

**Knochenresorption: Licht-, rasterelektronenmikroskopische
und molekularbiologische Untersuchungen am Modell des
humanen, spongiösen Knochens und der aseptisch gelockerten
Hüftendoprothese**

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Carsten Gentzsch
aus Hamburg

Hamburg 2003

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. G. DELLING

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Professor Dr. L. RENWRANTZ

Tag der Disputation: 06. Dezember 2002

Hamburg, den 22. November 2002



Professor Dr. U. Wienand
Dekan

Inhaltsverzeichnis

| | |
|---|----|
| Abkürzungen | IV |
| 1. Einleitung | 1 |
| 2. Material und Methoden | 11 |
| 2.1 Material..... | 11 |
| 2.2 Medien..... | 11 |
| 2.3 Fixation..... | 12 |
| 2.4 Probenpräparation..... | 12 |
| 2.5 Lichtmikroskopie..... | 13 |
| 2.5.1 Histologie..... | 13 |
| 2.5.1.1 Einbettungen..... | 13 |
| 2.5.1.1.1 Einbettung in Methylmethacrylat..... | 13 |
| 2.5.1.1.2 Einbettung in Paraffin..... | 15 |
| 2.5.1.2 Mikrotomie..... | 16 |
| 2.5.1.3 Histologische Färbungen..... | 16 |
| 2.5.1.3.1 Die Giemsa-Färbung..... | 16 |
| 2.5.1.3.2 Die Goldner-Färbung..... | 17 |
| 2.5.1.3.3 Die HE-Färbung..... | 19 |
| 2.5.1.3.4 Die Toluidinblau O-Färbung..... | 20 |
| 2.5.2 3D-Lichtmikroskopie..... | 20 |
| 2.5.2.1 Einbettung in Technovit..... | 21 |
| 2.5.2.2 Herstellung von Schliffpräparaten..... | 22 |
| 2.5.2.3 Die Kossa-Färbung..... | 22 |
| 2.5.3 Histomorphometrie..... | 23 |
| 2.5.4 Lichtmikroskopische Abbildungen..... | 24 |
| 2.6 Rasterelektronenmikroskopie..... | 24 |
| 2.6.1 Herstellung von Dentin-Chips..... | 25 |
| 2.6.2 Kritisch-Punkt Trocknung..... | 25 |
| 2.6.3 Gold-Sputter..... | 26 |
| 2.6.4 Rasterelektronenmikroskopische Abbildungen..... | 27 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.7 | Die Methode der cDNA-Arrays..... | 27 |
| 2.7.1 | Materialgewinnung..... | 28 |
| 2.7.2 | Single-Step RNA-Isolierung..... | 28 |
| 2.7.3 | Bestimmung der RNA-Konzentration..... | 29 |
| 2.7.4 | Agarose-TAE-Minigelelektrophorese..... | 29 |
| 2.7.5 | DNase Verdau..... | 31 |
| 2.7.6 | PCR..... | 31 |
| 2.7.7 | RT-PCR..... | 33 |
| 2.7.8 | Anreicherung der mRNA..... | 35 |
| 2.7.9 | Herstellung von radioaktiv-markierten cDNA-Sonden..... | 36 |
| 2.7.10 | Säulenchromatographie..... | 37 |
| 2.7.11 | Hybridisierung der cDNA-Arrays..... | 37 |
| 2.7.12 | Analyse der cDNA-Arrays..... | 39 |
| 2.7.13 | Strippen der cDNA-Arrays..... | 39 |
| 2.8 | Verifikation der cDNA-Arrays..... | 40 |
| 2.8.1 | cDNA-Synthese..... | 40 |
| 2.8.2 | Gel-Extraktion..... | 41 |
| 2.8.3 | Ligation..... | 41 |
| 2.8.4 | Transformation..... | 42 |
| 2.8.5 | Klonanalyse..... | 43 |
| 2.8.6 | Plasmid-Miniprep..... | 44 |
| 2.8.7 | Sequenzierung..... | 45 |
| 2.8.8 | Real-Time PCR..... | 46 |
| 2.9 | Bezugsquellen..... | 48 |
| 3. | Ergebnisse..... | 50 |
| 3.1 | Resorptionslakunen und Perforationen..... | 50 |
| 3.1.1 | Auswahl der Patienten..... | 50 |
| 3.1.2 | Histologie..... | 50 |
| 3.1.3 | Dreidimensionale Lichtmikroskopie..... | 53 |
| 3.1.4 | Rasterelektronenmikroskopie..... | 54 |
| 3.1.4.1 | Systematik..... | 62 |
| 3.1.5 | Histomorphometrie..... | 65 |
| 3.1.6 | Lokalisation von Resorptionslakunen..... | 67 |

| | | |
|-----------|--|------------|
| 3.1.6.1 | Resorptionstypen und ihre Lokalisation..... | 70 |
| 3.1.6.2 | Altersabhängige Lokalisation von Resorptionslakunen..... | 72 |
| 3.1.6.3 | Altersabhängige Verteilung der Resorptionstypen..... | 74 |
| 3.2 | Aseptische Lockerung von Endoprothesen..... | 76 |
| 3.2.1 | Auswahl der Materials..... | 76 |
| 3.2.2 | cDNA-Arrays..... | 78 |
| 3.2.3 | Real-Time PCR..... | 82 |
| 4. | Diskussion..... | 86 |
| 4.1 | Morphologie der Resorptionslakunen und Perforationen..... | 86 |
| 4.2 | Quantifizierung der Resorptionslakunen..... | 90 |
| 4.3 | Histomorphometrie – Vergleich mit den Literaturwerten..... | 91 |
| 4.4 | Histomorphometrie – Vergleich mit den REM-Werten..... | 92 |
| 4.5 | Lokalisation der Resorptionslakunen (nach Typ, Geschlecht, Alter)..... | 94 |
| 4.6 | cDNA-Arrays..... | 97 |
| 5. | Ausblick..... | 102 |
| 6. | Zusammenfassung..... | 103 |
| 7. | Literaturverzeichnis..... | 106 |
| | Danksagung..... | 118 |

| | |
|----------------------------------|--|
| 1 x | 1-fach konzentriert |
| Abb. | Abbildung |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| BMU | Bone Multicellular Unit |
| bp | Basenpaar |
| BPO | Benzoylperoxid |
| BV/TV | Bone Volume/Trabecular Volume |
| CAGB | Calgranulin B |
| CALA | Calgranulin A |
| cpm | counts per minute |
| DEPC | Diethylpyrocarbonat |
| DNA | Desoxyribonucleine Acid |
| dNTP | Desoxyribonukleotidtriphosphat |
| dT | Desoxythymidin |
| DTT | Dithiotreitol |
| E-Cup | Eppendorf-Reaktionsgefäß |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| ES/BS | Eroded Surface/Bone Surface |
| et al. | et alteri |
| FR | Flächige Resorptionslakunen |
| FW | Feldweite (hier: Bildbreite) |
| g | Erdbeschleunigung (9,81m/s ²) |
| GAPDH | Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase |
| GC-Gehalt | Guanidin-Cytosin-Gehalt |
| H ₂ O _{dest} | Destilliertes Wasser |
| IGFBP-6 | Insuline-like Growth Factor-Binding Protein-6 |
| IL-10 | Interleukin-10 |
| kp | Kilobasen |
| LM | Lichtmikroskop |
| LP | Lakunäre Perforation |
| LR | Longitudinale Resorptionslakunen |
| MCP-1 | Monocyte Chemotactic Protein-1 |
| MIF | Macrophage Migration Inhibitory Factor |
| Mip1- α | Macrophage Inflammatory Protein 1 alpha |
| MMA | Methylmethacrylat |
| n | Probenumfang |
| n. b. | nicht bestimmt |
| NO | Stickstoffmonoxyd |
| OD | Optische Dichte |
| ODF | Osteoclast Differentiation Factor |
| OPGL | Osteoprotegerin Ligand |
| PBS | Phosphat Buffered Saline |
| PCR | Polymerase Chain Reaction |
| PH | Phosphat |
| PHA | Phytohemagglutinin |
| PMMA | Polymethylmetacrylat |
| RAI | Ribonuclease/Angiogenin Inhibitor |
| RANKL | Receptor Activator of NF κ B Ligand |
| RANTES | Regulated on Activation Normal T-Cell-Expressed & Secreted Protein |
| REM | Rasterelektronenmikroskop |

| | |
|--------|---|
| RL | Resorptionslakune |
| RNA | Ribonucleine Acid |
| RSB | RNA Storage Buffer |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Sodiumdodecylsulfat |
| SSC | Sodium Chloride/Sodium Citrate |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-Acetat-EDTA |
| TDGF1 | Teratocarcinoma-Derived Growth Factor 1 |
| THYB10 | Thymosin Beta 10 |
| Ti | Titan |
| TNFR2 | Tumor Necrosis Factor Receptor 2 |
| TP | Tunnellierende Perforation |
| TRANCE | Tumor Necrosis Factor-Related Activation-Induced Cytokine |
| TRAP | Tartratresistente Acid Phosphatase |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |
| U | Unit [$\mu\text{mol}/\text{min}$] |
| Upm | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |
| v/v | volume per volume |
| w/v | weight per volume |
| X-Gal | 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- β -D-Galactosid |

1. Einleitung

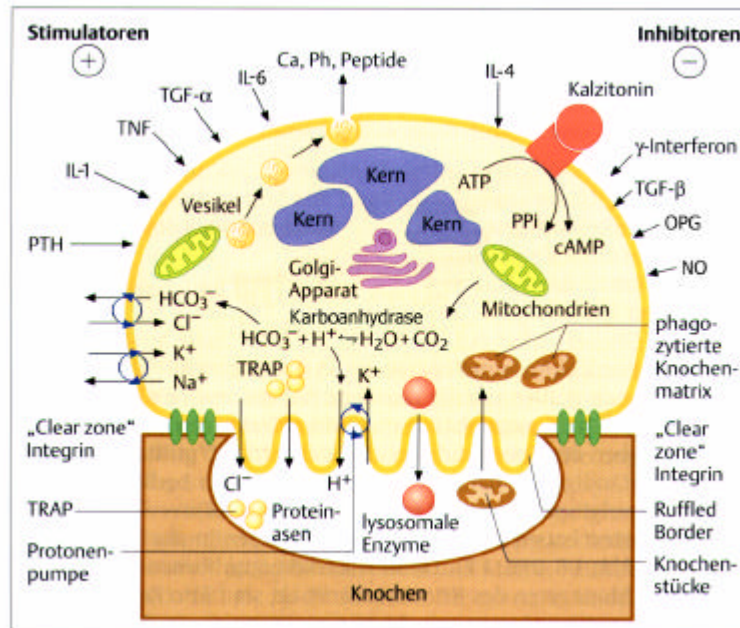
Das menschliche Skelett besteht aus 220 Knochen. Jeder dieser Knochen lässt sich strukturell in eine kompakte Rinde, der sogenannten Kortikalis und ein inneres Netzwerk aus Balken und Stäben (Spongiosa, trabekulärer Knochen) einteilen. Der Knochen entwickelt sich während der Embryogenese aus dem Mesoderm, wobei zusammenhängende Stränge embryonalen Bindegewebes die Lokalisation der künftigen Knochen vorgeben. Die Umwandlung dieses mesenchymalen Gewebes in Knochengewebe (Ossifikation) kann direkt durch desmale Ossifikation oder indirekt durch enchondrale Ossifikation erfolgen (Olsen et al., 2000; Sommerfeldt und Rubin, 2001).

Nach seiner Entwicklung erfüllt der Knochen die vielfältigsten strukturellen und metabolischen Funktionen. Durch seine mechanische Stabilität trägt er den menschlichen Körper, verleiht ihm seine Gestalt und schützt innere Organe vor Verletzung. Gleichzeitig bietet er den Muskeln eine Ansatzfläche und ermöglicht so Bewegungen. Darüber hinaus stellt er den größten Kalziumspeicher des Menschen dar und ist über dessen Bereitstellung an der Aufrechterhaltung des Kalziumgleichgewichts beteiligt. Schließlich erneuert er sich in regelmäßigen Abständen selbst, besitzt nach einer Fraktur die Fähigkeit zur Regeneration und kann sich außerdem geänderten mechanischen Belastungen anpassen (Jones et al., 1984).

Aufgebaut wird der Knochen von den aus undifferenzierten mesenchymalen Zellen gebildeten kubischen Osteoblasten, die das Osteoid, eine Kollagen-Glycosamino-Glycan Matrix, sezernieren, welches die zunächst noch weiche Knochengrundsubstanz darstellt. Durch die Einlagerung von Kalziumphosphat und Kalziumkarbonat (Hydroxylapatit) sowie ihrer Kristallisation entlang der Kollagenfasern kommt es zur Mineralisation des Osteoid und damit zur Härtung des neuentstandenen Knochens (Ohnsorge, 1970; Mavrakos und Vrotsos, 1988). In regelmäßigen Abständen von Osteoid eingehüllte und später im Knochengewebe eingeschlossene Osteoblasten differenzieren zu Osteozyten. Diese sind nicht mehr teilungsfähig und arm an Mitochondrien besitzen dafür jedoch sehr viele, ein signalweiterleitendes Netzwerk bildende zytoplasmatische Fortsätze, über die sie untereinander und mit der Knochenoberfläche verbunden sind. Osteozyten fungieren als Sensoren für die mechanische Belastung des Knochengewebes (Cowin et al., 1991; Aarden et al., 1994; Burger et al., 1995). Terminal differenzierte Osteoblasten überziehen als ausgestreckte sogenannte „lining cells“ die Oberfläche des spongösen Knochens und bilden dort end- und periostale Zellschichten (Zamboni Zallone et al., 1984).

Die den Knochen abbauenden Osteoklasten sind multinukleäre Zellen hämatopoetischen Ursprungs. Bipotente Vorläufer, die sowohl Osteoklasten als auch Monozyten und Makrophagen bilden können, differenzieren zu mononukleären Osteoklasten-Vorläufern, die dann zu multinukleären Osteoklasten fusionieren. Osteoklasten teilen sich nicht und sterben nach einer gewissen Zeit durch Apoptose (Suda et al., 1992; Reddy und Roodman, 1998; Greenfield et al., 1999). Die osteoklastäre Differenzierung wird vom Colony Stimulation Factor-1 (CSF1), von verschiedenen Transkriptionsfaktoren (c-Fos, Mikrophthalmia Genprodukt, c-Src, c-Cbl, NF κ B) sowie von parakrinen Faktoren (Hormone: Parathyroidhormon, Prostaglandin; Zytokine: TRANCE (RANKL, OPGL, ODF), IL-1, -6, -11; Vitamin D) bestimmt (Amling und Dellings, 1996; Reddy und Roodman, 1998). Die regulierende Wirkung der parakrinen Faktoren wird indirekt über einen Zell-Zell Kontakt der Osteoblasten mit den Osteoklasten vermittelt (Martin und Ng, 1994). Der Zellkontakt zu osteoblastären Stromazellen ist für die Differenzierung der Osteoklasten essentiell (Yasuda et al., 1998; Yasuda et al., 1998a). Die Resorptionsaktivität der reifen Osteoklasten wird durch verschiedenste Stimulatoren (IL-1, IL-6, TGF- α , TNF, PTH) und Inhibitoren (IL-4, Kalzitinin, γ -Interferon, TGF- β , OPG) reguliert. Der Zellkörper von resorbierenden Osteoklasten ist im rasterelektronenmikroskopischen Bild klar vom Substrat (kalzifizierte Strukturen s. u.) abgrenzbar. Eine zentral gelegene, domförmige Kappe zeigt eine büstensaumähnliche Begrenzung (ruffled border), die das extrazellulär gelegene Resorptionskompartiment umgibt. Voraussetzung für die Bildung dieses Kompartiments ist die Anheftung des Osteoklasten auf der Knochenoberfläche. Dabei kommt es in der sogenannten „sealing zone“ zu einer integrinvermittelten Interaktion zwischen der Plasmamembran des Osteoklasten und der Knochenmatrix (Marchisio et al., 1984). Dieser Bereich des mit einem Abstand von 0,2 nm bis 0,5 nm engsten Kontakts zur Knochenoberfläche erscheint weitgehend frei von Zellorganellen, weshalb er auch als „clear zone“ beschrieben wurde. Feine filopodienartige Fortsätze fixieren die Osteoklasten auf der Knochenoberfläche und ermöglichen es ihnen, sich aktiv über die Knochenoberfläche zu bewegen. Dabei sind die Osteoklasten abgeflacht und lassen keine deutliche Zellgrenze erkennen (Kanehisa und Heersche, 1988). Osteoklasten bewegen sich mit einer Geschwindigkeit von 30-248 $\mu\text{m}/\text{h}$ und zeigen eine Resorptionsrate von 43-1225 $\mu\text{m}^3/\text{h}$ (Kanehisa und Heersche, 1988). Sie unterbrechen ihre Bewegung bevorzugt an bestehenden Resorptionslakunen und an Rändern von Blutgefäßen, durch welche sie als monozytäre Vorläufer in den Knochen gelangen, um dort zu fusionieren und ihre Resorptionsaktivität zu beginnen (Kanehisa und

Heersche, 1988). Physiologisch resorbieren Osteoklasten neben Knochen auch andere kalzifizierte Strukturen wie Knorpel, Dentin und den Zahnschmelz (Jones et al., 1984). Der Bürstensaum begrenzt einen Bereich, dessen Bedingungen die Knochenresorption begünstigen. Die eingefaltete, fingerartige Plasmamembran des Bürstensaums besitzt integrale Ionentransportsysteme (H^+ -ATPasen), die im Bereich unter dem Bürstensaum einen sauren pH-Wert erzeugen (Silver et al., 1988). Die dazu benötigten Protonen werden in einer von der Karboanhydrase katalysierten Hydratation des von Mitochondrien freigesetzten Kohlendioxids bereitgestellt. Ein niedriger pH-Wert ermöglicht die Mobilisierung der Knochenminerale. Über den Bürstensaum sezernierte lysosomale Enzyme und Proteinase (Cystein-Proteinase, TRAP, Kathepsine, Kollagenasen, Metalloproteinase) zersetzen unter diesen Bedingungen die organische Knochenmatrix (Suda et al., 1992; Sasaki et al., 1993; Teitelbaum et al., 1997; Blair, 1998; Gay und Weber, 2000; Hentunen et al., 2000; Kornak et al., 2000; Saftig et al., 2000; Kornak et al., 2001). Die dabei entstehenden Abbauprodukte werden über den Prozess der Transzytose aus dem Resorptionskompartiment durch den Osteoklasten in den extrazellulären Raum transportiert (Nesbitt und Horton, 1997). Die Osteoklastenaktivität lässt ovale oder zirkuläre Pits, Vertiefungen in der Knochenoberfläche, entstehen, die zu Resorptionslakunen (Howship Lakunen) erweitert werden können (Jones und Boyde, 1993). Resorptionslakunen bestehen aus vielen aneinandergrenzenden Pits und können eine nierenförmige Gestalt besitzen (Reid, 1986). Diese ist Ausdruck des Auftretens von Wellen sukzessiver Resorptionsaktivität. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass das Volumen der Resorptionslakunen variiert (Boyde und Jones, 1991). Größere, mehrkernige Osteoklasten lassen größere und mehr Resorptionslakunen entstehen als kleinere Osteoklasten mit weniger Zellkernen (Piper et al., 1992). Die Tiefe der Resorptionslakunen ist umgekehrt proportional zum Mineralisationsgrad des Knochens, d. h. je niedriger der Mineralisationsgrad des Knochens, desto tiefer resorbieren die Osteoklasten (Reid, 1986; Boyde und Jones, 1991; Boyde und Jones, 1996).



Quelle: Eigene Darstellung in Anlehnung an Bartl, 2001

Schematische Übersicht des Osteoklasten

PTH: Parathormon; IL-1,4,6: Interleukin-1,4,6; TNF: Tumornekrosefaktor; TGF- α,β : Transforming Growth Factor- α,β ; OPG: Osteoprotegerin; TRAP: Tatreresistente saure Phosphatase; Ruffled Border: Bürstensaum

Der menschliche Knochen ist kein starres, totes Gebilde, sondern vielmehr ein lebendes Gewebe, dessen Fähigkeiten erst durch das regulierte Zusammenspiel dieser verschiedenen Zelltypen ermöglicht werden. Der Knochen befindet sich in einem dynamischen Umbauprozess, dessen Ziel neben der Knochenerneuerung und -regeneration die Anpassung an geänderte lokale Belastungssituationen und damit der Erhalt einer größtmöglichen Stabilität ist (Mosekilde, 1993; Melsen et al., 1996). In einer als Remodelling bezeichneten Abfolge wird der Knochen zunächst durch die Osteoklasten abgebaut (Marie et al., 2000). Anschließend schaffen Osteoblasten die Voraussetzung zur Bildung neuen Knochens. Diese aus der osteoklastären und der osteoblastären Zellaktivität zusammengesetzte sogenannte Basic Multicellular Unit (BMU) „patrolliert“ entlang der Knochenoberfläche (Ott, 1996). Verschiebt sich das durch die Kopplung der Knochenresorption mit der -formation aufrechterhaltene Gleichgewicht, kann es zur Ausbildung von metabolischen, die Knochenstabilität verändernden Knochenerkrankungen kommen. Nimmt die Anzahl der Resorptionslakunen infolge eines gestörten Knochenmetabolismus zu, können die dadurch hervorgerufenen Veränderungen der Knochenmikrostruktur das Frakturrisiko in den besonders stark belasteten Regionen des menschlichen Skeletts, wie etwa den Schenkelhälsen oder den Wirbelkörpern, erheblich erhöhen. Dieses Krankheitsbild der Osteoporose verursacht jährlich weltweit etwa zwei Millionen Oberschenkelhalsbrüche. Es wird angenommen, dass ungefähr 10 % der

Bevölkerung von dieser systemischen Skeletterkrankung betroffen sind. In Deutschland zählt die Osteoporose zu den unterdiagnostizierten und untertherapierten Krankheiten, was die Zahlen von nur 1,5 Millionen diagnostizierten und 1,2 Millionen behandelten Osteoporosen bei geschätzten 7 Millionen Osteoporose-Patienten belegen. Die Stabilität von Knochen wird u.a. durch ihre Masse bestimmt. Sie erreicht bei Menschen im Alter zwischen 25 und 35 Jahren ihren maximalen Wert, der bei Männern 20 – 25 % über dem der Frauen liegt, und nimmt dann mit zunehmendem Alter ab (Arnold et al., 1966; Parfitt et al., 1983; Mosekilde, 2000). Verantwortlich für diese Abnahme ist eine gegenüber der Osteoklastenaktivität ab dem 40. Lebensjahr zunehmend defizitärer werdende Osteoblastenaktivität (Parfitt, 1984; Parfitt, 1984a). Hinzu kommt während der Menopause eine durch den fallenden Östrogenspiegel verstärkte Osteoklastenaktivität. Diese kann sich in tieferen Resorptionslakunen und/oder einer erhöhten Remodellingrate manifestieren (Thomsen et al., 1994). Neben der Knochenmasse ist die Mikroarchitektur des Knochens für seine Stabilität von entscheidender Bedeutung (Ulrich et al., 1999; Van der Linden et al., 2001; Van der Linden et al., 2001a). Die Stabilität der Röhrenknochen wird nicht nur durch die Dicke der sie begrenzenden Kortikalis bestimmt, sondern ist in ihren Kondylen vielmehr vom Vernetzungsgrad des sie ausfüllenden spongiösen Knochens abhängig. Der Vernetzungsgrad seinerseits ist wiederum abhängig vom Verhältnis der den spongiösen Knochen aufbauenden Platten und Stäbe. In stärker mechanisch beanspruchten Knochenregionen findet sich ein höherer Vernetzungsgrad und damit eine dichtere Spongiosastruktur, der entsprechend der lokalen Belastung in Druck- und Zugtrajektorien angeordneten spongiösen Platten und Stäbe. Wird während des Remodellingzykluses ein spongiöser Stab in seiner Kontinuität unterbrochen (Perforation), hat dies weitreichende Konsequenzen. Es kommt zu einer Entkopplung der Knochenresorption von der – formation, da Osteoblasten nur auf vorhandenem Knochen neue Knochenmatrix anbauen können (Delling et al., 1988; Delling, 1989). Darüber hinaus kommt es zum Strukturverlust, denn die entstandenen sogenannten freien Enden unterliegen keiner mechanischen Beanspruchung mehr und werden deshalb durch osteoklastäre Resorption eliminiert (Amling und Delling, 1996). Solche Perforationen entstehen auch in plattenartiger Spongiosa und sind die Ursache für die mit dem Alter zunehmende Umwandlung der platten- in stabartige Spongiosa und letztlich für die Abnahme des Vernetzungsgrades (Vogel et al., 1993). Der zunehmende Verlust von horizontalen Trabekeln führt zu einer exponentiellen Abnahme der Knochenstabilität, da diese die druckbelasteten vertikalen Trabekel vernetzen (Bell et al., 1967; Mosekilde, 1989; Van der

Linden et al., 2001a). Der Osteoklast hat somit als einzige knochenresorbierende Zelle einen direkten Einfluss auf die Stabilität des Knochens. Jede Resorptionslakune stellt eine Diskontinuität im Knochen dar, die zu einer lokalen Erhöhung der Belastung führt und damit seine Stabilität gefährdet (Dempster, 2000). Resorptionslakunen lassen sich bereits bei geringer Vergrößerung im Lichtmikroskop nachweisen. Bei genauerer Betrachtung histologischer Präparate deuten sich mikrostrukturelle Unterschiede zwischen den Resorptionslakunen hinsichtlich ihrer Tiefe und Ausdehnung an. Die Korrelation dieser lichtmikroskopischen Beobachtungen mit den Ergebnissen der rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung von Knochenproben aus humanen Hüftköpfen bildete die Grundlage für die vorliegende Studie. Die gegenüber dem Lichtmikroskop erheblich höhere Auflösung des Rasterelektronenmikroskops erlaubt die morphologische Charakterisierung der Resorptionslakunen und Perforationen auf mikrostruktureller Ebene und liefert neue Erkenntnisse über diese die Stabilität des Knochens gefährdenden Diskontinuitäten. Neben ihrer Morphologie und Anzahl ist die Lokalisierung dieser Diskontinuitäten auf den Platten und Stäben des spongiosen Knochens für seine Stabilität von entscheidender Bedeutung und war somit Gegenstand weiterer Untersuchungen. Das Rasterelektronenmikroskop bietet mit einer Schärfentiefe von bis zu 1 nm die besten Voraussetzungen, um die Lokalisierung der typisierten Resorptionslakunen in den unterschiedenen Arealen auf den Platten und Stäben zu bestimmen. Alle erhaltenen Ergebnisse wurden auf eine alters- oder geschlechtsspezifische Abhängigkeit analysiert.

Ein forciertes osteoklastäres Knochenabbau ist nicht nur für das Krankheitsbild der Osteoporose verantwortlich, sondern spielt auch bei der aseptischen Lockerung von Endoprothesen eine bedeutende Rolle. Mit mehr als 6 Mio. Eingriffen stellt das vor über 40 Jahren erstmals implantierte künstliche Hüftgelenk eine der am häufigsten eingesetzten Endoprothesen dar (Bourne und Rorabeck, 1999). Allein in Europa werden jährlich 500000 dieser aus den Gleitpartnern Hüftkopf (mit Stielprothese) und Hüftpfanne bestehenden Implantate eingebaut. In den 60er Jahren waren es hauptsächlich Infektionen, die zu einem Versagen dieser Prothesen führten. Heute ist die aseptische Lockerung in den meisten Fällen der Auslöser für die notwendige Wechseloperation. Trotz intensiver Bemühungen ist es bislang nicht gelungen, die Ursache dieses Lockerungsprozesses aufzuklären. In der Vergangenheit wurde versucht, die Standzeit von Endoprothesen durch eine Variation des verwendeten Materials, ihrer Form und einer verbesserten Einbringung des von John Charnley in die Hüftendoprothetik für eine formschlüssige Kraftübertragung

eingeführten Knochenzementes zu verlängern. Die Gleitpartner der ersten Hüft-Endoprothesen um 1950 bestanden aus Stahl, der wenig später (1956) durch die bis in die Gegenwart verwendeten Chrom-Cobalt-Legierungen ersetzt wurde. John Charnley vergrößerte 1962 mit der Einführung von Polyethylen (PE) in die Endoprothetik ebenso wie der 1970 erstmals dokumentierte Einbau eines Keramik Implantates die Vielfalt der für die Konstruktion der Gleitpartner geeigneten Werkstoffe (Boutin, 2000). Die Gleitpaarung aus einer weichen (PE) Pfanne und einem harten (Metall) Hüftkopf erzielte die längsten Standzeiten, weshalb diese auch als „goldener Standard“ bezeichnet wird (Malchau, 1998). Doch auch die Kombination von Gleitpartnern aus verschiedenen Materialien konnte das Problem der aseptischen Lockerung nicht beseitigen. Parallel dazu wurde versucht, die Langzeitresultate der Implantation durch eine Veränderung der Prothesenform weg vom ursprünglichen Vollmantelgradstil hin zum anatomisch adaptiven Design und zum Zentraliser zu verbessern. Darüber hinaus sollte über eine definierte Oberflächenbeschaffenheit (poliert, aufgeraut, beschichtet) des Hüftstils eine verbesserte Kraftübertragung auf den Zement bzw. bei unzementierten Hüftstilen eine schnellere und effektivere Osseointegration erzielt werden (Sauer, 1988; Davies et al., 1992). Erst der Einsatz moderner Zementiertechniken (Jetlavage, Markraumstopper, Vakuummischtechnik, retrograde Zementapplikation, Druckzementierung) zusammen mit der Erkenntnis über die Bedeutung des spongiösen Knochens für die Zementpenetration, und damit die Festigkeit des Knochen-Zement Interfaces, führten zu einer deutlichen Verlängerung der Standzeit von Implantaten (Charnley, 1970; Lee und Ling, 1981; Jasty et al., 1990; McCaskie und Gregg, 1994; Breusch SJ, 1997; DiGiovanni et al., 1999; Breusch SJ, 2000; Breusch SJ, 2000a). Doch die Zementierung des Implantats sorgt nur für die erste Fixation im Knochengewebe. Eine weitere und für die Standzeit der Prothese entscheidende Verankerung im knöchernen Implantatbett erfolgt durch den Heilungsprozess und das Knochen Remodelling (s. o.) (Willert, 1972; Willert et al., 1979). Durch die Einbringung der Prothese und die während der Polymerisation des als Zement verwendeten Polymethylacrylats entstehenden Wärme sowie durch die Freisetzung seiner toxischen monomeren Bestandteile kommt es zur Nekrose des angrenzenden Knochengewebes (Sih et al., 1980). Fibroblasten wachsen in das geschädigte Knochenmark ein und ersetzen es durch mesenchymales Gewebe, in welches dann Kapillaren einsprießen. In diesem fibrovasculärem Gewebe entsteht desmaler Knochen, der an einigen Stellen bis an die Implantat- bzw. die Zementoberfläche heran wächst. Gleichzeitig resorbieren Osteoklasten den nekrotischen Knochen. Mit dem Austausch des

fibrovasculären Gewebes gegen Knochenmarkgewebe ist dieser Heilungsprozess beendet und ein neues Implantatbett entstanden (Linder et al., 1988). Trotz dieser anfänglich festen Verankerung kommt es bei allen Prothesen nach unbestimmter Zeit und aus noch ungeklärten Gründen zum Versagen des Implantats durch einen Lockerungsprozess. In den 90er Jahren erhärtete sich die Erkenntnis, dass der Partikelabrieb einen wesentlichen Beitrag zum Lockerungsprozess liefert und somit ein gravierendes Problem der Endoprothetik darstellt (Harris, 1991; Jasty et al., 1997). Mögliche Quellen für die Abriebpartikel sind u.a. neben der Reibfläche zwischen den Gleitpartnern, die Grenzflächen zwischen Knochen und Pfannenrückwand, die Knochen-Zement-Grenze und die Zement-Implantat Grenze sowie schlecht sitzende Kopf-Konus Verbindungen (Williams et al., 1997). Diese Abriebpartikel werden u.a. in den periprothetischen Weichteilen akkumuliert und führen dort zu einer Kaskade biologischer Prozesse (Abriebkaskade), an deren Ende die Resorption des an die Prothese angrenzenden Knochen (Osteolyse) steht (Willert, 1977; Urban et al., 2000). Die gegen Ende der 70er Jahre aufgrund ihrer Entdeckung bei zementierten Implantaten als „Zementkrankheit“ bezeichneten Osteolysen werden heute als Ausdruck ihrer Unabhängigkeit von der chemischen Zusammensetzung der Abriebpartikel als „Partikelkrankheit“ bezeichnet. Beeinflusst wird die Osteolyse u.a. von der Menge, der Partikelgröße, dem Partikelvolumen und der Art des Abriebs (abhängig von der Art und der Belastung der Gleitpartner) sowie durch dessen Zugangsmöglichkeiten zum Implantat-Knochen Interface (Maloney et al., 1995; Maloney et al., 1999). Dort angelangt führen sie zur Entstehung eines granulomatösen Gewebes, welches aufgrund histologischer Analogien auch als Synovialmembran oder unter Berücksichtigung seiner Lage als Interfacemembran bezeichnet wird. Die pathologische Interfacemembran wird von der nur wenige μm dicken, festsitzende Prothesen umgebenden physiologischen Interfacemembran unterschieden und gilt als deutliches Anzeichen für die beginnende Abriebkaskade, an deren Anfang auch die Phagozytose von Abriebpartikel durch Makrophagen und Riesenzellen steht (Vidovszky et al., 1998). Neben diesen beiden Zelltypen finden sich in der mehrere 100 μm dicken pathologischen Interfacemembran auch Fibroblasten, Osteoklasten sowie B- und T-Lymphozyten. In der Vergangenheit konnte nachgewiesen werden, dass einige dieser Zellen unter bestimmten Bedingungen (z.B. Mikrobewegungen als Folge von Instabilitäten) die Osteoklastenaktivität stimulierende Substanzen sezernieren (Kollagenase, Interleukin-1 (IL-1), Tumornekrosefaktor (TNF), Lymphotoxine, Prostaglandin E2 (PGE2)), die dann über eine gesteigerte Knochenresorption zur Osteolyse

führen (Fuchs et al., 1998). Der resorbierte Knochen wird durch Bindegewebe ersetzt, so dass sich der Knochen mit zunehmender Instabilität der Prothesenverankerung von ihrer Oberfläche entfernt. Letztlich kommt es zur Ausbildung eines knöchernen Saumes, dem sogenannten inneren Kortex, der den Markraum gegenüber dem die Prothese umgebenden Bindegewebe abgrenzt (Bulow et al., 1996). Diese Vorgänge werden direkt oder indirekt von den Zellen der Interfacemembran und den von ihnen sezernierten Zytokinen reguliert, so dass die Zell-Zell Kommunikation für den Vorgang der aseptischen Lockerung von großer Bedeutung ist.

Zytokine sind typischerweise 15 - 30 kd große Proteine, die von Zellen als Reaktion auf verschiedenste Stimuli gebildet und sekretiert werden. Sie wirken auf Zellen, die aufgrund spezifischer Rezeptoren in der Lage sind, diese zu binden und deshalb als Zielzellen bezeichnet werden. Die Wirkung der durch den Prozess der Signaltransduktion über Zellmembranrezeptoren in das Cytoplasma der Zielzellen gelangenden Zytokinsignale ist vielgestaltig und dient in der Regel der Koordinierung von interzellulären Prozessen. Zytokine können die Proliferation der Zielzelle auslösen oder die Synthese spezifischer Proteine erhöhen. Darüber hinaus beeinflussen sie u.a. Prozesse wie die Gewebeerneuerung, die Zelldifferenzierung, die Apoptose, die Immunantwort, Entzündungsreaktionen sowie die Hämatopoese und die Knochenbildung. Historisch werden sechs Klassen von Zytokinen unterschieden: Wachstumsfaktoren, Lymphokine, Colony Stimulating Factors, Transforming Growth Factors, Tumor Necrosis Factors, Interferone. Die immunhistologische Identifizierung einzelner Zytokine in den Zellen der Interfacemembran sowie ihr genetischer Nachweis brachten in den vergangenen Jahren neue Erkenntnisse über die Beteiligung und das Zusammenspiel verschiedener Zellen am Prozess der aseptischen Lockerung (Al Saffar und Revell, 1994; Horowitz und Purdon, 1995; Al-Saffar et al., 1996; Blaine et al., 1996; Goodman et al., 1996; Xu et al., 1996; Goodman et al., 1997; Xu et al., 1997; Xu et al., 1998; Xu et al., 1998; Stea et al., 1999; Stea et al., 2000a). Beispielsweise konnte 1999 über den Nachweis von IL-15 in mit aktivierten T-Lymphozyten assoziierten Makrophagen gezeigt werden, dass in den aseptischen Lockerungsprozess auch eine Komponente der Immunantwort involviert ist (Revell und Jellie, 1998). Die Entwicklung der cDNA-Array Technologie eröffnet eine Möglichkeit die Stärke der Expression einer Vielzahl von Zytokingenen und der Gene ihrer Rezeptoren gleichzeitig an einer Gewebeprobe zu bestimmen und gab den Anstoß für die vorliegende Studie. Die bei dem Vergleich der Expressionsstärken des Interfacemembran mit einem Referenzgewebe erhaltenen Ergebnisse sollen weitere, am Lockerungsprozess

beteiligte Zytokine aufdecken und das vorhandene Bild der aseptischen Prothesenlockerung komplettieren.

2. Material und Methoden

2.1 Material

Das untersuchte spongiöse Knochengewebe wurde aus den Hüftköpfen unerwartet verstorbener Menschen gewonnen. Diese Menschen waren vor ihrem Tod weder bettlägerig noch hatten sie eine Knochen- oder Knorpelerkrankung.

2.2 Medien

Transportmedium

| | |
|-----------------------------|----------|
| RPMI 1640 | 500,0 ml |
| Penicillin/Streptomycin | 10,0 ml |
| Amphoterotrexin (Fungizone) | 10,0 ml |
| Gentamycin | 5,0 ml |

LB-Medium

| | |
|----------------------------------|-----------|
| Trypton | 10,0 g |
| Hefeextrakt | 5,0 g |
| NaCl | 10,0 g |
| H ₂ O _{dest} | 1000,0 ml |

Für die Herstellung von Agarplatten wurden dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Die verwendeten Medienzusätze (Tab. 1) wurden sterilfiltriert (Qualilab Spritzenvorsatzfilter 0,22 µm, Merk, Bruchsal) und im Fall des Ampicillins dem autoklavierten (KSG Sterilisatoren GmbH, Olching) Medium zugesetzt. Anschließend wurden die Petrischalen mit 10 bis 15 ml des Mediums gefüllt. Nach dem Erstarren der Agarplatten wurden diese mit Klebeband abgedichtet und kopfüber bei 4 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert. Von der X-Gal-Stammlösung wurden erst vor dem Animpfen 40 µl gleichmäßig auf der Platte verteilt und 15 Minuten getrocknet.

Tab. 1: Verwendete Medienzusätze

| MEDIENZUSATZ | STAMMLÖSUNG | ARBEITSKONZENTRATION |
|--------------|---|----------------------|
| Ampicillin | 10 mg/ml H ₂ O _{dest} | 50-100 µg/ml |
| X-Gal | 20 mg/ml Dimethylformamid | 40 µg/ml |

2.3 Fixation

Die Fixation der zu untersuchenden Probe dient in erster Linie dem Erhalt ihrer Struktur. Darüber hinaus soll sie eine potentiell vorhandene Infektiösität der Probe beseitigen. Für das Fixieren der Hüftköpfe wurde das Standardfixiermittel für die Lichtmikroskopie, eine neutral gepufferte Formaldehyd-Lösung (pH 7,2), verwendet. Die Fixation erfolgte mindestens 7 Tage lang vor dem Zsägen der Hüftköpfe bei Raumtemperatur (RT). Nach der Fixation wurden die Proben unter fließendem Leitungswasser gewaschen.

Neutral gepufferte Formaldehyd-Lösung

| | |
|--|--------------|
| Formol (36 %ig) | 100,0 ml |
| NaH ₂ PO ₄ •H ₂ O | 4,0 g |
| Na ₂ HPO ₄ (wasserfrei) | 6,5 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000,0 ml |

2.4 Probenpräparation

Aus den untersuchten Hüftköpfen wurden mit einem Trennschleifsystem (Exakt-Apparatebau, Norderstedt) zwei mediale Scheiben entnommen. Entlang der Zentralachse des Hüftkopfes wurde aus diesen Scheiben je ein ca. 0,5 cm breiter Streifen und aus diesen je 1,5 cm unterhalb der Gelenkfläche ein ca. 0,5 cm² großes Teilstück herausgesägt (Abb. 2). Für die Rasterelektronenmikroskopie wurde eines dieser Teilstücke 3 bis 4 Tage in 30 %igem H₂O₂ bei 37 °C und 150 Upm in einem Rundschüttler (Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, USA) mazeriert. Anschließend wurde die vom Weichgewebe befreite Probe in einer in 10 %-Schritten aufsteigenden Ethanol-Reihe beginnend mit einer 30 %igen Ethanol-Lösung jeweils 10 Minuten bei RT entwässert. Die luftgetrocknete Probe wurde mit einem beidseitig klebenden Kohleplättchen auf ein Aluminiumtischchen fixiert und nach ihrer Beschichtung mit Gold (s. 2.6.3) im Rasterelektronenmikroskop (REM) untersucht. Das andere Teilstück wurde in Methylmethacrylat eingebettet (s.

2.5.1.1.1), gefärbt (s. 2.5.1.3) und lichtmikroskopisch einer histomorphometrischen Auswertung (s. 2.5.3) unterzogen.

2.5 Lichtmikroskopie

Die Lichtmikroskopie wurde für die histologische Visualisierung der Osteoklasten auf der Knochenoberfläche der untersuchten Teilstücke des Hüftkopfes verwendet. Außerdem sollten die unter dem Lichtmikroskop betrachteten Schliffpräparate einen ersten dreidimensionalen Eindruck des im Hüftkopf vorliegenden spongiösen Netzwerkes vermitteln. Darüber hinaus konnten an diesen Präparaten erste Erkenntnisse über Resorptionslakunen und Perforationen gewonnen werden. Diese waren der Anstoß zu rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen, deren Ergebnisse mit den im Lichtmikroskop gewonnenen histomorphometrischen Daten verglichen werden sollten. Schließlich kam die Lichtmikroskopie bei der histologischen Beurteilung des Interfacemembran- und Referenzgewebes aus Patienten mit einer aseptischen Endoprothesenlockerung zum Einsatz.

2.5.1 Histologie

Grundlage für die Histologie ist die lichtmikroskopische Untersuchung des zellulären Aufbaus eines Gewebes. Dabei kann dieses als Frisch- und/oder als Gefrierschnittpräparat vorliegen. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit von entwässerten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben Feinschnittpräparate mit einem Mikrotom anzufertigen. Durch die Behandlung der Schnitte mit zellspezifischen Farbstoffen ist es möglich, sowohl einzelne Zellbestandteile als auch verschiedene Gewebearten visuell voneinander zu unterscheiden.

2.5.1.1 Einbettungen

2.5.1.1.1 Einbettung in Methylmethacrylat (Delling, 1972)

In Abhängigkeit von ihrer Größe wurden die Knochenpräparate bis zu einer Woche fixiert (s. 2.3) und anschließend in 70 %igem Ethanol aufgenommen. Die weiteren Schritte der Entwässerung und Überführung in Methylmethacrylat (MMA) sind in dem folgenden Schema zusammengestellt (Tab. 2).

Tab. 2: Entwässerungs- und Einbettzeiten für die Methylmethacrylat Einbettung

| ZUSATZ | INKUBATIONSDAUER [STUNDEN] |
|-------------------------------------|----------------------------|
| 80 % Ethanol | 2 |
| 90 % Ethanol | 3 |
| 96 % Ethanol | 3 |
| 100 % Ethanol | 2 |
| 100 % Ethanol | 1 |
| 50 (100 % Ethanol) : 50 (Aceton) | 2 |
| 50 (100 % Ethanol) : 50 (Aceton) | 1 |
| 100 % Ethanol | 2 |
| 100 % Ethanol | 1 |
| 50 (MMA) : (100 % Ethanol) | 2 |
| MMA + 10 % Nonylphenol + 0,15 % BPO | 2 |
| MMA + 10 % Nonylphenol | 3 |

Zur vollständigen Durchtränkung der Knochenpräparate mit MMA wurden diese 16 Stunden lang in einem Gemisch aus MMA, 20 % Nonylphenol und 0,15 % Benzoylperoxid (BPO) auf einem Schüttler (Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, USA) inkubiert. Für die Herstellung eines sogenannten Blockpräparates wurden die durchtränkten Knochenpräparate in den Boden einer Gießform eingebracht und anschließend mit zwei Gießlösungen unterschiedlicher Polymerisationseigenschaften überschichtet. Die Polymerisation des MMA wurde bei 10 °C gestartet und lief nach dem in Tab. 3 aufgelisteten Programm ab.

Tab. 3: Polymerisationsprogramm

| INKUBATIONSTEMPERATUR [°C] | INKUBATIONSDAUER [MINUTEN] |
|----------------------------|----------------------------|
| 10 | 5 |
| 16 | 30 |
| 16 | 45 |
| 10 | 180 |
| 10 | 300 |
| 25 | 510 |
| 10 | 120 |
| 10 | 90 Stunden |

Gießlösung 1

| | |
|-------------------|-----------|
| Methylmethacrylat | 2000,0 ml |
| Nonylphenol | 400,0 ml |
| Benzoylperoxid | 6,0 g |

Gießlösung 2

| | |
|-------------------|-----------|
| Methylmethacrylat | 2000,0 ml |
| Nonylphenol | 200,0 ml |
| Benzoylperoxid | 20,0 g |

2.5.1.1.2 Einbettung in Paraffin

Die in Abhängigkeit von ihrer Größe bis zu einer Woche fixierten Knochenpräparate (s. 2.3) wurden nach folgendem Schema entwässert und in Paraffin überführt (Tab. 4).

Tab. 4: Entwässerungs- und Einbettzeiten für die Paraffin Einbettung

| ZUSATZ | INKUBATIONSDAUER [STUNDEN] |
|---------------|----------------------------|
| 37 % Formalin | 2,5 |
| 80 % Ethanol | 1,0 |
| 80 % Ethanol | 1,0 |
| 96 % Ethanol | 1,0 |
| 96 % Ethanol | 1,0 |
| 100 % Ethanol | 1,0 |
| 100 % Ethanol | 1,0 |
| 100 % Ethanol | 1,0 |
| Xylol | 1,0 |
| Xylol | 1,0 |
| Paraffin | 2,0 |
| Paraffin | 1,5 |

Nach dem Aushärten des Paraffins wurden von den Knochenpräparaten mit einem Mikrotom Semi-Dünnschnitte angefertigt (s. 2.5.1.2).

2.5.1.2 Mikrotomie

Der Begriff der Mikrotomie bezeichnet das Verfahren zur Erzeugung dünner Schnitte, die eine mikroskopische Auswertung der untersuchten Präparate erlauben. Die in Methylmethacrylat eingebetteten Proben wurden in das 1150/Autocut (Reichert-Jung; Jung, AG Heidelberg) Mikrotom eingespannt und 4 µm dicke Schnitte von ihnen hergestellt. Für das Schneiden der in Paraffin eingebetteten Proben auf eine Dicke zwischen 3 µm und 5 µm wurde ein Handmikrotom der Firma Reichert-Jung verwendet.

2.5.1.3 Histologische Färbungen

2.5.1.3.1 Die Giemsa-Färbung (Gross und Strunz, 1977)

Diese Färbung erlaubt die Differenzierung zwischen Zellen und der Interzellularsubstanz der Weich- und Hartgewebe. Darüber hinaus ermöglicht sie die Unterscheidung der Blutbildungszellen im Knochenmark. Nach erfolgter Färbung erscheint die mineralisierte Matrix rosa bis zartrosa, das Kollagen und Osteoid blassblau, die Zellen und Zellkerne

unterschiedlich blau, die eosinophilen Granula rot, die Mastzellgranula und die Knorpelmatrix rotviolett. Die Schnitte der zu untersuchenden Knochenpräparate wurden zunächst 3 mal für je 7 Minuten in Xylol entplastet. Anschließend wurden die freigelegten Präparate je 1 Minute in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %) hydratisiert bevor sie 45 Minuten lang bei RT in der Giemsa-Lösung inkubiert wurden. Die Differenzierung der Färbung erfolgte in 0,1 %iger Essigsäure solange, bis der blaue Farbüberschuß verschwand und die Schnitte rötlich erschienen. Nach 2-maligem kurzem Eintauchen in eine 80 %ige Ethanol-Lösung erfolgte die weitere Differenzierung in 96 %igem Ethanol für zwei mal je 15 Sekunden, so dass die Kernfärbung in der mikroskopischen Kontrolle nicht zu prominent erschien. Abschließend wurden die Schnitte drei mal für je 3 Minuten in eine 100 %ige Ethanol-Lösung eingetaucht und schließlich über Xylol mit einer Folie (Eukit, Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckt.

Giemsa-Lösung

| | | |
|--|----|----------|
| Giemsa-Lösung | | 20,0 ml |
| H ₂ O _{dest} (abgekocht !) | ad | 100,0 ml |

Die Lösung wurde stets frisch vor ihrer Verwendung angesetzt.

Essigsäure (0,1 %ig)

| | | |
|----------------------------------|----|---------------|
| Eisessig | | 3 - 4 Tropfen |
| H ₂ O _{dest} | ad | 100,0 ml |

2.5.1.3.2 Die Goldner-Färbung (Goldner, 1938)

Die Goldner-Färbung zählt zu den vielen Trichromfärbungen und wird als die Standardfärbung in der Knochenmorphometrie verwendet. Neben einer guten Zellfärbung sind mineralisierte und nicht-mineralisierte Bereiche der Knochenmatrix klar voneinander unterscheidbar. Das mineralisierte Knochengewebe und das Kollagen erscheinen leuchtend grün gefärbt, während die verkalkten Bereiche der Knorpelmatrix hellgrün, das Osteoid rot, die Zellkerne blauschwarz, das Zytoplasma rötlich-braun und die Erythrozyten orange gefärbt werden. Am Anfang der Färbung stand eine wiederholte Inkubation der Schnitte in Xylol für je 10 Minuten. Nach dem Entplasten wurden die Schnitte für je 1 Minute in einer absteigenden Ethanol-Reihe (100 %, 96 %, 80 %) und anschließender 5-minütiger Wässerung in H₂O_{dest}. hydratisiert. Als erste folgte dann eine 10-minütige Kernfärbung mit

Eisenhämatoxylin. Die Schnitte wurden 5 Minuten lang mit fließendem Wasser abgespült und dann 30 Minuten in einer Säurefuchsin-Ponceau-Lösung inkubiert. Nach zwei je 5-sekündigen Einwirkphasen in 1 %iger Essigsäure und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ erfolgte die Differenzierung der Färbung in Phosphorwolframsäure-Orange G-Lösung. Zwei weiteren je 5-sekündigen Inkubationen in 1 %iger Essigsäure und $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ folgte die dritte Färbereaktion mit einer Lichtgrün-Lösung für 10 Minuten. Der 5-sekündigen Spülung in 1 %iger Essigsäure schloß sich ein 5-sekündiger Auswaschschritt mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ an. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (80 %, 96 %, 100 %) für je 3 Minuten entwässert und über Xylol mit einer Folie (Eukit, Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckt.

Eisenhämatoxylin

Lösung A

| | | |
|------------------|----|----------|
| Hämatoxylin | | 1,0 g |
| Ethanol (96 %ig) | ad | 100,0 ml |

Die Lösung wurde erst nach ihrer Reifung erkennbar an einer rotbraunen Verfärbung verwendet.

Lösung B

| | | |
|--|----|----------|
| $\text{FeCl}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ | | 1,16 g |
| HCl (25 %ig) | | 1,0 ml |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ | ad | 100,0 ml |

Lösung A und B wurden in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Die fertige Gebrauchslösung war nicht länger als 8 Tage haltbar.

Säurefuchsin-Ponceau-Lösung

| | | |
|------------------------------------|----|----------|
| Ponceau de Xylidine | | 8,0 g |
| Säurefuchsin | | 4,0 g |
| Eisessig | | 1,6 ml |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ | ad | 800,0 ml |

Phosphorwolframsäure-Orange G-Lösung

| | | |
|----------------------------------|----|----------|
| Phosphorwolframsäure | | 8,0 g |
| Orange G | | 4,0 g |
| H ₂ O _{dest} | ad | 800,0 ml |

Lichtgrün-Lösung

| | | |
|----------------------------------|----|----------|
| Lichtgrün | | 1,6 g |
| Eisessig | | 1,6 g |
| H ₂ O _{dest} | ad | 800,0 ml |

2.5.1.3.3 Die HE-Färbung

Die HE-Färbung ist eine Kernfärbung, die das Chromatin im lichtmikroskopischen Bild blau und das Zytoplasma sowie Bindegewebe und Kollagenfasern kräftig rot erscheinen lässt. Nach erfolgter Entparaffinierung der Schnitte in Xylol 3 mal für je 5 Minuten und ihrer Hydratisierung für je 1 Minute in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %) wurden die Präparate 6 Minuten in Mayers Hämalaun inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte 3 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen und dann 3 bis 5 Sekunden in ein Gemisch aus HCl und Ethanol getaucht. Nach einer 6-minütigen Spülung unter fließendem Wasser folgte der zweite Teil der Färbung, eine 2-minütige Inkubation mit Eosin (gelb). Abschließend wurden die Schnitte mit H₂O_{dest} gespült, in einer aufsteigenden Ethanolreihe (80 %, 96 %, 100 %) für je 3 Minuten entwässert und schließlich über Xylol mit einer Folie (Eukit, Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckt.

Mayers Hämalaun

| | | |
|----------------------------------|----|-----------|
| Hämalaun | | 1,0 g |
| NaJO ₃ | | 0,2 g |
| Kalialaun | | 50,0 g |
| Chloralhydrat | | 50,0 g |
| Zitronensäure | | 1,0 g |
| H ₂ O _{dest} | ad | 1000,0 ml |

Eosin (gelb)

| | |
|----------------------------------|--------------|
| Eosin (gelb) | 0,2 % (w/v) |
| Eisessig | 8,0 Tropfen |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000,0 ml |

2.5.1.3.4 Die Toluidinblau O-Färbung

Diese Färbung wird immer dann verwendet, wenn Schnitte leicht abschwimmen oder nicht entplastet werden können. Die auftretenden metachromatischen Farbeffekte bieten folgende Differenzierungsmöglichkeiten: Verkalkte Knorpelmatrix erscheint dunkelblau, während die mineralisierte Hartgewebematrix ungefärbt bis blassblau imponiert. Die Zellen und das Weichgewebe werden unterschiedlich blau, die Knorpelmatrix und die Mastzellgranula hingegen metachromatisch rotviolett gefärbt. Die Schnitte der zu untersuchenden Knochenpräparate wurden zunächst 3 mal für je 5 Minuten in Xylol entplastet. Anschließend wurden die freigelegten Präparate je 1 Minute in einer absteigenden Ethanolreihe (100 %, 96 %, 80 %) in Wasser gebracht. Einer 5- bis 10-minütigen Inkubation in der Toluidinblau O Färbelösung folgte eine kurze Spülung mit H₂O_{dest}. Die Differenzierung der Färbung und das Entwässern der Präparate erfolgte durch eine jeweils 1-minütige Verweildauer in einer aufsteigenden Ethanolreihe bestehend aus einer 70 %igen und einer 100 %igen Lösung. Abschließend wurden die Schnitte über Xylol mit Eukit (Kindler GmbH, Freiburg) eingedeckt.

Toluidinblau O Färbelösung

| | |
|----------------------------------|-------------|
| Toluidinblau | 0,3 g |
| Natriumkarbonat | 2,5 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 100,0 ml |

Die Färbelösung wurde vor Gebrauch zweimal filtriert.

2.5.2 3D-Lichtmikroskopie (Hahn et al., 1989)

Die 3D-Lichtmikroskopie der spongiösen Knochenproben wird durch die Verwendung spezieller Präparationsverfahren ermöglicht. Dabei werden von den in Technovit eingebetteten Proben (s. 2.5.2.1) 1 bis 2 mm dicke Schliffpräparate (s. 2.5.2.2) angefertigt, deren Oberfläche Kossa gefärbt wird (s. 2.5.2.3). Diese erscheint bei Hellfeldbeleuchtung im lichtmikroskopischen Bild betont und kann wie ein konventionelles,

zweidimensionales, histologisches Schnittpräparat morphometrisch ausgewertet werden. Im Dunkelfeld heben sich die korrelierenden dreidimensionalen Strukturelemente hell von der dunkel gefärbten Oberfläche ab und können so analysiert werden.

2.5.2.1 Einbettung in Technovit (Donath, 1987)

Die Einbettung der marzerierten Knochenpräparate in Technovit ermöglicht die Herstellung von Schliffpräparaten (s. 2.5.2.2).

Die fixierten (s. 2.3) und marzerierten (s. 2.4) Knochenpräparate wurden vor ihrer Einbettung 1 bis 2 Stunden in fließendem Wasser gewaschen. Anschließend wurden die Knochenpräparate nach folgendem Schema in einer aufsteigenden Ethanolreihe entwässert und schließlich in Technovit 7200 überführt (Tab. 5).

Tab. 5: Entwässerungs- und Einbettzeiten für die Technovit Einbettung

| ZUSATZ | INKUBATIONSDAUER [STUNDEN] |
|--|----------------------------|
| 70 % Ethanol | 6 |
| 80 % Ethanol | 6 |
| 96 % Ethanol | 6 |
| 100 % Ethanol | 6 |
| 100 % Ethanol | 6 |
| 100 % Ethanol | 6 |
| 30 (Technovit 7200) : 70 (100 % Ethanol) | 6 |
| 50 (Technovit 7200) : 50 (100 % Ethanol) | 8 |
| 70 (Technovit 7200) : 30 (100 % Ethanol) | 8 |
| 100 % Technovit 7200 | 12 |
| 100 % Technovit 7200 + Vakuum | 24 |

Die vollständige Durchtränkung mit Technovit wurde durch eine 2-wöchige Inkubation der Knochenpräparate auf einem Schüttler (Incubator Shaker, New Brunswick, USA) sichergestellt. Das Auspolimerisieren des Technovits zu Blockpräparaten erfolgte in einem Einbettautomaten (Histolux, Exakt, Norderstedt) in einer 2-stündigen Bestrahlung mit gelbem und einer 8-stündigen Behandlung mit blauem Licht.

2.5.2.2 Herstellung von Schliffpräparaten

Zunächst wurde das Blockpräparat mit Schleifpapier grober Gradation (80 bis 800 er) auf einem Handschleifgerät (Exakt, Norderstedt) solange angeschliffen, bis die Oberfläche des in Technovit eingebetteten Knochenpräparates frei lag. Mit dieser freigelegten Präparatoberfläche wurde das Blockpräparat mit doppelseitigen Klebeband auf einen Plastikobjektträger fixiert. Auf die gegenüberliegende Seite des Blockpräparates wurde ein klarer Plastikobjektträger mit Technovit 4000 geklebt. Nach dem Entfernen des mit Klebeband befestigten Objektträgers und der Reinigung der Präparatoberfläche mit Petroleumbenzin wurde auf diese ein klarer Plastikobjektträger mit Technovit 7210VCL geklebt. Die Aushärtung des Klebers erfolgte in einer 10-minütigen Bestrahlung mit blauem Licht in einer Präzisionsklebepresse (Exakt, Norderstedt). Mit einem Trennschleifsystem (Exakt, Norderstedt) wurde das Blockpräparat etwa 1 mm von der Präparatoberfläche entfernt abgesägt. Nach dem Eichen des Mikroschleifsystems (Exakt, Norderstedt) auf die Höhe des Objektträgers wurde der verbliebende Teil des Blockpräparates mit 1200 er Schleifpapier auf eine Höhe von 1 mm bis 2 mm abgeschliffen. Abschließend wurde die Präparatoberfläche mit 4000 er Schleifpapier poliert bis keine Schleifspuren mehr erkennbar waren.

2.5.2.3 Die Kossa-Färbung

Die Kossa-Färbung wird in der Knochenhistomorphometrie verwendet, um auf Schliffpräparaten durch eine Oberflächenfärbung (Versilberung) mineralisierte Bereiche schwarz erscheinen zu lassen.

Die Schliffpräparate wurden 5 Minuten in einer Silbernitrat-Lösung inkubiert und anschließend 10 Minuten mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gewaschen. Einer 5-minütigen Behandlung mit Sodaformol folgte ein 10-minütige Waschschrift unter fließendem Wasser. Nach einer 5-minütigen Inkubation mit Natriumthiosulfat wurden die Schliffpräparate abschließend 10 Minuten unter fließendem Wasser gewaschen.

Silbernitrat-Lösung (3 %ig, w/v)

| | | |
|------------------------------------|----|----------|
| AgNO_3 | | 6,0 g |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ | ad | 200,0 ml |

Soda-Formol

| | | |
|----------------------------------|----|----------|
| Na ₂ CO ₃ | | 10,0 g |
| Formaldehyd (37 %ig) | | 50,0 ml |
| H ₂ O _{dest} | ad | 200,0 ml |

Natriumthiosulfat

| | | |
|----------------------------------|----|----------|
| Natriumthiosulfat | | 10,0 g |
| H ₂ O _{dest} | ad | 200,0 ml |

2.5.3 Histomorphometrie

1866 entwickelte Delesse die Grundidee der heutigen morphometrischen Analyseverfahren. Er ging davon aus, dass das Volumen und die Oberfläche eines unbekanntes Körpers anhand seiner Fläche und seines Umfanges bestimmt werden können. Zur Erhebung dieser Daten wurde die von Henning (1958) eingeführte und von Merz (1967) weiterentwickelte Methode der sogenannten Punktzählung („Treffer Methode“) erdacht (Henning, 1958). Dabei werden das Volumen und die Oberfläche eines Präparatausschnittes auf der Grundlage einer Messung von Punkten und parallelen Linien berechnet. Das von Merz eingeführte und auch in dieser Studie verwendete sogenannte „Merz-Grid“ besteht aus parallel angeordneten Wellenlinien mit einem Raster aus 36 Punkten. Durch den Einsatz dieses Messfeldes in das Okular eines Lichtmikroskopes wird die schnelle histomorphometrische Auswertung eines Schnittpräparates unabhängig von seiner Ausrichtung und dem Winkel zwischen den Messlinien und der Präparateoberfläche ermöglicht (Merz, 1967).

Histomorphometrisch ausgewertet wurde ein 1,5 cm unterhalb der Gelenkfläche des Hüftkopfes gelegener, ca. 50 mm² großer Präparatausschnitt bei 200-facher Vergrößerung (s 2.5.4). Dabei entsprach der absolute Abstand zwischen zwei Messpunkten des Rasters (Grid-Konstante) dem Durchmesser der Trabekel. Das Auszählen der Messpunkte auf mineralisierten Knochen und der Überschneidungen zwischen der Trabekeloberfläche und den Wellenlinien waren die Grundlage für die Berechnung der Knochendichte (BV/TV) sowie der Resorptionslakunendichte (ES/BS).

$BV/TV = (P / F) \times 100 [\%];$ P - Messpunkte auf mineralisiertem Knochen und Osteoidsäumen

F - Anzahl ausgezählter Messfelder

$ES/BS = ((N_{ho} + N_{he}) / N) \times 100 [\%];$ N_{ho} - Überschneidungen mit von Osteoklasten bedeckten Resorptionslakunen

N_{he} - Überschneidungen mit leeren Resorptionslakunen

N - Gesamtzahl an Überschneidungen

2.5.4 Lichtmikroskopische Abbildungen

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Knochenpräparate wurden mit einem Axioplan Lichtmikroskop (Zeiss, Jena), das über eine Axiophot (Zeiss, Jena) Photoeinheit mit einer Digitalkamera (Olympus DP10, Olympus, Hamburg) ausgerüstet war, bei 25- bis 1000-facher Vergrößerung durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in digitalen Bildern mit einer Auflösung von 1280 x 1024 Pixel festgehalten. Die Bilder wurden gegebenenfalls mit Photoshop 6.0 nachbearbeitet. Als Maßstab der lichtmikroskopischen Abbildungen ist ihre Feldweite (FW, entspricht der Breite der Abbildung) ausgewiesen.

2.6 Rasterelektronenmikroskopie

In der Elektronenmikroskopie wird für die Erzeugung eines Bildes der untersuchten Probe anstelle des Lichtstrahles ein Elektronenstrahl verwendet. Dieser besitzt eine wesentlich kürzere Wellenlänge als das sichtbare Licht und ermöglicht so eine um einige Zehnerpotenzen höhere Auflösung. Eine Elektronenquelle (z. B. ein Wolframdraht) setzt Elektronen frei, die im Wehneltzylinder in Richtung Kathode beschleunigt werden und durch eine Lochblende in seinem Boden eine erste Bündelung erfahren. Entlang des Strahlenganges sind elektromagnetische Linsen angeordnet, mit denen der negativ geladene Elektronenstrahl abgelenkt und so weiter gebündelt werden kann. Diesem Zweck dienen auch die in den Strahlengang eingebrachten Lochblenden über deren unterschiedlichen Durchmesser sich darüber hinaus in der Rasterelektronenmikroskopie die Tiefenschärfe des erzeugten Bildes verändern lässt. In der Rasterelektronenmikroskopie tastet dieser gebündelte Strahl primärer Elektronen die Probenoberfläche ab, dringt teilweise in diese ein und interagiert in Bereich der sogenannten Wechselwirkungsbirne mit den Elektronen der Proben. Dabei entstehen u. a. Sekundärelektronen,

Rückstreuelektronen und Röntgenstrahlung, die von entsprechenden Detektoren oberhalb der Probe registriert, elektronisch bearbeitet und wieder zu einem Bild zusammengesetzt werden.

2.6.1 Herstellung von Dentin-Chips

Dentin besitzt einen dem Knochen vergleichbaren Aufbau und eine gleichmäßig strukturierte Oberfläche. Diese ermöglicht den Einsatz von Dentin-Chips als Substrat in sogenannten Pit-Assays, bei denen die osteoklastäre Resorptionsaktivität anhand der von ihnen gebildeten Pits untersucht wird. Die verwendeten Dentin-Chips wurden aus Elfenbein hergestellt, in dem dieses mit einem Trennschleifsystem (Exakt, Norderstedt) in 0,1 mm bis 0,15 mm dicke Plättchen zersägt wurde. Diese wurden anschließend autoklaviert und somit keimfrei gemacht.

2.6.2 Kritisch-Punkt Trocknung (Anderson, 1951)

Eine wesentliche Voraussetzung für die Erzeugung eines gebündelten Elektronenstrahls ist ein luftleerer Raum. Das im Rasterelektronenmikroskop (REM) herrschende Hochvakuum erlaubt nur die Untersuchung von zuvor entwässerten Präparaten, da diese durch die im Wasser gelösten und dann ausperlenden Gase zerstört würden. Die Lufttrocknung führt jedoch zur Entstehung von Schrumpfungartefakten, welche die wahre Struktur des Präparates zerstören. Durch die Anwendung der Kritisch-Punkt-Trocknung kann dieser Vorgang weitgehend verhindert werden. Der Kritische Punkt einer Flüssigkeit bezeichnet den Druck und die Temperatur, bei denen die Dichte dieser Flüssigkeit gleichzeitig der ihres gasförmigen Aggregatzustands entspricht. Damit liegt die Flüssigkeit unter den physikalischen Bedingungen des Kritischen-Punktes gleichzeitig als Flüssigkeit und als Gas vor. Das Gas wird abgelassen und das getrocknete Präparat kann im REM untersucht werden. Wasser hat seinen Kritischen-Punkt bei Bedingungen (374 °C, 228,5 bar), welche die meisten Präparate insbesondere biologische nicht überstehen würden. Aus diesem Grund wird für die Kritisch-Punkt-Trocknung CO₂ verwendet, das bei 31 °C und 72,8 bar sowohl flüssig als auch gasförmig vorliegt. Die im REM zu untersuchenden Präparate wurden zunächst in 2,5 %igem, phosphatgepuffertem Glutaraldehyd fixiert und in einer in 10 %-Schritten aufsteigenden Aceton-Reihe beginnend mit einer 30 %igen Acetonlösung jeweils 10 Minuten bei RT entwässert. Anschließend wurden die Präparate mit der 100 %igen Acetonlösung in eine temperierbare Druckkammer (Kritisch-Punkt Trockner CPD 030, BaT-Tec, Schalksmühle) überführt. Durch die folgende Abkühlung der Kammer

auf 4 °C sollte die vorzeitige Verflüchtigung des flüssigen CO₂ verhindert werden. Das Aceton wurde in 6 bis 8 Spülungen gegen das flüssige CO₂ ausgetauscht. Die Bedingungen des Kritischen-Punktes von CO₂ wurden durch die Erwärmung der Kammer auf 31 °C eingestellt. Abschließend wurde das gasförmige CO₂ über ein Nadelventil langsam über einen Zeitraum von 30 Minuten abgelassen.

Sörensen`s Phosphatpuffer (0,1 M)

Lösung A

| | |
|----------------------------------|--------------|
| KH ₂ PO ₄ | 13,7 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000,0 ml |

Lösung B

| | |
|---|--------------|
| Na ₂ HPO ₄ •2H ₂ O | 18,0 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000,0 ml |

Für die Herstellung von 100 ml einer Pufferlösung mit einem pH-Wert von 7,2 wurden 28,5 ml der Lösung A und 71,5 ml der Lösung B gemischt.

Phosphatgepufferte Glutaraldehyd-Lösung (2,5 %ig)

| | |
|-------------------------------|---------|
| Glutaraldehyd (25 %ig) | 5,0 ml |
| Phosphatpufferlösung (pH 7,2) | 45,0 ml |

2.6.3 Gold-Sputter

Der Elektronenstrahl des REM bringt kontinuierlich negative Ladungen auf die Probenoberfläche. Bei nicht-leitenden Präparaten können diese nicht abfließen und es kommt zu einer Aufladung der Probenoberfläche. Diese Aufladungen lenken den Elektronenstrahl ab und führen zu starken Kontrasten sowie Verzerrungen im rasterelektronenmikroskopischen Bild, die eine Auswertung unmöglich werden lassen. Eine gleichmäßige Beschichtung der Probenoberfläche mit einem leitenden Metall (Gold, Wolfram) oder Kohlenstoff verhindert solche Aufladungseffekte. Der Gold-Sputter besteht aus einer evakuierten Röhre, in der sich zwei Elektroden senkrecht gegenüberstehen. Die Kathode trägt ein sogenanntes Gold-Target und die auf eine Halterung montierten REM-Proben bilden die Anode. In der zwischen den Elektroden anliegenden Hochspannung kommt es zu einer Ionisierung der in der Röhre verbliebenen Luftmoleküle. Dabei treffen

die Anionen auf die Kathode und schlagen dort Goldatome aus dem Target, die sich auf der Oberfläche der REM-Proben niederschlagen und diese mit einer dünnen Goldschicht überziehen. Die REM-Proben wurden in einem Abstand von 5 cm vom Gold-Template bei einem Druck $< 0,1$ mbar und einer Spannung von 30 V für 90 Sekunden in einer Anlage von Cressington (Sputter-coater 108 auto, Cressington, England) mit Gold besputtert.

2.6.4 Rasterelektronenmikroskopische Abbildungen

Die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen der Knochenpräparate wurden mit einem Leo 435VP (Leo, Oberkochen) bei einer Beschleunigungsspannung von 10 bis 30 kV durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in digitalen Bildern mit einer Auflösung von 1024 x 768 Pixel festgehalten. Als Maßstab der lichtmikroskopischen Abbildungen ist ihre Feldweite (FW, entspricht der Breite der Abbildung) ausgewiesen.

2.7 Die Methode der cDNA-Arrays (Blanchard, 1998)

Die Methode der cDNA-Arrays beruht auf dem Prinzip der spezifischen komplementären Basenpaarung und erlaubt durch die Verwendung von cDNAs Aussagen über das Expressionsprofil der untersuchten Gene. Auf die Nylonmembran des Cytokine/Receptor Arrays der Firma Clontech wurden 268 einzelsträngige cDNAs der Teilsequenzen ausgesuchter Zytokingene oder der Gene ihrer Rezeptoren als Doppelspots synthetisiert. Aus dem zu analysierenden Gewebe wurde zunächst die Total RNA (s. 2.7.1) isoliert. Aus dieser wurde dann unter Verwendung von magnetic beads die mRNAs angereichert (s. 2.7.7). Die mRNAs des zu analysierenden Gewebes bildet die Grundlage zur Herstellung markierter Sonden. Dazu wurden die mRNAs in einer reversen Transkriptasereaktion in einzelsträngige cDNAs umgeschrieben. Die dabei entstandenen Sonden wurden durch die Verwendung eines radioaktiven Bausteins (^{32}P dATP) markiert (s. 2.7.8). Bei der Hybridisierung der Nylonmembran des Cytokine/Receptor Arrays mit den Sonden binden diese an die ihrer jeweiligen Sequenz komplementären Teilsequenzen der Zytokingene oder der Gene ihrer Rezeptoren auf der Membran (s. 2.7.10). Ein Autoradiogramm oder die Auswertung mit einem Phosphorimager zeigt dann durch eine Schwärzung die Bindung der Sonden an die Membran an. Anhand eines Auswerteschemas lassen sich die im Vergleich zu einer Referenz unter- oder überexprimierten Zytokingene identifizieren.

2.7.1 Materialgewinnung

Das untersuchte Interfacemembrangewebe wurde bei Wechseloperationen gelockerter Hüftendoprothesen aus dem Bereich des Femurschaftes gewonnen. Durch die sofortige Konservierung des Gewebes in flüssigem Stickstoff sollte der Erhalt der zu analysierenden mRNAs sichergestellt werden. Vor der Konservierung wurden Blutreste entfernt und eine Gewebeprobe für die histologische Beurteilung entnommen.

2.7.2 Single-step RNA Isolierung (Chomczynski und Sacchi, 1987);

modifiziert

Für die Isolierung der Total RNA aus Primärgewebe wurde die TRIzolTM-Methode verwendet. TRIzolTM ist eine monophasische Lösung aus Phenol und Guanidinisothiocyanat, die während der Homogenisierung des Gewebes die Zellen aufschließt und dabei gleichzeitig die Integrität der RNA erhält.

Für die Isolierung von Total RNA wurden 0,5 bis 1,0 g des tiefgefrorenen Primärgewebes eingesetzt. Das abgewogene Gewebestück wurde unter ständiger Stickstoffkühlung in einem speziell für diesen Zweck angefertigten Teflonmörser zerkleinert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 ml TRIzolTM pro 100 mg eingesetzten Gewebes. In einem Homogenisator (Ultra-Turrax T25, Wilke&Witzel, Hamburg) wurden die Zellen dann bei 900 Upm aufgeschlossen. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurden die Zelltrümmer bei 10000 x g (Avanti 30 Centrifuge, Beckman, Krefeld) und 4 °C für 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 0,2 ml Chloroform pro ml für die Homogenisierung eingesetzten TRIzolsTM versetzt und 90 Sekunden kräftig geschüttelt und 3 Minuten bei RT inkubiert. In der anschließenden 15-minütigen Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C (Ananti 30 Centrifuge, Beckman, Krefeld) wurde die Emulsion in eine die Total RNA enthaltene wässrige Phase, eine weiße Interphase und eine darunterliegende rötliche organische Phase getrennt. Nach dem Abpipettieren der wässrigen Phase wurden dem Ansatz 0,5 ml Isopropanol pro ml für die Homogenisierung eingesetzten TRIzolsTM zugesetzt. Die folgende 10-minütige Zentrifugation bei 12000 x g und 4 °C (Ananti 30 Centrifuge, Beckman, Krefeld) diente der Präzipitation der Total RNA. Der Überstand wurde verworfen und das RNA Pellet in 1 ml 75 %igem Ethanol pro ml für die Homogenisierung eingesetzten TRIzolsTM durch Lösen und anschließender 5-minütiger Zentrifugation bei 7500 x g bei 4 °C (Ananti 30 Centrifuge, Beckman, Krefeld) gewaschen. Das Ethanol wurde vollständig entfernt und das RNA Pellet 5 Minuten bei RT

luftgetrocknet. Die Total RNA wurde je nach Größe des Pellets in 15 bis 35 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ oder RSB (RNA storage buffer) gelöst und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.7.3 Bestimmung der RNA-Konzentration

Die Konzentration der RNA wurde photometrisch (UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 10, Perkin Elmer, Überlingen) ermittelt. Dabei entspricht bei einer Wellenlänge von 260 nm einer Extinktionseinheit eine Nukleinsäurekonzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Aus dem Verhältnis der Extinktionseinheiten bei 260 nm und bei 280 nm, dem Absorptionsmaximum für Proteine, lässt sich die Reinheit der untersuchten Nukleinsäure bestimmen. Saubere Nukleinsäureisolate haben einen Quotienten zwischen 1,6 und 1,8.

2.7.4 Agarose-TAE-Minigelelektrophorese (Studier, 1973); modifiziert

In Agarosegelen werden hochmolekulare Substanzen entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Konzentration der ein Molekularsieb-bildenden Agarose bestimmt dabei die Porengröße und über diese das Maß der Auftrennung. Die in dieser Studie verwendeten Gele hatten eine Agarosekonzentration von 0,8 bis 2,0 % (w/v).

Agarosegel (1 %ig, w/v)

| | |
|------------------------------------|------------|
| Agarose | 0,5 g |
| TAE-Puffer (50 x) | 1,0 ml |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$ | ad 50,0 ml |

TAE-Puffer (50 x)

| | |
|---|--------------|
| Tris base | 242,0 g |
| Eisessig | 57,1 ml |
| $\text{Na}_2\text{EDTA}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 37,2 g |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ | ad 1000,0 ml |

$\text{H}_2\text{O}_{\text{DEPC}}$

| | |
|------------------------------------|--------------|
| Diethylpyrocarbonat | 1,0 ml |
| $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ | ad 1000,0 ml |

Das DEPC wurde über Nacht unter ständigem Rühren gelöst und anschließend autoklaviert.

Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml)

| | |
|----------------------------------|------------|
| Ethidiumbromid | 0,2 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 20,0 ml |

Die Ethidiumbromidlösung wurde in einem mit Alufolie eingewickeltem E-Cup im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

Die Agarose wurde unter zwischenzeitigem Mischen bis zum Aufkochen in der Mikrowelle erwärmt. Für den Nachweis von Nukleinsäuren wurden dem Ansatz 3 µl Ethidiumbromidlösung zugesetzt. Ethidiumbromid interkaliert in Nukleinsäuren und ist aus diesem Grund hochgiftig. Außerdem ist es thermolabil, so dass der Ansatz vor Zugabe dieses Farbstoffes unter kaltem Leitungswasser auf Handwärme abgekühlt wurde.

Anschließend wurde der Ansatz blasenfrei in den Gelschlitten der Minigelkammer (Qiagen Instruments, Schweiz) gegossen. Nach dem Erstarren des Agarosegels wurde die Minigelkammer soweit mit 1 x TAE-Puffer aufgefüllt bis das Gel mit Flüssigkeit bedeckt war. Als letztes wurde der Kamm für die Geltaschen vorsichtig entfernt, um ein Einfallen der Geltaschen zu verhindern.

Vor dem Auftragen auf das Agarosegel wurden alle Proben abzentrifugiert und mit dem beschwerenden Probenpuffer versetzt. Der dem Probenpuffer zugesetzte Farbstoff gibt während der Gelelektrophorese die Lage der Lauffront an. Die Geltaschen fassen je nach Dicke des Gels 15 bis 20 µl.

Probenvorbereitung

| | |
|----------------------------------|------------|
| Probenpuffer | 1,0 µl |
| Probe | 1,0-3,0 µl |
| H ₂ O _{DEPC} | ad 10,0 µl |

Probenpuffer (10 x)

| | |
|----------------------------------|---------|
| Bromphenolblau (10 %ig, w/v) | 4,2 µl |
| Xylencyanol (10 %ig, w/v) | 4,2 µl |
| Glycerol | 50,0 µl |
| H ₂ O _{DEPC} | 41,6 µl |

Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 Volt durchgeführt.

2.7.5 DNase-Verdau (Suck und Oefner, 1986)

Durch die Behandlung der Total RNA mit DNase wurden vorhandene DNA-Verunreinigungen beseitigt. Dadurch sollten falsche Ergebnisse bei der der cDNA-Synthese folgenden Herstellung der radioaktiv-markierten cDNA-Sonde (s 2.7.9) und damit falsche Signal auf den cDNA-Arrays vermieden werden.

Reaktionsansatz

| | |
|---------------------|---------|
| DNase-Puffer (10 x) | 6,0 µl |
| DNase (4 U) | 4,0 µl |
| Total-RNA | 40,0 µl |

Die Total RNA wurde 60 Minuten bei RT mit der DNase inkubiert. Abgestoppt wurde die Reaktion durch die Zugabe von 15 µl eines DNase inactivation reagent (Stop-Mix). Nach einer 2-minütigen Inkubation bei RT unter gelegentlichem Mischen wurde dieser Stop-Mix 1 Minute bei 15000 x g (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) abzentrifugiert.

DNase-Puffer (10 x)

| | |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl, pH 7,5 | 100 mM |
| MgCl ₂ | 25 mM |
| CaCl ₂ | 1 mM |

2.7.6 PCR

Die Methode der PCR ermöglicht die Amplifizierung einer Nukleinsäuresequenz. Unerlässlich für eine erfolgreiche PCR ist die Flankierung der zu amplifizierenden Sequenz mit geeigneten Primern. Die Primer binden sequenzspezifisch an die Nukleinsäurevorlage (Template) und bilden die Startpunkte für die Polymerasekettenreaktion (PCR). Bei der Wahl und der Verwendung der Primer ist u. a. darauf zu achten, dass

- der GC-Gehalt der beiden Primer eine um höchstens 1 - 3 °C unterschiedliche Anlagerungstemperatur an das Nukleinsäuretemplate ermöglicht.
- die Enden eines Primers nicht aus komplementären Nukleotiden bestehen.
- die Primer untereinander keine komplementären Nukleotide besitzen.

- die Primer eine Länge von 20-30bp besitzen.
- die zusätzlich in den Primer eingebaute Erkennungssequenz eines Restriktionsenzymns mindestens 3bp vom Ende einer Primersequenz entfernt liegen sollte
- sie in identischen Konzentrationen vorliegen.

Die PCR wurde verwendet, um die Reinheit der isolierten Total-RNA vor und nach erfolgtem DNase-Verdau unter Verwendung der Primer des humanen Aktins zu überprüfen. Darüber hinaus diente sie bei der Verifikation der cDNA-Array Ergebnisse der Amplifizierung von Teilsequenzen der untersuchten Zytokingene. Als Primer für diese Reaktionen wurden die von der Firma Clontech vorgeschlagenen und von der Firma Invitrogen synthetisierten Sequenzen eingesetzt (Tab. 6).

Tab. 6: Untersuchte Zytokine und die Größen der klonierten cDNA-Sequenzen
(2.6.13.3)

| ZYTOKIN | FRAGMENTGRÖÙE [BP] | SCHMELZTEMPERATUR [T _M] |
|---------|--------------------|-------------------------------------|
| IL-10 | 206 | 57 °C |
| CALA | 238 | 58 °C |
| CAGB | 238 | 58 °C |
| MCP1 | 348 | 58 °C |
| RANTES | 365 | 58 °C |
| TNFR2 | 184 | 57 °C |
| TDGF1 | 418 | 59 °C |
| RAI | 315 | 58 °C |
| THYB10 | 302 | 58 °C |

Die jeweils verwendete Anlagerungstemperatur der Primer an das DNA-Template wurde aus der im Syntheseprotokoll der Firma Invitrogen angegebenen Schmelztemperatur (T_m) berechnet. Dabei wurden von dieser in einer ersten PCR 5 °C abgezogen. Eine darüber hinaus erforderliche Erhöhung der PCR-Spezifität wurde u. a. durch eine Erhöhung der Anlagerungstemperatur sowie der Magnesiumkonzentration im Reaktionsansatz erreicht.

Der für die PCR verwendete Ansatz hatte folgende Zusammensetzung:

Reaktionsansatz

| | |
|----------------------------------|-------------|
| Qiagen PCR-Puffer (10 x)* | 5,00 µl |
| dNTP Mix (je 10 mM) | 1,00 µl |
| Downstream Primer (10 µM) | 1,00 µl |
| Upstream Primer (10 µM) | 1,00 µl |
| Taq DNA Polymerase | 0,25 µl |
| Template DNA (1 µg/µl) | 1,00 µl |
| H ₂ O _{DEPC} | ad 50,00 µl |

* enthält 15 mM MgCl₂

Bei Bedarf wurde die PCR durch die Erhöhung der MgCl₂-Konzentration im Ansatz oder durch die Zugabe der mitgelieferten Q-Solution, bestehend aus einem MgCl₂- und DMSO-Gemisch, optimiert.

Die PCR-Reaktionen wurden in einem Thermozykler mit beheiztem Deckel (GeneAmp PCR System 9700, Applied Biosystems, Weiterstadt) unter den in Tab. 7 aufgeführten Reaktionsbedingungen durchgeführt.

Tab. 7: Reaktionsbedingungen der PCR

| ANZAHL DER ZYKLEN | TEMPERATUREN UND ZEITEN | | |
|--------------------------|--|-------|---------|
| 1 | Initiale Denaturierung des DNA-Templates | 95 °C | 3 Min. |
| 35 | Denaturierung des DNA | 95 °C | 30 Sek. |
| | Anlagerung der Primer | 53 °C | 45 Sek. |
| | Strangsynthese | 72 °C | 90 Sek. |
| 1 | Abschließende Strangsynthese | 72 °C | 10 Min. |
| 1 | Lagerung der PCR-Ansätze | 4 °C | ∞ |

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch in einem 2,0 %igem Agarosegel.

2.7.7 RT-PCR (Myers und Gelfand, 1991)

Die Methode der RT-PCR ermöglicht den Nachweis von RNA-Molekülen. Mit Hilfe der Reversen Transkriptase (RT) wird die RNA in einer ersten Reaktion in cDNA

umgeschrieben. Diese dient dann in der anschließenden PCR als Template für die Amplifizierung einzelner Nukleinsäuresequenzen deren Nachweis in einem Agarosegel auf die Anwesenheit der entsprechenden RNA rückschließen lässt. Das Titan One Tube RT-PCR System von Roche (Mannheim) kombiniert unter Verwendung eines optimierten RT-PCR Puffers und eines Enzymmixes beide Reaktionen in einem Ansatz.

Reaktionsansatz

Master Mix 1:

| | | |
|----------------------------------|----|---------|
| dNPT Mix (10 mM) | | 4,0 µl |
| DTT Lösung (100 mM) | | 2,5 µl |
| RNase Inhibitor (40 U/µl) | | 1,0 µl |
| Downstream Primer (10 µM) | | 1,0 µl |
| Upstream Primer (10 µM) | | 1,0 µl |
| RNA Template (1 µg/µl) | | 1,0 µl |
| H ₂ O _{DEPC} | ad | 25,0 µl |

Master Mix 2:

| | | |
|----------------------------------|----|---------|
| RT-PCR Puffer (5 x) | | 14,0 µl |
| Enzym Mix* | | 1,0 µl |
| H ₂ O _{DEPC} | ad | 25,0 µl |

* AMV für die cDNA-Synthese, Taq- und Pwo-DNA Polymerase für die PCR

Beide eisgekühlten Master Mixe wurden in einem 0,2 ml PCR-Reaktionsgefäß vereinigt, gemischt und anzentrifugiert, um den PCR-Ansatz am Boden des Gefäßes zu sammeln.

Tab. 8: Reaktionsbedingungen der RT-PCR

| ANZAHL DER ZYKLEN | TEMPERATUREN UND ZEITEN | | |
|--------------------------|---|-------|---------|
| 1 | cDNA Synthese | 50 °C | 30 Min. |
| 1 | Initiale Denaturierung des DNA-Templates | 95 °C | 2 Min. |
| 10 | Denaturierung des DNA | 95 °C | 30 Sek. |
| | Anlagerung der Primer | 53 °C | 30 Sek. |
| | Strangsynthese | 68 °C | 45 Sek. |
| 25 | Denaturierung des DNA | 95 °C | 30 Sek. |
| | Anlagerung der Primer | 53 °C | 30 Sek. |
| | Strangsynthese | 68 °C | 50 Sek. |
| | (ab dem 11. Zyklus je 5 sec mehr pro weiteren Zyklus) | | |
| 1 | Abschließende Strangsynthese | 68 °C | 7 Min. |
| 1 | Lagerung der PCR-Ansätze | 4 °C | ∞ |

Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte elektrophoretisch in einem 2,0 %igem Agarosegel.

2.7.8 Anreicherung der mRNA

Die messenger RNA (mRNA) hat an der Gesamtheit aller in einer Zellen vorhandenen RNA-Spezies den geringsten Anteil. Ihr charakteristisches Ende aus vielen aufeinanderfolgenden Adenosinen, dem sogenannten poly A Schwanz, ermöglicht dennoch die spezifische Anreicherung der mRNA. Die Methode der Firma Clontech beruht auf einer magnetischen Separation der mRNA aus dem Pool der Total RNA. Hierzu binden zunächst biotinylierte oligo dT komplementär an den poly A Schwanz. An das Biotin der oligo dT binden in Streptavidin eingehüllte sogenannte magnetic beads und markieren die mRNA auf diese Weise. Unter Verwendung eines Magneten ist es nun möglich, die mRNA gezielt zu isolieren.

Vor ihrem Gebrauch wurden pro Reaktionsansatz 15 µl der resuspendierten magnetic beads in einem 0,5 ml E-Cup mit 400 µl Bindungspuffer (1 x) versetzt und kurz gemischt. Anschließend wurden die Beads mit einem Magneten separiert und der Überstand abpipettiert. Dieser Waschvorgang wurde 3 bis 5 mal wiederholt. Die gereinigten Beads wurden in 15 µl Bindungspuffer (1 x) resuspendiert.

Für die Anreicherung der mRNA wurden 10 bis 50 µg Total RNA in ein 0,5 ml E-Cup pipettiert und der Ansatz mit H₂O_{dest} auf 45 µl aufgefüllt. Nach Zugabe von 1 µl der biotinylierten oligo dT wurde das Reaktionsgemisch in einem vorgeheizten Thermocycler 2 Minuten bei 70 °C inkubiert. Einer 10-minütigen Abkühlung auf Raumtemperatur (RT) folgte die Zugabe von 45 µl Bindungspuffer (2 x). Die gesamten gewaschenen Beads (15 µl) wurden durch kurzes Mischen resuspendiert und dem Ansatz beigemischt. Dieser wurde bei 1500 Upm und RT auf einem Schüttler (Thermomixer 5436, Eppendorf, Hamburg) 25 bis 30 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Beads mit einem Magneten separiert und der Überstand verworfen. Nach zwei Waschschritten (s. o.) in 50 µl des Waschpuffers (1 x) wurden die Beads in 50 µl des Reaktionspuffers (1 x) resuspendiert. Schließlich wurden die Beads separiert, der Überstand verworfen und diese in 6 µl H₂O_{dest} aufgenommen.

2.7.9 Herstellung der radioaktiv-markierten cDNA-Sonden

Die radioaktiv-markierten cDNA-Sonden wurden aus den zuvor angereicherten mRNAs des zu analysierenden Gewebes synthetisiert. Dazu wurden die mRNA-beladenen magnetic beads in ihren 6 µl H₂O_{dest} resuspendiert, mit 1 µl CDC Primer Mix versetzt und durch Pipettieren gemischt. Dieser Ansatz wurde dann in einem Thermocycler (Robo Cycler Gradient 40, Stratagene, USA) für jeweils 2 Minuten erst bei 65 °C und anschließend bei 50 °C inkubiert. Während dieser Zeit wurden dem Mastermix 2 µl Superskript Reverse Transkriptase untergemischt. 13,5 µl des Mastermixes wurden zu den 6 µl resuspendierter magnetic beads gegeben und 25 Minuten bei 50 °C inkubiert. Abgestoppt wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 2 µl 10 x Terminationsmix und einer 5-minütigen Inkubation bei 70 °C.

Mastermix (pro Reaktionsansatz)

| | |
|--|--------|
| Reaktionspuffer (5 x) | 4,0 µl |
| dNTP Mix (10 x) (für dATP-Markierung) | 2,0 µl |
| [α- ³² P]dATP (3000 Ci/mmol, 10 µCi/µl) | 5,0 µl |
| DTT (100 mM) | 0,5 µl |

2.7.10 Säulenchromatographie

In der Säulenchromatographie wurden nicht eingebaute ^{32}P -Nukleotide von den markierten cDNA-Sonden abgetrennt. Dafür wurden zunächst die magnetic beads separiert und der Überstand (ca. 20 μl) in 180 μl des Puffers NT2 aufgenommen. Beides wurde auf eine sogenannte NucleoSpin Extraction Spin Säule gegeben, die ihrerseits in einem 2 ml Sammelröhrchen hing. Der Ansatz wurde 1 Minute bei 15000 x g zentrifugiert (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg) und das Sammelröhrchen samt Inhalt in den radioaktiven Abfall entsorgt. Die NucleoSpin Säule wurde in ein neues 2 ml Sammelröhrchen gehängt und mit 400 μl NT3-Puffer aufgefüllt. Es folgte eine 1-minütige Zentrifugation bei 15000 x g (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg) und das Verwerfen des Sammelröhrchens samt Inhalts. Dieser Waschschrift wurde weitere drei mal wiederholt bevor die NucleoSpin Säule in ein 1,5 ml E-Cup gehängt und mit 100 μl NE-Puffer gefüllt wurde. Nach einer 2-minütigen Inkubation wurden die markierten mRNAs 1 Minute bei 15000 x g (Centrifuge 5415C, Eppendorf, Hamburg) von der Säule gewaschen. Als Maß für die Qualität der cDNA-Sonden wurde die Menge an eingebautem ^{32}P mit Hilfe eines Scintillationszählers (LS 5000TD, Beckman, Krefeld) ermittelt. 1 μl der Sonden wurde in 1000 μl Scintillationsflüssigkeit aufgenommen und anschließend die Radioaktivität gemessen. Bei Verwendung des Atlas Pure Labeling System für die Sondenherstellung sollte dieser Wert zwischen 0,5 und 5×10^6 cpm liegen. Eine kurzzeitig Lagerung der Proben erfolgte bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

2.7.11 Hybridisierung der cDNA-Arrays

Vor der Hybridisierung der cDNA-Arrays mit den radioaktiv-markierten Sonden wurden unspezifische Bindungen auf der Nylonmembran in der sogenannten Prähybridisierung abgesättigt. Verwendet wurde ein Ansatz aus ExpressHyb und Lachssperma DNA. 0,5 mg dieser DNA wurden 5 Minuten bei $95\text{ }^\circ\text{C}$ bis $100\text{ }^\circ\text{C}$ denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Diese wurde dann mit 5 ml auf $68\text{ }^\circ\text{C}$ vorgewärmten ExpressHyb vermischt und bei dieser Temperatur bis zur Verwendung aufbewahrt. Die Hybridisierungsflaschen wurden mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ gefüllt, um ihre Wände zu befeuchten. Die Nylonmembran wurde ebenso mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$ getränkt und anschließend in die Hybridisierungsflaschen eingebracht. Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischen der Membran und der Flaschenwandung keine Luftblasen eingeschlossen wurden und die cDNA der Zytokinteilsequenzen tragende Seite der Membran ins Flascheninnere orientiert wurde. Das Wasser in den Flaschen wurde durch die Prähybridisierungslösung ersetzt und die Nylonmembran wurde in dieser

30 Minuten bei 68 °C und einer kontinuierlichen Drehbewegung (5 bis 7 Upm) in einem Inkubator (GFL 7601, Burgwedel) inkubiert.

Anschließend wurden 5 µl C₀t-1 DNA zum gesamten Pool der radioaktiv-markierten cDNA Sonden gegeben und zusammen mit diesen für 2 Minuten in einem Wasserbad gekocht. Nach einer 2-minütigen Abkühlung auf Eis wurde dieser Ansatz in die Hybridisierungsflaschen zur Prähybridisierungslösung gegeben. Dabei durfte der Ansatz mit den Sonden nicht direkt auf die Membran pipettiert werden. Die Membran wurde über Nacht bei 68 °C und kontinuierlicher Drehbewegung in einem Inkubator hybridisiert. Am folgenden Tag wurde die Hybridisierungslösung in den flüssigen radioaktiven Abfall entsorgt und die Membran dreimal in 50 ml vorgewärmter Waschlösung 1 für jeweils eine halbe Stunde bei 68 °C und kontinuierlicher Drehbewegung im Inkubator gewaschen. Nach einem weiteren Waschschrift unter den gleichen Bedingungen in Waschlösung 2 folgte ein abschließender 5-minütiger Waschschrift in 50 ml 2 x SSC bei RT. Die Membran wurde mit Pinzetten aus der Hybridisierungsflasche geholt und im feuchten Zustand in eine Plastikhülle eingeschweißt. Das Einschweißen der Membran verhindert ihre Austrocknung und ermöglicht eine spätere Wiederverwendung. Darüber hinaus erlaubt es eine komfortable Auswertung der Membran.

Waschlösung 1

| | |
|----------------------------------|--------------|
| SSC (20 x) | 100,0 ml |
| SDS (20 %ig) | 50,0 ml |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000,0 ml |

Waschlösung 2

| | |
|----------------------------------|--------------|
| SSC (20 x) | 5,0 ml |
| SDS (20 %ig) | 25,0 ml |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000,0 ml |

SSC (20 x)

| | |
|--|--------------|
| NaCl | 173,3 g |
| Na ₃ Citrat•2H ₂ O | 88,2 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000,0 ml |

Der pH-Wert wurde mit 1 M HCl auf 7,0 eingestellt und die Lösung bei RT gelagert.

SDS (20 %ig)

| | |
|----------------------------------|--------------|
| SDS | 200,0 g |
| H ₂ O _{dest} | ad 1000,0 ml |

Die Lösung wurde auf 65 °C erwärmt, um das SDS zu lösen. Gelagert wurde sie bei RT.

2.7.12 Analyse der cDNA-Arrays

Für die Analyse der cDNA-Arrays standen zwei Möglichkeiten zur Verfügung: Die Autoradiographie und der Phosphorimager. Bei der Autoradiographie wird die Energie der von den gebundenen radioaktiven Sonden ausgehende ionisierende Strahlung dazu verwendet, die Silberhalogenid-Kristalle eines Röntgenfilms zu metallischem Silber zu reduzieren. Diese Silberkörner erscheinen nach der Entwicklung des Film als Schwärzung und geben die Lage der Radioaktivität auf der Array Membran an. Der Röntgenfilm wurde 14 Tage lang mit dem cDNA-Array exponiert. Anschließend wurde der Film in einer Entwicklermaschine (Optimax Typ TR, MS Laborgeräte, Heidelberg) entwickelt. Für die Auswertung der Arrays mit dem Phosphorimager (Fuji Bas 2000, Fuji, Japan) wurden diese zunächst auf einem beschichteten Screen 2 Tage lang in einer Art Tresor weitgehend abgeschirmt von der kosmischen Strahlung inkubiert. Dieser verglichen mit herkömmlichen Röntgenfilmen 10 - 100 mal empfindlichere Screen absorbiert die radioaktive Strahlungsenergie und gibt sie nach Anregung durch einen Laser als sichtbares Licht teilweise wieder ab. Der Phosphorimager detektiert und quantifiziert diese Lichtsignale mit einer Auflösung von 0,2 mm und ermöglicht so ebenfalls eine Lokalisierung der Radioaktivität. Für die Auswertung der erhaltenen Expressionsprofile wurde die Software AtlasImager2.0 der Firma Clontech verwendet.

2.7.13 Strippen der cDNA-Arrays

Die cDNA-Arrays können laut Hersteller ohne wesentlichen Verlust an Spezifität bis zu 4 mal wiederverwendet werden. Dazu ist es erforderlich, die an der Membran gebundenen cDNA-Sonden abzulösen. Zu diesem Zweck wurden die Membranen 5 bis 10 Minuten in 500 ml einer 0,5 %igen SDS Lösung gekocht. Nach einer 10-minütigen Abkühlung der Lösung wurden die Arrays mit Waschlösung 1 (s. 2.6.10) abgespült. Anschließend wurden sie entweder sofort wiederverwendet oder in eine sie vor dem Austrocknen schützenden Plastikhülle eingeschweißt und bei – 20 °C gelagert.

2.8 Verifikation der cDNA-Arrays

Die Ergebnisse der cDNA-Arrays sollten mit dem Verfahren der Real-Time PCR bestätigt werden. Dazu wurden bei der Firma Clontech die zu den auf den Arrays als verändert exprimiert identifizierten Zytokingene die passenden Primersequenzen bestellt. Diese dienten der Firma Invitrogen als Vorlage für die Synthese der entsprechenden Oligonukleotide. Die mRNA der aus dem Interfacemembran- und dem Referenzgewebe der Patienten mit einer aseptischen Endoprothesenlockerung isolierten Total RNA wurde zunächst in cDNA transkribiert, die dann unter Verwendung der synthetisierten Primer als PCR Template eingesetzt wurde.

2.8.1 cDNA-Synthese

Die cDNA-Synthese beruht auf einer durch die reverse Transkriptase katalysierten enzymatischen Reaktion, in der RNA zu cDNA transkribiert wird. Das folgende Protokoll stammt aus dem „First-Strand Synthesis“-Kit der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande).

Reaktionsansatz 1

| | |
|-----------------------------------|------------|
| Total-RNA (1 µg) | 1,0 µl |
| Random Hexamer Primers (50 ng/µl) | 1,0 µl |
| dNTP-Mix (10 mM) | 1,0 µl |
| H ₂ O _{DEPC} | ad 10,0 µl |

Dieser Ansatz wurde 5 Minuten bei 65 °C inkubiert und anschließend mindestens 1 Minute auf Eis abgekühlt.

Reaktionsansatz 2

| | |
|---------------------------|--------|
| RT-Puffer (10 x) | 2,0 µl |
| MgCl ₂ (25 mM) | 4,0 µl |
| DTT (0,1 M) | 2,0 µl |
| RNase OUT | 1,0 µl |

Für jede cDNA Synthese wurden 9 µl des Reaktionsansatzes 2 mit dem gesamten Reaktionsansatz 1 gemischt und anschließend kurz abzentrifugiert. Einer 2-minütigen

Inkubation bei 25 °C folgte der Zusatz von 1 µl (50 U) der reversen Transkriptase SuperScriptII-RT. Die Anlagerung der Primer an die Total RNA erfolgte in den folgenden 10 Minuten bei 25 °C. Die während der anschließenden 50-minütigen Inkubation bei 50 °C stattfindende Transkription der Total RNA in cDNA wurde durch die 15-minütige Erwärmung der Proben auf 70 °C terminiert. Nach ihrer Abkühlung auf Eis wurden die Proben abzentrifugiert und einer 20-minütigen RNaseH (1µl/Ansatz) Behandlung bei 37 °C unterzogen. Die cDNAs wurden bei – 20 °C aufbewahrt.

2.8.2 Gel-Extraktion

Die Gel-Extraktion wird eingesetzt, um DNA-Fragmente nach ihrer gelelektrophoretischen Auftrennung aus dem Gel zu isolieren. Bei dem verwendeten „QIAquick Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) wird die isolierte DNA zusätzlich von Verunreinigungen befreit.

Die Bande der zu extrahierenden DNA wurde exakt aus dem Agarosegel ausgeschnitten, gewogen und mit 3 Vol QG-Puffer pro Gelvolumen (100 mg ~100 µl) versetzt. Nach dem Auflösen der Agarose bei 50 °C wurde der Ansatz mit 1 Gelvolumen Isopropanol versetzt und auf die Membran einer QIAquick Säule gegeben. Diese wurde in einem 2 ml E-Cup platziert und 1 Minute bei 13000 x g (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Die aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen und die DNA mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde der PE-Puffer durch wiederholtes Zentrifugieren bei 13000 x g (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) vollständig entfernt, wobei der Durchlauf zwischen den beiden Zentrifugationsschritten verworfen wurde. Anschließend wurde die QIAquick Säule in ein 1,5 ml E-Cup überführt und zum Eluieren der DNA 50µl H₂O_{DEPC} auf ihre Membran gegeben. Nach 1-minütiger Inkubation wurde die DNA bei 18000 x g (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) eluiert und bis zu ihrer Verwendung bei – 20 °C gelagert.

2.8.3 Ligation

In dem als Ligation bezeichneten Vorgang werden DNA-Fragmente in ein als Vektor für eine Klonierung fungierendes Plasmid eingebracht. Dabei werden in dem verwendeten Kit der Firma Invitrogen die während der PCR durch die Taq-Polymerase an die zu klonierenden DNA-Fragmente synthetisierten unspezifischen sogenannten A-Überhänge genutzt, um sie in einer durch die T4-Ligase katalysierten Reaktion mit den T-Überhängen des linearisierten Vektors zu verbinden. Der eingesetzte Vektor (*pCR2.1*) ist ein *E.coli*

Plasmid mit einer Größe von 3,9 kb. Darüber hinaus besitzt er das lacZ-Gen, welches für die β -Galactosidase codiert und einen Polylinker besitzt, der die Selektion erfolgreich transformierter Klone (s. 2.8.4) ermöglicht (Blau-weiß Selektion). Die Aufnahme des Plasmids durch kompetente Zellen ist durch seine Gene für eine Ampicillin und Kanamycin Resistenz auf entsprechenden Nährböden überprüfbar.

Ligationsansatz

| | |
|----------------------------------|-----------------|
| Vektor (pCR2.1) | 2,0 μ l |
| DNA aus PCR-Ansatz | 1,0 μ l |
| Puffer (10 x) | 1,0 μ l |
| T4 DNA-Ligase | 1,0 μ l |
| H ₂ O _{DEPC} | ad 10,0 μ l |

Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 14 °C in einem Wasserbad mit angeschlossenem Kühlgerät (WK 500 Lauda , Merck, Darmstadt) inkubiert und anschließend gegebenenfalls bei – 20 °C gelagert.

2.8.4 Transformation

Der Begriff der Transformation beschreibt die Aufnahme von genetischer Information aus dem eine kompetente Zelle umgebenden Medium. In dem verwendeten TA Cloning Kit der Firma Invitrogen (Groningen, Niederlande) können alternativ die *E.coli* Stämme *Inv*aF` oder *DH5a* für eine Transformation mit dem Plasmid *pCR2.1* eingesetzt werden. Dabei wird die Transformations-effizienz durch einen kurzzeitigen Hitzeschock noch erhöht. Nach dem Auftauen von 50 μ l kompetenter Zellen wurden diesen 2 μ l des bei 15000 x g abzentrifugierten Ligationsansatzes zugesetzt und durch Umrühren der Pipette gemischt. Einer 30-minütigen Inkubation auf Eis folgten ein 30-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C und eine 2-minütige Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 250 μ l SOC-Medium wurde der Ansatz eine Stunde bei 37 °C und 225 rpm geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 x g abzentrifugiert, in 250 μ l LB-Medium resuspendiert und 50 μ l sowie 200 μ l des Ansatzes auf je eine Ampicillin- und X-Gal-haltige LB-Agarplatte ausgestrichen. Nach mindestens 18-stündiger Inkubation bei 37 °C und 2 - 3-stündiger Abkühlung bei 4 °C zeigten sich unter vielen blauen einzelnen weißen, das Plasmid mit dem inklonierten DNA-Fragment tragende Kolonien (Blau-weiß Selektion).

2.8.5 Klonanalyse

In der Klonanalyse soll überprüft werden, ob das gewünschte DNA-Fragment in den Vektor legiert wurde. Dazu wurden alle einen Vektor mit Insertion im Polylinker tragenden und aufgrund der dann fehlenden β -Galactosidaseaktivität weißen Kolonien gepickt und zum Animpfen von 1,5 ml Ampicillin-haltigen LB-Mediums verwendet. Diese Kulturen wurden über Nacht bei 37 °C und 150 rpm geschüttelt (Incubator Shaker, New Brunswick Scientific, USA). Anschließend wurden die Zellen in einer 15-minütigen Zentrifugation bei 6000 x g pelletiert (Rotina 35, Hettich, Tuttlingen) und in 250 μ l Quiagenpuffer 1 resuspendiert. Nach Zugabe von 250 μ l Quiagenpuffer 2 und 6 maligem Invertieren wurde der Ansatz 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Dem Zusatz von 250 μ l vorgekühlten Quiagenpuffer 3, sechs maligem Invertieren und einer 20-minütigen Inkubation auf Eis folgte eine 20-minütige Zentrifugation bei 13000 x g (Rotina 35, Hettich, Tuttlingen). Der Überstand wurde in ein neues E-Cup überführt und die enthaltene DNA durch Zugabe von 700 μ l Isopropanol sowie einer 30-minütigen Inkubation auf Eis gefällt. Die in einer 30-minütigen Zentrifugation bei 13000 x g (Rotina 35, Hettich, Tuttlingen) pelletierte DNA wurde anschließend zweimal mit 70 %igem Ethanol gewaschen und abermals in einer 5-minütigen Zentrifugation bei 13000 x g (Rotina 35, Hettich, Tuttlingen) pelletiert. Nach Abnahme des Überstandes wurde das Pellet luftgetrocknet und schließlich in 20 μ l H₂O_{DEPC} aufgenommen.

Die Konzentration der isolierten DNA wurde photometrisch (UV/VIS Spectrometer Lambda Bio 10, Perkin Elmer, Überlingen) bestimmt.

Der Polylinker des verwendeten Vektors enthält Erkennungsstellen für die unterschiedlichsten Restriktionsenzyme, so dass ein gezieltes Herausschneiden des einklonierten DNA-Fragmentes möglich ist. Nach der Isolation der DNA wurde eine Restriktionsspaltung mit dem Enzym EcoRI durchgeführt und die Größen der Spaltprodukte im Agarosegel mit denen der einklonierten DNA-Fragmente (s.2.6.5) verglichen.

Restriktionsansatz

| | |
|----------------------------------|--------------|
| DNA | 3,0 μ l |
| Restriktionspuffer (10 x) | 2,0 μ l |
| EcoRI | 1,0 μ l |
| H ₂ O _{DEPC} | 14,0 μ l |

Der Restriktionsansatz wurde eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

2.8.6 Plasmid Miniprep (Birnboim und Doly, 1979); modifiziert

Die Plasmid Miniprep ermöglicht die Isolierung und Reinigung von Plasmid DNA. Die erhaltene DNA wurde als Template in einer PCR eingesetzt, um das inklonierte DNA-Fragment zu identifizieren. Zur Plasmidpräparation wurde der „QIAprep Spin Miniprep Kit“ der Firma Qiagen (Hilden) verwendet.

Die Zellen der gepickten Klone wurden in 5 ml ampicillin-haltigen LB-Medium über Nacht bei 37 °C und 150 rpm angezogen und anschließend 15 Minuten lang bei 6000 x g (Rotina 35, Hettich, Tuttlingen) pelletiert. Das Zellpellet wurde in 250 µl P1-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von 250 µl P2-Puffer durch vorsichtiges 6 maliges Invertieren mit diesem vermischt. Nach einer maximal 5-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden dem Ansatz zum Ausfällen der Proteine 350 µl P3-Puffer zugesetzt und durch 6 maliges Invertieren durchmischt. Der Überstand der folgenden 10-minütigen Zentrifugation bei 13000 x g (Rotina 35, Hettich, Tuttlingen) wurde auf eine QIAprep-Säule gegeben. In einer 1-minütigen Zentrifugation bei 13000 x g (Rotina 35, Hettich, Tuttlingen) wurde der Puffer aus dem Überstand entfernt, in einem 2 ml ECup aufgefangen und verworfen. Anschließend wurde die Säule mit 500 µl PB-Puffer gewaschen und damit die restliche Nukleaseaktivität entfernt. Nach dem 1-minütigen Abzentrifugieren des Puffers bei 13000 x g (Rotina 35, Hettich, Tuttlingen) wurde dieser ebenfalls verworfen und die Säule mit 750 µl PE-Puffer gewaschen. Zwischen den folgenden beiden jeweils 1-minütigen Zentrifugationsschritten bei 13000 x g (Rotina 35, Hettich, Tuttlingen) wurde der abzentrifugierte Puffer verworfen. Die Säule wurde anschließend in ein 1,5 ml ECup überführt und mit 50 µl H₂O_{DEPC} geladen. Nach einer 1-minütigen Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde die DNA in einer 1-minütigen Zentrifugation bei 13000 x g (Rotina 35, Hettich, Tuttlingen) von der Säule eluiert. Die Plasmid-DNA wurde bis zu ihrer Verwendung bei – 20 °C gelagert.

P1-Puffer

| | |
|------------------|----------|
| Tris-HCl, pH 8,0 | 50 mM |
| EDTA | 10 mM |
| RNase A | 10 µg/ml |

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 8,0 eingestellt.

P2-Puffer

| | |
|------|-----------|
| NaOH | 200 mM |
| SDS | 1 % (w/v) |

P3-Puffer

| | |
|--------------|-----|
| Kaliumacetat | 3 M |
|--------------|-----|

Der pH-Wert wurde mit Essigsäure auf 5,5 eingestellt.

2.8.7 Sequenzierung

Die Sequenzierung der unter Verwendung der Plasmid-DNA als Template und des jeweiligen Primers erhaltenen PCR-Produkte ist die sicherste und eindeutigste Methode zur Identifizierung des inklonierten DNA-Fragmentes. Mit der Sequenzierung, d. h. der Bestimmung der Basenfolge, der analysierten Klone wurde der Sequenzierservice des Universitätskrankenhauses Eppendorf, Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie, Prof. Richter beauftragt. Dort wird für die Sequenzierung der auf dem Einbau fluoreszierender Farbstoffe (BigDye) während der Doppelstrangsynthese einer durch die Appli-Tag DNA Polymerase katalysierten PCR basierende Big Dye Terminator Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Amplifikate erfolgte anschließend in einem denaturierenden Polyacrylamidgel auf einem ABI PRISM® 377 DNA Sequencer. Die Reaktionsansätze für die der Sequenzierung vorausgehenden PCR sowie die erforderliche Reinigung der PCR-Produkte mit dem DyeEx SpinKit der Firma Qiagen sind im Folgenden beschrieben.

PCR-Reaktionsansatz

| | |
|--|------------|
| Primer (upstream oder downstream, 15 pmol) | 1,5 µl |
| BD (Big Dye Farbstoff) | 1,5 µl |
| HT (Half Therm Puffer + Enzym) | 6,5 µl |
| Plasmid-DNA | 5,0 µl |
| H ₂ O _{DEPC} | ad 20,0 µl |

Tab. 9: Reaktionsbedingungen der PCR

| ANZAHL DER ZYKLEN | TEMPERATUREN UND ZEITEN | | |
|-------------------|--|-------|---------|
| 1 | Initiale Denaturierung des DNA-Templates | 94 °C | 5 Min. |
| 25 | Denaturierung des DNA | 94 °C | 10 Sek. |
| | Anlagerung der Primer | 50 °C | 5 Sek. |
| | Strangsynthese | 60 °C | 4 Min. |
| 1 | Lagerung der PCR-Ansätze | 4 °C | ∞ |

Die Säulen für die Reinigung der PCR-Produkte wurden in 2 ml ECups platziert und 3 Minuten bei 2700 x g (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) zentrifugiert. Nachdem die Säulen in 1,5 ml E-Cups gestellt worden waren, wurden diese mit den 20 µl des PCR-Ansatzes beladen. Einer 3-minütigen Zentrifugation bei 2700 x g (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg) folgte das Fällen der DNA aus dem Eluat mit 45 µl absoluten Ethanol. Die Pelletierung der DNA erfolgte in einer 20-minütigen Zentrifugation bei 15000 x g (Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg). Das Ethanol wurde abgezogen und das DNA-Pellet luftgetrocknet zum Sequenzieren abgegeben.

Die erhaltenen Sequenzen wurden mit dem Programm Blastn (Altschul et al., 1997) für Nukleinsäuren mit den aktuellen Datenbankeinträgen "GenBank R" (Benson et al., 2000) des Nationale Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA, verglichen, um zu überprüfen, ob die Sequenz der inklonierten DNA mit der des untersuchten Zytokingens übereinstimmt.

2.8.8 Real-Time PCR (Saiki et al., 1985)

Die Methode der Real-Time PCR ermöglicht die kontinuierliche Quantifizierung der während einer PCR synthetisierten Nukleinsäuren. Dabei bindet der in dieser Studie als Reportermolekül verwendete DNA Farbstoff SYBR Green an die PCR Produkte und ermöglicht über seine Fluoreszenz ihre Quantifizierung. Durch die abschließende Erstellung einer Schmelzkurve der PCR Produkte wird die Temperatur ermittelt, bei der ihre doppelsträngige DNA in Einzelstränge zerfällt. Diese Temperatur ist speziesspezifisch und erlaubt eine Zuordnung der PCR Produkte. Durchgeführt wurde die Real-Time PCR in einem LightCycler der Firma Roche (Roche-Boehringer, Mannheim).

Real-Time PCR Reaktionsansatz

| | |
|-----------------------------------|--------|
| MgCl ₂ (4mM) | 2,4 µl |
| Forward Primer (5µM) | 2,0 µl |
| Reverse Primer (5µM) | 2,0 µl |
| SYBR Green Master Mix | 2,0 µl |
| cDNA (1:10) | 2,0 µl |
| H ₂ O _{dest.} | 9,6 µl |

SYBR Green Master Mix

| | |
|----------------------|---------|
| SYBR Green (Lsg. 1B) | 60,0 µl |
| SYBR Green (Lsg. 1A) | 40,0 µl |

Der Master Mix wurde lichtgeschützt b, bei – 20 °C gelagert.

Tab. 10: Reaktionsbedingungen der Real-Time PCR

| ANZAHL DER ZYKLEN | TEMPERATUREN UND ZEITEN | | |
|--------------------------|--|-------|---------|
| 1 | Initiale Denaturierung des DNA-Templates | 95 °C | 10 Min. |
| 40 | Denaturierung des DNA | 95 °C | 10 Sek. |
| | Anlagerung der Primer | 53 °C | 10 Sek. |
| | Strangsynthese | 72 °C | 10 Sek. |
| 1 | Schmelzkurve | 95 °C | 30 Sek. |
| | Erhöhung der Temperatur von 60 °C auf 95 °C mit einer Schrittweite von 0,5 °C bei kontinuierlicher | | |
| | Messung der Fluoreszenz | | |
| | Abkühlung | 40 °C | 15 Sek. |
| 1 | Lagerung der PCR-Ansätze | 4 °C | ∞ |

2.9 Bezugsquellen

Bis auf die im Folgenden aufgelisteten wurden alle übrigen Chemikalien und Enzyme der Firmen Gibco (Karlsruhe), Sigma (Taufkirchen) sowie Merk (Darmstadt) in den Reinheitsgraden „p.a.“ oder „reinst“ verwendet:

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg:

[α -³²P]dATP

Chroma-GmbH & Co., Münster:

Orange G, Ponceau de Xylidine

Clontech, Heidelberg:

AtlasTMPure Total RNA Labeling System,

Atlas Human Cytokine/Receptor Array

Heraeus/Kalzer GmbH, Wehrheim/Ts. :

Technovit

Invitrogen, Groningen, Niederlande:

SuperScriptTM First-Strand Synthesis System for RT-PCR,

The Original TA Cloning Kit

Novo Biolabs, Bagsvaerd, Dänemark:

EcoRI

Qiagen, Hilden:

Plasmid Midi Kit 25,

DyeEx Spin Kit,

QIAprep Spin Miniprep Kit (50),

QIAquick Gel Extraction Kit (50),

RNase-Free DNase Set (50),

Taq PCR Core Kit (1000 units)

Riedel-de-Haen, Seelze:

Eisessig

Roche-Boehringer, Mannheim:

TitanTM One Tube RT-PCR System,

LightCycler-Fast Start DNA Master SYBR Green I

3. Ergebnisse

3.1 Resorptionslakunen und Perforationen

3.1.1 Auswahl der Patienten

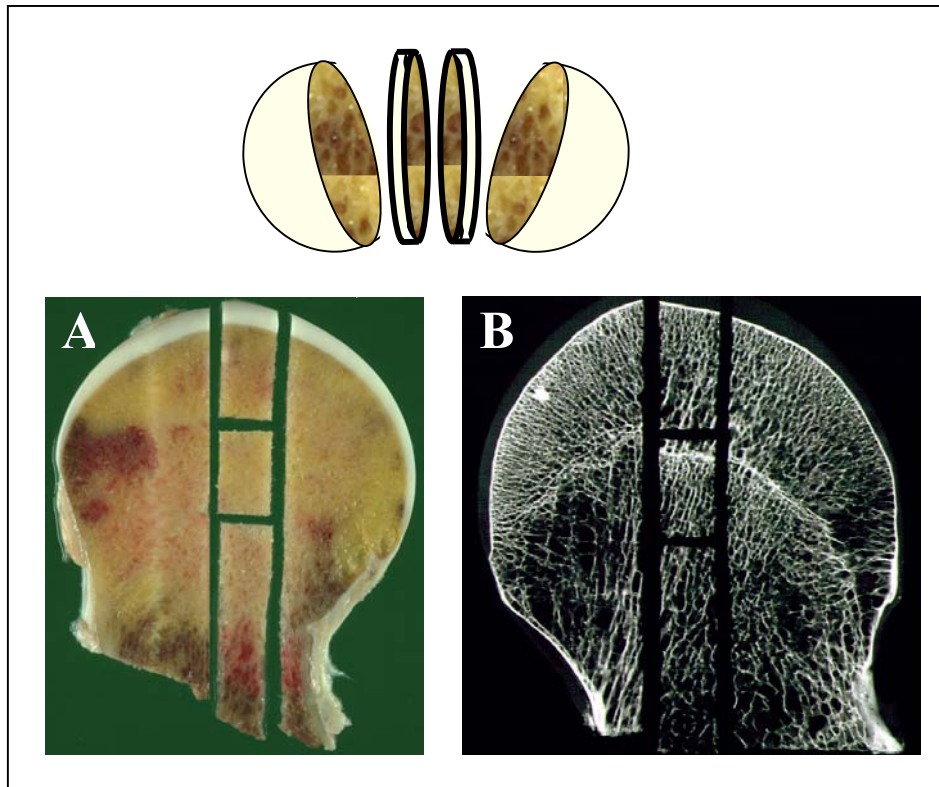
In dieser Studie sollten ausschließlich Skelettgesunde, sogenannte „Normalpatienten“ untersucht werden. Daher war es wichtig, ausschließen zu können, dass die Patienten vor ihrem plötzlichen Tod weder bettlägerig gewesen waren noch an einem metabolischen Defekt litten. Beide Umstände verändern den Knochenmetabolismus und beeinflussen damit auch die licht- und elektronenmikroskopisch analysierbare Struktur des Knochens. Aufgrund der erforderlichen Erfahrung beim Ausschließen dieser Kriterien wurden die Proben zunächst von dem renommierten Referenzpathologen Prof. Dr. G. Delling histologisch beurteilt.

Tab. 11: Auflistung der untersuchten Knochenproben

| GESCHL. | ALTER [JAHREN] | | | | | | | | | | | | | | | | | Ø ALTER [JAHREN] | |
|----------|----------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|------------------|------|
| | 34 | 36 | 43 | 47 | 48 | 48 | 49 | 49 | 51 | 51 | 52 | 52 | 53 | 62 | 66 | 73 | 78 | | |
| männlich | 34 | 36 | 43 | 47 | 48 | 48 | 49 | 49 | 51 | 51 | 52 | 52 | 53 | 62 | 66 | 73 | 78 | | 52,5 |
| weiblich | 33 | 34 | 38 | 41 | 42 | 48 | 51 | 52 | 53 | 55 | 57 | 58 | 68 | 70 | 74 | 78 | 79 | 82 | 56,3 |

3.1.2 Histologie

Eine erste Möglichkeit, die osteoklastäre Abbauaktivität sichtbar zu machen, bot die histologische Untersuchung der aus den Hüftköpfen gewonnenen spongiösen Knochenproben. Zur Entnahme der Knochenproben wurden die fixierten (s. 2.3) Hüftköpfe durch einen medialen Sagittalschnitt eröffnet. Parallel zu der entstandenen Schnittfläche wurden den Hüftköpfen je zwei mediale Scheiben entnommen. Aus diesen wurde ein in der Zentralachse des Hüftkopfes gelegener Knochenstreifen gesägt. Die untersuchten Proben wurden den Knochenstreifen 1,5 cm unterhalb der Gelenkfläche des Hüftkopfes entnommen (Abb. 1).

**Abb. 1: Probenzuschnitt**

Schema: Auftrennung des Hüftkopfes

A: Makroskopisches Bild einer zugesägten medialen Scheibe des Hüftkopfes mit ausgesägtem und unterteiltem Knochenstreifen. Das mittlere Fragment des Knochenstreifens wurde untersucht.

B: Kontaktradiographie einer solchen Scheibe mit deutlich erkennbarem spongiösen Knochen

Für die histologische Untersuchung wurden die Knochenproben in Acrylat (s. 2.5.1.1.1) oder Paraffin (s. 2.5.1.1.2) eingebettet, semidünn geschnitten (s. 2.5.1.2) und anschließend zur besseren Differenzierung verschiedener Gewebe mit Toluidinblau O (s. 2.5.1.3.4), Giemsa (s. 2.5.1.3.1) oder Goldner (s. 2.5.1.3.2) gefärbt. Sowohl das Giemsa gefärbte als auch die mit Toluidinblau O behandelte Schnittpräparate erlauben eine deutliche Unterscheidung zwischen dem blassblau bzw. dunkelblau erscheinenden mineralisierten Knochengewebe und den angrenzenden bläulich bzw. rötlich angefärbten Knochenmarkszellen. Osteoklasten ließen sich aufgrund ihrer Mehrkernigkeit und Größe in solchen histologischen Präparaten von anderen Zellen abgrenzen (Abb. 2, Pfeile). Einen weiteren Hinweis, dass es sich bei diesen Riesenzellen um Osteoklasten handelt, liefert ihre einzigartige Befähigung zum Knochenabbau. Das Ergebnis ihrer Resorptionsaktivität ist wie auf den lichtmikroskopischen Bildern der histologischen Schnittpräparate zu sehen, als Einsenkung der Knochenoberfläche direkt unter den auf der Knochenoberfläche sitzenden Osteoklasten zu erkennen.

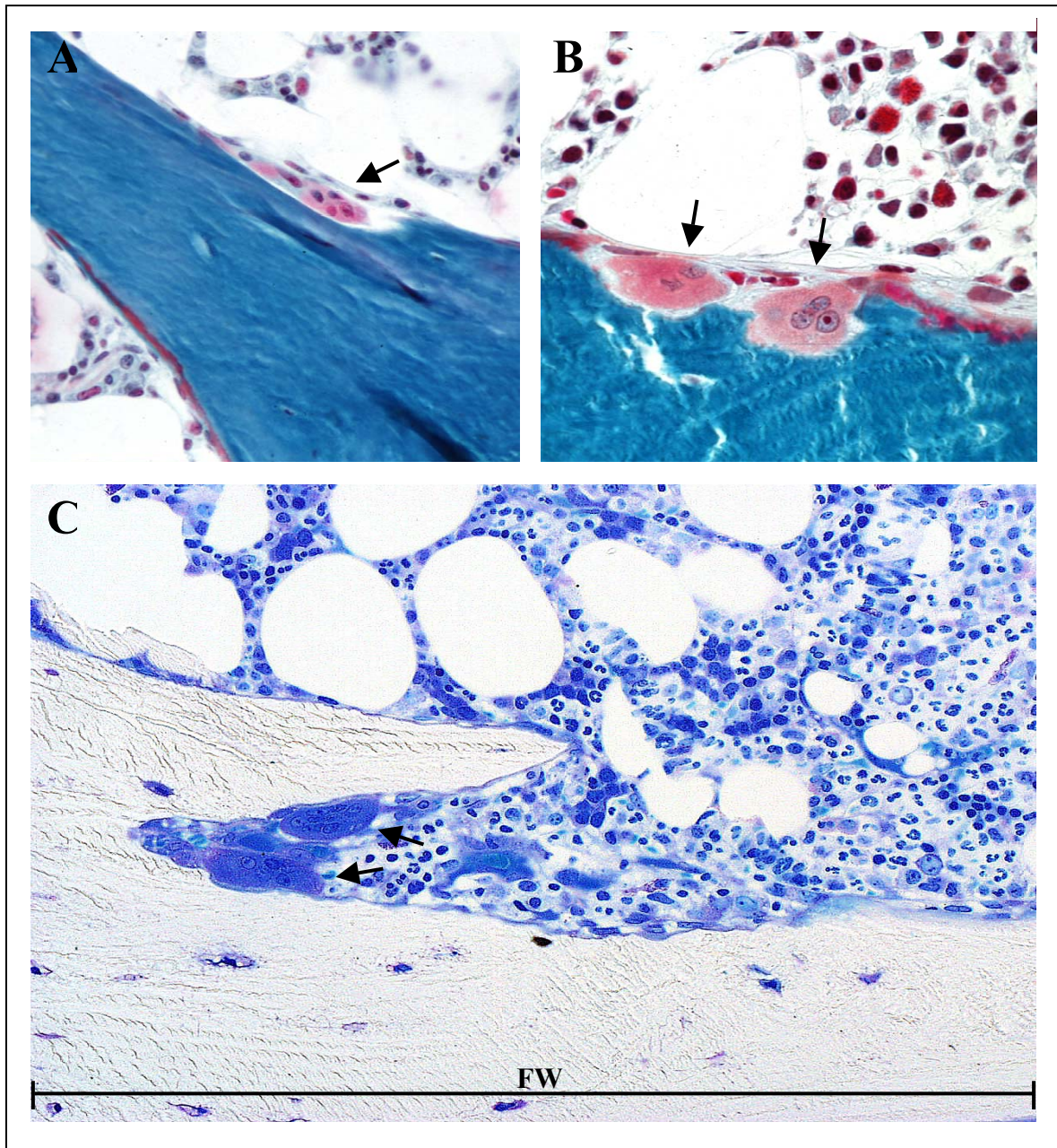


Abb. 2: Osteoklasten in histologischen Schnitten

A, B: Toluidinblau O gefärbte Schnitte mit mehrkernigen Osteoklasten (Pfeile) in unterschiedlich tiefen und verschiedenförmigen Resorptionspits; Feldweite (FW) = 423 μm

C: Giemsa behandeltes Präparat mit Osteoklasten in einer tiefen, sich verjüngenden Einkerbung der Knochenoberfläche; FW = 423 μm

Bereits diese lichtmikroskopischen Aufnahmen lassen erahnen, dass es hinsichtlich der Tiefe, der Form und der Entstehung von Resorptionslakunen Unterschiede gibt. Der Resorptionspit unter dem Osteoklasten in Abb. 2A erscheint deutlich flacher und langgestreckter als die in Abb. 2B gezeigten quadratischen Resorptionspits. Darüber hinaus ist in den Abb. 2A und 2B nur jeweils ein Osteoklast in einem Resorptionspit zu sehen, während in Abb. 2C ein Verband aus mindestens zwei Osteoklasten scheinbar zielstrebig

eine Art Tunnel in den Knochen „hineinresorbiert“ und die Knochenoberfläche damit einkerbt. Die weitere Untersuchung dieser Resorptionslakunen erfolgte mit Hilfe der dreidimensionalen Lichtmikroskopie (3D-LM) von Schliffpräparaten.

3.1.3 Dreidimensionale Lichtmikroskopie (3D-LM)

Für die 3D-LM wurden die spongiösen Knochenpräparate des Hüftkopfes in einer Mazeration vom Weichgewebe befreit (s. 2.4), getrocknet, in Technovit eingebettet (s. 2.5.2.1), geschliffen (s. 2.5.2.2) und ihre Oberfläche in einer Kossa-Färbung (s. 2.5.2.3) versilbert. Die Schliffpräparate waren 1 mm dick und erlaubten einen dreidimensionalen Blick auf das mineralisierte Knochengewebe.

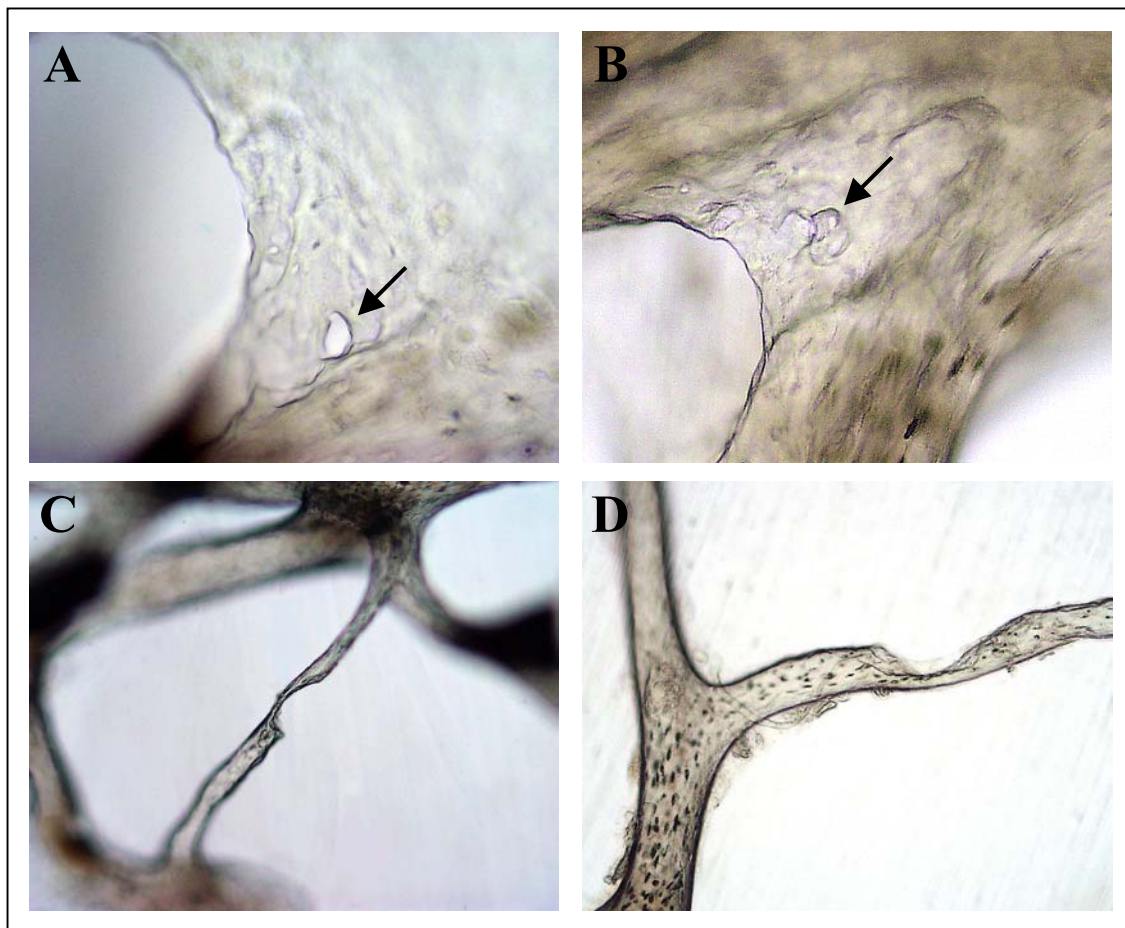


Abb. 3: Kossa gefärbte Schliffpräparate des spongiösen Knochens

- A, B: Aufsicht auf eine spongiöse Platte mit Perforation (Pfeil) und angrenzender Resorptionslakune; FW = 423 μ m; FW = 369 μ m
 C, D: Seitenansicht eines spongiösen Stabes mit tiefer Resorptionslakune; FW = 1,69 mm; FW = 1,43 mm

In den Schliffpräparaten lassen sich Resorptionslakunen sowohl auf spongiösen Platten (Abb. 3A, B) als auch auf spongiösen Stäben (Abb. 3C) finden. Darüber hinaus ist auf den

gezeigten spongiösen Platten eine Perforation zu erkennen. Die Perforation liegt innerhalb einer Resorptionslakune, die offensichtlich eine ungeordnete Mikrostruktur besitzt, erkennbar an ihrer granuliert erscheinenden Oberfläche. Darüber hinaus sind in den Abbildungen 3B, D durch die Kossa-Färbung schwarz erscheinende Osteozytenhöhlen als kleine Punkte zu sehen. Limitierend in der Lichtmikroskopie sind die Auflösung und die Schärfentiefe. Diese beiden Parameter sind jedoch für die Untersuchung der Mikrostruktur von Resorptionslakunen und Perforationen entscheidend. Eine höhere Auflösung bei gleichzeitig größerer Schärfentiefe bot die Analyse der mazerierten Knochenpräparate mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM).

3.1.4 Die Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie wird hauptsächlich zur Untersuchung von Oberflächen eingesetzt. Dabei liegt die Auflösungsgrenze bei 0,1 nm und die Schärfentiefe bei bis zu 1 mm. Für die Aufklärung der mikrostrukturellen Charakteristika von Resorptionslakunen war es erforderlich, das Weichgewebe zu entfernen (s. 2.4) und die Knochenoberfläche einer rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung zugänglich zu machen. Die Knochenproben wurden getrocknet, um Schädigungen im Vakuum des Rasterelektronenmikroskops zu verhindern und mit einer dünnen, die auftreffenden Elektronen ableitenden Goldschicht überzogen (s. 2.6.3), um Aufladungseffekte zu vermeiden. Durch die Anwendung des Verfahrens der Kritisch-Punkt Trocknung (s. 2.6.1) gelang die schonende Präparation von resorbierenden Osteoklasten (Abb. 4).

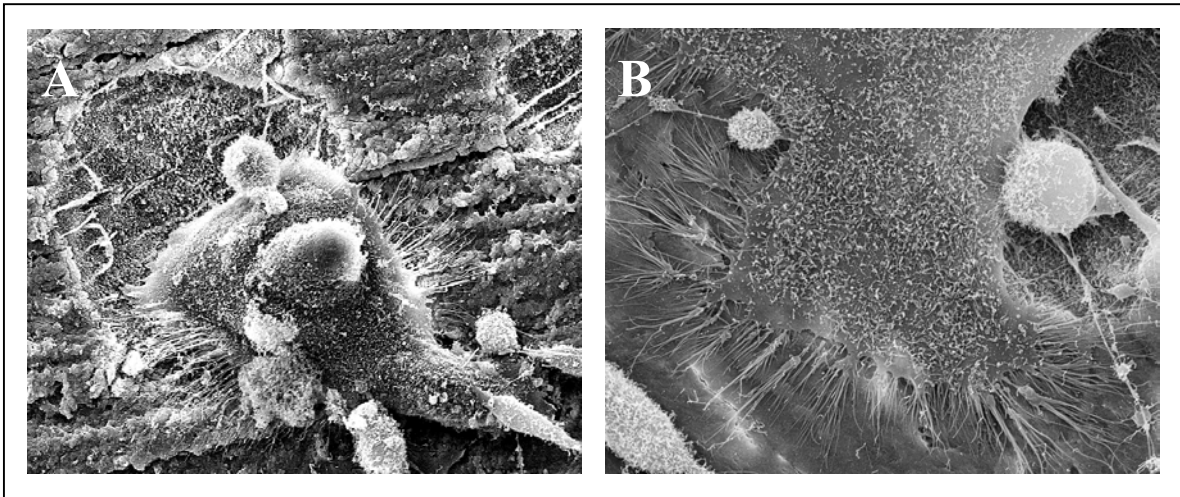


Abb. 4: Osteoklasten auf Dentin-Chips nach Kritisch-Punkt Trocknung

A: Osteoklast über einem Resorptionspit ; FW = 116 μm

B: Filopodienartige Fortsätze der „sealing zone“ des Osteoklasten ; FW = 61 μm

Der gezeigte Osteoklast sitzt auf einem Plättchen aus Dentin, das dem Knochengewebe in seinem Aufbau ähnelt und wegen seiner relativ gleichmäßigen Oberfläche im osteoklastären Aktivitätstest als Substrat eingesetzt wird. Unter dem Osteoklasten ist als deutliche Einsenkung der Oberfläche des Dentinplättchens ein sogenannter Resorptionspit zu erkennen und zeigt die Resorptionsaktivität des Osteoklasten an. Darüber hinaus besitzt der Osteoklast die charakteristische zentral gelegene domförmige Erhebung (Abb. 4A). Auch die vielen filopodienartigen Fortsätze der sealing zone (Bereich des engsten Knochenkontakts, s. Einleitung), mit denen sich der Osteoklast auf der Knochenoberfläche festsetzt und mit deren Hilfe er sich aktiv über diese bewegen kann, sind zu sehen (Abb. 4B). Wie auf dem Dentinplättchen lassen sich die Spuren osteoklastärer Resorptionsaktivität auch im rasterelektronenmikroskopischen Bild der Knochenoberfläche deutlich erkennen (Abb. 5).

Resorptionslakunen

Im rasterelektronenmikroskopischen Bild der Knochenoberfläche werden viele mikrostrukturellen Details sichtbar, die der lichtmikroskopischen Untersuchung verschlossen blieben. Neben den Kollagenfasern auf der Knochenoberfläche sind im rasterelektronenmikroskopischen Bild auch abgrenzbare Strukturen innerhalb der Resorptionslakunen erkennbar. Diese sogenannten Resorptionspits sind die Bausteine einer Resorptionslakune.

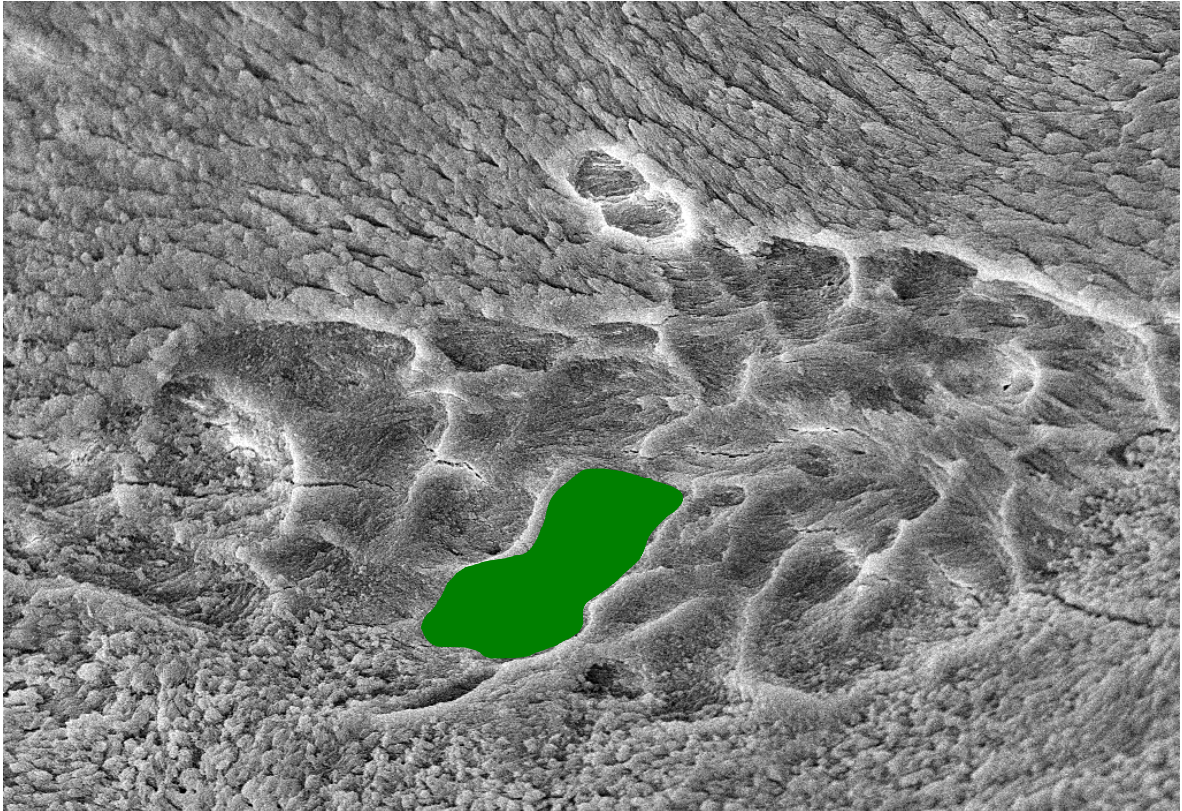


Abb. 5: Resorptionslakune auf der Knochenoberfläche

Farbig hervorgehoben: Resorptionspits innerhalb der Resorptionslakune; FW = 116 μm

Die Auswertung mehrerer tausend Resorptionslakunen hat ergeben, dass sich die Resorptionspits hinsichtlich ihrer Ausdehnung, ihrer Tiefe, ihrer Form und ihrer Anordnung innerhalb einer Resorptionslakune unterscheiden. Eine Resorptionslakune kann aus wenigen (Abb. 6A) oder aus vielen (Abb. 6B) Resorptionspits zusammengesetzt sein. Ebenso kann die Tiefe der Resorptionspits einer Lakune einheitlich (Abb. 6A) oder unterschiedlich (Abb. 6B) sein. Die Formen der Resorptionspits reichen von zirkulär über länglich bis hin zu polymorphen Strukturen (Abb. 6C).

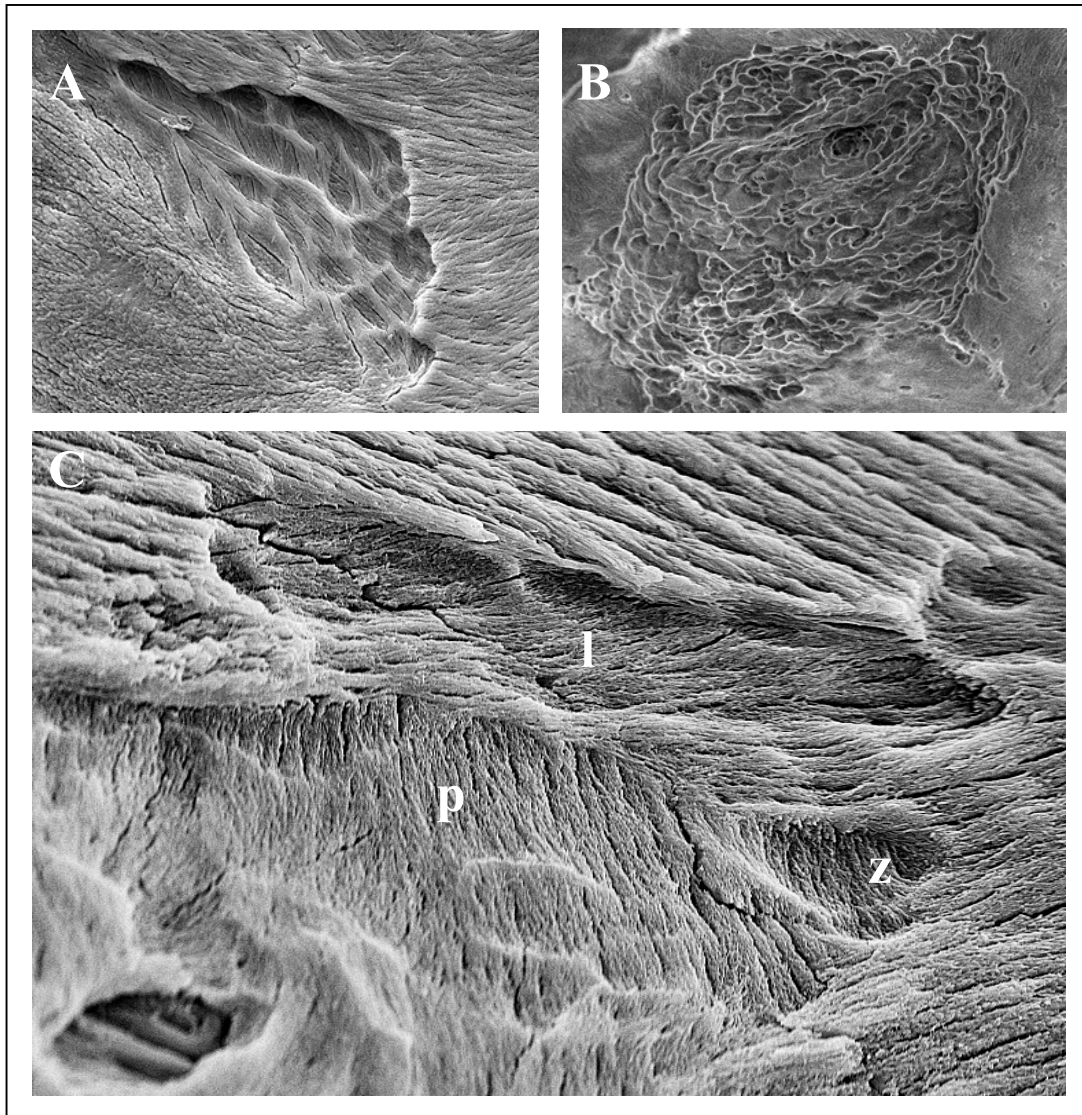


Abb. 6: Erscheinungsbild von Resorptionslakunen

A: Einheitliche Resorptionslakune mit wenigen, ausgedehnten Resorptionspits; FW = 90 μm

B: Resorptionslakune mit vielen, inhomogenen Resorptionspits; FW = 695 μm

C: Formen der Resorptionspits; l – länglich; z – zirkulär; p – polymorph; FW = 74 μm

Trotz dieser vielgestaltigen Merkmale und den sich daraus ergebenden Kombinationsmöglichkeiten ist eine Typisierung der Resorptionslakunen gelungen. Ermöglicht wurde dies durch die zwischen der Form einer Resorptionslakune und der Anordnung ihrer Resorptionspits bestehenden Abhängigkeit.

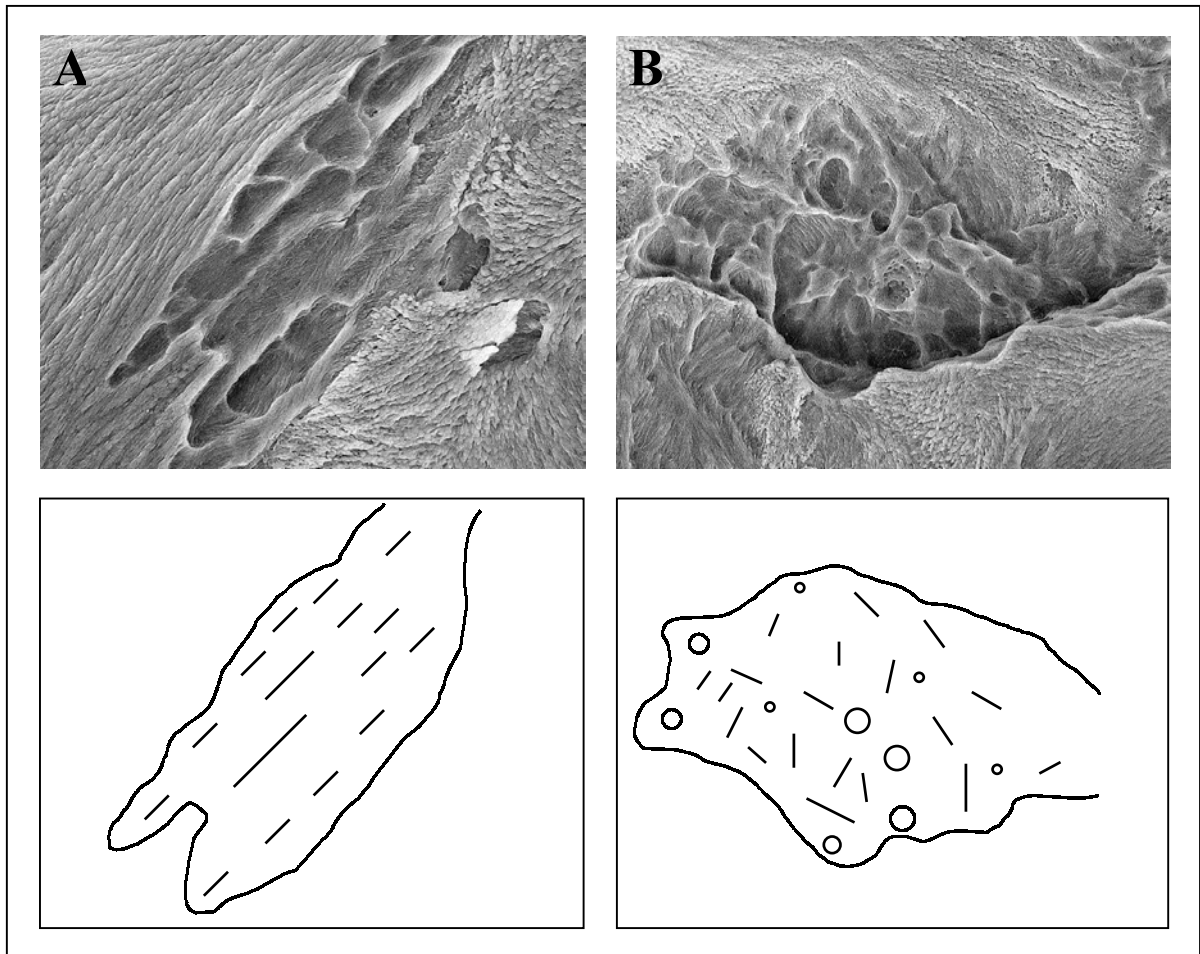


Abb. 7: Typen von Resorptionslakunen

A: Longitudinale Resorptionslakune im REM-Bild und als Schema; FW = 149 μm

B: Flächig ausgedehnte Resorptionslakune im REM-Bild und als Schema; FW = 219 μm

Schemata: Striche – Anordnung der Resorptionspits

Kreise – Resorptionspits ohne erkennbare Anordnung

Unterscheiden lassen sich longitudinale Resorptionslakunen (LR) von flächig ausgedehnten Resorptionslakunen (FR). Die longitudinale Resorptionslakune (Abb. 7A) hat eine längliche Form und besteht aus einzelnen ebenfalls länglichen Resorptionspits, die parallel zueinander angeordnet sind. Diese Resorptionslakunen erstrecken sich entlang der ebenfalls parallel angeordneten Kollagenfasern der angrenzenden Knochenoberfläche. Der flächig ausgedehnte Typ von Resorptionslakune (Abb. 7B) lässt hingegen eine ungleichmäßige Anordnung seiner vielgestaltigen Resorptionspits erkennen. Die angrenzenden Kollagenfasern der Knochenoberfläche erscheinen ebenfalls ungeordnet. Beide Typen von Resorptionslakunen können aus unterschiedlich und/oder einheitlich tiefen Pits unterschiedlicher Ausdehnung bestehen.

Perforationen

Bereits die 3D-Lichtmikroskopische Untersuchung der Knochenpräparate ergab, dass es neben den weitverbreiteten Resorptionslakunen auch vereinzelt Durchtritte in der Knochenstruktur gibt (Abb. 3A, B). In der rasterelektronenmikroskopischen Analyse dieser Durchtritte konnte gezeigt werden, dass diese mit Resorptionslakunen assoziiert sind. Grundsätzlich konnte zwischen Perforationen mit Resorptionslakunen, die sich bis zu ihrem Rand fortsetzten (Abb. 8A), und von Resorptionslakunen umgebenden Durchtritten (Abb. 8B) unterschieden werden. Letztere wurden häufig von zirkulär angeordneten Resorptionslakunen des longitudinalen Typs umgeben und besaßen eine glattwandige von Kollagenfasern überzogene Begrenzung.

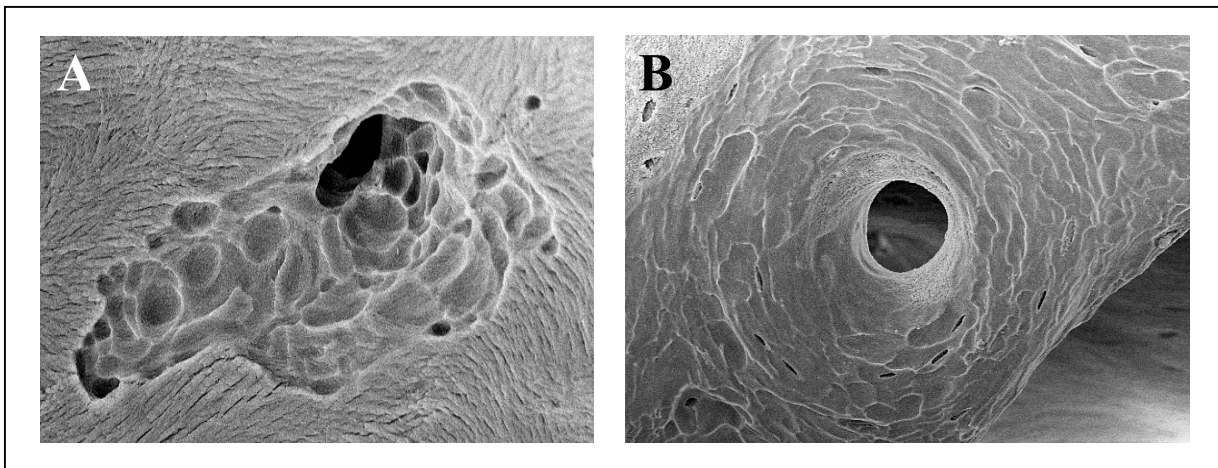


Abb. 8: Resorptionslakunen um Perforationen

A: Perforation mit angrenzender Resorptionslakune; FW = 186 μm

B: Perforation mit umgebenden Resorptionslakunen; FW = 495 μm

Die von Resorptionslakunen begrenzten Perforationen (Abb. 8A) zeigten markante morphologische Unterschiede, die eine Typisierung ermöglichten. Neben der Lage der Perforation innerhalb eines Feldes aus Resorptionslakunen war auch deren Tiefe entscheidend für diese Einteilung. Beide Merkmale lassen Rückschlüsse auf die Entstehung der Perforationen zu und sollen später diskutiert werden (s. 4.1).

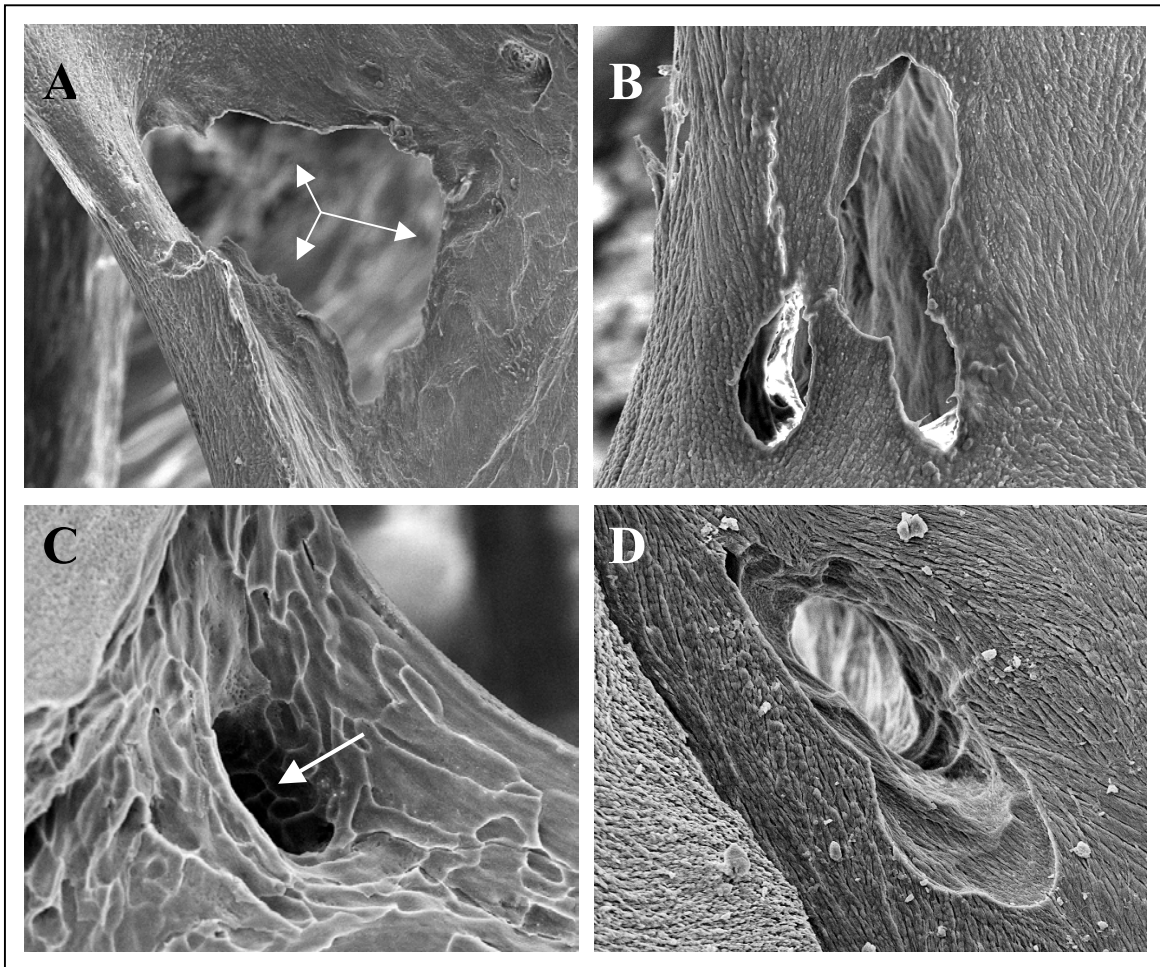


Abb. 9: Typen von Perforationen

- A: Lakunäre Perforation in einem Feld von Resorptionslakunen;
Pfeile: Dünnwandige Begrenzung; FW = 425 μm
- B: Rückwärtige Ansicht einer lakunären Perforation; FW = 153 μm
- C: Tunnellierende Perforation in einem Feld von Resorptionslakunen;
Pfeil: Eintrittsöffnung; FW = 294 μm
- D: Rückwärtige Ansicht einer tunnellierende Perforation; FW = 118 μm

Der lakunäre Typ von Perforation (LP) zeichnet sich durch seine zentrale Lage in einem flachen, trichterförmig zulaufenden Feld von meist flächig ausgedehnten Resorptionslakunen aus (Abb. 9A). Die Begrenzung dieser Perforation ist dünnwandig. Im Gegensatz dazu bildet die tunnellierende Perforation (TP) die Eintrittsöffnung für einen diagonal verlaufenden Tunnel, dessen Wandungen mit Resorptionslakunen bedeckt sind (Abb. 9C). Unter der Voraussetzung, dass die tunnellierende Perforation das Ergebnis einer gerichteten osteoklastären Resorptionsaktivität ist, kann Abb. 9D die dann vorhandene Austrittsöffnung dieses Perforationstyps darstellen. Eine charakteristische Lage dieses Perforationstyps innerhalb eines Feldes aus Resorptionslakunen konnte nicht bestimmt werden. Weiterhin wurde ein Durchtritt ohne erkennbare umgebende Resorptionslakunen

und mit bis an seine Begrenzung heranreichenden Kollagenfasern entdeckt (Abb. 9B), der vermutlich die rückwärtige Ansicht einer lakunären Perforation darstellt. In den folgenden Schemata (Abb. 10) sind die Merkmale der unterschiedenen Perforationstypen zusammenfassend dargestellt.

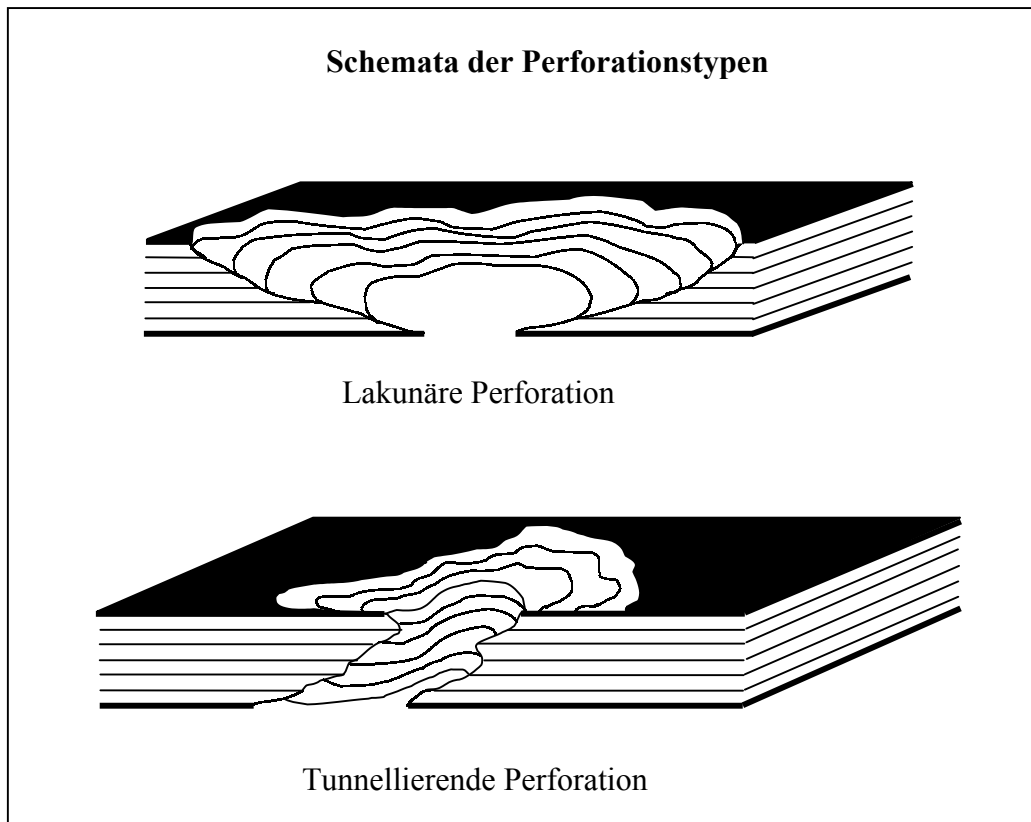


Abb. 10: Schemata der Perforationstypen
Schwarze Fläche: Knochenoberfläche

Von diesen beiden Perforationstypen lassen sich die bereits histologisch beschriebenen Einkerbungen der Knochenoberfläche (Abb. 2C) rasterelektronenmikroskopisch abgrenzen (Abb. 11). Unterschiedliche Stadien dieser Einkerbungen sind auf spongiösen Platten (Abb. 11B) und Stäben (Abb. 11C, D) zu finden.

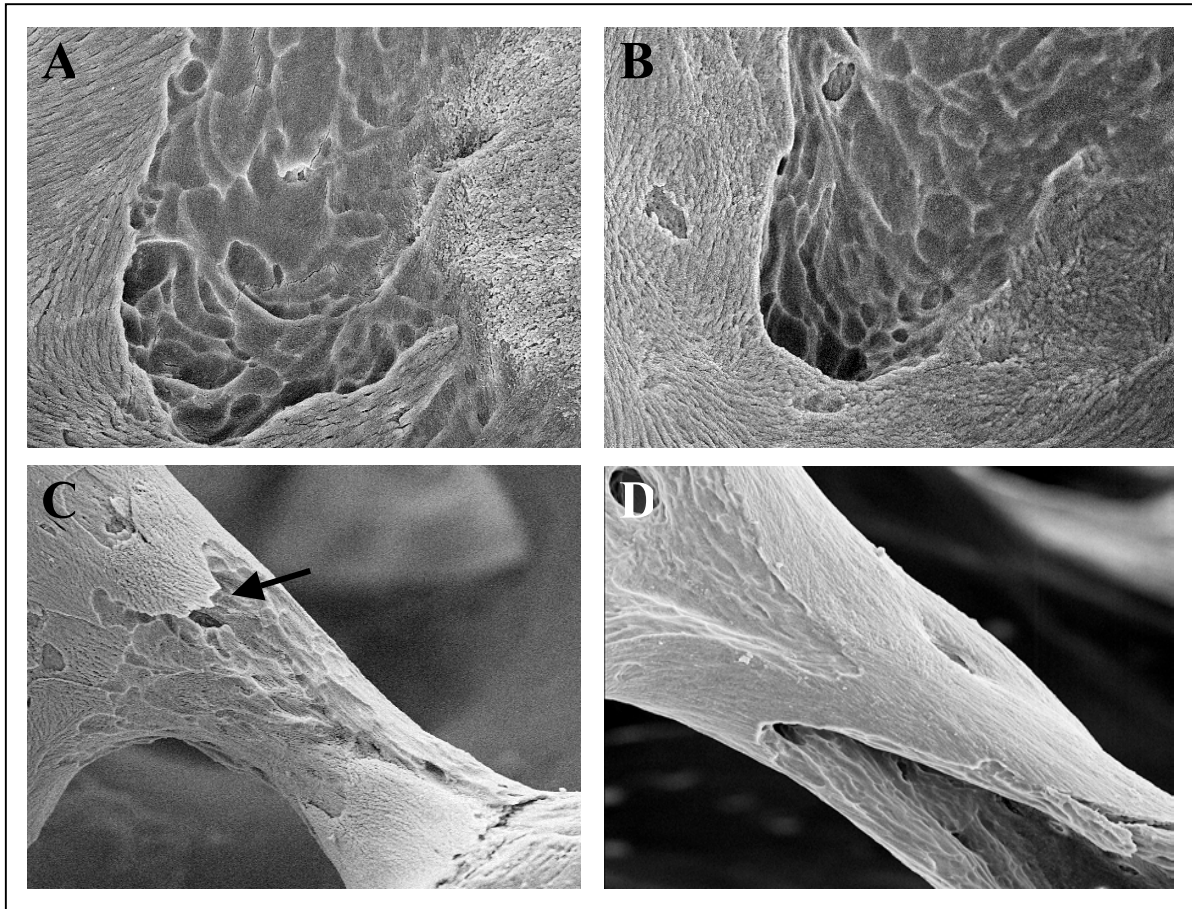


Abb. 11: Einkerbungen der Knochenoberfläche

A: Anfänge der Einkerbung einer spongiösen Platte; FW = 158 μm

B: Fortgeschrittene Einkerbung einer spongiösen Platte; FW = 221 μm

C: Anfänge der Einkerbung eines spongiösen Stabes (Pfeil); FW = 355 μm

D: Ausgeprägte Einkerbung eines spongiösen Stabes; FW = 432 μm

3.1.4.1 Systematik

Die Möglichkeit im rasterelektronenmikroskopischen Bild Resorptionslakunen auf der Knochenoberfläche eindeutig zu identifizieren, ließ eine quantitative Untersuchung dieser Strukturen zu. In der klassischen lichtmikroskopischen Histomorphometrie wird die Systematik durch die feldweise Untersuchung einer definierten Präparatfläche erreicht. Die Quantifizierung der verschiedenen Parameter wird durch eine gleichmäßige Unterteilung in einzelne Messfelder ermöglicht (s. 2.5.3). Dieses Prinzip wurde auf die elektronenmikroskopische Untersuchung der mazerierten Knochenpräparate übertragen. Ein ca. 3 x 2 mm großer Ausschnitt aus dem Knochenpräparat wurde bei 250-facher Vergrößerung systematisch, d. h. Zeile für Zeile untersucht. Dabei wurde jedes rasterelektronenmikroskopische Bild bei dieser Vergrößerung in ein 400 x 240 μm großes Fenster, bestehend aus 15 gleichgroßen Messfeldern, unterteilt (Abb. 12).

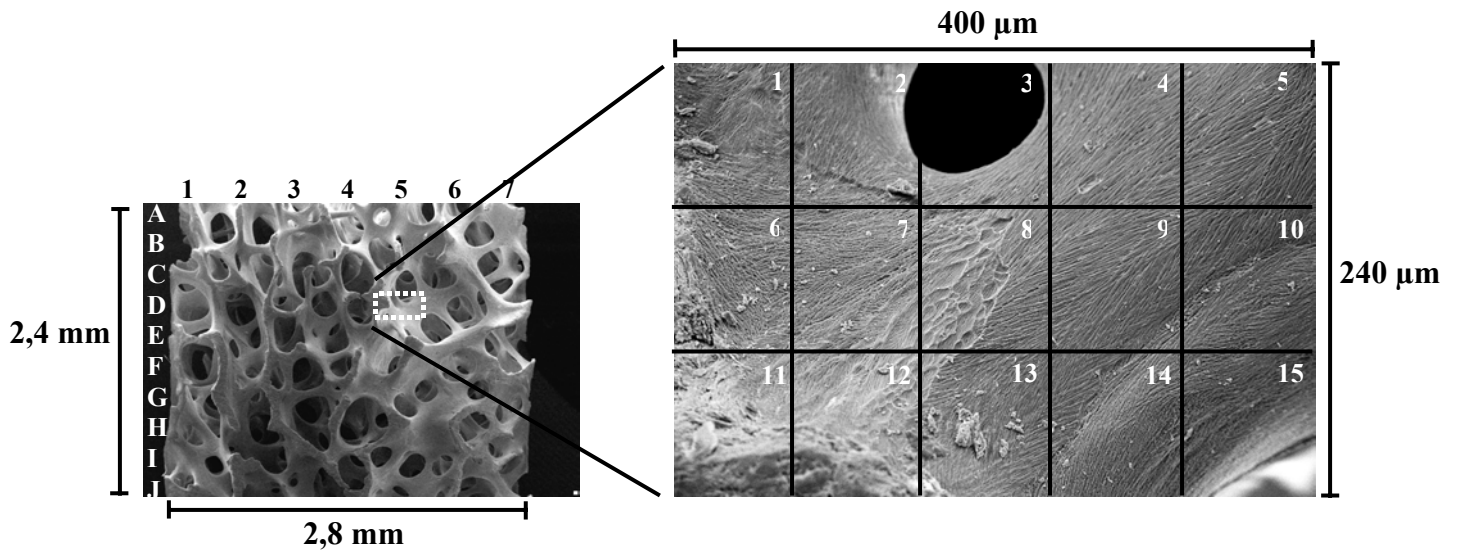


Abb. 12: Quantifizierung der Resorptionslakunen im REM

Übersichtsaufnahme der untersuchten Probe (links); FW = 3,6 mm

Einteilung des Planquadrates D5 in 15 Meßfelder (rechts); FW = 400 µm

Die Verteilung der Resorptionslakunen über die Messfelder wurde in einer Tabelle (Tab. 12) festgehalten. Insgesamt wurden pro Knochenpräparat 70 solcher Fenster ausgezählt.

Tab. 12: Beispiel für die Quantifizierung der Resorptionslakunen im SEM

| Probenzeile | MESSFELD | | | | | | | | | | | | | | | Σ |
|-------------|----------|---|---|---|---|---|-------|-------|---|----|----|-------|----|----|----|---|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | |
| D1 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D2 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D3 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D4 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D5 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | R1(3) | R2(3) | 0 | 0 | 0 | R3(3) | 0 | 0 | 0 | 3 |
| D6 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| D7 | | | | | | | | | | | | | | | | |

0 - keine Resorptionslakune gefunden

R1(3) - erstes Feld einer sich über drei Messfelder erstreckenden Resorptionslakune

Die relative Verteilung der Resorptionslakunen (RL [%]) über die 1050 Messfelder/Patient wurde in Abhängigkeit von Alter und Geschlecht in den folgenden Diagrammen (Abb. 13) zusammengestellt.

Verteilung der Resorptionslakunen bei den untersuchten Männern und Frauen

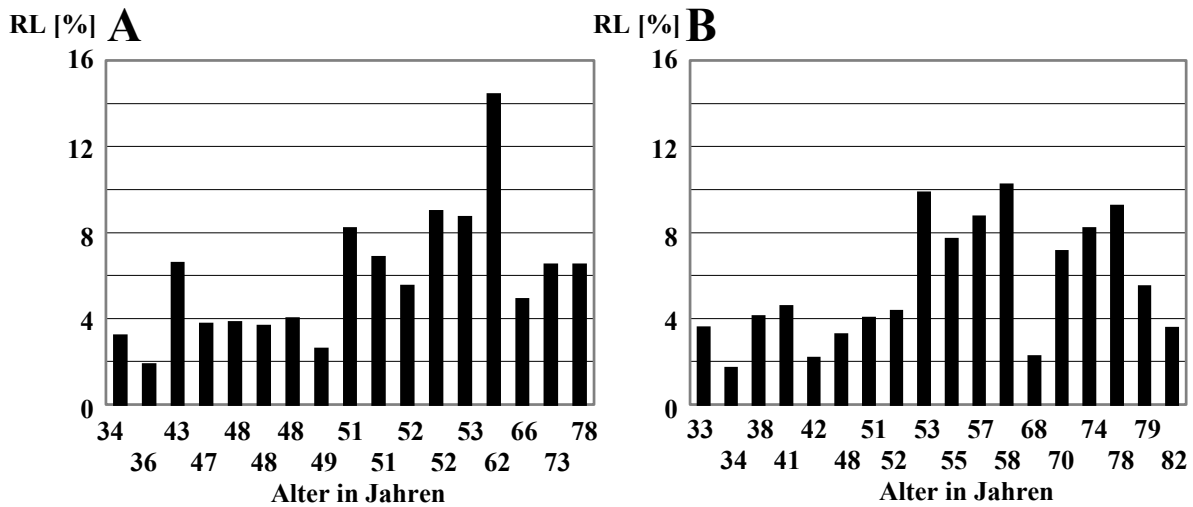


Abb. 13: Quantifizierung der Resorptionslakunen (RL)

A: Prozentuale Verteilung der Resorptionslakunen bei Männern

B: Prozentuale Verteilung der Resorptionslakunen bei Frauen

RL [%]: Anteil der Resorptionslakunen bezogen auf die ausgewerteten Messfelder

In der dritten und vierten Lebensdekade schwankt bei Männern und Frauen der Anteil der Resorptionslakunen ohne eine erkennbare Zunahme. Bei beiden Geschlechtern liegt diese Schwankung in einem Bereich zwischen 2 % und 4 %. Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung ergab für Männer in der fünften Lebensdekade einen Anstieg des Anteils der Resorptionslakunen (Abb. 13A). Bei ihnen konnten zu Beginn der sechsten Lebensdekade die meisten Resorptionslakunen nachgewiesen werden. Von dem Ende der vierten Lebensdekade an nimmt der Anteil der Resorptionslakunen bei den untersuchten Frauen stetig zu und erreicht am Ende der fünften Lebensdekade einen maximalen Wert (Abb. 13B). In den folgenden Altersdekaden nimmt der Anteil der Resorptionslakunen in beiden Geschlechtern ab und erreicht gegen Ende der siebten Lebensdekade einen annähernd gleichen Wert. Die Zusammenfassung dieser Einzelwerte in drei Altersklassen (<50, 50-60, >60 Jahren) relativiert die deutlichen Einzelwertschwankungen und erleichtert ihren Vergleich (Abb. 14).

Verteilung der Resorptionslakunen in den verschiedenen Altersgruppen

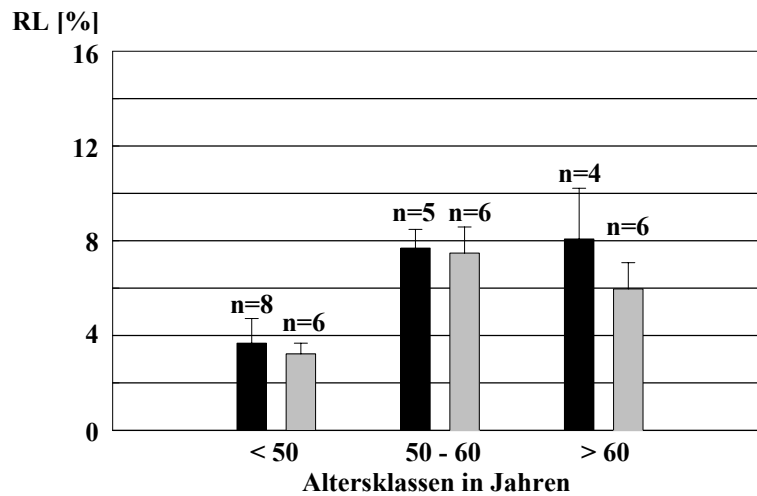


Abb. 14: Quantifizierung von Resorptionslakunen in den verschiedenen Altersgruppen

Schwarze Balken: Aufteilung der Resorptionslakunen bei Männern

Graue Balken: Aufteilung der Resorptionslakunen bei Frauen

RL [%]: Anteil der Resorptionslakunen bezogen auf die ausgewerteten Messfelder

Die eingezeichneten Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder

Die Mittlung der in Abb. 13 aufgeführten Einzelwerte in den drei Altersklassen ergibt bei den untersuchten Männern einen mit dem Alter zunehmenden Anteil der Resorptionslakunen. Im Gegensatz dazu nimmt dieser Anteil bei den Frauen nach dem Erreichen eines maximalen Wertes in der fünften Lebensdekade mit fortschreitendem Alter ab. Bei dieser Art der Datendarstellung zeigen beide Geschlechter von der dritten bis zur fünften Lebensdekade sowohl qualitativ als auch quantitativ eine vergleichbare Entwicklung des Anteils der auf ihrer Knochenoberfläche nachweisbaren Resorptionslakunen.

3.1.5 Histomorphometrie

Die Histomorphometrie ist das klassische Verfahren, um lichtmikroskopisch Strukturparameter von Knochengewebe zu bestimmen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit einer Gegenüberstellung mit den im REM erhaltenen Ergebnissen. Der einzige in seiner Aussagekraft diesen Ergebnissen ähnliche histomorphometrische Parameter ist der ES/BS (eroded surface per bone surface) Wert. Die osteoklastäre Aktivität hat über die Entstehung von Resorptionslakunen auch Einfluss auf die Struktur und damit die Dichte des Knochens. Aus diesem Grund wurde auch die Knochendichte (BV/TV – bone volume per trabecular volume) als indirekter Maßstab für die Anzahl von Resorptionslakunen

histomorphometrisch bestimmt. Die dabei erhaltenen Werte sind in den folgenden Tabellen für Männer und Frauen getrennt aufgeführt.

Tab. 13: Histomorphometriedaten der untersuchten Männer

| | ALTER DER UNTERSUCHTEN MÄNNER [IN JAHREN] | | | | | | | | | | |
|-----------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Parameter | 36 | 47 | 48 | 48 | 49 | 51 | 52 | 52 | 53 | 73 | 78 |
| BV/TV [%] | 25,3 | 26,1 | 28,6 | 20,6 | 20,0 | 31,3 | 22,9 | 25,0 | 30,5 | 16,0 | 36,5 |
| ES/BS [%] | 7,9 | 2,7 | 4,0 | 7,1 | 5,8 | 13,9 | 9,0 | 9,5 | 3,4 | 13,1 | 9,6 |

Tab. 14: Histomorphometriedaten der untersuchten Frauen

| | ALTER DER UNTERSUCHTEN FRAUEN [IN JAHREN] | | | | | | | | | | | | | |
|-----------|---|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Parameter | 33 | 34 | 41 | 48 | 51 | 52 | 53 | 55 | 57 | 58 | 68 | 70 | 79 | 82 |
| BV/TV [%] | 23,1 | 30,3 | 32,4 | 44,4 | 24,1 | 32,5 | 15,4 | 27,7 | 28,9 | 24,2 | 25,6 | 29,6 | 20,3 | 19,1 |
| ES/BS [%] | 2,5 | 3,3 | 5,9 | 11,7 | 3,8 | 8,5 | 8,3 | 5,2 | 9,4 | 6,2 | 6,7 | 7,2 | 7,1 | 9,3 |

Die schwankenden Werte lassen auf den ersten Blick keine geschlechts- und/oder altersspezifischen Tendenzen in den Werten für ES/BS und BV/TV erkennen. Dies ändert sich jedoch mit der Einteilung von Altersgruppen (Abb. 15).

Auswertung der Histomorphometriedaten

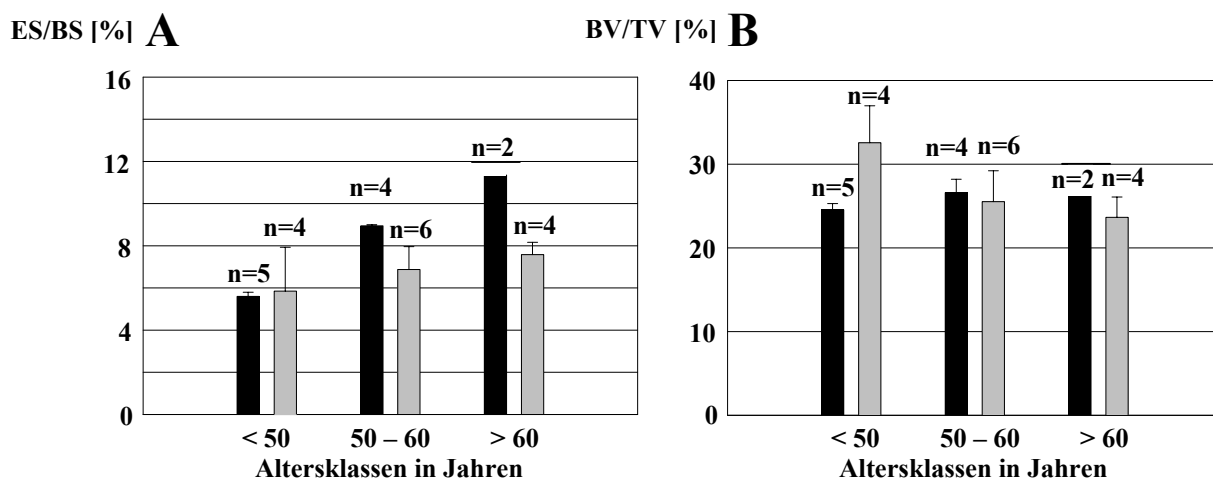


Abb. 15: Histomorphometriedaten in den verschiedenen Altersklassen

A: ES/BS der untersuchten Männer (schwarz) und Frauen (grau)

B: BV/TV der untersuchten Männer (schwarz) und Frauen (grau)

Die eingezeichneten Fehlerbalken geben den Standardfehler wieder

Analog zur Auswertung der REM-Daten erfolgte die Zusammenfassung der histomorphometrischen Parameter zu Altersklassen, um mögliche alters- oder geschlechtsspezifische Veränderungen zu verdeutlichen. Der Wert für die durch osteoklastäre Resorption erodierte Knochenoberfläche (ES/BS) der im Lichtmikroskop analysierten Spongiosapräparate der Männer steigt in den aufeinanderfolgenden Altersklassen stetig an (Abb. 15A). Die Knochendichte (BV/TV) steigt bis in die fünfte Lebensdekade leicht an und nimmt ab dem 60. Lebensjahr unwesentlich ab (Abb. 15B). Insgesamt betrachtet verändert sich dieser Wert über die untersuchten Lebensdekaden kaum. Bei den untersuchten Frauen steigt die Anzahl der auf der Knochenoberfläche sichtbaren Resorptionslakunen (ES/BS) an (Abb. 15A), während gleichzeitig die Knochendichte mit zunehmendem Alter abnimmt (Abb. 15B). Dieser ES/BS-Anstieg ist bei den betrachteten Frauen verglichen mit dem der Männern schwächer ausgeprägt. Männer und Frauen zeigen in der Altersklasse < 50 Jahre vergleichbare ES/BS-Werte. Ein Vergleich der ermittelten ES/BS-Werte mit den im REM erhobenen Daten für die Knochenresorption zeigt, dass diese zwar in ihrer Dimension, jedoch nicht vom Betrag her übereinstimmen.

3.1.6 Lokalisation von Resorptionslakunen

Neben der Quantität ist die Lokalisierung der Resorptionslakunen auf der Knochenoberfläche für die Stabilität der betroffenen Struktur von entscheidender Bedeutung (s. 4.5). Diese Tatsache war der Anlaß zur Untersuchung der alters- und geschlechtsabhängigen Lokalisierung der Resorptionslakunen im humanen Hüftkopf. Grundsätzlich können in spongiösen Knochen stabartige von plattenartigen Strukturen unterschieden werden, wobei Resorptionslakunen auf beiden Strukturen zu finden sind. Für eine detailliertere Aufklärung ihrer Lokalisation wurden die stabartigen, spongiösen Strukturen in einen zentralen- und einen ihre verbreiterte Basis umfassenden Übergangsbereich unterteilt (Abb. 16A). Darüber hinaus wurden die Resorptionslakunen erfasst, die sich über beide Bereiche erstreckten. Bei den plattenartigen, spongiösen Strukturen wurde zwischen einem zentralen- und einem diesen umgebenden peripheren Bereich unterschieden (Abb. 16B).

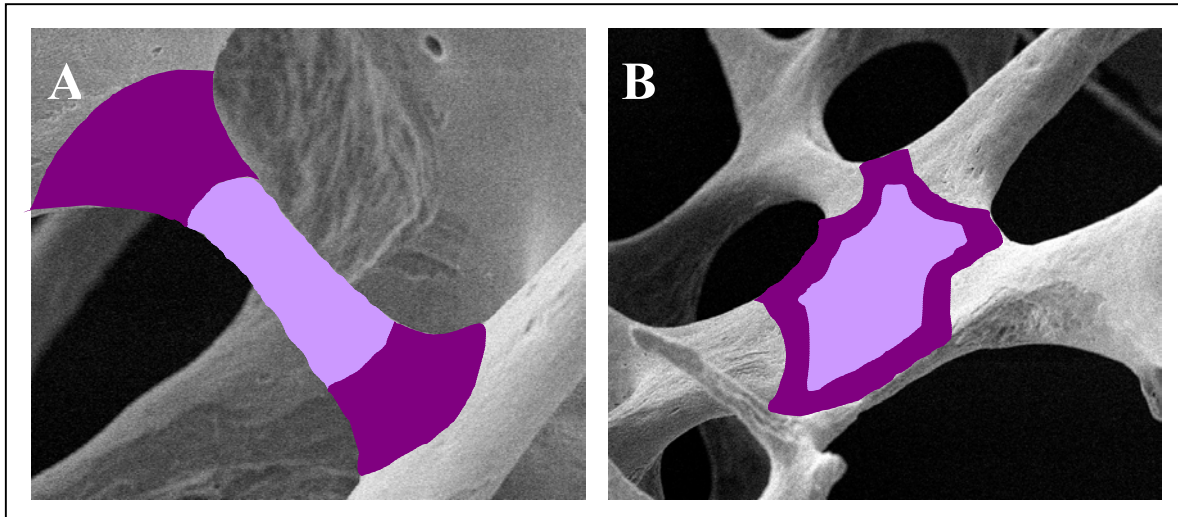


Abb. 16: Unterschiedene Lokalisationen auf spongiösen Platten und Stäben

A: Spongiöser Stab mit hell eingefärbten Zentralbereich und dunklem Übergangsbereich;

FW = 594 μm

B: Spongiöse Platte mit hell eingefärbten Zentralbereich und dunkler Peripherie;

FW = 1300 μm

Auf der folgenden Bildtafel sind Beispiele für die verschiedenen Resorptionstypen an den unterschiedenen Lokalisationen zusammengestellt. Dabei wurden die Bildbeispiele für den longitudinalen Resorptionslakunentyp (RL) in der linken und die für den flächigen Resorptionslakunentyp (FR) in der rechten Spalte angeordnet. Die Abb. 17A1 bis 17C2 zeigen die mögliche Lokalisation von Resorptionslakunen auf spongiösen Stäben, während die Abb. 18A1 bis Abb. 18B2 von der osteoklastären Resorptionsaktivität auf charakteristischer Weise gezeichnete spongiöse Platten darstellen.

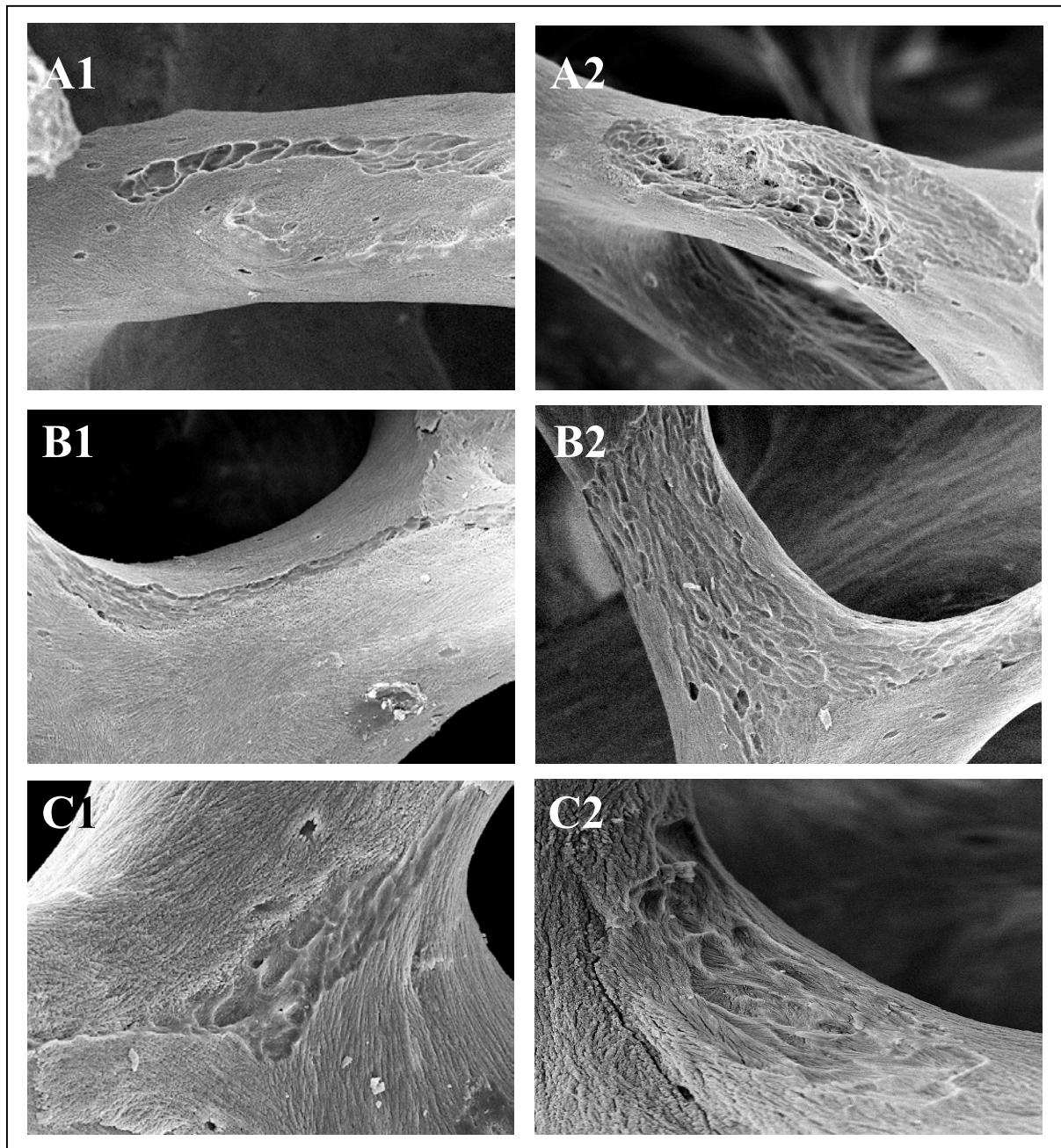


Abb. 17: Lokalisation der Resorptionslakunen auf spongiösen Stäben im REM

A1: LR zentral auf spongiösen Stab; FW = 477 μm

A2: FR zentral auf spongiösen Stab; FW = 500 μm

B1: LR zentral auf und im Übergangsbereich des spongiösen Stabes; FW = 585 μm

B2: FR zentral auf und im Übergangsbereich des spongiösen Stabes; FW = 599 μm

C1: LR im Übergangsbereich des spongiösen Stabes; FW = 260 μm

C2: FR im Übergangsbereich des spongiösen Stabes; FW = 154 μm

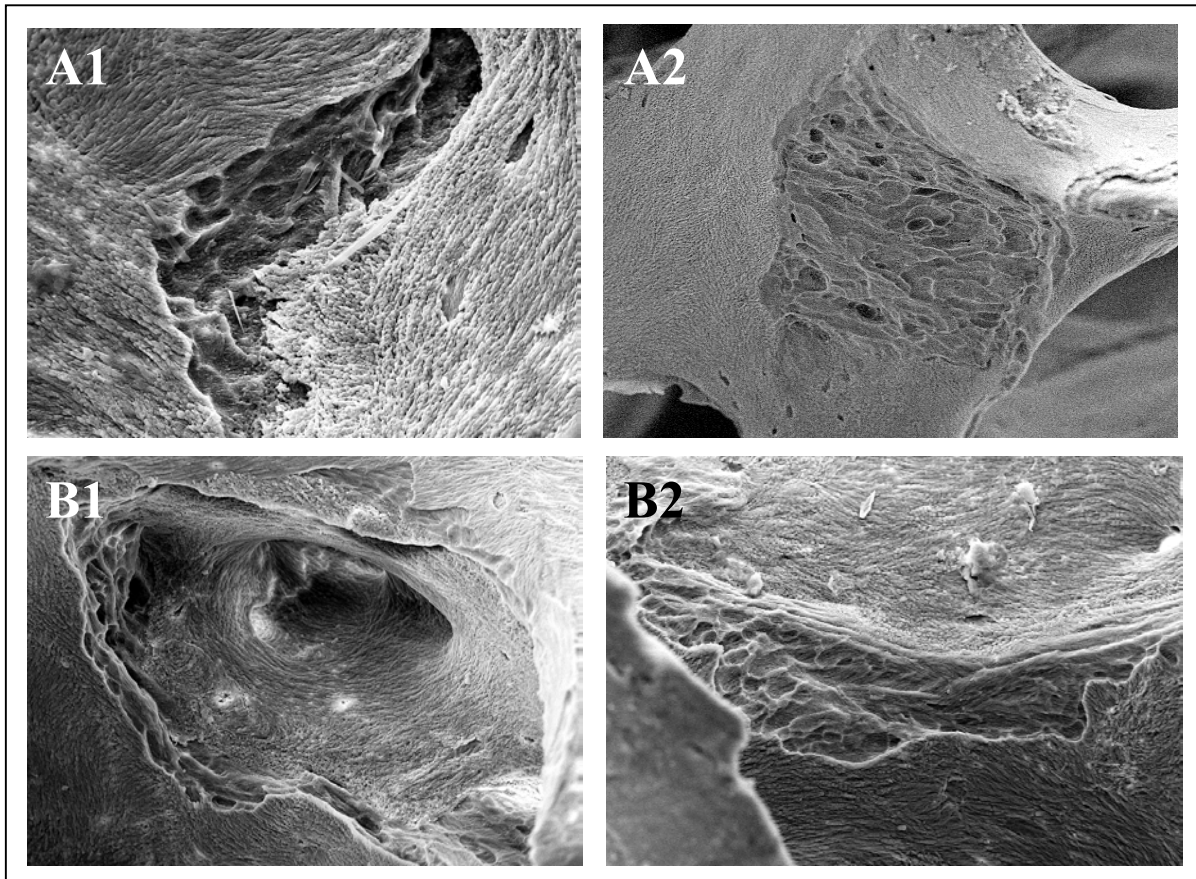


Abb. 18: Lokalisation der Resorptionslakunen auf spongiösen Platten im REM

- A1: LR zentral auf spongiöser Platte; FW = 175 μm
- A2: FR zentral auf spongiöser Platte; FW = 505 μm
- B1: LR peripher auf spongiöser Platte; FW = 343 μm
- B2: FR peripher auf spongiöser Platte; FW = 377 μm

Die folgenden Diagramme (Abb. 19) zeigen die relative Verteilung der unterschiedenen Resorptionstypen auf den untersuchten Lokalisationen

3.1.6.1 Resorptionstypen und ihre Lokalisation

Die graphische Auswertung der Verteilung der unterschiedenen Typen von Resorptionslakunen auf die definierten Lokalisationen zeigt, dass in beiden Geschlechtern auf spongiösen Stäben mehr flächige (FR) als longitudinale Resorptionslakunen (LR) nachgewiesen werden konnten (Abb. 19A, B). Bei den Männern läßt sich eine Zunahme des Anteiles der flächigen Resorptionslakunen von dem zentralen Bereich, über den beide unterschiedenen Lokalisationen umfassenden Bereich, bis hin zu den Übergangsbereichen der spongiösen Stäbe feststellen. Analog dazu kann bei Männern eine Abnahme des Anteils longitudinaler Resorptionslakunen ermittelt werden (Abb. 19A).

Die untersuchten Frauen besitzen den größten Anteil longitudinaler und flächiger Resorptionslakunen in einem über den Zentral- und die Übergangsbereiche ausgedehnten Bereich des spongiösen Stabes (Abb. 19B).

Der Anteil von longitudinalen Resorptionslakunen im Zentralbereich der spongiösen Platten entspricht in beiden Geschlechtern dem ihres peripheren Bereiches (Abb. 19C, D). Eine deutliche Abnahme des Anteils flächiger Resorptionslakunen kann geschlechtsunabhängig zwischen diesen Bereichen der spongiösen Platte festgestellt werden. Die untersuchten Männer und Frauen zeigen in den peripheren Bereichen der spongiösen Platten vergleichbare Anteile longitudinaler und flächiger Resorptionslakunen (Abb. 19C, D).

Lokalisation der unterschiedenen Resorptionstypen

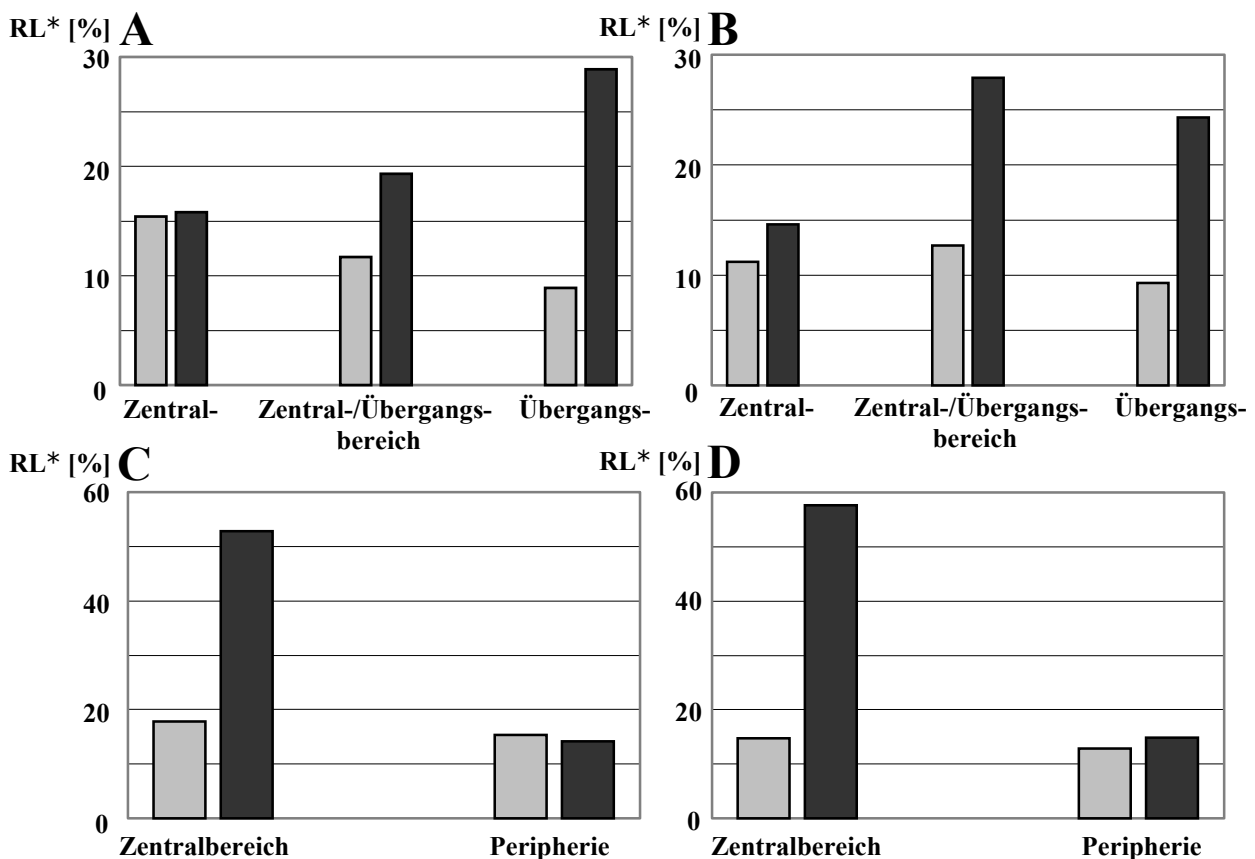


Abb. 19: Prozentuale Verteilung der Resorptionslakunen

A: auf spongiösen Stäben bei Männern, n=4

B: auf spongiösen Stäben bei Frauen, n=4

C: auf spongiösen Platten bei Männern, n=4

D: auf spongiösen Platten bei Frauen, n=4

RL* [%]: Anteil der Resorptionslakunen bezogen auf ihre Gesamtzahl

grau: LR; schwarz: FR

Die statistische Auswertung dieser Ergebnisse ergibt einen signifikanten Zusammenhang zwischen den Resorptionsstypen und ihrer Lokalisation auf spongiösen Stäben (Tab. 15) und Platten (Tab. 16) in beiden Geschlechtern.

Tab. 15: Absolute Verteilung der Typen von Resorptionslakunen auf spongiösen Stäben

| LOKALISATION AUF SPONGIÖSEN STÄBEN | MÄNNER | | FRAUEN | |
|--|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | Resorptionsstypen | | Resorptionsstypen | |
| | LR [Anzahl] | FR [Anzahl] | LR [Anzahl] | FR [Anzahl] |
| Zentralbereich | 59 | 61 | 63 | 83 |
| Zentral- /Übergangsbereich | 45 | 74 | 72 | 158 |
| Übergangsbereich | 34 | 111 | 53 | 138 |
| χ^2 | 19,14 | | 9,43 | |
| p-Wert | 0,00007 | | 0,00896 | |

Tab. 16: Absolute Verteilung der Typen von Resorptionslakunen auf spongiösen Platten

| LOKALISATION AUF SPONGIÖSEN PLATTEN | MÄNNER | | FRAUEN | |
|---|-------------------|-------------|-------------------|-------------|
| | Resorptionsstypen | | Resorptionsstypen | |
| | LR [Anzahl] | FR [Anzahl] | LR [Anzahl] | FR [Anzahl] |
| Zentralbereich | 126 | 374 | 127 | 499 |
| Peripherie | 108 | 100 | 111 | 129 |
| χ^2 | 47,41 | | 58,68 | |
| p-Wert | 0,00000 | | 0,00000 | |

3.1.6.2 Altersabhängige Lokalisation von Resorptionslakunen

Der Anteil an Resorptionslakunen im Übergangsbereich nimmt bei den untersuchten Männern mit fortschreitendem Alter ab (Abb. 20A). In den Übergangsbereichen der spongiösen Stäbe ließ sich bei ihnen in der fünften Lebensdekade der höchste Anteil an Resorptionslakunen ermitteln. Der Zentralbereich der spongiösen Stäbe zeigt verglichen mit der dritten und vierten Lebensdekade in der fünften Lebensdekade eine starke Abnahme des Anteils an Resorptionslakunen. In den folgenden Lebensdekaden steigt dieser leicht an (Abb. 20A).

Bei den untersuchten Frauen können in der fünften Lebensdekade die höchsten Anteile von Resorptionslakunen in allen drei unterschiedenen Lokalisationen der spongiösen Stäbe

festgestellt werden (Abb. 20B). Dabei wurde der höchste Anteil an Resorptionslakunen in dem den Zentral- und die Übergangsbereiche umfassenden Bereich ermittelt. In beiden Geschlechtern ist der Anteil von Resorptionslakunen im Zentralbereich der spongiösen Platten höher als der in ihrem peripheren Bereich (Abb. 20C, D). Die ausgewerteten Knochenproben der Männer zeigen mit zunehmendem Alter abnehmende Anteile an Resorptionslakunen in den unterschiedenen Lokalisationen (Abb. 20C). Bei den untersuchten Frauen sind diese Anteile in der fünften Lebensdekade am höchsten (Abb. 20D). Anhand dieser Daten kann ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen der Lokalisation von Resorptionslakunen auf spongiösen Stäben (Tab. 17) und Platten (Tab. 18) und dem Alter der Patienten für beide Geschlechter hergestellt werden.

Altersabhängige Lokalisation der Resorptionslakunen auf Stäben und Platten

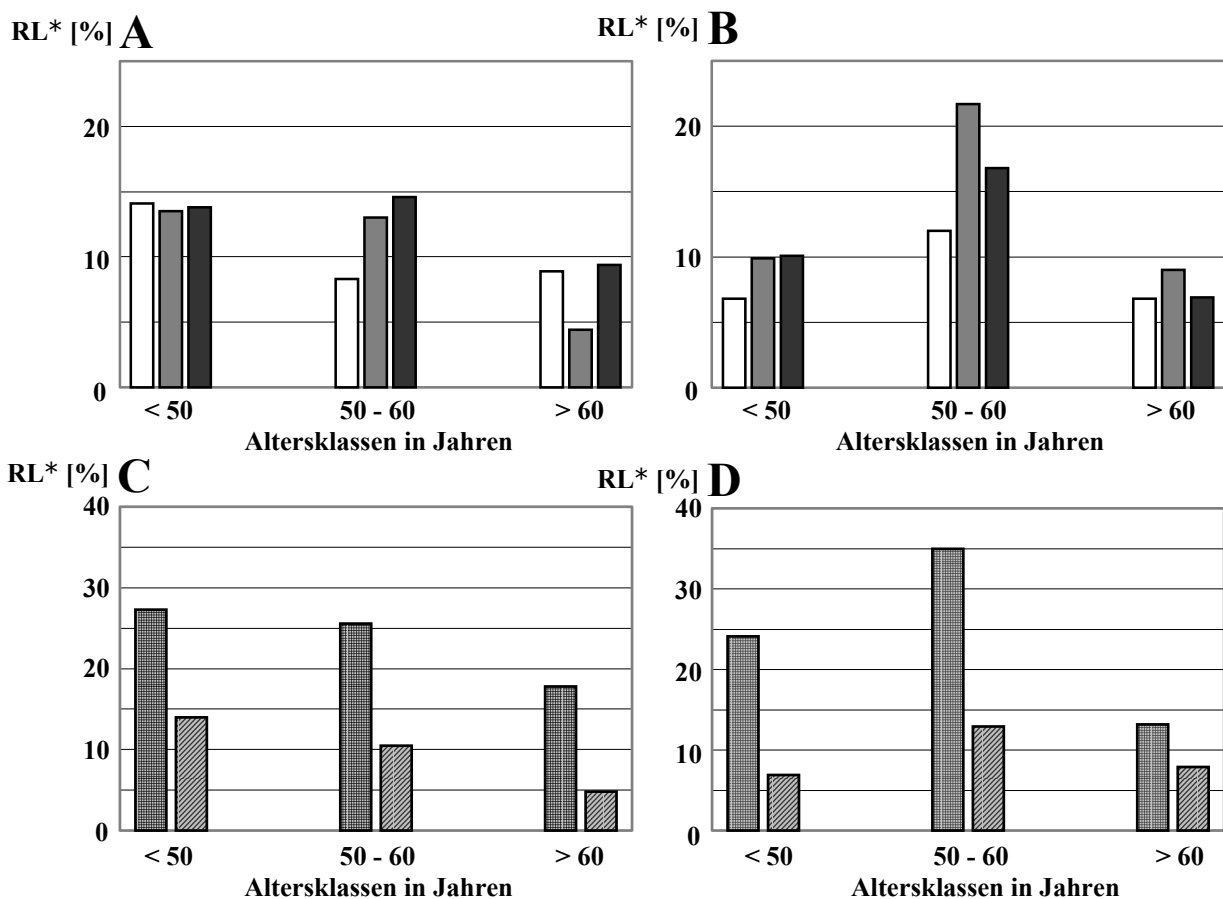


Abb. 20: Prozentuale, altersabhängige Verteilung der Resorptionslakunen

A: auf spongiösen Stäben bei Männern, n=4

B: auf spongiösen Stäben bei Frauen, n=4

C: auf spongiösen Platten bei Männern, n=4

D: auf spongiösen Platten bei Frauen, n=4

RL* [%]: Anteil der Resorptionslakunen bezogen auf ihre Gesamtzahl

weiß: Zentralbereich; grau: Zentral-/Übergangsbereich; schwarz: Übergangsbereich

kariert: Zentralbereich; schraffiert: Peripherie

Tab. 17: Absolute Verteilung der Resorptionslakunen auf spongiösen Stäben in den Altersklassen

| ALTERSKLASSE IN JAHREN | MÄNNER | | | FRAUEN | | |
|---------------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------|------------------------------------|--------------------------|------------------|
| | Lokalisation auf spongiösen Stäben | | | Lokalisation auf spongiösen Stäben | | |
| | zentral [Anzahl] | zentral/über [Anzahl] | über [Anzahl] | zentral [Anzahl] | zentral/über [Anzahl] | über [Anzahl] |
| < 50 | 54 | 52 | 53 | 39 | 56 | 57 |
| 50 – 60 | 32 | 50 | 56 | 68 | 123 | 95 |
| > 60 | 34 | 17 | 36 | 39 | 51 | 39 |
| χ^2 | 10,55 | | | 3,98 | | |
| p-Wert | 0,03280 | | | 0,40872 (nicht sign) | | |

Tab. 18: Absolute Verteilung der Resorptionslakunen auf spongiösen Platten in den Altersklassen

| ALTERSKLASSE IN JAHREN | MÄNNER | | FRAUEN | |
|---------------------------|-------------------------------------|---------------------|-------------------------------------|------------------------|
| | Lokalisation auf spongiösen Platten | | Lokalisation auf spongiösen Platten | |
| | Zentralbereich [Anzahl] | Peripherie [Anzahl] | Zentralbereich [Anzahl] | Peripherie [Anzahl] |
| < 50 | 193 | 99 | 209 | 60 |
| 50 – 60 | 181 | 74 | 303 | 112 |
| > 60 | 126 | 35 | 114 | 68 |
| χ^2 | 7,42 | | 12,52 | |
| p-Wert | 0,02448 | | 0,01911 | |

zentral – Zentralbereich; zentral/über – Zentral-/Übergangsbereich; über – Übergangsbereich

3.1.6.3 Altersabhängige Verteilung der Resorptionstypen

Wie bereits gezeigt werden konnte, besitzen Frauen und Männer einen verglichen mit dem Anteil longitudinaler Resorptionslakunen höheren Anteil flächiger Resorptionslakunen. Bei den untersuchten Männern konnte ein mit fortschreitendem Alter zunehmender Rückgang der Anteile beider Resorptionstypen nachgewiesen werden (Abb. 21A), während die untersuchten Frauen den höchsten Anteil an flächigen und longitudinalen Resorptionslakunen in der fünften Lebensdekade zeigten (Abb. 21B).

Ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen dem Alter der Patienten und dem Resorptionstyp konnte anhand der vorliegenden Daten für Frauen (Tab. 19) nicht nachgewiesen werden. Die analysierten Männer zeigen statistisch gesichert einen solchen Zusammenhang.

Altersabhängige Verteilung der Resorptionstypen

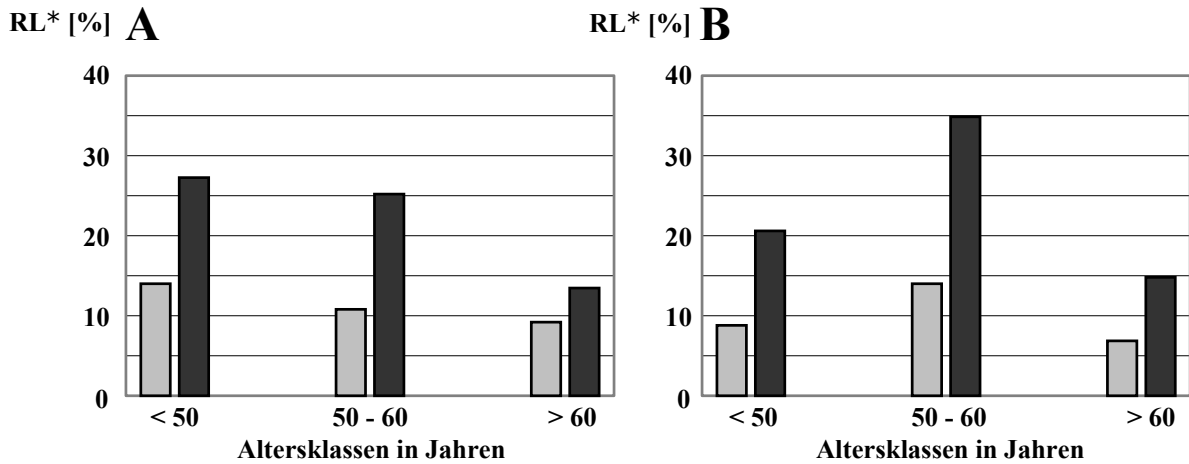


Abb. 21: Prozentuales, altersabhängiges Vorkommen der Typen von Resorptionslakunen in den Altersklassen

A: bei Männern, n=4

B: bei Frauen, n=4

RL* [%]: Anteil der Resorptionslakunen bezogen auf ihre Gesamtzahl

grau: LR; schwarz: FR

Tab. 19: Absolute Verteilung der Typen von Resorptionslakunen in den Altersklassen

| ALTERSKLASSE IN JAHREN | MÄNNER | | FRAUEN | |
|---------------------------|------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | Resorptionstypen | | Resorptionstypen | |
| | LR [Anzahl] | FR [Anzahl] | LR [Anzahl] | FR [Anzahl] |
| < 50 | 153 | 298 | 126 | 295 |
| 50 - 60 | 118 | 275 | 201 | 500 |
| > 60 | 101 | 147 | 99 | 212 |
| χ^2 | 7,7 | | 1,0 | |
| p-Wert | 0,02128 | | 0,60656 (nicht sig) | |

3.2 Aseptische Lockerung von Endoprothesen

3.2.1 Auswahl des Materials

Die Untersuchung gelockerter Prothesen des Femurschaftes (Abb. 22) sollte sich auf die durch aseptische Prozesse verursachten Fälle beschränken. Aus diesem Grund wurden in einer histologischen Analyse des Interfacemembrangewebes der gelockerten Prothese andere Ursachen wie eine Infektion oder ein Tumor ebenso ausgeschlossen wie den Lockerungsprozess begünstigende Faktoren wie eine starke Metallose (Abb. 23A) oder ausgedehnte Nekrosen (Abb. 23B).

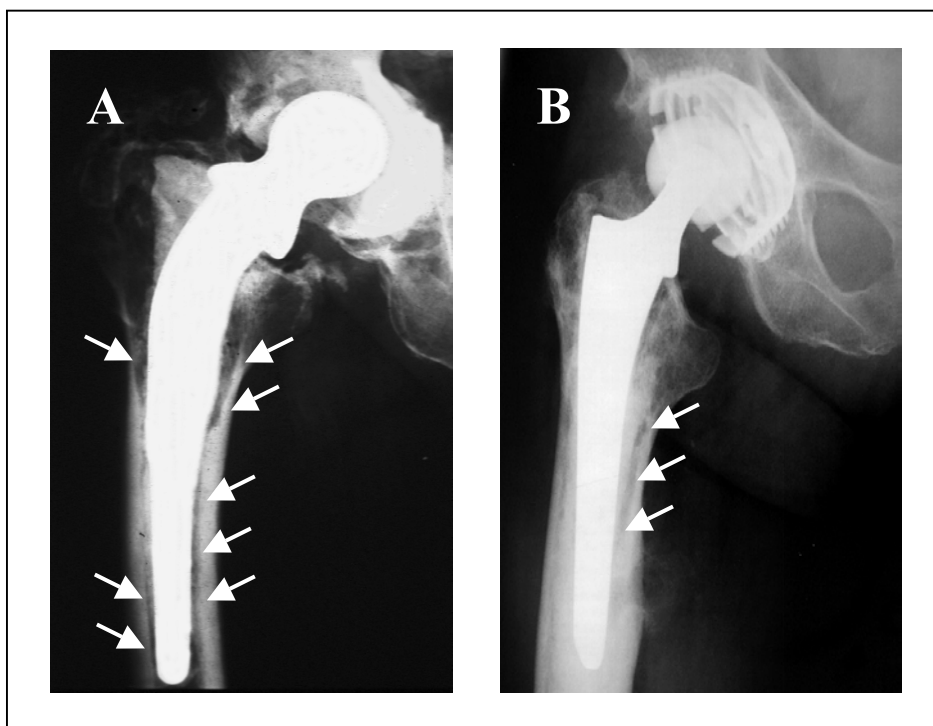


Abb. 22: Gelockerte Femurschaftprothesen im Röntgenbild

A: Unzementierte Femurschaftprothese mit Lockerungssaum (Pfeile)

B: Zementierte Femurschaftprothese mit Lockerungssaum (Pfeile)

Die beiden Röntgenbilder zeigen eine Femurschaftprothese mit deutlichen Anzeichen für einen Lockerungsprozess (Abb. 22). Der sogenannte Lockerungssaum entsteht durch den fortschreitenden Verlust des bei festsitzenden Endoprothesen bis an ihre Oberfläche (unzementierte Femurschaftprothese, Abb. 22A) oder die Oberfläche des für ihre Fixierung verwendeten Knochenzementes (zementierte Femurschaftprothese, Abb. 22B) heranreichenden Knochens. Dieser wird durch Bindegewebe ersetzt, welches im Röntgenbild einen schwachen Kontrast bildet.

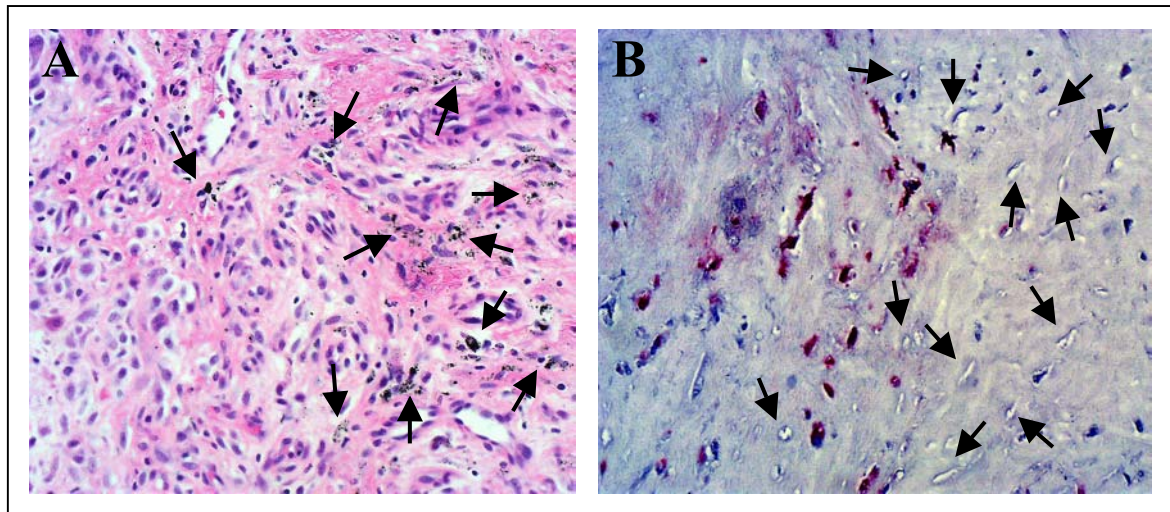


Abb. 23: Histologische Überprüfung des Interfacemembrangewebes

A: HE-gefärbtes Präparat mit Anhäufungen von Metallabriebpartikeln (Pfeile); FW = 423 μm

B: Giemsa-gefärbtes Präparat eines nekrotischen (Pfeile), zellarmen Bereichs der Interfacemembran; FW = 423 μm

Der in Abb. 23A dargestellte Ausschnitt des Interfacemembrangewebes zeigt ein rot gefärbtes, fibröses Bindegewebe mit zahlreichen, blau gefärbten Zellkernen. Darüber hinaus sind unterschiedlich große schwarze Partikel zu erkennen. Die Akkumulation dieser von der Endoprothese stammenden Abriebpartikel in den Zellen des umgebenden Interfacemembrangewebe zeigt ein fortgeschrittenes Stadium des Lockerungsprozesses an und kann zu ihrer Apoptose führen (Stea et al., 2000). Dieser als Metallose bezeichnete Zusammenhang beeinflusst das Expressionsverhalten der Zellen (Pioletti et al., 1999) und würde die in dieser Studie angestrebte Aufklärung weiterer, am aseptischen Lockerungsprozess beteiligter Mechanismen erschweren. Die in der vorliegenden Studie eingesetzte Methode der cDNA Arrays verlangt den Einsatz relativ großer Mengen reiner Total RNA. Diese können aus zellarmen Interfacemembrangewebe (Abb. 23B) nicht gewonnen werden. Hinzu kommt, dass es aus bislang nicht geklärten Gründen zur Entstehung großflächiger Nekrosen im Interfacemembrangewebe kommen kann, die das betroffene Gewebe durch den großen Zellverlust ebenfalls ungeeignet für die Verwendung in dieser Studie werden lassen. Als Referenz wurde ein Gewebe gewählt, welches durch eine größtmögliche Entfernung zur Interfacemembran eine Beeinflussung seiner Zytokingenexpression durch den Lockerungsprozess ausschließen ließ. Darüber hinaus musste es während des Eingriffs der Wechseloperation zugänglich sein und eine hinreichend hohe Zelldichte aufweisen, um die gleiche RNA-Isoliermethode wie bei dem Interfacemembrangewebe anwenden zu können. Damit war die Grundlage für einen

Abgleich der Expressionsmuster beider Gewebe geschaffen. Das Muskelgewebe des Oberschenkels erfüllte diese Anforderungen und wurde als Referenzgewebe verwendet.

Für die vorliegende Studie wurde das Interfacemembrangewebe von 50 Patienten histologisch analysiert. Das Interface- und Referenzgewebe von 6 dieser Patienten wurde mit der Methode der cDNA-Arrays auf eine veränderte Expression von ausgewählten Zytokingenen untersucht.

3.2.2 cDNA Arrays

Neue Einsichten in die zellulären Grundlagen der aseptischen Lockerung von Endoprothesen sollten durch die Untersuchung des die Prothese umgebenden Interfacemembrangewebes gewonnen werden. In einem ersten Ansatz wurde mit Hilfe von cDNA Arrays ein für gelockerte Femurschaftprothesen charakteristisches Expressionsmuster der an der Zell-Zell Interaktion beteiligten Zytokingene ermittelt. Dazu wurde aus dem nach der Entnahme sofort in Stickstoff fixierten Gewebe die Total RNA isoliert (s. 2.7.1). Nach der elektrophoretischen Auftrennung der verschiedenen RNA-Subspezies zeigten sich im Agarosegel im Falle einer erfolgreichen Isolierung zwei Banden. Eine obere aus 28 S rRNA bestehende und die darunterliegende Bande der 18 S rRNA. Das Mengenverhältnis dieser ribosomalen RNA sollte sich in einer 1,5 bis 2 mal stärkeren Anfärbung der oberen Bande darstellen (Abb. 24).

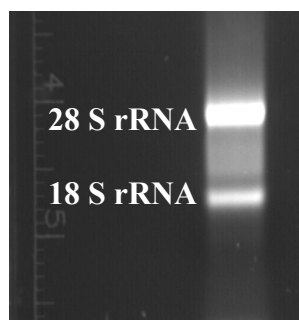


Abb. 24: Elektrophoretisch aufgetrennte Total RNA im Agarosegel

Nach der photometrischen Quantifizierung der Total RNA wurde als zusätzliche Qualitäts- und Reinheitskontrolle eine RT-PCR und eine PCR unter Verwendung eines Primerpaares für das ubiquitär exprimierte humane Aktin durchgeführt. Dabei ergab die RT-PCR eine einzige 600 bp große Bande (Abb. 25).

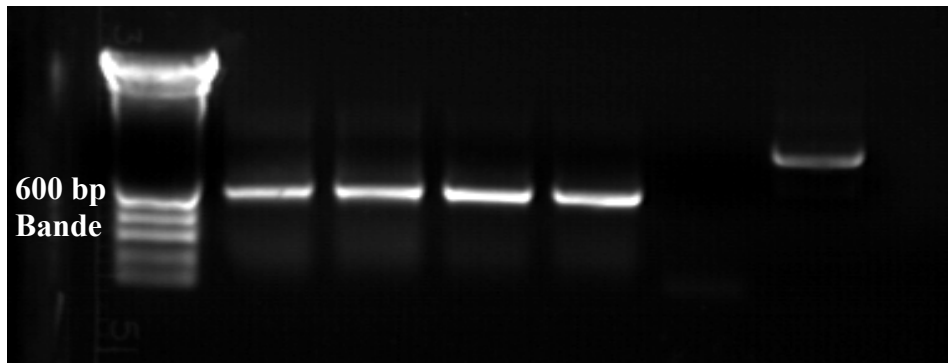


Abb. 25: Überprüfung der isolierten Total RNA

- Spur 1-4: In einer RT-PCR entstandene Aktinamplifikate der Total RNA
- Spur 5: Überprüfung der Total RNA auf DNA-Verunreinigungen in einer PCR
- Spur 6: Positivkontrolle der PCR (aus dem Kit)
- Spur 7: Negativkontrolle der PCR (ohne Template)

Auftretende PCR-Produkte zeigten DNA-Verunreinigungen an, die durch einen DNase-Verdau (s. 2.7.5) beseitigt wurden. Aus dieser gereinigten Total RNA wurden die für die Sondenherstellung benötigten mRNAs der im Gewebe exprimierten Zytokingene extrahiert (s. 2.7.7). Die Quantität der radioaktiven Markierung der cDNA-Sonde (s. 2.7.8) wurde in einem Szintillationszähler überprüft und lag zwischen 500 000 und 5 000 000 cpm/ml. Mit einem Phosphorimager wurden die gebundenen Sonden auf dem Array sichtbar und digital auswertbar gemacht (Abb. 26).

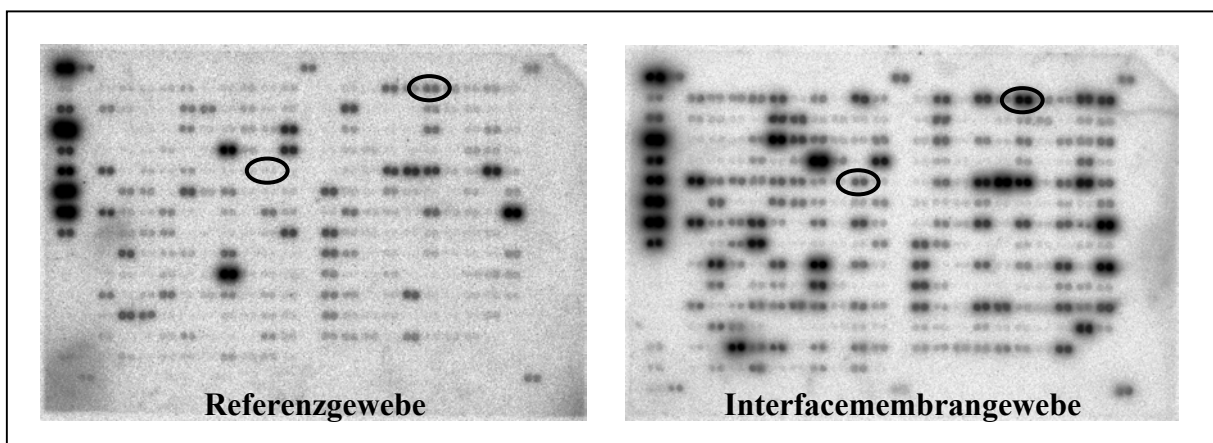


Abb. 26: Visualisierung der Sondenhybridisierung mit dem Phosphorimager

Markierungen: Beispiele für unterschiedlich exprimierte Gene

Die Verteilung der Radioaktivität auf den Arrays wurde zusätzlich mittels Autoradiographie auf Röntgenfilmen dokumentiert (Abb. 27).

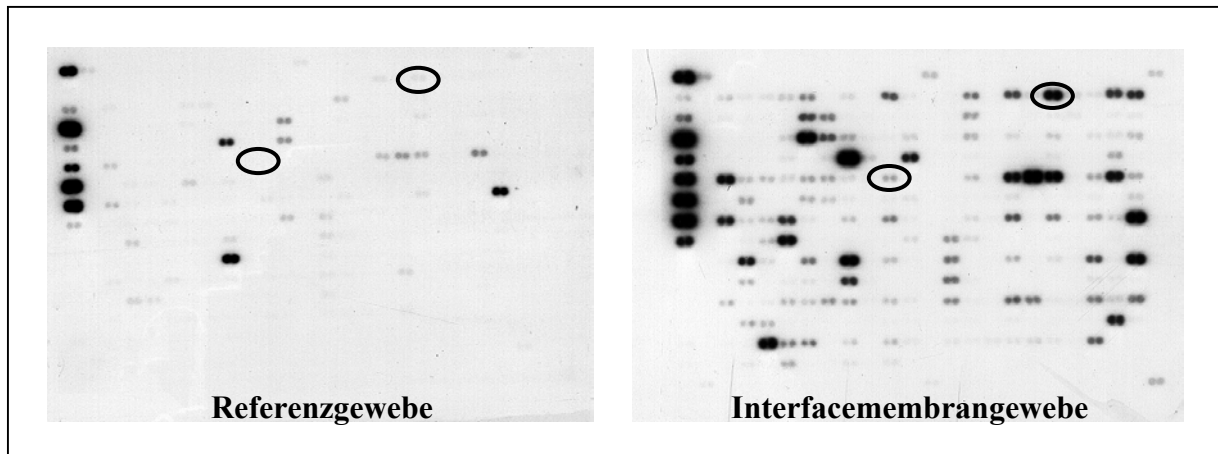


Abb. 27: Visualisierung der Sondenhybridisierung mittels Autoradiographie
 Markierungen: Beispiele für unterschiedlich exprimierte Gene

Für die Auswertung der Arrays wurde das AtlasImage 2.0 Programm der Firma Clontech verwendet. Diese Software ermöglicht die quantitative Analyse der als graduierte Schwärzung auf den Arrays detektierbaren Expressionslevel der verschiedenen Zytokingene. Dazu wurden alle Arrays gegen den Hintergrund und auf GAPDH (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase), ein ubiquitär exprimiertes sogenanntes Housekeeping Gen, abgeglichen. Die Expressionsstärke der Zytokingene des untersuchten Interfacemembrangewebes wurde durch einen Vergleich ihrer Expressionsmuster mit denen des als Referenz eingesetzten Muskelgewebes ermittelt (Abb. 28).

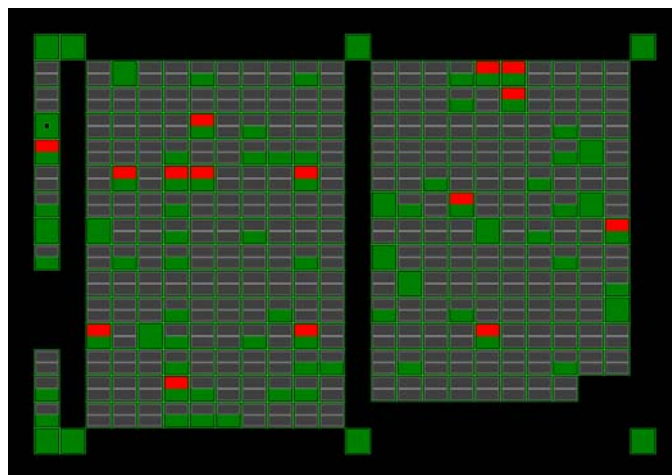


Abb. 28: Graphische Auswertung der cDNA-Arrays
 Rot – signifikante Veränderung ($\geq 1,5$ -fach) gegenüber der Referenz
 Grün – Veränderung gegenüber der Referenz
 Obere Quadrathälfte – Ratio (Verhältnis von Probe zur Referenz)
 Untere Quadrathälfte – Differenz (Absoluter Signalunterschied zwischen Probe und Referenz)

Alle der im Interfacemembrangewebe der untersuchten Patienten gegenüber der Referenz mindestens 1,5-fach über- oder unterexprimierten Zytokingene wurden in der folgenden Tabelle zusammengestellt (Tab. 20).

Tab. 20: Quantitative Analyse der cDNA-Arrays

| Genname | GenBank Zugang | Array- Position | Patient1 Ratio/Diff. | Patient2 Ratio/Diff. | Patient3 Ratio/Diff. | Patient4 Ratio/Diff. | Patient5 Ratio/Diff. | Patient6 Ratio/Diff. |
|----------------|-------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| IL-10 | M57627 | 3L | 1,6 / 7685 | - / - | 2,0 / 13196 | 1,5 / 9194 | - / - | - / - |
| CALA | X06234 | 6H | - / - | 2,3 / 20797 | - / - | 1,7 / 16018 | 4,5 / 46016 | 1,7 / 15452 |
| CAGB | X06233 | 6I | 2,2 / 16242 | n. b. / 27555 | - / - | - / - | 2,8 / 23184 | 2,1 / 20811 |
| MIP1- α | M23452 | 6N | n. b. / 24156 | n. b. / 20676 | 1,8 / 12277 | - / - | - / - | n. b. / 28745 |
| MIF | M25639 | 7C | n. b. / 15965 | 1,9 / 16454 | - / - | - / - | n. b. / 9863 | n. b. / 24372 |
| MCP-1 | M24545 | 7D | 1,8 / 16154 | 2,8 / 30321 | 1,7 / 15293 | 1,6 / 12065 | - / - | - / - |
| RANTES | M21121 | 7F | 1,6 / 8396 | n. b. / 14098 | 1,8 / 12814 | - / - | - / - | - / - |
| IGFBP6 | M62402 | 12D | 1,7 / 9281 | 0,6 / -13248 | - / - | - / - | n. b. / -11413 | n. b. / 24255 |
| TNFR2 | M32315 | 14K | n. b. / 10147 | n. b. / 15876 | - / - | 1,6 / 9895 | - / - | 2,1 / 17303 |
| TDGF1 | M96955 | 18B | n. b. / 14319 | - / - | 2,2 / 18094 | 1,6 / 11261 | n. b. / 13191 | n. b. / 15410 |
| RAI | M36717 | 19B | n. b. / 9747 | 2,0 /21459 | 2,0 / 15817 | - / - | - / - | 1,9 / 11550 |
| THYB10 | M92381 | 23H | 1,9 / 27226 | - / - | 2,0 / 17863 | 2,0 / 19978 | 2,0 / 36712 | 2,5 / 44012 |

n. b. – nicht bestimmt

- / - – keine differentielle Genexpression

grau unterlegt – in mindestens zwei Patienten auswertbar verändert exprimierte Zytokine

Einen ersten „Fingerabdruck“ der in den aseptischen Lockerungsprozeß von Endoprothesen des Femurschaftes involvierten Zytokine stellen die in mindestens zwei Patienten gegenüber der Referenz in ihren Expressionsstärke gleichermaßen veränderten Zytokingene dar (Tab. 20; grau unterlegte Zytokinbezeichnungen). Dies sind neben Interleukin 10 (IL-10) die Calgranuline A und B (CALA, CAGB), das Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1), das Regulated on Activation Normal T-cell-Expressed & Secreted protein (RANTES), der Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2), der Teratocarcinoma Derived Growth Factor 1 (TDGF1), der Ribonuclease/Angiogenin Inhibitor (RAI) sowie das Thymosin beta 10 (THYB10). Der überwiegende Teil dieser neun Zytokingene wird in über 60 % der analysierten Gewebeproben vermehrt exprimiert. Die „nicht bestimmten“ (n. b.) Verhältnisse der Zytokinexpression zwischen Referenz- und Interfacemembrangewebe zeigen an, dass eines der beiden verglichenen Signale auf den Arrays nicht eindeutig quantifizierbar war und somit kein signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Im Gegensatz dazu konnte beim THYB10 in fünf von sechs analysierten Gewebeproben eine signifikante Erhöhung seiner Genexpression im Interfacemembrangewebe nachgewiesen werden.

3.2.3 Real-Time PCR

Zur Verifikation dieser Ergebnisse wurde die Methode der Real-Time PCR (s. 2.8.8) verwendet. Dazu wurde die mRNA der aus der Interfacemembran und dem Referenzgewebe isolierten Total RNA (s. 2.7.2) in cDNA transkribiert (s. 2.8.1), in einer PCR überprüft (Abb. 29) und anschließend als Template für die Real-Time PCR verwendet (s. 2.8.8).

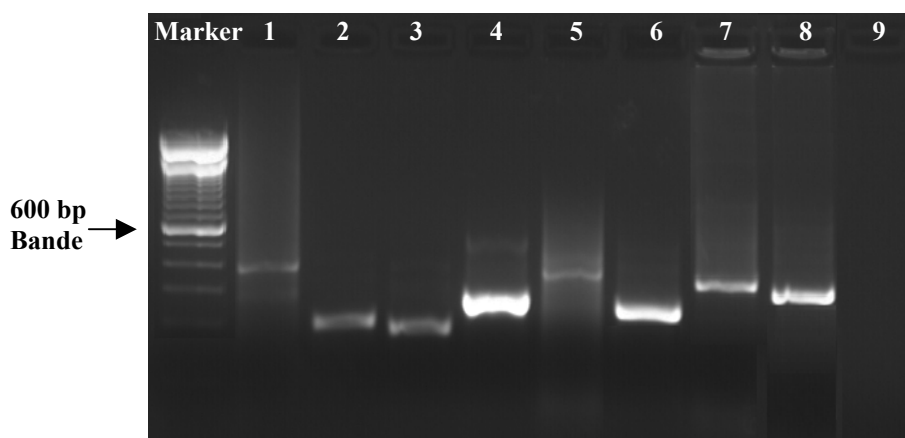


Abb. 29: PCR-Amplifikate der cDNA

Spur 1: TDGF1; Spur 2: IL-10; Spur 3: TNFR2; Spur 4: THYB10; Spur 5: RANTES

Spur 6: CAL A; Spur 7: RAI; Spur 8: MCP1; Spur 9: Negativkontrolle der PCR (ohne Template)

Als Standard für die Quantifizierung der PCR-Amplifikate fungierte das Plasmid pCR2.1, in welches zuvor die jeweils untersuchte Teilsequenz des Zytokingens (entspricht der auf den Arrays vom Hersteller aufgetragenen cDNA-Sequenz) einkloniert (s. 2.8.4) wurde. Ein typisches Ergebnis der Real-Time PCR ist in Abb. 30 dargestellt.

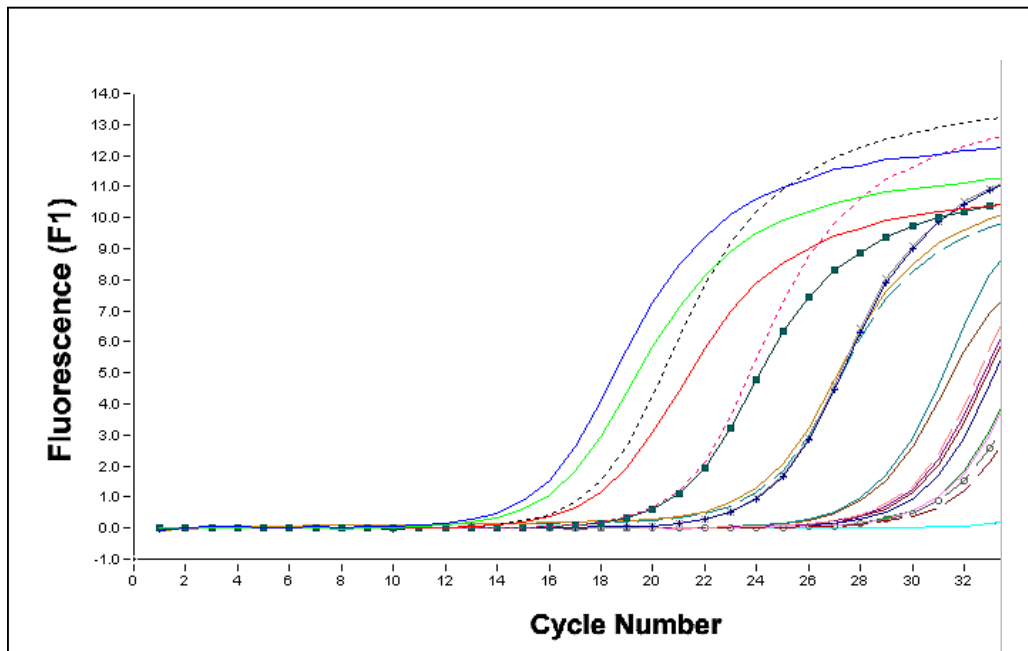


Abb. 30: Analyse der Real-Time PCR

Dargestellt wird die Fluoreszenz der PCR-Produkte in den farblich unterschiedlichen PCR Ansätzen gegen die Zyklusanzahl

Nach dem Erreichen einer bestimmten Kopienanzahl kommt es mit zunehmender PCR Zyklusanzahl zu einem exponentiellen Anstieg der durch den Einbau eines Farbstoffes photometrisch nachweisbaren PCR-Amplifikate. Verschiedene limitierende Faktoren führen dazu, dass die Kopienanzahl der Amplifikate einen Plateauwert erreicht. Der Negativkontrolle fehlt die jeweilige cDNA Matrize, weshalb sie diesen Verlauf einer typischen Sättigungskurve nicht zeigt. Die Reinheit der PCR-Produkte wurde in einer Analyse ihrer Schmelzkurven überprüft (Abb. 31).

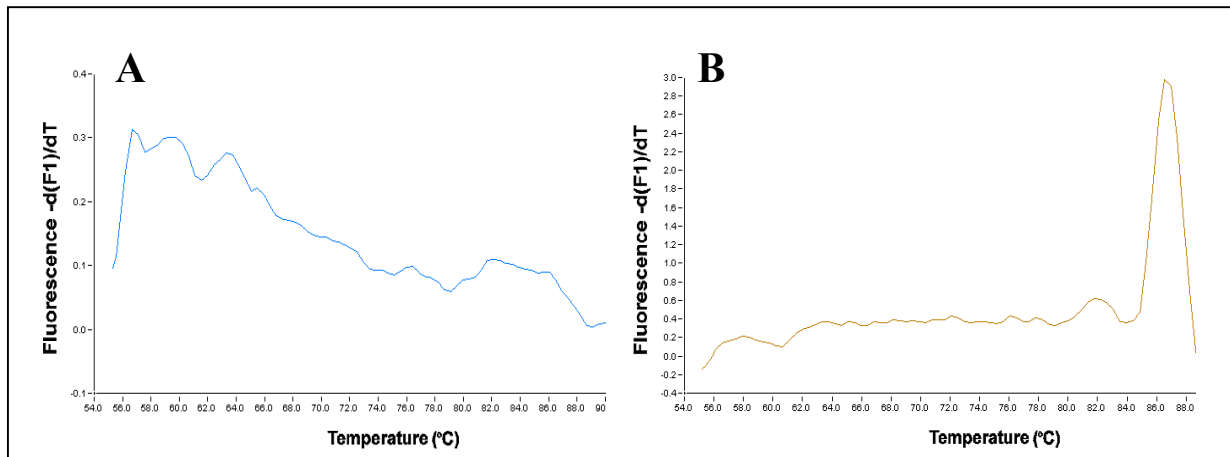
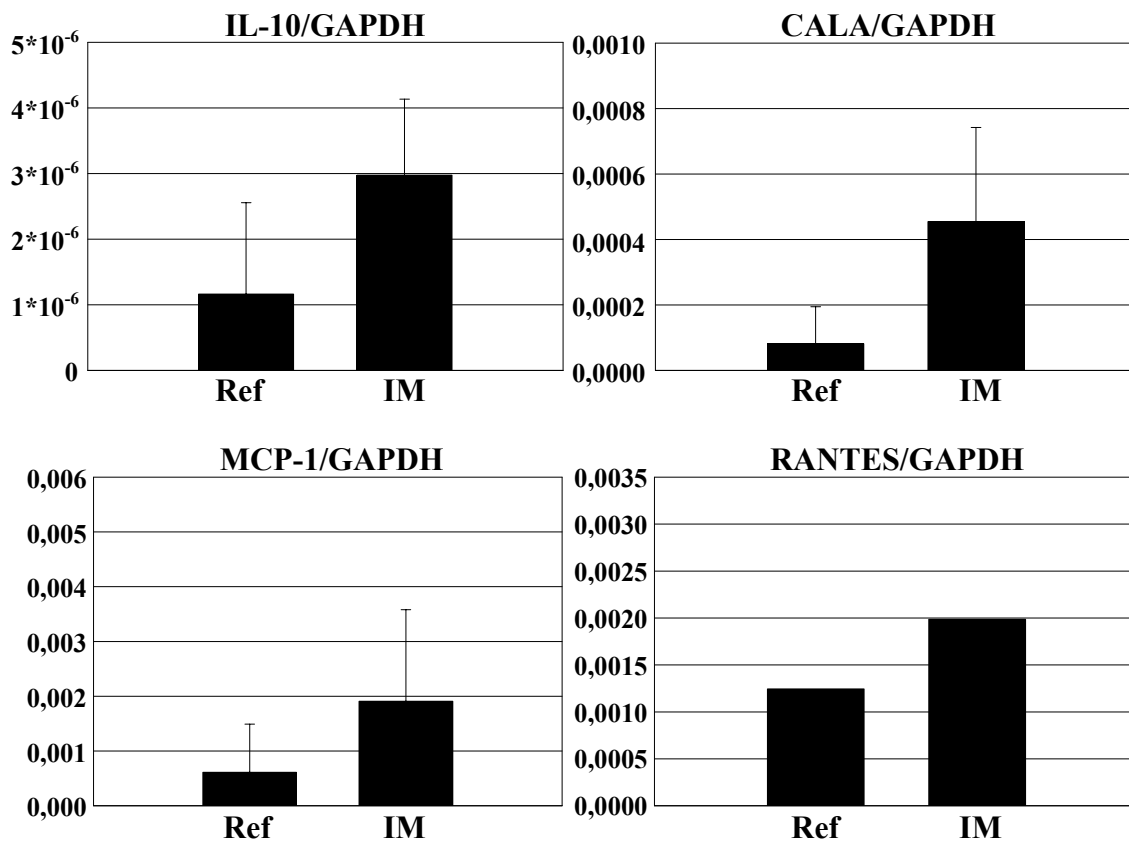


Abb. 31: Schmelzkurven der Real-Time PCR Produkte

A: Negativkontrolle ohne cDNA Matrize
 B: Ansatz mit PCR Produkt

Die zeitabhängige Veränderung der Fluoreszenz zeigt bei der Negativkontrolle mit zunehmender Temperatur eine kontinuierliche Abnahme (Abb. 31A). Demgegenüber weist eine rasche Veränderung der Fluoreszenz in einem Temperaturbereich zwischen 80 °C und 90 °C ein humanes PCR Produkt im PCR Ansatz nach (Abb. 31B). In der folgenden Abbildung sind die Ergebnisse der Real-Time PCR zusammenfassend dargestellt (Abb. 32).

Ergebnisse der Real-Time PCR



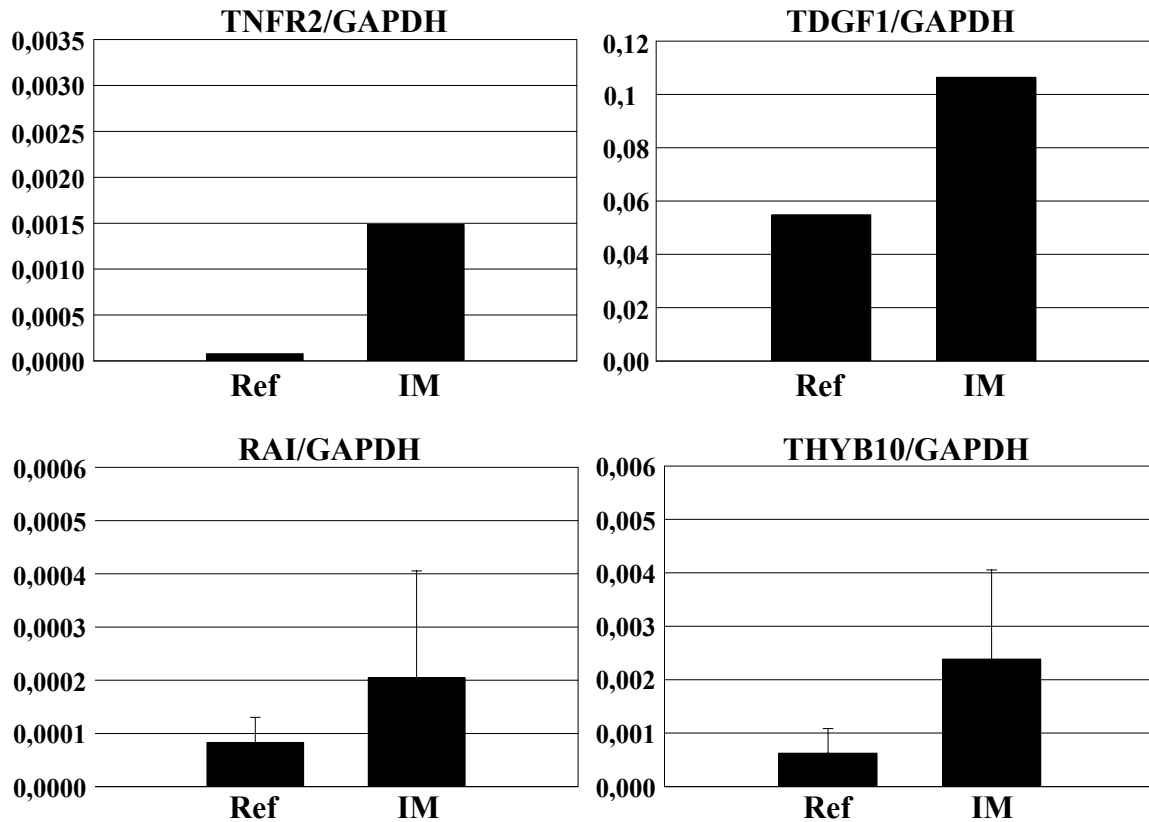


Abb. 32: Ergebnisse der Real-Time PCR

Darstellung der Zytokinnormierungen auf GAPDH von Referenz -(Ref) und Interfacemembrangewebe (IM); angegeben wurde die Standardabweichung bei einem Probenumfang von $n > 2$ (s. Tab. 20)

Die Auswertung der Real-Time PCR Ergebnisse ergab bei allen untersuchten Zytokinen ein gegenüber dem Interfacemembrangewebe kleineres Zytokin/GAPDH Verhältnis im Referenzgewebe. Das Zytokin TNFR2 zeigt zwischen dem Referenz- und dem Interfacemembrangewebe den größten Unterschied des Zytokin/GAPDH Verhältnisses, während das Zytokin RANTES von den untersuchten Zytokinen den kleinsten Unterschied in diesem Verhältnis besitzt.

4. Diskussion

In der Vergangenheit konnte gezeigt werden, dass neben der Knochenmasse die Mikroarchitektur des Knochens für seine Stabilität von entscheidender Bedeutung ist. Durch eine optimale räumliche Anordnung der strukturellen Elemente des spongiösen Knochens (Platten, Stäbe) wird trotz ihrer kleinen Masse eine Minimierung der internen mechanischen Belastung des Knochens erreicht und das Frakturrisiko reduziert (Huiskes et al., 2000; Huiskes, 2000). Die Anordnung der spongiösen Platten und Stäbe ist das Resultat der Beeinflussung osteoklastärer Abbau- und osteoblastärer Anbauprozesse durch eine Vielzahl von Faktoren wie zum Beispiel einer geänderten mechanischen Belastungssituation oder einem unausgewogenen Kalziumhaushalt. Gleichzeitig werden im Zuge der ständigen Selbsterneuerung (Remodelling) des Knochens Mikrofrakturen repariert, um die Stabilität des Knochens zu erhalten. Die Mikroarchitektur des Knochens ist somit ein wichtiger Parameter, um die Knochenstabilität, den Prozess des Remodellings und das osteoklastäre Resorptionsverhalten zu beschreiben (Jayasinghe et al., 1993; Jones und Boyde, 1994; Dempster, 2000). Dabei ist sowohl die qualitative als auch die quantitative Untersuchung der osteoklastären Resorptionslakunen von besonderem Interesse, da diese eine den Knochen schwächende Diskontinuität im Gefüge des spongiösen Netzwerkes darstellen und das Risiko von Mikrofrakturen erhöhen (Evans, 1976). Hinzu kommt, dass mit der altersabhängigen Umwandlung der spongiösen Platten in Stäbe (Delling, 1989; Vogel et al., 1993; Ding und Hvid, 2000) und der damit einhergehenden Abnahme der Dichte des spongiösen Netzwerkes, die Lokalisation der Resorptionslakunen auf den verbliebenen Strukturen des spongiösen Knochens an Bedeutung gewinnt.

4.1 Morphologie der Resorptionslakunen und Perforationen

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung zahlreicher Resorptionslakunen und Perforationen im spongiösen Knochen des humanen Hüftkopfes ergab Übereinstimmungen in ihrer Morphologie, die eine Typisierung ermöglichen. Demnach lassen sich ihrer Gestalt nach longitudinale Resorptionslakunen (LR) von flächigen Resorptionslakunen (FR) sowie lakunäre Perforationen (LP) von tunnellierenden Perforationen (TP) unterscheiden (Abb. 7; Abb. 9). Vergleichbare Beobachtungen wurden bereits in anderen Studien im spongiösen Knochen der Wirbelkörper gemacht (Jayasinghe et al., 1993; Jones und Boyde, 1994; Boyde und Jones, 1998).

Resorptionslakunen

Die charakteristische longitudinale Ausdehnung der LR sowie die entsprechende Anordnung ihrer Pits wurde bereits Mitte der 80er als „snail track“ Resorptionslakune bezeichnet (Boyde et al., 1984; Jones et al., 1985). Demgegenüber korrelieren die FR mit ihren ungeordnet erscheinenden Pits vor allem wegen ihrer häufig inhomogenen Tiefe mit solchen Resorptionslakunen, deren Pits als „accumulating and penetrating“ beschrieben wurden (Jones und Boyde, 1994). Diese Formulierung deutet bereits einen Zusammenhang zwischen Resorptionslakunen und den bislang nicht näher untersuchten Perforationen an. Darüber hinaus reichende Hinweise über die Entstehung dieser Resorptions- und Perforationstypen und ihre Stellung im Gefüge des Knochenmetabolismus finden sich in der Literatur nicht. Resorptionslakunen sind ebenso wie Perforationen das Ergebnis osteoklastärer Resorptionsaktivität, wobei ihre Form durch die Mobilität der Osteoklasten bestimmt wird (Boyde et al., 1984; Jones et al., 1986; Kanehisa und Heersche, 1988; Fuller et al., 1995). Bewegt sich ein Osteoklast gerichtet über die Knochenoberfläche, ist die Entstehung von LR sehr wahrscheinlich. Beschränken sich seine Ortswechsel jedoch auf einen begrenzten Bereich, wird dies die Ausprägung von FR begünstigen. Das Erscheinungsbild der Resorptionlakunen scheint in einem engen Zusammenhang zur Form der sie aufbauenden Pits zu stehen. Diese Vermutung basiert auf der Beobachtung, dass LR überwiegend aus länglichen, parallel angeordneten Pits bestehen, während FR die unterschiedlichsten Pitformen vereinen (Abb. 7). Die einzelnen Pits entstehen in einem durch die ruffled border abgegrenzten extrazellulären Kompartiment des Osteoklasten und lassen Rückschlüsse auf die Form dieses Bereichs zu. Es kann angenommen werden, dass die gegenüber den Pits der LR kleiner erscheinenden Pits der FR durch Osteoklasten entstanden sind, die aufgrund ihrer Größe in der Lage waren, ihre Resorptionsaktivität in mehreren solcher Bereiche gleichzeitig zu entfalten (Holtrop und King, 1977; Kanehisa und Heersche, 1988; Piper et al., 1992). Die Pits der Resorptionslakunentypen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Form, sondern auch in ihrer Tiefe. Während die Pits in LR vornehmlich eine einheitliche Tiefe erkennen lassen, erscheint diese bei den Pits der FR inhomogen. Anders als die Tiefe der Resorptionslakunen ist die Tiefe ihrer Pits direkt von der Resorptionsaktivität eines Osteoklasten abhängig. Diese wird neben den systemischen Faktoren auch von lokalen Faktoren reguliert. Beispielsweise wird die Osteoklastenaktivität durch den extrazellulären Anstieg der Calciumkonzentration während des Resorptionsvorganges inhibiert (Jones et al., 1985; Zaidi et al., 1999; Zaidi et al., 1999a). Doch auch ein hoher Mineralisationsgrad des spongiösen Knochens sowie niedrige

Konzentrationen organischer Knochenanteile beeinflussen die Resorptionsaktivität negativ (Jones et al., 1985; Reid und Boyde, 1987; Boyde et al., 1993). Darüber hinaus wird angenommen, dass die durch andere Zellen auf einen eng eingegrenzten Bereich der Knochenoberfläche beschränkten Osteoklasten, tiefere Pits entstehen lassen, als solche, die sich uneingeschränkt über die Knochenoberfläche erstrecken können (Jones und Boyde, 1994). Die Osteoklastenaktivität und damit die Tiefe der Pits sowie die Form der Resorptionslakune wird von der lokalen mechanischen Belastung innerhalb des Knochens beeinflusst (Smit und Burger, 2000; Lanyon und Skerry, 2001). Die von Smit durchgeführten Berechnungen zeigen, dass diese Belastung mit zunehmender Resorptionstiefe ansteigt und möglicherweise die osteoklastäre Aktivität inhibiert (Smit und Burger, 2000). Daraus kann geschlossen werden, dass die Bereiche des Knochens mit einer homogenen Belastungssituation, die Entstehung von Resorptionslakunen mit einheitlich tiefen Pits begünstigen, während Lakunen mit unterschiedlich tiefen Pits die Folge einer ungleichmäßigen Belastungssituation sein könnten. Die Tiefe von Resorptionslakunen hängt nicht nur von der Tiefe ihrer Pits ab, sondern sie wird auch von dem Remodellingstatus der Knochenoberfläche bestimmt. Entsteht eine Resorptionslakune innerhalb einer noch nicht vollständig wieder durch Osteoblasten aufgefüllten Lakune, so wird diese zwangsläufig tiefer werden als die ursprüngliche Lakune. Die Ursachen für ein solches Szenario sind mannigfaltig und können in einem unausgewogenen Remodelingzyklus liegen. Dieser kann sich wie im vorliegenden Fall u.a. in einer erhöhten Osteoklastenaktivität bei gleichzeitig unveränderter Osteoblastenaktivität oder in einer unveränderten Osteoklastenaktivität bei gleichzeitig inhibierter Osteoblastenaktivität manifestieren. Die Kombination dieser Erkenntnisse legt den Schluß nahe, dass es sich bei den LR um Resorptionslakunen eines ausgewogenen Remodellingzykluses handelt, während die FR als erste Anzeichen einer strukturellen Veränderung angesehen werden können.

Perforationen

Eine unumkehrbare strukturelle Veränderung stellen Perforationen dar. Durch ihre Entstehung werden mit zunehmendem Alter spongiöse Platten zu Stäben umgewandelt (Vogel et al., 1993; Ding und Hvid, 2000). Die Unterbrechung ihrer Kontinuität durch fortgesetzte Resorptionsaktivität lässt mechanisch nicht belastete, sogenannte freie Enden entstehen, was die Stabilität des trabekulären Knochens nachhaltig mindert (Mosekilde, 1990). Aufgrund ihrer Lokalisation in zumeist ausgedehnten Resorptionsfeldern kann

angenommen werden, dass sowohl die LP als auch die TP ihren Ursprung in FR besitzen (Abb. 9). Demnach scheint es möglich, dass die LP das Ergebnis einer fortgesetzten osteoklastären Resorptionsaktivität in einem begrenzten Bereich der Knochenoberfläche darstellt, die nach einer anfänglichen Ausdünnung letztlich zur Perforation des betroffenen spongiösen Elements geführt hat. Die gezeigten rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen lassen die Annahme zu, dass eine solche Perforation auf spongiösen Platten ebenso wie auf spongiösen Stäben auch von nur einer Seite aus erfolgen kann (Abb. 9). Für die TP ist eine Entstehung durch Osteoklasten mit penetrierender Resorptionsaktivität denkbar (Parfitt, 1987; Abe et al., 1990; Delling et al., 1991). Durch die Akkumulation mehrerer penetrierender Osteoklasten werden die sowohl histologisch als auch elektronenmikroskopisch nachweisbaren Einkerbungen der Knochenoberfläche erklärbar (Abb. 2; Abb. 11). Diese Osteoklasten erzeugen Resorptionslakunen, deren Pitttiefe graduell zunimmt (Abb. 11A) auf spongiösen Platten (Abb. 11B) und –Stäben (Abb. 11C, D). Dabei scheint der „Eintrittswinkel“ der Osteoklasten in den Knochen zu variieren.

Gefäßdurchtritte

Beide Perforationstypen müssen von Gefäßdurchtritten abgegrenzt werden. Im Gegensatz zu den beschriebenen Perforationen entstehen die Gefäßdurchtritte während der Osteogenese durch das Einwandern von Blutgefäßen in eine noch knorpelige Matrix (Olsen et al., 2000). Osteoklastenvorläufer gelangen nach der Knochenbildung durch diese in den spongiösen Knochen, reifen dort zu Osteoklasten heran und beginnen ihre Resorptionsaktivität, so dass an die Gefäßdurchtritte angrenzende Resorptionslakunen zu erwarten sind. Abbildung 8B könnte solch einen Gefäßdurchtritt zeigen. Charakterisiert wird er durch ihn umgebende, meist zirkulär angeordnete Resorptionslakunen des longitudinalen Typs und einer an den Kollagenfasern erkennbaren unversehrten Knochenoberfläche im Gefäßdurchtritt. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass die Orientierung der Kollagenfasern des Knochens von der lokalen Belastungssituation abhängig ist (Wolff, 1892; Turner et al., 1995; Suda et al., 1999; Takano et al., 1999). Darüber hinaus ist bekannt, dass Osteoklasten ihre Resorptionsaktivität entlang der Kollagenfasern entfalten (Jones et al., 1985; Jones und Boyde, 1994; Kingsmill und Boyde, 2001). Die zirkuläre Anordnung der Resorptionslakunen um die Gefäßdurchtritte deutet auf eine ebensolche, besonders stabile Anordnung der Kollagenfasern hin, wie sie zum Schutz des Blutgefäßes von Vorteil wäre. Letztlich findet sich eine vergleichbare Anordnung der Kollagenfasern um die Osteone und

damit um die darin entlanglaufenden Haverschen Kanäle (Ascenzi, 1999), die ebenfalls ein Gefäßsystem darstellen.

4.2 Quantifizierung der Resorptionslakunen

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglicht die Untersuchung von mikrostrukturellen Veränderungen im Knochen lange bevor diese klinisch auffällig werden oder mit densitometrischen oder radiologischen Verfahren nachweisbar sind. Die meisten dieser Veränderungen manifestieren sich über eine Verlagerung des Gleichgewichtes aus Knochenaufbau und Knochenresorption in einer abweichenden Anzahl von Resorptionslakunen. In der vorliegenden Studie wurde daher die Rasterelektronenmikroskopie erstmals für die Quantifizierung von Resorptionslakunen verwendet. Die Standardisierung der Probenpräparation (s. 2.4) und der Datenerhebung (s. 3.1.4.1) ermöglicht den Vergleich der erhaltenen Ergebnisse (Abb. 13; Abb. 14). Mögliche Erklärungsansätze für die beobachteten Veränderungen des Resorptionslakunenanteils bieten verschiedene zelluläre Mechanismen. Der sowohl bei Männern als auch bei Frauen in der fünften Lebensdekade festgestellte Anstieg des Resorptionslakunenanteils könnte die Folge einer Erhöhung der BMU-Frequenz (Bone Multicellular Units) sein (Parfitt, 1987; Brockstedt et al., 1993; Thomsen et al., 1994; Han et al., 1997). Diese würde dazu führen, dass die durch osteoklastäre Resorptionsaktivität entstandenen Lakunen in der zur Verfügung stehenden Zeit von den Osteoblasten nicht wieder vollständig aufgefüllt werden können und damit der Anteil der Resorptionslakunen ansteigt (Eriksen et al., 1985; Van der Linden et al., 2001a). Die Schwankungen der Messwerte könnten somit auf die individuell unterschiedlichen Zeitpunkte und Ausprägungen einer Erhöhung der BMU-Frequenz (Tayyar et al., 1999) zurück zu führen sein. Der bei Frauen während der Menopause sinkende Östrogenspiegel bewirkt nachweislich eine Erhöhung der BMU-Frequenz, was den bei der Darstellung der einzelnen Messwerte (Abb. 13) beobachteten stärkeren Anstieg des Resorptionslakunenanteils bei ihnen erklären würde. Darüber hinaus ist auch die Tiefe der Resorptionslakunen von großer Bedeutung, denn mit ihrer zunehmenden Tiefe nimmt die von den Osteoblasten benötigte Zeit für ihre vollständige Auffüllung zu. Damit steigt jedoch auch die durchschnittliche Anzahl der nur teilweise aufgefüllten Resorptionslakunen an. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Osteoklasten in Abwesenheit von Östrogen stärker in den Knochen penetrieren und damit tiefere Pits entstehen lassen (Parikka et al., 2001). Hinzu kann eine verminderte Aktivität

der Osteoblasten kommen, was ebenfalls eine Ausdehnung der resorbierten Knochenoberfläche zur Folge hätte (Arnold et al., 1966). Doch auch eine Verlängerung des Lebenszyklusses der Osteoklasten durch die verzögerte Einleitung ihrer Apoptose kann zur Störung des Remodellingzykluses und damit zu einer Erhöhung des Resorptionslakunenanteils beitragen (Hughes et al., 1996; Kameda et al., 1997; Hofbauer et al., 2000; Kousteni et al., 2001). Frauen besitzen eine geringere Knochenmasse als Männer, so dass der altersbedingte Knochenmasseverlust bei ihnen schneller zu einer Ausdünnung des spongiösen Netzwerkes führt. Durch diese Abnahme der Knochendichte sinkt die Wahrscheinlichkeit auf der verbliebenen Knochenoberfläche osteoklastäre Resorptionsspuren nachweisen zu können. Damit könnte die im REM bei Frauen ab der sechsten Lebensdekade beobachtete Abnahme des Resorptionslakunenanteils erklärt werden. Hinzu kommt die mit zunehmendem Alter abnehmende Frequenz der Remodellingzyklen, die ebenfalls zum Rückgang des Resorptionslakunenanteils beiträgt (Parfitt, 1984; Kelly et al., 1989). Der im Zusammenhang mit der Menopause beobachtete beschleunigte Knochenverlust tritt zeitlich begrenzt auf (Brockstedt et al., 1993). Die in dieser Studie ab der 6. Lebensdekade rasterelektronenmikroskopisch beobachtete Abnahme des Resorptionslakunenanteils könnte somit auf die Rückkehr der Knochenverlustrate zu premenopausalen Werten zurück zu führen sein. Über die Wichtung der aufgeführten Faktoren bei der Änderung der auf der Knochenoberfläche nachweisbaren Anzahl von Resorptionslakunen kann nur spekuliert werden.

4.3 Histomorphometrie – Vergleich mit den Literaturwerten

In der Vergangenheit wurde in einer Reihe histomorphologischer Studien an Beckenkämmen der Resorptionslakunen aufweisende Anteil der Trabekeloberfläche (eroded surface/bone surface – ES/BS) bestimmt. Die mit diesem lichtmikroskopischen Verfahren erhaltenen Ergebnisse waren widersprüchlich. Einige Forscher beobachteten bei gesunden Frauen in der Menopause eine Zunahme des ES/BS Wertes (Eastell et al., 1988; Ballanti et al., 1990; Zhioua et al., 1994; Han et al., 1997; Nakashima et al., 1999), während andere einen altersabhängigen Anstieg (Croucher et al., 1991), keine Veränderungen (Vedi et al., 1982) oder gar ein Absinken des ES/BS Wertes (Malluche et al., 1982) feststellen konnten. Angesichts einer ermittelten Streuung der ES/BS Werte von mehr als 80 % erscheinen die Diskrepanzen der Erhebungen nachvollziehbar (De Vernejoul et al., 1981; Bonucci et al., 1990). Eine mögliche Erklärung könnte die geringe Auflösung des für die Histomorphometrie verwendeten Lichtmikroskops liefern.

Diese erschwert das Erkennen von Resorptionslakunen in der Aufsicht. Insbesondere flache, wenig mikrostrukturierte Lakunen lassen sich schwer von der angrenzenden Knochenoberfläche unterscheiden (Abb. 3A). Vergleichende Untersuchungen haben keinen signifikanten Unterschied zwischen den an Beckenkammbiopsien und den am spongiösen Knochen des Hüftkopfes erhobenen ES/BS Werten ergeben, so dass ein Vergleich der in dieser Studie erhaltenen ES/BS Werten mit den an Beckenkammbiopsien gewonnenen Literaturwerten möglich ist (Fazzalari et al., 1989). Die im Rahmen dieser Studie untersuchten Patienten (Abb. 15A) zeigen unabhängig vom Geschlecht tendenziell eine mit der Arbeit von Croucher vergleichbare Zunahme der ES/BS Werte bis zur 5. Lebensdekade (Schulz und Delling, 1976; Croucher et al., 1991). In den folgenden Lebensjahren wurde bei Männern von einigen Autoren ein Rückgang der ES/BS Werte beobachtet (Aaron et al., 1987; Clarke et al., 1996). Im Gegensatz dazu wurde in anderen histomorphometrischen Studie bei Männern und Frauen von einer Zunahme der ES/BS Werte ab der 6. Lebensdekade berichtet (Meunier et al., 1973; Rehman et al., 1994). Die Veränderungen der ES/BS Werte ab der 6. Lebensdekade der im Rahmen dieser Studie histomorphometrisch untersuchten Männern und Frauen stimmen mit den Ergebnissen von Rehman und Meunier weitgehend überein.

Im Gegensatz dazu finden sich in der Literatur viele übereinstimmende Ergebnisse, die belegen, dass die Knochendichte mit zunehmendem Lebensalter kontinuierlich und geschlechtstunabhängig abnimmt (Delling und Schulz, 1973; Chan und Duque, 2002). Dies gilt offensichtlich auch für die Knochendichte des spongiösen Hüftkopfknochens der untersuchten Frauen (Abb. 15B). Eine mögliche Erklärung für die nahezu unveränderten BV/TV Werte der untersuchten Männer bietet die geringe Anzahl der ausgewerteten Fälle bei gleichzeitig großer Streuung der Einzelwerte. Belegt werden diese Einzelwertschwankungen durch den großen Fehlerbalken in der Altersgruppe größer 60 Jahre, der auf einen in diesem Zusammenhang zu großen BV/TV Wert hindeutet.

4.4 Histomorphometrie – Vergleich mit den REM-Werten

In einem Vergleich der erstmals mit einem Rasterelektronenmikroskop in einem definierten Bereich des Hüftkopfes ausgezählten Resorptionslakunen (Abb. 14) mit den durch das klassische lichtmikroskopische Verfahren der Histomorphometrie erhobenen ES/BS Werten (Abb. 15A), sollten die erhaltenen Ergebnisse überprüft werden. Dieser Vergleich der Verteilung der Resorptionslakunen über die definierten Altersklassen zeigt, dass die mit dem Lichtmikroskop erhobenen histomorphometrischen ES/BS Werte größer

sind als die mit dem REM erhaltenen Daten. Einen möglichen Erklärungsansatz bietet die unterschiedliche Größe der analysierten Probenausschnitte. Während im REM die über einen Probenausschnitt von 6 mm^2 verteilten Resorptionslakunen ausgezählt wurden, war dieses Feld bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen 25 mm^2 groß. Mit der Größe des Probenausschnittes nimmt die Wahrscheinlichkeit Resorptionslakunen nachzuweisen zu. Der ES/BS Wert beschreibt ein Verhältnis, so dass die Größe dieses Wertes nicht allein von der Anzahl der Resorptionslakunen, sondern auch von der im Probenausschnitt messbaren Knochenoberfläche abhängt. Die im Vergleich höheren ES/BS Werte müssten demnach das Resultat einer im größeren Probenausschnitt relativ zur messbaren Knochenoberfläche stärker gestiegenen Anzahl an Resorptionslakunen sein. Darüber hinaus konnte unabhängig von dem verwendeten Messverfahren ein geschlechtsunabhängiger Anstieg des Resorptionslakunenanteils in der fünften Lebensdekade nachgewiesen werden. Der in der sechsten Lebensdekade bei den untersuchten Männern lichtmikroskopisch nachweisbare deutliche Anstieg des Resorptionslakunenanteils, fällt bei der rasterelektronenmikroskopischen Erhebung moderater aus. Noch deutlicher wird dieser Unterschied zwischen den Messverfahren bei den analysierten Frauen der sechsten Lebensdekade. Der lichtmikroskopisch festgestellte Anstieg des Resorptionslakunenanteils wird rasterelektronenmikroskopisch als gegenteilige Entwicklung gemessen. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz könnte die verglichen mit dem REM geringere Schärfentiefe des für die Histomorphometrie verwendeten Lichtmikroskops sein. Zusammen mit der ebenfalls geringeren Auflösung führt sie dazu, dass Resorptionslakunen nicht oder fälschlicherweise erkannt werden. Die dadurch verursachte Abweichung wird umso größer, je flacher die untersuchten Resorptionslakunen sind. Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass die Tiefe der Resorptionslakunen mit zunehmendem Alter abnimmt (Eriksen et al., 1985; Palle et al., 1989), was die Ungenauigkeit der histomorphometrischen ES/BS Werte im gleichen Maße zunehmen ließe. Hinzu kommt, dass der Verlust von Knochenstrukturen durch die bis zu 1 cm große Schärfentiefe des REMs den Blick auf die darunterliegende Knochenoberfläche erlaubt, so dass die Größe der auswertbaren Oberfläche verglichen mit den Verhältnissen im lichtmikroskopischen Bild über einen größeren Altersbereich konstant bleibt. Im Gegensatz dazu führt ein Strukturverlust bei der histomorphometrischen Analyse eines Schnittpräparates zu einer Abnahme der messbaren Knochenoberfläche (BS), die eine nahezu unveränderte Anzahl an Resorptionslakunen (ES) vorausgesetzt, eine Zunahme des ES/BS Wertes zur Folge hätte. Aus diesen

Überlegungen geht hervor, dass die Grundlage für die Bestimmung der Resorptionslakunenanzahl im REM eine annähernd gleichgroße Knochenoberfläche ist, während der histomorphometrische Parameter der ES/BS von dieser abhängig ist.

4.5 Lokalisation der Resorptionslakunen (nach Typ, Geschlecht, Alter)

Die Lokalisation von Resorptionslakunen wurde bislang in der Literatur sehr oberflächlich beschrieben. Es wird berichtet, dass sich Resorptionslakunen sowohl auf platten- als auch auf stabartiger Spongiosa nachweisen lassen (Jayasinghe et al., 1993; Chai et al., 1996). Eine detailliertere Auflösung ihrer Lokalisation auf diesen Strukturen blieb ebenso aus, wie die Klärung der Frage nach einer alters- und/oder geschlechtsspezifischen Verteilung der Resorptionslakunen auf diesen Lokalisationen. Dies verwundert vor dem Hintergrund der Arbeit von Dempster (Dempster, 2000) um so mehr, da dieser auf die Bedeutung der Lage von Resorptionslakunen auf die Stabilität des spongiösen Netzwerkes hingewiesen hat. Bereits ein kleiner durch osteoklastäre Resorption herbeigeführter Knochenverlust an einer druck- und oder zugbelasteten Stelle, wie sie die Basis eines jeden Trabekel darstellt, kann das Risiko einer Mikrofraktur erheblich erhöhen. Dempster vergleicht diese Situation mit der eines Baumes, bei dem trotz seiner großen Masse der Verlust eines kleinen, keilförmigen Stückes im wurzelnahen Bereich des Baumstammes ausreicht, diesen zu fällen. Die Verteilung der Resorptionstypen in den Lokalisationen der spongiösen Stäbe zeigt, dass bei den untersuchten Frauen die meisten Resorptionslakunen auf den spongiösen Stäben im Zentral-/Übergangsbereich lokalisiert waren und sich somit über die gesamte Trabekelstruktur erstreckten (Abb. 19A). Diese Erkenntnis liefert einen weiteren Anhaltspunkt für das bei Frauen höhere Frakturrisiko (Wenzel et al., 1996; Orwoll et al., 2001). Aufgrund ihrer gegenüber den Männern geringeren Knochenmasse (Parfitt et al., 1997), werden die auftretenden Belastungen über eine relativ filigranere Spongiosastruktur verteilt. Resorptionslakunen entstehen während der Selbsterneuerung des Knochens, während der Mobilisierung des im Knochen gespeicherten Kalziums oder während der Beseitigung von sogenannten Mikrorissen im Knochen (Hirano et al., 2000; Christiansen, 2001). Mikrorisse entstehen durch eine lokale Überbelastung der spongiösen oder kortikalen Knochenstruktur und können bei einer Akkumulation zu Mikrofrakturen und Perforationen führen. Der von den Mikrorissen induzierte Remodellingprozess (Burr et al., 1985; Mori und Burr, 1993; Bentolila et al., 1998) wird von einer Phase der osteoklastären Resorption eingeleitet bevor osteoblastäre Anbauvorgänge die entstandenen Resorptionslakunen auffüllen. Vor diesem Hintergrund könnten die erhaltenen Ergebnisse

der Lokalisation von Resorptionslakunen als Hinweis auf mechanisch stark belastete Regionen der spongiösen Stäbe und Platten verstanden werden. Analog zu diesen Überlegungen lässt sich für die untersuchten Männer festhalten, dass bei ihnen die Übergangsbereiche der spongiösen Stäbe aufgrund der hohen Belastung häufig Mikrorisse aufweisen (Abb. 19B), die einen der strukturellen Wiederherstellung dienenden Remodellingprozess auslösen. Das Verhältnis der charakterisierten Resorptionstypen ändert sich zwischen den unterschiedenen Lokalisationen in beiden Geschlechtern. Diese Veränderung weist auf einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Lokalisation von Resorptionslakunen auf spongiösen Platten und Stäben hin (Tab. 14).

Eine Erklärung für diesen Zusammenhang bieten die unterschiedlichen Funktionen des Remodellingprozesses (s. o.). Es wäre denkbar, dass die flächigen Resorptionslakunen eine Momentaufnahme des frühen Stadiums eines der Mikrorissheilung dienenden Remodellingprozesses darstellen, wohingegen die longitudinalen Resorptionslakunen während der Erneuerung des Knochens gebildet werden. Für diese Theorie spricht die Identifizierung von sogenannten diffusen Mikroschäden an der Oberfläche von spongiösen Stäben, die sich über einen flächigen Bereich erstrecken (Vashishth et al., 2000). Die Selbsterneuerung des Knochens findet gleichermaßen in allen Bereichen des Knochens statt (Christiansen, 2001), so dass zwischen den unterschiedenen Lokalisationen auf spongiösen Stäben und Platten keine großen Schwankungen des Anteils longitudinaler Resorptionslakunen zu erwarten sind. Diese mögliche Zuordnung der unterschiedenen Resorptionstypen stellt den Idealfall dar. Anhand des vorhandenen Datenmaterials kann nicht ausgeschlossen werden, dass beide Remodellingarten überlappend in einer Resorptionslakune stattfinden. Kommt es während eines Remodellingzykluses innerhalb der ausgebildeten Resorptionslakunen zu einem Mikroriss, könnte dieser einen weiteren Remodellingprozess induzieren, ohne dass der vorherige zuvor abgeschlossen wurde. Es kann festgehalten werden, dass die meisten Resorptionslakunen sowohl bei Frauen als auch bei Männern im Zentral-/Übergangsbereich bzw. Übergangsbereich der spongiösen Stäbe und damit in mechanisch stark belasteten und für die Stabilität wichtigen Bereichen gefunden wurden.

Der relativ höhere Anteil flächiger Resorptionslakunen der Frauen im Zentralbereich der spongiösen Platten (Abb. 19D) könnte auf ein durch ihre niedrigere Knochenmasse bedingtes höheres Mikrorissrisiko in diesem Bereich der spongiösen Platten zurück zu führen sein. Gleichzeitig ist der Zentralbereich der spongiösen Platten der Ausgangspunkt für eine Perforation und die damit beginnende Umwandlung der spongiösen Platte in

spongiöse Stäbe. Aus der Literatur ist bekannt, dass es in Abhängigkeit von der Remodellingfrequenz und des Lebensalters zu einer Akkumulation von Mikrorissen und damit zu einer möglichen Perforation in diesem Bereich kommen kann (Mori et al., 1992; Schaffler et al., 1995; Wenzel et al., 1996; Mori et al., 1997; Fazzalari et al., 1998). Auch auf den spongiösen Platten konnte für beide Geschlechter ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Lokalisation von Resorptionslakunen und dem Resorptionstyp hergestellt werden (Tab. 16).

Die in Abbildung 20 dargestellte altersabhängige Lokalisation der Resorptionslakunen auf Stäben und Platten deutet auf einen qualitativen Unterschied in ihrer Verteilung zwischen Männern und Frauen in der fünften Lebensdekade hin. Auf der Grundlage eines annähernd gleichen durchschnittlichen Resorptionslakunenanteils (vgl. Abb. 14) können in beiden Geschlechtern die größten Unterschiede in der Verteilung des Resorptionslakunenanteils zwischen den Lokalisationen des spongiösen Stabes in dieser Lebensdekade ermittelt werden. Hinzu kommt die aus Abbildung 21 ableitbare Erkenntnis, dass Frauen in dieser Altersklasse einen gegenüber gleichaltrigen Männern höheren Anteil flächiger Resorptionslakunen besitzen, der darüber hinaus im Vergleich zu jüngeren Frauen eine deutliche, altersabhängige Zunahme erkennen lässt. Die untersuchten Männer zeigen hingegen eine leichte Abnahme des Anteils flächiger Resorptionslakunen zwischen der Altersklasse < 50 Jahren und der 50 – 60-jährige Männer umfassenden Altersklasse. Durch die Kombination dieser Erkenntnisse mit den Überlegungen zum Ursprung und der Bedeutung von Mikrorissen (s. o.) ergibt sich folgende Belastungssituation des spongiösen Stabes in der fünften Lebensdekade: Ebenso wie die Männer besitzen die Frauen dieser Altersklasse ein hohes Risiko von Mikrofrakturen in den Übergangsbereichen der spongiösen Stäbe. Hinzu kommt geschlechtsspezifisch bei den Frauen ein erhöhtes Perforationsrisiko im Zentralbereich der spongiösen Stäbe. Durch den hohen Anteil flächiger Resorptionslakunen im Zentralbereich besteht die Gefahr einer Ausdünnung und des Verlustes dieser Lokalisation und damit eine verminderte Stabilität gegenüber Scherkräften. Die statistische Auswertung der erhobenen Daten konnte bei den untersuchten Frauen die Annahme einer generellen Altersabhängigkeit der Lokalisation von den Resorptionslakunen ebenso wenig bestätigen wie die altersabhängige Verteilung der Resorptionstypen (Tab. 17-19). Die Gründe dafür dürften in der Betrachtung des gesamten Altersspektrums liegen. Zusammen mit einer Ausweitung des Probenumfangs könnte eine Eingrenzung des analysierten Altersspektrums statistische Unterschiede deutlicher hervorheben.

4.6 cDNA-Arrays

Die für die molekularbiologische Untersuchung der Interfacemembran aus Patienten mit aseptisch gelockerten Hüftendoprothesen eingesetzte cDNA-Array Technologie ergab unabhängig von Alter und Geschlecht der Patienten sowie unabhängig vom verwendeten Prothesentyp ein gegenüber dem verwendeten Referenzgewebes deutlich verändertes Expressionsprofil von neun Zytokingenen. Fünf dieser Zytokine (Calgranulin A, Calgranulin B, IL-10, MCP-1 und RANTES) konnten in verschiedenen, vorangegangenen Studien in der Interfacemembran auf Protein- und genetischer Ebene nachgewiesen werden (Cuida et al., 1996; Nabae et al., 1999; Nakashima et al., 1999; Trindade et al., 2001). Der in der vorliegenden Studie erstmals geführte Nachweis ihrer differentiellen Regulation auf genetischer Ebene ergänzt das Bild von der Beteiligung dieser Zytokine am Prozess der aseptischen Lockerung.

In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass MCP-1 u.a. von Lymphozyten nach PHA-Stimulation sowie von Osteoblasten und Makrophagen nach ihrer Stimulation mit Abriebmaterial (PMMA, Ti-Legierung) sekretiert wird. MCP-1 ist am Prozess der Signaltransduktion und der Rekrutierung von monozytären Zellen, insbesondere von Makrophagen bei chronischen Entzündungen beteiligt (Nakashima et al., 1999). Letztere sind zahlreich im Interfacemembrangewebe von gelockerten Hüftendoprothesen nachgewiesen worden und ihre Beteiligung am Prozess der aseptischen Lockerung ist vielgestaltig (Horowitz et al., 1994; Lassus et al., 1998).

RANTES zählt ebenso wie MCP-1 zur Familie der sogenannten CC Chemokine und gilt als Vermittler akuter und chronischer Entzündungen (Saito und Chihara, 2001). Es beeinflusst die Signalweiterleitung und die Regulation der Zellaktivität (Reale et al., 2001). Gleichzeitig ist dies von T-Lymphozyten und Fibroblasten sowie nach Stimulation mit Abriebpartikeln von Makrophagen exprimierte und sekretierte Protein ein Chemoattraktant für Monozyten (Appay und Rowland-Jones, 2001). Eine Beeinflussung der osteoklastären Resorptionsaktivität durch RANTES konnte nicht gezeigt werden (Fuller et al., 1995). Es ist bekannt, dass Monozyten während der Wundheilung oder spontan in Fibroblasten transformiert werden (Krupp, 1976; Labat et al., 1994). Einen vergleichbaren Prozess könnte die aseptische Prothesenlockerung darstellen, so dass sowohl RANTES als auch MCP-1 den aseptischen Lockerungsprozess fördern, in dem sie durch die Rekrutierung von monozytären Zellen zu einer Verdickung der fibrösen Interfacemembran und damit zu einer zunehmend schlechter werdenden Verankerung der Hüftprothese beitragen. Der dadurch gesteigerte Partikelabrieb stimuliert dann wiederum die in der Membran

lokalisierten Fibroblasten und Makrophagen zur Synthese von MCP-1 und RANTES. Gleichzeitig wirken die von den Fibroblasten aufgenommenen Abriebpartikel und Hydroxyapatitekristalle als Mitogen und tragen zu ihrer Proliferation bei (Evans et al., 1984; Frondoza et al., 1993; Shanbhag et al., 1997).

IL-10 besitzt anti-inflammatorische und immunoregulierende Eigenschaften und wird u.a. von T- und B-Lymphozyten sowie von Makrophagen und Monozyten synthetisiert (Spits und de Waal Malefyt, 1992). Darüber hinaus inhibiert IL-10 die Differenzierung sowohl von Makrophagen als auch von Osteoklasten und Osteoblasten (Owens et al., 1996). Gleichzeitig lenkt IL-10 die Differenzierung von mesenchymalen Knochenmarkszellen weg von knochenbildenden hin zu blutbildenden Zellen (Van Vlasselaer et al., 1995). Daraus lassen sich für die Integrität des Implantat/Knochen Gefüges im wesentlichen zwei Folgen ableiten: Das Anwachsen der Prothese wird ebenso wie die Aufrechterhaltung einer festen Prothesenverankerung durch ein gestörtes Remodellinggleichgewicht gefährdet. Hinzu kommt ein mögliches Zurückweichen des Knochens von der Implantatoberfläche durch die vermehrte Entstehung blutbildenden Gewebes. Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 keinen direkten Effekt auf die Resorptionsaktivität reifer, ausdifferenzierter Osteoklasten hat (Owens et al., 1996). Die dennoch nachgewiesene Beeinträchtigung der osteoklastären Funktion erfolgt indirekt über die durch IL-10 gesteigerte Synthese des die Knochenresorption inhibierenden NO (Sunyer et al., 1996).

Calgranulin A (CALA, MRP 8) und Calgranulin B (CAGB, MRP 14, L1, Calprotectin) sind Calcium- und Zink-bindende Proteinkomplexe, die von der Mehrzahl der reifen Lymphozyten, den Knochenmarkszellen, von Makrophagen und epithelialen Zellen synthetisiert werden (Hubbe et al., 1993). Extrazelluläres Calgranulin B inhibiert das Zellwachstum und induziert bei verschiedenen Zelltypen, darunter auch die den Hauptteil der Interfacemembran bildenden Fibroblasten, Apoptose, was der Auslöser für eine Gewebeerstörung sein kann (Mikami et al., 1999). Damit könnte eine vermehrte Calgranulin Synthese neben einer übermäßigen Anreicherung des Partikelabriebs eine weitere Ursache für die beobachteten lokalen Nekrosen im Interfacemembrangewebe sein. Im Gegensatz zu den bisher beschriebenen Zytokinen, wurde Thymosin beta 10 (THYB10) bislang weder auf Protein- noch auf genetischer Ebene in der Interfacemembran gelockerter Endoprothesen nachgewiesen. Dies 5 kDa große Peptid wird von vielen Zelltypen synthetisiert und ist der größte intrazelluläre G-Aktin Puffer. Es bindet Aktinmonomere in einem 1:1 Komplex und verhindert so deren Polymerisation. Aus diesem Aktinspeicher können von der Zelle im Bedarfsfall Aktinmonomere für die

Synthese von Aktinfilamenten mobilisiert werden. Dabei besteht ein Zusammenhang zwischen einer gesteigerten Expression von Beta-Thymosinen und der Differenzierung sowie der Beweglichkeit von Zellen (Huff et al., 2001). In Osteoklasten bilden Aktinmonomere in der sealing zone einen Aktinring und ermöglichen es den Zellen so in einem von der Umgebung abgeschirmten Kompartiment die Knochenresorption begünstigende Bedingungen zu schaffen. Die vermehrte Synthese des THYB10 könnte somit über die mangelnde Verfügbarkeit von Aktinmonomeren die Ausbildung einer sealing zone verhindern und damit die osteoklastäre Knochenresorption inhibieren. Hinzu kommt, dass Osteoklasten ihre Resorptionsaktivität nur entfalten können, wenn sie in einem vorübergehenden Stadium der Immobilität verharren (Ali et al., 1984). Eine Erhöhung der zellulären Beweglichkeit durch THYB10 könnte somit ebenfalls inhibierende Auswirkungen auf die Knochenresorption haben.

Eine Überexpression der in Säugetierzellen am häufigsten vorkommenden Isoformen der Beta-Thymosine (THYB4, THYB10) verringert die Anzahl der focal adhesions, verbessert die Fähigkeit von Makrophagen, Antigene zu präsentieren und erhöht die Empfindlichkeit von Fibroblasten, in Apoptose zu gehen (Tzevalou et al., 1989; Yu et al., 1994; Hall, 1995). Makrophagen sind in der Lage, die freigesetzten Abriebpartikel zu phagozytieren, die teilweise an ihnen haftenden Proteine zu prozessieren und Teile von ihnen als Antigene zu präsentieren (Tang et al., 1996; Wooley et al., 1999). Eine Verbesserung dieser Fähigkeit könnte eine Beschleunigung der entzündlichen Reaktionen in der Interfacemembran bewirken und damit den Lockerungsprozess begünstigen. Auch die durch THYB10 in ihrer Apoptoseempfindlichkeit veränderten Fibroblasten könnten durch das vermehrte Auftreten herdförmiger Nekrosen zur Instabilität des Knochen/Implantat Gefüges beitragen. Extrazellulär induziert es die Synthese von Metalloproteinasen, wirkt chemotaktisch, fördert die Bildung von Blutgefäßen und inhibiert die Proliferation von Stammzellen des Knochenmarks (Huff et al., 2001). Metalloproteinasen sind direkt an der osteoklastären Resorption beteiligt, so dass ihre vermehrte Synthese die Osteolyse des die Prothese umgebenden Knochens begünstigt. Darüber hinaus führt die vermehrte Aktivität von Metalloproteinasen über die chemotaktische Wirkung der dabei entstehenden Abbauprodukte des Kollagens und der Knochenmatrix zu einer Akkumulation von Monozyten und Makrophagen sowie einer Aktivierung von Fibroblasten in der Interfacemembran (Takagi et al., 1998; Yang und Liu, 1998). Die Vaskularisierung der Interfacemembran ist eine der Voraussetzungen für ihr Wachstum und die Einwanderung von u.a. monozytären osteoklastären Vorläufer- und osteoblastären Zellen (Mohanty,

1996). Somit kann eine durch THYB10 induzierte verstärkte Einspritzung von Blutgefäßen in die Interfacemembran als Zeichen für ihre geänderte Zellaktivität und damit einer drohenden Prothesenlockerung gedeutet werden. Eine Verringerung der Proliferation der Stammzellen des Knochenmarks beeinflusst über die Anzahl der vorhandenen Vorläuferzellen auch Anzahl der BMUs und damit das Remodellinggleichgewicht. Die Bedeutung dieser Wirkung des THYB10 für den Prozess der aseptischen Prothesenlockerung hinge dann von der Art der betroffenen Stammzellen ab.

Das Teratocarcinoma Derived Growth Factor-1 (TDGF-1, CRIPTO) Gen codiert für ein 188 Aminosäure großes, membrangebundenes 36 kDa Glykoprotein, das strukturelle Homologien mit der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren besitzt (Baldassarre et al., 1997). Die Überexpression dieses in der frühen Entwicklung von Vertebraten essentiellen Faktors bewirkt in Fibroblasten ein vermehrtes Wachstum (Kintner und Hosick, 1998). Fibroblasten bilden den Hauptbestandteil der Interfacemembran, so dass die Zunahme ihrer Anzahl eine Grundvoraussetzung für ihr im Zusammenhang mit dem aseptischen Lockerungsprozess stehenden Wachstum ist.

Der Tumor Nekrose Faktor Rezeptor 2 (TNFR2) ist ein 70 kDa Protein, das mit dem TNFR1 über die Bindung des TNFs bei der Abtötung von nicht-lympoiden Zellen kooperiert (Beltinger et al., 1996). Darüber hinaus wird über diesen hauptsächlich von Zellen des Immunsystems und von epithelialen Zellen synthetisierten, signalweiterleitenden Rezeptor eine stimulierende Wirkung auf die Proliferation von Fibroblasten vermittelt (Kalb et al., 1996). Dadurch könnte TNFR2 indirekt über eine gesteigerte Bindung des TNFs an der Verdickung der Interfacemembran und damit am Prozess der aseptischen Lockerung beteiligt sein. Eine Blockierung dieses Rezeptors mit spezifischen Antikörpern verursacht eine Inhibition der Osteoklastogenese, was auf seine Bedeutung bei der Kontrolle von Resorptionsvorgängen hindeutet.

Das Wissen über den Ribonuclease/Angiogenin Inhibitor (RAI) bezüglich seiner physiologischen Funktionen ist größtenteils noch unerschlossen. Eine Beteiligung dieses Leuzin-reichen Proteins an hoch-spezifischen Protein-Protein Interaktionen wird ebenso angenommen wie seine Beteiligung an der Blutkoagulation, an der Embryonalentwicklung, an der Zellmorphogenese und an der Signaltransduktion (Schneider et al., 1988). Sicher scheint nur seine Wirkung als Inhibitor der Ribonucleaseaktivität und damit seine essentielle Bedeutung bei der Kontrolle der mRNA Degradation und der Genexpression (Zneimer et al., 1990). Weitere Aussagen über zum Beispiel die Gen-, Zell- und/oder Gewebespezifität des RAI und seiner Wirkung lassen sich beim gegenwärtigen

Wissenstand nicht machen, so dass seine mögliche Beteiligung am aseptischen Lockerungsprozess nicht abgeschätzt werden kann.

Die Tatsache, dass gut 30 % der im Vergleich zum Referenzgewebe überexprimierten Zytokingene (RANTES, IL-10, TNFR2) nachweislich eine inhibierende Wirkung auf die Osteoklastogenese und/oder direkt auf die osteoklastäre Resorptionsaktivität besitzen, relativiert die Bedeutung der osteoklastären Resorption in der untersuchten Lockerungsphase. Im Gegensatz dazu scheinen Makrophagen und Fibroblasten als Zielzellen und als Produzenten eines Großteils dieser Zytokine (RANTES, MCP-1, IL-10, THYB10, Calgranulin, TDGF1, TNFR2) stärker in den Lockerungsprozess involviert zu sein (Abb. 33). Diese Schlussfolgerung wird von Veröffentlichungen bestätigt, die unter Kulturbedingungen in Abwesenheit von Osteoklasten eine Resorptionsaktivität von Fibroblasten nachweisen konnten (Pap et al., 1999; Pap et al., 2000).

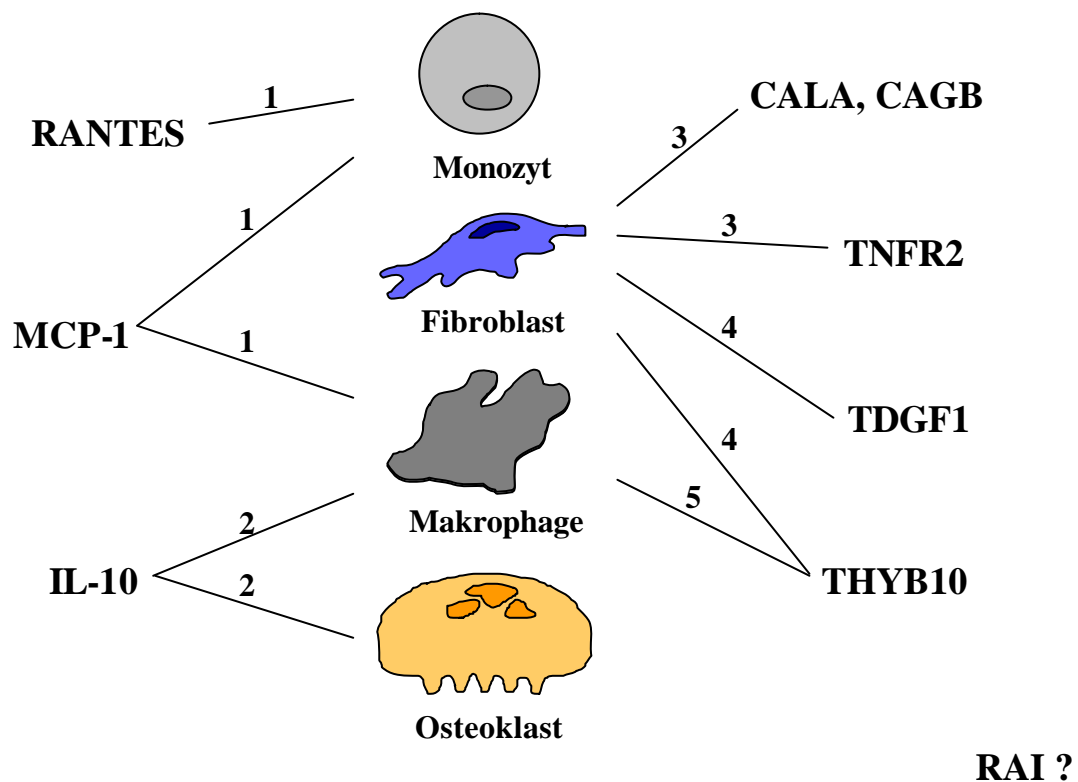


Abb. 33: Wirkungen der untersuchten Zytokine auf verschiedene Zelltypen

- 1 – Chemoattraktant
- 2 – Inhibition der Differenzierung
- 3 – Induktion der Apoptose
- 4 – Induktion der Proliferation
- 5 – Verbesserung der Antigenpräsentation

5. Ausblick

Durch die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung der Resorptionslakunen im spongiosen, humanen Hüftkopfknochens konnte gezeigt werden, dass durch osteoklastäre Aktivität zwei morphologisch unterscheidbare Typen von Resorptionslakunen und Perforationen existieren. Eine Ausweitung dieser Untersuchungsmethode auf andere Knochenlokalisationen wie dem Beckenkamm oder dem Wirbelkörper könnte klären, ob diese Einteilung der Resorptionslakunen und Perforationen nur für die Spongiosa des Hüftkopfes gilt oder im gesamten Skelett angewendet werden kann. Sollte dies der Fall sein, könnte in Zellkulturexperimenten wie zum Beispiel dem Pit-Assay der Frage nachgegangen werden, ob die Unterschiede in der Morphologie von Resorptionslakunen und Perforationen durch verschiedene Osteoklastenarten, verschiedene Funktionszustände der Osteoklasten oder aber durch Unterschiede in der Knochenzusammensetzung erklärt werden können. Darüber hinaus wäre ein Vergleich dieser in skelettgesunden Patienten gefundenen Resorptionslakunen- und Perforationsmorphologie mit der bei unter metabolischen Osteopathien leidenden Patienten wünschenswert. Ein möglicher charakteristischer Unterschied könnte bei der Früherkennung oder der Diagnose dieser Skeletterkrankungen behilflich sein.

Neben der Morphologie wurde in der vorliegenden Studie auch die Lokalisierung von Resorptionslakunen in der Spongiosa des Hüftkopfes untersucht. Eine Weiterführung dieser Untersuchung bei Patienten mit einer Schenkelhals- oder Wirbelkörperfraktur könnte eine Korrelation der Lokalisierung von Resorptionslakunen mit diesen beiden pathologischen Ereignissen ermöglichen. Dadurch könnten weitere Erkenntnisse zur Früherkennung eines möglichen lokalen Frakturrisikos gewonnen werden.

Die Methode der cDNA Arrays ermöglicht die Erstellung eines Expressionsprofils der am Prozess der aseptischen Lockerung beteiligten Zytokine. Vier der neun in dem die Endoprothese umgebenden Interfacemembrangewebe überexprimierten Zytokingene wurden in der vorliegenden Studie zum ersten Mal im Zusammenhang mit dem aseptischen Lockerungsprozess nachgewiesen. Das Ziel von weiteren Untersuchungen sollte die Aufklärung der Bedeutung dieser Zytokine für die aseptische Prothesenlockerung sein. In Zellkulturexperimenten könnte ihre Wirkung auf die Differenzierung und Aktivität von in der Interfacemembran nachgewiesenen Fibroblasten, Makrophagen, Osteoklasten, Osteoblasten und Lymphozyten analysiert werden.

6. Zusammenfassung

Licht- und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen

Die Stabilität des spongiösen Knochens wird, anders als beim kortikalen Knochen, weniger von der Knochenmasse als vielmehr von seiner Mikroarchitektur bestimmt. Dabei unterliegt die Anordnung der spongiösen Platten und Stäbe alters- und belastungsspezifischen Veränderungen, die durch Modelling- und Remodellingprozesse herbeigeführt werden. An diesen Umbauvorgängen maßgeblich beteiligt sind Osteoklasten, die als knochenresorbierende Zellen deutliche Spuren ihrer Abbauprodukte auf der Knochenoberfläche in Form von Resorptionslakunen und Perforationen hinterlassen. Diese Resorptionslakunen bestehen aus einzelnen Resorptionspits, deren Ausdehnung, Tiefe, Form und Anordnung innerhalb einer Resorptionslakune die Grundlagen für ihre Einteilung in verschiedene Resorptionstypen bilden.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass sich longitudinale Resorptionslakunen (LR) von flächigen Resorptionslakunen (FR) unterscheiden lassen. Longitudinale Resorptionslakunen besitzen eine längliche Form und bestehen aus einzelnen ebenfalls länglichen Resorptionspits, die parallel zueinander angeordnet sind. Diese Resorptionslakunen erstrecken sich entlang der ebenfalls parallel angeordneten Kollagenfasern der angrenzenden Knochenoberfläche. Der flächige Typ von Resorptionslakune lässt keine geordnete Anordnung seiner vielgestaltigen Resorptionspits erkennen. Die angrenzenden Kollagenfasern der Knochenoberfläche erscheinen ungeordnet. Beide Typen von Resorptionslakunen können aus unterschiedlich und/oder einheitlich tiefen Pits unterschiedlicher Ausdehnung bestehen.

Die lokale Akkumulation von Resorptionslakunen ist ursächlich an der Entstehung von Perforationen beteiligt. Dieser irreparable Knochenverlust führt durch die Entkopplung der osteoklastären Knochenabbauaktivität von der osteoblastären Knochenaufbauaktivität neben dem Knochenmasse- auch zu einem Strukturverlust.

Die von Resorptionslakunen begrenzten Perforationen zeigen ebenso wie diese morphologische Unterschiede, die ihre Typisierung ermöglichen. Neben der Lage der Perforation innerhalb des Feldes aus Resorptionslakunen war auch ihre Tiefe entscheidend für diese Einteilung. Der lakunäre Typ von Perforation (LP) zeichnet sich durch seine zentrale Lage in einem flachen, trichterförmig zulaufenden Feld von meist flächigen Resorptionslakunen aus. Die Begrenzung dieser Perforation ist dünnwandig. Im Gegensatz dazu bildet die tunnellernde Perforation (TP) die Eintrittsöffnung für einen diagonal verlaufenden Tunnel, dessen Wandungen mit Resorptionslakunen bedeckt sind. Als

mögliche Vorstufe dieses Perforationstyps können Resorptionslakunen angenommen werden, deren Pittiefe graduell zunimmt. Eine charakteristische Lage dieses Perforationstyps in einem Feld aus flächigen Resorptionslakunen konnte nicht bestimmt werden.

Von diesen beiden Perforationstypen mit bis an ihren Rand heranreichenden Resorptionslakunen konnten von zirkulär angeordneten longitudinalen Resorptionslakunen umgebende Durchtritte in spongiösen Platten unterschieden werden.

Die rasterelektronenmikroskopische Quantifizierung der Resorptionslakunen ergab bei Männern und Frauen in den unterschiedenen Altersklassen vergleichbare Resorptionslakunenanteile. Nach einem deutlichen Anstieg des Resorptionlakunenanteils in der fünften Lebensdekade divergiert dieser geschlechtsspezifisch mit zunehmendem Alter. Diese Ergebnisse konnten in histomorphometrischen Untersuchungen weitgehend bestätigt werden.

Neben der Quantität ist die Lokalisierung der Resorptionslakunen auf der Knochenoberfläche für die Stabilität der betroffenen Struktur von entscheidender Bedeutung. Die Einteilung der spongiösen Stäbe in einen Zentral-, einen ihre breitere Basis umfassenden Übergangs- und einen beide zuvor genannten Lokalisationen vereinenden Zentral-/Übergangsbereich ergab eine geschlechtsspezifische Verteilung der Resorptionslakunen. Bei den Knochenproben der untersuchten Männer konnten der höchste Resorptionslakunenanteil im Übergangsbereich der spongiösen Stäbe nachgewiesen werden, während sich bei den Knochenproben der Frauen die meisten Resorptionslakunen über beide unterschiedenen Bereiche der spongiösen Stäbe erstreckten. Besonders in der fünften Lebensdekade wird deutlich, dass trotz annähernd gleicher Quantitäten die Resorptionslakunenanteile zwischen den bei spongiösen Stäben und Platten unterschiedenen Lokalisationen geschlechtsspezifisch verteilt sind. Der Anteil der FR lag in allen Bereichen über dem der LR.

Molekularbiologische Untersuchungen

Die aseptische Lockerung von Hüftendoprothesen ist die häufigste Ursache für die dann unerlässliche Wechseloperation. Dabei kommt der Osteolyse im Bereich des an die Prothese angrenzenden Knochens in der Kaskade beteiligter biologischer Prozesse eine zentrale Rolle zu. Die Aktivierung der am Lockerungsprozess involvierten Zellen erfolgt u.a. über Zytokine. In der vorliegenden Studie wurde das die gelockerte Hüftendoprothese umgebende Interfacemembrangewebe erstmals mit der Methode der cDNA Arrays auf das

Expressionsprofil einer Auswahl von Zytokingenen analysiert. Es konnte bei neun Zytokingenen eine gegenüber dem als Referenz verwendeten Muskelgewebe erhöhte Expression detektiert und mit Hilfe der Real-Time PCR verifiziert werden. Vier dieser Zytokingene werden in der vorliegenden Studie zum ersten Mal in den Zusammenhang mit der aseptischen Lockerung von Hüftendoprothesen gebracht. Sie weisen auf die Bedeutung des Wachstums der Interfacemembran für den Lockerungsprozess hin.

7. Literaturverzeichnis

- Aarden, E. M., E. H. Burger, et al. (1994). "Function of osteocytes in bone." J Cell Biochem **55**(3): 287-99.
- Aaron, J. E., N. B. Makins, et al. (1987). "The microanatomy of trabecular bone loss in normal aging men and women." Clin Orthop(215): 260-271.
- Abe, K., K. Ohno, et al. (1990). "Morphological relationships between osteoclasts and bone resorption surfaces on mouse parietal bones." Arch Histol Cytol **53**(1): 95-102.
- Al Saffar, N. und P. A. Revell (1994). "Interleukin-1 production by activated macrophages surrounding loosened orthopaedic implants: a potential role in osteolysis." Br J Rheumatol **33**(4): 309-316.
- Ali, N. N., A. Boyde, et al. (1984). "Motility and resorption: osteoclastic activity in vitro." Anat Embryol **170**(1): 51-56.
- Al-Saffar, N., H. A. Khwaja, et al. (1996). "Assessment of the role of GM-CSF in the cellular transformation and the development of erosive lesions around orthopaedic implants." Am J Clin Pathol **105**(5): 628-639.
- Altschul, S. F., T. L. Madden, et al. (1997). "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Res **25**(17): 3389-3402.
- Amling, M. und G. Delling (1996). "Cell biology of the osteoclast and molecular mechanisms of bone resorption." Pathologe **17**: 358-367.
- Anderson, T. F. (1951). "Techniques for the preservation of three-dimensional structure in preparing specimens for the electron microscope." Trans. N.Y. Acad. Sci. **13**: 130-134.
- Appay, V. und S. L. Rowland-Jones (2001). "RANTES: a versatile and controversial chemokine." Trends-Immunol. **22**(2): 83-87.
- Arnold, J. S., M. H. Bartley, et al. (1966). "Skeletal changes in aging and disease." Clin Orthop **49**: 17-38.
- Ascenzi, M. G. (1999). "A first estimation of prestress in so-called circularly fibered osteonic lamellae." J Biomech **32**(9): 935-942.
- Baldassarre, G., A. Romano, et al. (1997). "Expression of teratocarcinoma-derived growth factor-1 (TDGF-1) in testis germ cell tumors and its effects on growth and differentiation of embryonal carcinoma cell line NTERA2/D1." Oncogene **15**(8): 927-936.
- Ballanti, P., E. Bonucci, et al. (1990). "Bone histomorphometric reference values in 88 normal Italian subjects." Bone Miner **11**(2): 187-197.
- Bartl, R. (2001). Osteoporose - besser verstehen. In: Osteoporose: Prävention - Diagnostik - Therapie. Reiner Bartl. Stuttgart - New York. Thieme. **1**: 8
- Bell, G. H., O. Dunbar, et al. (1967). "Variations in strength of vertebrae with age and their relation to osteoporosis." Calcif Tissue Res **1**(1): 75-86.
- Benson, D. A., I. Karsch-Mizrachi, et al. (2000). "GenBank." Nucleic Acids Res **28**(1): 15-28.
- Bentolila, V., T. M. Boyce, et al. (1998). "Intracortical remodeling in adult rat long bones after fatigue loading." Bone **23**(3): 275-281.
- Beltinger, C. P., P. S. White, et al. (1996). "Physical mapping and genomic structure of the human TNFR2 gene." Genomics **35**(1): 94-100.
- Birnboim, H. C. und J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.

- Blaine, T. A., R. N. Rosier, et al. (1996). "Increased levels of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 protein and messenger RNA in human peripheral blood monocytes due to titanium particles." J Bone Joint Surg Am **78**(8): 1181-1192.
- Blair, H. (1998). "How the osteoclast degrades bone." Bioessays **20**(10): 837-846.
- Blanchard, A. (1998). "Synthetic DNA arrays." Genet Eng **20**: 111-123.
- Bonucci, E., P. Ballanti, et al. (1990). "Technical variability of bone histomorphometric measurements." Bone Miner **11**(2): 177-186.
- Bourne, R. B. und C. H. Rorabeck (1999). "Assessing the outcomes: what really works?" Orthopedics **22**(9): 823-825.
- Boutin, P. (2000). "Total hip arthroplasty using a ceramic prosthesis. Pierre Boutin (1924- 1989)." Clin Orthop(379): 3-11.
- Boyde, A., N. N. Ali, et al. (1984). "Resorption of dentine by isolated osteoclasts in vitro." Br Dent J **156**(6): 216-220.
- Boyde, A., J. C. Elliott, et al. (1993). "Stereology and histogram analysis of backscattered electron images: age changes in bone." Bone **14**(3): 205-210.
- Boyde, A. und S. Jones (1998). Aspects of anatomy and development of bone the nm, um, and mm hierarchy. Advances in Organ Biology, JAI Press Inc. **5A**: 3-44.
- Boyde, A. und S. J. Jones (1991). "Pitfalls in pit measurement." Calcif Tissue Int **49**(2): 65-70.
- Boyde, A. und S. J. Jones (1996). "Scanning electron microscopy of bone: instrument, specimen, and issues." Microsc Res Tech **33**(2): 92-120.
- Breusch SJ, D., K (1997). "Vacuum application of bone cement in total hip arthroplasty." Hip Int **7**(4): 137-152.
- Breusch SJ, R. T., Schneider U, Volkmann M, Ewerbeck V, Lukoschek M (2000). "Zementierte Hüftendoprothetik: Verminderung des Fettembolierisikos in der zementierten Hüftendoprothetik mittels gepulster Druckspülung." Orthopäde **29**: 578-586.
- Breusch SJ, S. U., Kreutzer J, Ewerbeck V, Lukoschek M (2000a). "Einfluß der Zementiertechnik auf das Zementiererergebnis am koxalen Femurende." Orthopäde **29**: 260-270.
- Brockstedt, H., M. Kassem, et al. (1993). "Age- and sex-related changes in iliac cortical bone mass and remodeling." Bone **14**(4): 681-691.
- Bulow, J. U., G. Scheller, et al. (1996). "Uncemented total hip replacement and thigh pain." Int Orthop **20**(2): 65-69.
- Burger, E. H., J. Klein-Nulend, et al. (1995). "Function of osteocytes in bone--their role in mechanotransduction." J Nutr **125**(7 Suppl): 2020S-2023S.
- Burr, D. B., R. B. Martin, et al. (1985). "Bone remodeling in response to in vivo fatigue microdamage." J Biomech **18**(3): 189-200.
- Chai, B., X. Tang, et al. (1996). "A scanning electron microscopic study of trabeculae in osteoporotic femoral head." Chin Med J (Engl) **109**(5): 399-403.
- Chan, G. K. und G. Duque (2002). "Age-related bone loss: old bone, new facts." Gerontology **48**(2): 62-71.
- Charnley, J. (1970). "The reaction of bone to self-curing acrylic cement. A long-term histological study in man." J Bone Joint Surg Br **52**(2): 340-353.

- Chomczynski, P. und N. Sacchi (1987). "Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction." Anal Biochem **162**(1): 156-159.
- Christiansen, P. (2001). "The skeleton in primary hyperparathyroidism: a review focusing on bone remodeling, structure, mass, and fracture." APMIS Suppl **102**: 1-52.
- Clarke, B. L., P. R. Ebeling, et al. (1996). "Changes in quantitative bone histomorphometry in aging healthy men." J Clin Endocrinol Metab **81**(6): 2264-2270.
- Cowin, S. C., L. Moss-Salentijn, et al. (1991). "Candidates for the mechanosensory system in bone." J Biomech Eng **113**(2): 191-197.
- Croucher, P. I., N. J. Garrahan, et al. (1991). "Age-related changes in resorption cavity characteristics in human trabecular bone." Osteoporos Int **1**(4): 257-261.
- Cuida, M., J. G. Brun, et al. (1996). "Immunohistochemical characterization of the cellular infiltrates in Sjogren's syndrome, rheumatoid arthritis and osteoarthritis with special reference to calprotectin-producing cells." Apmis **104**(12): 881-890.
- Davies, J. P., G. Singer, et al. (1992). "The effect of a thin coating of polymethylmethacrylate on the torsional fatigue strength of the cement-metal interface." J Appl Biomater **3**(1): 45-49.
- De Vernejoul, M. C., D. Kuntz, et al. (1981). "Bone histomorphometric reproducibility in normal patients." Calcif Tissue Int **33**(4): 369-374.
- Delling, G. (1972). "Über eine vereinfachte Methakrylateinbettung für unentkalkte Knochenschnitte." Beitr. Path **145**: 100-105.
- Delling, G. (1989). "Neuere Vorstellungen zu Bau und Struktur der menschlichen Spongiosa-Ergebnisse einer kombinierten zwei- und dreidimensionalen Analyse." Z. gesamte inn. Med **44**(18): 536-540.
- Delling, G., M. Amling, et al. (1991). "Morphologische Mechanismen für die Regulation der Knochenstruktur." Nieren- und Hochdruckkrankheiten **6**: 255-261.
- Delling, G. und A. Schulz (1973). "[Proceedings: Relationship between bone cell "activity" and loss of bone substance due to age]." Verh Dtsch Ges Pathol **57**(391): 391.
- Delling, G., M. Vogel, et al. (1988). Trabecular bone structure in the human spine results of a new 2- and 3-dimensional analysis. Bone Morphometry. H. Takahashi. Niigata, Japan, Nishimura Co., Ltd.: 256-259.
- Dempster, D. W. (2000). "The contribution of trabecular architecture to cancellous bone quality." J Bone Miner Res **15**(1): 20-23.
- DiGiovanni, C. W., K. L. Garvin, et al. (1999). "Femoral preparation in cemented total hip arthroplasty: reaming or broaching?" J Am Acad Orthop Surg **7**(6): 349-357.
- Ding, M. und I. Hvid (2000). "Quantification of age-related changes in the structure model type and trabecular thickness of human tibial cancellous bone." Bone **26**(3): 291-295.
- Donath, K. (1987). "Die Trenn- Dünnschliff-Technik zur Herstellung histologischer Präparate von nicht schneidbaren Geweben und Materialien." Apparate- und Methodenbeschreibung: Exakt-Kuzler-Druckschrift. Norderstedt.
- Eastell, R., P. D. Delmas, et al. (1988). "Bone formation rate in older normal women: concurrent assessment with bone histomorphometry, calcium kinetics, and biochemical markers." J Clin Endocrinol Metab **67**(4): 741-748.

- Eriksen, E. F., L. Mosekilde, et al. (1985). "Trabecular bone resorption depth decreases with age: differences between normal males and females." Bone **6**(3): 141-146.
- Evans, F. G. (1976). "Mechanical properties and histology of cortical bone from younger and older men." Anat Rec **185**(1): 1-11.
- Evans, R. W., H. S. Cheung, et al. (1984). "Cultured human monocytes and fibroblasts solubilize calcium phosphate crystals." Calcif Tissue Int **36**(6): 645-650.
- Fazzalari, N. L., M. R. Forwood, et al. (1998). "Assessment of cancellous bone quality in severe osteoarthritis: bone mineral density, mechanics, and microdamage." Bone **22**(4): 381-388.
- Fazzalari, N. L., R. J. Moore, et al. (1989). "Comparative study of iliac crest and proximal femur histomorphometry in normal patients." J Clin Pathol **42**(7): 745-748.
- Fronzoza, C. G., K. T. Tanner, et al. (1993). "Polymethylmethacrylate particles enhance DNA and protein synthesis of human fibroblasts in vitro." J Biomed Mater Res **27**(5): 611-617.
- Fuchs, D., C. Zinman, et al. (1998). "[Characterization of the biological process of aseptic loosening of joint implants in orthopedics]." Harefuah **134**(6): 432-5, 504, 503.
- Fuller, K., J. M. Owens, et al. (1995). "Macrophage inflammatory protein-1 alpha and IL-8 stimulate the motility but suppress the resorption of isolated rat osteoclasts." J Immunol **154**(11): 6065-6072.
- Gay, C. und J. Weber (2000). "Regulation of differentiated osteoclasts." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **10**(3-4): 213-230.
- Goldner, J. (1938). "A modification of the Masson trichrom technique for routine laboratory purpose." Amer. J. Path **14**: 237-243.
- Goodman, S. B., P. Huie, et al. (1997). "Loosening and osteolysis of cemented joint arthroplasties. A biologic spectrum." Clin Orthop(337): 149-163.
- Goodman, S. B., G. Knoblich, et al. (1996). "Heterogeneity in cellular and cytokine profiles from multiple samples of tissue surrounding revised hip prostheses." J Biomed Mater Res **31**(3): 421-428.
- Greenfield, E., Y. Bi, et al. (1999). "Regulation of osteoclast activity." Life Science **11**: 1087-1102.
- Gross, U. M. und V. Strunz (1977). "Surface staining of sawed sections of undecalcified bone containing alloplastic implants." Stain Technol **52**(4): 217-219.
- Hahn, M., M. Vogel, et al. (1989). "Kombinierte zwei- und dreidimensionale Analyse der Wirbelsäule als Grundlage für das Verständnis endokriner Knochenmassenverlust-Syndrome." Quintessenz: S1-S32.
- Hall, A. K. (1995). "Thymosin beta-10 accelerates apoptosis." Cell Mol Biol Res **41**(3): 167-180.
- Han, Z. H., S. Palnitkar, et al. (1997). "Effects of ethnicity and age or menopause on the remodeling and turnover of iliac bone: implications for mechanisms of bone loss." J Bone Miner Res **12**(4): 498-508.
- Harris, W. H. (1991). "Aseptic loosening in total hip arthroplasty secondary to osteolysis induced by wear debris from titanium-alloy modular femoral heads." J Bone Joint Surg Am **73**(3): 470-472.
- Henning, A. (1958). "Kritische Betrachtungen zur Volumen- und Oberflächenmessung in der Mikroskopie." Mikroskopie **30**: 78-86.
- Hentunen, T., P. Harkonen, et al. (2000). "Carbonic anhydrases in calcified tissues." EXS **90**: 491-497.
- Hirano, T., C. H. Turner, et al. (2000). "Does suppression of bone turnover impair mechanical properties by allowing microdamage accumulation?" Bone **27**(1): 13-20.

- Hofbauer, L. C., S. Khosla, et al. (2000). "The roles of osteoprotegerin and osteoprotegerin ligand in the paracrine regulation of bone resorption." J Bone Miner Res **15**(1): 2-12.
- Holtrop, M. E. und G. J. King (1977). "The ultrastructure of the osteoclast and its functional implications." Clin Orthop(123): 177-196.
- Horowitz, S. M. und M. A. Purdon (1995). "Mechanisms of cellular recruitment in aseptic loosening of prosthetic joint implants." Calcif Tissue Int **57**(4): 301-305.
- Horowitz, S. M., B. P. Rapuano, et al. (1994). "The interaction of the macrophage and the osteoblast in the pathophysiology of aseptic loosening of joint replacements." Calcif Tissue Int **54**(4): 320-324.
- Hubbe, M., A. Kowitz, et al. (1993). "L1 adhesion molecule on mouse leukocytes: regulation and involvement in endothelial cell binding." Eur J Immunol **23**(11): 2927-2931.
- Huff, T., C. S. Muller, et al. (2001). "beta-Thymosins, small acidic peptides with multiple functions." Int J Biochem Cell Biol **33**(3): 205-220.
- Hughes, D. E., A. Dai, et al. (1996). "Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta." Nat Med **2**(10): 1132-1136.
- Huiskes, R. (2000). "If bone is the answer, then what is the question?" J Anat **197**(Pt 2): 145-156.
- Huiskes, R., R. Ruimerman, et al. (2000). "Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone." Nature **405**(6787): 704-706.
- Jasty, M., J. P. Davies, et al. (1990). "Porosity of various preparations of acrylic bone cements." Clin Orthop(259): 122-129.
- Jasty, M., D. D. Goetz, et al. (1997). "Wear of polyethylene acetabular components in total hip arthroplasty. An analysis of one hundred and twenty-eight components retrieved at autopsy or revision operations." J Bone Joint Surg Am **79**(3): 349-358.
- Jayasinghe, J. A., S. J. Jones, et al. (1993). "Scanning electron microscopy of human lumbar vertebral trabecular bone surfaces." Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol **422**(1): 25-34.
- Jones, S. und A. Boyde (1993). "Histomorphometry of Howship's lacunae formed in vivo and in vitro: Depths and volumes measured by scanning electron and confocal microscopy." Bone **14**(3): 455-460.
- Jones, S., A. Boyde, et al. (1985). "A review of bone cell and substratum interactions." Scanning **7**: 5-24.
- Jones, S. J. und A. Boyde (1994). "Questions of quality and quantity--a morphological view of bone biology." Kaibogaku Zasshi **69**(3): 229-243.
- Jones, S. J., A. Boyde, et al. (1984). "The resorption of biological and non-biological substrates by cultured avian and mammalian osteoclasts." Anat Embryol **170**(3): 247-256.
- Jones, S. J., A. Boyde, et al. (1986). "The interface of cells and their matrices in mineralized tissues: a review." Scan Electron Microsc (Pt4): 1555-1569.
- Kalb, A., H. Bluethmann, et al. (1996). "Tumor necrosis factor receptors (Tnfr) in mouse fibroblasts deficient in Tnfr1 or Tnfr2 are signaling competent and activate the mitogen-activated protein kinase pathway with differential kinetics." J Biol. Chem. **271**(45): 28097-28104.
- Kameda, T., H. Mano, et al. (1997). "Estrogen inhibits bone resorption by directly inducing apoptosis of the bone-resorbing osteoclasts." J Exp Med **186**(4): 489-495.
- Kanehisa, J. und J. N. Heersche (1988). "Osteoclastic bone resorption: in vitro analysis of the rate of resorption and migration of individual osteoclasts." Bone **9**(2): 73-79.

- Kelly, P. J., N. A. Pocock, et al. (1989). "Age and menopause-related changes in indices of bone turnover." J Clin Endocrinol Metab **69**(6): 1160-1165.
- Kingsmill, V. J. und A. Boyde (2001). "Collagen fiber orientation affects osteoclastic resorption." J Dent Res **80**(12): 2085-2088.
- Kintner, R. L. und H. L. Hosick (1998). "Reduction of Cripto-1 expression by a hammerhead-shaped RNA molecule results from inhibition of translation rather than mRNA cleavage." Biochem. Biophys. Res. Common **245**(3): 774-779.
- Kornak, U., D. Kasper, et al. (2001). "Loss of the ClC-7 chloride channel leads to osteopetrosis in mice and man." Cell **104**(2): 205-215.
- Kornak, U., A. Schulz, et al. (2000). "Mutations in the $\alpha 3$ subunit of the vacuolar H(+)-ATPase cause infantile malignant osteopetrosis." Hum Mol Genet **9**(13): 2059-2063.
- Kousteni, S., T. Bellido, et al. (2001). "Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity." Cell **104**(5): 719-730.
- Krupp, S. (1976). "[Transformation of monocytes into fibroblasts in wound healing (author's transl)]." Res Exp Med (Berl) **167**(2): 85-126.
- Labat, M. L., A. F. Binguier, et al. (1994). "Monocytic origin of fibrosis. In vitro transformation of HLA-DR monocytes into neo-fibroblasts: inhibitory effect of all-trans retinoic acid on this process." Biomed Pharmacother **48**(2): 103-111.
- Lanyon, L. und T. Skerry (2001). "Postmenopausal osteoporosis as a failure of bone's adaptation to functional loading: a hypothesis." J Bone Miner Res **16**(11): 1937-1947.
- Lassus, J., J. Salo, et al. (1998). "Macrophage activation results in bone resorption." Clin Orthop(352): 7-15.
- Lee, A. J. und R. S. Ling (1981). "Improved cementing techniques." Instr Course Lect **30**: 407-413.
- Linder, L., A. Carlsson, et al. (1988). "Clinical aspects of osseointegration in joint replacement. A histological study of titanium implants." J Bone Joint Surg Br **70**(4): 550-555.
- Malchau, H., Herberts, P. (1998). "Prognosis of total hip replacement; revision and re-revision rate in THR: A revision-risk study of 148`359 primary operations." Scientific Exhibition. 65rd AAOS Meeting. New Orleans, USA **1-16**.
- Malluche, H. H., W. Meyer, et al. (1982). "Quantitative bone histology in 84 normal American subjects. Micromorphometric analysis and evaluation of variance in iliac bone." Calcif Tissue Int **34**(5): 449-455.
- Maloney, W. J., J. O. Galante, et al. (1999). "Fixation, polyethylene wear, and pelvic osteolysis in primary total hip replacement." Clin Orthop(369): 157-164.
- Maloney, W. J., R. L. Smith, et al. (1995). "Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement." J Bone Joint Surg Am**77**(9): 1301-1310.
- Marchisio, P. C., D. Cirillo, et al. (1984). "Cell-substratum interaction of cultured avian osteoclasts is mediated by specific adhesion structures." J Cell Biol **99**(5): 1696-1705.
- Marie, P., F. Debais, et al. (2000). "New factors controlling bone remodelling." Joint Bone Spine **67**(3): 150-156.
- Martin, T. J. und K. W. Ng (1994). "Mechanisms by which cells of the osteoblast lineage control osteoclast formation and activity." J Cell Biochem **56**(3): 357-366.

- Mavrakos, T. und G. Vrotsos (1988). "[Osteoblasts. Morphology and biochemical activity]." Odontostomatol Proodos **42**(5): 351-356.
- McCaskie, A. W. und P. J. Gregg (1994). "Femoral cementing technique: current trends and future developments." J Bone Joint Surg Br **76**(2): 176-177.
- Melsen, F., T. Steiniche, et al. (1996). Bone remodeling and bone structure in osteoporosis. Osteoporosis: A guide to diagnosis and treatment. Rheumatolgy. H. Broell und M. Dambacher. Basel, Krager. **18**: 28-38.
- Merz, W. A. (1967). "Die Streckenmessung an gerichteten Strukturen im Mikroskop und ihre Anwendung zur Bestimmung von Oberflächen-Volumen-Relationen im Knochengewebe." Mikroskopie **22**: 132-142.
- Meunier, P., P. Courpron, et al. (1973). "Physiological senile involution and pathological rarefaction of bone. Quantitative and comparative histological data." Clin Endocrinol Metab **2**(2): 239-256.
- Mikami, M., M. Kitahara, et al. (1999). "Suppressive activity of lycoricidinol (narciclasine) against cytotoxicity of neutrophil-derived calprotectin, and its suppressive effect on rat adjuvant arthritis model." Biol Pharm Bull **22**(7): 674-678.
- Mohanty, M. (1996). "Cellular basis for failure of joint prosthesis." Biomed Mater Eng **6**(3): 165-172.
- Mori, S. und D. B. Burr (1993). "Increased intracortical remodeling following fatigue damage." Bone **14**(2): 103-109.
- Mori, S., R. Harruff, et al. (1997). "Trabecular bone volume and microdamage accumulation in the femoral heads of women with and without femoral neck fractures." Bone **21**(6): 521-526.
- Mori, S., S. Isa, et al. (1992). "Microcrack distribution in human femoral heads."
- Mosekilde, L. (1989). "Sex differences in age-related loss of vertebral trabecular bone mass and structure--biomechanical consequences." Bone **10**(6): 425-432.
- Mosekilde, L. (1990). "Consequences of the remodelling process for vertebral trabecular bone structure: A scanning electron microscopy study (uncoupling of unloaded structures)." Bone Miner **10**(1): 13-35.
- Mosekilde, L. (1993). "Normal age-related changes in bone mass, structure, and strength - consequences of the remodelling process." Dan Med Bull **40**(1): 65-83.
- Mosekilde, L. (2000). "Age-related changes in bone mass, structure, and strength--effects of loading." Z Rheumatol **59**(Suppl 1): 1-9.
- Myers, T. W. und Gelfand, D. H. (1991). "Reverse transcription and DNA amplification by a *Thermus thermophilus* DNA polymerase." Biochemistry **30**(31): 7661-7666.
- Nabae, M., K. Inoue, et al. (1999). "Gene expressions of antiinflammatory mediators in THR retrieved interfacial membranes." Acta Orthop Scand **70**(2): 149-154.
- Nakashima, Y., D. H. Sun, et al. (1999). "Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles." J Bone Joint Surg Br **81**(1): 155-162.
- Nesbitt, S. A. und Horton, M. A. (1997). "Trafficking of matrix collagens through bone-resorbing osteoclasts." Science **276**(5310): 266-269.
- Ohnsorge, J., Holm, R., (1970). "Die Spongiosafeinstruktur des Hüftkopfes im rasterelektronenmikroskopischen Bild." Arch orthop unfall chir **68**(1): 15-27.
- Olsen, B. R., A. M. Reginato, et al. (2000). "Bone development." Annu Rev Cell Dev Biol **16**: 191-220.

- Orwoll, E. S., J. K. Belknap, et al. (2001). "Gender specificity in the genetic determinants of peak bone mass." J Bone Miner Res **16**(11): 1962-1971.
- Ott, S. (1996). Theoretical and methodological approach. Principles of Bone Biology, Academic Press, Inc: 231-241.
- Owens, J. M., A. C. Gallagher, et al. (1996). "IL-10 modulates formation of osteoclasts in murine hemopoietic cultures." J Immunol **157**(2): 936-940.
- Palle, S., D. Chappard, et al. (1989). "Evaluation of the osteoclastic population in iliac crest biopsies from 36 normal subjects: a histoenzymologic and histomorphometric study." J Bone Miner Res **4**(4): 501-506.
- Pap, T., W. Aicher, et al. (1999). "Activated fibroblasts from the interface membrane around loose joint arthroplasties resorb bone in the absence of osteoclasts [abstract]." Arthritis Rheum **42**(Suppl 9): S1-S54.
- Pap, T., S. Otsu, et al. (2000). "Activated fibroblasts express an H⁺ ATPase and are capable of resorbing bone [abstract]." Ann Rheum Dis **59**(Suppl 1): 267.
- Parfitt, A., C. Mathews, et al. (1983). "Relationships between surface, volume, thickness of iliac trabecular bone in ages and in osteoporosis." J Clin Invest **72**: 1396-1409.
- Parfitt, A. M. (1984). "Age-related structural changes in trabecular and cortical bone: cellular mechanisms and biomechanical consequences." Calcif Tissue Int **36**(Suppl 1): S123-128.
- Parfitt, A. M. (1984a). "The cellular basis of bone remodeling: the quantum concept reexamined in light of recent advances in the cell biology of bone." Calcif Tissue Int **36**(Suppl 1): S37-45.
- Parfitt, A. M. (1987). "Trabecular bone architecture in the pathogenesis and prevention of fracture." Am J Med **82**(1B): 68-72.
- Parfitt, A. M., Z. H. Han, et al. (1997). "Effects of ethnicity and age or menopause on osteoblast function, bone mineralization, and osteoid accumulation in iliac bone." J Bone Miner Res **12**(11): 1864-1873.
- Parikka, V., P. Lehenkari, et al. (2001). "Estrogen reduces the depth of resorption pits by disturbing the organic bone matrix degradation activity of mature osteoclasts." Endocrinology **142**(12): 5371-5378.
- Pioletti, D. P., H. Takei, et al. (1999). "The cytotoxic effect of titanium particles phagocytosed by osteoblasts." J Biomed Mater Res **46**(3): 399-407.
- Piper, K., A. Boyde, et al. (1992). "The relationship between the number of nuclei of an osteoclast and its resorptive capability in vitro." Anat Embryol (Berl) **186**(4): 291-299.
- Reale, M., R. C. Barbacane, et al. (2001). "Differential expression and secretion of RANTES and MCP-1 in activated peripheral blood mononuclear cell cultures of atopic subjects." Imun Letters **76**(1): 7-14.
- Reddy, S. V. und G. D. Roodman (1998). "Control of osteoclast differentiation." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **8**(1): 1-17.
- Rehman, M. T., J. A. Hoyland, et al. (1994). "Age related histomorphometric changes in bone in normal British men and women." J Clin Pathol **47**(6): 529-534.
- Reid, S. A. (1986). "Effect of mineral content of human bone on in vitro resorption." Anat Embryol **174**(2): 225-234.
- Reid, S. A. und A. Boyde (1987). "Changes in the mineral density distribution in human bone with age: image analysis using backscattered electrons in the SEM." J Bone Miner Res **2**(1): 13-22.

- Revell, P. A. und S. E. Jellie (1998). "Interleukin 15 production by macrophages in the implant interface membrane of aseptically loosened joint replacements." J Mater Sci Mater Med **9**(12): 727-730.
- Saftig, P., E. Hunziker, et al. (2000). "Functions of cathepsin K in bone resorption. Lessons from cathepsin K deficient mice." Adv Exp Med Biol. **477**: 293-303.
- Saiki, R. K., S. Scharf, et al. (1985). "Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." Science **230**(4732): 1350-1354.
- Saito, N. und J. Chihara (2001). "Chemokine (RANTES, eotaxin, etc.)." Ja J Clin. Med. **59**(10): 1900-1905.
- Sasaki, T., K. Debari, et al. (1993). "Cytochalasin D reduces osteoclastic bone resorption by inhibiting development of ruffled border-clear zone complex." Calcif Tissue Int **53**(3): 217-221.
- Sauer, G. (1988). "[Long-term fixation of hip endoprostheses by coating with hydroxyapatite? An analysis of the literature]." Biomed Tech (Berl) **33**(12): 300-305.
- Schaffler, M. B., K. Choi, et al. (1995). "Aging and matrix microdamage accumulation in human compact bone." Bone **17**(6): 521-525.
- Schneider, R., E. Schneider-Scherzer, et al. (1988). "The primary structure of human ribonuclease/angiogenin inhibitor (RAI) discloses a novel highly diversified protein superfamily with a common repetitive module." Embo J **7**(13): 4151-4156.
- Schulz, A. und G. Delling (1976). Age related changes in bone resorption parameters in iliac crest trabecular bone. Proceedings of the first workshop on bone morphometry. Z. ZFG. Ottawa, University of Ottawa Press: 161-162.
- Shanbhag, A. S., J. J. Jacobs, et al. (1997). "Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro." Clin Orthop(342): 205-217.
- Sih, G. C., G. M. Connelly, et al. (1980). "The effect of thickness and pressure on the curing of PMMA bone cement for the total hip joint replacement." J Biomech **13**(4): 347-352.
- Silver, I. A., R. J. Murrills, et al. (1988). "Microelectrode studies on the acid microenvironment beneath adherent macrophages and osteoclasts." exp cell res **175**: 266-276.
- Smit, T. H. und E. H. Burger (2000). "Is BMU-coupling a strain-regulated phenomenon? A finite element analysis." J Bone Miner Res **15**(2): 301-307.
- Sommerfeldt, D. W. und C. T. Rubin (2001). "Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton." Eur Spine J **10**: S86-S95.
- Spits, H. und R. de Waal Malefyt (1992). "Functional characterization of human IL-10." Int Arch Allergy Immunol **99**(1): 8-15.
- Stea, S., M. Visentin, et al. (2000). "Apoptosis in peri-implant tissue." Biomaterials **21**(13): 1393-1398.
- Stea, S., M. Visentin, et al. (2000a). "Cytokines and osteolysis around total hip prostheses." Cytokine **12**(10): 1575-1579.
- Stea, S., M. Visentin, et al. (1999). "Wear debris and cytokine production in the interface membrane of loosened prostheses." J Biomater Sci Polym Ed **10**(2): 247-257.
- Studier, F. W. (1973). "Analysis of bacteriophage T7 early RNAs and proteins on slab gels." J Mol Biol **79**(2): 237-248.
- Suck, D. und C. Oefner (1986). "Structure of DNase I at 2.0 Å resolution suggests a mechanism for binding to and cutting DNA." Nature **321**(6070): 620-625.

- Suda, K., K. Abe, et al. (1999). "Changes in the orientation of collagen fibers on the superficial layer of the mouse tibial bone after denervation: scanning electron microscopic observations." Arch Histol Cytol **62**(3): 231-235.
- Suda, T., N. Takahashi, et al. (1992). "Modulation of osteoclast differentiation." Endocr Rev **13**(1): 66-80.
- Sunyer, T., L. Rothe, et al. (1996). "Proinflammatory agents, IL-8 and IL-10, upregulate inducible nitric oxide synthase expression and nitric oxide production in avian osteoclast-like cells." J Cell Biochem **60**(4): 469-483.
- Takagi, M., S. Santavirta, et al. (1998). "Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in loose artificial hip joints." Clin Orthop(352): 35-45.
- Takano, Y., C. H. Turner, et al. (1999). "Elastic anisotropy and collagen orientation of osteonal bone are dependent on the mechanical strain distribution." J Orthop Res **17**(1): 59-66.
- Tang, L., T. P. Ugarova, et al. (1996). "Molecular determinants of acute inflammatory responses to biomaterials." J Clin Invest **97**(5): 1329-1334.
- Tayyar, S., P. S. Weinhold, et al. (1999). "Computer simulation of trabecular remodeling using a simplified structural model." Bone **25**(6): 733-739.
- Teitelbaum, S., M. Tondravi, et al. (1997). "Osteoclasts, macrophages and teh molecular mechanisms of bone resorption." J Leukocyte Biology **61**: 381-388.
- Thomsen, L., L. Mosekilde, et al. (1994). "Stochastic simulation of vertebral trabecular bone remodeling." Bone(15): 6.
- Trindade, M. C., M. Lind, et al. (2001). "Interleukin-10 inhibits polymethylmethacrylate particle induced interleukin-6 and tumor necrosis factor-alpha release by human monocyte/macrophages in vitro." Biomaterials **22**(15): 2067-2073.
- Turner, C. H., A. Chandran, et al. (1995). "The anisotropy of osteonal bone and its ultrastructural implications." Bone **17**(1): 85-89.
- Tzehoval, E., M. B. Szein, et al. (1989). "Thymosins alpha 1 and beta 4 potentiate the antigen-presenting capacity of macrophages." Immunopharmacology **18**(2): 107-113.
- Ulrich, D., B. van Rietbergen, et al. (1999). "The ability of three-dimensional structural indices to reflect mechanical aspects of trabecular bone." Bone **25**(1): 55-60.
- Urban, R. M., J. J. Jacobs, et al. (2000). "Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement." J Bone Joint Surg Am**82**(4): 457-476.
- Van der Linden, J. C., J. Homminga, et al. (2001). "Mechanical consequences of bone loss in cancellous bone." J Bone Miner Res **16**(3): 457-465.
- Van der Linden, J. C., J. A. Verhaar, et al. (2001a). "A three-dimensional simulation of age-related remodeling in trabecular bone." J Bone Miner Res **16**(4): 688-696.
- Van Vlasselaer, P., N. Falla, et al. (1995). "Interleukin-10 stimulates hematopoiesis in murine osteogenic stroma." Clin Orthop(313): 103-114.
- Vashishth, D., J. Koontz, et al. (2000). "In vivo diffuse damage in human vertebral trabecular bone." Bone **26**(2): 147-152.
- Vedi, S., J. E. Compston, et al. (1982). "Histomorphometric analysis of bone biopsies from the iliac crest of normal British subjects." Metab Bone Dis Relat Res **4**(4): 231-236.

- Vidovszky, T. J., M. E. Cabanela, et al. (1998). "Histologic and biochemical differences between osteolytic and nonosteolytic membranes around femoral components of an uncemented total hip arthroplasty." J Arthroplasty **13**(3): 320-330.
- Vogel, M., M. Hahn, et al. (1993). "Relation between 2- and 3-dimensional architecture of trabecular bone in the human spine." Bone **14**(3): 199-203.
- Wenzel, T. E., M. B. Schaffler, et al. (1996). "In vivo trabecular microcracks in human vertebral bone." Bone **19**(2): 89-95.
- Willert, H. G. (1977). "Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses." J Biomed Mater Res **11**(2): 157-164.
- Willert, H. G., K. Mueller, et al. (1979). "The morphology of polymethylmethacrylate (PMMA) bone cement: surface structures and causes of their origin." Arch Orthop Trauma Surg **94**(4): 265-292.
- Willert, H. G., Puls, P. (1972). "Die Reaktion des Knochens auf Knochenzement bei der Alloarthroplastik der Hüfte." Arch Orthop. und Unfall-Chir. **72**: 33-71.
- Williams, V. G., 2nd, L. A. Whiteside, et al. (1997). "Fixation of ultrahigh-molecular-weight polyethylene liners to metal- backed acetabular cups." J Arthroplasty **12**(1): 25-31.
- Wolff, J. (1892). Das Gesetz der Transformation der Knochen. Berlin.
- Wooley, P. H., R. H. Fitzgerald, Jr., et al. (1999). "Proteins bound to polyethylene components in patients who have aseptic loosening after total joint arthroplasty. A preliminary report." J Bone Joint Surg Am **81**(5): 616-623.
- Xu, J. W., Y. T. Konttinen, et al. (1996). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) in loosening of total hip replacement (THR)." Clin Exp Rheumatol **14**(6): 643-648.
- Xu, J. W., Y. T. Konttinen, et al. (1998). "Production of platelet-derived growth factor in aseptic loosening of total hip replacement." Rheumatol Int **17**(6): 215-221.
- Xu, J. W., Y. T. Konttinen, et al. (1997). "Macrophage-colony stimulating factor (M-CSF) is increased in the synovial-like membrane of the periprosthetic tissues in the aseptic loosening of total hip replacement (THR)." Clin Rheumatol **16**(3): 243-248.
- Xu, J. W., T. F. Li, et al. (1998). "Interleukin-11 (IL-11) in aseptic loosening of total hip replacement (THR)." Scand J Rheumatol **27**(5): 363-367.
- Yang, R. S. und T. K. Liu (1998). "Immunohistochemical analysis of matrix proteolytic enzymes in the periprosthetic tissue in the patients with loosening prostheses." Tohoku J Exp Med **184**(2): 99-111.
- Yasuda, H., N. Shima, et al. (1998). "Identity of osteoclastogenesis inhibitory factor (OCIF) and osteoprotegerin (OPG): a mechanism by which OPG/OCIF inhibits osteoclastogenesis in vitro." Endocrinology **139**(3): 1329-1337.
- Yasuda, H., N. Shima, et al. (1998a). "Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(7): 3597-3602.
- Yu, F. X., S. C. Lin, et al. (1994). "Effects of thymosin beta 4 and thymosin beta 10 on actin structures in living cells." Cell Motil Cytoskeleton **27**(1): 13-25.
- Zaidi, M., O. A. Adebajo, et al. (1999). "Emerging insights into the role of calcium ions in osteoclast regulation." J Bone Miner Res **14**(5): 669-674.

- Zaidi, M., B. S. Moonga, et al. (1999a). "Novel mechanisms of calcium handling by the osteoclast: a review-hypthesis." Proc Assoc Am Physicians **111**: 319-327.
- Zamboni Zallone, A., A. Teti, et al. (1984). "Resorption of vital or devitalized bone by isolated osteoclasts in vitro. The role of lining cells." Cell Tissue Res **235**(3): 561-564.
- Zhioua, A., M. Hamdoun, et al. (1994). "Bone histomorphometry in 50 normal Tunisian subjects." Clin Rheumatol **13**(4): 581-585.
- Zneimer, S., D. Crawford, et al. (1990). "Mapping of the human ribonuclease inhibitor gene (RNH) to chromosome 11p15 by in situ hybridization." Genomics **8**(1): 175-178.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei Prof. G. Delling für die Möglichkeit bedanken, dies interessante und vielfältige Thema in seiner Arbeitteilung bearbeiten zu dürfen. Ebenso möchte ich mich bei Prof. Renwantz für die Betreuung meiner Arbeit bedanken. Darüber hinaus gilt mein Dank all denjenigen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Herrn Dr. Werner und Herrn Dr. Junge danke ich für die Unterstützung bezüglich der statistischen Auswertung meiner Ergebnisse. Doch auch den mit mir an Teilprojekten der vorliegenden Dissertation arbeitenden Wissenschaftlern wie Herrn Dr. Möller, Herrn Dr. Püschel, Herrn Dr. Leuenberger, Herrn Dr. Plutat, Herrn Dr. Sellkau, Herrn Dr. Wodtke, Herrn Dr. Marotzki sowie Frau Nina Schultz gilt mein Dank. Besonders hervorheben möchte ich in diesem Zusammenhang die vielen anregenden und sehr konstruktiven Diskussionen mit Frau Dr. Edelgard Kaiser, die mir jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand. Den übrigen Mitarbeitern des Zentrums für Biomechanik („Zentrum B.“), Frau Andrea Schröder, Frau Dr. Manuela Wülling, Frau Ulrike Larsen sowie Herrn Dr. Michael Hahn danke ich ebenso wie Herrn Dr. Clemens Engels und Herrn Dr. Konstantin Pollandt für ihre häufig tatkräftige sowie geistige Unterstützung, viele weitschweifende und phantasievolle Gespräche, den hilfreichen Beistand an „schlechten Tagen“ und die stets nette Arbeitsatmosphäre. Darüber hinaus bin ich Frau Regina Deiwick für die zuvorkommende und prompte Bearbeitung so manch eiliger Spontanbestellung zu großem Dank verpflichtet. Herrn Dr. Wepf danke ich für die praktischen Tipps und Kniffe in Fragen der Rasterelektronenmikroskopie und Frau Kaiser gilt mein Dank für die Einarbeitung in das Verfahren der Kritisch-Punkt Trocknung.

Der größte Dank gebührt meinen Eltern, die mir diese akademische Ausbildung ermöglicht haben, die mit der vorliegenden Arbeit ihren Abschluss gefunden hat. Nicht vergessen möchte ich natürlich meine Lebensgefährtin Birte, die mir mit ihrer menschlichen Wärme, ihrem großen Herzen und viel Verständnis zur Seite stand und jeder Zeit für mich da war.

Lebenslauf

Name: Gentsch
Vorname: Carsten
Geburtsjahr: 1970
Geburtsort Hamburg

Wissenschaftlicher Werdegang

10.1991 – 04.1998 Studium der Biologie
an der Georg-August-Universität in Göttingen

Thema der Diplomarbeit: Untersuchungen zur Kompartimentierung des
Cyclosporin-Biosyntheseweges in *Tolypocladium inflatum*

01.1999 – 12.2001 Stipendiat im Institut für Osteopathologie / Zentrum
für Biomechanik des Universitätsklinikums
Hamburg-Eppendorf im Rahmen des
Graduiertenkollegs 476

Thema der Dissertation: Knochenresorption: Licht-, rasterelektronen-
mikroskopische und molekularbiologische
Untersuchungen am Modell des humanen,
spongösen Knochens und der aseptisch
gelockerten Hüftendoprothese

seit 01.2002 wissenschaftlicher Mitarbeiter des Universitätsklinikums
Hamburg-Eppendorf

Publikationen

M. Hoppert , C. Gentsch , K. Schörgendorfer (2001),
Structure and localization of cyclosporin synthetase, the key enzyme of cyclosporin
biosynthesis in *Tolypocladium inflatum*,
Archives of Microbiology, 176: 285-293.

C. Gentsch, E. Kaiser, G. Delling (2002),
Rasterelektronenmikroskopische Typisierung von Resorptionslakunen und
Perforationen im spongösen Knochen des humanen Hüftkopfes,
Der Pathologe, 23: 367-372.

C. Gentsch, E. Kaiser, J. Plutat, R. Sellckau, J. Wodtke, G. Delling (2002),
cDNA-Arrays: Zytokin-Expressionsprofil aseptisch gelockerter
Femurschaftprothesen,
Der Pathologe, 23: 373-378.

C. Gentsch, E. Kaiser, G. Delling (2002),
Microstructural classification of resorption lacunae and perforations in human
proximal femura,
Calcified tissue international, in press

Präsentationen

C. Gentsch, G. Möller, E. Kaiser, G. Delling
Age- and Sex-Related Structural Changes in Trabecular Bone: A Scanning Electron
Microscope and Light Microscope Investigation on Human Femura.
ASBMR meeting, Toronto 2000, SA015

G. Möller, M. Voigtländer, M. Junge, C. Gentsch, F. Dehghani, K. Püschel, G.
Delling
Age-related Alterations in Bone Microarchitecture and Stability in the Proximal Femur
– A Structural and Biochemical Investigation.
ASBMR meeting, Toronto 2000, SA001

E. Kaiser, C. Gentsch, N. Schultz, R. Sellckau, J. Wodtke, J. Plutat, G. Delling
Differential Expression of Cytokines and Chemokines in the Interfacemembrane of
Aseptic Loosened Endoprotheses of the Hip.
ASBMR meeting, San Antonio 2002, SA143

Sitzung des gemeinnützigen Vereins ENDO-Klinik e.V.
Titel: cDNA-Arrays: Neue Impulse zur Untersuchung der aseptischen
Prothesenlockerung.
Nov. 2001

Preise

GRY-Preis für Osteologie 2002 für die Arbeit
Microstructural classification of resorption lacunae and perforations in human
cancellous bone