley, A.J., Nusem, I., Wilson, K., Whitehouse, S.L., Buma, P., Crawford, R.W. A modified cementing technique using BoneSource to augment fixation of the acetabulum in a sheep model. *Acta orthopaedica* 81 (2010) 503-507
138. Tuan, R.S., Lee, F.Y., Y, T.K., Wilkinson, J.M., Smith, R.L. 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? *The Journal of the American Academy of Orthopaedic*

Surgeons 16 Suppl 1 (2008) S42-48

139. Tunyogi-Csapo, M., Koreny, T., Vermes, C., Galante, J.O., Jacobs, J.J., Glant, T.T. Role of fibroblasts and fibroblast-derived growth factors in periprosthetic angiogenesis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25 (2007) 1378-1388
140. Urban, R.M., Tomlinson, M.J., Hall, D.J., Jacobs, J.J. Accumulation in liver and spleen of metal particles generated at nonbearing surfaces in hip arthroplasty. *The Journal of arthroplasty* 19 (2004) 94-101
141. Utzschneider, S. (2010a) Verwendung von crosslinked Polyethylenen in der Knieendoprothetik und deren biologische Aktivität. Ludwigs-Maximilians-Universität München, p 174
142. Utzschneider, S., Harrasser, N., Sadoghi, P., Weber, P., Schroeder, C., Pietschmann, M.F., Jansson, V. Crosslinked polyethylene in knee arthroplasty: a simulator study evaluating the positive influence on the tribocontact area in the fixed-bearing knee. *Archives of orthopaedic and trauma surgery* 130 (2010b) 1419-1424
143. Utzschneider, S., Harrasser, N., Schroeder, C., Mazoochian, F., Jansson, V. Wear of contemporary total knee replacements--a knee simulator study of six current designs. *Clinical biomechanics (Bristol, Avon)* 24 (2009a) 583-588
144. Utzschneider, S., Lorber, V., Dedic, M., Paulus, A.C., Schroeder, C., Gottschalk, O., Schmitt-Sody, M., Jansson, V. Biological activity and migration of wear particles in the knee joint: an in vivo comparison of six different polyethylene materials. *Journal of materials science. Materials in medicine* 25 (2014) 1599-1612
145. Utzschneider, S., Paulus, A., Datz, J.C., Schroeder, C., Sievers, B., Wegener, B., Jansson, V. Influence of design and bearing material on polyethylene wear particle generation in total knee replacement. *Acta biomaterialia* 5 (2009b) 2495-2502

146. Valladares, R.D., Nich, C., Zwingenberger, S., Li, C., Swank, K.R., Gibon, E., Rao, A.J., Yao, Z., Goodman, S.B. Toll-like receptors-2 and 4 are overexpressed in an experimental model of particle-induced osteolysis. *Journal of biomedical materials research. Part A* 102 (2014) 3004-3011
147. Veihelmann, A., Harris, A.G., Krombach, F., Schutze, E., Refior, H.J., Messmer, K. In vivo assessment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse antigen-induced arthritis. *Microcirculation (New York, N.Y. : 1994)* 6 (1999) 281-290
148. Veihelmann, A., Szczesny, G., Nolte, D., Krombach, F., Refior, H.J., Messmer, K. A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Research in experimental medicine. Zeitschrift fur die gesamte experimentelle Medizin einschliesslich experimenteller Chirurgie* 198 (1998) 43-54
149. Vermes, C., Glant, T.T., Hallab, N.J., Fritz, E.A., Roebuck, K.A., Jacobs, J.J. The potential role of the osteoblast in the development of periprosthetic osteolysis: review of in vitro osteoblast responses to wear debris, corrosion products, and cytokines and growth factors. *The Journal of arthroplasty* 16 (2001) 95-100
150. Voss, H. "Grundlage der normalen Histologie und mikroskopischen Anatomie" Thieme 1957
151. Wang, Y., Zhou, R., Wu, N.N., Mou, Y.Q., Li, R.D., Deng, Z.L. [Interleukin-4 and osteoprotegerin suppress polyethylene wear debris-induced osteolysis in a murine air pouch model]. *Nan fang yi ke da xue xue bao = Journal of Southern Medical University* 31 (2011) 1709-1713
152. Wei, S., Kitaura, H., Zhou, P., Ross, F.P., Teitelbaum, S.L. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation* 115 (2005) 282-290
153. Wengler, A., Nimptsch, U., Mansky, T. Hip and knee replacement in

- Germany and the USA: analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011. *Deutsches Arzteblatt international* 111 (2014) 407-416
154. Wise, L.M., Waldman, S.D., Kasra, M., Cheung, R., Binnington, A., Kandel, R.A., White, L.M., Grynblas, M.D. Effect of zoledronate on bone quality in the treatment of aseptic loosening of hip arthroplasty in the dog. *Calcified tissue international* 77 (2005) 367-375
 155. Wooley, P.H., Morren, R., Andary, J., Sud, S., Yang, S.Y., Mayton, L., Markel, D., Sieving, A., Nasser, S. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch. *Biomaterials* 23 (2002) 517-526
 156. Wooley, P.H., Schwarz, E.M. Aseptic loosening. *Gene therapy* 11 (2004) 402-407
 157. Yang, S.Y., Yu, H., Gong, W., Wu, B., Mayton, L., Costello, R., Wooley, P.H. Murine model of prosthesis failure for the long-term study of aseptic loosening. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 25 (2007) 603-611
 158. Yao, J., Cs-Szabo, G., Jacobs, J.J., Kuettner, K.E., Glant, T.T. Suppression of osteoblast function by titanium particles. *The Journal of bone and joint surgery. American volume* 79 (1997) 107-112
 159. Zeintl, H., Sack, F.U., Intaglietta, M., Messmer, K. Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation* 8 (1989) 293-302
 160. Zhang, L., Jia, T.H., Chong, A.C., Bai, L., Yu, H., Gong, W., Wooley, P.H., Yang, S.Y. Cell-based osteoprotegerin therapy for debris-induced aseptic prosthetic loosening on a murine model. *Gene therapy* 17 (2010) 1262-1269
 161. Zhang, T., Yu, H., Gong, W., Zhang, L., Jia, T., Wooley, P.H., Yang,

- S.Y. The effect of osteoprotegerin gene modification on wear debris-induced osteolysis in a murine model of knee prosthesis failure. *Biomaterials* 30 (2009) 6102-6108
162. Zysk, S.P., Gebhard, H., Plitz, W., Buchhorn, G.H., Sprecher, C.M., Jansson, V., Messmer, K., Veihelmann, A. Influence of orthopedic particulate biomaterials on inflammation and synovial microcirculation in the murine knee joint. *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials* 71 (2004) 108-115
163. Zysk, S.P., Gebhard, H.H., Kalteis, T., Schmitt-Sody, M., Jansson, V., Messmer, K., Veihelmann, A. Particles of all sizes provoke inflammatory responses in vivo. *Clinical orthopaedics and related research* (2005) 258-264
164. Zysk, S.P., Gebhard, H.H., Pellengahr, C., Refior, H.J., Plitz, W., Messmer, K., Veihelmann, A. [Inflammatory responses to wear particles in vivo: a novel model in the murine knee joint]. *Der Orthopade* 32 (2003) 305-311

10. Danksagung

Zunächst gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dipl.-Ing- Jansson für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Des Weiteren bedanke ich mich bei Herrn Prof. Plitz für die freundliche Unterstützung und die großfamiliäre Atmosphäre im Labor.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Sandra Utzschneider für die optimale Betreuung und tatkräftige Unterstützung, die Sie mir während des Projekts zuteil werden ließ.

Auch Frau Sievers und ihrem kompetenten Team, insbesondere den MTAs, möchte ich für die gemeinsame Zeit im Labor danken.

Ein Dank gilt auch meinen Mitstreitern Fabian Becker, Alexander Paulus und Verena Lorber für eine aufregende Zeit in der Welt der experimentellen Orthopädie.



LUDWIG-
MAXIMILIANS-
UNIVERSITÄT
MÜNCHEN

Dekanat Medizinische Fakultät
Promotionsbüro



Eidesstattliche Versicherung

Dedic, Mirza

Name ,Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, das ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema **Inflammatorische Potenz verschiedener Crosslinked Polyethylene im Mausmodell** selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse ,die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren ,dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde

München den 18.11.2019

Dedic Mirza

