

Zentrum für Experimentelle Medizin
Institut für Biochemie und Molekularbiologie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Direktorin: Prof. Dr. rer. physiol. Dr. h.c. Ulrike Beisiegel

Fettsäure- und Lipidkomposition in Knochenmark und
Plasma bei Patienten mit
Osteonekrose, Knochenmarksödemsyndrom und Coxarthrose.

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Maike Ihnen
aus Kiel

Hamburg im Jahre 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Universität Hamburg am: 08.11.05

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereiches
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. U. Beisiegel

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. U. Beil

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. Amling, stellvertretend für Prof. Dr. Rüther

Inhaltsverzeichnis

1. Problemstellung und Ziel der Arbeit	3
2. Einleitung	3
2.1. Einführung in die Thematik	3
2.2. Erfassung des wissenschaftlichen Umfeldes	4
2.2.1. Einflußfaktoren auf den Lipidmetabolismus im Knochengewebe	4
2.2.2. Knochenpathologien	11
2.2.2.1. Idiopathische aseptische Osteonekrose	11
2.2.2.2. Idiopathisches Knochenmarksödemsyndrom	13
2.2.2.3. Coxarthrose	14
3. Material und Methoden	16
3.1. Patienten	16
3.2. Gewebe	17
3.3. Lipidextraktion aus Knochen und Plasma	18
3.4. Gas-Chromatographie	21
3.5. Enzymatische Analysen	23
3.5.1. Enzymatische Triglyceridbestimmung	23
3.5.2. Enzymatische Cholesterinbestimmung	24
3.6. Dünnschichtchromatographie	27
3.7. Erhebung eines Plasmalipidstatus und Plasmalipoproteinwerte	29
3.8. Statistische Auswertung	29
4. Ergebnisse	30
4.1. Ergebnisse der Plasmaanalyse	30
4.1.1. Plasmalipidanalyse	30
4.1.2. Ergebnisse der Gas-Chromatographie des Plasmas	31
4.2. Ergebnisse der Knochenmarksanalysen	34
4.2.1. Modifikation verschiedener Methoden für die Anwendung auf Knochengewebe und Knochenlipid	34
4.2.1.1. Lipidextraktion aus Knochengewebe	34
4.2.1.2. Methodenmodifikation der Gas-Chromatographie für Knochenlipid	37
4.2.1.3. Methodenmodifikation der Dünnschichtchromatographie für ihre Anwendung auf Knochenlipid	38
4.2.1.4. Enzymatische Knochenlipidbestimmung	38

4.2.2. Ergebnisse der Knochenlipidanalysen	40
4.2.2.1. Ergebnisse der Lipidextraktion aus Knochenlipid	40
4.2.2.2. Ergebnisse der gas-chromatographischen Fettsäurebestimmung	40
4.2.2.3. Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie	42
4.2.2.4. Ergebnisse der enzymatischen Triglyceridbestimmung	43
4.2.2.5. Ergebnisse der enzymatischen Cholesterinbestimmung	43
4.2.2.6. Ergebnisse der gas-chromatographischen Cholesterinbestimmung	43
4.3. Vergleich der Lipidkomposition in Plasma- und Knochenlipid von Individuen mit und ohne Dyslipidämien	43
4.4. Ergebniszusammenfassung	44
5. Diskussion	46
5.1. Methodendiskussion	46
5.2. Triglycerid, Cholesterin und Lipoproteine im Plasmalipid	47
5.3. Triglycerid und Cholesterin im Knochenlipid	49
5.4. Fettsäuren im Plasma	50
5.5. Fettsäuren im Knochenlipid	52
6. Zusammenfassung	55
7. Anhang	56
7.1. Abbildungs- und Graphikenverzeichnis	56
7.2. Tabellenanhang	57
8. Abkürzungen	71
9. Literaturverzeichnis	73
10. Danksagung	88
11. Lebenslauf	89
12. Erklärung	90

1. Problemstellung und Ziel der Arbeit

Über die Zusammensetzung des Knochenlipids und den Lipidstoffwechsel des menschlichen Knochengewebes ist wenig bekannt. Ebenso ist der Einfluss von systemischen Dyslipidämien auf die Lipidzusammensetzung des Knochens und als Ursache für die Entstehung von Knochenerkrankungen zwar evident aber nur wenig erforscht. Fast alle existierenden Daten basieren auf Ergebnissen von Tierversuchen. Informationen über die Lipid- und Fettsäurenkomposition des Plasmas und Knochenmarks bei Patienten mit Knochenerkrankungen, wie der idiopathischen Knochennekrose und dem Knochenmarksödemsyndrom sind kaum vorhanden, obwohl in der Literatur von einem Zusammenhang zwischen Störungen des Lipidstoffwechsel und diesen Knochenerkrankungen ausgegangen wird.

Vorliegend soll daher die Messung und vergleichende Charakterisierung der Lipide und Fettsäuren im menschlichen Knochenmark und Blutplasma bei gesunden und an der idiopathischen Osteonekrose und dem Knochenmarksödemsyndrom erkrankten Patienten durchgeführt werden. Als Knochenmark wird im Folgenden die Substantia spongiosa mit allen darin enthaltenen Zellpopulationen, wie z.B. Osteoblasten, Osteoklasten, Adipozyten, Zellen des blutbildenden Marks sowie Zellen des Stützgewebes definiert.

Um eine Untersuchung des Knochenmarklipids und Plasmalipids durchführen zu können, musste zuerst die Methode der Lipidextraktion aus Knochengewebe sowie die Methode der gaschromatographischen Fettsäure- und Cholesterinmessung und die enzymatische Triglycerid- und Cholesterinmessung für die Anwendung auf Knochengewebe etabliert werden. Für die Plasmaanalysen bestanden diese Methoden bereits.

Nach Etablierung der Methoden wurde eine vergleichende Charakterisierung der Fettsäureverteilung, des Cholesterin- und Triglyceridgehalts von Plasma und Knochengewebe der Patienten mit den genannten Erkrankungen zu einem gesunden Kollektiv vorgenommen und diese statistisch ausgewertet.

2. Einleitung

2.1. Einführung in die Thematik

Makroskopisch besteht der Knochen aus der äußeren Substantia corticalis und der inneren Substantia spongiosa, in welche die verschiedenen Zellpopulationen der Hämatopoese, die Osteoblasten und Osteoklasten sowie Zellen des Binde- und Stützgewebes und deren Progenitorzellen eingelagert sind. Knochen ist ein komplexes, stoffwechselaktives Gewebe. Es besteht eine hohe Gefäßdichte im Knochenmark, die die Versorgung des Knochens über den Blutstrom ermöglicht. Für die Durchblutung des erwachsenen Skelettsystems werden ca. 6% des Herzminutenvolumens benötigt. Neben der vaskulären Versorgung erfolgt der Stofftransport über die Fortsätze der Osteozyten sowie durch die feinen Spalträume zwischen ihnen.

Für den Knochenstoffwechsel werden Proteine (z.B. für die Aminosäureversorgung und Aufrechterhaltung der Kollagensynthese), Vitamine, Mineralstoffe (v.a. Calcium und Phosphat) und Hormone (z.B. Somatotrophes Hormon, Androgene und Östrogene) sowie Lipide benötigt.

Diese Substanzen werden aus dem Blut in den Knochen aufgenommen, so dass sich eine systemische Minder- oder Überversorgung auch auf den Knochenstoffwechsel auswirken und zu pathologischen Veränderungen führen kann.

Vor allem dem systemischen Lipidmetabolismus und dessen Störungen wird eine zunehmende Bedeutung in der Entstehung von Knochenerkrankungen zugeschrieben.

Ein potentiell kausaler Zusammenhang zwischen Lipidstoffwechsel und Knochenerkrankungen wird für die idiopathischen Osteonekrose (ON), dem Knochenmarksödemsyndrom (KÖ) (Lavernia et al. 1999), (Mielants et al. 1975), (Moskal et al. 1997) und der Osteoporose (Burkhardt et al. 1987), (Aspden 2001) diskutiert, wobei der Lipidstoffwechsel im Knochen nur in Ansätzen verstanden ist. Insgesamt finden sich derzeit in der Literatur sehr wenige Stellen, die mit großem zeitlichem Abstand und unterschiedlichem Ansatz die Lipidzusammensetzung und Fettsäureverteilung im menschlichen Knochen beschreiben (Lund 1962), (Tavassol et al. 1970), (Boskey et al. 1982), (Malik 1984), (Miller 1996), (Kagawa 1996). Die mit Abstand meisten Daten zu dieser Thematik beziehen sich auf Ergebnisse, die anhand von Tiermodellen erhalten wurden (Wang et al. 1977, 2000) (Weiss et al. 2005).

Die Lipidkomposition im nekrotischen und ödematösen humanen Knochengewebe sowie im Plasma dieser Patienten wurde bisher kaum untersucht. Die Ursachen der Erkrankungen sind unklar.

2.2. Erfassung des wissenschaftlichen Umfeldes

2.2.1. Einflussfaktoren auf den Lipidmetabolismus im Knochengewebe

Effekte endogener und exogener Faktoren auf den Lipidmetabolismus des Knochens

Der Lipidmetabolismus des Knochens unterliegt einer Vielzahl von Faktoren, er ist Ausdruck der derzeitigen Ernährungs- und Lebensweise und wird u.a. vom physiologischen Alterungsprozess beeinflusst (Beresford et al. 1992), (Wang et al. 2000). Werden bestimmte Fettsäuren, wie z.B. essentielle Fettsäuren, die nicht synthetisiert werden können, zeitweilig nicht zugeführt, kommt es zu ihrer Abnahme in Plasma und Knochenmark (Soppela, Nirminen 2001).

Zugeführte Nahrungslipide führen zu einer Modifikation der Zusammensetzung der Plasmafettsäuren, des systemischen Lipidspiegels und des Lipidspiegels der peripheren Gewebe, wie dem Knochen, Fettgewebe und Muskelgewebe (Zock et al. 1997), (Garland et al. 1998), (Andersson et al. 2002), (Mollard, Kovacs 2005). In einer Studie, in der nicht einzelne Fettsäuren sondern die zugeführte absolute Fettsäuremenge variiert wurde, änderte sich die Fettsäureverteilung im Plasma (Raatz et al. 2001). Auch landesspezifische Ernährungsgewohnheiten führen zu einem unterschiedlichem Lipidspiegel und einer unterschiedlichen Plasmafettsäurezusammensetzung, was Untersuchungen von Italienern, Finnen und Amerikanern zeigten (Dougherty et al. 1987). Wie sich die veränderten Plasmafettsäuren auf die Lipidzusammensetzung im Knochen auswirken und ob die Veränderung ihrer Zusammensetzung zu Knochenpathologien führen kann, wird derzeit diskutiert.

Freie Fettsäuren

Fettsäuren haben eine wichtige Bedeutung für den Lipidstoffwechsel des Knochens. Es handelt sich um langkettige aliphatische Monocarbonsäuren, die in essentielle und nicht essentielle, gesättigte und einfach oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren unterschieden werden. Bis heute sind weit über 100 verschiedene Fettsäuren bekannt. In höheren Tieren kommen hauptsächlich Fettsäuren mit C₁₄- bis C₂₂-Kettenlänge vor (Vance 1996).

Enthält die Kohlenwasserstoffkette der Fettsäure keine Doppelbindung ist sie gesättigt. Die in tierischen Lipiden überwiegenden gesättigten Fettsäuren sind die Palmitinsäure (16:0) und die Stearinsäure (18:0). Sie dienen als Vorstufen der beiden häufigsten einfach ungesättigten Fettsäuren in tierischen Geweben, der Palmitoleinsäure (16:1(n-7)) und der Ölsäure (18:1(n-9)), siehe Abbildung 1.

Das "n" oder "ω" steht für die Lokalisation der ersten Doppelbindung in der C-Atomkette der Fettsäure, ausgehend von der Methylgruppe. Die meisten ungesättigten Fettsäuren sind einfach ungesättigt und die Doppelbindung weist eine cis-Konfiguration auf. Untersuchungen, die die freien Fettsäuren im gelben Fettmark des menschlichen Knochens detektieren, zeigen, dass die Ölsäure mit einem Anteil von 34%-50% der Gesamtfettsäuren die am stärksten vertretene Fettsäure darstellt (Lund 1962), (Boskey et al. 1982), (Malik 1984), (Kagawa 1996), (Miller 1996).

Nicht essentielle Fettsäuren werden vom Körper selbst synthetisiert. Die de novo Synthese der Fettsäuren findet anhand eines Multienzymkomplexes im Zytosol statt.

Sie kann in allen Organen ablaufen, Hauptproduktionsorte sind Leber, Fettgewebe und Milchdrüsen.

Zu den essentiellen Fettsäuren, Fettsäuren, die ausschließlich mit der Nahrung aufgenommen und nicht endogen synthetisiert werden können, gehören die α-Linolensäure (18:3 (n-3)) und die Linolsäure (18:2 (n-6)). Sie dienen dem Körper als Vorstufen der (n-3)- und (n-6)-Fettsäurederivate. Fettsäuren, die ihre erste Doppelbindung in der Δ³-Position (zwischen C-3 und C-4) bzw. in der Δ⁶-Position (zwischen C-6 und C-7) aufweisen. Die am stärksten vertretenen Fettsäuren der (n-3)-Familie in vielen tierischen und humanen Geweben sind die Eicosapentaensäure (EPA, 20:5 (n-3)) und die Docosahexaensäure (DHA 22:6 (n-3)) (Lands 1992). Für die Synthese der (n-6)-Fettsäuren ist die Linolsäure das Substrat, über sie werden die γ-Linolensäure (18:3 (n-6)) und die Eicosatriensäure (20:3 (n-6)) als Vorläufersubstanzen der Arachidonsäure (20:4 (n-6)) gebildet, die die am stärksten vertretene Fettsäure dieser Gruppe im Plasma darstellt und zu den Eicosanoiden gehört (Vance 1996), siehe Abbildung 1.

Der Anteil der beiden essentiellen Fettsäuren Linolsäure und α-Linolensäure wird mit 5%-15% der Gesamtfettsäuren im humanen Knochenmark angegeben (Kagawa et al. 1996).

Folgen einer modifizierten Lipidzusammensetzung auf die Entwicklung von Knochenpathologien

Es wird vermutet, dass ernährungsbedingte Faktoren einen Einfluss auf die Ausbildung von Arthrose (Felson et al. 1998), Osteonekrose und möglicherweise dem Knochenödem (Wang et al. 1977) haben (Aspden et al. 2001).

In den letzten Jahrzehnten hat sich der Anteil der Fettsäuren in den Nahrungsmitteln der Industrieländer stark verändert, wodurch das Verhältnis der (n-6)- zu den (n-3)-Fettsäuren von 1985 bis 1994 zugunsten der (n-6)-Fettsäuren verschoben wurde.

Abbildung 1

Klasse	Gesättigte Fettsäuren	Ungesättigte Fettsäuren	Syntheseprodukte
Tetradekan- säuren	14:0 Myristinsäure		
Hexadekan- säuren	16:0 Palmitinsäure ➔		16:1-7 Palmitoleinsäure
Essentielle Fettsäuren;		18:2-6 Linolsäure ➔ 18:3-3 α -Linolensäure ➔	18:3-6 γ -Linolensäure, 20:3-6 Eicosatriensäure ➔ 20:4-6 Arachidonsäure 20:5-3 Eicosapentaensäure, 22:6-3 Docosahexaensäure
Octadecan- säuren	18:0 Stearinsäure ➔	18:3-6 γ -Linolensäure, 18:1-7 Vaccensäure	18:1-9 Ölsäure
Eicosanoide	20:0 Arachinsäure	20:4-6 Arachidonsäure 20:5-3 Eicosapentaensäure 20:3-6 Eicosatriensäure 20:2-6 Eicosadiensäure 20:1-9 Eicoensäure	
Behen- säuren; Docosan- säuren		22:6-3 Docosahexaensäure 22:4-6 Docosatetraensäure 22:5-3 Docosapentaensäure 22:2-6 Docosadiensäure 22:1-9 Erucinsäure	

Darstellung der v.a. in tierischen Fetten vorkommenden Fettsäureklassen und deren Syntheseprodukte.

➔= die vor dem Pfeil stehende Fettsäure ist die Vorstufe von der nach dem Pfeil stehenden Fettsäure.

Gleichzeitig konnte ein Zuwachs an Knochenerkrankungen verzeichnet werden (Kris-Etherton et al. 2000). Vor allem bei adipösen Patienten ist eine erhöhte Inzidenz für Knochen- und Gelenkerkrankungen nachweisbar.

In einem Tiermodell konnte durch eine fett- und kalorienreduzierte Diät der altersbedingte Knochendichteverlust gesenkt werden (Kalu et al. 1984), was möglicherweise mit einer veränderten Plasmafettsäureverteilung, induziert durch die fettreduzierte Diät zusammenhängt (Raatz et al. 2001). Bei Kindern und älteren Patienten konnten zugeführte gesättigte und ungesättigte Fettsäuren in bestimmten Mischungsverhältnissen mit einer höheren Knochendichte assoziiert werden (Kruger et al. 1998), (Gunnes et al. 1995).

Vor allem den (n-3) und (n-6) mehrfach ungesättigten Fettsäuren wird eine Bedeutung im Knochenmetabolismus zugeschrieben.

Diätische (n-3)-Fettsäureaufnahme wird in der Literatur mit einem positiven Effekt gegen das Auftreten von kardiovaskulären Erkrankungen und Hyperlipidämien assoziiert (Judex et al. 2000). Aber auch bezüglich des Knochens wird z.B. Fischöl, reich an (n-3)-Fettsäuren mit einer gesteigerten Knochendichte und einem verminderten osteoporotischen Knochendichteverlust in Verbindung gebracht (Kruger et al. 1998). Im Mausmodell konnte eine Diät mit hohem (n-3)-Fettsäureanteil im Vergleich zu einer Diät mit hohem (n-6)-Anteil die Symptome einer rheumatoiden Arthritis abschwächen (Shapiro et al. 1996).

Diäten mit hohem (n-6)-Fettsäureanteil, vor allem die essentielle Linolsäure, führen im Gegensatz zu den (n-3)-Fettsäuren zu einer geringeren Knochenneubildungsrate (Weiss et al. 2005). Diäten mit einer Verringerung der (n-6)/(n-3)-Ratio resultieren in einer vermehrten Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und einer höheren Knochendichte (Kokkinos et al. 1993), (Atkinson et al. 1997), (Weiler 2000) sowie einer Steigerung der alkalischen Phosphatase, die als Marker für Umbauvorgängen im Knochen gilt. Ebenfalls kommt es zu einer Senkung der Docosahexaensäure und des Arachidonsäurespiegels (Scott et al. 1975). Andere Autoren konnten eine erhöhte knochenspezifische alkalische Phosphatase, ein Marker für Knochenumbauprozesse und -wachstum, im Serum von Ratten nachweisen, denen eine (n-3)-Fettsäure reiche Diät verabreicht worden war (Watkins et al. 2001). Die im Fütterungsversuch zugeführten und im Knochenlipid (Kagawa 1996) angereicherten (n-6)-Fettsäuren führten zu einer Erhöhung der Arachidonsäure im Knochen, die die Ausgangssubstanz der Prostaglandinsynthese (PG) darstellt und vermutlich den Prostaglandin E₂ (PGE₂)-Spiegel im Knochen anhebt. Prostaglandine gelten als potente Stimulatoren des Knochenmetabolismus (Watkins et al. 1997).

Prostaglandine

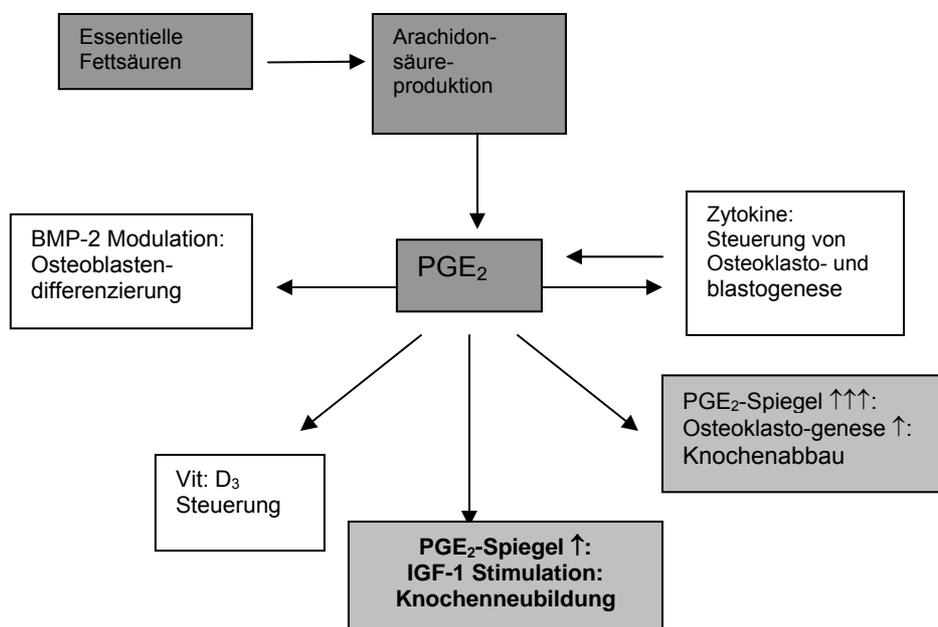
Prostaglandine werden im Knochengewebe hauptsächlich von Osteoblasten produziert und stellen lokal sezernierte, biologisch aktive Fettsäuren dar (Ohshiba 2003). Als ursächlich für die Wirkung der Fettsäuren auf den Knochenmetabolismus wird v.a. die Synthese von Prostaglandin E₂ und E₃ über die Cyclooxygenase (COX) angesehen, die in vivo vermutlich durch das Verhältnis von (n-3)- zu (n-6)-Plasmafettsäuren gesteuert wird (Boudreau et al. 1991), (Marks, Miller 1993).

Prostaglandine und Prostaglandininhibitoren haben vermutlich über die Steuerung von Insulin-like Growth Factor 1 (IGF-1), eines Wachstumsfaktors, einen Effekt auf Knochenum- und abbauvorgänge bei Menschen und Tieren (Li et al. 1998), (Watkins 2003). Hohe Prostaglandinkonzentrationen hemmen die Knochenneubildung in vivo b.z.w. steigern die Osteoklastogenese und konnten im Knochen bei akuten, entzündlichen und destruktiven, neoplastischen Knochen- und Knorpelprozessen um 5-30 mal erhöht gemessen werden (Norrdin et al. 1990), (Ohshiba 2003). Weiterhin sind hohe Prostaglandinkonzentrationen über eine Überexpression der COX mit dem Auftreten von akuter Arthritis und der Osteomyelitis sowie Neoplasien assoziiert (Lawrence et al. 1998).

Niedrige Konzentrationen stimulieren die Knochenneubildung, in sehr niedrigen Konzentrationen findet vermutlich keine relevante Knochenneubildung mehr statt (Klein und Raisz 1970), (Raisz und Koolemans-Beynen 1974), (Raisz, Fall 1990), (Watkins 2000). In der Osteoblastenreifung moduliert PGE₂ die auf Osteoblasten stimulierend wirkenden Effekte von Bone Morphogenetic Protein-2 (BMP-2) (Arikawa et al. 2004), (Watkins 2000). Die Steuerung der Synthese und die Freisetzung von PGE₂ wird durch Zytokine wie dem Tumor-Nekrosefaktor α (TNF- α), Interleukin 1, 3, 6 und 11 (IL-1), (IL-3), (IL-6) und (IL-11) und extrazelluläre Signalproteine reguliert, die u.a. von Adipozyten des Knochenmarks synthetisiert und sezerniert werden (Maurin 2000), (Blair 2004).

Die wichtigsten Effekte von PGE₂ sind in Abbildung 2 dargestellt.

Abbildung 2



Einfluss von PGE₂ auf den Knochenstoffwechsel.

Eine Diät reich an Linolsäure (18:2 (n-6)) führt zu einer verstärkten Arachidonsäuresynthese und diese als Substrat der COX zur PGE₂-Bildung und Knochenwachstum (Fernandes et al. 2003). Eine verminderte Arachidonsäuresynthese und folglich niedrige Prostaglandinspiegel führen zu einer geringeren Knochenneubildungsrate, was anhand von Knochenzellkulturen gezeigt werden konnte (Watkins et al. 2000).

Einer Diät reich an α -Linolensäure (18:3(n-3)) folgt eine verminderte PGE₂ Freisetzung aus dem Knochen und eine gesteigerte EPA- und PGE₃-Bildung über die Aktivierung der COX (Mollard, Gillam et al. 2005). Es wird angenommen, dass (n-3)-Fettsäuren die COX herunterregulieren können und somit weniger Prostaglandine synthetisiert werden (Hamilton et al. 1999), (Watkins et al. 2003).

EPA als (n-3)-Fettsäure scheint ausserdem das weniger effektive Substrat für die COX darzustellen als Arachidonsäure (Raisz et al. 1989). Somit führen hohe diätische EPA-Spiegel bei niedrigen Arachidonsäurespiegeln zu einer verminderten Produktion von PGE₂ und einem schwächeren Anstieg von PGE₃, was sich wiederum positiv auf die Knochenneubildung auszuwirken scheint. Diäten reich an EPA erhöhen die Knochendichte im Femur und den Calciumgehalt im Knochen. (Li et al. 1999), (Sakaguchi et al. 1994), (Weiler et al. 2002). Alle Syntheseprodukte der essentiellen Fettsäuren werden durch das selbe Enzymsystem hergestellt, was Fettsäuren in der Reihenfolge (n-3), (n-6) und (n-9) metabolisiert. Für ein Gleichgewicht werden vermehrt (n-6) Fettsäuren benötigt. Ein ausgewogenes Verhältnis der (n-6)/(n-3) Fettsäuren wird bei 5:1 bis 15:1 erreicht (Jensen et al. 1992).

Lipide im Knochen

Freie Fettsäuren werden z.B. in die Adipozyten des Knochenmarks aufgenommen und dort als Triglyceride gespeichert. Triglyceride sind drei über eine Esterbindung an ein Glycerinmolekül gebundene Fettsäuren. Das gelbe Fettmark der menschlichen Röhrenknochen enthält Lipid, was zu etwa 97% aus Triglyceriden besteht (Lund et al. 1962).

Neben dem Triglyceridanteil wurde im Fettmark der langen Röhrenknochen ein Cholesterinanteil von 1% nachgewiesen (Lund et al. 1962).

Cholesterin gehört in die Gruppe der Steroide, deren Struktur durch 4 kondensierte Ringe (3 Sechseringe und 1 Fünfering) definiert wird. Cholesterin ist amphipatisch, da es eine Hydroxygruppe und eine Kohlenwasserstoffseitenkette aufweist.

Es stellt das wichtigste Steroid im menschlichen Körper dar. Cholesterin wird zur Synthese der Membranen und als Vorstufe für die Bildung von Gallensäuren und Steroidhormonen (Mineralokortikoide und Glucokortikoide) sowie Vitamin D benötigt. Auch wird angenommen, dass Produkte der Cholesterinbiosynthese für die Differenzierung der mesenchymalen Knochenmarkstammzellen in Osteoblasten notwendig sind (Parhami 2002).

Cholesterin wird aus der Nahrung aufgenommen und in allen Körperzellen, v.a. aber in der Leber und Gehirn aus Acetyl-CoA synthetisiert. Beim Menschen gilt ein erhöhter Cholesterinspiegel als Risikofaktor für Herz-Kreislauferkrankungen, aber auch mit der Entstehung anderer Erkrankungen, wie z.B. mit dem Auftreten von Knochenerkrankungen, wie der Osteonekrose wird es assoziiert (Moskal 1997).

Eine Aufnahme von cholesterinreichen Lipoproteinen in den Knochen (High-Density-Lipoprotein, HDL) konnte nicht beobachtet werden, obwohl das Apolipoprotein AI, was Bestandteil der HDL ist, im Knochen nachgewiesen wurde (Delmas et al. 1984). Als Akzeptor für zellmembranständiges Cholesterin dient HDL als Lipoprotein beim Transport von Cholesterin von peripheren Zellen zur Leber (von Eckardstein et al. 2001).

Adipozyten

Neben der Triglyceridspeicherung haben die Adipozyten im Lipidstoffwechsel des Knochens auch zahlreiche andere Funktionen und somit möglicherweise auch Anteil an der Entstehung von Knochenerkrankungen.

Während der Entwicklung des Kindes zum Erwachsenen kommt es physiologischerweise zur Involution des roten, blutbildenden Marks der langen Röhrenknochen zu weißem Fettmark. Histologisch zeigt sich, dass die Adipozyten im roten hämopoetischen Mark einen Volumenanteil von ca. 30% haben, während es im gelben Fettmark der langen Röhrenknochen nahezu 100% sind.

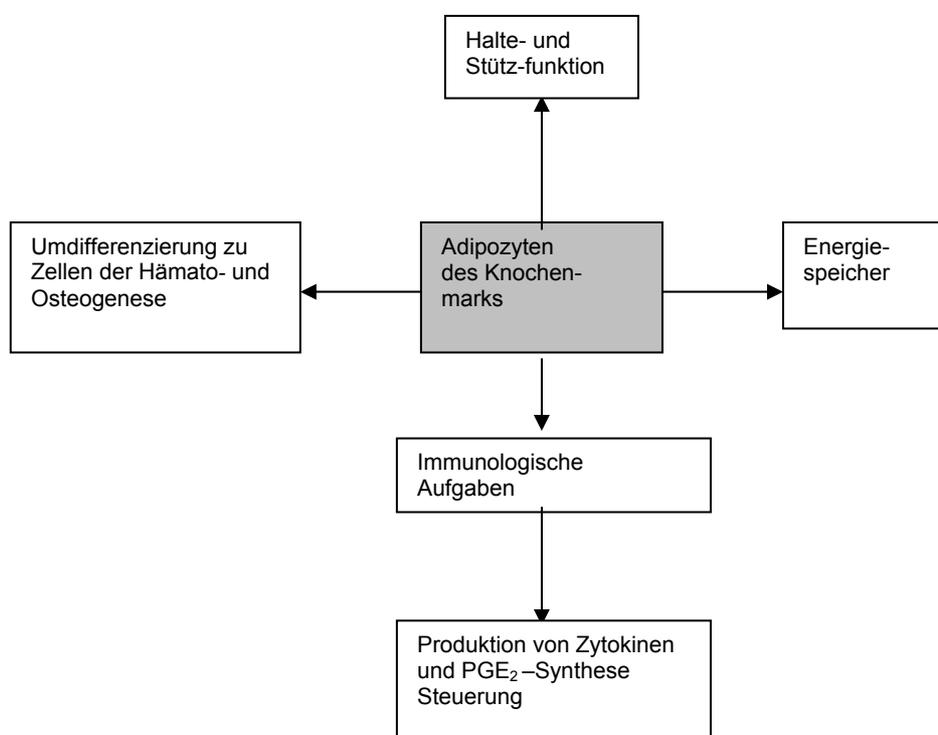
Im Alterungsprozess kommt es mit der Zunahme des weißen Fettgewebes zu einer Zunahme des Anteils der ungesättigten Fettsäuren im Knochenmarkslipid (Tavassoli 1977), was mit einer erhöhten Inzidenz für Knochenerkrankungen assoziiert ist (Beresford et al. 1992).

Adipozyten gelten als hochdifferenzierte Zellen, die im menschlichen Knochenmark in den Zwischenräumen der Substantia spongiosa lokalisiert sind und von Adipozyten anderer Gewebe unterschieden werden müssen.

Obwohl sie den Adipozyten des weißen Fettgewebes histologisch ähneln, unterscheiden sie sich bezüglich der Zellgröße, der Esteraseaktivität und des intrazellulären retikulinen Materials (Tavassoli et al. 1970), (Gimble et al. 1996).

Adipozyten des weißen Fettmarks haben neben der Lipidspeicherfunktion, die als Energiereservoir für eine lokale Regenerierung des Knochens nach Frakturen o.ä. dienen könnte und einer möglichen Stabilisierungsfunktion des Knochengengerüsts wahrscheinlich auch die Fähigkeit sich in Zellen der Hämatopoese und Osteogenese umzudifferenzieren (Dodds et al. 1994), (Nuttall, Gimble 2000). Bei größeren Blutverlusten oder bei akuten Knochenumbauprozessen konnte in vivo eine Umdifferenzierung in Zellen der Hämatopoese und Osteogenese beobachtet werden (Nuttall, Gimble 2000).

Abbildung 3



Zusammenfassung der Funktionen von Adipozyten im Knochenmark.

In der Entwicklung von Knochen- und intraossärem Fettgewebe sind Lipidmetabolismus und Knochenmetabolismus eng miteinander verknüpft. Adipozyten und Osteoblasten entstehen wahrscheinlich aus den selben pluripotenten mesenchymalen Stammzellen (Nuttall et al. 1998), (Yagami et al. 2004). Zwischenstufen in der Differenzierung lassen ebenfalls ein hohes Maß an Plastizität zwischen den beiden Zelltypen erkennen, so dass man von einer reziproken Beziehung zwischen beiden Zelllinien ausgeht (Beresford 1992), (Pittenger et al. 1999).

Elemente des Lipidstoffwechsels, Insulin, Wachstumshormon und Glucocorticoide gelten in vitro Versuchen als Differenzierungsstimuli für eine Differenzierung der Vorläuferzellen in Adipozyten (Doglio 1987), (Nakamura et al 1997).

Diascro et al. zeigten in vitro, dass durch zugeführte Fettsäuren aus Kaninchenserum zu humanen Osteosarkom-Zelllinien verstärkt Mediatoren für die Differenzierung der Osteosarkomzellen zu Adipozyten exprimiert wurden (Diascro et al. 1998), (Maurin 2002). Neben den oben genannten Funktionen sind die Adipozyten des Knochenmarks auch immunologisch von Bedeutung. Es wurde nachgewiesen, dass sie Leptin, Zytokine, hauptsächlich den TNF- α und Interleukin-6 (IL-6), synthetisieren und sezernieren und so in die PGE₂-Synthese und den Knochenmetabolismus eingreifen und möglicherweise zur Entstehung von Knochenerkrankungen beitragen (Maurin 2000). Eine Zusammenfassung der verschiedenen Funktionen der Adipozyten gibt Abb. 3.

Osteoblasten und Osteoklasten

Osteoblasten und Osteoklasten werden ebenfalls vom Lipidstoffwechsel des Knochens beeinflusst. Daher könnten Fettstoffwechselstörungen Dysfunktionen verursachen, die zu Knochenerkrankungen führen könnten (Liu 2005). Im Tierversuch verstärkt zugeführte (n-3)-Fettsäuren und EPA resultierten in einem verminderten Knochendichteverlust bei ovariectomierten Mäusen, als ursächlich wurde die Unterdrückung der Osteoklastogenese angenommen, einen gegenteiligen Effekt wurde bei Diäten mit hohem (n-6)-Anteil beobachtet (Sun et al. 2003), (Iwami-Morimoto et al. 1999).

Über die Rezeptor Aktivatoren des nuklearen Faktor-kappaB Liganden (RANKL) und des nuklearen Faktor-kappaB (RANK), die die massgeblichen Mediatoren der Osteoklastogenese darstellen, wird das System auch durch IL-1, IL-6 und IL-11 sowie TNF- α und PGE-2 beeinflusst, die ebenfalls in der Entwicklung der Osteoblastogenese eine Rolle spielen (Blair 2004) (Liu et al. 2005).

Die Expression von IL-6 und die Synthese von PGE-2 in Knochengewebe scheinen Fettstoffwechsel abhängig zu sein (Bordin et al. 2003).

Überdies wurden in humanen Osteozyten bei unbekanntem Aufnahmemechanismus essentielle Fettsäuren nachgewiesen (Kagawa et al. 1996). In einem anderen Tiermodell konnte die Aufnahme von triglyceridreichen Lipoproteinen ins Knochenmark beschrieben werden (Hussein et al. 1989). Die Gruppe wies eine Aufnahme von Chylomikronen in das Knochenmark mit einem Anteil von 20%-40% der hepatischen Aufnahme nach, was eine mögliche Bedeutung des Lipidstoffwechsels für den Knochen herausstellt.

2.2.2. Knochenpathologien

2.2.2.1. Idiopathische aseptische Osteonekrose

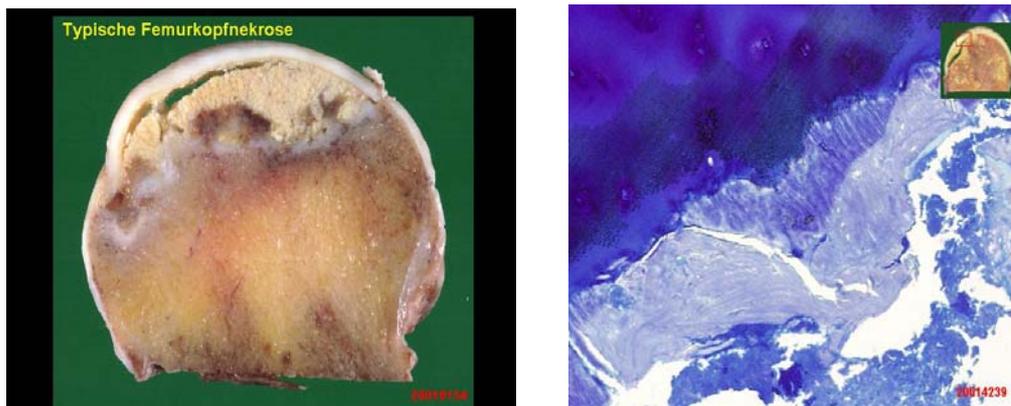
An einer idiopathischen aseptischen Osteonekrose des Hüftkopfes erkranken in den USA etwa 10.000-20.000 Personen pro Jahr, die gleiche Inzidenz wird für Europa geschätzt. Die Inzidenz und somit die Bedeutung dieser Erkrankung ist in westlichen Industrieländern zunehmend (Lavernia et al. 1999).

Die Ätiologie der idiopathischen Osteonekrose ist nicht bekannt (Kenzora et al. 1985). Für ihre Entstehung wird eine Störung der Blutversorgung des Knochengewebes verantwortlich gemacht (Kenzora, Glimcher 1985), (Mont, Hungerford 1995), (Nakamura et al. 1997) s. Abb. 4.

Die idiopathische Knochennekrose tritt spontan auf und betrifft vor allem männliche Individuen in der 3. und 4. Lebensdekade. Eine Spontanheilung tritt in der Regel nicht ein, es kommt meist zu einem progredienten Verlauf, der häufig über eine sekundäre Osteoarthrose zu einem endoprothetischen Gelenkersatz führt.

In dieser Arbeit soll vor allem auf die Osteonekrose als Folge eines gestörten Lipidstoffwechsels eingegangen werden, da in der Literatur ein Zusammenhang unter verschiedenen Gesichtspunkten beschrieben wird.

Abbildung 4



Makroskopisches und mikroskopisches Bild einer Femurkopfnekrose. Erkennbar ist der nekrotische Knochenanteil unterhalb des Gelenkknorpels bei erhaltener Knorpeloberfläche. (Osteopathologie des Universitätskrankehaus HH Eppendorf, Prof. Delling.)

Ca. 90% der auftretenden Osteonekrosen sind mit dauerhaft hoher Einnahme von Kortikosteroiden (>30mg/Tag), wie sie für Immunsuppression nach Transplantationen oder für die Behandlung von Autoimmunerkrankungen verabreicht werden und mit chronischem Alkoholabusus assoziiert (Matsuo, Hirohata 1988), (Mont, Hungerford 1995), (Lavernia et al. 1999). In dem Patientenkollektiv, das Kortikosteroide einnimmt, ist die Auftretenswahrscheinlichkeit für eine Osteonekrose gesunken, nachdem steroidfreie Immunsuppressiva in der Praxis eingeführt wurden (Landmann et al. 1987). Niedrige Dosen, wie sie bei chronischem Asthma verwendet werden, sind nicht mit dem Auftreten einer Osteonekrose assoziiert (Colwell et al. 1996), (Mont et al. 1997).

Glucokortikoide haben neben verschiedenen Wirkmechanismen auch einen Einfluss auf den Lipidstoffwechsel. Sie steigern die Lipolyse und können zur systemischen Hyperlipidämie und zur Fettumverteilung im Organismus führen (Gravholt et al. 2002).

Alkoholabusus beeinträchtigt die Leberfunktion und führt über die Induktion des Cytochrom-P450-abhängigen mikrosomalen ethanolydierenden Systems (MEOS) zu läppchenzentraler Hypoxie. Über eine verminderte Oxydierung von Fettsäuren kommt es zur Leberverfettung und längerfristig zur Zirrhose. Da die Leber das zentrale Organ im systemischen Lipidstoffwechsel und der Lipoproteinsynthese darstellt, weisen Patienten mit chronischem Alkoholabusus und Leberparenchymdefekten ebenfalls häufig eine Hyperlipidämie auf (Jacobs 1978), (Schroeder 1994), (Moskal et al. 1997).

Es wird angenommen, dass Patienten, die unter Steroidbehandlung oder chronischem Alkoholabusus hyperlipämisch werden eine Adipozytenhypertrophie im Knochenmark ausbilden. Der intraossäre Druck steigt, es kommt zu einer Kompression der Osteozytenkerne und der Knochengefäße und damit zur Minderdurchblutung und zur Osteonekrose (Johnson 1964), (Jaffe et al. 1972), (Tsai 1992), (Schroeder 1994). Eine Leberverfettung und eine Zunahme des Adipozytenvolumens wurde an Tiermodellen nach hochdosierter Kortisongabe beschrieben (Wang et al. 1977), (Motomura et al. 2004). Eine Adipozytenhypertrophie wurde ebenfalls bei der autoptischen Untersuchung von Patienten mit Osteonekrose gezeigt (Motomura 2005).

In einem anderen Tiermodell waren nach Kortisongabe intravaskuläre Lipidanhäufungen in Gallengängen und Blutgefäßen der Leber nachweisbar (Moran 1962). Von dort traten sie systemisch in den Organismus ein. In der Folge konnten Fettembolien in Lunge, Niere und Herz und vor allem im Humerus und Femur gezeigt werden (Hartroft et al. 1951).

Es wird angenommen, dass Leberparenchymzellen durch zu starke Lipideinlagerung platzen und die in den Hepatozyten gespeicherten Lipide in den systemischen Kreislauf und in der Folge in den Knochen eingeschwemmt werden (Jones, Sakovich 1966), (Jones 1993).

Störungen im Lipoproteinstoffwechsel werden ebenfalls mit dem Auftreten einer Osteonekrose in Zusammenhang gebracht (Kawai et al. 1980). Bei hyperlipämischen Kaninchen konnte ein erniedrigter Plasma-HDL-Spiegel bei unbekanntem Mechanismus mit der Akkumulation von Lipiden in peripheren Geweben, vor allem im Haverschen Kanal und dem Auftreten einer Osteonekrose assoziiert werden (Kawai et al. 1980).

Low-Density-Lipoproteine (LDL) sind Lipoproteine, die durch Delipidierung aus den Very-Low-Density-Lipoproteinen (VLDL) entstehen und Cholesterin zu den peripheren Zellen transportieren, wo es über einen Rezeptor aufgenommen wird. Eine Abweichung des LDL/HDL-Index von der Norm wird bei dem Krankheitsbild der Osteonekrose beschrieben (Miyanishi et al. 2001). Die Arbeitsgruppe konnte im Tiermodell zeigen, dass eine höhere LDL/HDL-Ratio signifikant mit der Entwicklung einer Osteonekrose assoziiert werden konnte. Sie vermuteten, dass die Erhöhung der LDL/HDL-Ratio einen Reiz zur Hypertrophie der intraossären Adipozyten darstellt (Miyanishi et al. 2001).

Die Osteonekrose wird mit einer Hypercholesterinämie assoziiert (Lavernia et al. 1999) und ein erhöhter Cholesterinspiegel in der Nekrosezone des Knochens bei systemischer Hypercholesterinämie nachgewiesen, wobei der Cholesteringehalt prozentual mit dem Anteil an nekrotischem Knochengewebe ansteigt (Boskey et al. 1982). Die in der Literatur v.a. am Tiermodell beschriebene Assoziation zwischen lokalem und systemischen Lipidmetabolismus und der Entstehung einer Osteonekrose soll in dieser Arbeit anhand von menschlichem Knochen und Plasma untersucht werden.

2.2.2.2. Idiopathisches Knochenmarksödemsyndrom

Ein Ödem, welches im Knochenmark auftritt, geht meist mit einer Gewebsirritation oder Gewebsverletzung einher. Es kann als eine Reaktion des Gewebes auf einen Reiz verstanden werden.

Dieses transitorische Phänomen wird mit Hilfe der Magnetresonanztomographie im Knochen diagnostiziert. Ein Knochenmarksödem wird in Fällen von Osteomyelitis (Unger et al. 1988) und stressbedingten Frakturen oder als Folge von Traumata (Lee, Yao 1988) beobachtet, wo es stets eine Begleiterscheinung zur eigentlichen Erkrankung darstellt. Das idiopathische Knochenmarksödemsyndrom, womit sich diese Arbeit beschäftigt, entsteht ohne dass primär eine Gewebsverletzung vorhanden war (Hofmann et al. 1993), (Hayes et al. 1993). Mikroskopische Untersuchungen der ödematösen Zone wurden erstmals 1997 von Plenk et al. anhand von Stanzungen nach Core-Decompression durchgeführt (Plenck, Hofmann et al. 1997). Es zeigten sich diffuse Areale, die flüssigkeitsgefüllte Markhöhlen darstellten. Zerstörte Adipozyten und fibrovaskuläre Regeneration wurde beobachtet. Der Knochen in diesen Zonen enthielt wenige Osteoblasten, die von einem Osteoidsaum bedeckt waren. Microcallus, der auf eine gesteigerte Knochenaktivität hindeutet wurde gesehen.

Osteoklastenaktivität war kaum nachweisbar. Eine Knochenmorphometrie zeigte eine normale und bis zu 20% erhöhte Knochendichte. Der Knochen wies ein gesteigertes Osteoidvolumen, einen verminderten Hydroxyapatitgehalt sowie Veränderungen bis hin zu unmineralisiertem Knochen auf (Hofmann, Plenck 1991).

Die Ätiologie und die Pathogenese der Erkrankung sind unklar. In einigen Fällen scheint es ein Vorläuferstadium einer beginnenden Osteonekrose zu sein, spontane Regressionen des Ödems etwa acht Monate nach Auftreten der Symptome wurden aber ebenso beschrieben (Wilson et al. 1988), (Hofmann et al. 1993).

Untersuchungen, die mit Hilfe des MRT Osteonekrosen detektierten, konnten initial kein Ödem nachweisen. Lediglich um die Nekrosezone herum war ein Knochenmarksödem sichtbar, was aber als reaktives Ödem verstanden wurde (Iida et al. 2000), (Fujioka, Kubo et al. 2001).

Eine eindeutige Klassifizierung eines Ödems als eine Gewebsreaktion auf eine bestehende Knochennekrose oder als idiopathisches Knochenmarksödemsyndrom, was in eine Knochennekrose übergegangen ist, ist nicht möglich (Solomon 1993), weil retrospektiv nach Auftreten einer Knochennekrose nicht mehr beurteilt werden kann, ob initial ein Knochenmarksödem vorhanden war (Turner et al. 1989). Da ein idiopathisches Knochenmarksödemsyndrom als Vorläufersyndrom einer Knochennekrose beschrieben wird und diese mit einem gestörten Lipidstoffwechsel assoziiert ist, soll in dieser Arbeit das Knochenmarksödemsyndrom als mögliche Folge eines gestörten Lipidstoffwechsels im Knochenmark untersucht werden. Auch wurde ein idiopathisches Knochenmarksödemsyndrom mit einem erhöhten Lp(a)-Spiegel assoziiert, was bedeuten könnte, dass auch für dieses Krankheitsbild eine systemische Dyslipidämie ursächlich sein könnte (Berger et al 2000).

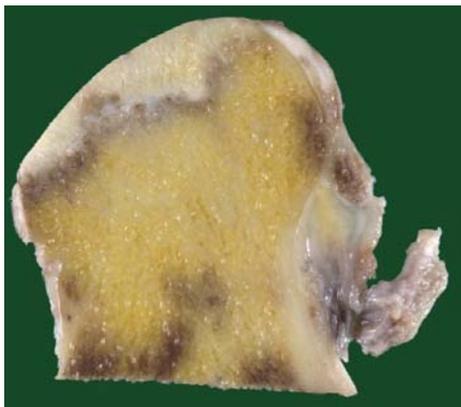
2.2.2.3. Coxarthrose

Die Arthrose ist die häufigste Gelenkerkrankung weltweit. Die pathologischen Umbauvorgänge finden am Gelenkknorpel und am subchondralen Knochen unterhalb der Knorpelschicht statt, so dass das tiefer liegendes Knochenmaterial als nicht pathologisch verändert angesehen wird (Radin, Rose 1986), (Mansell, Bailey 1998).

Daher wird der Knochen aus dem resezierten Hüftkopf dieser Patienten als gesunde Kontrolle zur vergleichenden Untersuchung mit der Knochennekrose und dem Knochenmarksödemsyndrom verwendet. Die Entscheidung für die Annahme der Coxarthroseproben als "gesunde" Proben erscheint legitim, da erstens keine Erkenntnisse aus der Forschung vorliegen, die dem widerspricht und zweitens die Coxarthroseproben auch in anderen Versuchen als "gesunde" Probe verwendet werden (Miller et al. 1996).

Mehr als 80% der über 75-jährigen sind von einer Arthrose betroffen.

Abbildung 5



Makroskopisches Bild einer Coxarthrose. Erkennbar wird die fehlende Knorpeloberfläche des Gelenks bei bereits geschädigtem Knochengewebe subchondral. (Fortgeschrittenes Stadium). (Osteopathologie des Universitätskrankenhauses HH Eppendorf, Prof. Dellling.)

Die Erkrankung tritt nach einer Manifestation im Kniegelenk am zweithäufigsten im Hüftgelenk, als Coxarthrose, auf (Felson et al. 1988). Verschiedene Ursachen werden mit dem Auftreten der Coxarthrose assoziiert s. Abb. 5.

Die Ätiologie ist unbekannt. Neben genetischen Faktoren (Lanyon et al. 2000) werden vor allem Adipositas und Gelenkfehlstellungen mit dem Auftreten einer Coxarthrose durch die biomechanische Überlastung des Gelenks in Zusammenhang gebracht (Felson et al. 1988), (Nevitt et al. 1999). Ebenfalls werden metabolische Störungen für die Entstehung der Erkrankung diskutiert. Unter anderem gelten Dyslipidämien, wie z.B. die Hypercholesterinämie (Stürmer et al. 1998) als Risikofaktoren für das Auftreten einer Coxarthrose (Aspden et al. 2001), (Lawrence et al. 1998).

Da das Auftreten einer Arthrose ebenso wie das Auftreten einer Knochennekrose und möglicherweise auch des Knochenmarködemsyndroms mit dem Vorhandensein einer systemischen Dyslipidämie assoziiert wird, wird das Plasma der Patienten mit Coxarthrose, Knochennekrose und idiopathischem Knochenmarksödemsyndrom auf Dyslipidämien untersucht und mit den Lipidparametern eines Kollektives ohne Knochen- oder Knorpelerkrankungen verglichen.

3. Material und Methoden

3.1. Patienten

Es wurden für die Analysen Knochenmark und venöses Blut von 19 Patienten ausgewertet. Die Patienten sind männlich, n=9, und weiblich, n=10, und stammen zum Teil aus asiatischen (männlich, n=1) und arabischen (männlich, n=1) Ländern. Das Alter der Patienten variiert von 37 bis 81 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 58 Jahren, s. Abb. 1. Alle Patienten wurden in der Orthopädischen Klinik des Universitätskrankenhauses Hamburg Eppendorf operativ behandelt. Die Patienten zeigen drei verschiedene Krankheitsbilder:

-11 Patienten erhielten eine Hüftprothese wegen Coxarthrose, hier lag das Durchschnittsalter bei 65 Jahren.

-6 Patienten waren an einer Knochenmarksnekrose erkrankt und wurden mit einer Core Decompression behandelt bzw. ein endoprothetischer Hüftgelenkserersatz vorgenommen. Das Durchschnittsalter war in dieser Gruppe 40 Jahre.

-2 Patienten wiesen neben der Osteonekrose in der kontralateralen Hüfte ein Knochenmarksödemsyndrom auf.

-2 Patienten wurden aufgrund eines idiopathischen Ödems im Knochenmark des Hüftkopfes ebenfalls mit einer Stanzung behandelt. Das Alter der Patienten lag bei 37 Jahren.

Siehe Abb. 3 für die in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen für die Krankenkollektive und gesunde Kontrollen.

Während der jeweiligen Operation wurde Knochenmark aus dem Hüftkopf des proximalen Femur entnommen und, sofern möglich, präoperatives venöses Blut des nüchternen Patienten.

Abbildung 1 Charakterisierung der Patienten.

Patienten	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Geschlecht	M	F	M	M	M	F	M	F
Nationalität	Europa	Europa	Asiate	Araber	Europa	Europa	Europa	Europa
Knochenpathologie	KÖ	KÖ	ON	ON	CA	CA	ON	CA
Plasma vorhanden	n.n.	n.n.	n.n.	ja	ja	n.n.	ja	n.n.
Hypercholesterinämie	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	n.n.	-	n.n.
Hypertriglyceridämie	n.n.	n.n.	n.n.	-	-	n.n.	-	n.n.

Patienten	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
Geschlecht	F	M	F	F	M	M	F	F
Nationalität	Europa							
Knochenpathologie	CA	ON/KÖ						
Plasma vorhanden	ja	n.n.	ja	ja	n.n.	ja	ja	n.n.
Hypercholesterinämie	-	n.n.	-	-	n.n.	-	ja	n.n.
Hypertriglyceridämie	-	n.n.	-	-	n.n.	-	-	n.n.

Patienten	XVII	XVIII	XIX
Geschlecht	F	F	M
Nationalität	Europa	Europa	Europa
Knochenpathologie	CA	ON/KÖ	ON
Plasma vorhanden	ja	ja	ja
Hypercholesterinämie	-	ja	-
Hypertriglyceridämie	ja	-	-

n.n.= nicht gemessen, dargestellt sind alle erhobenen Daten des einzelnen Patienten.
- =nicht erkrankt.

Das Patientenplasma wurde für die Bestimmung der Fettsäureverteilung mit dem Plasma eines gesunden Kollektives (GK, n=7), ohne Knochen -und Gelenkskrankheiten verglichen.

Die Personen sind männlich (n=3) und weiblich (n=4) und stammen aus Deutschland. Das Alter der Personen variiert von 23 bis 65 Jahren. Das Durchschnittsalter lag bei 36 Jahren, s. Abb. 2.

Abbildung 2 Charakterisierung des gesunden Kollektives.

GK	I	II	III	IV	V	VI	VII
Geschlecht	M	F	M	F	F	M	F
Alter	23	23	25	26	35	58	57
Nationalität	Europa						
Knochenpathologie	-	-	-	-	-	-	-
Hypercholesterinämie	-	-	-	-	-	-	-
Hypertriglyceridämie	-	-	-	-	-	ja	-

Abbildung 3 Aufstellung der in dieser Arbeit für die Kollektive verwendeten Abkürzungen.

CA	CAk	ON	KÖ	GK
Coxarthrose	Coxarthrose, bei Knochengewebsanalysen gleichbedeutend mit der „gesunden“ Kontrolle.	Osteonekrose	Knochenmarksödem syndrom	Gesundes Kollektiv, Patienten ohne Knochen- oder Gelenks-erkrankungen zum Plasmalipidvergleich.

Alle Patienten haben ihr schriftliches Einverständnis zur wissenschaftlichen Analyse der Gewebeproben gegeben.

Eine Genehmigung der Ethikkommission der Ärztekammer zu dieser Studie liegt vor.

3.2. Gewebe

Knochenproben

Während der oben genannten Operationen wird die Knochensubstanz auf zwei Wegen erhalten. Entweder wird der Hüftkopf komplett reseziert oder es wird subtrochantär eine Stanzung durch den Schenkelhals in den Hüftkopf vorgenommen (Core Decompression).

Die Gewebeproben wurden sofort nach ihrer Entnahme in flüssigem Stickstoff zwischengelagert und bis zur Analyse bei -80°C aufbewahrt.

Es wurden Gewebeproben von 80mg bis 500mg analysiert.

Plasmaproben

Das Blut wurde prä OP nüchtern und venös entnommen.

Bei allen Proben handelt es sich um gerinnungsunterdrücktes EDTA-Blut, was nach der Abnahme bei 5°C gelagert und anschließend bei 5°C 10 Minuten, bei 2500 UPM zentrifugiert wurde. Das Plasma wurde separiert und aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.3. Lipidextraktion aus Knochen und Plasma

In dieser Arbeit werden die Fettsäuren aus Knochenlipid und Plasmalipid analysiert. Der Analysemethode vorangestellt ist die Lipidextraktion.

Methode der Lipidextraktion aus Plasma- und Knochenlipid

Material

Geräte

- Homogenisieren: Ultra Turrax, DZM 5 500-50000 1/min, Fa. IKA-Tron
- Zentrifugieren: Zentrifuge Rotanta/RP, Fa. Hettich
- Lyophilisieren: Lyovac GT2, Fa. Leybold-Haereus
- Vortexen: ReAx 2000, Fa. Heidolph
- Tischwaage, Fa. Sartorius
- Glasröhrchen ohne Schraubung mit einer Länge von 9,5cm und einem Durchmesser von 1,5cm, Glasröhrchen 100 ml Fassungsvermögen
- Pyrexröhrchen mit Schraubung und Deckel
- Mörser
- Luerzange und sonst. chirurgisches Material
- Hood, Kühlraum, Glasware, 1,5ml und 2ml Tubes, Fa. Eppendorf; Styroporboxen mit Deckel; Pflasterband Fa. Beiersdorf; Parafilm, Pipetten, Waagepapierchen und Plastikschälchen.
- Auswertung: EXEL, Word, STATISTICA, Fa. Microsoft

Chemikalien

- Methanol, Chloroform, Ethanol p.a., Fa. Merck
- 0,88% KCL, Fa. Merck in Aqua dest.
- PBS: Ansatz: 40g NaCl, 1g KCL, 1g KH₂PO₄, 5,75g Na₂HPO₄·x1H₂O ad 5l, ph:7,5, alles Fa. Merck
- EDTA 0,5M, Fa. Sigma
- Standards: Heptadekansäure(Heptadecanoic acid methyl ester, capillary GC), Fa. Sigma; 5-alpha-Cholestan, Fa. Sigma; Butylhydroxytoloul (BHT), Fa. Sigma.
- Für Knochen:
Heptadekansäure: 20mg/ml in Chloroform, pro mg Ausgangsgewebe wird 6mg des internen Standards hinzugegeben.
5-alpha-Cholestan: 10mg/ml in Ethanol, pro mg Ausgangsgewebe wird 3mg des internen Standard hinzugegeben.

BHT: 0,1M/l in Ethanol, pro mg Knochengewebe, je 25µl der genannten Mischung.

- Für Plasma:
Heptadekansäure: 0,2mg/ml in Chloroform, pro ml Plasma 20µg (Standard),
5-alpha-Cholestan: 0,1mg/ml in Ethanol, pro ml Plasma 10µg (Standard).
BHT: 0,1M/l in Ethanol, auf 1ml Plasmaprobe, je 25µl der genannten Mischung.
- Trockeneis

Methode

Homogenisierung der Gewebsfragmente

Im Gegensatz zum Plasma, was als relativ homogenes Material vorliegt, muss das Knochenmark homogenisiert werden, um Lipide aus dem Zellverbund zu lösen. Die Knochenproben werden auf Trockeneis verarbeitet. Für die Homogenisierung wird das **Knochenmark** ausgewogen und mit:

- Methanol, dem 10fachen in ml der ausgewogenen Probe in mg,
- Chloroform, dem 20fachen in ml der ausgewogenen Probe in mg und
- BHT (eingesetzte Menge, siehe "Chemikalien")

versetzt, mit Stickstoff bedampft und auf Eis aufgetaut. Die Zugabe von BHT und die Bedampfung mit Stickstoff verhindert die Autooxidation der Fettsäuren. Anschließend wird das Gemisch 5 Minuten mit Hilfe des Ultra Turrax homogenisiert.

Das **Plasma** wird mit

- Chloroform und Methanol 2:1 in der 4fachen Menge des eingesetzten Plasmavolumens versetzt
- BHT (eingesetzte Menge, siehe "Chemikalien")

Zugabe der Standards für die GC-Messung

- Heptadekansäure (eingesetzte Menge, siehe "Chemikalien")
- 5-alpha-Cholestan (eingesetzte Menge, siehe "Chemikalien")
- Homogenisierungsschritt 5 Minuten.

Diese Vorgehensweise gilt für Lipidextraktionen aus Knochengewebe. Mit **Plasma** wird anders verfahren.

Die Mengen der eingesetzten Standards sind geringer.

- Heptadekansäure, (eingesetzte Menge, siehe "Chemikalien")
- 5-alpha-Cholestan, (eingesetzte Menge, siehe "Chemikalien")

Überstand und Sediment

Nachdem homogene Gemische vorliegen, werden diese zentrifugiert.

- 20 Minuten bei 3000 UPM und 4°C.

Es bilden sich zwei Phasen aus, die abpipettiert werden. Das Knochensediment wird erneut lipidextrahiert.

Der Überstand wird getrennt vom Sediment weiterbehandelt.

- KCL 0,88% wird dem Überstand zugesetzt. Die zugesetzte Menge entspricht 1/4 des Volumens des Überstandes.

Nun werden die beiden sich ausbildenden Phasen in einem Zentrifugenschritt separiert.

- 10 Minuten bei 3000 UPM bei 4°C.

Die obere wässrige Phase wird für weitere Analysemöglichkeiten bei -20°C gelagert, die untere organische Phase wird mit

- KCL 0,88% und Methanol 1:1 versetzt, wobei die zugesetzte Menge dem Volumen der organischen Phase entspricht.
- 5 Minuten gemischt und erneut zentrifugiert.

Die organische Phase, in der sich das Lipid der Probe befindet, wird bei -80°C gelagert.

Mit dem **Plasma** wird anders verfahren. Nach dem Zentrifugenschritt bilden sich drei Phasen aus, wovon die mittlere ausgefälltes Protein enthält. Die obere Phase und die mittlere werden verworfen, die untere organische Phase wird ohne einen weiteren Extraktionsschritt bei -80°C gelagert.

Das Sediment

Die folgenden Schritte der Sedimentweiterbehandlung gelten nur für Knochenmarkspalten.

Nachdem der Überstand abgenommen worden ist, wird das Sediment

- 8 Stunden gefriergetrocknet,
- der Knochensand wird anschließend ausgewogen.

Um nicht zerkleinerten Knochenstrukturen, die sich im Knochensand befinden dennoch zu lösen und etwaige Lipide freizusetzen, wird er mit

- EDTA 0,5M, dem 20fachen in ml vom Ausgangsgewicht der Probe in mg, 5 Minuten erneut mit dem Ultraturrax zerkleinert, dann
- 8 Stunden auf einem Rolltisch bei 4°C gelöst.

Dieses Gemisch wird mit

- Methanol, dem 10fachen in ml des Volumens der Probe,
- Chloroform, dem 20fachen in ml des Volumens der Probe versetzt,
- 5 Minuten mit dem Ultra Turrax homogenisiert und anschließend
- 10 Minuten bei 3000 UPM bei 4°C zentrifugiert.

Man erhält drei Phasen:

- die obere Phase wird verworfen
- die mittlere Phase, die alle nicht durch EDTA löslichen Substanzen enthält, wird bei -80°C gelagert, und
- die unterste Phase wird erneut gewaschen.

Um in den weiteren Analysen einen Anhaltspunkt für die Extraktionseffizienz der einzelnen Proben zu haben, wird bei jeder Extraktion das Volumen der erhaltenen organischen Phasen bestimmt, um in späteren Analysen festzulegen wie viel Lipid aus der Probe extrahiert werden konnte, siehe Abb. 4.

Abbildung 4 Vergleich der Verfahrensschritte der Lipidextraktion aus verschiedenen Geweben.

	Knochenmark	Plasma
Zugabe von: Methanol und Chloroform und BHT	10fach (w/v) 20fach (w/v) (eingesetzte Menge, siehe "Chemikalien").	4fach Chloroform und Methanol; 2:1 (v/v) (eingesetzte Menge, siehe "Chemikalien").
Standards: Heptadecansäure und 5-alpha-Cholestan	(eingesetzte Menge, siehe "Chemikalien")	(eingesetzte Menge, siehe "Chemikalien")
Ultraturrex	ja	nein
Zentrifuge	ja	ja
Phasenbildung nach 1. Zentrifugation	nein	ja (durch Wasser im Plasma)
Überstand mit KCL (0,88%) extrahieren	ja	nein
Überstand mit KCL (0,88%) und Methanol 1:1 extrahieren	ja	nein
Sediment lyophilisieren und Strukturen mit EDTA lösen	ja	nein (kein Sediment vorhanden)
gelöstes Sediment lipidextrahieren	ja	nein

3.4. Gas-Chromatographie

Anhand der Gas-Chromatographie (GC) werden freie Fettsäuren, Gesamtfettsäuren und Gesamtcholesterin bestimmt.

Während die Methode für Plasma etabliert ist, musste sie für Knochenlipid modifiziert werden.

Um die Messungen durchzuführen, wird initial Triglycerid in den Proben hydrolysiert: Hierbei werden die Fettsäuren aus den TG abgespalten.

Anschließend werden die Fettsäuren methyliert (Hughes et al. 1986), (Wang et al. 1992), über diesen Schritt werden die Fettsäuren verestert und für die Messung unter hohen Temperaturen stabilisiert.

Das Cholesterin wird ebenfalls verestert und stabilisiert, dazu wird es silyliert (Hughes et al. 1986), (Carpenter et al. 1994). Im Injektor des GC verdampfen die Substanzen, getrennt werden sie auf der Methyl-Siloxansäule. Die einzelnen Komponenten werden dann im Flammenionisationsdetektor gemessen und mit Hilfe der zugegebenen internen Standards quantifiziert.

Es stellte sich nach den durchgeführten Messungen heraus, dass für den GC fälschlicherweise initial keine Kalibrierung vorgenommen worden war.

Die Response Faktoren der Fettsäuremethylester wurden als 1 angenommen. In einer nach dem experimentellen Teil dieser Arbeit durchgeführten Kalibrierung wurden die Responsefaktoren der Fettsäuremethylester zwischen 0,8-1,8 gegenüber dem Standard Heptadekanmethylester ermittelt. In Plasmaproben sind die Abweichungen in der Quantität von den am stärksten vertretenen Fettsäuren wie Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolsäure allerdings nicht größer als 20-25% je Fettsäure, das gilt ebenso für die Gesamtfettsäuren.

Methode der Gaschromatographie

Material

Geräte

- 5890 Series II, Gas Chromatograph, Fa. Hewlett Packard
- Software: HP 3365 Series II, Chem Station
- Vorteur: ReAx 2000, Fa. Heidolph

Chemikalien

- Standards Heptadekansäure, 5-alpha-Cholestan, Butylhydroxytoloul (BHT) Chloroform, Methanol, Toluol, Hexan, Fa. Merck
- Natriummethylat, 0,5M Lösung in Methanol A.C.S. Reagenz, Fa. Aldrich
- Essigsäure 2,5%, verdünnt mit Aqua dest., Fa. Merck
- NIN-Dimethylformamid (DMFA) für die Spektroskopie, Fa. Merck Uvasol
- bis(-Trimethylsilyl)trifluoroacetamid (BSTFA), Fa. Sigma

Methode

Vorbereitung und Messung der Knochenmarkslipidproben

Um das Lipid aus dem Knochenmark der GC zugänglich zu machen, wird das in Chloroform gelöste Lipid, erhalten in der Lipidextraktion folgendermaßen aufbereitet:

- Das Knochenmarkslipid liegt in Chloroform gelöst und bei -80°C gelagert vor. Für die weiteren Schritte benötigt man ein Chloroformvolumen, dem etwa 1,8mg bis 3mg extrahiertes Ausgangsgewebe entsprechen.
Wobei pro Probe nicht mehr als 0,8 mg Lipid für die GC-Messung eingesetzt werden sollte. Je nach Lipidgehalt der Probe variieren die erforderlichen Mengen.
- Da für die weiteren Schritte das Lipid ohne Lösungsmittel vorliegen muss, wird das Chloroform nun unter Stickstoff in ca. 10 Minuten vollständig abgedampft.

Hydrolyse und Methylierung

- Danach folgt die Hydrolyse und die Methylierung des abgedampften Lipids. Dazu wird die Probe mit 250µl Toluol und 500µl Natriummethoxid 0,5M mit Hilfe des Vortex gemischt, mit Stickstoff bedampft und 15 Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Dieses Gemisch wird nun mit 1ml Essigsäure neutralisiert, mit 250µl Hexan extrahiert, für 1 Minute gemischt und bei 3000UPM, 4°C 10Min. zentrifugiert. 200µl werden dann aus der oberen Hexanphase in ein 1,5ml Eppendorf-Tube abpipettiert. Das Hexan wird ca. 15-30 Minuten unter Stickstoff abgedampft.

Silylierung der Probe

- Der Niederschlag wird in 100µl DMFA aufgenommen und mit 100µl BSTFA gemischt, anschließend 120 Minuten bei 50°C im Wärmeblock inkubiert, danach wird die Probe erneut unter Stickstoff ca. 60 Minuten abgedampft und der Niederschlag in Toluol aufgenommen.

Einspritzen der Probe

- Das Einspritzen der Probe in den Gas-Chromatographen erfolgt nach folgendem Schema in einer 10µl Hamilton-Spritze:
1µl Toluol, 1µl Luft, 2µl Probe, 1µl Luft.

Vorbereitung und Messung der Plasmalipidproben

- Die Lipidextraktion der Lipide aus dem Plasma, ist oben beschrieben.
- Die Schritte der Hydrolyse und Methylierung werden analog derer für Knochenmark vollzogen.
- Die Inkubationszeit der Silylierung beträgt für das Plasma lediglich eine Stunde bei RT.
- Aufziehen der Hamilton-Spritze siehe oben.

3.5. Enzymatische Analysen

3.5.1. Enzymatische Triglyceridbestimmung

Der benutzte kommerzielle Test wurde zur enzymatischen in vitro Quantifizierung von Triglyceriden in Humansen- und plasma entwickelt. Während die Methode für Plasma etabliert ist, musste sie für Knochenlipid modifiziert werden. Die Methode beruht auf der Arbeit von Wahlefeld unter Verwendung einer Lipoproteinlipase aus Mikroorganismen zur schnellen und vollständigen Hydrolyse von Triglyceriden zu Glycerin mit anschließender Oxidation zu Dihydroxyacetonphosphat und Wasserstoffperoxid. Das entstandene Wasserstoffperoxid bildet unter katalytischer Wirkung der Peroxidase mit 4-Aminophenazon und 4-Chlorphenol in einer Endpunktreaktion einen roten Farbstoff, der im Photometer quantifiziert wird.

In den enzymatischen Puffer wird 10µl Plasma gegeben, dieses wird gemischt und 15 Min. bei 37°C inkubiert. Der o.g. Farbumschlag wird photometrisch gemessen.

Neben der Probe werden zwei Standards der Firma mitanalysiert. Precinorm (PN), als Standard des Normalwertes (97-145mg/dl) und Precipath (PP) als Standard der pathologischen Triglycerid-Konzentration im Plasma (294-398mg/dl).

3.5.2. Enzymatische Cholesterinbestimmung

Der Cholesterol Assay Kit bietet eine fluorometrische Methode für die sensitive Quantifizierung von Cholesterin mit der Hilfe von einem Mikroplate Reader. Eine Konzentration von weniger als 20ng/ml Cholesterin kann verlässlich gemessen werden, da Cholesterin im Blut auch in Form von Cholesterinestern vorliegt, detektiert dieser Test basierend auf einem enzymatischen Prinzip sowohl freies Cholesterin als auch Cholesterinester. Cholesterinester werden mit Hilfe der Cholesterinesterase zu Cholesterin hydrolisiert. Cholesterin wird nun durch die Cholesterinoxidase zu H_2O_2 und dem entsprechenden Keton Produkt oxidiert.

Das H_2O_2 wird durch 10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazin, dem Amplex red Reagenz, detektiert. In Gegenwart einer horseradish peroxidase (HRP) reagiert das Amplex Red Reagenz mit H_2O_2 , wobei in einem Verhältnis von 1:1 stark fluoreszierendes Resorufin entsteht. Die Fluoreszenz wird mit einem Fluoreszenz Mikroplate Reader bei einer Extinktion von 530nm und Fluoreszenz Detektion von 570nm gemessen.

Methode der enzymatischen Messungen

Material

Photometrische Triglyceridbestimmung

- Photometer 150-20 Spectrophotometer, Fa. Hitachi
- Vortexer, ReAx 2000, Fa. Heidolph
- Schüttler mit Temperaturregulation, Fa. Eppendorf
- 1ml Spritzen und Kanülen, Fa. Braun
- Eppendorf Tubes, Parafilm

Fluorometrische Cholesterinbestimmung

- Fluoreszenz Mikroplate Reader, Software für den Reader und die Auswertung in EXEL
- Elisa-Platten, 96 well, Fa. Nunc
- Wärmeofen, Fa. Haereus

Chemikalien: enzymatische Analysen

Photometrische Triglyceridbestimmung

- Kit für Plasmatriglyceridbestimmung GPO-PAP, Fa. Roche
- Standards: Precinorm , Precipath L, Fa. Roche
- Triton X-100, Fa. Merck,
- Tritonpuffer (CLB), Ansatz: Tris 50mM, (Fa. Invitrogen), 2mM $CaCl_2$, (Fa. Merck), 80mM NaCl (Fa. J.T. Baker), 1% TX-100 in Aqua dest.
- Chloroform, Methanol p.a., Fa. Merck

Fluorometrische Cholesterinbestimmung

- Amplex red Cholesterol Assay Kit (A-12216), Fa. Molecular Probes
Kit Bestandteile:

- Amplex Red Reagenz, Horseradish Peroxidase (HRP), Reaktionspuffer (20ml 0,5M Kalium Phosphat, pH 7,4, 0,25 M Natrium Chlorid, 25mM Cholic acid, 0,5% Triton X-100), Cholesterin Oxidase von Streptomyces, Cholesterinesterase vom Rinderpankreas.
Von allen Komponenten wurden Stocklösungen nach Herstellerangaben angesetzt und diese lichtgeschützt bei -20°C aliquotiert gelagert.
- Triton X-100, Tritonpuffer als Detergenz (CLB), s.o.
- Standard Precinom, Fa. Roche

Lipid aus Knochengewebe und Plasma für die enzymatischen Analysen

Für die enzymatische Cholesterin und Triglyceridbestimmung aus Knochenmark geht der enzymatischen Analyse die oben beschriebene Lipidextraktion voraus. EDTA versetztes Patientenplasma kann direkt eingesetzt werden s.o..

Methode

Aufarbeitung von Knochenlipid für die enzymatische Triglycerid- und Cholesterinanalyse

Die Aufbereitung der Lipidproben ist für beide Tests gleich, wie für jeden Test einzeln weiter verfahren wird folgt im Anschluss.

- Das Lipid wurde von seinem Lösungsmittel Chloroform befreit.
Dazu wurden von der Chloroformphase standardmäßig -500µl bzw. 1250µl, je nach vorhandenem Volumen der Chloroformphase in ein 1,5 ml Eppendorf-Tube abgenommen und unter Stickstoff das Chloroform abgedampft.
Wichtig bei dieser Prozedur war es, dafür zu sorgen, dass das abgedampfte Lipid eine zähflüssige Konsistenz behält.
Einfacher war dies zu handhaben, wenn ein größeres Chloroformvolumen verwendet wurde, z.B. 1250µl.
- Nach dem Abdampfen wird das erhaltene Lipid mit seinem Detergenz Tritonpuffer 5% versetzt.
Um das Volumen des Detergenz zu erhalten, wird das Chloroformvolumen, was eingedampft wurde mit dem Faktor 0,4 multipliziert.
- Nachfolgend wird die Mischung im Tube leicht geschwenkt, so dass sich das Lipid vom Boden des Tubes ablösen kann und damit dem Detergenz zur Reaktion zur Verfügung steht. Dann wird das Tube zügig in einen Schüttler überführt. Bis alle Analysen abgeschlossen sind, verbleiben die Proben bei Raumtemperatur im Schüttler.
Um nun eine optimale Mischung zu erhalten, wird das Medium durch eine Kanüle 0,4x20mm in eine 1ml Spitze aufgezogen und durch mehrfaches Wiederholen dieses Vorgangs wird ein gutes Mischverhältnis erreicht.
Längeres vortexen sollte vermieden werden. Nach jedem Arbeitsschritt werden die Proben wieder in den Schüttler verbracht.

Durchführung der enzymatischen Triglyceridbestimmung

Leerwert

- Zur Leerwertbestimmung werden 10µl Aqua dest. dem Reaktionspuffer zugesetzt.

Standards

- Es werden bei jeder Messung zwei Standards mit untersucht.
Precinorm (Normbereich für Triglyceride im Plasma: 97-145mg/dl) und Precipath (Normbereich für Triglyceride im Plasma: 294-396mg/dl).
Von den Standards werden je 10µl dem Reaktionspuffer zugesetzt.

Proben

- Die Proben befinden sich vor ihrer Gabe in den Reaktionspuffer im Schüttler und werden bei Raumtemperatur gemischt.
Für die enzymatischen Untersuchungen werden jeweils nur die Verdünnungen genutzt. Dabei handelt es sich um eine 1:10, 1:50 und 1:100 Verdünnung, die 24 Stunden vor der Messung hergestellt werden. Die Proben werden erst kurz vor ihrer Gabe in den Reaktionspuffer dem Schüttler entnommen und ein weiteres Mal mit einer 1ml Spritze und einer Kanüle 0,4x20mm durchgemischt. Von jeder Probe werden ebenfalls 10µl entnommen und dem Reaktionspuffer zugegeben.

Weiteres Verfahren

- Sobald eine Probe zugegeben wurde, wird das Proben-Puffergemisch zügig mit Hilfe des Vortex 3 sec. durchmengt.
Nachdem alle Reaktionsgefäße bestückt und gemischt worden sind, werden sie für 10 Minuten bei 37°C in einen Wärmeschrank gestellt.
Dann werden die Proben im Photometer gemessen.

Durchführung der enzymatischen Cholesterinbestimmung

Standards

- Um eine Kontrolle über die Validität der Messung zu erhalten, wird der Standard Precinorm in verschiedenen Verdünnungen zusammen mit den eigentlichen Proben mituntersucht, außerdem wird anhand der Verdünnungen die Standardkurve für die Auswertung gebildet.
Das verwendete Precinorm hat eine Cholesterinkonzentration von 1,7mg/ml. Eingesetzt werden Konzentrationen von 0,2,4,8,16 µg/ml. Die Verdünnungen werden mit Hilfe des o.g. Reaktionspuffers hergestellt.

Probenvorbereitung

- Eingesetzt wird das abgedampfte und unverdünnte Lipid, was in Detergenz aufgenommen 12 Stunden bei Raumtemperatur (RT) im Schüttler gemischt wurde.

Es werden Verdünnungen mit dem Reaktionspuffer in 1:10, 1:50, 1:100 und 1:200 hergestellt.

Vor jeder Entnahme des in Detergenz aufgenommenen Lipids muss das Gemisch erneut mit einer Spritze und einer Kanüle durchmengt werden.

Bestückung der Analyseplatte

- Es werden jeweils Doppelbestimmungen vorgenommen.
Je Well werden nun 50µl des Standards b.z.w. seinen Verdünnungen oder der Proben und ihren Verdünnungen hineinpipettiert.
Um die enzymatische Reaktion beginnen zu lassen, werden in jedes Well 50µl der Reaktionslösung gegeben.
Die Analyseplatte wird leicht geschwenkt und 30 Minuten bei 37°C in den Wärmofen verbracht.
Danach wird die Platte in den Reader gegeben und sofort bei 530nm- 570 nm ausgewertet.

Auswertung

- Die Auswertung erfolgt computerunterstützt anhand einer Standardkurve.

3.6. Dünnschichtchromatographie

Es wurde die Methode der Dünnschichtchromatographie gewählt, um sich mit einfachen Mitteln einen Überblick über die Menge des Knochenlipids und seine Bestandteile Triglycerid und Cholesterin in einer Probe zu verschaffen. Verwendet wird eine Kieselgelplatte, auf die in Chloroform gelöstes Lipid aufgetragen wird, welches in einem Laufmittel in verschiedene Fraktionen auf der Platte aufgetrennt werden kann. Zur Definition der einzelnen Fraktionen laufen zwei Standards mit. Die

- Cholesterin,
- Monoolein, Diolein und Triolein, sowie
- Ölsäure enthalten. Das aufgetrennte Lipid wird im Folgenden in einer Jodkammer durch solubilisiertes Jod angefärbt.

Material

Geräte

- DC-Fertigplatten, Kieselgel 60 F-254, Fa. Merck
- DC-Plastikfolien, Kieselgel 60, ohne Fluoreszenzindikator, Fa. Merck
- DC-Trennkammern
- Jodkammer, Maße wie Laufkammer.
- Abdampfanlage, Hood, Eppendorf Tubes.

Chemikalien

- Als Laufmittel wurde: Hexan 80ml, Diethylether 20ml, Eisessig 100% 1ml eingesetzt. Alle Reagenzien p.a., Fa. Merck
- Jod solubilisiert, Fa. Merck
- Standard I, 178-4, Fa. Sigma, Standard II, 178-6 Sigma. Die Standards wurden so eingesetzt wie sie vom Hersteller bezogen wurden. Von beiden Standards wurden je 5µl eingesetzt.

Material Knochenmark

Für die Dünnschichtchromatographie wird direkt das in Chloroform gelöste Lipid nach Extraktion aus Knochenmark verwendet.

Methode

Das Knochenlipid wird folgendermaßen behandelt:

- Bei den Proben mit einem Ausgangsgewicht von 500mg wird ein Volumen von 2000µl des sich in Chloroform befindlichen extrahierten Lipids verwendet.
Bei den Proben deren Ausgangsgewicht c.a.100mg beträgt, wird ein Volumen von 1000µl verwendet.
Von diesem Volumen werden je 25% des Volumens unter Stickstoff abgedampft und 5µl auf die Kieselgelplatte gegeben.
- Im nächsten Schritt werden weitere 25% des Volumens abgedampft.
Es werden 5µl auf die Kieselgelplatte gegeben.
- Man lässt nochmals 25% abdampfen und trägt von diesem konzentrierterem Gemisch ein weiteres Mal 5µl auf.
- Die Kieselgelplatte wird für 5 Minuten bei Zimmertemperatur getrocknet und für 45 Minuten in das Laufmittel gestellt, wo die Lauffront nicht weiter als bis zum oberen 1/4 wandern sollte, um die Signale, die als kreisförmige Flecken imponieren nicht auseinander laufen zu lassen, was im weiteren zu Problemen in der Auswertung führt.
- Nach dem Lauf wird die Kieselgelplatte für 15 Minuten unter der Hood getrocknet.
- Danach wird die Platte in eine Glaskammer mit solubilisiertes Jod gegeben, wo sie ca. 5-10 Minuten, je nach Jodabsättigung der Luft in der Kammer verbleibt.
- Für die Auswertung wurden die Kieselgelplatten mit einem hochauflösenden Kopierer kopiert, die Signale der Standards und der Proben ausgeschnitten und ausgewogen. Im weiteren wird die Konzentration dem Gewicht des Standardsignals gleichgesetzt und anhand dieser Daten mit Berücksichtigung der vorangegangenen Aufkonzentrierung die Konzentration der Proben errechnet. Bei dieser Methode ist es wichtig, in der Auswertung die Signale der Proben heranzuziehen, die in ihrer Farbintensität den Standardsignalen gleichen, um eine Vergleichbarkeit in der oben genannten Auswertung zu erzielen.

3.7. Erhebung eines Plasmalipidstatus und Plasmalipoproteinwerte

Für die Analysen wird EDTA-Blut verwendet. Die Analysen werden im Routinelabor durchgeführt.

3.8. Statistische Auswertung

Um eine adäquate statistische Auswertung der niedrigen Kollektivzahlen vornehmen zu können, wird in dieser Arbeit allgemein der Kruskal-Wallis-Test, ein Rangtest, mit $p < 0,05$ für unabhängige Stichproben verwendet. Dieser Test vergleicht die drei Gruppen untereinander. Da häufig sehr kleine Stichproben verwendet wurden, sollten statistische Signifikanzen lediglich als Hinweis gewertet werden, die entsprechenden Messungen noch einmal mit einer größeren Gruppe vorzunehmen.

4. Ergebnisse

Das Plasma der Coxarthrosepatienten (CA), der Knochennekrosepatienten (ON) und der Knochenmarksödempatienten (KÖ) wird mit einem Kollektiv von Probanden, ohne Knochen- oder Gelenkerkrankung (GK) verglichen.

Knochenlipidmessungen der Knochennekrosepatienten (ON) und der Knochenmarksödempatienten (KÖ) werden mit Lipidbestimmungen der Coxarthrosepatienten, als gesunder Kontrolle (CAk) verglichen.

Das Knochenmark der Coxarthrosepatienten wird als "gesund" angesehen und kann somit als Kontrolle fungieren, die Erkrankung ist aber mit systemischen Dyslipidämien assoziiert und somit könnten die Plasmawerte pathologisch sein, weshalb sie mit den Ergebnissen von Probanden verglichen werden, die keinerlei Knochen- oder Gelenkerkrankung aufweisen.

4.1. Ergebnisse der Plasmaanalysen

4.1.1. Plasmalipidanalyse

Das Plasma von Coxarthrose-, Nekrose- und Knochenödempatienten wurde auf das Vorliegen von Dyslipidämien untersucht, s. Abbildung 1.

Abbildung 1 Vergleich der Plasmalipidkonzentration der drei Kollektive.

		CA n=7* ¹	ON/KÖ n=4* ²
	Normwert	MW(±Std.)	
Triglyceride	<150mg/dl	140 (±71)	152 (±27)
Cholesterin	<220mg/dl	181 (±30)	186 (±32)
LDL	<150mg/dl	118 (± 28)	126 (±27)
HDL	>40mg/dl	35 (±8)* ³	30 (±10)* ⁴
VLDL	<30mg/dl	23 (±8,5)	31 (±6) n=3
LDL/HDL-Index	<4	3,4 (±1)	4,5 (±1,9)

Verglichen wurde die Plasmakonzentration von Plasmalipiden und Lipoproteinen bei Coxarthrose(CA),- und Nekrose/Knochenödempatienten(ON/KÖ). Unterlegt sind von der Norm abweichende Werte.

Alle Werte in mg/dl.

*¹(6Frauen: F/1Mann: M), *³HDL Mittelwert: Männer: 40mg/dl, Frauen: 34mg/dl.

*²(3Männer: M/1 Frau: F), *⁴HDL Mittelwert: Männer: 21mg/dl, Frauen: 36 mg/dl.

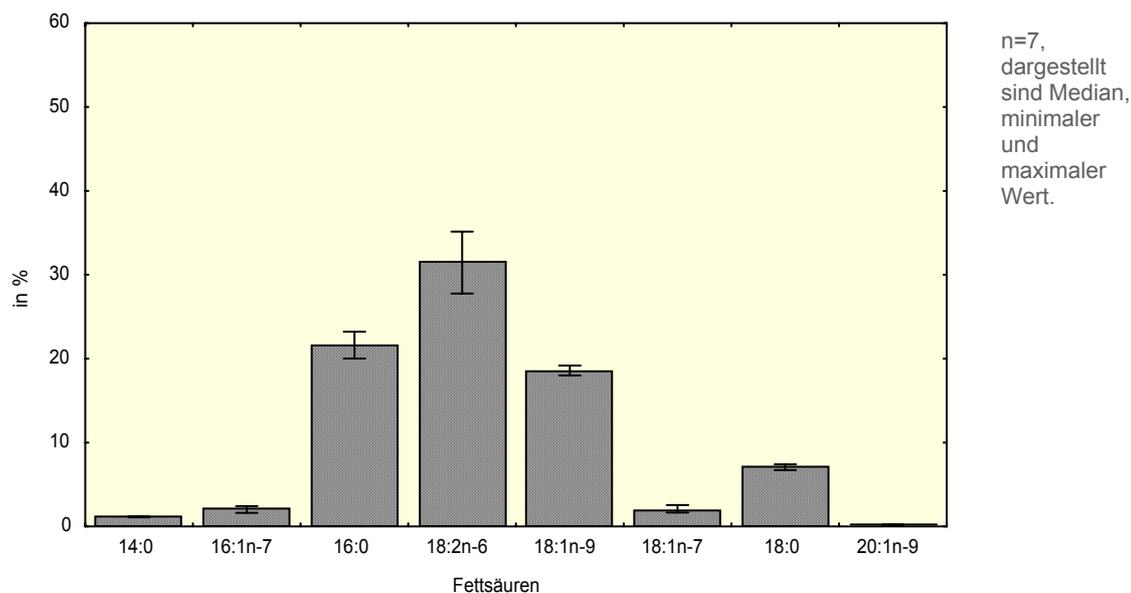
Die vorliegende Abbildung zeigt eine grenzwertige Erhöhung des Mittelwertes der Triglyceride und der VLDL und eine über Normbereich liegendem LDL/HDL-Index im Plasma (4,5 (±1,9)) der Patienten mit Knochennekrose. Außerdem ist ein unter dem Normbereich liegendes HDL (30mg/dl (±10mg/dl)) sowohl bei den Patienten mit Coxarthrose als auch bei den Patienten mit Knochennekrose nachweisbar.

4.1.2. Ergebnisse der Gas-Chromatographie des Plasmas

Fettsäureverteilung im Plasma von Individuen ohne Knochen- und Gelenkerkrankungen

Die folgende Aufstellung gibt einen Überblick über die Fettsäureverteilung im Plasma, siehe Graphik 1 und Tab. 1a,b im Tabellenanhang.

Graphik 1 Prozentuale Häufigkeitsverteilung der Fettsäuren im Plasma einer gesunden Stichprobe.



Dargestellt sind die häufigsten im menschlichen Plasma vorkommenden Fettsäuren.

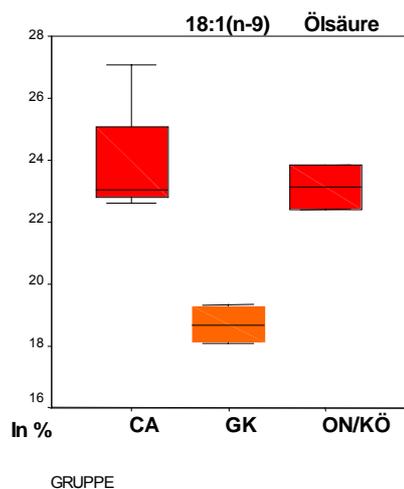
(14:0 Myristinsäure), (16:1n-7) Palmitoleinsäure, (16:0) Palmitinsäure, (18:2n-6) Linolsäure, (18:1n-9) Ölsäure, (18:1n-7) Vaccensäure, (18:0) Stearinsäure, (20:1n-9) Eicosaensäure.

Die Fettsäureverteilung im Plasma von gesunden Individuen weist Linolsäure als Fettsäure mit dem größten Anteil von 32% aus, es folgen mit 22% Palmitinsäure und 19% die Ölsäure. Die Fettsäureverteilung im Plasmalipid unterscheidet sich von der Fettsäureverteilung im Knochenmark s.u..

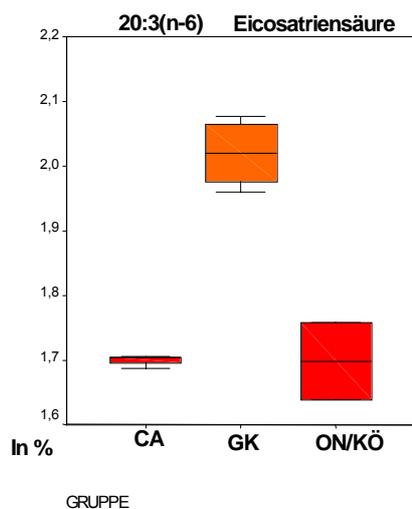
Vergleich der Fettsäureverteilung im Plasma von Individuen mit und ohne Knochen- und Gelenkerkrankungen

Die Fettsäureverteilung im Plasma gesunder Individuen, ohne eine der drei Knochen- oder Gelenkerkrankungen (GK) wurde mit dem Patientenplasma mit Hilfe der Gas-Chromatographie analysiert und verglichen (siehe Tabellenanhang 2a, 2b). Es stellt sich ein signifikanter ($p < 0.05$) Unterschied in der Fettsäureverteilung des gesunden Kollektivs verglichen mit dem Kollektiv der Coxarthrosepatienten und der Osteonekrose- und Knochenödempatienten dar. Signifikant abweichend waren die (18:1 (n-9)) Ölsäure, (20:3 (n-6)) Eicosatriensäure, (20:1 (n-9)) Eicosaensäure und die (22:4 (n-6)) Docosatetraensäure, siehe Graphik 2-5.

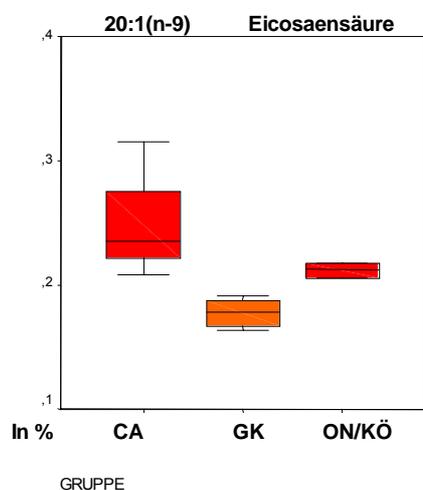
Graphik 2 Anteil der Ölsäure an der Summe der Gesamtfettsäuren im Plasma von Patienten mit Coxarthrose (CA), Nekrose/Knochenödem (ON/KÖ) und der gesunden Kontrolle (GK) in %. Der Anteil der Ölsäure ist im Plasmalipid der CA- und ON/KÖ-Gruppe signifikant ($p < 0.05$) erhöht (rote Box). (CA:n=3, GK:n=7, ON/KÖ:n=2).



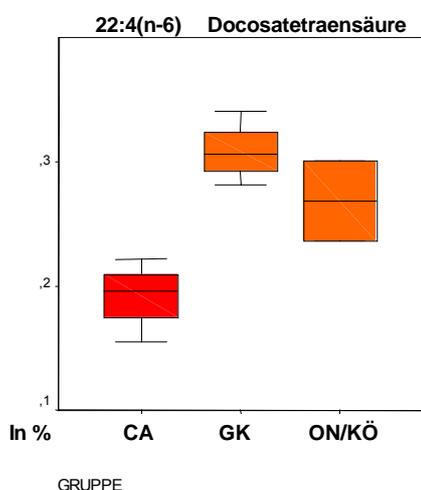
Graphik 3 Anteil der Eicosatriensäure an der Summe der Gesamtfettsäuren im Plasma von Patienten mit Coxarthrose (CA), Nekrose/Knochenödem (ON/KÖ) und der gesunden Kontrolle (GK) in %. Der Anteil der Eicosatriensäure ist im Plasmalipid der CA- und ON/KÖ-Gruppe signifikant ($p < 0.05$) erniedrigt (rote Box). (CA:n=3, GK:n=7, ON/KÖ:n=2).



Graphik 4 Anteil der Eicosaensäure an der Summe der Gesamtfettsäuren im Plasma von Patienten mit Coxarthrose (CA), Nekrose/Knochenödem (ON/KÖ) und der gesunden Kontrolle (GK) in %. Der Anteil der Eicosaensäure ist im Plasmalipid der CA- und ON/KÖ-Gruppe signifikant ($p < 0.05$) erhöht (rote Box). (CA:n=3, GK:n=7, ON/KÖ:n=2).



Graphik 5 Anteil der Docosatetraensäure an der Summe der Gesamtfettsäuren im Plasma von Patienten mit Coxarthrose (CA), Nekrose/Knochenödem (ON/KÖ) und der gesunden Kontrolle (GK) in %. Der Anteil der Docosatetraensäure ist im Plasmalipid der CA-Gruppe signifikant ($p < 0.05$) erniedrigt (rote Box). (CA:n=3, GK:n=7, ON/KÖ:n=2). $p < 0.05$.



Gesamtfettsäuremenge im Plasma von Individuen mit und ohne Knochen- und Gelenkerkrankungen

Die Gesamtfettsäuren wurden im Plasmalipid der Nekrosepatienten um 10% höher als bei den Coxarthroseproben und den gesunden Probanden gemessen, allerdings ohne statistische Relevanz (siehe Tabellenanhang 2c).

4.2. Ergebnisse der Knochenmarksanalysen

4.2.1. Modifikation verschiedener Methoden für die Anwendung auf Knochenlipid

4.2.1.1. Lipidextraktion aus Knochengewebe

Die Lipidextraktion aus Knochengewebe war bis dato im Labor von Prof. Beisiegel nicht etabliert. Für diese Arbeit musste die Methode modifiziert werden.

Mit Hilfe der Lipidextraktion werden Lipide aus Geweben extrahiert (Folch et al. 1951, 1956), (Bligh and Dyer. 1959). Die Gewebeproben werden mit Chloroform und Methanol homogenisiert. Durch Zugabe von destilliertem Wasser, bzw. durch das Wasser im Gewebe bilden sich zwei Phasen, wobei sich die Lipide zu 99% in der unteren, hydrophoben Chloroformphase sammeln (Folch et al. 1951), (Shoreland et al. 1952), alle anderen Nicht-Lipid-Bestandteile und ca. 1% der gesamt extrahierbaren Lipidmenge befinden sich im oberflächlichen, hydrophilen Methanol/Wassergemisch. Folch wählte die Menge des Lösungsmittels so, dass dem Gewebsgewicht in g das 20fache an Lösungsmittelvolumen in ml (Chloroform/Methanol 2:1) und 1/5 des Chloroform/Methanolvolumens an Wasser zugesetzt wird. Bligh und Dyer erhielten die besten Ergebnisse mit einem Verhältnis Chloroform/Methanol/Wasser von 1:2:0,8. Zwei Methoden wurden basierend auf den Ansätzen von Folch und Bligh und Dyer entwickelt und vergleichend anhand der selben Knochengewebsprobe auf Durchführbarkeit und Extraktionseffizienz überprüft.

"Methode I" beruht auf der Methode von Folch. Das Lösungsmittel Chloroform/Methanol wird in einem Verhältnis 2:1 eingesetzt und das 30fache in Milliliter bezogen auf das Gewebsgewicht in Gramm eingesetzt. Das zugesetzte Wasservolumen wird auf 1/4 des Lösungsmittelvolumens erhöht, da der Knochen kaum einen Wassereigenanteil aufweist.

Alle weiteren Schritte, wurden streng nach Folch durchgeführt.

"Methode II" wird an Folchs und Bligh und Dyers Vorschrift angelehnt. 1000mg Knochengewebe wurden 1ml PBS zugesetzt, um den Wasseranteil im Knochengewebe zu erhöhen.

Die Lösungsmittel wurden 8fach in einem Verhältnis von 2:1 eingesetzt.

Zur Prüfung, ob mit den angewendeten Methoden eine Lipidextraktion quantitativ möglich ist, wurde das Lipid nach der Extraktion ausgewogen, die extrahierten Knochenreste gefriergetrocknet, gewogen und zu dem Gewicht des Lipids addiert, zieht man den Wasseranteil ab, muss die Summe dem Ausgangsgewicht der Knochenprobe entsprechen.

Da dieses der Fall war, konnte davon ausgegangen werden, dass eine Lipidextraktion des Knochenlipids quantitativ möglich ist.

Die Methode mit der höheren Extraktionseffizienz soll als Standardmethode verwendet werden. Die Extraktionseffizienz wurde durch Vergleich der Fettsäuremenge im extrahierten Knochenlipid gaschromatographisch ermittelt. Dabei zeigte sich, dass die Extraktionseffizienz in "Methode I" etwa 15% über der in "Methode II" lag, weshalb die "Methode I" als Methode der Wahl festgelegt wurde.

In folgender Abbildung 2 werden beiden Methoden gegenübergestellt und die Vorgehensweise verdeutlicht.

Abbildung 2 Vergleich zweier Methoden zur Lipidextraktion.

Durchführung der "Methode I"	Durchführung der "Methode II"
<p>1000mg Knochenmehl wird mit 10ml Methanol und 20ml Chloroform versetzt und homogenisiert, Mischverhältnis: 1:30 Zentrifugation: 20Min. 3000UpM, 4°C</p> <p>1. Ein Pellet aus Knochensediment setzt sich ab und wird wiederholt lipidextrahiert: 2. Mit dem Überstand wird wie folgt verfahren:</p>	<p>1000mg Knochenmehl wird mit 1ml PBS versetzt und homogenisiert</p> <p>Dazu: 8ml Chloroform/Methanol 2:1, Mischverhältnis: 1:4 mischen</p> <p>1. Ein Pellet aus Knochensediment setzt sich ab und wird wiederholt lipidextrahiert: 2. Mit dem Überstand wird wie folgt verfahren:</p>
<p>Überstand wird mit 1/4 des Volumen des Überstandes mit 0,88% KCL in Aqua dest. gewaschen</p> <p>Zentrifugation: 10Min. 3000UpM, 4°C Ausbildung von 2 Phasen</p>	<p>Überstand wird mit 1/4 des Volumen des Überstandes mit 0,88% KCL in Aqua dest. gewaschen</p> <p>Zentrifugation: 20Min. 3000UpM, 4°C Ausbildung von 2 Phasen</p>
<p>obere wässrige Phase: verwerfen, untere Phase=Chloroformphase: versetzten mit 1/4 des Volumens der unteren Phase mit 0,88% KCL in Aqua dest./Methanol 1:1 mischen und zentrifugieren: 10Min. 3000UpM, 4°C</p>	<p>obere wässrige Phase: verwerfen, untere Phase=Chloroformphase: versetzten mit 1/4 des Volumens der unteren Phase mit 0,88% KCL in Aqua dest./Methanol 1:1 mischen und zentrifugieren: 10Min. 3000UpM, 4°C</p>
<p>untere Phase=Chloroformphase lagern bei -80°C.</p>	<p>untere Phase=Chloroformphase lagern bei -80°C.</p>

„Methode I“ ist eine an das Protokoll von Folch et al. angelehnte Methode der Lipidextraktion, wofür hohe Lösungsmittelvolumina verwendet werden müssen. „Methode II“ ist ein Zusammenschritt der Methoden von Folchs und Bligh und Dyer, die mit kleinen Lösungsmittelvolumina und zeitsparender durchgeführt werden kann.

Wiederholte Lipidextraktion aus dem Knochensediment

Durch wiederholte Lipidextraktion des extrahierten Knochengewebes werden ca. weitere 6% der extrahierbaren Gesamtlipidmenge erhalten (Bligh and Dyer 1959).

Die Reextraktion wird daher in die Standardmethode mit aufgenommen. Die Lipidextraktionen des Knochensediments werden mit "Methode I" durchgeführt. Das Gewebe lagerte für die erste Reextraktion über Nacht im Lösungsmittel, durch welches alles Lipid aus dem Knochensand herausgelöst werden soll. Vor der zweiten Reextraktion wird der Knochensand gefriergetrocknet, durch Zugabe von EDTA demineralisiert und solubilisiert, um die Lipide, die in den Knochenbälkchen enthalten sind, extrahieren zu können. Eine mittlere Phase aus Zellresten bildet sich.

Die Zellreste werden in der dritten Reextraktion lipidextrahiert. Das genaue Vorgehen wird in Abbildung 3 dargestellt.

5,32% der gesamt extrahierbaren Fettsäuren konnten durch die drei Reextraktionen erhalten werden. Durch die zweite Reextraktion nach Demineralisierung mit EDTA wurde der größte Anteil an der extrahierbaren Fettsäuremenge mit 2,9% erhalten. Die erste Reextraktion hatte einen Anteil von 1,6%, die dritte Reextraktion von 0,82%.

Abbildung 3 Vorgehensweise der Lipidextraktion aus dem nach der ersten Lipidextraktion erhaltenen Knochensand.

1. Lipidextraktion aus Knochensediment	2. Lyophilisieren, EDTA versetzen, Lipidextraktion	3. Lipidextraktion der Zellreste
Das Pellet aus Knochengewebe wird versetzt mit 15ml Chloroform/Methanol 2:1	Das Pellet wird über Nacht gefriergetrocknet	Die mittlere Phase mit Zellresten wird versetzt mit 15ml Chloroform/Methanol 2:1
Homogenisierung	Zugabe von: 10ml EDTA 0,5M (Demineralisierung der Matrix) Homogenisierung	Homogenisierung
Lagerung über Nacht 4°C	Lagerung über Nacht 4°C	Zentrifugation
Zentrifugation Es wird erhalten: 1. Das Pellet aus Knochengewebe und der 2. Überstand	Zugabe von 15ml Chloroform/Methanol 2:1	Überstand und Pellet
Überstand wird lipidextrahiert ("Methode I") Pellet wird gefriergetrocknet und mit EDTA versetzt und durchläuft Schritt 2.	Homogenisierung Zentrifugation	Überstand wird s.o. lipidextrahiert. Pellet bei -80°C gelagert.
	3 Phasen: obere Phase=wässrige Phase:verwerfen Die mittlere Phase, bestehend aus Zellresten durchläuft Schritt 3: untere Phase: wird nach "Methode I" lipidextrahiert	

Veränderung der Extraktionseffizienz bei unterschiedlichen Ausgangsmengen Knochengewebe

Nachdem die Methode der Lipidextraktion aus Knochengewebe mit Gewebsstücken von ca. 500mg (Volumen $<1 \times 1 \text{ cm}^3$) modifiziert worden war, musste überprüft werden, ob auch Gewebsstücke von ca. 100mg (Volumen $0,2 \times 0,2 \text{ cm}^3$), zu einer vergleichbaren Menge Lipid führen, da von einigen Patienten nur wenig Gewebe z.B. nach Knochenstanzungen, verfügbar war.

Es wurden Ausgangsgewichte von 500mg und ~100mg von vier Individuen lipidextrahiert (Pat. IV(ON), Pat. VI(CA), Pat. VII(ON), Pat. VIII (CA)) und anhand der Menge der gaschromatographisch ermittelten Gesamtfettsäuren die Extraktionseffizienz ermittelt. Im Anhang sind die Messergebnisse aufgeführt (siehe Tabellenanhang 3).

Bei Pat. VII und Pat. VIII ist die Gesamtfettsäuremenge in der Probe mit dem geringeren Probenausgangsvolumen um ca. 20% erhöht.

Bei Pat. IV und Pat VI zeigt sich ein entgegengesetztes Bild, die Gesamtfettsäuremenge ist um 10% in der Probe mit dem geringeren Ausgangsgewicht erniedrigt.

Das Ergebnis zeigt, dass die Gewebemenge einen Einfluss auf die Extraktionseffizienz hat, wobei die Menge des eingesetzten Gewebes nicht mit der Höhe der extrahierbaren Gesamtfettsäuremenge korreliert. Die Extraktion kann somit auch mit einem geringeren Probenvolumen durchgeführt werden, trotzdem sollten gleiche Ausgangsmengen verwendet werden sollten, um die Kongruenz der Messung einzuhalten.

4.2.1.2. Methodenmodifikation der Gas-Chromatographie für Knochenlipid

Vorlage für die Modifikation der gaschromatographischen Lipidbestimmung aus Knochenlipid war das Protokoll für die gaschromatographische Plasmalipidmessung. Die eingesetzte Knochenlipidemenge wurde willkürlich festgelegt und der Zielwert nach mehreren Testläufen auf 0,6mg Lipid festgesetzt.

Die internen Standards wurden dem Knochengewebe vor der Lipidextraktion zugefügt, da sie unmittelbar in Konzentration und Behandlung dem extrahierten Lipid vergleichbar sein mussten und sämtliche Arbeitsschritte der Lipidextraktion durchlaufen sollten.

Es wurden letztendlich Heptadekansäure 17:0 3000µg und 5-Alpha-Cholestan 1500µg eingesetzt.

Die für Plasma beschriebene Vorgehensweise der Hydrolyse und Methylierung in der Aufarbeitung der Proben (Hughes et al., 1986), (Wang et al., 1992) wurde für Knochenlipid übernommen und zeigte im Vergleich mit der Literatur Übereinstimmung in den Ergebnissen (Kagawa et al. 1996), s. Abbildung 4.

Mittelwert des Fettsäuregehalts in humanem Knochenmark	Pat. XIII n=1	Literaturwerte*1 n=16	Literaturwerte*2 n=12
Probenentnahmestelle	Hüftkopf	Schädel, Sternum, Becken, Rippen	obere 2/3 des Femur
Fettsäuren in % der Gesamtfettsäuresumme			
14:0 Myristinsäure	2,25	2,01	3,22
16:1-7 Palmitoleinsäure	4,19	5,21	6,35
16:0 Palmitinsäure	21,14	21,44	26,3
18:3-6 γ-Linolensäure	0,07	-	-
18:2-6 Linolsäure	15,02	14,80	8,1
18:1-9 Ölsäure	45,53	46,26	46,4
18:1-7 Vaccensäure	3,05	-	-
18:0 Stearinsäure	3,27	5,60	7,9
20:4-6 Arachidonsäure	0,51	-	-
20:5-3 Eicosapentaensäure	0,08	-	-
20:3-6 Eicosatriensäure	0,26	-	-
20:2-6 Eicosadiensäure	0,32	-	-
20:1-9 Eicosaensäure	0,63	1,14	-
20:3-3 Eicosatriensäure	0,02	-	-
20:0 Arachinsäure	0,07	-	-
22:6-3 Docosahexaensäure	0,26	-	-
22:4-6 Docosatetraensäure	0,22	-	-
22:5-3 Docosapentaensäure	0,28	-	-
22:2-6 Docosadiensäure	0,20	-	-
22:1-9 Erucinsäure	0,01	-	-

Abbildung 4

Abschlusstabelle der im GC gemessenen Fettsäuren im Vergleich mit der Literatur.

Angegeben in prozentualem Anteil der Fettsäure an der Gesamtsumme.

*1: M. Kagawa et al. 1996

* 2: Lund et al. 1962

Plasmacholesterin wird bei Raumtemperatur ca. 60 Minuten ausreichend silyliert (Hughes et al. 1986). In einigen Messreihen mit Knochenlipid, stellte sich heraus, dass in diesem Zeitraum nicht alles Cholesterin silyliert wird. Daher musste dieser Zeitraum auf 120 Minuten bei 50°C erhöht werden.

Abbildung 4 zeigt die gaschromatographische Fettsäurebestimmung einer Patientenprobe (Pat. XIII) nach Lipidextraktion aus dem Knochen. Aufgeführt ist der prozentuale Anteil jeder Fettsäure an der Gesamtfettsäuresumme. Vergleichend gegenübergestellt sind Literaturdaten. Die in dieser Arbeit erhaltenen Werte sind im Literaturvergleich stets die niedrigsten.

Das ist dadurch zu erklären, dass vorliegend in die prozentuale Aufteilung auch Fettsäuren mit kleinem Anteil einfließen, was bei den Daten aus der Literatur nicht der Fall ist, wo stets die Fettsäuren mit dem größten Anteil aufgeführt werden. Folglich hat jede hier aufgeführte Fettsäure einen kleineren Anteil an den Gesamtfettsäuren.

4.2.1.3. Methodenmodifikation der Dünnschichtchromatographie für ihre Anwendung auf Knochenlipid

Die Dünnschichtchromatographie wurde als semiquantitative Methode durchgeführt, um einen Überblick über den Triglycerid- und Cholesteringehalt im Knochenlipid zu erhalten. Bis dato existiert dafür keine quantifizierende Methode (Lund, Abadi, Mathies 1962), (Miller et al.1996). Für die Durchführung musste die Auftragsmenge des extrahierten Knochenlipids in einigen Testläufen festgelegt werden. Die Probensignale mussten mit dem Standardsignal, dessen Konzentration für Triglycerid und Cholesterin bekannt ist, für die Auswertung in der Intensität vergleichbar sein. Die Auswertung wird anhand des Standards vorgenommen. Es wird die Fläche des Standardsignals ausgeschnitten und ausgewogen. Damit kann das Gewicht der Fläche zu der aufgetragenen Triglycerid- und Cholesterinmenge in Beziehung gesetzt werden. Das Gewicht dieser Fläche stellt die Bezugsgröße für die Berechnung der Lipidmenge im Probensignal dar. Ein entsprechende Software stellte sich als nicht sensitiv genug heraus, so dass auf diese Methode zurückgegriffen wurde.

4.2.1.4. Enzymatische Knochenlipidbestimmung

Methodenmodifikation der enzymatischen Triglyceridbestimmung

Die enzymatische Triglyceridbestimmung mit photometrischer Auswertung wird routinemäßig für die Bestimmung der Plasmatriglyceride verwendet. Die Modifikation dieser Methode soll eine Quantifizierung der Triglyceridkonzentration im extrahierten Knochenlipid ermöglichen, was bisher nur semiquantitativ möglich war (Lund, Abadi, Mathies 1962), (Miller et al.1996).

Da der enzymatische Test auf Basis einer wässrigen Lösung funktioniert, musste das extrahierte Lipid über ein Lösungsmittel den Testenzymen zugänglich gemacht werden. Verschiedene Lösungsmittel wurden getestet, die keine reproduzierbaren Ergebnisse lieferten. Das Detergenz Triton (TX) wurde letztendlich aufgrund seiner guten Lösungsmittleigenschaften und in verschiedenen Konzentrationen reproduzierbarer Messergebnisse als Aufnahmesubstanz für das extrahierte Knochenlipid verwendet. Außerdem hatte TX keinen störenden Einfluss auf die Extinktion bei der photometrischen Auswertung des enzymatischen Tests.

Eine Verfälschung der Messergebnisse durch den Zusatz von TX wurde anhand der kommerziellen Standards des Triglyceridtestes, Precinorm (PN) und Precipath (PP), die mit dem Tritonpuffer in aufsteigender Konzentration im Verhältnis 2:1 vermischt und gemessen wurden untersucht. Vergleichend wurden die Standards ohne Tritonzusatz gemessen.

Es ist zu erkennen, dass die unterschiedlichen TX-Konzentrationen auf PN und PP keinen verfälschenden Einfluss haben (siehe Tabellenanhang 4).

Geprüft wurde weiterhin, ob das gesamte in der Probe enthaltene und im Tritonpuffer aufgenommene Lipid dem enzymatischen Test zugänglich gemacht werden kann.

Dazu wurde Plasmalipid dreier Patienten lipidextrahiert, in 1% und 5% Tritonpuffer aufgenommen und mit Hilfe des Test-Kits die Triglyceridkonzentration bestimmt. Die Triglyceridkonzentration im nicht lipidextrahierten Plasma wurde verglichen. Die Triglyceridkonzentration des extrahierten Plasmalipids erreicht fast 100% der Triglyceridwerte des nicht extrahierten Plasmalipids. Damit kann extrahiertes und in TX-Puffer aufgenommenes Lipid mit dem kommerziellen Kit gemessen valide bestimmt werden, (siehe Tabellenanhang 5).

Neben den untersuchten Aspekten, wurde geprüft, ob das extrahierte Plasmalipid im Tritonpuffer z.B. über Nacht gelagert werden kann, ohne dass sich die Messergebnisse verändern. Nach mehreren Messreihen, stellte sich heraus, dass durch unbewegte Lagerung die Zahl der Mizellen stieg und die Triglyceridkonzentration sank (nach zwei Tagen bis zu 80%). Es wurde festgelegt, die Proben während der Dauer der Messungen im Schüttler zu mischen und vorher mit PBS (1:50 und 1:100) zu verdünnen. Bei dieser Behandlung blieben die gemessenen TG-Werte unverändert, und die Messungen konnten innerhalb einer Stunde durchgeführt werden.

Auch wenn die einzelnen Schritte der Probenbearbeitung im Ergebnis zu befriedigenden Resultaten führten, war die Reteststabilität der Messung durch andere Tester nicht gewährleistet, weshalb der Test sich nicht als geeignete Messmethode außerhalb dieser Arbeit eignet.

Methodenmodifikation der enzymatischen Cholesterinbestimmung im Knochenlipid

Da die Cholesterinwerte im Knochen sehr niedrig sind, wurden sie mit einem hochsensitiven Kit fluorometrisch gemessen.

Die Untersuchungen, die für die Modifikation der Triglyceridmessung aus dem Knochenlipid durchgeführt wurden, wie die Wahl eines geeigneten Aufnahmemediums oder eine möglichen Verfälschung der Messergebnisse durch den Tritonzusatz oder den Einfluss von Triton auf die photometrische Messung, wurden analog auch für die Cholesterinbestimmung vorgenommen.

Die Plasmacholesterinkonzentration eines Individuums wurde vor und nach Durchführung einer Lipidextraktion mit dem enzymatischen Test bestimmt, um festzustellen, ob das quantitativ im Plasma enthaltene Cholesterin extrahiert werden konnte und ob der enzymatische Test das enthaltene Cholesterin detektiert. Sollte dies für das extrahierte Plasmalipid der Fall sein, musste dieses für das lipidextrahierte Knochenlipid gelten, (siehe Tabellenanhang 6).

Anhand der Tabelle wird ersichtlich, dass in lipidextrahiertem Plasma lediglich ~30% des im nicht lipidextrahierten Plasma enthaltenen Cholesterins detektierbar ist.

Einerseits könnte nicht alles extrahierte Cholesterin gemessen oder nicht alles im Plasmalipid enthaltenen Cholesterin extrahiert worden sein. Die anschließend durchgeführte gaschromatographische Kontrollmessung zeigt, dass die Cholesterinkonzentration der lipidextrahierten Plasmaprobe mit der nicht lipidextrahierten Plasmaprobe übereinstimmt.

Das lässt vermuten, dass quantitativ alles Cholesterin extrahiert wurde, enzymatisch aber nur ~30% des Cholesterins detektiert werden konnte.

Da dieses Ergebnis in allen Messungen reproduzierbar war und es sich somit um einen systematischen Fehler zu handeln scheint, wurde der enzymatisch gemessenen Cholesterinwert mit 3 multipliziert und extrapoliert. Die enzymatische Cholesterinmessung stellt wegen der bestehenden Messunsicherheit keine geeignete Methode zur Quantifizierung des Cholesteringehalts im Knochenlipid dar.

4.2.2. Ergebnisse der Knochenlipidanalysen

4.2.2.1. Ergebnisse der Lipidextraktion aus Knochenlipid

Durch die Lipidextraktion des Knochengewebes erhält man das Gesamtlipid und das Knochensediment, was gefriergetrocknet und ausgewogen wurde. In Anhang 7 wird das Gewicht des Knochensediments der gesunden Kontrollgruppe (CAK), der Osteonekroseproben (ON) und der Proben mit idiopathischem Knochenmarksödemsyndrom (KÖ) verglichen. Vorliegend zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) des Knochensedimentgewichts zwischen der Krankheitsgruppe Osteonekrose und gesundem Knochengewebe.

Anders die ödematösen Gewebeproben; sie weisen die signifikant ($p < 0,05$) höchsten Knochensedimentwerte auf (siehe Anhang 7).

4.2.2.2. Ergebnisse der gaschromatographischen Fettsäurebestimmung

Fettsäureverteilung im Knochenlipid von Individuen ohne Knochenerkrankungen

Einen Überblick über die Häufigkeitsverteilung der Fettsäuren im Knochenmark ohne Knochenpathologien bietet die folgende Graphik 6, wobei nur die Fettsäuren mit dem größten prozentualen Anteil in die Aufstellung Eingang fanden.

Dargestellt ist, dass die Ölsäure (18:1(n-9)) mit ca. 45%, gefolgt von der Palmitinsäure (16:0) mit ca. 22% und der Linolsäure (18:2(n-6)) mit ca. 12% den größten Anteil der Fettsäuren im Knochenmark ausmachen.

Vergleich der Fettsäureverteilung im Knochenlipid von Individuen mit und ohne Knochenerkrankungen

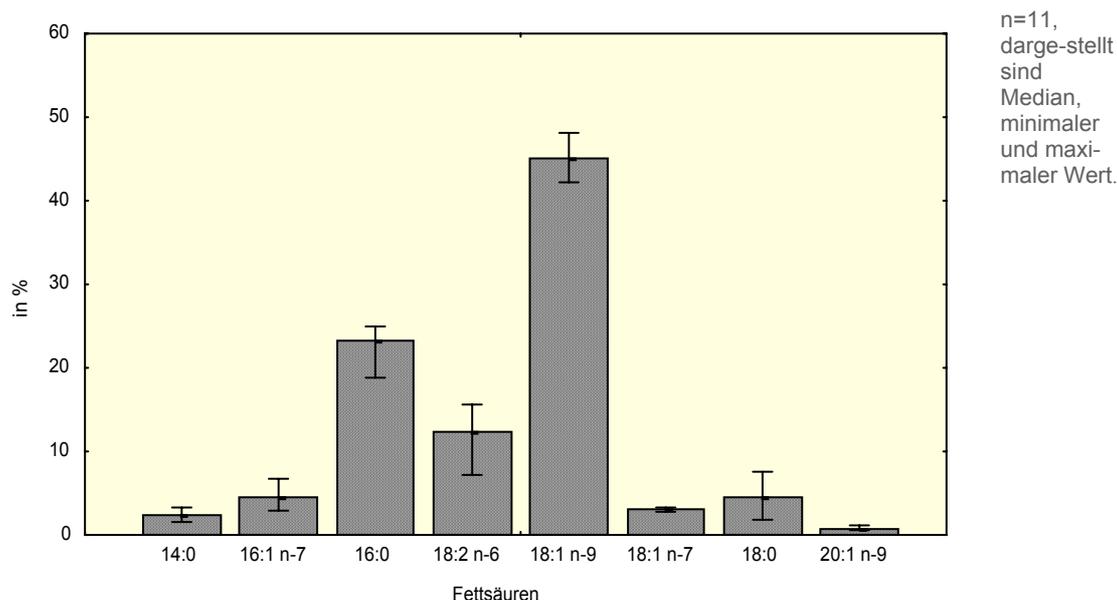
Das extrahierte Knochenlipid wurde gaschromatographisch ausgewertet und die Fettsäureverteilung innerhalb der Kollektive verglichen.

Im Anhang 8a, 8b, 9a, 9b, 10a, 10b ist die Fettsäureverteilung der einzelnen Kollektive, der Kontrolle (CAK), der Nekroseproben (ON) und der Proben mit idiopathischem Knochenödem (KÖ) aufgeführt (siehe Tabellenanhang).

Anhand Anhang 11a, 11b wird statistisch verglichen, ob sich die Fettsäuren im nekrotischen und ödematischen Knochenmark und im Knochenmark der Kontrolle signifikant voneinander unterscheiden (siehe Tabellenanhang).

Im Ergebnis zeigt sich, dass der prozentuale Anteil der Arachidonsäure (20:4 (n-6)) und der Docosatetraensäure (22:4 (n-6)) in den Nekroseproben und den Proben mit Knochenmarksödemsyndrom im Vergleich zu dem gesunden Kollektiv signifikant ($p < 0,05$) erhöht ist.

Graphik 6 Häufigkeitsverteilung der Fettsäuren im Knochenmark von gesunden Individuen.



Dargestellt sind die häufigsten im menschlichen Knochenlipid vorkommenden Fettsäuren in % an der Fettsäuregesamtsumme.

14:0 Myristinsäure, 16:1n-7 Palmitoleinsäure, 16:0 Palmitinsäure, 18:2n-6 Linolsäure, 18:1n-9 Ölsäure, 18:1n-7 Vaccensäure, 18:0 Stearinsäure, 20:1n-9 Eicosaensäure.

Gesamtfettsäuremenge im Knochenlipid von Individuen mit und ohne Knochenerkrankungen

Die Gesamtfettsäuren in mg/g Knochenausgangsgewebe haben einen Anteil von 20-30% an der Gewebsausgangsmenge bei Nekroseproben und der Kontrolle und 5% in ödematischem Knochengewebe.

Die Gesamtfettsäuren sind in den nekrotischen Proben nicht signifikant erhöht, im ödematischen Knochenmark aber signifikant erniedrigt ($p < 0,01$), (siehe Tabellenanhang 12).

Essentielle Fettsäuren und Eikosanoide im Knochenlipid von Individuen mit und ohne Knochenerkrankungen

Tabellennhang 13a, 13b zeigen die Verteilung der essentiellen Fettsäure Linolsäure (18:2 (n-6)) und der Eikosanoide im Knochenlipid der drei Kollektive.

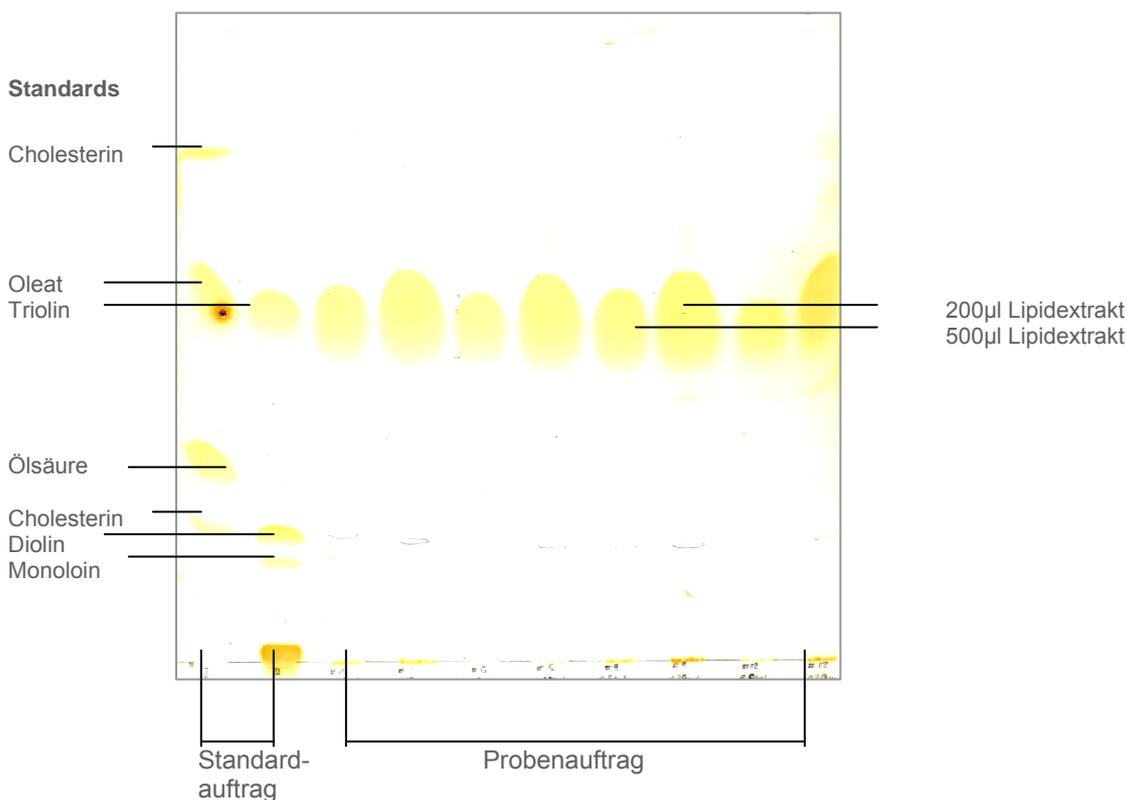
Obwohl zu den essentiellen Fettsäuren die Linolsäure und die α -Linolensäure gehören, konnte vorliegend nur die Linolsäure untersucht werden, da nach der Kalibrierung des Gas-Chromatographen deutlich wurde, dass die α -Linolensäure technisch nicht auswertbar war.

Der Anteil der Linolsäure zeigte keine signifikanten Unterschiede innerhalb der drei Kollektive.

Während der Anteil der Arachidonsäure innerhalb der Eikosanoide von Coxarthroseproben über Nekrose zu Ödem anzusteigen scheint, fällt der Anteil der Eikosaensäure in der gleichen Reihenfolge ab. Die Abweichungen sind nicht signifikant.

4.2.2.3. Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie

Abbildung 5 Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie aus Knochenlipid.



Die vorliegende Dünnschichtchromatographie zeigt die kommerziellen Standards und die verwendeten Proben. Die DC wurde beispielhaft mit vier verschiedenen Knochenmarkslipidproben durchgeführt, die in zwei Konzentrationen eingesetzt wurden (je von 2000µl Lipidextrakt auf 500µl und auf 200µl aufkonzentriert, kleine Bande aufkonzentriert auf 500µl, große Bande aufkonzentriert auf 200µl).

Cholesterin ist im Knochenmark mit der Dünnschichtchromatographie nur eingeschränkt ausgewertbar (s. Abbildung 5).

Den größten Lipidanteil am Knochenlipid hat das Triglycerid mit einem Gewichtsanteil von etwa 25-30% des Ausgangsgewebes, s. Tabellenanhang 14.

Die Triglyceridmenge innerhalb der Proben schwankt stark (von ca. 100-400mg). Der durchschnittliche Lipidanteil pro Gramm Knochengewebe ist nicht signifikant in den Proben der Nekrose erhöht. Im ödematösen Knochenmark macht der Triglyceridgehalt 5% des Ausgangsgewebes aus. Der erhaltene Wert ist signifikant ($p < 0,01$) erniedrigt.

4.2.2.4. Ergebnisse der enzymatischen Triglyceridbestimmung

Im Tabellennhang 15 ist die Menge des enzymatisch bestimmten Triglycerids im Knochenmark dargestellt.

Im Gegensatz zu den vorher erhaltenen Werten zeigt der Mittelwert der gesunden Kontrolle den höchsten Triglyceridwert mit ~33% vom Knochenausgangsgewebe. Die Erhöhung ist nicht signifikant ($p < 0,05$).

Als signifikant erniedrigt, mit 4,5 % bezogen auf das Gramm Knochenmark wurde der Wert der ödematischen Proben gemessen und stimmt mit den Ergebnissen der Dünnschichtchromatographie überein. In den nekrotischen Knochenproben haben die Triglyceride einen Anteil von ~28% vom Knochenausgangsgewebe.

4.2.2.5. Ergebnisse der enzymatischen Cholesterinbestimmung

In Tabellenanhang 16 ist die Menge des enzymatisch bestimmten Cholesterins im Knochenmark dargestellt.

Ebenso wie bei der Messung des Cholesterins im GC sind die höchsten Werte die der Nekroseproben, gefolgt von der Kontrollgruppe und Ödemproben. Die Unterschiede sind nicht signifikant. Der prozentuale Anteil des Cholesterins am Knochenmark ist vergleichbar mit dem durch die Gas-Chromatographie erhaltenen Cholesterinwert bei 0,1% des Ausgangsgewebes.

4.2.2.6. Ergebnisse der gaschromatographischen Cholesterinbestimmung

Mit einem Gewichtsanteil am Knochengewebe von ca. 0,1% ist das Cholesterin schwach vertreten. Auch hier weist der nekrotische Knochen nicht signifikant, den höchsten Wert auf. Die Cholesterinmenge der Ödemproben verglichen mit dem gesunde Kollektiv ist signifikant erniedrigt ($p < 0,05$) und lag bei einem Anteil von 0,05%, s. Anhang 17.

4.3. Vergleich der Lipidkomposition in Plasma- und Knochenlipid von Patienten mit und ohne Dyslipidämien

Hypercholesterinämie

Untersucht wurde, ob eine systemische Hypercholesterinämie zu erhöhten Cholesterinwerten oder zu einer veränderten Fettsäureverteilung im Knochenlipid führt.

Die Cholesterinkonzentration und die Fettsäureverteilung wurden im Knochenlipid von Patienten mit (Nr. XV und Nr. XVIII) und ohne Hypercholesterinämie verglichen. Statistisch konnte die systemische Hypercholesterinämie nicht mit erhöhten Cholesterinwerten im Knochen oder einer veränderten Fettsäureverteilung korreliert werden (siehe Tabellenanhang 18, 19).

Hypertriglyceridämie

Patient XVII weist eine Hypertriglyceridämie auf. Es wurde untersucht, ob die Hypertriglyceridämie zu einer veränderten Fettsäureverteilung im Knochenlipid führt.

Die Fettsäuregesamtsumme war im Vergleich zu den anderen Patienten erhöht, was aber nicht signifikant war. Die Fettsäureverteilung war nicht verändert (siehe Tabellennhang 20, 21a, 21c).

Arachidonsäure

Probe Nr. XVIII und Probe Nr. XIX, Patienten mit Knochennekrose und unauffälligen Plasmalipiden, wiesen die höchsten Arachidonsäurewerte im Knochenlipid auf. Im Plasmalipid waren die Arachidonsäurewerte nicht erhöht (siehe Tabellenanhang 21a).

Abbildung 6 zeigt eine Aufstellung aller Methoden und ihrer Ergebnisse in %.

Abbildung 6 Übersicht der erhaltenen TG-, Cholesterin- und FS-Werte anhand DC, GC und der enzymatischen TG und Cholesterinmessungen.

Patientenkollektiv

		Triglyceridanteil in % vom Knochenausgangsgewebe	Fettsäureanteil in % vom Knochenausgangsgewebe	Cholesterinanteil in % vom Knochenausgangsgewebe		
		angewendete Methode				
		DC	enzymatisch	GC	enzymatisch	GC
		Mittelwerte				
CAk	n=11	~25%	~33%	~30%	~0,12%	0,11%
ON	n=6	~29%	~28%	~30%	~0,14%	0,15%
KÖ	n=2	~5%	~5%	~5%	~0,1%	0,05%

Verglichen anhand der Tabelle werden die Werte von TG, Cholesterin, FS im Knochenmark, die anhand der unterschiedlichen Methoden wie DC, GC und der enzymatische Messung erhalten wurden.

4.4. Ergebniszusammenfassung

Plasmalipidmessung:

- Bei der Messung des Lipidstatus und der Lipoproteine ergab sich, dass der HDL-Spiegel bei allen Kollektiven mit c.a.30-35mg/dl um etwa 5-10mg/dl erniedrigt war. Der LDL/HDL-Index war bei den Nekroseproben mit durchschnittlich 4,5mg/dl ($\pm 1,9$) erhöht. Ebenfalls sind die VLDL und die Triglyceride in der Gruppe der Patienten mit Osteonekrose erhöht.

Gas-Chromatographie:

- Die Fettsäureverteilung im Plasma von gesunden Individuen, wobei nur die quantitativ wichtigsten Fettsäuren aufgeführt wurden, stellt sich folgendermaßen dar: 32% Linolsäure, 22% Palmitinsäure, 19% Ölsäure und unterscheidet sich somit von der Fettsäureverteilung im Knochenmark.
- Der Anteil der Ölsäure und der Eicosaensäure ist im Plasmalipid der Coxarthrose-, Nekrose- und Knochenödempatienten im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv signifikant ($p < 0,05$) erhöht.

- Der Anteil der Eicosatriensäure ist im Plasmalipid der Coxarthrose-, Nekrose- und Knochenödempatienten und der Anteil der Docosatetraensäure ist im Plasmalipid der Coxarthrosepatienten im Vergleich zu einem gesunden Kollektiv signifikant ($p < 0,05$) erniedrigt.

Knochenlipidmessung

Lipidextraktion:

- Der ödematöse Knochen weist im Vergleich zu den anderen Gruppen die signifikant ($p < 0,05$) höchsten Knochensedimentwerte auf (CA, n=11: 326,2 mg/g ($\pm 68,3$), ON, n=6: 433mg/g ($\pm 155,3$), KÖ, n=2:586,5).

Gas-Chromatographie:

- Die Fettsäureverteilung im Knochenlipid wurde wie folgt gemessen: 45% Ölsäure, 22% Palmitinsäure, 12% Linolsäure. Nur die quantitativ wichtigsten sind hier aufgeführt.
- Es konnte eine signifikante ($p < 0,05$) Erhöhung der Arachidonsäure und der Docosatetraensäure im Knochenlipid der Nekroseproben im Vergleich zur gesunden Kontrolle gemessen werden.
- Die Gesamtfettsäuren haben bei den Knochenödempatienten einen signifikant ($p < 0,01$) erniedrigten Gewichtsanteil von 5% am Ausgangsgewebe, bei dem gesunden Kollektiv und den Osteonekroseproben einen Anteil von 30%.
- Das Gesamtcholesterin ist in den ödematischen Proben mit 0,05% Gewichtsanteil am Knochenausgangsgewebe im Vergleich zur gesunden Kontrolle und Knochennekroseprobe mit 0,1% signifikant ($p < 0,05$) erniedrigt. In den Nekroseproben ist der Cholesterinspiegel nicht signifikant erhöht.

Enzymatische Analysen und DC:

- Es zeigte sich übereinstimmend, dass im Knochengewebe Triglyceride mit einem Gewichtsanteil von 30% des Ausgangsgewebes dominierend sind. Cholesterin ist nur minimal mit einem Anteil von 0,1% des Ausgangsgewebes vertreten und in den Nekroseproben nicht signifikant erhöht. Im ödematischen Knochen wird mit einem Gewichtsanteil von 5% vom Knochenausgangsgewebe ein signifikant ($p < 0,01$) verminderter Triglyceridgehalt gemessen.

Vergleich der Lipidkomposition in Plasma- und Knochenlipid von Patienten mit und ohne

Dyslipidämien

- Eine systemische Hypercholesterinämie fand im Knochenlipid keine Entsprechung in hohen Cholesterinwerten.
- Bei einem Patienten mit leichter Hypertriglyceridämie wurden die höchsten Gesamtfettsäurewerte im Knochenmarkslipid beobachtet.

5. Diskussion

5.1. Methodendiskussion

Methodendiskussion der Lipidextraktion aus Knochenlipid

In der Literatur wurde die Methode der Lipidextraktion anhand weicher, wasserreicher Gewebe, wie Hirngewebe, Leber- Muskel- und Fischgewebe entwickelt (Folch et al. 1951, 1956), (Bligh and Dyer. 1959, Shoreland et al. 1952). Das Gewebe wird mit den Lösungsmitteln Chloroform und Methanol versetzt und je nach Wassergehalt des Gewebes destilliertes Wasser hinzugefügt.

Jüngere Autoren untersuchten vor allem den Lipidgehalt in den weichen, wasserreichen Bestandteilen des Knochenmarks, weshalb sie die Methode von Folch ohne Modifikationsschritte verwenden konnten (Malik et al. 1984, Miller et al. 1996). Für Knochenstützgewebe wurde die Lipidextraktion bisher kaum durchgeführt (Kagawa et al. 1996). Schwierigkeiten ergaben sich vorliegend vor allem durch die Härte des Knochens, weshalb er auf Trockeneis zermörsert werden musste, um die Lipide im porös gewordenen Knochengewebe den Lösungsmitteln zugänglich zu machen. Ebenfalls mussten die Lösungsmittel- und Wasservolumina angepasst werden, da der Knochen per se ein wasserarmes Gewebe darstellt, in den Protokollen der Lipidextraktion aber von einem höheren Flüssigkeitsvolumen der Gewebe ausgegangen wird. Etwa 6% der Gesamtlipidmenge verbleiben laut Literaturangaben nach der ersten Lipidextraktion im Gewebe (Folch et al. 1951). Während Folch et al. eine weitere Extraktion nach Protokoll anschlossen, musste das Knochengewebe vorher in EDTA solubilisiert werden, um den Rest des im Gewebe enthaltenen Lipids zu lösen.

Basierend auf den verschiedenen Ansätzen von Folch und Bligh und Dyer wurde vorliegend eine Extraktionsmethode für die Lipidextraktion aus Knochengewebe entwickelt, die zeitsparend durchführbar ist und dennoch eine hohe Extraktionseffizienz erreicht, was anhand verschiedener Tests und Vergleichsdaten in der Literatur nachgewiesen wurde (Lund et al. 1962, Kagawa et al. 1992).

Die Methode kann als reteststabil und valide gelten.

Methodendiskussion der gas-chromatographischen Fettsäure- und Cholesterinbestimmung

Die Gaschromatographie (GC) wurde im Labor Professor Beisiegel bis dato für die Fettsäuredifferenzierung im Plasmalipid, nicht aber für die Bestimmung der Fettsäuren aus Knochenlipid angewendet.

Die Methode musste bezüglich der einzusetzenden Lipidmenge und der Menge des internen Standards modifiziert werden. Die Silylierungszeit (Veresterungs- und Stabilisierungsschritt) für Cholesterin aus Knochenlipid musste, verglichen mit Plasmacholesterin verlängert und bei höheren Temperaturen durchgeführt werden. Die für Plasma beschriebene Vorgehensweise in der Aufarbeitung der Proben (Hughes et al., 1986), (Christie, 1989) konnte für Knochenlipid übernommen werden und zeigte im Vergleich mit der Literatur Übereinstimmung in den Ergebnissen (Kagawa et al. 1996).

Methodendiskussion der enzymatischen Triglycerid- und Cholesterinbestimmung

Der quantitative enzymatische Triglycerid- und Cholesterintest wurde für Plasmalipid entwickelt und stellt eine Routineuntersuchung dar (Wahlefeld et al. 1974).

Fettsäureverteilung und Fettsäuregesamtsumme können in Knochenlipid quantitativ bestimmt werden, der Anteil von Triglycerid und Cholesterin wird in der Literatur bisher lediglich anhand semiquantifizierender Verfahren wie z.B. der Dünnschichtchromatographie (Lund, Abadi, Mathies 1962), (Miller et al. 1996) ermittelt.

Um eine Quantifizierung von Cholesterin und Triglycerid auch im Knochenlipid vornehmen zu können, sollte der enzymatische Test in dieser Arbeit auf seine Anwendung auf Knochenlipid modifiziert werden. Der enzymatische Test funktioniert auf hydrophiler Basis, so dass das extrahierte Knochenlipid in einem Detergenz aufgenommen werden muss, um den Testenzymen zugänglich zu sein. Nach Testreihen mit verschiedenen Testsubstanzen, wurde das Detergenz Triton als reteststabil in den Testreihen ermittelt. Weder die photometrische Auswertung noch die eingesetzten Standards des Testes wurden durch Triton beeinflusst. Das extrahierte Lipid konnte den Testenzymen zugänglich gemacht werden. Im Ergebnis zeigten die einzelnen Validierungsschritte der Methodenmodifikation befriedigende Resultate. Spätere Reaktionen, wie eine Mizellenbildung in den Probengefäßen bei unbewegter Lagerung über einer Stunde, die zu stark abnehmenden Triglyceridwerten in der Probe führten, sowie Verdünnungen der Probe, die durchgeführt werden mussten, da der Triglyceridgehalt der Knochenproben über dem Messmaximum des Tests lag und die vor allem bei Knochenproben mit hohem Triglyceridgehalt zu nicht vorhersehbar überhöhten Triglyceridwerten führten, zeigten letztlich, dass der Test nicht für extrahiertes Knochenlipid angewendet werden kann. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse hing v.a. von der Untersucherperson ab, so dass die Methode an der Reteststabilität scheitert. Da der Test für die Messung des Cholesteringehalts aus Knochenlipid nicht sensitiv genug ist, wurde die fluorometrische enzymatische Cholesterinmessung gewählt. Hier stellte sich ein systematischer Fehler ein, der in durchgeführten Testreihen das im Knochenlipid enthaltene Cholesterin um den Faktor 3 zu niedrig auswies.

Zwar waren hier die erhaltenen Werte reproduzierbar, die Handhabung mit den Proben erwies sich aber als sehr kompliziert, so dass auf die gas-chromatographische Cholesterinmessung zurückgegriffen wurde.

5.2. Triglyceride, Cholesterin und Lipoproteine im Plasmalipid

Pathogenetisch wird für die Entstehung der Osteonekrose und Coxarthrose unter anderem eine Störung des systemischen Lipidstoffwechsels angenommen (Aspden et al. 2001). Die auslösenden Faktoren für die Entstehung des idopathischen Knochenmarksödemsyndroms sind nur in Ansätzen bekannt. Ein Zusammenhang mit dem systemischen Lipidmetabolismus wird vermutet, da u.a. ein erhöhter Lp(a)-Spiegel, ein Lipoprotein, bei erkrankten Familienmitgliedern beschrieben wird und das idopathische Knochenmarksödemsyndrom als Vorläufersyndrom der Osteonekrose angesehen wird, die mit Störungen des Lipidstoffwechsels assoziiert ist (Berger et al. 2000), (Radke et al. 2004).

Hypertriglyceridämie und die Hypercholesterinämie werden bei unklarem Pathomechanismus mit dem Auftreten von Arthrose (Stürmer et al. 1998) und Osteonekrose (Moskal et al. 1997) assoziiert, was aber v.a. für die Osteonekrose zunehmend kontrovers diskutiert wird (Miyanishi et al. 2001). Ein Zusammenhang zwischen Hypertriglyceridämie und den genannten Knochenerkrankungen konnte vorliegend nicht bestätigt werden. Lediglich einer der Patienten mit Arthrose (bei n=7) wies eine Hypertriglyceridämie auf und der durchschnittliche Triglyceridgehalt im Plasma war im Arthrosekollektiv nicht und dem Kollektiv mit Osteonekrose nicht signifikant erhöht.

Bezüglich eines Zusammenhangs der Hypercholesterinämie und dem Auftreten von Arthrose und Osteonekrose konnten vorliegende Messungen zeigen, dass keiner der Patienten mit Arthrose (bei n=7) einen erhöhten Cholesterinspiegel aufweist. Im Kollektiv der Patienten mit Osteonekrose konnte eine Hypercholesterinämie bei der Hälfte der Patienten gemessen werden (bei n=4), was bei der vorliegenden kleinen Fallzahl kritisch beurteilt werden muss, die Datenlage aber bestätigen könnte. Der LDL-Spiegel war im Plasma aller Kollektive normwertig. Der HDL-Spiegel hingegen wurde in allen Kollektiven als unter die Norm erniedrigt gemessen, wobei er im Plasma der Patienten mit Osteonekrose am niedrigsten war, was für Männer und Frauen in diesem Kollektiv gleichermaßen zutraf.

In einem Tiermodell mit hyperlipämischen Kaninchen, die unter Steroidgabe eine Osteonekrose entwickelten, wurde ebenfalls ein signifikant erniedrigter Plasma-HDL-Spiegel gemessen (Kawai et al. 1980).

Die Arbeitsgruppe vermutete, dass nicht die Hyperlipidämie allein, verstärkt durch die Steroidgabe sondern die Koinzidenz mit einem erniedrigten HDL-Spiegel pathogenetisch in Bezug auf die Entstehung einer Osteonekrose sein und durch einen mangelhaften Lipidabtransport zur Fettakkumulation im Knochenmark und den Haverschen Kanälen und zur Ausbildung einer Knochennekrose führen könnte. Die Lipidanreicherungen im Knochengewebe der Tiere konnten in histologischen Untersuchungen nachgewiesen werden (Kawai et al. 1980). Vorliegend weisen alle Patienten mit Osteonekrose einen unter die Norm erniedrigten HDL-Spiegel im Plasma auf, keiner eine Hypertriglyceridämie und zwei eine Hypercholesterinämie (bei n=4).

Die erhaltenen Ergebnisse könnten die Annahme der Arbeitsgruppe stützen, aber auch bedeuten, dass der erniedrigte HDL-Spiegel allein für die Entstehung der Osteonekrose ursächlich sein könnte, da dieser Faktor als einziger bei allen Patienten mit Osteonekrose nachweisbar ist, was für die Hyperlipidämie und die Steroideinnahme nicht zutrifft.

Neben dem erniedrigten HDL-Spiegel wird auch eine Erhöhung des LDL/HDL-Index über die Norm, bei hohem LDL und normalem HDL im Tiermodell mit der Entwicklung einer Osteonekrose assoziiert (Miyanishi et al. 2001). Pathogenetisch wird hierbei ebenfalls von einer Störung des Lipidabtransportes aus dem Knochengewebe ausgegangen, was möglicherweise zur Ausbildung hypertropher Adipozyten und infolge dessen zu einer Knochennekrose führen könnte. Der LDL/HDL-Index war im Plasma der Patienten mit Osteonekrose über die Norm erhöht (bei n=4), was die Daten in der Literatur bestätigt, vorliegend aber nicht durch einen

hohen LDL-Spiegel, sondern durch einen unter die Norm erniedrigten HDL-Spiegel verursacht wird.

Neben dem Triglyceridspiegel wurde auch die VLDL-Konzentration im Plasma bestimmt. Es zeigte sich, dass die Konzentration im Plasma der Patienten mit Osteonekrose (bei n=3) höher als in den übrigen Kollektiven lag. Über eine Erhöhung des VLDL-Spiegels im Plasma von Patienten mit Osteonekrose werden in der Literatur keine spezifischen Angaben gemacht. Es wurde lediglich eine systemische Agglutination der VLDL und Chylomikronen bei einem erhöhten CRP-Wert (Gadsboll et al. 1985) beobachtet, die zur Formation von Fettemboli im Knochen führten (Rowe et al. 1986), (Hulman 1988). Ob diese Beobachtungen auch für die Pathogenese der Knochennekrose eine Rolle spielen ist nicht bekannt. Der CRP-Wert von Patienten mit Osteonekrose wurde vorliegend nicht bestimmt.

5.3. Triglyceride und Cholesterin im Knochenlipid

Im humanen Knochenmark wird ein Triglyceridanteil von ca. 30% des Ausgangsgewebes gemessen und stellt die am stärksten vertretene Lipidgruppe dar, was Daten aus der Literatur bestätigen (Lund 1962). Innerhalb der drei untersuchten Kollektive lag die Triglyceridmenge des nekrotischen Knochenmarks über der der beiden anderen Gruppen. Ebenfalls war die Fettsäuregesamtsumme in den Nekroseproben am höchsten. Die Differenz war nicht signifikant, entspricht aber den Beobachtungen in der Literatur und könnte das biochemisch ermittelte Korrelat zu den histologisch beschriebenen Lipideinlagerungen und hypertrophen Adipozyten im nekrotischen Knochen sein, die sich durch Störungen im Lipidabtransport oder durch Steroidgabe in Tierversuchen ausbilden (Miyaniishi et al. 2001), (Motomura 2005). Lipidansammlungen und hypertrophe Adipozyten gelten bei unbekanntem Mechanismus als wichtige Pathogenesefaktoren für die Entstehung der Osteonekrose (Schroeder 1994), (Wang et al. 2000), (Cui et al. 2000).

Gesamtcholesterin ist im Knochenlipid mit einem Gewichtsanteil von 0,1% des Ausgangsgewebes mit Hilfe der Gas-Chromatographie nachweisbar, was den Literaturangaben entspricht (Lund 1962).

Dieser Wert ist im nekrotischen Knochen im Vergleich zur gesunden Kontrolle nicht signifikant erhöht und liegt bei einem Gewichtsanteil von 0,15%. Systemische Hypercholesterinämie führte vorliegend nicht zu einem Anstieg des Cholesterins im Knochenlipid.

In der Literatur wurde ein signifikant ($p < 0,05$) erhöhter Cholesterinspiegel in der Nekrosezone des Knochens bestimmt (Boskey et al. 1982). Welchen Einfluss der erhöhte Cholesterinspiegel auf den Knochen hat, ist nicht bekannt. In vitro Versuche konnten keinerlei Auswirkungen des Cholesterins auf Osteoblasten- oder Osteoklastenproliferation nachweisen (Maurin et al. 2002).

Im Tierversuch und in in vitro Versuchen mit Knochengewebe wurde anhand von Low-Density Lipoprotein Rezeptor-negativen (LDLR $-/-$) Mäusen mit Hyperlipidämie eine erhöhte Knochenresorption durch gesteigerte Osteoklastenaktivität beschrieben (Tintut et al. 2004). Das könnte bedeuten, dass die Knochengewebsmasse der Patienten mit Hyperlipidämie geringer ist, als in der gesunden Kontrolle. Diese Annahme konnte vorliegend nicht bestätigt werden.

In der Literatur wird das idiopathische Knochenmarksödem histologisch und anhand von MRT-Bildern beschrieben. Über die Lipid- und Fettsäurekomposition und den Triglyceridgehalt des ödematischen Knochens existieren wenig Daten.

Mikroskopische Untersuchungen der ödematösen Areale zeigen flüssigkeitsgefüllte Markhöhlen, zerstörte Adipozyten und Microcallus, der auf eine gesteigerte Knochenaktivität hindeutet. In der Knochenmorphometrie konnte eine bis zu 20% erhöhte Knochendichte nachgewiesen werden (Hofmann, Plenck 1991) (Plenck, Hofmann et al. 1997).

Die Triglyceridmenge des ödematischen Knochens liegt mit 5% Gewichtsanteil an der Ausgangsmenge signifikant ($p < 0,01$) unter der Triglyceridmenge der beiden anderen Kollektive. Die zerstörten Adipozyten könnten das anatomische Korrelat zu der als vermindert gemessenen Triglyceridmenge im ödematischen Knochen darstellen, was sich vorliegend auch in einer signifikant ($p < 0,01$) verminderten Gesamtfettsäuresumme widerspiegelt. Der Cholesterinanteil war signifikant ($p < 0,05$) niedriger als im Kollektiv mit Osteonekrose und der gesunden Kontrolle nachweisbar, was auf den beschriebenen Zellverlust und die Zunahme der knöchernen Matrix zurückzuführen sein könnte.

Anders die Knochengewebssmasse, sie wurde als die signifikant ($p < 0,05$) höchste, verglichen mit den beiden anderen Kollektiven gemessen, was mit der histologisch als gesteigert beschriebenen Knochendichte assoziiert werden kann.

Zusammenfassend bedeutet das, dass der ödematische Knochen den höchsten Knochengewebssanteil und den niedrigsten Triglyceridanteil verglichen mit dem nekrotischen und dem gesunden Knochen aufweist, was in dieser Arbeit erstmals quantitativ anhand von biochemischen Messungen beschrieben wurde.

5.4. Fettsäuren im Plasma

Die Plasmafettsäureverteilung eines Patientenkollektives mit Knochen- und Gelenkserkrankungen wurde mit einer gesunden Kontrollgruppe verglichen, ohne zuvor Fettsäuren zugeführt zu haben. Es zeigen sich signifikante Unterschiede in der Fettsäureverteilung. Ölsäure und Eicosaensäure waren im Patientenplasma signifikant ($p < 0,05$) erhöht. Die Eicosatriensäure war im Patientenplasma signifikant ($p < 0,05$) erniedrigt.

Die Docosatetraensäure war signifikant ($p < 0,05$) im Plasma der Coxarthroseproben erniedrigt, (siehe Anhang 22).

Die Patienten sind unterschiedlichen Alters (von 37-81 Jahre) und unterschiedlicher Herkunft (Europäer($n=17$), Araber($n=1$), Asiatische ($n=1$)). In der Kontrollgruppe sind die Personen ebenfalls unterschiedlichen Alters (23-65) und deutscher Herkunft, siehe Abbildung 3 im Methodenteil. Für das signifikante Ergebnis kann somit nicht die Nationalität ursächlich sein. Durch die interne Heterogenität der verglichenen Gruppen können auch etwaige Ernährungsgewohnheiten nicht für die signifikant erhöhten oder erniedrigten Fettsäurespiegel verantwortlich gemacht werden. Die Kollektive unterscheiden sich einzig in dem Vorhandensein der Knochen- und Gelenkserkrankungen, so dass es möglich ist, dass die signifikant veränderten Fettsäurespiegel Ursache oder Folge der vorliegenden Knochen- und Gelenkserkrankungen sind.

Die Ölsäure ist eine monounsättigte Fettsäure mit dem prozentual drittgrößten Anteil aller Fettsäuren im humanen Plasma (Lepage et al. 1986) und ein wichtiger Bestandteil der mediterranen Diät. Die Fettsäure mit dem größten Anteil aller Fettsäuren im humanen Plasma ist mit 32% die Linolsäure, gefolgt mit 22% von der Palmitinsäure und mit 19% von der Ölsäure. Die Ölsäure scheint unter anderem protektive Effekte bei dem Auftreten von Atherosklerose und kardiovaskulären Erkrankungen zu haben (Carluccio et al. 1999). Ebenfalls wurde von einem positiven Effekt auf die Knochendichte im humanen Knochen durch eine Ernährung reich an Ölsäure berichtet (McDonald et al. 2004). Über die Funktion der Ölsäure im Lipidmetabolismus des Knochens sind aber insgesamt nur wenige Daten vorhanden.

In tierexperimentellen Fütterungsversuchen wurde die zugeführte Ölsäure verstärkt im Knochenlipid nachgewiesen über die Folgen der Akkumulation werden keine Aussagen gemacht (Watkins et al. 1996). Im Gegensatz zu einer Diät mit hohem Palmitin- und Stearinsäuregehalt, hatte eine Diät mit hohem Ölsäureanteil keine Auswirkung auf den Calciumgehalt im Knochen im Tierversuch (Atteh et al. 1983).

Auch das Postulat, dass Freie Fettsäuren einen Einfluss auf die Osteoblastenproliferation haben, konnte für die Ölsäure nicht bestätigt werden, während dieser Effekt für die Arachidonsäure und Docosahexaensäure in in vitro Versuchen beobachtet wurde (Maurin et al. 2002). Dass eine Erhöhung der Ölsäure ursächlich für das Auftreten von Knochen- und Gelenkerkrankungen ist, erscheint in Anbetracht der Datenlage unwahrscheinlich. Ob die Ölsäure vermehrt in reparativen Prozessen bei Knochen- und Gelenkdefekten freigesetzt wird, konnte anhand der Literatur nicht bestätigt werden. Es wurde lediglich beschrieben, dass die Ölsäure im in vitro Versuch mit Osteoblasten einen inhibitorischen Effekt auf die Arachidonsäure induzierte Zytokin mRNA-Expression hatte (Priante et al. 2002). Da Zytokine einen pro-inflammatorischen Effekt haben, könnte das bedeuten, dass die Ölsäure kompensatorisch freigesetzt wurde.

Auffällig an den erhaltenen Ergebnissen ist, dass die signifikant erhöht gemessenen Fettsäuren den (n-9)-Fettsäuren zugeordnet werden (Ölsäure, Eicosaensäure), während die erniedrigten Fettsäuren der (n-6)-Fettsäuregruppe angehören (Eicosatriensäure, Docosatetraensäure).

Während die Docosahexaensäure wie auch die Eicosapentaensäure, als (n-3)-Fettsäuren Syntheseprodukte der α -Linolensäure darstellen, und mit einer erhöhten Knochenneubildung assoziiert wird, existieren für die Docosatetraensäure, als (n-6)-Fettsäure keine direkten Daten zum Knochenmetabolismus. Allgemein werden (n-6)-Fettsäureerhöhungen über die Arachidonsäure- und PGE₂-Synthese mit einer erniedrigten Knochenneubildungsrate assoziiert (Watkins et al. 2000).

Eine Senkung der (n-6)-Fettsäuren könnte zu einer relativen Steigerung der (n-3)-Fettsäuren und somit möglicherweise zu einer Knochenneubildung und zu reparativen Prozessen führen (Watkins et al. 2000). Somit wäre die signifikante Senkung der Eicosatriensäure und der Docosatetraensäure als eine möglicherweise pathophysiologische Folge der Knochen- und Gelenkerkrankung anzusehen. Allerdings hat die Eicosatriensäure einen Anteil von 0,1% und die Docosatetraensäure einen Anteil von 0,2% an der Gesamtsumme der Fettsäuren.

Eine Senkung dieser Fettsäuren hätte vermutlich keinen relevanten Einfluss auf das Verhältnis von (n-3)/(n-6)-Fettsäuren. Die Arachidonsäure, als Fettsäure mit einem Anteil von ca. 1% an der Gesamtfettsäuresumme war in den Kollektiven nicht erniedrigt.

5.5. Fettsäuren im Knochenlipid

Die Fettsäureverteilung im Knochenlipid ohne Knochenerkrankungen wurde wie folgt gemessen: 45% Ölsäure, 22% Palmitinsäure, 12% Linolsäure. Nur die quantitativ wichtigsten sind aufgeführt. Die Ergebnisse stimmen mit denen in der Literatur überein (Kagawa et al. 1996).

In den Knochenproben des nekrotischen Knochens konnte im Vergleich zur Fettsäureverteilung beim Knochenmarksödemsyndrom und der Coxarthrose, als gesunder Kontrolle, ein signifikant ($p < 0,05$) erhöhter Arachidonsäurespiegel sowie eine Erhöhung der Docosatetraensäure und eine nicht signifikante Erhöhung der Fettsäuregesamtsumme gemessen werden.

Systemische Hyperlipidämien und Dyslipoproteinämien, die vorliegend bei der Hälfte der Patienten mit Osteonekrose vorlagen, werden als ursächlich für Lipidansammlungen und der Ausbildung hypertropher Adipozyten im Knochenmark des nekrotischen Knochens angesehen. In Autopsiebefunden konnte eine Adipozytenhypertrophie bei Patienten mit Osteonekrose nachgewiesen werden (Motomura et al. 2004).

Die Adipozyten des Knochenmarks speichern Freie Fettsäuren als Triglyceride (Kamp et al. 2002), so dass bei einem erhöhten systemischen oder lokalen Spiegel Freier Fettsäuren die Adipozytenhypertrophie Folge sein könnte und was biochemisch einer vorliegend gemessenen Gesamtfettsäureerhöhung entsprechen könnte. Wie die Adipozytenhypertrophie den Pathomechanismus der Osteonekrose beeinflusst wird derzeit diskutiert.

Die in den Nekroseproben erhöht gemessene Arachidonsäure kann möglicherweise ebenfalls als Folge der Adipozytenhypertrophie des nekrotischen Knochens angesehen werden.

Adipozyten sezernieren u.a. $\text{TNF-}\alpha$, wodurch in vitro eine Freisetzung von Arachidonsäure und Docosahexaensäure über zwei Phospholipasen, cPLA_2 und sPLA_2 aus Osteozyten und Osteoblasten erfolgt (Rawlinson et al. 2000). Eine Adipozytenhypertrophie und ein dadurch möglicherweise gesteigerter lokaler Lipidmetabolismus der Adipozyten könnte in der Folge auch zu einer erhöhten $\text{TNF-}\alpha$ -Sekretion führen und für den erhöht gemessenen Arachidonsäurespiegel ursächlich sein.

Neben der Arachidonsäurefreisetzung aufgrund eines gesteigerten Adipozytenstoffwechsels und $\text{TNF-}\alpha$ Freisetzung konnten im in vitro Versuch auch direkt durch mechanische Belastung des Knochengewebes, erhöhte Arachidonsäurespiegel nachgewiesen werden (Rawlinson et al. 1996).

Betrachtet man die mechanische Belastung als Stress, dem das Knochengewebe ausgesetzt ist, wäre es auch möglich, dass entzündliche Prozesse wie die Osteonekrose oder andere Knochenerkrankungen zu einer direkten Freisetzung der Arachidonsäure aus Osteoblasten und zu ihrer messbaren Erhöhung führen könnten. Direkte Daten von Arachidonsäuremessungen im Knochen bei pathologischen Prozessen sind kaum vorhanden.

Bekannt ist, dass in entzündlichen Knochenprozessen die PGE₂-Synthese um das 5-50fache erhöht ist (Norrdin et al. 1990). Da die Arachidonsäure das Substrat für die PGE₂-Synthese darstellt, wäre es möglich, dass im Knochen auch erhöhte Arachidonsäurewerte gemessen werden, was die Sachlage indirekt bestätigen könnte.

TNF- α gilt zusammen mit anderen Zytokinen als Mediator für die Synthese und Freisetzung von PGE₂, was zur Folge haben könnte, dass es über eine Erhöhung der Arachidonsäure, als Substrat der COX zu der Synthese von PGE₂ kommt (Fernandes et al. 2003).

PGE₂ hat in seiner Wirkung auf das Knochengewebe sowohl knochenauf- als auch knochenabbauende Effekte, was massgeblich von der Konzentration gesteuert wird (Norrdin et al. 1990). Es wäre also denkbar, dass es durch die Arachidonsäureerhöhung zu einer starken Erhöhung der PGE₂ kommt, mit der Folge der Knochendestruktion und einer Osteonekrose. Die erhöhten Arachidonsäurespiegel könnten somit die Ursache für die Entstehung der Osteonekrose darstellen. Notwendig zur Beantwortung dieser Frage wären Messungen der Arachidonsäure in anderen destruktiv veränderten Knochenproben und vergleichende Messungen von PGE₂.

Auf der anderen Seite wird ein moderat erhöhter Prostaglandinspiegel mit Knochenwachstum assoziiert (Watkins et al. 2002). TNF- α wird immunologisch betrachtet bei Entzündungsprozessen, möglicherweise auch bei der Osteonekrose freigesetzt (Fernandes et al. 2003). Das könnte bedeuten, dass die durch den Entzündungsprozess modulierte TNF- α -Produktion zu einer gesteigerten Arachidonsäure- und Prostaglandinbildung und zu reparativen Prozessen im Knochengewebe führt. Bestätigend für diese These ist die Beobachtung, dass in der reparativen Randzone der Osteonekrose sowohl Zellen der Immunabwehr sowie eine signifikante Steigerung von PGE₂ nachgewiesen werden konnte (Tsai und Liu 1992), (Lawrence et al. 1998).

Andere Autoren vermuten, dass die Arachidonsäure als (n-6)-Fettsäure über die verstärkte Ausschüttung von Zytokinen wie IL-6 zur Entstehung von Knochenerkrankungen beiträgt (Bordin et al. 2003). IL-6 ist ein Zytokin mit zahlreichen Aufgaben im Knochenstoffwechsel. Neben seiner Funktion in Osteoblasto- und Osteoklastogenese führte es zusammen mit IL-1 und TNF- α zu einer Steigerung der COX und zur PGE₂-Produktion und in der Folge zur Knochenresorption im in vitro Versuch (Park et al. 2004). Ähnliche Beobachtungen zeigen, dass hohe (n-6)-Fettsäurespiegel in der Nahrung zu einem Ansteigen von pro-entzündlichen Zytokinen IL-1, IL-6 und TNF assoziiert ist, während (n-3)-reiche Diäten zu einer Down-Regulation der Zytokine und einer erhöhten Knochendichte führen (Fernandes et al. 2003).

Neben der Annahme, dass die Synthese von PGE₂ mit einer möglichen Knochendestruktion einhergehen könnte, wird ebenfalls vermutet, dass erhöhte Fettsäurespiegel direkt zu einer Abnahme enzymatischer Reaktionen und möglicherweise zur Entwicklung von Knochenerkrankungen führen können (Bolton-Smith et al. 1997), da die Fettsäuren die Fettsäurekomposition der Membranphospholipide und somit Zellfunktionen beeinflussen (Duplus et al. 2000), (Watkins et al. 2004). Ob das für die Entstehung der Osteonekrose eine Rolle spielt, ist unklar.

In in vitro Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Arachidonsäure direkt den Knochenstoffwechsel beeinflussen kann. Sie zeigt eine dosisabhängige Abnahme der humanen Osteoblastenproliferation in der Zellkultur (Maurin et al. 2002). Wurde die Dosis gesteigert, verringerte sich die Osteoblastenproliferation. Andere Fettsäuren führten nicht zu diesem Effekt. Eine Erhöhung der Arachidonsäure im Knochenlipid des nekrotischen Knochens könnte somit direkt die Osteoblastenproliferation hemmen und zu einem Zelluntergang und in der Folge zur Ausbildung der Osteonekrose führen (Lima et al. 2002).

Diese Annahme könnte durch die Beobachtung bestätigt werden, dass die Replikationsfähigkeit der Osteoblasten in Zonen mit Osteonekrose untersucht im proximalen Femur von Patienten reduziert war (Gangji et al. 2003).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Erhöhung der Arachidonsäure einerseits Ursache und andererseits Folge einer Knochendestruktion und Ausbildung einer Osteonekrose sein könnte. Um diese Frage zu klären, müssten weitere Untersuchungen in nekrotischem und gesunden Knochen durchgeführt werden.

6. Zusammenfassung

Über den Lipidmetabolismus, den Lipid- und Fettsäuregehalt des humanen Knochens sowie die Auswirkungen des Plasmalipidspiegels auf den Knochenstoffwechsel im gesunden Knochen und bei Knochenerkrankungen ist derzeit wenig bekannt.

Vorliegend wurde daher in Knochenproben von Patienten mit idiopathischer Osteonekrose und idiopathischem Knochenmarksödemsyndrom der Triglycerid- und Cholesteringehalt sowie die Fettsäureverteilung in Plasma- und Knochenlipid gemessen und mit Messungen von Patienten mit Coxarthrose, als primärer Gelenkserkrankung, verglichen. Die angewandten Methoden v.a. der Lipidextraktion und der Gaschromatographie wurden für ihre Anwendung auf Knochengewebe vorher erfolgreich etabliert und modifiziert.

Im Ergebnis weist das humane Fettmark einen Triglyceridgehalt und einen Gesamtfettsäureanteil von ca. 30% und einen Cholesteringehalt von ca. 0,1% am Gewichts des Ausgangsgewebes auf. Die quantitativ wichtigste Fettsäure im Knochenlipid ist mit einem Anteil von 45% an der Gesamtfettsäuremenge die Ölsäure, gefolgt von der Palmitinsäure mit 22% und der Linolsäure mit 12%. Abweichend wurde im nekrotischen Knochen ein signifikant ($p < 0,05$) erhöhter Arachidonsäurespiegel nachgewiesen. Das Ergebnis ist im Vergleich mit der Literatur schlüssig und könnte durch eine gesteigerte PGE_2 -Synthese, einem potenten Stimulator des Knochen- und abbaus, destruirende und nekrotisierende aber auch reparative Prozesse im Knochengewebe zur Folge haben. Ein im nekrotischen Knochen vorliegend erhöht gemessener Triglycerid- und Fettsäurespiegel könnte das biochemische Korrelat der histologisch beschriebenen hypertrophen Adipozyten und Fettembolien im nekrotischen Knochengewebe darstellen. In den Knochenödem-Proben wurde ein signifikant ($p < 0,01$) erniedrigter Triglycerid- und Gesamtfettsäureanteil von 5% sowie ein Cholesterinanteil von 0,5% vom Gewichts des Ausgangsgewebes gemessen. Ebenfalls wies das Knochengewebe die signifikant ($p < 0,05$) höchsten Knochensedimentwerte auf (CA, $n=11$: 326,2 mg/g ($\pm 68,3$), ON, $n=6$: 433mg/g ($\pm 155,3$), KÖ, $n=2$: 586,5), was als biochemisches Korrelat der histologisch vorbeschriebenen zerstörten Knochenmarkszellen und einer gesteigerten Knochendichte verstanden werden kann.

Neben den Knochengewebsanalysen wurden die Plasmalipidspiegel der drei Kollektive mit dem Plasma von Patienten ohne Knochen- und Gelenkserkrankungen verglichen. Im Plasma der Patienten mit Osteonekrose konnte ein unter den Normbereich gesenkter HDL-Spiegel (30 mg/dl ± 10 mg/dl) bei erhöhtem LDL/HDL-Index (4,5 $\pm 1,9$) nachgewiesen werden, was die Angaben in der Literatur bestätigen. Eine in der Literatur beschriebene Assoziation von Knochenerkrankungen mit systemischen Dyslipidämien konnte für die Hypertriglyceridämie nicht (bei $n=7$) und für die Hypercholesterinämie bei der Hälfte der Patienten (bei $n=4$) bestätigt werden. Systemische Dyslipidämien fanden keine Entsprechung in einer Erhöhung oder systematischen veränderten Fettsäureverteilung im Knochenmark.

Somit konnten erstmals anhand der für die Knochenlipidanalyse etablierten Methoden die knochenhistologischen Ergebnisse des nekrotischen und ödematösen humanen Knochens biochemisch quantifiziert sowie eine signifikant veränderte Fettsäurezusammensetzung im nekrotischen Knochengewebe nachgewiesen werden.

7. Anhang

7.1. Abbildungs- und Graphikenverzeichnis

Einleitung

Abbildung 1: Darstellung der v.a. in tierischen Fetten vorkommenden Fettsäureklassen und deren Syntheseprodukte.	6
Abbildung 2: Einfluss von PGE ₂ auf den Knochenstoffwechsel.	8
Abbildung 3: Zusammenfassung der Funktion der Adipozyten im Knochenmark.	10
Abbildung 4: Makroskopisches und mikroskopisches Bild einer Femurkopfnekrose.	12
Abbildung 5: Markoskopisches Bild einer Coxarthrose.	15

Material und Methoden

Abbildung 1: Charakterisierung der Patienten.	16
Abbildung 2: Charakterisierung des gesunden Kollektives.	17
Abbildung 3: Aufstellung der in dieser Arbeit für die Kollektive verwendeten Abkürzungen.	17
Abbildung 4: Vergleich der Verfahrensschritte der Lipidextraktion aus verschiedenen Geweben.	21

Ergebnisse

Abbildung 1: Vergleich der Plasmalipidkonzentration der drei Kollektive.	30
Graphik 1: Häufigkeitsverteilung der Fettsäuren im Plasma einer gesunden Stichprobe.	31
Graphik 2: Anteil der Ölsäure an der Summe der Gesamtfettsäuren im Plasma von Patienten mit Coxarthrose (CA), Nekrose/Knochenödem (ON/KÖ) und der gesunden Kontrolle (GK) in %. Der Anteil der Ölsäure ist im Plasmalipid der CA- und ON/KÖ-Gruppe signifikant ($p < 0.05$) erhöht (rote Box). (CA:n=3, GK:n=7, ON/KÖ:n=2).	32
Graphik 3: Anteil der Eicosatriensäure an der Summe der Gesamtfettsäuren im Plasma von Patienten mit Coxarthrose (CA), Nekrose/Knochenödem (ON/KÖ) und der gesunden Kontrolle (GK) in %. Der Anteil der Eicosatriensäure ist im Plasmalipid der CA- und ON/KÖ-Gruppe signifikant ($p < 0.05$) erniedrigt (rote Box). (CA:n=3, GK:n=7, ON/KÖ:n=2).	32
Graphik 4: Anteil der Eicosaensäure an der Summe der Gesamtfettsäuren im Plasma von Patienten mit Coxarthrose (CA), Nekrose/Knochenödem (ON/KÖ) und der gesunden Kontrolle (GK) in %. Der Anteil der Eicosaensäure ist im Plasmalipid der CA- und ON/KÖ-Gruppe signifikant ($p < 0.05$) erhöht (rote Box). (CA:n=3, GK:n=7, ON/KÖ:n=2).	33
Graphik 5: Anteil der Docosatetraensäure an der Summe der Gesamtfettsäuren im Plasma von Patienten mit Coxarthrose (CA), Nekrose/Knochenödem (ON/KÖ) und der gesunden Kontrolle (GK) in %. Der Anteil der Docosatetraensäure ist im Plasmalipid der CA-Gruppe signifikant ($p < 0.05$) erniedrigt (rote Box). (CA:n=3, GK:n=7, ON/KÖ:n=2). $p < 0.05$.	33
Abbildung 2: Vergleich zweier Methoden zur Lipidextraktion.	35
Abbildung 3: Vorgehensweise der Lipidextraktion aus dem nach der ersten Lipidextraktion erhaltenen Knochensand.	36
Abbildung 4: Abschlusstabelle der im GC gemessenen Fettsäuren im Vergleich mit der Literatur.	37
Graphik 6: Häufigkeitsverteilung der Fettsäuren in Knochenmark von gesunden Individuen.	41
Abbildung 5: Ergebnisse der Dünnschichtchromatographie aus Knochenlipid.	42
Abbildung 6: Übersicht der erhaltenen TG-, Cholesterin- und FS-Werte anhand DC, GC und der enzymatischen TG und Cholesterinmessungen.	44

7.2. Tabellenanhang

Tabelle 1a: Fettsäureverteilung im Plasma gesunder Individuen.

Fettsäureanteil in %		
	Mittelwert in % n=7	Minimum- Maximum in %
14:0 Myristinsäure	1,16	1,09-1,21
16:1-7 Palmitoleinsäure	2,04	1,62-2,42
16:0 Palmitinsäure	21,63	20,02-23,21
18:3-6 γ -Linolenic	0,6	0,6-0,7
18:2-6 Linolsäure	31,48	37,77-35,13
18:1-9 Ölsäure	18,58	18,58-19,18
18:1-7 Vaccensäure	2,03	1,65-2,56
18:0 Stearinsäure	7,09	6,72-7,40
20:4-6 Arachidonsäure	7,49	6,78-8,12
20:5-3 Eicosapentaensäure	1,24	0,87-1,64
20:3-6 Eicosatriensäure	2,0	1,94-2,06
20:2-6 Eicosadiensäure	0,22	0,19-0,23
20:1-9 Eicosaensäure	0,17	0,16-0,19
20:3-3 Eicosatriensäure	0,02	0-0,03
20:0 Arachinsäure	0,07	0,06-0,08
22:6-3 Docosahexaensäure	2,27	1,96-2,75
22:4-6 Docosatetraensäure	0,3	0,28-0,33
22:5-3 Docosapentaensäure	0,77	0,60-0,95
22:2-6 Docosadiensäure	0,04	0,02-0,07
22:1-9 Erucinsäure	0,01	0,0-0,02

Freie Fettsäuren wurden anhand der GC im Plasma gesunder Individuen gemessen und ihr Anteil an der Gesamtsumme der gemessenen freien Fettsäuren prozentual bestimmt.

Diese Tabelle dient als Vergleichsgrundlage zur Analyse der Fettsäureverteilung im Plasma von an Knochenerkrankungen erkrankten Individuen.

Tabelle 1b: Fettsäuren im Plasma gesunder Individuen, eingeteilt nach Untergruppen.

Fettsäuregruppen in %		
	Mittelwert in %	Minimum-Maximum in %
Eikosanoide	11,24	10,16-12,33
GFS	29,96	28,47-31,45
EUFS	23,17	21,72- 24,47
MUFS	46,48	44,13-49,80

GFS: Gesättigte Fettsäuren gesamt in %. EUFS: Einfach ungesättigte Fettsäuren gesamt in %. MUFS: Mehrfachungesättigte Fettsäuren gesamt in %.

Tabelle 2a: Vergleich der Fettsäureverteilung im Plasma von gesunden und erkrankten Individuen.

Fettsäuren	GK	CA	ON/KÖ
Mittelwerte in %	n=7	n=3	n=2
14:0 Myristinsäure	1,16	1,05	1,60
16:1-7 Palmitoleinsäure	2,04	2,51	2,18
16:0 Palmitinsäure	21,63	21,86	21,78
18:3-6 γ -Linolensäure	0,60	0,33	0,42
18:2-6 Linolsäure	31,48	27,72	28,09
18:1-9 Ölsäure	18,58	24,17	22,98
18:1-7 Vaccensäure	2,03	1,63	3,12
18:0 Stearinsäure	7,09	6,89	6,93
20:4-6 Arachidonsäure	7,49	6,10	6,47
20:5-3 Eicosapentaensäure	1,24	1,26	0,75
20:3-6 Eicosatriensäure	2,0	1,69	1,80
20:2-6 Eicosadiensäure	0,22	0,24	0,22
20:1-9 Eicosaensäure	0,17	0,25	0,21
20:3-3 Eicosatriensäure	0,02	0,02	0,03
20:0 Arachinsäure	0,07	0,06	0,08
22:6-3 Docosahexaensäure	2,27	2,64	1,52
22:4-6 Docosatetraensäure	0,30	0,19	0,26
22:5-3 Docosapentaensäure	0,77	0,55	0,57
22:2-6 Docosadiensäure	0,04	0,04	0,03
22:1-9 Erucinsäure	0,01	0,01	0,01

Fettsäureverteilung im Plasma gesunder Individuen, als Kontrollgruppe, mit der Fettsäureverteilung von Patienten mit Coxarthrose- und Knochennekrose/Knochenödem (Ein Pat. ist an beiden Krankheitsbildern erkrankt). Angaben in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme der Fettsäuren.

Tabelle 2b: Vergleich der Fettsäureverteilung im Plasma von gesunden und erkrankten Individuen, eingeteilt nach Untergruppen.

Fettsäuren	CA	GK	ON/KÖ
Mittelwerte In %	n=3	n=7	n=2
Eikosanoide	9,63	11,24	9,47
GFS	29,86	29,96	30,39
EUFS	28,91	23,17	28,90
MUFS	39,04	46,48	40,28

Fettsäureverteilung im Plasma von Coxarthrose- und Nekrose/Knochenödemproben (Ein Pat. ist an beiden Krankheitsbildern erkrankt) sowie gesunden Individuen, folgende Untergruppen wurden addiert:

GFS: Gesättigte Fettsäuren gesamt in %. EUFS: Einfach ungesättigte Fettsäuren gesamt in %. MUFS: Mehrfachungesättigte Fettsäuren gesamt in %.

Tabelle 2c Vergleich der Fettsäuregesamtsumme von gesunden und erkrankten Individuen.

Mittelwerte	GK n=7	CA n=3	ON/KÖ n=2
Fettsäuren gesamt mg/dl	218,42	226	251

Messung der Gesamtsumme der Fettsäuren in mg/dl Plasma.

CA: Coxarthrose n=3, ON: Nekrose/KÖ: Knochenödem, n=2, GK= gesunde Individuen n=7.

Tabelle 3: Vergleich der eingesetzten Probenmenge und der extrahierten Gesamtfettsäuremenge bei vier Individuen und unterschiedlichem Probenausgangsgewicht (je 500mg und ~100mg).

Probe:	Pat. IV,	Pat. IV,	Pat. VI,	Pat. VI,	Pat. VII,	Pat. VII,	Pat. VIII,	Pat. VIII,
Knochengewebe	500mg	110mg	500mg	120mg	500mg	105mg	500mg	123mg
Gesamtfettsäuren in mg/g Knochengewebe	307	290	200	178	307	350	160	200

Patientencharakterisierung s. Methodenteil.

Verglichen werden das eingesetzte Knochenprobengewicht und die daraus extrahierbare Gesamtfettsäuremenge. Festzustellen war, ob unterschiedliche Probenmengen einen Einfluß auf die Effizienz der Lipidextraktion haben.

Tabelle 4: Auswirkung der Triton-Konzentration auf die gemessene Triglyceridmenge der Standards PP und PN des enzymatischen Kits.

PN	ohne	TX			PP	ohne	TX		
	Zusatz	1%	5%	10%		Zusatz	1%	5%	10%
mg/dl	98	99	99	n.g.	mg/dl	249	n.g.	240	n.g.
mg/dl	101	81	84	82	mg/dl	210	n.g.	176	150
mg/dl	109	n.g.	103	124	mg/dl	217	n.g.	213	224
mg/dl	95	102	105	107	mg/dl	209	246	234	n.g.
mg/dl	73	93	92	n.d.	mg/dl	238	240	225	243
mg/dl	104	78	87	85	mg/dl	257	243	259	n.g.
mg/dl	96	99	85	n.g.	mg/dl	260	189	244	n.g.
mg/dl	73	93	92	n.g.	mg/dl	267	n.g.	279	n.g.

PN=Precinorm=Standard Normwert (97-145mg/dl).

PP=Precipath=Standard pathologischer Wert (294-396mg/dl).

n.g.=nicht gemessen, TX:Tritonanteil in %.

Tabelle 5: Enzymatische TG-Messung in nicht lipidextrahiertem Plasma und Plasmalipiden nach Lipidextraktion.

Probe n=3	nicht lipid- extrahiertes Plasma	Lipidextrahiertes Plasmalipid in TX 1%	Lipidextrahiertes Plasmalipid in TX 5%
Plasma 1 mg/dl			
Messung 1	44	n.g.	45
Messung 2	43	n.g.	35
Messung 3	43	n.g.	49
Plasma 2 mg/dl			
Messung 1	31	33	n.g.
Messung 2	n.g.	36	n.g.
Messung 3	n.g.	44	n.g.
Plasma 3 mg/dl			
Messung 1	33	33	n.g.

n.g.=nicht gemessen

Das extrahierte Lipid wurde in einem Tritonpuffer mit verschiedenen Triton-Konzentrationen (1%, 5%) aufgenommen.

Tabelle 6: Cholesterinwert aus Plasmalipid mit und ohne vorheriger Lipidextraktion. Vergleich anhand zweier Proben (Plasma 1, Plasma 2).

	Plasma 1, ohne Lipidextraktion	Plasma 1, nach Lipidextraktion	Plasma 2, ohne Lipidextraktion	Plasma 2, nach Lipidextraktion
Cholesterin mg/dl	152	55	150	50

Tabelle 7: Menge des gefriergetrockneten Knochensediments nach Lipidextraktion.

Lyophilisat	CAk n=11	ON n=6	KÖ n=2
mg/g			
Mittelwert der Knochensedimentmenge	326,2	433,3	586,5
Standardabweichung	±68,30	±155,3	-

Nach der Lipidextraktion aus Knochengewebe aller drei Gruppen, wurde das Knochensediment gefriergetrocknet und ausgewogen.

CA: Coxarthrose (gesund), ON: Nekrose, KÖ: Knochenmarks Ödem

Tabelle 8a: Prozentuale Fettsäureverteilung im Knochenmark von Coxarthrosepatienten=gesundes Kollektiv (CAk).

Fettsäuren in %	CAk n=11	
	Mittelwert in %	Minimum-Maximum in %
14:0 Myristinsäure	2,41	1,55-3,29
16:1-7 Palmitoleinsäure	4,70	2,90-8,51
16:0 Palmitinsäure	22,74	18,81-24,95
18:3-6 γ -Linolensäure	0,05	0,02-0,20
18:2-6 Linolsäure	12,34	7,19-15,61
18:1-9 Ölsäure	45,31	42,19-48,11
18:1-7 Vaccensäure	3,25	2,54-4,81
18:0 Stearinsäure	4,63	1,83-7,57
20:4-6 Arachidonsäure	0,49	0,30-0,76
20:5-3 Eicosapentaensäure	0,09	0,04-0,14
20:3-6 Eicosatriensäure	0,22	0,15-0,41
20:2-6 Eicosadiensäure	0,32	0,19-0,46
20:1-9 Eicosaensäure	0,75	0,57-1,15
20:3-3 Eicosatriensäure	0,06	0-0,11
20:0 Arachinsäure	0,12	0,05-0,27
22:6-3 Docosahexaensäure	0,34	0,21-0,79
22:4-6 Docosatetraensäure	0,25	0,18-0,36
22:5-3 Docosapentaensäure	0,33	0,25-0,50
22:2-6 Docosadiensäure	0,24	0,07-0,50
22:1-9 Erucinsäure	0,03	0-0,19

n=11, Angaben in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme

Tabelle 8b: Prozentuale Fettsäureverteilung im Knochenmark von Coxarthrosepatienten=gesundes Kollektiv (CAk), eingeteilt nach Untergruppen.

Fettsäuren	CAk n=11	
	Mittelwert in %	Minimum-Maximum in %
Eikosanoide	2,07	1,63-2,76
GFS	29,92	22,20-35,79
EUFS	54,63	49,90-61,90
MUFS	14,77	10,36-18,54

Fettsäureverteilung im Knochenmark von Coxarthroseproben, Folgende Untergruppen wurden addiert:

GFS: Gesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme. EUFS: Einfach ungesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme. MUFS: Mehrfachungesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme.

Tabelle 9a: Prozentuale Fettsäureverteilung in nekrotischem Knochenmark.

Fettsäuren in %	ON n=6	
	Mittelwert in %	Minimum-Maximum in %
14:0 Myristinsäure	1,50	1,03-2,76
16:1-7 Palmitoleinsäure	4,42	3,81-5,54
16:0 Palmitinsäure	22,85	20,37-27,21
18:3-6 γ -Linolensäure	0,03	0,01-0,05
18:2-6 Linolsäure	13,16	9,81-16,73
18:1-9 Ölsäure	46,02	42,51-47,76
18:1-7 Vaccensäure	3,26	2,31-3,84
18:0 Stearinsäure	3,88	2,92-5,69
20:4-6 Arachidonsäure	0,60	0,38-0,78
20:5-3 Eicosapentaensäure	0,1	0,06-0,13
20:3-6 Eicosatriensäure	0,27	0,17-0,38
20:2-6 Eicosadiensäure	0,38	0,28-0,47
20:1-9 Eicosaensäure	0,78	0,45-0,89
20:3-3 Eicosatriensäure	0,06	0-0,11
20:0 Arachinsäure	0,10	0,06-0,13
22:6-3 Docosahexaensäure	0,41	0,22-0,53
22:4-6 Docosatetraensäure	0,33	0,22-0,45
22:5-3 Docosapentaensäure	0,34	0,26-0,40
22:2-6 Docosadiensäure	0,21	0,06-0,30
22:1-9 Erucinsäure	0,02	0-0,04

n=6, Angaben in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme

Tabelle 9b: Prozentuale Fettsäureverteilung in nekrotischem Knochenmark, eingeteilt nach Untergruppen.

Fettsäuren	ON n=6	
	Mittelwert in %	Minimum-Maximum in %
Eikosanoide	2,22	1,80-2,69
GFS	28,45	24,56-34,13
EUFS	55,09	52,06-57,06
MUFS	15,84	13,31-19,70

Fettsäureverteilung im Knochenmark von Nekroseproben. Folgende Untergruppen wurden addiert:

GFS: Gesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme. EUFS: Einfach ungesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme. MUFS: Mehrfachungesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme.

Tabelle 10a: Prozentuale Fettsäureverteilung in ödematösem Knochenmark.

Fettsäuren in %	KÖ n=2	
	Mittelwert in %	Minimum-Maximum in %
14:0 Myristinsäure	2,33	1,83, 2,84
16:1-7 Palmitoleinsäure	5,45	4,72, 6,17
16:0 Palmitinsäure	19,90	18,69, 21,10
18:3-6 γ -Linolensäure	0,10	0,10
18:2-6 Linoleinsäure	13,31	13,10, 13,56
18:1-9 Ölsäure	44,50	44,36, 44,65
18:1-7 Vaccensäure	3,97	3,57, 4,36
18:0 Stearinsäure	5,12	4,65, 5,58
20:4-6 Arachidonsäure	0,91	0,70, 1,14
20:5-3 Eicosapentaensäure	0,15	0,10, 0,2
20:3-6 Eicosatriensäure	0,29	0,6, 0,31
20:2-6 Eicosadiensäure	0,38	0,27, 0,50
20:1-9 Eicosaensäure	0,78	0,67, 0,88
20:3-3 Eicosatriensäure	0,04	0, 0,08
20:0 Arachinsäure	0,24	0,21, 0,27
22:6-3 Docosahexaensäure	0,32	0,27, 0,38
22:4-6 Docosatetraensäure	0,25	0,34
22:5-3 Docosapentaensäure	0,33	0,30, 0,37
22:2-6 Docosadiensäure	0,27	0,22, 0,31
22:1-9 Erucinsäure	0,06	0,02, 0,11

n=2, Angaben in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme.

Tabelle 10b: Prozentuale Fettsäureverteilung in ödematösem Knochenmark, eingeteilt nach Untergruppen.

Fettsäuren	KÖ n=2	
	Mittelwert in %	Minimum-Maximum in %
Eikosanoide	2,81	2,79, 2,83
GFS	27,60	26,33, 28,87
EUFS	55,25	53,86, 56,65
MUFS	16,48	16,41, 16,65

Fettsäureverteilung im Knochenmark von Ödemproben. Folgende Untergruppen wurden addiert:

GFS: Gesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme. EUFS: Einfach ungesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme. MUFS: Mehrfachungesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme.

Tabelle 11a: Vergleich der Fettsäureverteilung in Coxarthroseproben=gesunde Kontrolle, nekrotischem Knochen, und ödematösem Mark.

Fettsäuren	CAk	ON	KÖ
	Mittelwert in %	Mittelwert in %	Minimum- Maximum in %
	n=11	n=5	n=2
14:0 Myristinsäure	2,41	1,50	1,83, 2,84
16:1-7 Palmitoleinsäure	4,70	4,42	4,72, 6,17
16:0 Palmitinsäure	22,74	22,85	18,69, 21,10
18:3-6 γ -Linolensäure	0,05	0,03	0,10
18:2-6 Linolsäure	12,34	13,16	13,10, 13,56
18:1-9 Ölsäure	45,31	46,02	44,36, 44,65
18:1-7 Vaccensäure	3,25	3,26	3,57, 4,36
18:0 Stearinsäure	4,63	3,88	4,65, 5,58
20:4-6 Arachidonsäure	0,49	0,60	0,70, 1,14
20:5-3 Eicosapentaensäure	0,09	0,1	0,10, 0,2
20:3-6 Eicosatriensäure	0,22	0,27	0,6, 0,31
20:2-6 Eicosadiensäure	0,32	0,38	0,27, 0,50
20:1-9 Eicosaensäure	0,75	0,78	0,67, 0,88
20:3-3 Eicosatriensäure	0,06	0,06	0, 0,08
20:0 Arachinsäure	0,12	0,10	0,21, 0,27
22:6-3 Docosahexaensäure	0,34	0,41	0,27, 0,38
22:4-6 Docosatetraensäure	0,25	0,33	0,34
22:5-3 Docosapentaensäure	0,33	0,34	0,30, 0,37
22:2-6 Docosadiensäure	0,24	0,21	0,22, 0,31
22:1-9 Erucinsäure	0,03	0,02	0,02, 0,11

Vergleich der Fettsäureverteilung der drei Kollektive auf statistisch relevante Abweichungen.

Die Abweichungen wurden unterlegt und betreffen die 20:4-6 Arachidonsäure und 22:4-6 Docosatetraensäure. Dargestellt in der prozentuale Anteil der Fettsäuren an ihrer Gesamtsumme.

Tabelle 11b: Vergleich der Fettsäureverteilung in Coxarthroseproben=gesundes Mark, nekrotischem Knochen, und ödematösem Mark, eingeteilt nach Untergruppen.

Fettsäuren	CAk	ON	KÖ
	Mittelwert in %	Mittelwert in %	Minimum- Maximum in %
	n=11	n=6	n=2
Eikosanoide	2,07	2,22	2,79, 2,83
GFS	29,92	28,45	26,33, 28,87
EUFS	54,63	55,09	53,86, 56,65
MUFS	15,44	16,44	16,41 16,65

Fettsäureverteilung im Knochenmark von Ödemproben. Folgende Untergruppen wurden addiert:

GFS: Gesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme. EUFS: Einfach ungesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme. MUFS: Mehrfachungesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme.

Tabelle 12: Vergleich der Fettsäuregesamtmenge im gesundes Kollektiv, nekrotischem Material, und ödematösem Mark.

	CAk	ON	KÖ
	Mittelwert in mg/g	Mittelwert in mg/g	Mittelwert in mg/g
	n=11	n=6	n=2
Fettsäuren gesamt	278	299	52,5

Tabelle 13a: Anteil der Linolensäure an der Summe der Gesamtfettsäuren in % im Knochenlipid.

Fettsäure			
	CAk	ON	KÖ
	Mittelwert In %	Mittelwert In %	Mittelwert In %
	n=11	n=6	n=2
Linolensäure	12,34	13,16	13,33

Tabelle 13b: Anteil der einzelnen Eikosoide an der Summe der Eikosoide in %.

Fettsäure			
	CAk	ON	KÖ
	Mittelwert In %	Mittelwert In %	Mittelwert In %
	n=11	n=6	n=2
20:4 n-6	24,05	27,20	32,59
20:5 n-3	4,27	4,20	5,44
20:3 n-6	10,97	11,78	10,27
20:2 n-6	15,39	16,33	13,81
20:1 n-9	36,35	33,31	27,70
20:3 n-3	2,8	2,54	1,4
20:0	6,0	4,61	8,70

Tabelle 14: Dünnschichtchromatographisch dargestellte Triglyceridmenge im Knochenmark.

Triglycerid	CAk n=11	ON n=6	KÖ n=2
Mittelwert des Triglyceridanteils am Knochengewebe mg/g	253,1	290	50,5
Minimum- Maximum mg/g	156-395	161-396	45, 56
Standardabweichung mg/g	±89	±98	-

Die absoluten Grammangaben wurden über die Auswertung der dünn-schichtchromatographischen Darstellung erhalten.

Tabelle 15: Menge des enzymatisch bestimmten Triglycerids im Knochenmark in mg/g Knochenausgangsgewebe.

Triglycerid			
	CAk	ON	KÖ
mg/g	n=11	n=6	n=2
Mittelwert	336	283	46
Minimum- Maximum	81-584	141-461	45, 47
Standardabweichung	±142	±137	-

Enzymatisch gemessenes Triglycerid aus Knochenlipid.

Tabelle 16: Menge des enzymatisch bestimmten Cholesterins im Knochenmark in mg/g Knochenausgangsgewebe.

Cholesterin			
	CAk	ON	KÖ
mg/g	n=11	n=6	n=2
Mittelwert	1,22	1,37	0,94
Minimum- Maximum	0,9-2,0	1,0-1,8	0,69-1,2
Standardabweichung	±0,4	±0,32	-

Fluorometrisch gemessenes Cholesterin aus Knochenlipid.

Tabelle 17: Menge des Gesamtcholesterins im Knochenmark in mg/g Knochenausgangsgewebe.

Cholesterin			
	CAk	ON	KÖ
mg/g	n=11	n=6	n=2
Mittelwert	1,16	1,53	0,57
Minimum- Maximum	0,7-1,8	0,89-2,3	0,50, 0,64
Standardabweichung	±0,368	±0,70	-

Über die Gas-Chromatographie gemessenes Cholesterin aus Knochenlipid.

Tabelle 18: Plasmalipidwerte der Patienten XV und XVIII mit Hypercholesterinämie.

Plasmalipid		Patienten	
	Normwerte	XV	XVIII
Triglyceride	<150 mg/dl	104	184
Gesamt Cholesterin	<220 mg/dl	230	228
LDL	<150 mg/dl	177	155
HDL	>40 mg/dl	32	36
VLDL	<30 mg/dl	21	37
LDL/HDL-Index*	< 4 mg/dl	5,5	4,3

Vergleich erhöhter Plasmalipidwerte und deren möglicher Nachweis im Knochenlipid. Plasmalipidauswertung von Pat. XV mit CA und Pat. XVIII mit ON, beiden leiden an Hypercholesterinämie, Cholesterinwerte sind unterlegt.

Tabelle 19: Cholesterin im Knochenmark, erhalten über die Gas-Chromatographie, verglichen mit den LDL-, HDL-, und Gesamtcholesterinspiegel sowie dem LDL/HDL-Index. Im Plasma.

	Normwerte	Patienten				
		XIV	XV	XVII	XVIII	XIX
Gesamt Cholesterin mg/g im Knochenmark	n.n.	1	1,2	1,4	1,4	1,8
LDL im Plasma	<150 mg/dl	113	177	112	153	122
HDL im Plasma	>40 mg/dl	40	32	35	36	41
Gesamtcholesterin im Plasma	<220 mg/dl	172	230	187	226	188
LDL/HDL-Index im Plasma	< 4 mg/dl	2,8	5,5	3,2	4,3	2,9

Vergleich von Knochenlipidwerten und deren Nachweis im Plasmalipid.

Pat. XIV mit CA, Pat. XV mit CA, Pat. XVII mit CA, Pat. XVIII mit ON, Pat. XIX mit ON.

**Tabelle 20: Plasmalipidwerte von Patient XVII.
Gekennzeichnet ist der erhöhte TG-Wert.**

Plasmalipid	Normwerte	Patienten
		XVII
Triglyceride	<150 mg/dl	198
Gesamt Cholesterin	<220 mg/dl	187
LDL	<150 mg/dl	112
HDL	>40 mg/dl	35
VLDL	<30 mg/dl	39,6
LDL/HDL-Index*	< 4 mg/dl	3,2

Vergleich erhöhter Plasmalipidwerte und deren Nachweis im Knochenlipid.

Plasmalipidauswertung eines Pat. mit Hypertriglyceridämie und CA.

Tabelle 21a: Vergleich der Fettsäureverteilung zwischen Plasma- und Knochenlipid desselben Patienten.

Fettsäuren In % an der Gesamtfettsäuresumme	Patienten					
	XIV		XV		XVII	
	Plasma	Knochen	Plasma	Knochen	Plasma	Knochen
14:0 Myristinsäure	1,27	2,75	1,00	2,84	0,87	2,53
16:1-7 Palmitoleinsäure	2,15	3,25	2,97	4,15	2,44	2,89
16:0 Palmitinsäure	21,69	23,26	22,22	23,30	21,99	24,62
18:3-6 γ -Linolensäure	0,40	2,25	0,36	0,20	0,24	0,04
18:2-6 Linolsäure	28,97	12,85	27,95	9,93	26,53	12,37
18:1-9 Ölsäure	22,64	42,03	23,05	44,46	27,07	42,91
18:1-7 Vaccensäure	1,82	2,76	2,34	3,25	0,71	3,09
18:0 Stearinsäure	7,49	7,25	6,21	5,08	7,04	6,80
20:4-6 Arachidonsäure	6,48	0,43	5,59	0,57	6,39	0,41
20:5-3 Eicosapentaensäure	1,42	0,09	1,50	0,14	0,82	0,05
20:3-6 Eicosatriensäure	1,68	0,25	1,70	0,27	1,70	0,20
20:2-6 Eicosadiensäure	0,23	0,36	0,20	0,24	0,22	0,25
20:1-9 Eicosaensäure	0,31	1,12	0,20	0,89	0,23	0,67
20:3-3 Eicosatriensäure	0,03	0	0,01	0,11	0,02	0,04
20:0 Arachinsäure	0,08	0,25	0,05	0,14	0,04	0,11
22:6-3 Docosahexaensäure	2,07	0,39	3,30	0,78	2,58	0,29
22:4-6 Docosatetraensäure	0,22	0,20	0,15	0,25	0,19	0,22
22:5-3 Docosapentaensäure	0,56	0,34	0,62	0,49	0,47	0,26
22:2-6 Docosadiensäure	0,05	0,49	0,02	0,32	0,04	0,30
22:1-9 Erucinsäure	0,01	0,05	0,00	0,02	0,00	0,19

Auffällige Werte sind unterlegt.

Tabelle 21a: Vergleich der Fettsäureverteilung zwischen Plasma und Knochenmark desselben Patienten (Fortsetzung).

Fettsäuren In % an der Gesamtfettsäuresumme	Patienten			
	XVIII		XiX	
	Plasma	Knochen	Plasma	Knochen
14:0 Myristinsäure	2,16	2,62	1,07	1,18
16:1-7 Palmitoleinsäure	2,48	6,29	1,91	4,52
16:0 Pylmitinsäure	24,30	21,17	19,52	24,13
18:3-6 γ -Linolensäure	0,56	0,04	0,70	0,05
18:2-6 Linolsäure	26,03	14,46	30,51	14,41
18:1-9 Ölsäure	22,43	43,10	23,82	47,76
18:1-7 Vaccensäure	4,31	3,44	1,97	3,26
18:0 Stearinsäure	7,57	3,31	6,38	2,92
20:4-6 Arachidonsäure	4,94	0,90	8,09	0,78
20:5-3 Eicosapentaensäure	0,59	0,12	0,92	0,12
20:3-6 Eicosatriensäure	1,64	0,47	1,78	0,34
20:2-6 Eicosadiensäure	2,21	0,47	0,24	0,41
20:1-9 Eicosaensäure	0,21	0,88	0,20	0,87
20:3-3 Eicosatriensäure	0,05	0,00	0,02	0,08
20:0 Arachinsäure	0,10	0,13	0,06	0,07
22:6-3 Docosahexaensäure	1,55	0,50	1,50	0,53
22:4-6 Docosatetraensäure	0,23	0,35	0,15	0,37
22:5-3 Docosapentaensäure	0,39	0,40	0,77	0,36
22:2-6 Docosadiensäure	0,03	0,06	0,03	0,26
22:1-9 Erucinsäure	0,00	0,04	0,01	0,00

Auffällig hohe oder niedrige Werte sind unterlegt.
Für die Patientencharakterisierung siehe Legende im Methodenteil.

Tabelle 21b: Vergleich der Fettsäureverteilung zwischen Plasma und Knochenlipid desselben Patienten, eingeteilt nach Untergruppen.

Fettsäuren In %	Patienten					
	XIV		XV		XVII	
	Plasma	Knochen	Plasma	Knochen	Plasma	Knochen
Eikosanoide	10,23	2,53	9,19	2,41	9,47	1,77
GFS	30,41	33,64	29,39	31,73	29,78	34,20
EUFS	27,15	49,88	28,81	54,01	30,76	50,53
MUFS	42,02	15,76	41,28	13,52	38,96	14,55

Tabelle 21b: Vergleich der Fettsäureverteilung zwischen Plasma und Knochenmark desselben Patienten, eingeteilt nach Untergruppen (Fortsetzung).

Fettsäuren In %	Patienten			
	XVIII		XIX	
	Plasma	Knochen	Plasma	Knochen
Eikosanoide	7,78	2,90	11,2	2,67
GFS	33,95	27,24	26,84	24,56
EUFS	29,68	54,21	28,12	57,27
MUFS	36,06	17,70	44,62	17,73

Für die Patientencharakterisierung siehe Legende im Methodenteil.

Folgende Untergruppen wurden addiert:

GFS: Gesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme.

EUFS: Einfach ungesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme.

MUFS: Mehrfachungesättigte Fettsäuren gesamt in % der Fettsäuren an der Gesamtsumme.

Tabelle 21c: Vergleich der Fettsäuregesamtsumme zwischen Plasma und Knochenlipid desselben Patienten.

Fettsäuregesamtsumme im Knochenlipid	Patienten					
	XIV		XV		XVII	
	Plasma	Knochen	Plasma	Knochen	Plasma	Knochen
Fettsäuren gesamt in mg/g Knochengewebe	199	300	221	124	259	323

Tabelle 21c: Vergleich der Fettsäuregesamtsumme zwischen Plasma und Knochenlipid desselben Patienten (Fortsetzung).

Fettsäuregesamtsumme im Knochenlipid	Patienten			
	XVIII		XIX	
	Plasma	Knochen	Plasma	Knochen
Fettsäuren gesamt in mg/g Knochengewebe	287	57	216	190

Für die Patientencharakterisierung siehe Legende im Methodenteil.

Tabelle 22: Signifikante Steigerung oder Senkung einzelner Plasmafettsäuren von Patienten mit Knochenpathologien im Vergleich zu den Plasmafettsäuren einer gesunden Gruppe.

Fettsäureverteilung	CA	N	Ö	GK
Ölsäure (18:1(n-9))	↑	↑	↑	↔
Eicosaensäure (20:1(n-9))	↑	↑	↑	↔
Eicosatriensäure (20:3(n-6))	↓	↓	↓	↔
Docosatetraensäure (22:4(n-6))	↓	↔	↔	↔

8. Abkürzungen

AA	Arachidonsäure
AR	Amplex red
BFR	BoneFormationRate
BHT	Butylhydroxytoluol
BMP-2	Bone Morphogenetic Protein 2
BSTFA	bis(-Trimethylsilyl)trifluoroacetamid
°C	Grad Celsius
CA	Coxarthrose, Patientenkollektiv
Cak	Coxarthrose, Kontrollkollektiv
CLB	Zelllysispuffer
COX	Cyclooxygenase
cPLA ₂	cPhospholipase ₂
CRP	C-reaktives Protein
DC	Dünnschicht-Chromatographie
DHA	Docosahexaensäure
DMFA	NIN-Dimethylformamid
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EUFS	einfach ungesättigte Fettsäuren
EPA	Eicosapentaensäure
Fa.	Firma
FS	Fettsäuren
FS ges.	Fettsäuren gesamt
GC	Gas-Chromatographie
GFS	Gesättigte Fettsäuren
GK	Gesunde Kontrolle
h	Stunde
HDL	High Density Lipoproteins
HMG-CoA	Hydroxy-Methyl-Glutaryl-Coenzym-A
HPLC	High-Liquid-Pressure-Chromatography
HRP	horseradish peroxidase
IL	Interleukin
IGF-1	Insulin-like-growth-Factor 1
KÖ	Knochenmarksödemsyndrom, Patientenkollektiv
LDL	Low Density Lipoproteins
Lp(a)	Lipoprotein (a)
LPL	Lipoproteinlipase
MUFS	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren
Min.-Max.	Minimalwert und Maximalwert
MR(T)	Magnet Resonance (Therapie)

n	Stichprobengrösse
n-3-Fettsäuren	FS mit 1. Doppelbindung der Δ^3 -Position
n-6-Fettsäuren	FS mit 1. Doppelbindung in der Δ^6 -Position
ON	Osteonekrose, Patientenkollektiv
OP	Operation
p.a.	per analysis
PBS	Phosphate Buffered Saline
PG	Prostaglandin
PG(E)	Prostaglandin E
PGI	Prostacyclin
PN	Precinorm
PP	Precipath
RANK	Rezeptor Aktivatoren des nuklearen Faktor-kappaB
RANKL	Rezeptor Aktivatoren des nuklearen Faktor-kappaB Liganden
RT	Raumtemperatur
s.c.	subkutan
sec.	Sekunde
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
STH	Somatotrophes Hormon
TG	Triglycerid
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
TX	Triton X-100
UPM	Umdrehungen per Minute
VLDL	Very Low Density Lipoproteins
v/v	Volume per Volume
w/v	Weight per Volume

9. Literaturverzeichnis

Alam S, Kokkinos PP, Alam BS (1993) Fatty acid Composition and Arachidonic Concentrations in Alveolar Bone of Rats Fed Diets with different Lipids. *Calcif Tissue Int* 53:330-332.

Andersson A, Nälsen C, Tengblad S, Vessby B (2002) Fatty acid composition of skeletal muscle reflects dietary fat composition in humans. *Am J Clin Nutr* 76:1222-1229.

Antueno R, Knickle L, Smith H, Elliot M, Allen S, Nwaka S, Winther M (2001) Activity of human delta-5 and delta-6 desaturases on multiple n-3 and n-6 polyunsaturated fatty acids. *FEBS Letters* 509 (4):77-80.

Arikawa T, Omura K, Morita I (2004) Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 200(3):400-6.

Askari B, Carrol MA, Capparelli M, Kramer F, Gerrity RG, Bornfeldt KE (2002) Oleate and Linoleate enhance the growth-promoting effects of insulin-like growth factor-I through a phospholipase D-dependent pathway in arterial smooth muscle cells. *J Biol Chem* 277(39):36338-44.

Aspden RM, Scheven BAA, Hutchison JD (2001) Osteoarthritis as a systemic disorder including stromal cell differentiation and lipid metabolism. *The Lancet* 357:1118-1120.

Atkinson TG, Barker HJ, Meckling-Gill KA (1997) Incorporation of long-chain n-3 fatty acids in tissues and enhanced bone marrow cellularity with docosahexaenic acid feeding in post-weanling Fisher 344 rats *Lipids*. 32:293-302.

Atteh JO, Leeson S (1983) Effects of dietary fatty acids and calcium levels on performance and mineral metabolism of broiler chickens. *Poult Sci* 62 (12):2412-9.

Berger CE, Kluger R, Urban M, Kowalski J, Haas OA, Engel A (2000) Elevated levels of Lp (a) in familial bone marrow edema syndrome of the hip. *Clin Orthop Rel Res* 377:126-131.

Beresford JN, Bennetti JH, Devlin C, Leboy PS, Owen ME (1992) Evidence for an inverse relationship between the differentiation of adipocytic and osteogenic cells in rat marrow stromal cell cultures *J Cell Science* 102:341-351.

Bligh EG, Dyer WJ (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37:911-7.

Bolton-Smith C, Woodward M, Tavendale R (1997) Evidence for age-related differences in fatty acid composition of human adipose tissue, independent of diet. *Eur J Clin Nutr* 51:619-624.

Bordin L, Priante G, Musacchio E, Giunco S, Tibaldi E, Clari G, Baggio B (2003) Arachidonic acid-induced IL-6 expression is mediated by PKC alpha activation in osteoblastic cells. *Biochemistry*. 42(15):4485-91.

Boskey AL, Raggio CL, Bullough PG, Kinnett JG (1982) Changes in the bone tissue lipids in persons with steroid- and alcohol-induced osteonecrosis. *Clin Orthop* 172:289-295.

Boudreau MD, Chanmugam PS, Hart SB, Lee SH, Hwang DH (1991) Lack of dose response by dietary n-3 fatty acids at a constant ratio of n-3 to n-6 fatty acids in suppressing eicosanoid biosynthesis from arachidonic acid. *Am J Clin Nutr* 54:111-117.

Brekke OL, Sagen E, Bjerve KS (1997) TNF induced release of endogenous fatty acids analyzed by a high sensitive high-performance liquid chromatography method. *J Lipid Res* 38:1913-1922.

Burkhardt R, Kettner G, Bohm W, Schmidmeier M, Schlag R, Frisch B, Mallmann B, Eisenmenger W, Gilg TH (1987) Changes in trabecular bone, hematopoiesis and bone marrow vessels in aplastic anaemia, primary osteoporosis and old age: a comparative histomorphometric study. *Bone* 8:157-164.

Carbone LD, Tylavsky FA, Cauley JA, Harris TB, Lang TF, Bauer DC, Barrow KD, Kritchevsky SB (2003) Association between bone mineral density and the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and aspirin: impact of cyclooxygenase selectivity. *J Bone Miner Res*. 18:1795-802.

Carluccio M, Massaro M, Bonfrate C, Siculella L, Maffia M, Nicolardi G, Distante A, Storelli C, De Caterina R (1999) Oleic acid inhibits endothelial activation. *Art Throm Vasc Biol* 19:220-228.

Colwell CW, Robinson CA, Steveson DD, Vint VC, Morris BA (1996) Osteonecrosis of the femoral head in patients with inflammatory arthritis or asthma receiving corticosteroid therapy. *Orthopedics* 19:941-946.

Coates PT, Tie M, Russ GR, Matew TH (2002) Transient bone marrow edema in renal transplantation: a distinct post-transplantation syndrome with a characteristic MRI appearance. *Am J Transplant* 2(5):467-70.

Cui Q, Wang GJ, Balian G (2000) Pluripotential marrow cells produce adipocytes when transplanted into steroid-treated mice. *Connect Tissue Res* 41:45-56.

- Delmas DD**, Tracy R, Riggs B, Mann K (1984) Identification of the non collagenous proteins of bovine bone by two-dimensional gel electrophoresis. *Calcif Tissue Int* 36:308-316.
- Diascro DD**, Vogel RL, Johnson TE, Witherup KM, Pitzenberger SM, Rutledge SJ, Precott DJ, Rodan GA, Schmidt A (1998) High fatty acid content in rabbit serum is responsible for the differentiation of osteoblasts into adipocyte-like cells. *J Bone Min Res* 13(1):96-106.
- Dodds RA**, Growen M, Bradbeer JN (1994) Microcytophotometric analysis of human osteoclast metabolism: lack of activity in certain oxidative pathways indicates inability to sustain biosynthesis during resorption. *J Histochem Cytochem* 42:599-606.
- Doglio A**, Dani C, Fredrickson G, Ailhaud G (1987) Acute regulation of IGF-1 gene expression by growth hormone during adipose cell differentiation. *Eur Mol Biol Organ J* 6:4011-4016.
- Dougherty RM**, Galli C, Fero-Luzzi A, Iacono JM (1987) Lipid and phospholipid fatty acid composition of plasma, red blood cells, and platelets and how they are affected by dietary lipids: a study of normal subjects from Italy, Finland, and the USA. *Am J Clin Nutr* 45:443-455.
- Duffin KL**, Obukowicz MG, Salsgiver WJ, Welsch DJ, Shieh C, Raz Needleman P (2001) Lipid remodeling in mouse liver and plasma resulting from delta-6 fatty acid desaturase inhibition. *Lipids* 36(11):1203-8.
- Duplus E**, Glorian M, Forest C (2000) Fatty acid regulation of gene transcription. *J Biol Chem* 275:30749-52.
- Eckardstein**, von A, Nofer J-R, Assmann G (2001) High Density Lipoproteins and Arteriosklerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 21:13 – 27.
- Emken EA**, Adlof RO, Rakoff H, Rohwedder WK, Gulley RM (1990) Metabolism in vivo of deuterium-labelled linolenic and linoleic acids in humans. *Biochem Soc Trans* 18:766-769.
- Felson DT**, Couropmitree NN, Chaisson CE (1998) Evidence for a Mendelian gene in a segregation analysis of generalized radiographic osteoarthritis: the Framingham Study. *Arthritis Rheum* 41:1064-71.
- Ferrans VJ**, Buja LM, Roberts WC, Fredrickson DS (1971) The spleen in type I hyperlipoproteinemia: histochemical, biochemical, microfluorometric and electronic microscopic observations *Am J Pathol* 64:67-69.
- Ficat RP**, (1985) Idiopathic bone necrosis of the femoral head. Early diagnosis and treatment. *J Bone Joint Surg Br.* 67(1):3-9.

Folch J, Ascoli I, Lees M, Meath JA, Le Baron FN (1951) Preparation of lipide extracts from brain tissue. *J Biol Chem* 191, 833-41.

Folch J, Lees M., Stanley GHS (1956) A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* 226, 497-500.

Fujioka M, Kubo T, Nakamura F, Shibatani M, Ueshima K, Hamaguchi H (2001) Initial changes of non-traumatic osteonecrosis of femoral head in fat suppression images: bone marrow edema was not found before the appearance of band patterns. *Magn Reson Imaging*, 19:985-991.

Gadsboll N, Hoilund-Carlsen PF, Widding A (1985) C-reactive proteins in femoral head necrosis. *J Trauma* 25(6):511-515.

Gangji V, Hauzeur JP, Schoutens A, Hinsenkamp M, Appelboom T, Egrise D (2003) Abnormalities in the replicative capacity of osteoblastic cells in the proximal femur of patients with osteonecrosis of the femoral head. *J Rheumatol* 30(2):348-51.

Garulet M, Perez-Llomas F, Perez-Ayala M, Martinez P (2001) Site-specific differences in the fatty acid composition of abdominal adipose tissue in an obese population from a Mediterranean area: Relation with dietary fatty acids, plasma lipid profile, serum insulin, and central obesity. *Am J Clin Nutr* 74(5):585-591.

Garland M, Sacks FM, Colditz GA (1998) The relation between dietary intake and adipose tissue composition of selected fatty acids in US women. *Am J Clin Nutr* 67:25-30.

Gerstenfeld LC, Einhorn TA (2004) COX inhibitors and their effects on bone healing. *Expert Opin Drug Saf* 3(2):131-136.

Gimble JM (1990) The function of adipocytes in the bone marrow stroma. *New Biol* 2:304-312.

Gimble JM, Youkhana K, Hua X, Bass H, Medina K, Sullivan M, Greenberger J, Wang CS (1992) Adipogenesis in a myeloid supporting bone marrow stromal cell line. *J Cell Biochem* 50:73-82.

Gimble JM, Robinson CE, Wu X, Kelly KA (1996) The function of adipocytes in the bone marrow stroma: an update. *Bone* 19:421-428.

Glimcher MJ, Kenzora JE (1978) The biology of osteonecrosis of the human femoral head and its clinical implications. *Clin Orthop* 130:47-50.

-
- Gravholt** CH, Dall R, Christiansen JS, Moller N, Schmitz O (2002) Preferential stimulation of abdominal subcutaneous lipolysis after prednisolone exposure in humans. *Obes Res.* 10(8):774-781.
- Gunnes** M, Lehmann EH (1995) Dietary calcium, saturated fat, fiber and vitamin C as predictors of forearm cortical and trabecular bone mineral density in healthy children and adolescents. *Acta Paediatr* 84:388-392.
- Hamilton** L, Mitchell J, Tomlinson A, Warner T (1999) Synergy between COX2 induction and arachidonic acid supply in vivo: consequences for nonsteroidal antiinflammatory drugs. *FASEB J.* 13:245-251.
- Hartroft** WS, Ridout JH (1951) Pathogenesis of cirrhosis produced by choline deficiency. Escape of lipid from fatty hepatic cysts biliary and vascular system. *Am J Pathol* 27:951.
- Hayes** CW, Conway WF, Daniel WW (1993) MR imaging of bone marrow edema pattern: transient osteoporosis, transient bone marrow edema syndrome, or osteonecrosis. *Radiographics* 13:1001-1011.
- Hilal** G, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, Lajeunesse D (1998) Osteoblast-like cells from human subchondral osteoarthritic bone demonstrate an altered phenotype in vitro: possible role in subchondral bone sclerosis. *Arthritis Rheum* 41:891-899.
- Hofmann** S, Plenck H, Engel A (1991) Transient osteoporosis versus bone marrow edema of the hip: Correlation of histomorphology and magnetic resonance imaging. *Calcif Tissue Int* 48 (suppl):282-304.
- Hofmann** S, Engel A, Neuhold A, Leder K, Kramer J, Plenck H (1993) Bone-Marrow Oedema Syndrome and Transient Osteoporosis of the Hip. *J Bone Joint Surg* 75(2):210-216.
- Hughes** H, Smith CV, Tsokos-Kuhn JO, Mitchell JR (1986) Quantitation of lipid peroxidation products by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Biochem* 152(1):107-12.
- Hulman** G (1988) Pathogenesis of non-traumatic fat embolism. *Lancet* 8599:1366-7.
- Hussain** MM, Mahley RW, Boyles JK, Fainaru M, Brecht WJ, Lindquist PA (1989) Chylomicron-Chylomicron remnant clearance by liver and bone marrow in rabbits. *J Biol Chem* 264(16):9571-9582.

Hussein MM, Mahley RW, Boyles JK, Lindquist PA, Brecht WJ, Innerarity T (1989) Chylomicron Metabolism: chylomicron uptake by bone marrow in different animal species. J Biol Chem 264:17931-17938.

Iida S, Harada Y, Shimizu K, Sakamoto M, Ikenoue S, Akita T, Kitahara H, Moriya H (2000) correlation between bone marrow edema and collapse of the femoral head in steroid-induced osteonecrosis. AJR 174:735-743.

Iwami-Morimoto Y, Yamaguchi K, Tanne K (1999) Influence of dietary n-3 polyunsaturated fatty acid on experimental tooth movement in rats. Angle Orthod 69:365-371.

Jacobs B (1978) Epidemiology of traumatic and nontraumatic osteonecrosis. Clin Orthop 130:51-67.

Jaffe WL, Epstein M, Heymann N, Mankin HJ (1972) The effect of cortisone on femoral and humeral heads in rabbits. Clin Orthop 82:221-228.

Jensen R, Ferris A, Lammi-Keefe C (1992) Lipids in human milk and infant formulas. Ann Rev Nutr 12:417-41.

Jones JP, Sakovich I (1966) Fat embolism in bone: A roentgenographic and histological investigation with use of intraarterial Lipiodol in rabbits. J Bone Joint Surg 48:149-64.

Jones JP (1993) Fat embolism, intravascular coagulation, and osteonecrosis. Clin Orthop 292:294-308.

Judex S, Wohl G, Wolff R, Leng W, Gillis A, Zernicke R (2000) Dietary fish oil supplementation adversely affects cortical bone morphology and biomechanics in growing rabbits. Calcif Tissue Int 66:443-448.

Kagawa M, Matsubara K, Kimura K, Shiono H, Fukui Y (1996) Species identification by the positional analysis of fatty acid composition in triacylglyceride of adipose and bone tissues. Forensic Sci Int 79:215-226.

Kalu DN, Hardin RR, Cockerham R, Yu BP, Norling BK, Egan JW (1984) Lifelong food restriction prevents senile osteopenia and hyperparathyroidism in F344 rats. Mech Ageing Dev 26:103-112.

Kamp F, Wen G, Souto R, Pilch PF, Corkey BE, Hamilton JA (2003) Rapid flip-flop of oleic acid across the plasma membrane of adipocytes. J Biol Chem 278(10):7988-7995.

Kawai K, Maruno H, Watanabe Y, Hirohata K (1980) Fat necrosis of osteocytes as a causative factor in idiopathic osteonecrosis in heritable hyperlipemic rabbits. *Clin Orthop* 153:273-282.

Kenzora JE, Glimcher MJ (1985) Accumulative cell stress: The multifactorial etiology of idiopathic osteonecrosis. *Orthop Clin North Am* 16:669-679.

Klein DC, Raisz LG (1970) Prostaglandins: Stimulators of bone resorption in tissue culture. *Endocrinology* 86:1436-1440.

Kokkinos PP, Shaye R, Alam BS, Alam SQ (1993) Dietary lipids, prostaglandin E2 levels, and tooth movement in alveolar bone of rats. *Calcif Tissue Int* 53:333-337.

Koo KH, Ahn IO, Song HR, Kim SY, Jones Jr. JP (2002) Increased perfusion of the femoral head in transient bone marrow edema syndrome. *Clin Orthop* 402:171-5.

Kris-Etherton PM, Taylor DS, Yu-Poth P, Moriarty K, Fishell V, Hargrove RL, Zhao G, Etherton TD (2000) PUFAs in the food chain in the US. *Am J Clin Nutr* 71:179S-188S.

Kruger MC, Coetzer H, de Winter R, Gericke G, van Papendorp DH (1998) Calcium, gamma-linolenic acid and eicopentaenoic acid supplementation in senile osteoporosis. *Aging* 10:385-394.

Kuehl FA, Egan RW (1980) Prostaglandins, arachidonic acid, and inflammation. *Science* 210:978-989.

Landmann J, Renner N, Gachter A, Thiel G, Harder F (1987) Cyclosporin A and osteonecrosis of the femoral head. *Ann Surg* 175:282-289.

Lands W, (1992) Biochemistry and physiology of n-3 fatty acids. *FASEB J* 6:2530-2536.

Lanyon P, Muir K, Doherty S, Doherty M (2000) Assessment of a genetic contribution to osteoarthritis of the hip: sibling study. *BMJ* 321:479-83.

Lapage G, Roy CC (1986) Direct transesterification of all classes of lipids in a one-step reaction. *J Lipid Res* 27:114-120.

Lavernia CJ, Sierra RJ, Grieco FR (1999) Osteonecrosis of the Femoral Head, *J Am Acad Orthop Surg* 7:250-261.

- Lawrence RC**, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, Heyse SP, Hirsch SP, Hochberg MC et al. (1998) Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the U.S. *Arthritis Rheum* 41:778-799.
- Lee JK**, Yao L (1988) Stress fracture: MR imaging. *Radiology* 169:217-220.
- Li Y**, Watkins BA (1998) Conjugated linoleic acids alter bone fatty acid composition and reduce ex vivo PGE₂ biosynthesis in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids. *Lipids* 33:417-425.
- Li Y**, Seifert MF, Ney DM, Grahn M, Grant AL, Allen KG, Watkins BA (1999) Dietary conjugated linoleic acids alter serum IGF-1 and IGF binding protein concentrations and reduce bone formation in rats fed (n-6) or (n-3) fatty acids. *J Bone Miner Res* 14:1153-1162.
- Lima TM**, Kanunfre CC, Pomeia C, Verlengia R, Curi R (2002) Ranking the toxicity of fatty acids on Jurkat and Raji cells by flow cytometric analysis. *Tox in vitro* 6:741-747.
- Lippiello L** (1990) Lipid and cell metabolic changes associated with essential fatty acids enrichment or articular chondrocytes. *Proc Soc Exp Biol Med* 195:282-287.
- Lippiello L**, Walsh T, Fienhold M (1991) The association of lipid abnormalities with tissue pathology in human osteoarthritic articular cartilage. *Metabolism* 40:571-576.
- Liu XH**, Kirschenbaum A, Yao S, Levine AC (2005) Cross-talk between the interleukin-6 and prostaglandin E(2) signaling systems results in enhancement of osteoclastogenesis through effects on the osteoprotegerin/receptor activator of nuclear factor- κ B (RANK) ligand/RANK system. *Endocrinology* 146(4):1991-8.
- Lund PK**, Abadi DM, Mathies JC (1962) Lipid composition of normal human bone marrow as determined by column chromatography. *J Lipid Research* 3(1):95-97.
- Malik F**, Gordon Y, Goldmann JM (1984) Comparisons of the composition of fat cells obtained from the marrow of normal individuals or of subjects with aplastic anemia and from bone marrow cultures. *Exp Hematology* 12:191-197.
- Manninen P**, Riihimaki H, Heliovara M, Makela P (1996) Overweight, gender and knee osteoarthritis. *Int J Obesity* 20:595-597.
- Mansell JP**, Bailey AJ (1998) Abnormal cancellous bone collagen metabolism in osteoarthritis. *J Clin Invest* 101:1596-1603.
- Marks SC**, Miller SC (1993) Prostaglandins and the skeleton: the legacy and challenges of two decades of research. *J Endocrinology* 1: 337-344.

- Matsuo K**, Hirohata T, Sugiota Y, Ikeda M, Fukuda A (1988) Influence of alcohol intake, cigarette smoking, and occupational status on idiopathic osteonecrosis of the femoral head. *Clin Orthop* 234:115-123.
- Maurin AC**, Chavassieux PM, Frappart L, Delmas PD, Serre CM, Meunier PJ (2000) Influence of mature adipocytes on osteoblast proliferation in human primary cocultures. *Bone* 26:485-489.
- Maurin AC**, Chavassieux PM, Vericel E, Meunier PJ (2002) Role of polyunsaturated fatty acids in the inhibitory effect of human adipocytes on osteoblastic proliferation. *Bone* 31(1):260-266.
- Macdonald HM**, New SA, Golden MH, Campbell MK, Reid DM (2004) Nutritional associations with bone loss during the menopausal transition: evidence of a beneficial effect of calcium, alcohol, and fruit and vegetable nutrients and of a detrimental effect of fatty acids. *Am J Clin* 79(1):155-65.
- Mielants H**, Veys EM, DeBussere A (1975) Avascular necrosis and its relation to lipid and purine metabolism. *J Rheumatol* 2:430-436.
- Miller S**, Zirzow GC, Doppelt SH, Brady RO, Barton NW (1996) Analysis of the lipids of normal and Gaucher bone marrow. *J Lab Clin Med* 127/4:353-358.
- Miyaniishi K**, Yamamoto T, Irida T, Yamashita A, Jingushi S, Noguchi Y, Iwamoto Y (2001) A high low-density lipoprotein cholesterol to high-density lipoprotein cholesterol as a potential risk factor for corticosteroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Rheumatology* 40/2:196-201.
- Mollard RC**, Gillam ME, Wood TM, Taylor CG, Weiler HA (2005) (n-3) fatty acids reduce the release of prostaglandin E2 from bone but do not affect bone mass in obese (fa/fa) and lean Zucker rats. *J Nutr.* 135:499-504.
- Mollard RC**, Kovacs HR, Fitzpatrick-Wong SC, Weiler HA (2005) Low levels of dietary arachidonic and docosahexaenoic acids improve bone mass in neonatal piglets, but higher levels provide no benefit. *J Nutr.* 135:505-512.
- Mont MA**, Glueck CJ, Pacheco IH, Wang P, Hungerford DS, Petri M (1997) Risk factors for osteonecrosis in systemic lupus erythematosus. *J Rheumatol* 24:645-662.
- Mont MA**, Hungerford DS (1995) Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head. *J Bone Joint Surg Am.* 77:459-474.
- Moran TJ** (1962) Cortisone-induced alterations in lipid metabolism. *Arch Pathol*, 73:300.

- Moskal** JT, Topping RE, Franklin LL (1997) Hypercholesterolemia: An association with osteonecrosis of the femoral head. *Am J Orthop* 26:609-612.
- Motomura** G, Yamamoto T, Miyanishi K, Yamashita A, Sueishi K, Iwamoto Y (2005) Bone marrow fat-cell enlargement in early steroid-induced osteonecrosis-a histomorphometric study of autopsy cases. *Pathol Res Pract* 200(11-12):807-11.
- Motomura** G, Yamamoto T, Miyanishi K, Jingushi S, Iwamoto Y (2004) Combined effects of an anticoagulant and a lipid-lowering agent on the prevention of steroid-induced osteonecrosis in rabbits. *Arthritis Rheum* 50(10):3387-3391.
- Nakamura** T, Matsumoto T, Nishino M, Tomita K, Kadoya M (1997) Early magnetic resonance imaging and histologic findings in a model of femoral head necrosis. *Clin Orthop* 334:68-72.
- Nevitt** MC, Lane NE (1999) Body weight and Osteoarthritis. *Am J Med* 107:632-633.
- Nevitt** MC, Lane NE, Scott JC (1995) Radiographic osteoarthritis of the hip and bone mineral density: the Study of Osteoporotic Fractures Research Group. *Arthritis Rheum* 38:907-916.
- Norrdin** RW, Jee WS, High WB (1990) The role of prostaglandins in bone in vivo. *Prostaglanins, Leuko. Essent. Fatty acids* 41:139-149.
- Nuttall** ME, Patton AJ, Olivera DL, Nadeau DP, Gowen M (1998) Human trabecular bone cells are able to express both osteoblastic and adipocytic phenotype: implications for osteopenic disorders. *J Bone Miner Res* 13:371-382.
- Nuttall** ME, Gimble JM (2000) Is there a therapeutic opportunity to either prevent or treat osteopenic disorders by inhibiting marrow adipogenesis. *Bone* 27:177-184.
- Ohshiba** T, Miyaura C, Ito A (2003) Role of prostaglandin E produced by osteoblasts in osteolysis due to bone metastasis. *Biochem Biophys Res Commun.* 300(4):957-964.
- Park** YG, Kang SK, Kim WJ, Lee YC, Kim CH (2004) Effects of TGF-beta, TNF-alpha, IL-beta and IL-6 alone or in combination, and tyrosine kinase inhibitor on cyclooxygenase expression, prostaglandin E2 production and bone resorption in mouse calvarial bone cells. *Int J Biochem Cell Biol* 36(11):2270-2280.
- Paul** K, Abadi DM, Mathies JC(1961) Lipid composition of normal human bone marrow as determined by column chromatography. *J.Lipid Res* 3(1):95-98.

- Parhami F**, Mody N, Gharavi N, Ballard AJ, Tintut Y, Demer LL (2003) Role of the cholesterol biosynthetic pathway in osteoblastic differentiation of marrow stromal cells. *J Bone Miner Res.* 17(11):1997-2003.
- Pittenger MF**, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moormann MA, Marshak DR (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
- Plenck H**, Hofmann S, Eschberger J, Gstettner M, Kramer J, Schneider W, Engel A (1997) Histomorphology and bone morphometry of the bone marrow edema syndrome of the hip. *Clin Orthop* 334, 73-84.
- Plotquin D**, Dekel S, Katz S, Danon A (1991) Prostaglandin release by normal and osteomyelitic human bones. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.* 43:13-15.
- Priante G**, Bordin L, Musacchio E, Clari G, Baggio B (2002) Fatty acids and cytokine mRNA expression in human osteoblastic cells: a specific effect of arachidonic acid. *Clin Sci (Lond)* 102(4):403-9.
- Raatz SK**, Douglas B, Thomas W, Kris-Etherton P (2001) Total fat intake modifies plasma fatty acid concentration in humans. *J Nutr* 131:231-234.
- Radin EL**, Rose RM (1986) Role of subchondral bone in the initiation and progression of cartilage damage. *Clin Orthop* 213:34-40.
- Raiz LG**, Koolemans-Beynen AR (1974) Inhibition of bone collagen synthesis by prostaglandin E2 in organ culture. *Prostaglandins* 8:377-385.
- Raiz LG**, Fall PM (1990) Biphasic effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvariae: interaction with cortisol. *Endocrinology* 126:1654-1659.
- Raiz LG**, Pilbeam CC, Fall PM (1993) Prostaglandins: mechanism of action and regulation of prostaglandins in bone. *Osteoporos Int* 1:136-140.
- Rawlinson SCF**, Pitsillides, Lanyon LE (1996) Involvement of different ion channels in Osteoblasts and osteocytes early responses to mechanical stain. *Bone* 19:609-614.
- Rawlinson SCF**, Wheeler-Jones CPD, Lanyon LE (2000) Arachidonic acid for loading induced prostacyclin and prostaglandin E2 release from osteoblasts and osteocytes is derived from the activities of different forms of phospholipase A2. *Bone* 27/2:241-247.

Rowe IR, Soutar AK, Pepys MB (1986) Agglutination of intravenous lipid emulsion and plasma lipoproteins by C-reactive protein. *Clin Exp Immunol* 66(1):241-7.

Sakaguchi K, Morita I, Murota S (1994) Eicosapentaenoic acid inhibits bone loss due to ovariectomy in rats. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty acids* 50:81-84.

Schelling SH, Wolfe HJ, Tashjian AH (1980) Role of the osteoclast in prostaglandin E₂-stimulated bone resorption: A correlative morphometric and biochemical analysis. *Lab Invest* 42:290-298.

Schroeder WC (1994) Current concepts of osteonecrosis of the femoral head. *Orthop Rev* 23:487-497.

Scott MT, Adhikary PK (1975) Effect of the nature and amount of dietary energy of lipid composition of rat bone marrow. *Lipids* 10:584-590.

Shapiro JA, Koepsell TD, Voigt LF, Dugowson, Kestin M, Nelson JL (1996) Diet and rheumatoid arthritis in women: a possible protective effect of fish consumption. *Epidemiology* 7:256-263.

Shorland FB, Bruce LW, Jessop AS (1952) Studies on the composition of horse oil II. The component fatty acids of lipids from fatty tissues, muscle and liver. *Biochem J* 52(3), 400-7.

Skrede B, Lie SO, Blomhoff R, Norum KR (1994) Uptake and storage of retinol and retinyl esters in bone marrow of children with acute myeloid leukemia treated with high-dose retinyl palmitate. *Eur J Haematol* 52:140-144.

Solomon L (1993) Bone-marrow oedema syndrome. *J Bone Joint Surg* 75(2):175-176.

Soppela P, Nirminen M (2001) The effect of wintertime undernutrition on the fatty acid composition of leg bone marrow fats in reindeer. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 128:63-72.

Stürmer T, Sun Y, Sauerland S, Zeissig I, Günther KP, Puhl W, Brenner H (1998) Serum Cholesterol and Osteoarthritis. *J Rheumatol* 25(9):1827-1832.

Sun D, Krishan A, Zaman K, Lawrence R, Bhattacharya A, Fernandes G (2003) Dietary n-3 fatty acids decrease osteoclastogenesis and loss of bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 18:1206-1216.

Surat A, Isolation of Prostaglandin E2-like material from osteonecrosis induced by steroids and its prevention by kallikrein-inhibitor, aprotinin. An experimental study in rabbits (1984) Prostaglandins Leukotriens Med 13:159-165.

Takeuchi Y, Suzawa M, Fukumoto S, Fujita T (2000) Vitamin K2 inhibits adipoogenesis, osteoclastogenesis, and ODF/RANK ligand expression in murine bone marrow cell cultures. Bone 27(6):769-776.

Tavassoli M, Houchin DN, Jacobs P (1977) Fatty acid composition of adipose cells in red and yellow marrow: A possible determinant of haematopoietic potential. Scand J Haematol 18:47-53.

Tavassoli M, Crosby WH (1970) Bone marrow histogenesis: A comparison of fatty and red marrow. Science 169:291-293.

Tintut Y, Morony S, Demer LL (2004) Hyperlipidemia promotes osteoclastic potential of bone marrow cells ex vivo. Arterioscler Thromb Vasc Biol 24(2):6-10.

Tornvig L, Mosekilde L, Justesen J, Falk E, Kassem M (2001) Troglitazone treatment increases bone marrow adipose tissue volume but does not affect trabecular bone volume in mice. Calcif Tissue Int 69:46-50.

Tsai CL, Liu TK (1992) Evidence for eicosanoids within the reparative front in avascular necrosis of human femoral head. Clin Orthop 281:305-312.

Turner DA, Tempelton AC, Selzer PM, Rosenberg AG, Petasnick JP (1989) MR finding of diffuse marrow abnormalities without focal lesions. Radiology 171:135-140.

Unger E, Moldofsky P, Gatenby R, Hertz W, Broader G (1988) Diagnosis of osteomyelitis by MR imaging. AJR 150:605-610.

Vance DE, Vance JE (1996) Biochemistry of lipids, lipoproteins and membranes. New Comprehensive Biochemistry, Elsevier, Vol. 31.

Vermeer C, Gijsberg B, Craciun AM; Gronen-van-Dooren M, Knapen M (1996) Effects of Vitamin K on bone mass and bone metabolism. Symposium: Nutritional Advances in Human Bone Metabolism. J Nutr 126:1187S-1191S.

Vermeer C, Knapen HJ, Schurgers LJ(1998) Vitamin K and metabolic disease. J Clin Pathol 51:424-426.

- Wahl** HG, Kausch C, Machicao F, Rett K, Stumvoll M, Harig HU (2002) Toglitzone downregulates delta-6-desaturase gene expression in human skeletal muscle cell cultures. 51(4):1060-5.
- Wahlefeld** AW; Bergmeyer HU (Hrsg.). Methods of Enzymatic Analysis. In: 2nd English ed. New York, NY Academic Press Inc 1974:p.1831.
- Wang** GJ, Sweet DE, Reger SI, Thompson RC (1977) Fat-cell changes as a mechanism of avaskular necrosis of the femoral head in cortisone-treated rabbits. J Bone Joint Surg 59(6):729-735.
- Wang** GJ, Cui Q, Balian G (2000) The Nicolas Andrey award. The pathogenesis and prevention of steroid-induced osteonecrosis. Clin Orthop 295-310.
- Watkins** BA, Shen CL, Allen KGD, Seifert MF (1996) Dietary (n-3) and (n-6) polyunsaturates and acetylsalicylic acid alter ex vivo PGE2 biosynthesis, tissue IGF-Levels, and bone morphometry in chicks. J Bone Miner Res 11:1321-1332.
- Watkins** BA, Xu H, Turek JJ (1996) Linoleate impairs collagen synthesis in primary cultures of avian chondrocytes. Proc Soc Exp Biol Med 212:153-159.
- Watkins** B, Shen CL, McMurtry JP, Xu H, Bain SD, Allen KG, Seifert MF (1997) Dietary lipids modulate bone prostaglandin E2 production, Insulin-Like-Growth Factor-I concentration and formation rate in chicks. J Nutr 127:1048-1091.
- Watkins** BA, Li Y, Allen KGD, Hoffmann WE, Seifert MF (2000) Dietary ratio of (n-6)/(n-3) polyunsaturated fatty acid composition of bone compartment and biomarkers of bone formation in rats. J Nutr 130/9:2274-84.
- Watkins** BA, Seifert MF (2000) Conjugated acid and bone biology. J Am Coll Nutr 19(4):478S-486S.
- Watkins** BA, Yong L, Lippman HE, Seifert MF (2001) Omega-3 PUFAs and skeletal health (2001) Exp Biol Med 226:485-497.
- Watkins** BA, Yong L, Seifert MF (2001) Nutraceutical fatty acids as biochemical and molecular modulators of skeletal biology. J of the American College of Nutrition 20(5):410S-416S.
- Watkins** BA, Li Y, Lippman HE, Feng S (2003) Modulatory effect of omega-3 polyunsaturated fatty acids on osteoblast function and bone metabolism. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 68:387-398.

- Watkins** BA, Li Y, Lippman HE, Reinwald S, Seifert MF (2004) A test of Ockham's razor: implications of conjugated linoleic acid in bone biology. *Am J Clin Nutr* 79(6):1175S-1185S.
- Weiler** HA (2000) Dietary supplementation of Arachidonic acid is associated with higher whole body weight and bone density in growing pigs. *Pediatric Research* 47:692-697.
- Weiler** HA, Fitzpatrick-Wong SC (2002) Modulation of essential fatty acid ratios alters fatty acid status but not bone mass in piglets. *Nutrition* 132:2667-2672.
- Weiss** LA, Barrett-Connor E, von Muhlen D (2005) Ratio of n-6 to n-3 fatty acids and bone mineral density in older adults: the Rancho Bernardo Study. *Am J Clin Nutr* 81(4):934-938.
- Wilson** AJ, Murphy WA, Hardy DC, Totty WG (1988) Transient osteoporosis: transient bone marrow edema? *Radiology* 167:757-760.
- Xu** J, Cissel D, Varghese S, Whipkey D, Blaha J, Graeber G, Keeting PE (1997) Cytokine regulation of adult human osteoblast-like cell prostaglandin biosynthesis. *J Cell Biochem* 64:618-631.
- Yagami** K, Uyama Y, Yoshizawa Y, Kakuta S, Yamaguchi A, Nagumo M (2004) A human chondrogenetic cell line retains multi-potency that differentiates into osteoblasts and adipocytes. *Bone* 34(4):648-655.
- Zalavras** C, Dailiana Z, Elisaf M (2000) Potential factors concerning the development of osteonecrosis of the femoral head. *Eur J Invest* 30(3):215-21.
- Zock** PL, Mensink RP, Harryvan J, de Vries JH, Katan MB (1997) Fatty acid in serum cholesteryl esters as quantitative biomarkers of dietary intake in humans. *Am J Epidemiol* 145:1114-1122.
- Zucker** S, Beck G, Yi P, Lysik RM, DiStefano JF (1981) Rat hematopoietic cell receptor for VLDL growth inhibitor. *Exp Hematol* 9(5):550-62.

10. Danksagung

Frau Prof. Dr. Ulrike Beisiegel danke sehr ich für die Überlassung des Themas und die wunderbare Möglichkeit uneingeschränkt alle Geräte und Materialien des Labors nutzen zu können und jederzeit ein offenes Ohr für Fragen und Anregungen zu finden.

Bedanken möchte ich mich bei Dr. Andreas Niemeier, der mir bei der Erarbeitung des Themas stets zur Seite stand und von dem ich insgesamt sehr viel lernen konnte.

Ich danke allen Mitarbeitern des Labors sehr für die zahlreichen Hilfestellungen, Ratschläge, Diskussionen und für die schöne und anregende Zeit, die ich während der Bearbeitung meiner Dissertation haben durfte.

Ich danke meinen Eltern und meinen Freunden dafür, dass sie jederzeit Verständnis für mich in dieser arbeitsreichen Zeit aufgebracht und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben.

11. Lebenslauf

Maike Ihnen
Brahmsalle 39
20144 Hamburg

Persönliche Daten

Geburtsdatum: 18.6.1975 in Kiel

Ausbildungsdaten

2005: 3. Klinische Prüfung: Note: 1

2004: Praktisches Jahr an der Universität Hamburg und King´s College, London

2004: 2. Klinische Prüfung: Note 1,6

2003: Auslandsaufenthalt Universität Sydney, Australien

2002: Auslandssemester in Italien

2002: 1. Klinische Prüfung, Note: 2

2001: Auslandsaufenthalt Universität Zürich, Schweiz

2001: Dissertationsbeginn, Graduiertenkolleg 336

2000: Klinische Vorprüfung

10/1998: Medizinstudium an der Universität Hamburg

1997-1998: Grundstudium Jura

1995-1997: Ausbildung zur Bankkauffrau bei der Hamburger Sparkasse, Hamburg

1986-1995: Abitur, Lübeck

12. Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich diese Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, keine anderen als die von mir angegebene Quellen und Hilfsmittel benutzt und die aus den benutzen Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe, Band und Seite des benutzen Werkes kenntlich gemacht habe, und dass ich die Dissertation bisher keinem anderen Fachvertreter an einer Hochschule zur Überprüfung gegeben oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.