

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie des Universitäts-Krankenhauses Eppendorf, Direktor: Professor Dr. med. Wolfgang Rüter

**Assoziation zwischen dem Grad der Knochenerosion und dem Synoviaspiegel des Tumor-Nekrose-Faktor alpha in den Kniegelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis.**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors für Medizin, dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von Justus Lindschau aus Hamburg

Hamburg 1997

Sprecher des Fachbereiches Medizin: Professor Dr. H.-P. Leichtweiß

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. W. Rüter

2. Berichterstatter: Professor Dr. med. K. Tillmann

## **Erklärung**

Ich versichere hiermit, daß ich die vorliegende Doktorschrift ohne unerlaubte Hilfe angefertigt, das benutzte Schrifttum vollständig erwähnt habe und daß die Doktorschrift noch von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Hamburg, 20. Januar 1997

Die in dieser Arbeit angegebenen Experimente sind von mir nach entsprechender Anleitung durch Herrn Professor Dr. med. J. Neidel mit Unterstützung durch die medizinisch technische Assistentin Frau Hamdorf durchgeführt worden.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. med. J. Neidel für seine Anteilnehmende und wohlwollende Unterstützung.

Meinen Eltern in Dankbarkeit gewidmet

## INHALTSVERZEICHNIS:

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	5
1.1	Zielsetzung der Arbeit .....	5
1.2	Zytokine und Gelenkdestruktion .....	7
1.3	Beschreibung relevanter Zytokine unter besonderer Berücksichtigung des Tumor-Nekrose-Faktors- $\alpha$ .....	9
1.4	IL-1 $\alpha$ , synonym BAF (B-zellaktivierender Faktor), LAF (Lymphozyten aktivierender Faktor), EP (endogenous pyrogen). IL-1 $\beta$ entspricht unter anderem OAF (Osteoklasten aktivierender Faktor) und Catabolin .....	12
1.5	IL-1-Rezeptor Antagonist .....	13
1.6	IL-6 .....	13
1.7	IL-8 .....	14
1.8	Kollagenasen .....	14
1.9	Nicht primär Kollagenase I+II abbauende Matrix – Proteinasen .....	15
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	16
2.1	Patienten .....	16
2.2	Radiologische Einteilung der Gelenkdestruktionen .....	16
2.3	Probengewinnung .....	17
2.4	Zytokin-Meßmethoden .....	17
2.5	Enzym-Meßmethoden .....	18
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	21
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	28
<b>5</b>	<b>Abkürzungen</b> .....	33
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	34
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	35

# **1 Einleitung**

Zytokine spielen eine wichtige Rolle in der Knorpel- und Gelenkdestruktion bei rheumatischen Arthritiden und vermutlich auch bei degenerativen Gelenkerkrankungen [1, 5, 6, 40]. Zytokine sind nichtendokrine Proteine oder Glykoproteine, die Zellen in ihrer Aktivität zu beeinflussen vermögen [2]. Zytokine entfalten ihre Hauptwirkung als Mediatoren bei Entzündungen und entzündlichen Gelenkzerstörungen [16]. Hier sind besonders verschiedene Interleukine, speziell das Interleukin-1, und der Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  zu nennen [52]. Interleukin-1 wurde erstmalig in den frühen siebziger Jahren identifiziert [30], Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  Anfang der achtziger Jahre [10].

## **1.1 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war, mögliche Korrelationen zwischen dem radiologisch nachweisbaren Grad der Destruktionen der zur Untersuchung anstehenden Kniegelenke von Arthritikern und Arthrotikern und den in der Synovialflüssigkeit nachweisbaren Spiegeln einzelner Zytokine und knorpelabbauender Enzyme insbesondere Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  zu untersuchen [51].

Da bei dem immer noch schwer durchschaubaren Zytokin-Netzwerk mit seiner ungeheuren Menge an Interaktionen sowohl im fördernden als auch inhibitorischen Sinne das Messen einzelner Parameter durchaus in die Irre führen kann, wurden in der vorliegenden Arbeit zusätzliche, im Netzwerk nahestehende Zytokine mituntersucht. Dies diente zum einen einer möglichen Validierung, zum anderen der Beantwortung erweiterter Fragestellungen. Die wichtigsten zusätzlich erhobenen Parameter waren IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1-Rezeptor-Antagonist, IL-6 und IL-8, zusätzlich auch die Kollagen abbauenden Enzyme sowie die Casein abbauenden Enzyme als globale Meßparameter für

matrixabbauende Enzyme. Diese Enzyme sind in diesem Zusammenhang von speziellem Interesse, da sie unter dem Einfluß der o.a. Zytokine, hier vor allem des IL-1 und des Tumor-Nekrose-Faktors- $\alpha$  vermehrt von relevanten Zellen - zum Teil Chondrocyten, zum Teil Fibroblasten - synthetisiert werden.

Bereits 1972 untersuchten Horton und andere *in vitro* die Wirkung von TNF zunächst auf den Zahnhalteapparat, später auch auf andere Knochen [38]. Hierbei stellte sich u. a. heraus, daß TNF die osteoklastische Aktivität in Kulturen von fetalen langen Rattenknochen steigerte. Daraus resultierte die anfängliche Bezeichnung Osteoklasten aktivierender Faktor. TNF sorgt nicht nur für eine Verringerung des Mineralgehaltes der Knochen, sondern führt auch zu einem proteolytischen Abbau der Kollagenknochenmatrix. Diese Effekte können inhibiert werden durch Cortison, Calzitonin und Phosphate [38].

Die anfänglich nur Interleukin-1  $\alpha$  und  $\beta$  zugeschriebenen Einflüsse auf die Knochenresorption fanden sich später auch bei TNF [35]. Die Effekte von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  differieren offenbar von denen anderer Faktoren, die das Wachstum von Osteoklastenvorstufen regulieren. Hier ist zu nennen der koloniestimulierende Faktor und TGF- $\alpha$ . Diese Faktoren erfordern 1,25-Dihydroxyvitamin D für die Aktivierung der Osteoklasten, während TNF, aber auch Interleukin 1, in der Lage sind, Osteoklasten ohne die Anwesenheit von 1,25-Dihydroxyvitamin D zu beeinflussen [56].

Es ist sehr wahrscheinlich, daß einige der Effekte von TNF auf Osteoklasten durch Interleukin 1 vermittelt werden, wofür spricht, daß neutralisierende Antikörper gegen IL-1 die TNF-induzierte Osteoklastenformierung verhindern können [58]. Hierfür sprechen auch die Untersuchungen von Garrett [29]. Der Nachweis der Stimulationsfähigkeit der Osteoklasten zur Knochenresorption durch TNF *in vivo* wurde u.a. durch Boyce geführt. Er fand heraus, daß TNF-

ebenso wie Interleukin-1- eine Zunahme der Osteoklastenaktivität an der endostalen Oberfläche von Mäuseknochen bewirkte [13].

TNF scheint zusätzlich nicht nur die Proliferation von Osteoblastenvorläufern zu hemmen, sondern auch unterschiedliche Funktionen in diesen Zellen [9]. TNF bewirkt auch eine Abnahme der Synthese kollagenaseverdaulicher Proteine [62]. Saklatvala und andere zeigten, daß humaner TNF eine dosisabhängige Abnahme der Proteoglycan-Synthese bewirkt, allerdings ohne Effekt auf eine Kollagensynthese. Bei der Gewebszerstörung in den Gelenken von Patienten mit rheumatoider Arthritis ist TNF möglicherweise ein weniger wichtiger Mediator als das Interleukin-1. Injektionen von TNF in rheumatisch-entzündliche Gelenke führen zu einer geringeren entzündungsfördernden Wirkung als die auslösende Gabe von Interleukin-1. In Kombination mit Interleukin-1 kommt es zu einer gesteigerten Wirkung gegenüber der Gabe der beiden jeweils einzelnen Zytokine [67].

TNF steigert die Produktion von Kollagenase und Prostaglandin E<sub>2</sub> durch Chondrozyten und Synovialzellen in ähnlicher Weise wie IL-1 [21].

## **1.2 Zytokine und Gelenkdestruktion**

Histopathologisch ist bei der rheumatoiden Arthritis, aber auch bei anderen chronisch entzündlichen Gelenkerkrankungen, eine Hyperplasie der Lining cell-Schicht, eine Infiltration der Synovialmembran mit Monocyten/Makrophagen und Lymphozyten sowie eine unterschiedlich stark ausgeprägte Destruktion des Knorpels festzustellen. Je nach Verlauf kommt es zusätzlich zu einer unter Umständen starken Erosion des gelenknahen Knochens.

Interleukin-1 und Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  können die Synthese der Knorpelmatrix unterdrücken [45, 52]. Sie können aber auch Chondrozyten zur Synthese von Matrix-abbauenden Proteasen aktivieren wie z.B. der 92 kDa

Kollagenase und Stromelysin [47]. Beide Zytokine stimulieren synergistisch oder additiv [48, 64, 65] Chondrozyten zur Produktion von Granulozyten-Makrophagen-Koloniestimulierendem Faktor (GM-CSF) [2, 17]. Zusätzlich unterdrücken sie die Produktion von Protease-Inhibitoren durch Chondrozyten und Synovialzellen [73, 65]. Weitere Effekte von IL-1 und TNF- $\alpha$  schließen die Stimulierung der Prostaglandin-Produktion durch synoviale Fibroblasten [21, 22] und die Aktivierung von Osteoklasten mit konsekutiver Knochenresorption ein [36, 72]. Die Einwanderung von Leukozyten wird ebenfalls gefördert, wobei dies wahrscheinlich durch die Verstärkung der Expression von interzellulären Adhäsionsmolekülen bei Synovialzellen zustande kommt [71]. Eine Aktivierung der Phospholipase in Knorpelzellen von Ratten durch TNF und Interleukin-1 wurde ebenfalls beschrieben [67].

Weiterhin zeigen Untersuchungen in vitro und in vivo, daß die katabolen Effekte von IL-1 und TNF- $\alpha$  auf Gelenkstrukturen offenbar synergistisch sind [45].

Mindestens zwei lösliche TNF-Rezeptoren sind bekannt (TNF-sR55 und TNF-sR75), welche beide die Effekte von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  zu modulieren vermögen [60], auch für IL-1 sind in der humanen Synovialflüssigkeit lösliche Rezeptoren nachgewiesen worden. Unter anderem wurde dieser Nachweis von Burger und anderen geführt [15]. IL-1 lösliche Rezeptoren (IL-1sR) binden IL-1 und verringern die freien Konzentrationen des löslichen Zytokins, hemmen daher seine Bindung an den Zelloberflächenrezeptor. IL-1 löslicher Rezeptor kann zusätzlich binden an IL-1 Rezeptor Antagonist. Burger und andere untersuchten auch den gleichzeitigen Effekt auf die Produktion von Kollagenase und PGE<sub>2</sub> durch menschliche dermale Fibroblasten und Synovialiszellen, stimuliert entweder durch IL-1 $\alpha$  oder IL-1 $\beta$  [15].



### **1.3 Beschreibung relevanter Zytokine im Rahmen der Gelenkdestruktion unter besonderer Berücksichtigung von Tumor-Nekrose-Faktor alpha**

In der TNF-Familie unterscheidet man zwei distinkte Proteine, die als Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (Cachectin) und Tumor-Nekrose-Faktor- $\beta$  (Lymphotoxin) bezeichnet werden [63]. Diese binden an den gleichen Rezeptor.

Die Synonyma für Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (Cachectin, Cytotoxin, differentiation inducing factor; endogenous pyrogen; haemorrhagic factor; macrophage cytotoxic factor; macrophage cytotoxin) erinnern an die ursprünglich beobachteten Effekte dieses Zytokins.

Unter physiologischen Bedingungen wird TNF- $\alpha$  von Makrophagen zusammen mit Interleukin-1 und anderen Monokinen sezerniert, ein Vorgang, der durch Lipopolysaccharide erheblich angeregt werden kann. CD4<sup>+</sup>-Zellen sezernieren Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  ebenfalls, zusätzlich auch stimulierte periphere Neutrophile, aber auch nicht stimulierte Zellen wie Astrozyten, glatte Muskelzellen und Fibroblasten. Als Stimuli für die Synthese von Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  gelten Interferone, Interleukin-2, GM-CSF (granulocyte-makrophage-colony-stimulating factor), Substanz P, Immunkomplexe, Inhibitoren der Cyclooxygenase und PAF (platelet activating factor). Inhibiert wird die Herstellung von TNF u.a. durch Interleukin-6, TNF- $\beta$ , Vitamin D<sub>3</sub>, Prostaglandin E<sub>2</sub>, Dexamethason, Cyclosporin A und Antagonisten von PAF [24].

Humaner Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  ist ein nicht glycolysiertes, 17kDa Protein von einer Länge von 157 Aminosäuren [7]. Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  bildet Dimere und Trimere aus und ist zu ca. 30% mit Tumor-Nekrose-Faktor- $\beta$  homolog [5]. Neben der löslichen Form gibt es eine weitere 26kDa-Form in der Zellmembran, die möglicherweise parakrin wirkt. Die kleinere Form entsteht

aus dem hochmolekularen, 233 Aminosäuren langen Vorläuferprotein. Die einzige intramolekulare Disulfidbrücke kann zerstört werden ohne die biologische Aktivität zu beeinflussen. Die Mutationen Ala84→Val und Val91→Ala reduzieren die zytotoxische Wirkung fast vollständig. Die biologische Wirkung des Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  wird durch spezifische Rezeptoren vermittelt. Ca. 500 - 10.000 hochaffine Rezeptoren ( $K_a = 2,5 \times 10^{-9} \text{M}$ ) werden mit Ausnahme von Erythrozyten an allen Körperzellen exprimiert, wobei kein Nachweis eines Zusammenhanges zwischen Rezeptordichte und Reaktion der Zellen bekannt ist. Der Rezeptor für Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  bindet auch Tumor-Nekrose-Faktor- $\beta$ .

Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  hat eine Reihe von biologischen Aktivitäten und wirkt nicht spezifisch. Er sorgt für die Zytolyse oder Zytostase vieler Tumorzell-Linien in vitro. Empfindliche Zielzellen sterben bereits nach wenigen Stunden ab, wenn sie geringen Konzentrationen des Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  ausgesetzt werden. Er induziert die haemorrhagische Nekrose von transplantierten Tumoren, verstärkt die Phagozytose und Zytotoxizität von polymorphkernigen Neutrophilen und moduliert die Expression vieler Proteine [2].

Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  führt innerhalb weniger Stunden nach Injektion zu einer Zerstörung der einen malignen Tumor versorgenden feinen Blutgefäße, somit zu einer haemorrhagischen Nekrose und zum Absterben der Zellen. In vivo ist TNF- $\alpha$  u.a. mit Interleukin-1 für viele Veränderungen im Endothel verantwortlich. Hier werden antikoagulatorische Mechanismen gebremst und thrombotische Ereignisse begünstigt, somit Thrombosen, Sklerosen, Vaskulitiden und disseminierte intravasale Gerinnungen gefördert. Zusätzlich wird die Adhärenz von Neutrophilen verstärkt [72]. In vitro hemmt TNF- $\alpha$  das Wachstum von Endothel sehr stark, in vivo wird die Angiogenese stark

gefördert. TNF- $\alpha$  wirkt als Wachstumsfaktor für menschliche diploide Fibroblasten und unterstützt hier die Synthese von Kollagenase und Prostaglandin E<sub>2</sub>. Gemeinsam mit IL-1- $\beta$  moduliert TNF- $\alpha$  auch die Synthese von Kollagenase III [57]. In ruhenden Makrophagen wird die Synthese von IL-1 und Prostaglandin E<sub>2</sub> induziert, die Phagozytosefähigkeit und die Synthese von Superoxid - Dismutase wird ebenfalls stimuliert, zusätzlich auch die Ausbildung von HLA-Antigenen der Klassen 1 und 2 sowie u.a. die Biosynthese von Kollagenase in Endothelzellen und Synovialzellen. Inhibiert wird die Synthese von Lipoproteinlipase [24].

Für eine normale Immunantwort ist TNF- $\alpha$  unerlässlich. Eine Hyperexpression führt jedoch zu pathogenen Effekten. TNF- $\alpha$  ist der Hauptmediator für die bei Tumorpatienten beobachtete Kachexie, zusätzlich verantwortlich für die Toxizität bei Gram-negativer Sepsis, da Antikörper gegen TNF hier einen protektiven Effekt haben.

TNF- $\alpha$  aktiviert - und dies ist eine für die vorliegende Untersuchung wichtige Eigenschaft – die an der Knochenresorption beteiligten Osteoklasten. Somit unterdrückt TNF durch Förderung des Abbaus indirekt die Knochenneubildung. Bisherige Versuche zur klinischen Anwendung der TNF-Fähigkeit, spezifisch auf maligne Zellen zu wirken, verliefen bislang nicht erfolgversprechend. Von klinischer Relevanz sind derzeit eher die Tumor-Nekrose-Faktor Hemmer, die in der Synovia von r.A.-Patienten gefunden werden [59], wobei diese Inhibitoren evtl. auch beim septischen Schock eingesetzt werden können. Der Einsatz von monoklonalen Anti-TNF Antikörpern - z.B. beschrieben von Maini und Brennan [44] – erscheint bei der rheumatoiden Arthritis vielversprechend.

#### **1.4 IL-1 $\alpha$ , synonym BAF (B-zellaktivierender Faktor), LAF (Lymphozyten aktivierender Faktor), EP (endogenous pyrogen). IL-1 $\beta$ entspricht unter anderem OAF (Osteoklasten aktivierender Faktor) und Catabolin**

Auch IL-1 wird überwiegend von aktivierten Makrophagen (Alveolar - Makrophagen, Kupffer'sche Sternzellen, adhärente Milz- und Peritonealzellen), Monozyten und peripheren Neutrophilen gebildet. Zwei funktionell gleichwertige Formen liegen vor, das IL-1  $\alpha$ , (17 kDa, 159 Aminosäuren) und IL-1  $\beta$ , (17 kDa und 153 Aminosäuren). Aus IL-1  $\beta$  besteht die Hauptmenge des sezernierten Interleukins. Beide Proteine haben nur einen geringen Grad an Homologie. Bei IL-1 hat das intrazelluläre Vorläufermolekül keine erkennbare hydrophobe sekretorische Signalfrequenz. Das reife IL-1 entzieht sich den Nachweisen im Zellinneren und wird wahrscheinlich an der Membran oder extrazellulär prozessiert. IL-1 hat ein weites Spektrum an biologischen Aktivitäten, das von den oben angegebenen unterschiedlichen synonymen Bezeichnungen abgeleitet werden kann. Die Hauptwirkung von IL-1 ist die Stimulierung von T-Helferzellen zur Produktion und Sekretion von Interleukin 2. Interleukin fördert zusätzlich die Proliferation von B-Zellen und ist zusammen mit dem Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  an Entzündungsreaktionen beteiligt. Zusätzlich steigert es die Sekretion von Kollagenase. Dadurch antagonisiert IL-1 den durch den transformierenden Wachstumsfaktor ausgelösten Effekt auf den Aufbau der extrazellulären Matrix. IL-1 aktiviert die Osteoklasten und greift somit direkt in den Knochenstoffwechsel ein [41].

Ergänzend ist zu erwähnen, daß IL-1 und ebenso IL-6 die Synthese von ACTH stimulieren. Die als Reaktion hierauf ausgeschütteten Glukocorticoide inhibieren wiederum die Produktion von IL-1 und IL-6 sowie von Tumor-

Nekrose-Faktor, so daß hier von einem negativen Regelkreis gesprochen werden kann [36].

Die im Blut gemessenen IL-1 $\alpha$  und  $\beta$  Konzentrationen korrelieren bei Patienten mit rheumatoider Arthritis mit der Aktivität der Erkrankung [25], [Tabelle 2].

### **1.5 IL-1 Rezeptor Antagonist**

IL-1 ra ist ein Faktor, der keine IL-1-ähnliche Aktivität aufweist und von den selben Zellen sezerniert wird, die auch IL-1 exprimieren. IL-1 Rezeptor Antagonist bindet mit fast gleicher Affinität an den IL-1 Rezeptor wie IL-1, ohne jedoch die nach der Rezeptor-Bindung von IL-1 ausgelösten Prozesse der Signaltransduktion in Gang zu setzen. Somit ist IL-1 ra in vitro und in vivo ein kompetitiv wirkender Inhibitor der Wirkung von IL-1. Die physiologischen IL-1 Inhibitoren sind nichtsteroidale, antiinflammatorisch wirkende Substanzen und eignen sich daher möglicherweise zur Behandlung von Arthritiden [5].

### **1.6 IL-6**

IL-6 wird hauptsächlich von stimulierten Monocyten, Fibroblasten und Endothel-Zellen hergestellt, auch Makrophagen, T- und B-Lymphozyten und weitere können nach entsprechender Stimulation IL-6 herstellen. IL-6 stimuliert auch seine eigene Synthese. Physiologische Stimuli sind IL-1, Tumor-Nekrose-Faktor und PDGF (platelet-derived growth factor). IL-6 besitzt wichtige überlappende Aktivitäten mit IL-1 und TNF, kann allerdings die Produktion von PGE<sub>2</sub> und Kollagenase bei Chondrocyten und synovialen Fibroblasten nicht induzieren [32]. Die in der Synovialflüssigkeit von Arthritikern gefundenen erhöhten IL-6-Spiegel korrelieren mit den serologischen Entzündungsparametern wie BSG und Akutphaseproteinen [11, 32],[Tabelle 3].

## 1.7 IL-8

Die Herstellung von IL-8 findet hauptsächlich in stimulierten Monozyten statt, nicht jedoch in gewebständigen Makrophagen und T-Lymphophyzyten. Hergestellt wird IL-8 u.a. aber auch von Makrophagen, Fibroblasten und Epithelzellen. Stimuliert wird seine Synthese durch IL-1 und den Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$ . Eine Hemmung findet statt durch Glukocorticoide und TGF- $\beta$ . Im Gegensatz zu anderen Zytokinen kann IL-8 spezifisch neutrophile Granulozyten aktivieren. Sehr hohe Konzentrationen von IL-8 finden sich in Psoriasissschuppen, möglicherweise bedingt durch die hohe proliferative Aktivität dieser Zellen. Die Neutrophilenaktivierung könnte eine Einwanderung dieser Zellen in die Kapillaren der Gelenke bewirken, die dann schließlich das Kapillarbett durchdringen und einen ständigen Zustrom von Entzündungszellen ermöglichen [66, 70].

## 1.8 Kollagen abbauende Enzyme, Kollagenasen:

Hierzu gehören die Matrix-Metalloproteinasen (MMP 1, MMP 2 und MMP 9). Matrix-Metalloproteinasen (MMP) sind eine Familie von neun oder mehr hochhomologen  $Zn^{++}$ -Endopeptidasen, die gemeinsam die meisten, wenn nicht alle Bestandteile der extrazellulären Matrix spalten [12]. Die neun Mitglieder der Metalloproteinase-Familien schließen interstitielle Kollagenasen, Stromelysine und Gelatinasen ein [50]. Für die vorliegende Arbeit von Interesse sind besonders die Metalloproteinase-1 (Fibroblasten-Kollagenase) mit einem Molekulargewicht von 57 bzw. 52 kDa. Deren extrazellulären Matrixsubstrate sind Kollagen I, II, III, sowie VII, VIII und X, Gelatine und Proteoglycan core protein. MMP 2 (Gelatinase A) mit einem Molekulargewicht von 72 kDa, deren Substrate sind Kollagen IV, V, VII und X. Das MMP 9 entspricht der

Gelatinase B mit einem Molekulargewicht von 92 kDa. Hier sind die Substrate Gelatine, Kollagen IV und V, Elastin und ebenfalls Proteoglycan core protein.

Von acht humanen Matrix-Metalloproteinasen sind die proteolytischen Aktivitäten nachgewiesen [49]. Die Enzyme teilen eine Reihe von gemeinsamen strukturellen und funktionellen Eigenschaften, unterscheiden sich aber etwas in Form der Substratspezifität. So ist beispielsweise die Fähigkeit, Fibrillen von Kollagen I und II zu spalten (ein Charakteristikum für MMP 1 und MMP 8), anderen Matrix-Metalloproteinasen nicht möglich. Die physiologische Grundlage dieses Unterschiedes ist noch nicht hinreichend untersucht. Ebenso ist die augenscheinliche Redundanz in der Entwicklung der Enzyme mit überlappenden Substratspezifitäten noch nicht endgültig geklärt.

### **1.9 Nicht primär kollagenabbauende Matrix - Proteinase**

Hierunter fallen Stromelysin 1 und 2. Diese entsprechen den MMP 3 bzw. 10. Stromelysin 1 hat ein Molekulargewicht von 60 kDa. Die extrazellulären Matrixsubstrate sind Kollagen IV, V, IX und X. Zusätzlich Proteoglycane, Laminin, Fibronectin, Elastin und Gelatin. Diese Substrate gelten auch für das Stromelysin 2, wobei dies ebenfalls über ein Molekulargewicht von 60 kDa verfügt.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Patienten**

Die vorliegende Arbeit bezieht sich auf die Untersuchung von 77 Patienten mit Gelenkerkrankungen unter Beteiligung mindestens eines Kniegelenkes. Von diesen litten 42 Patienten an einer rheumatoiden Arthritis gemäß den Kriterien des American College of Rheumatologists [6] und 35 an einer primären oder posttraumatischen Gonarthrose entsprechend den Kriterien von Altman et al. [3]. Die Arthritiker waren im Mittel 60 Jahre alt (Bereich 32 bis 83 Jahre), die Arthrotiker 54 Jahre alt (Bereich 25 bis 78 Jahre). Die Erkrankungsdauer wurde bei den Arthritikern in Abhängigkeit von der Erstdiagnose durch einen Arzt festgelegt, bei den Arthrotikern wurde in Ermangelung harter Eingangskriterien hierauf verzichtet. Der Median der Krankheitsdauer bei der Gruppe der Arthritiker betrug 12 Jahre (Bereich 1 - 49 Jahre).

### **2.2 Radiologische Einteilung der Gelenkdestruktionen**

Von sämtlichen untersuchten Patienten lagen aktuelle Röntgenaufnahmen des erkrankten Kniegelenkes im antero-posterioren und seitlichen Strahlengang vor, zusätzlich axiale Aufnahmen der Patella. Das Höchstalter der Aufnahmen betrug 2 Monate. Der Grad der Gelenkdestruktion wurde vom Autor festgestellt, wobei bei den Patienten mit rheumatoider Arthritis die Methode von Larsen [42, 43], bei Patienten mit degenerativer Gelenkerkrankung die Methode von Dahlgren [20] zugrunde gelegt wurde [siehe Tabelle 1].



Tabelle 1:

Stadien-einteilung	Nach Larsen	Nach Dahlgren
1	Diskrete Gelenkspaltverschmälerung, Erosionen unter einem Millimeter Durchmesser.	Geringe Gelenkspaltverschmälerung, subchondrale Sklerosierung.
2	Eine oder mehrere kleine Erosionen, Durchmesser über einem Millimeter, mäßige Gelenkspaltverschmälerung.	Mehr als 50 % Verringerung der Knorpelhöhe.
3	Größere Erosionen, deutliche Gelenkspaltverschmälerung.	100 % Verringerung der Knorpelhöhe.
4	Schwere Erosionen, Gelenkspalt annähernd aufgehoben.	Knochenerosionen < 5mm
5	Mutilationen, komplette Zerstörung der knöchernen Gelenkstrukturen.	Knochenerosionen > 5mm

Stadieneinteilung der Gelenkdestruktionen: Nach Larsen [30] bei Arthritikern, nach Dahlberg [14] bei Arthrotikern

### 2.3 Probengewinnung

Von allen Patienten wurde eine Synovialflüssigkeits-Probe aus dem erkrankten Kniegelenk gewonnen. Dies geschah üblicherweise durch eine Punktion. Die Proben wurden umgehend zentrifugiert (3000 g, 10 Minuten) und der zellfreie Überstand portioniert bei -20° C gelagert.

### 2.4 Messung der Zytokin-Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit

IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  wurden in der SF mit spezifischen ELISAs (Amersham, Braunschweig) in Duplikatbestimmung gemessen. Die Zytokin-Bestimmung wurde unter Nutzung von Test-Kits derselben Charge simultan für alle Synovia-Proben durchgeführt,.

Messungen von je zwei OA- und zwei RA-SF Proben ohne bzw. mit Zugabe des entsprechenden rekombinanten Zytokins aus den Standardreihen ergaben

eine Erfassungsrate ("Recovery") der zugegebenen ("gespiketen") Zytokine von mindestens 72 Prozent.

Die Sensitivität der Testverfahren betrug für IL-1 $\alpha$  0,4 pg/mL, für IL-1 $\beta$  0,5 pg/mL und für TNF- $\alpha$  6 pg/mL.

Der Variationskoeffizient (CV) für die Bestimmung innerhalb eines Kits lag unter 6%, der Variationskoeffizient für die Bestimmung mit verschiedenen Kits unter 11%. Ähnliche oder bessere Reproduzierbarkeit wurden von Amersham mitgeteilt für die IL-1ra und IL-8-ELISAs, die in dieser Untersuchung verwendet wurden.

Daten des Herstellers zeigten die Abwesenheit einer signifikanten Kreuzreaktion zwischen den hier beschriebenen Zytokinen und anderen gleichzeitig untersuchten in allen benutzten Testverfahren. Ergebnisse von Amersham zeigten weiter, daß der TNF- $\alpha$ -ELISA nicht beeinflußt wird durch die Zugabe von löslichen Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren in Konzentrationen bis 200 ng/mL, welche diejenigen übersteigen, die in der Synovia von Patienten gefunden wurden [60].

## 2.5 Enzymbestimmungen

Kollagenase-Aktivität: Alle Proben wurden in der Synovialflüssigkeit in Doppelbestimmung gemessen. Die Kollagenase-Aktivität wurde bestimmt mit [ $^3$ H] Rattenschwanz Typ I Kollagen (DuPont, Bad Homburg, Germany) als Substrat. Markiertes Kollagen (0,5  $\mu$ g) wurde auf Eis mit 70  $\mu$ L eines 20 mM Tris-Puffers, pH 7,6 gemischt, der 5 mM CaCl $_2$  und 0,02 % NaN $_3$  enthielt. Die Inkubationszeit für diese Mischung in Polypropylen-Reaktionsgefäßen betrug 2 Stunden bei 4° C. Anschließend wurden Synovia-Proben zugegeben (20  $\mu$ L) und die Inkubation für weitere 24 Stunden bei 21° C in Anwesenheit einer Endkonzentration von 0,5 mM p-Aminophenyl-Quecksilberacetat (APMA)

fortgesetzt. Anschließend wurde auf auf Eis gekühlt und bei 3000 g für 4 Stunden zentrifugiert. Dann erfolgte die Entnahme eines Aliquots des Überstandes nebst Messung der enthaltenen Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung. Als negative Kontrollen dienten Test-Puffer und Trypsin, als positive clostridiale Kollagenase. Als Einheit für die Ergebnisse wurden Kollagenase-Einheiten gewählt. Eine Einheit entspricht der Menge von Enzym, die 1µg Kollagen pro Minute bei 21° C abbaut.

Eine ähnliche Vorgehensweise wurde für die Bestimmung der nicht primär Kollagen I+II abbauenden Proteinase gewählt, die als Caseinase-Aktivität gemessen wurden. Dabei wurde [<sup>14</sup> C] Casein (Hersteller Amersham, Braunschweig, Germany) als Substrat benutzt. 1,5µg markiertes Casein wurde in Polypropylen-Reaktionsgefäße pipettiert, in denen sich 50 µL eines 20 mM Tris-Puffers (pH 7,6) mit 5 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,02 % NaN<sub>3</sub> befanden. Die Synovia-Proben wurden hinzugefügt und die Reaktionsmischung für 18 Stunden bei 37° C in Anwesenheit einer Endkonzentration von 0,5 mM APMA inkubiert. Die Ausfällung unverdauten Caseins erfolgte durch Zugabe von 100 µL 6%-iger Trichloressigsäure auf Eis. Anschließend wurde auf Eis abgekühlt und bei 3000 g und 4° C über 15 Minuten zentrifugiert. Auch hier wurde ein Aliquot des Überstandes entfernt und die Radioaktivität durch Flüssigszintillationszählung bestimmt. Hier wurden Test-Puffer als negative und Trypsin als positive Kontrollen benutzt. Die Ergebnisse wurden in Caseinase-Einheiten ausgedrückt, wobei eine Einheit derjenigen Enzymmenge entspricht, die 1 µg Casein pro Minute bei 37° C abbaut.

In beiden Protokollen wurde die Aktivierung mit APMA benutzt. Somit weisen diese Testverfahren sowohl latente als auch aktive Formen des entsprechenden Enzyms nach. Der Variationskoeffizient in den Enzymtests für die Bestimmung innerhalb eines Assays lag unter 8%, der Variationskoeffizient für die Bestimmung bei verschiedenen Assays lag unter 18%.

Das C-reaktive Protein im Serum der Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde unter Nutzung eines Nephelometers von Boehringer nach Angaben des Herstellers bestimmt.

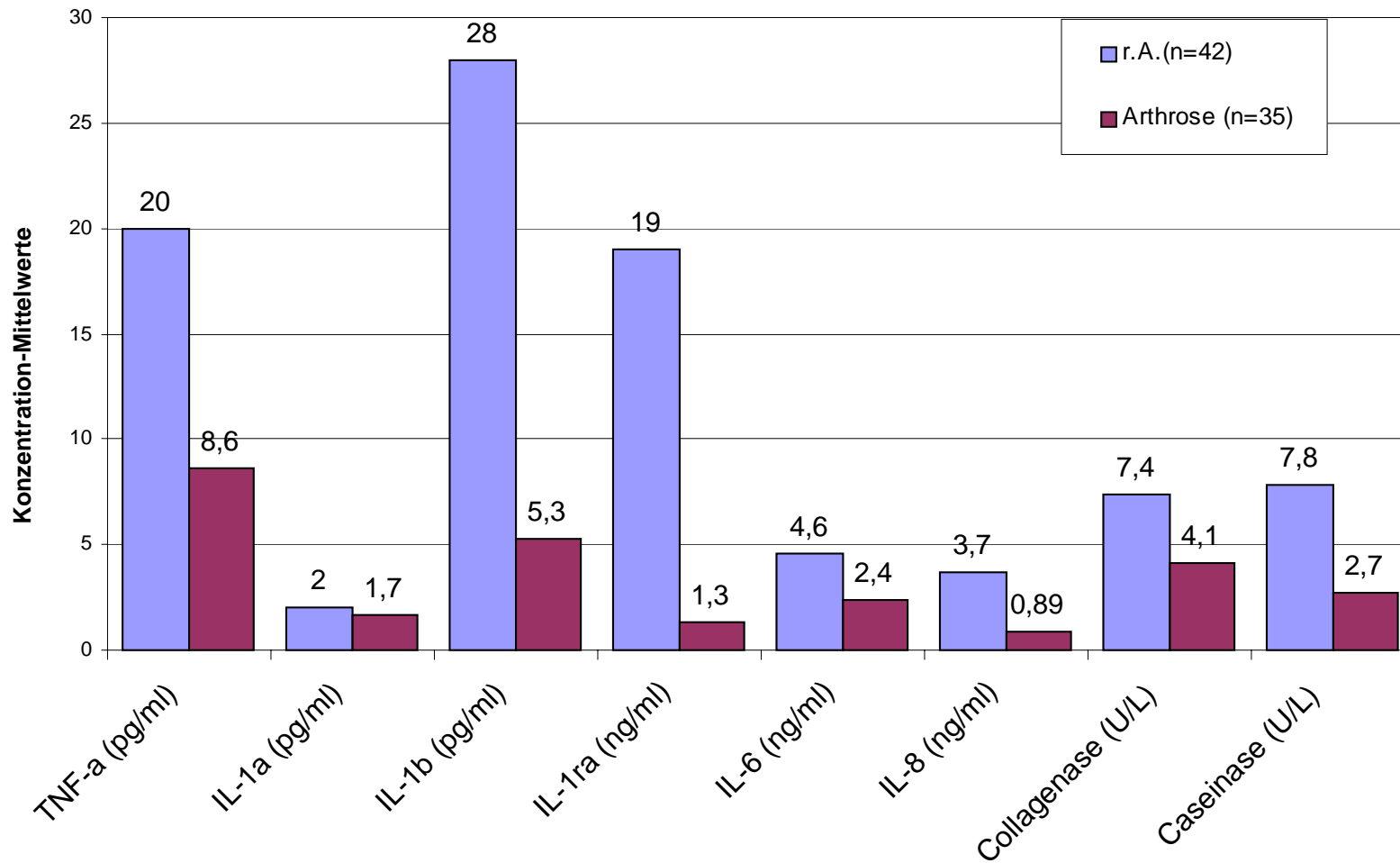
### 3 Ergebnisse

Verglichen wurden die mittels ELISA gemessenen Synovialkonzentrationen von TNF- $\alpha$  und anderen Zytokinen sowie relevante Kollagenasen und Caseinasen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis mit Befall mindestens eines Kniegelenkes und Patienten mit Gonarthrose. Hierbei zeigte sich eine signifikant höhere Konzentration von TNF- $\alpha$  bei der Patientengruppe mit rheumatoider Arthritis [Tabelle 2]. Bei der Bestimmung der Interleukin Konzentrationen ergab sich ein uneinheitliches Bild. Ähnlich signifikant erhöht waren die Konzentrationen von IL-1- $\beta$  und IL-8 sowie die Konzentrationen der Kollagenasen und nicht primär Kollagenase I+II abbauenden Matrix - Proteinase bei den Patienten mit rheumatoider Arthritis gegenüber denen mit Gonarthrose [Abbildung 1].

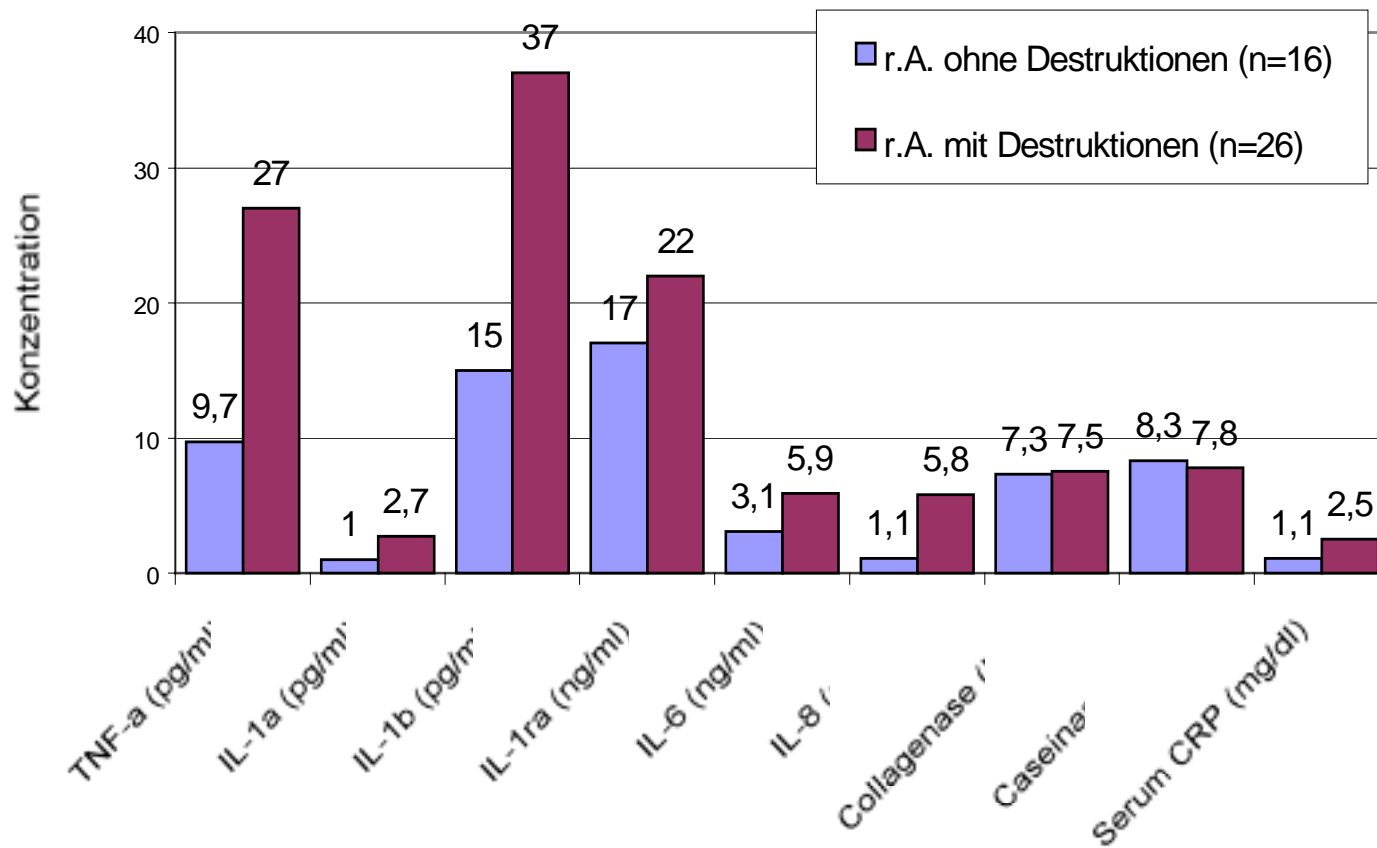
**Tabelle 2**

Synovia-Konzentration	r.A. (n=42) Median	SEM	Arthrose (n=35) Median	SEM	p
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	20,0	4,0	8,6	1,1	<0,001**
IL-1 $\alpha$ (pg/mL)	2,0	0,9	1,7	0,5	0,62
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	28,0	6,0	5,3	1,7	<0,001**
IL-1 ra (ng/mL)	19,0	4,5	1,3	0,3	<0,001**
IL-6 (ng/mL)	4,6	1,0	2,4	1,2	0,036
IL-8 (ng/mL)	3,7	1,2	0,89	0,3	<0,001**
Kollagenase(U/L)	7,4	0,5	4,1	0,3	<0,001**
Caseinase (U/L)	7,8	0,7	2,7	0,6	<0,001**

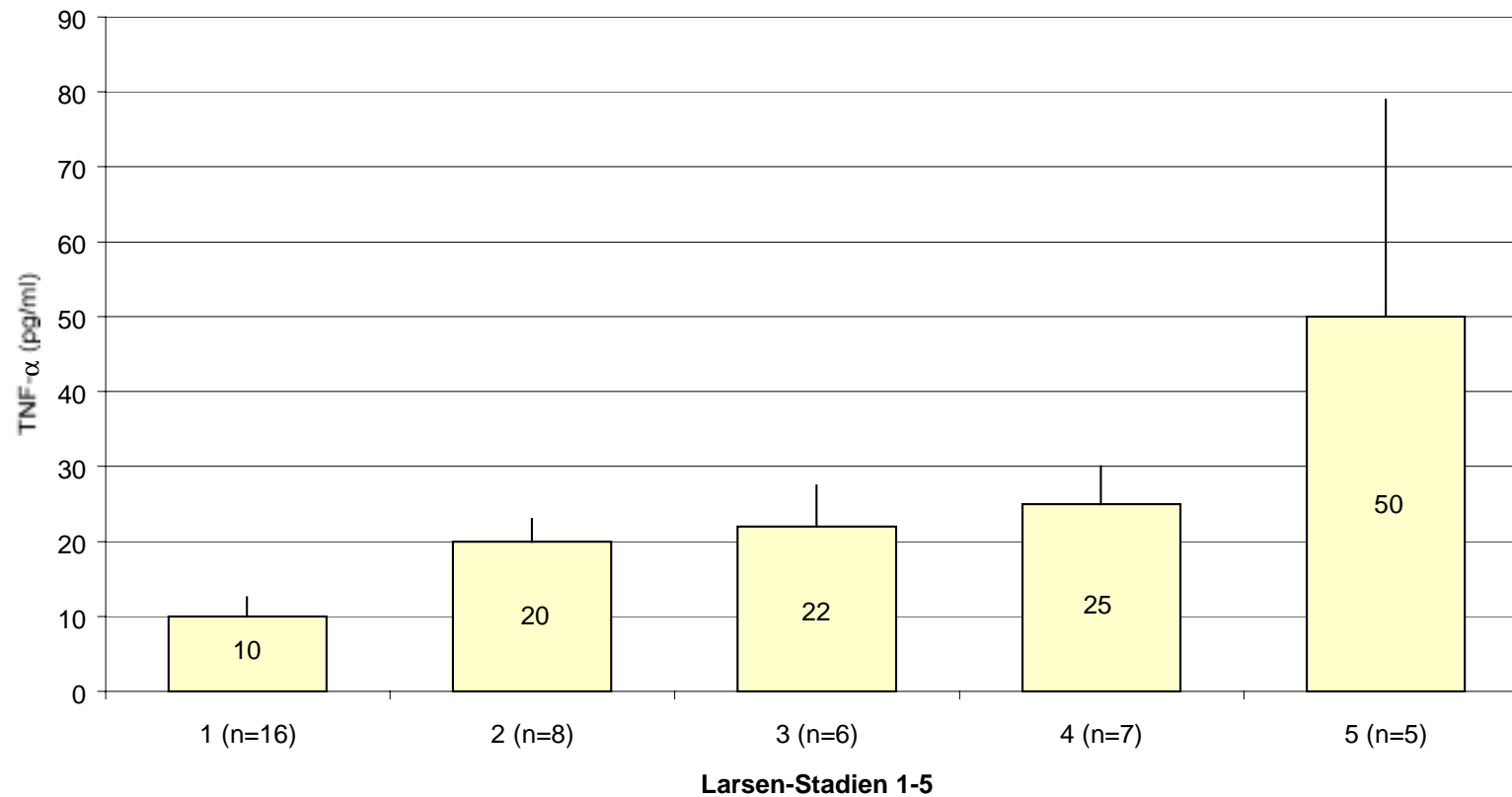
Konzentrationen von Cytokinen und Enzym-Aktivitäten in der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Arthrose. \*\*: Signifikant bez. p<0,01-level (Mann Whitney U- Test, ergänzt durch Bonferroni-Korrektur für multiples Testen)



**Abbildung 1:** Konzentration von Cytokinen und Enzym-Aktivitäten in der Synovia bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und Arthrose



**Abbildung 2:** Konzentration von Cytokinen und Enzym-Aktivitäten in der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis



**Abbildung 3:** Konzentration von TNF- $\alpha$  in den Kniegelenken von 42 Patienten mit rheumatoider Arthritis im Verhältnis zu den radiologischen Befunden dieser Gelenke entsprechend der Einteilung nach Larsen [30; Tabelle 1]. Die Balken entsprechen den Medianen, die Fehlerbalken den Standardabweichungen (SEM) der angegebenen Zahl an Patienten. ( $p < 0,05$  gegenüber der Larsen Einteilung (T-Test)).



Von allen gemessenen Parametern unterschied sich der Synoviaspiegel des IL-1ra am stärksten zwischen der Arthritis- und der Arthrosegruppe. In der Gruppe der Arthritiker fand sich ein annähernd vierzehnfach erhöhter Spiegel an IL-1ra im Vergleich zur Synovia der Arthrotiker. Demgegenüber waren weder bei IL-1- $\alpha$  noch IL-6 höhere Konzentrationen nachweisbar [Tabelle 2].

Somit sind die Konzentrationen der meisten Zytokine und Enzyme in der Arthritisgruppe höher als in der Arthrosegruppe.

Innerhalb der Gruppe mit rheumatoider Arthritis wurden zwischen Patienten mit und ohne radiologisch nachweisbaren Knochendestruktionen differenziert [Abbildung 2]. Es zeigte sich, dass TNF- $\alpha$  und IL-1ra in der Gruppe mit diagnostizierten Knochenerosionen signifikant erhöht waren, während die anderen Zytokine nicht damit korrelierten [Tabelle 3].

**Tabelle 3:**

Synoviakon- zentration	r.A. ohne ossäre Destr. (n=16) Median	SEM	r.A. mit ossären Destr. (n=26) Median	SEM	p
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	9,7	2,4	27,0	6,2	<0,001**
IL-1 $\alpha$ (pg/mL)	1,0	0,4	2,7	1,5	0,38
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	15,0	5,0	37,0	10,0	0,12
IL-1 ra (ng/mL)	17,0	9,0	22,0	5,0	0,051
IL-6 (ng/mL)	3,1	1,1	5,9	1,4	0,12
IL-8 (ng/mL)	1,1	0,3	5,8	2,1	0,046
Kollagenase (U/L)	7,3	0,8	7,5	0,6	0,77
Caseinase (U/L)	8,3	1,2	7,8	0,9	0,65
Serum-CRP (mg/dL)	1,1	0,4	2,5	0,57	0,064

Konzentration von Zytokinen und Enzym-Aktivitäten in der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis mit und ohne radiologisch nachweisbare ossäre Destruktionen

Für Patienten mit rheumatoider Arthritis, bei denen bereits knöcherne Destruktionen der betroffenen Gelenke radiologisch entsprechend den Stadien II–V nach Larsen [Tabelle 1] nachweisbar waren, ergaben sich weniger eindeutige Ergebnisse. Hier zeigte sich nur der TNF- $\alpha$  signifikant erhöht, korrelierte somit mit dem Grad der Knochendestruktion [Abbildung 3]. Demgegenüber waren weder IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6, IL-8 noch Kollagenasen und nicht primär Kollagen I+II abbauende Matrix - Proteinase erhöht nachweisbar. Auch das Serum CRP und die Dauer der Erkrankung an der rheumatoiden Arthritis spielte keine nennenswerte Rolle ( $r$  0.16,  $p$  0,26 ; Spearman's Rang Korrelation).

Keine signifikanten Korrelationen fanden sich zwischen den Konzentrationen der gemessenen Zytokine und Enzyme sowie dem Serum-CRP und den radiologisch nachweisbaren degenerativen Veränderungen klassifiziert nach der Einteilung nach Dahlgren [Tabelle 4].

Die Mediandauer der rheumatoiden Arthritis betrug 12 Jahre (Bereich 1 - 49 Jahre) bei nicht nachweisbaren Knochenerosionen und 13 Jahre (Bereich 5 - 33 Jahre) mit Knochenerosionen ( $p$  0.99, Mann-Whitney U-Test).

Untersucht man die Konzentration von TNF- $\alpha$  in der Synovia der an rheumatoider Arthritis erkrankten Patienten im Zusammenhang mit dem Body Mass Index ergibt sich eine negative Korrelation ( $r$ - 0,38,  $p$  0,015; Spearman's Rang Korrelation), je höher der TNF- $\alpha$  Spiegel war, desto geringer war der Body Mass Index. Eine vergleichbare Situation fand sich bei den degenerativ Erkrankten mit einer ebenfalls negativen Korrelation.

**Tabelle 4**

	<b>Radiologische Einteilung der Gelenkdestruktionen</b>			
	Einteilung nach Larsen r.A. Gruppe (n 42)		Einteilung nach Dahlgren Arthrosegruppe (n 35)	
Synovialkonzentration	r	p	r	p
TNF- $\alpha$ (pg/mL)	0,55	<0,005*	-0,13	0,49
IL-1 $\alpha$ (pg/mL)	0,12	0,46	-0,09	0,64
IL-1 $\beta$ (pg/mL)	0,25	0,08	-0,06	0,74
IL-1 ra (ng/mL)	0,27	0,09	-0,22	0,23
IL-6 (ng/mL)	0,20	0,20	-0,19	0,29
IL-8 (ng/mL)	0,28	0,12	-0,02	0,93
Kollagenase(U/L)	0,02	0,90	-0,31	0,09
Caseinase (U/L)	0,13	0,41	-0,19	0,30
Serum-CRP (mg/dL)	0,30	0,071		

Konzentrationen von Cytokinen und Enzym-Aktivitäten in der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Arthrose, jeweils bezogen auf die radiologischen Befunde der betreffenden Gelenke, in der Arthritis-Gruppe von Larsen [30], in der Arthrose-Gruppe von Dahlgren [14]. Daten aufbereitet nach Spearmans Rang-Korrelation.

r: Rang-Koeffizient.

\* : Signifikant bez.  $p < 0,05$  level, Spearmans Rang-Korrelation, ergänzt durch Bonferroni – Korrektur für multiples Testen.

#### **4. Diskussion**

Wenn Knochenerosionen kleiner Gelenke im Laufe einer r.A. auftreten, geschieht dies üblicherweise während der ersten 2 Jahre nach Diagnosestellung und ist als Hinweis auf eine schlechte Prognose zu deuten [33]. Die Annahme, daß die Knochendestruktion auch in größeren Gelenken früh beginnt, wird durch die erhobenen Daten von Mittel- bis Endstadium r.A.-Patienten unterstützt, wobei sich keine signifikanten Unterschiede in der Krankheitsdauer zwischen Patienten mit oder ohne erosive Knochenveränderungen der Kniegelenke ergaben. Die vergleichsweise niedrige Sensitivität einer Röntgenuntersuchung für die Bestimmung von Knochendestruktionen in größeren Gelenken muß bei der Interpretation natürlich berücksichtigt werden [19].

Um erosive Gelenkveränderungen bei rheumatoider Arthritis zu verhüten oder zu mildern, wird zunehmend ein früher Einsatz von DMARD's befürwortet [33, 74], wenn nichtsteroidale antiinflammatorische Medikamente den Entzündungsprozeß nicht ausreichend kontrollieren. Berücksichtigt man mögliche schwere Nebenwirkungen der DMARD's, so scheint die Identifikation prognostischer Kriterien wünschenswert, die die Entscheidung über eine entsprechende medikamentöse Therapie erleichtern würde. Bedauerlicherweise ist es bisher kaum möglich, früh diejenigen r.A.-Patienten, die schließlich Knochenerosionen entwickeln, von denjenigen zu trennen, bei denen dies nicht der Fall sein wird.

Die Daten dieser Querschnittsstudie legen nahe, daß r.A.-Patienten mit Knochenerosionen höhere TNF- $\alpha$ -Spiegel aufweisen als Patienten ohne erosive Destruktionen. IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1ra, IL-6 und IL-8 tendierten zwar auch zu höheren Werten in der Synovia von Gelenken mit Knochenerosionen, aber diese

Tendenzen waren nicht signifikant. Ähnliches gilt für das Serum-CRP der Patienten [Tabelle 3].

Diese Ergebnisse unterstützen die Annahmen von Brennan und Mitarbeitern [14], daß der TNF- $\alpha$  eine besondere Stellung in dem Zytokin-Netzwerk einnimmt, welches in die Gelenkzerstörung bei rheumatoider Arthritis involviert ist. Andererseits könnten Gelenkveränderungen, die sich im Verlauf der r.A. entwickeln, wie z.B. Knochenerosionen, ortsständige Zellen im Synovialgewebe dazu anregen, vermehrt TNF- $\alpha$  freizusetzen.

Die gesamte Synovia-Kollagenase- bzw. Caseinase-Aktivität unterschied sich nicht zwischen r.A.-Patienten mit oder ohne erosive Knochenbeteiligung. Die Synovia der Arthritiker wies aber einen deutlich höheren Enzymspiegel auf, als die Synovia der Arthrotiker [Tabelle 2].

Der Caseinase-Test erfaßt Stromelysin unter anderen Proteasen [73]. Ob Proteasen, die in r.A.-Synovia enthalten sind, maßgeblich am Prozeß der Knochenresorption beteiligt sind, muß noch untersucht werden.

Obwohl zahlreiche Untersucher Zytokine in der Synovia von Patienten mit r.A. gemessen haben, gibt es nur wenige Versuche, die Resultate mit dem Grad der Knochendestruktion zu korrelieren, entweder im Allgemeinen oder in dem bestimmten Gelenk, in dem die Synoviaprobe entnommen wurde.

Di Giovine und Mitarbeiter [23] sowie Mannami et al. [40] fanden keine Assoziation zwischen Knochenerosion und IL-1 $\alpha$  in der Synovia bei rheumatoider Arthritis, was mit den vorliegenden Resultaten übereinstimmt.

Fong und Mitarbeiter [28] dagegen berichteten über erhöhte IL-1 $\alpha$ -Synoviaspiegel bei 8 r.A.-Patienten mit Knochenerosionen verglichen mit 20 r.A.-Patienten ohne erosive Beteiligung. In dieser Studie wurden allerdings Patienten der "Knochenerosions"-Gruppe zugerechnet, wenn typische

Knochendestruktionen auf Röntgenbildern irgend eines Gelenkes beobachtet wurde, nicht notwendigerweise bei dem Gelenk, von dem die Synoviaprobe entnommen worden war. Fong und Mitarbeiter [28] bestimmten auch TNF- $\alpha$  in ihren r.A.-Synoviaprobe, fanden aber keinen Unterschied zwischen Patienten mit oder ohne Knochenerosionen. Außerdem differierten die TNF- $\alpha$ -Synoviaspiegel nicht zwischen ihren Arthrose- und r.A.-Patienten, was von den Beobachtungen anderer Untersucher abweicht, welche entweder TNF in der Synovialflüssigkeit bestimmten oder aber die Expression von TNF durch Arthrose- und r.A.-Synovialgewebe [26, 37, 39]. Unterschiede zwischen den Daten der vorliegenden Arbeit und den Befunden von Fong [28] sind vermutlich Unterschieden im Studiendesign sowie einer unterschiedlichen Zahl untersuchter Patienten zuzuschreiben [8, 54, 68].

Grom und Mitarbeiter [31] fanden eine signifikante Erhöhung von TNF- $\alpha$ , TNF- $\beta$  und ihren Rezeptoren in der Synovia besonders bei Patienten mit juveniler rheumatoider Arthritis und juveniler Spondylitis ankylosans. Hermann und Mitarbeiter [35] berichteten von erheblich streuenden Werten bei der Messung von IL-1 Aktivitäten in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis und Psoriasisarthritis.

Kahle et al. [39] beschrieben deutlich höhere TNF- $\alpha$  Synoviaspiegel bei Kniegelenken Verstorbener (ohne Kenntnis einer möglichen entzündlichen Grunderkrankung) gegenüber der Synovia lebender Patienten mit einer nachgewiesenen rheumatischen Gonitis. Die Wertigkeit von Untersuchungen an tierischen Gelenken ist bei im Vergleich zu humanem Gewebe verringerter Empfindlichkeit z.B. des Schweineknorpels u.a. gegen IL-1 nicht sicher einzuschätzen [53].

Es ist schwierig, zu möglichen zusätzlichen methodischen Unterschieden Stellung zu nehmen, da in keiner der oben zitierten Studien [23, 40, 28] Daten

zur Verfügung gestellt wurden, ob oder nicht lösliche TNF-Rezeptoren oder IL-1ra möglicherweise die benutzten Testsysteme für TNF- $\alpha$  oder IL-1 beeinflusst haben könnten.

Bei den möglichen bekannten Differenzen in den Ergebnissen verschiedener Testsysteme werden Zytokin-Bestimmung in der Synovialflüssigkeit von einigen Autoren kritisch beurteilt.

Da die Zentrum-zu-Zentrum Reproduzierbarkeit sogar bei identischen Testsystemen schlecht sein kann, sind entsprechende Daten möglicherweise nur voll vergleichbar mit Ergebnissen, die mit demselben Testsystem in demselben Labor erhoben wurden.

Synovia-Zytokin-Spiegel, die hier vorgelegt werden, waren im selben Bereich wie vergleichbare veröffentlichte Daten der Konsensus-Studie des European Workshop for Rheumatology Research [61]. Es wurden außerdem im allgemeinen höhere Zytokin-Konzentrationen in r.A.-Synovia als in Arthrose-Synovia gefunden, was die Befunde von anderen bestätigt [23, 37, 40, 46, 60].

Keine signifikanten Unterschiede in Synovia-Zytokin-Spiegeln wurden zwischen rheumafaktorpositiven Patienten und seronegativen r.A.Erkrankten gemessen, was eine Störung der benutzten ELISA-Systeme durch Rheumafaktor unwahrscheinlich macht (Daten nicht gezeigt). Die Recovery von IL-1 $\beta$  oder TNF- $\alpha$ , welches in Synovia „gespiked“ wurde, war in dieser Untersuchung etwas höher als in der Konsensus-Studie [61]. Dies mag damit zusammenhängen, daß im vorliegenden Falle die Proben unmittelbar nach dem Spiken gemessen wurden, während in der Konsensus-Studie das Material nach dem Spiken vor dem Versand zunächst noch einmal eingefroren und später wieder aufgetaut wurde.

Es muß beachtet werden, daß Synovia-Konzentrationen von Mediatoren und Enzymen weder die direkten Zell-zu-Zell-Interaktionen widerspiegeln, noch

autokrine oder parakrine Stoffwechselwege. Diese Daten reflektieren möglicherweise nur zum Teil örtliche Konzentrationen auf der Oberfläche von angrenzenden Knochen, der von Pannusgewebe bedeckt sein kann [18].

Zytokin-Spiegel in der Synovialflüssigkeit schwanken überdies in der Zeit [40]. Es muß außerdem beachtet werden, daß Zytokin-Bestimmungen in der vorliegenden Studie mit immunologischen Proben durchgeführt wurden und daß die resultierenden Daten möglicherweise nicht die Bioaktivität dieser Mediatoren widerspiegeln. Die Bioaktivität von TNF- $\alpha$  wird vermutlich durch das TNF/TNF-sR-Verhältnis beeinflusst, so daß zukünftige Erweiterungen der hier vorgelegten Arbeit auch die Messung von TNF-sR einschließen sollte. Andere Faktoren, welche die TNF- $\alpha$ -Bioaktivität beeinflussen, schließen IL-1 ein, von dem gezeigt wurde, daß es die Bindung von TNF- $\alpha$  an TNF-sR verstärkt [69].

Bevor Daten von Längsschnittuntersuchungen zur Verfügung stehen, sollten Ergebnisse von Querschnittstudien nicht überbewertet werden.

Querschnittstudien, wie die hier vorgelegte, können aber möglicherweise Parameter identifizieren helfen, die eine prognostische Bedeutung im Frühstadium einer r.A. haben. Diese Parameter sollten dann in Längsschnittstudien evaluiert werden, um ihre klinische Relevanz näher zu bestimmen. Aus den Ergebnissen ist zu schließen, daß die Synovia-Konzentration von TNF- $\alpha$  ein geeigneter Kandidat für eine solche Studie sein könnte, somit auch ein möglicher weiterer Ansatz in der Therapie rheumatischer Gelenkerkrankungen [27]. Unterstützt wird dies zum Beispiel durch Daten von Maini und Mitarbeitern, die nach Injektionen von monoklonalen TNF-Antikörpern in Gelenke von DBA 1 Mäusen mit kollageninduzierter Arthritis eine Verlangsamung der entzündlichen Zerstörung nachwiesen [44].



## 5. Abkürzungen

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
Ala	Alanin
APMA	Aminophenyl-Quecksilberacetat
BAF	B-Cell aktivating factor = Interleukin-1 $\alpha$
BMI	Body Mass Index
CRP	C-reaktives Protein
CD	Cluster of Determination
CV	Variationskoeffizient
DMRD	Disease modifying antirheumatic drugs
ELISA	Enzyme linked sorbent assay
EP	Endogenous pyrogen
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor
HLA	Histokompatibilitätsantigen
IL	Interleukin
kDA	KiloDalton
LAF	Lymphocyte activating factor = Interleukin-1 $\alpha$
OAF	Osteoclast activating factor = Interleukin-1 $\beta$
PAF	Platelet activating factor
PDGF	Platelet derived growth factor
PGE	Prostaglandin E
r.A.	Rheumatoide Arthritis
R.A.	Rezeptor Antagonist
S.R.	Soluble receptor
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
Val	Valin

## **6. Zusammenfassung**

Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob die Konzentration von Zytokinen und Matrix-abbauenden Enzymen in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder Arthrose assoziiert ist mit dem Grad der Knochendestruktion in demselben Gelenk.

Bestimmt wurden die Konzentrationen von IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-Rezeptor-Antagonist, IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  mit ELISA sowie die Kollagenase-Aktivität und die nicht primär Kollagen I+II abbauenden Matrix-Proteinasen mit Substrattests in der Kniesynovia von Arthritikern (n=42) und Gonarthrotikern (n=35).

Der Grad der Knochendestruktion wurde radiologisch bestimmt.

Die gemessenen Zytokin- und Enzymspiegel waren in der Arthritisgruppe höher als in der Arthrosegruppe. In der Arthritisgruppe waren die Synoviaspiegel des TNF- $\alpha$  positiv korreliert mit dem Grad der Knochendestruktion des entsprechenden Gelenkes. Keine Korrelation wurde gefunden zwischen der radiologisch nachgewiesenen Knochendestruktion und den Synovialkonzentrationen der übrigen Zytokine, Enzymen, dem Serum-CRP sowie der Dauer der Erkrankung. In der Arthrosegruppe bestanden keine Assoziationen zwischen den untersuchten Parametern und dem Grad der Gelenkzerstörungen. Die Untersuchungsergebnisse stützen die Annahme, daß TNF- $\alpha$  eine wichtige Rolle bei der Gelenkzerstörung der rheumatoiden Arthritis spielt.

## 7 Literaturverzeichnis:

1. Alsalameh S., Firestein GS., Oez S., Kurrle R., Kalden JR., Burmester GR.: Regulation of granulocyte macrophage colony stimulating factor production by human articular chondrocytes. Induction by both tumor necrosis factor-alpha and interleukin 1, downregulation by transforming growth factor beta and up-regulation by fibroblast growth factor [published erratum appears in J. Rheumatol. 1994,(9): 1785] J. Rheumatol. 1994,(6): 993-1002
2. Alsalameh S., Kalden JR., Burmester GR.: Die Rolle von Zytokinen und Wachstumsfaktoren bei der rheumatoiden Gelenkdestruktion. Z. Rheumatologie 1991, 50: 347-359
3. Altman R., Asch E., Bloch D., Bole G., Borenstein D. et al.: Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the knee. Arthritis Rheum. 1986, 29: 1039-1049
4. Arend WP., Dayer JM.: Cytokines and Growth Factors, Textbook of Rheumatologie, Chapter 13, Herausgeber Kelly W.N., Harris E.D., Ruddy S., Sledge C.B. Verlag W.B. Saunders, Philadelphia, 4. Auflage, 1993: 227-247
5. Arend WP., Joslin FG., Thompson RC., Hannum CH.: An interleukin 1 inhibitor from human monocytes: Production and characterization of biological properties. J. Immunol. 1989, 143: 1851-1858
6. Arnett FC., Edworthy SM., Bloch DA. et al.: The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. Arthritis Rheum. 1986, 31: 315-324
7. Auron PE., Webb AC., Rosenwasser LJ., Mucci SF., Rich A., Wolff SM., Dinarello CA.: Nucleotide sequence of human monocyte interleucine precursor cDNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1984, 81: 7907-7911
8. Bendtzen K., Petersen J., Halkjaer-Kristensen J., Ingemann-Hansen T.: Interleukin-1-like activities in synovial fluids of patients with rheumatoid arthritis and traumatic synovitis. Rheumatol. Int. 1985, 5: 79-82
9. Bertolini D., Nedwin G., Bringman T., Mundy G. Stimulation of bone resorption and inhibition of bone formation in vitro by human tumour necrosis factor. Nature 1986, 319: 516-518
10. Beutler B., Greenwald D., Hulmes JD., Chang M., Pan YC., Mathison J., Ulevitch R., Cerami A.: Identity of tumour necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin. Nature 1985, Aug 8, 316 (6028): 552-554
11. Bhardwaj N., Santhanam U., Lau LL. et al.: IL-6/IFN $\beta^2$  in synovial effusions of patients with rheumatoid arthritis and other arthritides: identification of several isoforms and studies of cellular sources. J. Immunol. 1989, 143: 2153-2159
12. Birkedal-Hansen H., Moore, WGI., Bodden MK., Windsor LJ., Birkedal-Hansen B., DeCarlo A., Engler JA.: Critical Reviews in Oral Biology and Medicine 1993, 4(2): 197-250
13. Boyce B., Aufdemorte T., Garret I., Yates A., Mundy G.: Effects of interleukin-1 on bone turnover in normal mice. Endocrinology 1989, 125: 1142-1150

14. Brennan FM., Maini RN., Feldman M.: TNF-alpha – A pivot role in rheumatoid arthritis? *Br. J. Rheumatol.* 1992, 31: 293-298
15. Burger D., Chicheportiche R., Giri JG., Dayer JM.: Inhibitory activity of human interleukin-1 receptor antagonist is enhanced by type 2 IL-1 soluble receptor and hindered by type 1 IL-1 soluble receptor. *J. Clin. Invest.* 1995, 96: 38-41
16. Bunning RA., Rusell RG.: The effect of tumor necrosis factor alpha and gamma-interferon on the resorption of human articular cartilage and on the production of prostaglandin E and of caseinase activity by human articular chondrocytes. *Arthritis-Rheum.* 1989, Jun. 32 (6): 780-784
17. Campbell IK., Novak U., Ceon J., Layton JE., Hamilton JA.: Human articular cartilage and chondrocytes produce hemopoietic colony-stimulating factors in culture in response to IL-1. *J.-Immunol.* 1991, Aug. 15, 147 (4): 1238-1246
18. Chu CQ., Field M., Allard S., Abney E., Feldman M., Maini RN.: Detection of cytokines at the cartilage/pannus junction in patients with rheumatoid arthritis: implications for the role of cytokines in cartilage destruction and repair. *Br. J. Rheumatol.* 1992, (10): 653-661
19. Cuchacovich M., Couret M., Peray P., Gatica H., Sany J.: Precision of the Larsen methods of assessing radiologic change in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis-Rheum.* 1992, Jul. 35 (7): 736-739
20. Dahlgren L., Ryd L., Heinegard D., Lohmander LS.: Proteoglycan fragments in joint fluid: Influence of arthrosis and inflammation. *Acta Orthop. Scand.* 1992, 63: 417-423
21. Dayer JM., Beutler B., Cerami A.: Cachectin/tumor necrosis factor stimulates collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub> production by human synovial cells and dermal fibroblasts. *J. Exp. Med.* 1985, 162: 2163-2168
22. Dayer JM., Derochemonteix B., Burrus B. et al.: Human recombinant interleukin-1 stimulates collagenase and prostaglandin E<sub>2</sub> production by human synovial cells. *J. Clin. Invest.* 1986, 77: 645-648
23. Di Giovine FS., Poole S., Situnayake RD., Wadhwa M., Duff GW.: Absence of correlations between indices of systemic inflammation and synovial fluid interleukin 1 (alpha and beta) in rheumatic diseases. *Rheumatol. Int.* 1990, 9: 259-264
24. Dinarello CA.: Interleukin-1 and its biological related cytokines. *Adv. Immunol.* 1989, 44: 153-205
25. Eastgate JA., Symons JA., Wood NC., Grinlinton FM., di Giovine FS., Duff GW.: Correlation of plasma interleukin 1 levels with disease activity in rheumatoid arthritis. *Lancet* 1988, II: 706-709
26. Farahat MJ., Yanni G., Poston R., Panayi GS.: Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1993, 52: 870-5
27. Feldmann M., Brennan FM., Elliott M., Katsikis P., Maini RN.: TNF-alpha as a therapeutic target in rheumatoid arthritis. *Circ. Shock* 1994, 43(4): 179-184

28. Fong KY., Boey ML., Koh WH., Feng PH.: Cytocine concentrations in the synovial fluid and plasma of rheumatoid arthritis patients: Correlations with bone erosions. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1994, 12: 55-58
29. Garrett I., Black K., Mundy GR.: Interactions between interleukin-6 and interleukin-1 in osteoclastic bone resorption in neonatal mouse calvariae. *Calcif. Tissue Int.* 1990, 46 Suppl 2: 140
30. Gery I., Walksman BH.: Potentiation of the T-lymphocyte response to mitogenes. II The cellular source of potentiating mediators. *J. Exp. Med.* 1972, 136: 143-155
31. Grom AA., Murray KJ., Luyrink L., Emery H., Passo M. H., Glass DN., Bowlin T., Edwards C. 3<sup>rd</sup>.: Patterns of expression of tumor necrosis factor alpha, tumor necrosis factor beta, and their receptors in synovia of patients with juvenile rheumatoid arthritis and juvenile spondylarthropathy. *Arthritis-Rheuma.* 1996, 39(10): 1703-1710
32. Guerne PA., Zuraw BL., Vaughan JH., Carson DA., Lotz M.: Synovium as a source of interleukin 6 in vitro: contribution to local and systemic manifestations of arthritis. *J. Clin. Invest.* 1989, 83: 585-592
33. Harris ED.: Treatment of rheumatoid arthritis. In WN Kelly et al., Eds., *Textbook of Rheumatology*, 4<sup>th</sup> edition, WB Saunders, Philadelphia PA, 1993
34. Heath JK., Saklatvala J., Meicle MC., Atkinson SJ., Reynolds JJ.: Pig interleukin-1 is a potent stimulator of bone resorption in vitro. *Calcif. Tissue Int.* 1986, 37: 95-97
35. Hermann E., Vogt P., Hagmann W., Dunky A., Müller W.: Synoviaspiegel von Interleukin-1 und C3a bei chronischer Polyarthritits, Psoriasisarthritits und aktivierter Arthrose. *Zeitschrift für Rheumatologie* 1988, 47: 20-25
36. Hermus AR., Sweep CG.: Cytokines and the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 1990, 37 (6): 867-871
37. Hopkins SJ., Meager A.: Cytocines in synovial fluid: II. The presence of tumor necrosis factor and interferon. *Clin. Exp. Immunol.* 1988, 73: 88-92
38. Horton J., Raisz L., Simmons H., Oppenheim J., Mergenhagen S.: Bone resorbing activity in supernatant fluid from cultured human peripheral blood leucocytes. *Science* 1972, 177: 793-795.
39. Kahle P., Saal JG., Schaudt K., Zacher J., Fritz P., Pawelec G.: Determination of cytokines in synovial fluids: correlation with diagnosis and histomorphological characteristics of synovial tissue. *Ann. Rheum. Dis.* 1992, 51: 731-734
40. Mannami K., Mitsuhashi T., Takeshita H., Okada K.: Concentrations of Interleukin- $\beta$  in serum and synovial fluid in patients with rheumatoid arthritis and those with osteoarthritis. *J. Jpn. Orthop. Assoc.* 1989; 63: 1343-1352
41. Kirkham B.: Interleukin 1, immune activation pathways and different mechanisms in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.* 1991, 50: 395-400
42. Larsen A.: How to Apply Larsen Score in Evaluating Radiographs of Rheumatoid Arthritis in Longterm Studies? *J. Rheumatol.* 1995, 22: 10
43. Larsen A., Dale K., Eek M.: Radiographic evaluation of rheumatoid arthritis and related conditions by standard reference films. *Acta Radiol.* 1977, 18: 481-491

44. Maini RN., Brennan FM., Williams R., Chu CQ., Cope AP., Gibbons D., Elliott M., Feldmann M.: TNF- $\alpha$  in rheumatoid arthritis and prospects of anti-TNF therapy. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1993, 11 (Suppl. 8): 173-175
45. Malfait AM., Verbruggen G., Veys EM., Lamber J., De Ridder L., Cornelissen M.: Comparative and Combined Effects of Interleukin 6, Interleukin 1 $\beta$ , and Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  on Proteoglycan Metabolism of Human Articular Chondrocytes Cultured in Agarose. *The J. Rheumatol.* 1994, 21(2): 314-320
46. Miller VA., Rogers K., Muirden KD.: Detection of tumor necrosis factor alpha and interleukin-1 beta in the rheumatoid osteoarthritic cartilage-pannus junction by immunohistochemical methods. *Rheumatol. Int.* 1993, 13: 77-82
47. Mitchell PG., Cheung HS.: Tumor necrosis factor alpha and epiderma growth factor regulation of collagenase and stromelysin in adult porcine articular chondrocytes. *J. Cell. Physiol.* 1991, 149: 132-140
48. Mohamed-Ali H.: Influence of interleukin-1 beta, tumour necrosis factor alpha and prostaglandin E<sub>2</sub> on chondrogenesis and cartilage matrix breakdown in vitro. *Rheumatol. Int.* 1995, 15: 191-199
49. Mundy GR.: *Tumor Necrosis Factor: The Molecules and their Emerging Role in Medicine.*: Bruce Beutler. Raven Press. Ltd.,New York 1992
50. Nagase H., Barrett AJ., Woessner JF., et al.: MMP numbering, *Matrix Spec. Supp.* 1992, 1: 421-424
51. Neidel J., Schulze M., Sova L., Lindschau J.: Praktische Bedeutung der Zytokinbestimmung im Gelenkpunktat von Patienten mit Arthrosen oder rheumatischen Arthritiden. *Z. Orthop.* 1996, 134
52. Neidel J., Zeidler U.: Independent effects of interleukin-1 on proteoglycan synthesis and proteoglycan breakdown of bovine articular cartilage in vitro. *Agents Actions* 1993, 39: 82-90
53. Nietfeld JJ., Wilbrink B., Den Otter W., Huber J., Huber-Brunning O.: The Effect of Human Interleukin 1 on Proteoglycan Metabolism in Human and Porcine Cartilage Explants. *J. Rheumatol.* 1990, 17: 818-826
54. Nouri AME., Panayi GS., Goodman SM.: Cytokines and the chronic inflammation of rheumatic disease. I. The presence of interleukin-1 in synovial fluids. *Clin. Exp. Immunol.* 1984, 55: 295-302
55. Pelletier JP., Roughley PJ., DiBattista JA., McCollum R., Martel-Pelletier J.: Are cytokines involved in osteoarthritic pathophysiology? *Semin. Arthritis Rheuma.* 1991, 20(6 Suppl. 2): 12-25
56. Pfeilschifter J., Chenu C., Bird A., Mundy GR., Roodman GD.: Interleukin-1 and tumor necrosis factor stimulate the formation of human osteoclast-like cells in vitro. *J. Bone Min. Res.* 1989, 4: 113-118
57. Reboul P., Pelletier JP., Tardif G., Cloutier JM., Martel-Pelletier J.: The new collagenase, collagenase-3, is expressed and synthesized by human chondrocytes but not by synoviocytes. A role in osteoarthritis. *J. Clin. Invest.* 1996, 97: 2011-2019

58. Roodmann G., Takahashi N., Bird A., Mundy GR.: Tumor necrosis factor  $\alpha$  (TNF) stimulates formation of osteoclast-like cell (OCL) in long term marrow cultures by stimulating production of interleukin-1 (IL-1). *Clin. Res.* 1987, 35: 515A.
59. Roux-Lombard P., Modoux C., Dayer JM.: Inhibitors of IL-1 and TNF- $\alpha$  activities in synovial fluids and cultured synovial fluid cell supernatants. *Calif. Tissue Int.* 1988, 42: A47
60. Roux-Lombard P., Punzi L., Hasler F., Bas S., Todesco S., Gallati H., Guerne PA., Dayer JM.: Soluble tumor necrosis factor receptors in human inflammatory synovial fluids. *Arthritis Rheum.* 1993, 36: 485-489
61. Roux-Lombard P., Steiner G.: Preliminary report on cytokine determination in human synovial fluids: a consensus study of the European Workshop for Rheumatologie Research. *Clin. Exp. Rheumatol.* 1992, 10: 515-520
62. Saklatvala J.: Tumor necrosis factor  $\alpha$  stimulates resorption and inhibits synthesis of proteoglycan in cartilage. *Nature* 1986, 332: 547-549
63. Saxne T., Palladino MA Jr., Heinegard T., Talal N., Wollheim FA.: Detection of tumor necrosis factor  $\alpha$  but not tumor necrosis factor  $\beta$  in r.A. synovial fluid and serum. *Arthritis Rheum.* 1988, 31: 1041-1045
64. Seid JM., Rahman S., Graveley R., Bunning RA., Nordmann R., Wishart W., Russell RG.: The Effect of Interleukin-1 on Cytokine Gene Expression in Cultured Human Articular Chondrocytes analyzed by Messenger RNA Phenotyping. *Arthritis Rheum.* 1993, 36: 35-43
65. Shinmei M., Masuda K., Kikuchi T., Shimomura Y.: The role of cytokines in chondrocyte mediated cartilage degradation. *J.-Rheumatol. Suppl.* 1989, 18: 32-34
66. Smith, WB., Gamble JR., Clark-Lewis I., Vadas MA.: Interleukin 8 induces neutrophil transendothelial migration. *Immunology* 1991, 72: 65-72
67. Suffeys P., Van RF., Fiers W.: Tumor necrosis factor and interleukin 1 activate phospholipase in rat chondrocytes. *FEBS Lett.* 1988, 232: 24-28
68. Tanabe BK., Abe LM., Kimura LH., Reinker KA., Yamage KM.: Cytokine mRNA repertoire of articular chondrocytes from arthritic patients, infants, and neonatal mice. *Rheumatol. Int.* 1996, 16: 67-76
69. Taylor DJ.: Cytokine combinations increase p75 tumor necrosis factor receptor binding and stimulate receptor shedding in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum. Dis.* 1993, 37: 232-235
70. Terkeltaub R., Zachariae C., Santoro D., Martin J., Peveri P., Matsushima K.: Monocyte-derived neutrophil chemotactic factor/interleukin-8 is a potential mediator of crystal-induced inflammation. *Arthritis Rheum.* 1991, 34: 894-903
71. Tessier P., Audette M., Cattaruzzi P., McCall SR.: Up-regulation by tumor necrosis factor alpha of intercellular adhesion molecule 1 expression and function in synovial fibroblasts and its inhibition by glucocorticoids. *Arthritis Rheum.* 1993, 11:1528-1539
72. Thomas BM., Mundy GR., Chambers TJ.: Tumor necrosis factor alpha and beta induce osteoblastic cells to stimulate osteoclast bone resorption. *J. Immunol.* 1987, 138: 775-80

73. Treadwell BV., Neidel J., Pavia M., Towle CA., Trice ME., Mankin HJ.: Purification and Characterization of Collagenase Activator Synthesized by Articular Cartilage. Arch. Biochem. Biophys. 1986, 251: 715-723
74. Yu M., Zhang L., Shi L.: IL-1 and TNF-alpha bioassay and PGE<sub>2</sub> immunoassay of supernatant of cultured synovia in patients with rheumatic diseases. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao 1994, 16: 192-196