

Aus der Klinik für Orthopädie
(Direktor: Prof. Dr. med. Lohmann)
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Untersuchungen zur Expression und Funktion von Syndecan-4 in der
aseptischen Prothesenlockerung (APL)**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.
(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Nina Gilbert
aus Bremen

Magdeburg 2013

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Gilbert, Nina:

Untersuchungen zur Expression und Funktion von Syndecan-4 in der aseptischen Prothesenlockerung (APL). – 2013. – 92 Bl. : 21 Abb., 9 Tab., 7 Seiten Anlagen

Kurzreferat:

Weltweit werden jährlich circa 1,5 Millionen Gelenkersatzoperationen durchgeführt. Die Implantatchirurgie gilt als eine der erfolgreichsten orthopädischen Operationen, und durch sie konnte die Lebensqualität vieler Patienten deutlich verbessert werden. Die aseptische Prothesenlockerung stellt heutzutage noch immer die häufigste Ursache für ein Implantatversagen dar. Als bisher einzige Therapieform der APL bleibt momentan die Revisionsoperation.

Eine erneute Operation ist für den Patienten mit Risiken verbunden, und der ökonomische Kostenaufwand ist sehr hoch. Um für diese Problematik eine Lösung zu finden, ist es wichtig, den Pathomechanismus der APL zu verstehen. Trotz zahlreicher Forschungsarbeiten ist der genaue Ablauf bzw. das Zusammenspiel verschiedener Reaktionsschritte, die zur aseptischen Prothesenlockerung führen, noch immer nicht vollständig geklärt.

Syndecan-4 ist als Mitglied der Heparansulfat-Proteoglykane an einer Vielzahl von Abläufen im menschlichen Organismus beteiligt. In dieser Arbeit soll der Frage nachgegangen werden, ob Syndecan-4 ebenfalls eine Rolle bei der aseptischen Prothesenlockerung spielt.

Schlüsselwörter / Abkürzungsverzeichnis:

Ak	Antikörper
a.p.	Anterior-posterior
APL	Aseptische Prothesenlockerung
bp	Basenpaare
BSG	Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit
CC1	Cell Conditioning 1
cDNA	Komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CRP	C-reaktives Protein
DEPC	Diethylene Pyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamin-tetraacetat
EZM	Extrazelluläre Matrix
FCS	Fetales Kälberserum
FGF	Fibroblast growth factor
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure)
HSPGs	Heparansulfatproteoglykane
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
M-CSF	Makrophagen-Kolonie stimulierender Faktor
MMP	Metalloproteinase
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
NSAR	Nichtsteroidale Antirheumatika
OASFs	Osteoarthritis synovial fibroblasts
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PKC α	Proteinkinase C α
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Polyethylen
PIP2	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PKC	Proteinkinase C
PLFs	Prothesenlockerungsfibroblasten

RA	Rheumatoide Arthritis
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RASFs	Rheumatoid arthritis synovial fibroblasts
RANK(L)	Receptor activator of nuclear factor- κ B (ligand)
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	Small interfering Ribonukleinsäure
SLIM	Synovial-like interface membrane
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TGF	Transforming growth factor
Tm	Temperature of melting
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
VEGF	Vaskular endothelial growth factor

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	7
Aseptische Prothesenlockerung	8
1.1.1 Definition.....	8
1.1.2 Epidemiologie.....	8
1.1.3 Ätiologie und Pathogenese.....	8
1.1.4 Klinik.....	12
1.1.5 Diagnostik.....	12
Labordiagnostik.....	12
Bildgebende Diagnostik.....	13
1.1.6 Therapie.....	14
Periprothetische Membran (Syn. Synovial-like interface membrane)	15
1.1.7 Klassifikation der periprothetischen Membran.....	15
Makrophagen und Fibroblasten (PLFs) in der aseptischen Prothesenlockerung	18
Heparansulfatproteoglykane – Die Syndecane	19
1.1.8 Syndecan-4.....	20
2. MATERIAL UND METHODEN	24
Materialien	24
2.1.1 Biopsie- und Patientenkollektiv.....	24
Methoden	25
2.1.2 Histologische Methoden.....	25
2.1.2.1 Fixierung.....	25
2.1.2.2 Paraffineinbettung.....	25
2.1.2.3 Schneiden der Blöcke.....	25
2.1.2.4 Immunhistochemie.....	25
2.1.2.5 Antikörperfärbungen.....	27
2.1.3 Zellbiologische Methoden.....	27
2.1.3.1 Isolation von Fibroblasten mit Hilfe des Enzyms Dispase II.....	27
2.1.3.2 Mediumwechsel und Umsetzen der Primärkulturen.....	28
2.1.3.3 Invasionsassay.....	28
2.1.4 Molekularbiologische Methoden.....	30
2.1.4.1 Isolation von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen.....	30
2.1.4.2 Quantifizierung der RNA.....	30
2.1.4.3 RNA-Agarosegelelektrophorese.....	31
2.1.4.4 Reverse Transkription.....	31
2.1.4.5 Oligonukleotide und Vektoren (Plasmide).....	32
2.1.4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	32
2.1.4.7 Plasmidverdünnung – Kopienberechnung.....	32
2.1.4.8 Quantitative Real-Time PCR am Light Cycler.....	33
2.1.4.9 Agarose-Gelelektrophorese.....	34
2.1.5 Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate.....	34
2.1.6 Auswertung der HE-Schnitte mit Hilfe des „Synovialitis Scores“.....	35
2.1.7 Statistische Analyse.....	35
3. ERGEBNISSE	37
Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen	37
3.1.1 Patientenkollektiv.....	37
3.1.2 Syndecan-4 Expression in der periprothetischen Membran („Synovial-like interface	

membrane") bei aseptischer Prothesenlockerung.....	39
3.1.3 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit klinischen Daten.....	41
3.1.3.1 Prothesenstandzeit und Body Mass Index (BMI).....	41
3.1.3.2 Nebendiagnosen.....	42
3.1.3.3 Medikamente	43
3.1.3.4 Entzündungsparameter (C-reaktives Protein) und mikrobiologische Untersuchung	44
3.1.3.5 Knochenzement.....	45
3.1.4 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit den Klassifikationstypen der periprothetischen Membran	47
3.1.5 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit dem Synovialitis-Score.....	48
3.1.6 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit verschiedenen histologischen Merkmalen (Pannus, Makrophagen und Abriebtyp)	49
Ergebnisse der molekular- und zellbiologischen Untersuchungen.....	52
3.1.7 Expression von Zytokinen in PLFs	52
3.1.8 Expression von Syndecan-4 in Prothesenlockerungsfibroblasten (PLFs)	53
3.1.9 Ergebnisse der Invasionsassays.....	54
4. Diskussion	55
Diskussion der immunhistochemischen Ergebnisse	55
4.1.1 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit den histologischen Typen der periprothetischen Membran	55
4.1.2 Die Syndecan-4 Expression und die Anwendung des Synovialitis-Score bei der APL	56
4.1.3 Die Syndecan-4 Expression und weitere histologische Kriterien	56
4.1.4 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit klinischen Daten.....	57
4.1.4.1 Vergleich der Syndecan-4 mit dem BMI und der Prothesenstandzeit.....	57
4.1.4.2 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit verschiedenen Nebendiagnosen.....	58
4.1.4.3 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit der Einnahme verschiedener Medikamente	60
4.1.4.4 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit dem Entzündungsparameter C-reaktives Protein	62
4.1.4.5 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit der Verwendung von Knochenzement.....	62
Diskussion der molekular- und zellbiologischen Ergebnisse.....	63
5. LITERATURVERZEICHNIS	67
6. ANLAGE	81
7. DANKSAGUNG	88
8. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	89
9. CURRICULUM VITAE.....	90

1. EINLEITUNG

Die Implantation von Gelenkprothesen gehört heute zu den am häufigsten durchgeführten Operationen im orthopädisch-traumatologischen Bereich. Dabei werden weltweit jährlich etwa 1,3 - 1,5 Mio. Endoprothesen implantiert (Drees et al. 2008). In der Bundesrepublik Deutschland beträgt diese Zahl circa 180.000 für Hüft- und 100.000 für Knieprothesen (Otto et al. 2006). Die Indikationen dafür sind vielfältig. Sie reichen von degenerativen Erkrankungen wie Arthrose, traumatischen Ursachen, rheumatischen Erkrankungen, aseptischen Hüftkopfnekrosen, Knochentumoren bis hin zu destruktiven Osteomyelitiden (Morawietz et al. 2006). Allein wegen einer bestehenden Arthrose befanden sich in Deutschland im Jahr 2002 etwa 340.000 Patienten in stationärer Behandlung, was Kosten von 7 Mrd. € verursachte (Bund 2006).

Dabei sind nicht nur ältere Menschen von Erkrankungen des Muskel-Skelett-Systems betroffen, sondern bereits junge Männer und Frauen können darunter leiden, weshalb eine Prothesenimplantation letztendlich notwendig werden kann (Morawietz et al. 2006).

Der künstliche Gelenkersatz arthrotisch veränderter Hüftgelenke ist dabei die erfolgreichste Operation der orthopädischen Chirurgie (Gravius et al. 2007). Der Großteil der Endoprothesenträger kann nach einer Rehabilitationsphase seine alltäglichen Tätigkeiten ohne besondere Schwierigkeiten wieder aufnehmen. Es gibt jedoch 5-12 % der Prothesenträger, die in einem Zeitraum von etwa 10 Jahren Beschwerden entwickeln. Diese führen dazu, dass eine Revisionsoperation notwendig wird (Morawietz et al. 2006). Eine Wechseloperation kommt dabei auf circa zehn Neuimplantationen (Bos et al. 2001).

Die Hauptursache der Prothesendysfunktion ist die aseptische Prothesenlockerung (APL), die etwas 80 % der Prothesenrevisionen bedingt (Otto et al. 2006). Trotz verbesserter Implantate und sich ständig verbessernder Operationstechniken ist es bisher nicht möglich diese Komplikation zu verhindern.

Als Risikofaktoren einer aseptischen Prothesenlockerung gelten patientenbezogene Daten (Alter des Patienten, Begleiterkrankungen, Körpergewicht, Alkohol-/Nikotinabusus, Allergien) sowie implantatabhängige Faktoren wie Implantatdesign, Gleitparameter, Verankerungstechnik sowie operativ-chirurgische Parameter. Zum Letzteren gehören u.a. der vom Chirurg gewählte operative Zugang, die Zementiertechnik, die Lernkurve des Operateurs bezüglich des Implantats und der Operationstechnik (Krukemeyer 2009, Menge 2003).

Eine Revisionsoperation birgt für den Patienten neue gesundheitliche Risiken, es entstehen zusätzliche Kosten, und das Ergebnis der Operation bleibt meist qualitativ hinter dem der Primäroperation zurück (Sundenfeldt et al. 2006).

Aseptische Prothesenlockerung

1.1.1 Definition

Trotz anfänglich fester Verankerung kommt es bei Prothesen nach unbestimmter Zeit zum Versagen des Implantats durch einen Lockerungsprozess. Früher waren es hauptsächlich Infektionen, periprothetische Frakturen und Dislokationen, die zu einem Versagen der Prothesen führten (Gentzsch et al. 2002, Otto 2008).

Heute ist die aseptische Prothesenlockerung die Hauptursache für eine Revisionsoperation (Sundenfeldt et al. 2006). Die Lockerung von Teilen oder des gesamten Prothesensystems ist trotz intensiver Forschung ein noch unzureichend verstandenes Problem der Endoprothetik großer und kleiner Gelenke, obwohl optimierte Operationsverfahren und verbesserte Implantate die Standzeit der Prothesen verlängert haben (Gravius et al. 2007).

1.1.2 Epidemiologie

Bei der primären Implantation einer Prothese sind die Patienten durchschnittlich 60 Jahre alt (Morawietz et al. 2004). In klassischen Endoprothetikkliniken der BRD liegt der Anteil der Revisionsoperationen bei etwa 10 % aller Gelenkersatzoperationen (Otto et al. 2006).

Die zementierte und auch die zementfreie Implantation von Prothesen bieten unter Reflexion der gegenwärtigen Literatur vergleichbare Ergebnisse mit Lockerungsraten von 5-12 % nach 10 Jahren Prothesenstandzeit (Gallo et al. 2002, Morawietz et al. 2006, Otto et al. 2006). Nach etwa 20 Jahren sinkt die Funktionsrate der Endoprothesen auf 63 % (Morawietz et al. 2006).

Ein auf dem „Finish Arthroplasty Register“ basierender Bericht lässt bei 72 % bzw. 90 % der Patienten im Alter unter 55 Jahren und über 70 Jahren eine Überlebensrate von 10 Jahren feststellen. Die Konsequenz daraus ist, dass auch immer mehr jüngere Menschen von nachfolgenden Revisionsoperationen aufgrund einer aseptischen Prothesenlockerung betroffen sind (Gallo et al. 2002).

Bei Männern kommt es insgesamt zu einer höheren Revisionsrate als bei Frauen (Wirtz et al. 2008). Betroffen ist besonders der jüngere, aktivere männliche Patient (Löhr et al. 2005). Für das weibliche Geschlecht dagegen ist das Risiko für eine Revisionsoperation 20 % geringer, und es nimmt mit zunehmendem Alter ab (Wirtz et al. 2008).

1.1.3 Ätiologie und Pathogenese

In den letzten Jahren bzw. Jahrzehnten sind unterschiedliche Theorien aufgestellt und veröffentlicht worden.

Partikelkrankheit

In verschiedenen Tierstudien haben sich Forschungsgruppen mit der Frage beschäftigt, ob Abriebpartikel, die durch den Einsatz einer Endoprothese entstehen, für die Knochenresorption in der Prothesenumgebung verantwortlich sind, was letztendlich zur Instabilität des Implantats führt. Dadurch ist der Begriff der sog. „Particle-related disease“ entstanden und geprägt worden. Der Fokus liegt dabei u.a. auf der Größe der Partikel und ihrer biologischen Aktivität. Hierbei scheinen Partikel von einer Größe von 0,3 µm bis 10 µm, die von Makrophagen phagozytiert werden können, biologisch am aktivsten zu sein (Green et al. 1998). In vitro-Untersuchungen von Makrophagenkulturen deuten daraufhin, dass kleinere Polymethylmethacrylat- (PMMA) und Polyethylenpartikel eine signifikant stärkere inflammatorische Zytokinantwort hervorrufen (Abu-Amer et al. 2007). Größere Partikel (bis 1 cm) werden dagegen als nicht verdaubare Fremdkörper erkannt, und es bleibt eine Aktivierung der Makrophagen aus (Drees et al. 2008).

Einige Studien haben gezeigt, dass Abriebpartikel sowohl die Osteoklastogenese induzieren als auch Osteoklasten aktivieren und deren Apoptose inhibieren können. Dabei dienen die aktivierten Makrophagen zum einen als Quelle für entsprechende Mediatoren und zum anderen als Vorläuferzellen zum Osteoklasten (Greenfield et al. 1999, 2002; Yang et al. 2002).

Andere Studiengruppen zeigten wiederum, dass der Prozess der Phagozytose nicht notwendig ist, um Makrophagen zu aktivieren (Nakashima et al. 1999). In vitro-Studien wiesen nach, dass verschiedene Partikel fähig sind, in einem geeigneten Zellmodell verschiedene Mediatoren (TNF α , PGE $_2$, IL-1, IL-6, IL-8, MMP-2, MMP-7, MMP-9, TGF β und IFN γ) auf RNA- und Proteinebene zu induzieren (Baumann et al. 2008).

Zytokine spielen als Mediatoren bei der APL eine wichtige Rolle. Einige Zytokine wie IL-6, IL-1 und TGF- β sind an beiden Vorgängen, der Knochenformation und der –resorption, beteiligt (Kottinen 1997). Wachstumsfaktoren, wie z.B. TNF α , besitzen vielfältige Funktionen. TNF α kommt in der periprothetischen Membran vor, die sich nach einer Prothesenimplantation ausbildet, und interagiert mit verschiedenen Zelltypen. Außerdem bindet er an Rezeptoren der Osteoklastenvorläuferzellen, fördert Knochenresorption und stimuliert Fibroblasten (Drees et al. 2007, 2008). Der Tumornekrosefaktor alpha stimuliert außerdem die Expression von Syndecan-4 (Zhang et al. 2007).

Neben der Größe der Abriebpartikel hängt die Zytokinantwort von dem Material, der Konzentration und der Form der Partikel ab (Baumann et al. 2004). Legierungen mit Kobalt und Chrom scheinen den stärksten biologischen Effekt zu haben. Titanlegierungen zeigen einen mäßigen Effekt, während Polyethylen- sowie Keramikpartikel den geringsten biologischen Effekt besitzen. Hinzu kommt ein synergistischer Effekt, wenn Abriebpartikel verschiedener Materialien (z.B. PE- und Titanpartikel) zusammenwirken (Baumann et al. 2006).

Micromotion

Tierstudien und klinische radiosterometrische Studien haben gezeigt, dass Mikrobewegungen schädlich für den festen Sitz einer Prothese sind (Aspenberg et al. 1992, 1996, 1998b; Ryd et al. 1989). Durch die Mikrobewegungen wird die Integration der Prothese in den Knochen verhindert und eine Lockerung des Implantats gefördert (Goodman 1994, Ryd et al. 1989).

High Fluid Pressure

In einer experimentellen Kaninchenstudie konnte gezeigt werden, dass oszillierender Flüssigkeitsdruck am Knochen Osteolysen induzieren und den Tod von Osteozyten herbeiführen kann. Es wird vermutet, dass dieser Druckanstieg einen Einfluss auf die interstitielle Flüssigkeit, die Osteoklasten und die Osteoblasten ausübt, was zu einem Knochenverlust und damit zu einer Lockerung des Implantats führen kann (Aspenberg et al. 1998a,b; Schmalzried et al. 1997).

Der vermehrte Flüssigkeitsfluss unterstützt u.a. den Transport von Abriebpartikeln. Die Partikel können in das periprothetische Gewebe gelangen und die molekularbiologische Kaskade der Prothesenlockerung auslösen (Bauer et al. 2002).

Stress Shielding

Die Implantation einer Endoprothese führt dazu, dass die normale Beanspruchung des Knochens nicht aufrecht erhalten wird. Die durch die eingebrachte Endoprothese veränderte Belastung bewirkt eine Änderung der Knochenarchitektur (periprothetisches bone remodelling). In den druckentlasteten Abschnitten atrophiert der Knochen, während in Zonen des Lastüberganges von der Prothese auf den Knochen Anpassungshypertrophien beobachtet werden. Dieses „Stress Shielding“ bedingt langfristig Gefahren für die Stabilität der Prothese. Saumbildungen um den proximalen Prothesenschaft sind die Folge. Warum diese knöchernen Anpassungsvorgänge nicht bei allen Patienten auftreten, ist noch unbekannt (Menge 2003, Engh et al. 1988).

Sealed Interface

Abriebpartikel werden durch den vorherrschenden Druck, der entlang der Knochen-Implantat-Grenze besteht, in der Gelenkflüssigkeit transportiert. Dies beeinflusst wiederum auch das Knochengewebe, das sich in der Nähe der Prothese befindet. Intakte Zwischenraumgrenzen könnten daher möglicherweise den periprothetischen Knochenverlust verhindern (Schmalzried et al. 1992).

Die Abdichtung des Zwischenraums in zementierten oder unzementierten Gelenkprothesen ist daher wahrscheinlich für das Langzeitüberleben des Implantats entscheidend. Der

Vorgang des „Sealings“ muss jedoch sehr früh eintreten. Ansonsten dringen zunehmende Mengen an Abriebpartikeln und Gelenkflüssigkeit in den Zwischenraum. So wird ein enger Kontakt zwischen dem Knochen und dem Zement oder dem Knochen und der Prothese verhindert, was anschließend zu einem Implantatsverlust führen kann (Sundenfeldt et al. 2006).

Hypersensitivität

Neben der Auslösung einer inflammatorischen Reaktion durch Abriebpartikel mit anschließender Ausschüttung von Zytokinen kann auch eine Hypersensitivität zu einer aseptischen Prothesenlockerung beitragen. Es handelt sich hierbei um eine Sensibilisierung gegenüber den Partikeln, die von der Prothese stammen. Sie rufen letztlich eine allergische Reaktion vom Typ IV (Allergie vom verzögerten Typ) hervor. Dies führt zu einer Ausschüttung verschiedener Zytokine wie IL-1 α , IL-1 β , TNF- α sowie IL-6 (Haddad et al. 1996).

In zwei aktuelleren Studien wird eine besondere Reaktionsweise der periprothetischen Membran (s.u.) beschrieben, die nur bei Metall-Metall-Gleitpaarungen auftritt. Histologisch sind hierbei in tieferen Abschnitten der periprothetischen Membran perivaskuläre Aggregate von Lymphozyten, Plasmazellen, Makrophagen mit tropfenförmigen Einschlüssen, eosinophile Granulozyten, hochendotheliale Venolen, Fibrinexsudate und Nekrosen vorzufinden (Davies et al. 2005, Willert et al. 2005). Es herrscht jedoch Unklarheit darüber, ob ein kausaler Zusammenhang zwischen dem Auftreten einer aseptischen Prothesenlockerung und einer gesteigerten Reaktivität lymphozytärer Zellen gegenüber metallischen Abriebpartikeln besteht. Die Befunde weisen jedoch daraufhin, dass diese spezifische Immunreaktion in der Pathogenese der periprothetischen Osteolyse eine Rolle spielen könnte (Jacobs et al. 2006, Kaddick et al. 2009).

Individuelle und genetische Variabilität

Die individuellen Unterschiede zwischen Patienten aufgrund von genetischen Faktoren könnten eine bedeutendere Rolle spielen, als bisher angenommen wurde (Sundenfeldt et al. 2006).

Die Ursache der Endoprothesenlockerung wird zum Teil auch durch patientenbezogene Faktoren vorgegeben. So spielen die Knochenqualität, die Geometrie, andere Grunderkrankungen, die Femurschaftform, weitere Voroperationen etc. eine große Rolle. Patienten, die an einer avaskulären Nekrose bzw. an einer entzündlichen Grunderkrankung wie z.B. einem Lupus erythematoses leiden, haben eine höhere Wahrscheinlichkeit, eine aseptische Prothesenlockerung zu erleiden (Löhr et al. 2005).

Unabhängig von den oben erläuterten Theorien spielen also die klassischen biomechanischen Faktoren wie Primärstabilität, chirurgische Qualität und Implantatdesign eine wichtige Rolle (Baumann et al. 2008). Neben dem Implantatdesign ist auch die Oberflächenbeschaffenheit im Kontakt zwischen Prothese und Knochen von Bedeutung. Alle Beschichtungen nehmen für sich in Anspruch, knocheninduktiv zu wirken, Friktion, Abrieb und Korrosion zu minimieren, wodurch die Standzeit des Implantats verbessert werden soll (Drees et al. 2008).

1.1.4 Klinik

Die Klinik der aseptischen Endoprothesenlockerung ist durch einen persistierenden Schmerz im Bereich der vorher belastbaren Endoprothese (Peters et al. 2008) gekennzeichnet. Bei Hüft- und Knieendoprothesenlockerungen finden sich häufig Schmerzen im Bereich der Leiste, im Gesäß und im Oberschenkel. Bei Schaftlockerungen treten sie meist als belastungsabhängiger Dauerschmerz und bei Pfannenlockerung als Anlaufschmerz auf. Die Pfannenlockerungen verursachen eher eine schleichende Verschlechterung der Symptome, und zwischen beschwerdefreien bzw. beschwerdearmen Phasen klagen die Patienten über Schmerzepisoden. In einigen Fällen verlaufen ausgedehnte Pfannenlockerungen symptomlos. Die Schaftlockerung wird dagegen klinisch schlecht von den Prothesenträgern toleriert (Otto et al. 2006). Bei der klinischen Untersuchung fallen dem Untersucher oft ein Rotations- und Stauchungs- bzw. Rüttelschmerz sowie eine schmerzhafte aktive und passive Beweglichkeit auf. Im fortgeschrittenen Stadium der APL empfinden die Betroffenen häufig eine Gangunsicherheit. Es kann außerdem zu Komponentenwanderungen oder zu einer Fraktur des Prothesenstiels, des Knochenzements oder des Knochens kommen. Auch wiederholte Luxationen einer Hüft-TEP Jahre nach der Implantation gelten als Hinweise für eine Lockerung. Bedauerlicherweise sind die Beschwerden und klinischen Symptome einer aseptischen Prothesenlockerung oft sehr uncharakteristisch und uneindeutig, was eine Diagnosestellung anhand der Klinik erschwert (Peters et al. 2008).

1.1.5 Diagnostik

Labordiagnostik

Durch eine Punktion des schmerzhaften, mit einer Endoprothese versorgten Gelenkes mit anschließendem direkten bakteriellen Keimnachweis und durch die Bestimmung der Entzündungsparameter (CRP, BSG) kann eine septische Prothesenlockerung nachgewiesen werden (Wirtz et al. 1997, Löhr et al. 2005). Die Bestimmung des kleinen Blutbildes, des Differenzialblutbildes sowie der Entzündungsparameter ist für die präoperative Diagnostik

wichtig, aber weniger aussagekräftig in der Feststellung einer aseptischen Prothesenlockerung (Löhr et al. 2005).

Bildgebende Diagnostik

Für die radiologische Diagnose einer Endoprothesenlockerung besteht in der Literatur sowohl für zementierte als auch für zementfreie Prothesen keine einheitliche Definition, obwohl der periprothetische Lysesaum und der Nachweis einer Implantatmigration als Kriterien einer Lockerung anerkannt sind (Wirtz et al. 1997).

Um den Verdacht einer Endoprothesenlockerung zu bestätigen, ist zunächst eine Röntgenuntersuchung des betroffenen Gelenkes notwendig (Otto et al. 2006). Die Bildgebung erfolgt mit konventionellen Röntgentechniken, intraoperativ mittels Durchleuchtung, und das Abschlussröntgen sollte bei Kniegelenken in zwei Ebenen sowie bei Hüftendoprothesen in Form einer Beckenübersichtsaufnahme durchgeführt werden. Im Langzeitverlauf sollte ein Hüftstrahl in a.p. und axial angefertigt werden (Breitenseher et al. 2002).

Radiologisch zeigt sich bei der Prothesenlockerung eine Saumbildung zwischen dem Zementknochen der Prothese und dem Knochen. Bei einer zementfrei implantierten Totalendoprothese befindet sich dieser Saum zwischen der Prothese und dem Knochen (Peters et al. 2008). Prinzipiell kann eine Saumbildung jedoch nicht nur durch eine aseptische Lockerung, sondern auch durch eine septische Lockerung verursacht werden (Breitenseher et al. 2002).

Bei Hüftendoprothesen werden zirkumferente Lysesäume > 1 mm oder Lysesäume > 2 mm, die mehr als ein Drittel jedweder der 14 Gruen-Zonen (Schaft) im anterior-posterioren beziehungsweise seitlichen Bild oder der drei Azetabulumzonen nach De Lee/Charnley (Pfanne) einnehmen, als lockerungsverdächtig angesehen (DeLee et al. 1976, Gruen et al. 1979, Katzer et al. 2003, Siebold et al. 2001).

Bei Knieendoprothesen findet u.a. das Scoring-System von *Ewald* bei der radiologischen Beurteilung Anwendung. Aufsummierte Lysesaumweiten der Prothesenkomponenten von weniger als 5 mm ohne Progression gelten hier als unauffällig, 5 bis 9 mm als fragliche Lockerung, und sie sollten auf Progression kontrolliert werden. Über 9 mm werden bei entsprechender klinischer Beschwerdesymptomatik als Lockerung angesehen (Ewald 1989). Als weitere Lockerungszeichen gelten ein Zementbruch, eine Zementresorption oder eine Wanderung der Prothesenteile. Für eine Migration von Prothesenteilen sprechen beim Schaft das Einsinken und die Varisierung, bei der Pfanne die Protrusion, Kraniation und Verkipfung der Prothesenkomponente.

Bei der femoralen Komponente gibt es verschiedene Kriterien, die zur Feststellung einer Migration dienen. Es kann eine Änderung der Distanz von > 2 mm zwischen der lateralen Kontur und der Spitze des Trochanter majors darauf hinweisen (Breitenseher et al. 2002).

Für die vertikale Senkung ist die Distanz zwischen dem superomedialen Anteil der grobstrahligen Ummantelung und der Spitze des Trochanter minor von Bedeutung. Dabei sollten 5 mm nicht überschritten werden (Callaghan et al. 1988).

Die Arthrographie hat sich für die breite routinemäßige Anwendung nicht durchgesetzt, da bei Hüftendoprothesen relativ häufig falsch-positive azetabuläre Lockerungsdiagnosen gestellt und femoralseitig eher falsch-negative Ergebnisse erzielt werden (Breitenseher et al. 2002).

Falls das radiologische Bild keine eindeutige Diagnose liefert, kann eine Knochenszintigrafie bei der diagnostischen Einordnung helfen (Otto et al. 2006). Szintigrafisch bedeutet demnach die Traceranreicherung von Technetium-99 als Korrelat einer Lockerung einen gesteigerten Knochenstoffwechsel (Peters et al. 2008). Bei fibrös fixierten Implantaten gibt es auch stumme Verläufe in der Technetiumszintigrafie, so dass hier ein Szintigramm wenig von Nutzen ist (Löhr et al. 2005).

Die Stärke der Magnetresonanztomografie liegt im Ausschluss bzw. Nachweis einer Arthritis oder Osteolyelitis und insbesondere in der Darstellung von Weichteilabszessen und Weichteilphlegmonen, was eine hilfreiche nichtinvasive Untersuchung sein kann, um Differenzialdiagnosen auszuschließen (Breitenseher et al. 2002) und das operative Vorgehen bei septischer Lockerung zu planen.

1.1.6 Therapie

Die aseptische Prothesenlockerung stellt in Bezug auf die Indikationsstellung zur Revisionsoperation und auf das operative Vorgehen hohe Anforderungen an den behandelnden Arzt. Um die Entscheidung für den Endoprothesenwechsel treffen zu können, müssen alle klinischen und diagnostischen Befunde zusammen betrachtet werden (Wirtz et al. 1997), da die erneute Operation für den Patienten ein deutlich erhöhtes operatives Risiko trägt und ein schlechteres Langzeitergebnis als die Primäroperation zeigt (Otto 2008). Außerdem entstehen durch eine Revisionsoperation deutlich höhere Kosten.

Die Revisionsarthroplastik wird einen immer größer werdenden Stellenwert für die orthopädischen Chirurgen einnehmen, und für das Gesundheitssystem stellt sie schon jetzt einen erheblichen Kostenfaktor dar. Die rechtzeitige Erkennung revisionsbedürftiger Prothesen durch sorgfältige Nachkontrollen kann das persönliche Leid der Patienten, die Rehabilitationszeiten und die damit verbundenen Kosten positiv beeinflussen (Löhr et al. 2005). Die Entwicklung neuer Konzepte vor allem für Patienten unter 65 Jahren, aber auch für Patienten mit hoher Lebenserwartung wird auch zukünftig eine wichtige Rolle spielen (Menge 2003).

Periprothetische Membran (Syn. Synovial-like interface membrane)

Nach einer Prothesenimplantation bildet sich zwischen der Implantatoberfläche bzw. Zement und Knochengewebe ein unterschiedlich breiter Bindegewebssaum. Diese periprothetische Membran zeigt zahlreiche morphologische Ähnlichkeiten mit der Synovialmembran der rheumatoiden Arthritis, daher wird sie auch als Synovial-like interface membrane (SLIM) bezeichnet (Goldring et al. 1983). Diese Membran entsteht auch bei festsitzenden Prothesen. Sie ist jedoch wesentlich schmäler als bei lockeren Implantaten, wie z.B. im Rahmen der APL. Im Femurschaftbereich erreicht sie eine Dicke zwischen 0,1 und 0,3 mm. Im Acetabulumlager kann die Dicke mit zunehmender Prothesenstandzeit bis über 1,0 mm betragen (Morawietz et al. 2006).

Die Klassifikation der periprothetischen Membran erfolgt in verschiedene morphologische Typen. Ein Klassifikationsvorschlag stammt von Morawietz et al. (Otto et al. 2006, Otto 2008, Morawietz et al. 2004).

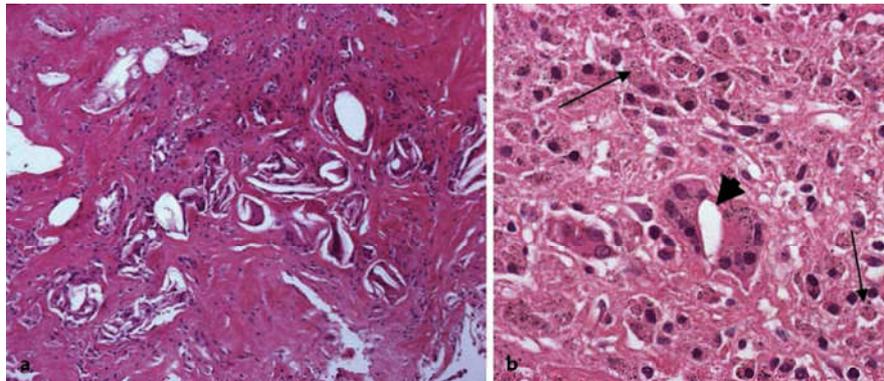
1.1.7 Klassifikation der periprothetischen Membran

Periprothetische Membran vom abriebinduzierten Typ (Typ I)

Histologisch besteht das Bindegewebe der periprothetischen Membran Typ I hauptsächlich aus Makrophagen, prothesenlockerungsspezifischen Fibroblasten (PLFs) und multinukleären Riesenzellen. Lymphozyten und Plasmazellen lassen sich vereinzelt nachweisen. Abriebinduzierte periprothetische Membranen können entweder prädominant aus Makrophagen oder prädominant aus multinukleären Riesenzellen bestehen. Zusätzlich gibt es Mischformen (Krenn et al. 2008, Morawietz et al. 2004, Morawietz et al. 2006).

Größere Abriebpartikel, wie z.B. Polyethylen $> 5 \mu\text{m}$, finden sich besonders in multinukleären Riesenzellen, während kleinere PE-Partikel ($< 2 \mu\text{m}$) vor allem in Makrophagen nachzuweisen sind. Die Abriebpartikel aus Polyethylen, Keramik, Metall oder Zement (je nach Prothesentyp und Lockerungsregion) sind in der Routinemikroskopie und im polarisierten Licht nur teilweise darstellbar. Polyethylen erscheint lichtmikroskopisch meist als längliche Form mit diskretem Kolorit. Mit Hilfe der Öl-Rotfärbung kann Polyethylen im Paraffin aufgefunden werden (Hansen et al. 2005). In der Berliner-Blau-Reaktion führt feinsten Eisenabrieb zu bläulichen Einschlüssen in Makrophagen. Für Titanabrieb gibt es noch keine routinemäßig durchführbare Färbetechnik. Zementfragmente (Polymethylmethacrylat, PMMA) imponieren in Abhängigkeit von ihrer Größe als ein basophiles, oft traubenförmiges, scholliges Muster. In der Polarisationsoptik zeigen Zementfragmente eine geringe Doppelbrechung, oder sie stellen sich als optisch leere Hohlräume dar, nachdem sie bei der Schnitthanfertigung herausgebrochen wurden. PMMA werden Kontrastmittelkörnchen aus Zirkondioxyd oder Bariumsulfat beigegeben. Sie bilden häufig größere Konglomerate, die

eine rund-ovale Form besitzen und eine starke weiße Doppelbrechung bewirken. Keramikpartikel besitzen eine variable Größe von 0,5 bis 10 μm . Diese Partikel sind gelb-weißlich mit einem auffälligen dunklen Rand. Die Intensität ihre Doppelbrechung ist abhängig von der Orientierung ihrer kristallinen Struktur (Krenn et al. 2008, Morawietz et al. 2004, Morawietz et al. 2006).



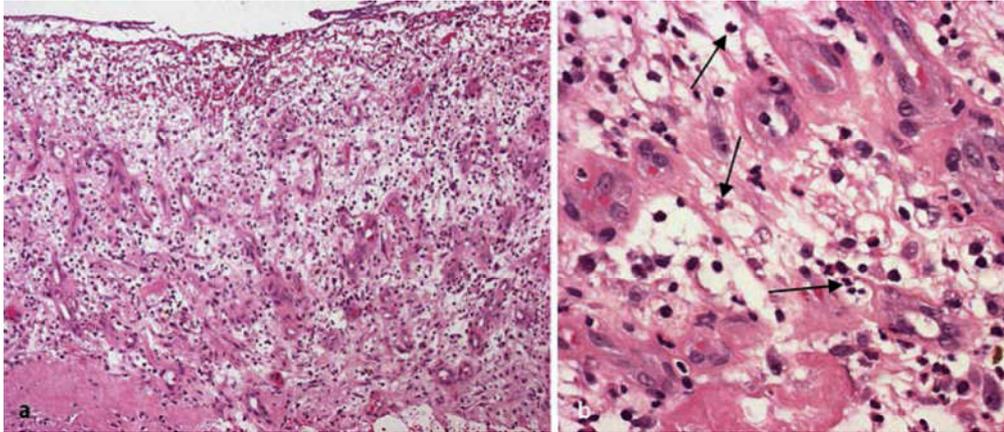
(Quelle: Morawietz et al. 2006)

Abbildung 1: Periprothetische Membran vom abriebinduzierten Typ (Typ I)

- a Dicht gelagerte Makrophagen, multinukleäre Riesenzellen; HE-Färbung (Vergr. 100:1)
- b Multiple dunkelgraue, runde Abriebpartikel in den Makrophagen (*Pfeile*), Riesenzelle zeigt einen spindelförmigen optisch leeren Raum, der einem herausgerissenen PE-Partikel entspricht (*Pfeilspitze*); HE-Färbung (Vergr. 400:1)

Periprothetische Membran vom infektiösen Typ (Typ II)

Bei diesem Typ unterscheidet man zwischen einer low-grade Infektion und einer eitrigen, phlegmonösen oder abszedierenden Entzündung. Die low-grade Infektion stellt sich klinisch und makroskopisch ähnlich wie eine aseptische Prothesenlockerung dar. Das Bild der low-grade Infektion ist überwiegend durch eine chronisch granulierende Entzündung mit aktivierten Fibroblasten, Gefäßproliferation und chronischem Ödem gekennzeichnet. Das entzündliche Infiltrat setzt sich aus neutrophilen Granulozyten und oft auch Plasmazellen in Nachbarschaft von kleinen Lymphozytenaggregaten zusammen. Vielkernige Riesenzellen und Makrophagen sind meist nur vereinzelt nachweisbar. Diagnostisch entscheidend sind die neutrophilen Granulozyten, so dass Pandey et al. (1999) in einer Studie folgendes Kriterium definiert haben. Mindestens ein neutrophiler Granulozyt muss pro Gesichtsfeld bei 400facher Vergrößerung (high-power-field / HPF) in je mindestens 10 HPF vorkommen.



(Quelle: Morawietz et al. 2006)

Abbildung 2: Periprothetische Membran vom infektiösen Typ (Typ II)

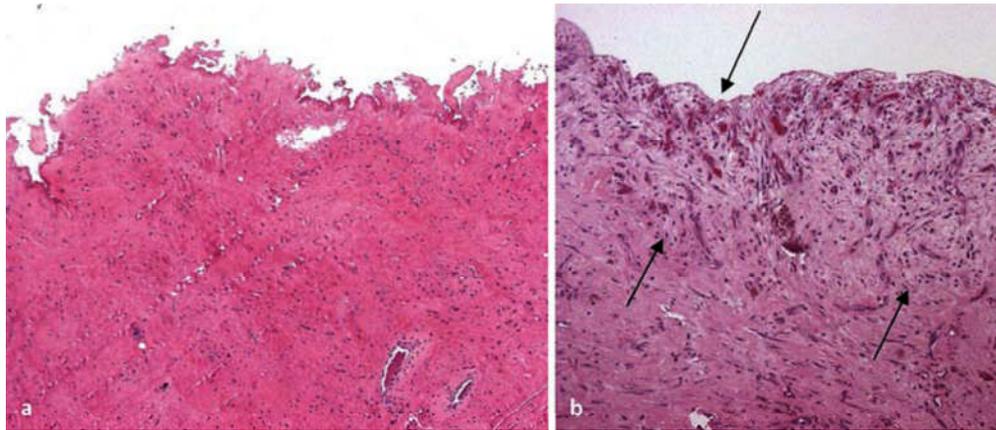
- a** Kapillarreiches, ödematöses Granulationsgewebe; HE-Färbung (Vergr. 100:1)
- b** Etliche neutrophile Granulozyten (*Pfeile*); HE-Färbung (Vergr. 400:1)

Periprothetische Membran vom abriebinduzierten und infektiösen Typ (Mischtyp, Typ III)

Es gibt einige Fälle, in denen in der periprothetischen Membran abriebinduzierte sowie infektiöse Areale in ähnlichen Anteilen vorkommen. Einen histologisch dominierenden Typ gibt es also nicht, so dass es sich hier um eine Kombination aus dem Typ I und Typ II handelt.

Periprothetische Membran vom indifferenten Typ (nicht abriebinduziert, nicht infektiös, Typ IV)

Die periprothetische Membran vom Indifferenztyp stellt sich histologisch als zellarmes, kollagenfaserreiches Bindegewebe dar. Ihre Oberfläche wird zumeist von einem zarten Fibrinraum mit Fibroblasten und Makrophagen synovialisähnlich begrenzt. Neutrophile Granulozyten kommen nur vereinzelt oberflächennah lokalisiert vor. Mit Hilfe der HE-Färbung und der Polarisationsmikroskopie lassen sich nur sehr wenige Fremdmaterialablagerungen erkennen. Man findet keine Fremdkörperreaktion. Die Riesenzellen und Makrophagen nehmen in diesem Typ IV weniger als 20% der Schnittfläche ein (Krenn et al. 2008, Morawietz et al. 2004, Morawietz et al. 2006).



(Quelle: Morawietz et al. 2006)

Abbildung 3: Periprothetische Membran vom Indifferenztyp

- a** zellarmes Narbengewebe (HE-Färbung, Vergr. 50:1) mit einer angedeutet villös konfigurierten Oberfläche und zartem Fibrinraum.
b Granulationsgewebe zur Oberfläche hin (*Pfeile*; HE-Färbung, Vergr. 100:1), fast keine neutrophilen Granulozyten

Makrophagen und Fibroblasten (PLFs) in der aseptischen Prothesenlockerung

Makrophagen sind an der Knochen-Zement-Grenze zu finden (Charnley 1979). Fremdörperreaktionen treten gegen Partikel wie Plastik, Metall und Acryl auf. Es bildet sich Granulationsgewebe, das wiederum Makrophagen und Riesenzellen enthält (Willert 1977). Histomorphologische Untersuchungen der periprothetischen Membran haben bestätigt, dass verschiedene Zelltypen wie Makrophagen, T-Lymphozyten, multinukleäre Riesenzellen sowie Fibroblasten dort vorzufinden sind (Goldring et al. 1983, 1986; Linder et al. 1983, Santavirta 1990, 1991a,b).

Es ist bekannt, dass Makrophagen bei der inflammatorischen Reaktion auf Abriebpartikel eine Rolle spielen. Makrophagen, die diese Partikel phagozytieren, schütten Zytokine, Wachstumsfaktoren und Prostaglandine aus. Dies führt wiederum zur Aktivierung von Osteoklasten, Fibroblasten und Osteoblasten.

Fibroblasten bilden im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung Zytokine, Metalloproteinasen, Kollagen etc. (Sakai et al. 2002). TGF β 1 aktiviert Fibroblasten, und diese bilden daraufhin Fibronectin und Kollagen (Shanabhag et al. 1997). Auch beteiligen sich Fibroblasten aus dem Granulationsgewebe der Pseudokapsel an der Osteoklastendifferenzierung (Sakai et al. 2002). In vitro-Untersuchungen ergaben, dass bestimmte Bedingungen im Medium der Fibroblasten deren Proliferation induzieren. Außerdem scheinen die Fibroblasten in der Lage zu sein, die osteoklastäre Knochenresorption direkt zu stimulieren (Shanbhag et al. 1997).

Heparansulfatproteoglykane – Die Syndecane

Syndecane gehören zu einer Familie von transmembranen Proteoglykanen. Wirbeltiere besitzen vier verschiedene Gene, die jeweils für ein Syndecan kodieren (Syndecan-1,-2,-3 oder -4). Jedes Syndecan besteht aus einem Core-Protein und hat eine kurze zytoplasmatische Domäne, eine Transmembrandomäne sowie eine extrazelluläre Domäne mit Bindungsstellen für Glykosaminoglykanketten wie Heparansulfat- (HS) oder Chondroitinsulfat-(CS)-Ketten (Tkachenko et al. 2005).

Die kleine zytoplasmatische Domäne wird in drei Regionen unterteilt. Es gibt zwei konservierte Regionen (C1 und C2). Diese flankieren eine variable Region. Die Funktion dieser variablen Sequenz ist noch weitgehend unbekannt. Da sie bei allen vier Syndecan-Mitgliedern unterschiedlich aufgebaut ist, wird vermutet, dass sie an der Ausbildung der spezifischen Eigenschaften der einzelnen Syndecane beteiligt ist (Couchman 2003).

Die Heparansulfat- und Chondroitinsulfat-Ketten kommen in unterschiedlicher Länge vor. Ihre strukturelle Vielfalt resultiert aus einer Reihe von posttranskriptionalen Modifikationen. Die Syndecan-Familie hat normalerweise HS-Ketten gebunden, während Syndecan-1 und -3 gelegentlich auch Chondroitin- oder Dermatansulfatketten auf ihrer extrazellulären Domäne tragen (Bernfield et al. 1999). Auf der Basis von Proteinsequenzhomologien bilden Syndecan-1 und Syndecan-3 eine Subfamilie, während Syndecan-2 und -4 den Rest ausmachen (Bernfield et al. 1999, Couchman 2002).

HS-Ketten erlauben Interaktionen mit einer großen Zahl von Proteinen wie Heparin bindenden Wachstumsfaktoren (Fibroblast growth factor (FGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Transforming growth factor- β (TGF- β) und Platelet-derived growth factors (PDGF). HS-Ketten erleichtern auch die Interaktion mit extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin und Plasmaproteinen (z.B. Antithrombin-1). Die genaue Rolle der CS-Ketten ist noch unklar (Tkachenko et al. 2005).

Syndecane kommen in jedem Gewebekompartiment, in der Extrazellulären Matrix, auf der Zelloberfläche, interzellulär in Granula und sogar im Zellkern vor (Couchman 2003). Biochemische Studien und Zellkulturassays haben gezeigt, dass Heparansulfatproteoglykane als Co-Rezeptoren eine Rolle bei verschiedenen Prozessen spielen. Ihre Fähigkeit reicht von mechanischer Unterstützung bis hin zu Funktionen bei der Adhäsion, Motilität, Proliferation, Differenzierung und Morphogenese von Zellen (Perrimon et al. 2000, Bernfield et al. 1992). Einige Proteoglykane sind essentiell für die Entwicklung und Funktion von Skelett, Immunsystem und ZNS (Perrimon et al. 2000, Selleck 2000).

In vivo-Untersuchungen deuten daraufhin, dass jedes der vier Syndecane zu einem spezifischen Zeitpunkt und auf ganz bestimmten Zellen präsent ist (Bernfield et al. 1992, Filmus 2001). Syndecan-1 wird z.B. früh in der Entwicklung und im Allgemeinen auf Epithelien sowie auf mesenchymalen Zellen exprimiert, die mit Gewebemorphogenese assoziiert werden.

Syndecan-3 kommt im Nervengewebe, aber auch im Skelettmuskelgewebe vor. Syndecan-2 wurde ursprünglich als Fibroglykan bezeichnet, das gehäuft in mesenchyalem Gewebe gefunden wird. Es ist jedoch auch in Leberzellen und neuronalen Zellen vertreten. Syndecan-4 ist ein spezieller Vertreter der Syndecane, da es weit verteilt in den verschiedenen Entwicklungsstufen vorkommt und in vielen verschiedenen Zelltypen präsent ist (David et al. 1992). Es wird ubiquitär exprimiert.

Das Expressionsmuster der Syndecane wird u.a. von Wachstumsfaktoren reguliert (Tkachenko et al. 2005). TNF- α führt zur Up-Regulation von Syndecan-2 und zur Down-Regulation von Syndecan-1 in Endothelzellen (Halden et al. 2004). TGF- β bewirkt eine Hochregulation von Syndecan-4 sowie eine Verringerung von Syndecan-1 in Epithelzellen. In den glatten Muskelzellen der Aorta induziert FGF-2 die Syndecan-4 Expression, was bei Syndecan-1 und -2 nicht festzustellen ist. Syndecan-4 spielt als Co-Rezeptor für FGF-2 eine bedeutende Rolle. Außerdem scheint eine Veränderung in der Genexpression eines Syndecan-Familienmitgliedes die Expression der anderen zu beeinflussen (Tkachenko et al. 2005).

Zusammenfassend sind die Funktionen der Syndecane vielfältig. Ihnen wird eine bedeutende Rolle bei der Embryonal- und Organentwicklung zugeschrieben. Außerdem sind sie an zahlreichen pathophysiologischen Prozessen (Wundheilung, Tumorbildung, Nierenerkrankungen etc.) beteiligt (Patterson et al. 2008). Auf zellulärer Ebene sind sie wichtige Partner bei der Adhäsion, Migration, der Zelldifferenzierung sowie der -proliferation (Zimmermann et al. 1999, Tkachenko et al. 2005). Die Syndecane sind außerdem involviert in infektiöse Prozesse und nehmen an Vorgängen der Blutgerinnung sowie des Lipidstoffwechsels teil (Zimmermann et al. 1999).

1.1.8 Syndecan-4

Jedes Mitglied der Syndecan-Familie erhält seine strukturelle Spezifität durch die extrazelluläre Domäne und die einzigartige variable Region der kurzen zytoplasmatischen Domäne.

Die extrazelluläre Domäne des Syndecan-4-Proteins besitzt eine Zellbindungsregion, die die Bindung von FGF2 an die HS-Ketten vermittelt. Syndecan-4 ist somit an der Modulation der FGF2-induzierten Zellmigration und -proliferation beteiligt. Die anderen Syndecane weisen diese Besonderheit nicht auf (McFall et al. 1997, 1998; Volk et al. 1999).

Syndecan-4 unterscheidet sich außerdem in seinem Aufbau von den anderen Mitgliedern der Syndecan-Familie, indem die zytoplasmatische Domäne die Fähigkeit besitzt, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP2) zu binden und die Proteinkinase C α (PKC α) zu aktivieren (Simons et al. 2001).

Die Expression von Syndecan-4 wird in allen Stadien der embryonalen Entwicklung und in den meisten adulten Geweben gefunden (Kim et al. 1994, Wilcox-Adelman et al. 2003). In Mäuseembryonen konnte gezeigt werden, dass Syndecan-4 in den Wirbeln, Rippen, der Schädelbasis, den Haarfollikeln, Barthaaren, Speicheldrüsen, Nieren, Lungen, im Herzen und der Harnblase vorkommt (Wilcox-Adelman et al. 2003). Adultes Gewebe exprimiert in hohem Maße Syndecan-4 in der Leber, Niere und Lunge, während im Herzen und Gehirn geringe Mengen exprimiert werden (Kim et al. 1994, Tsuzuki et al. 1997). Syndecan-4 wird auch von vielen Zellen exprimiert, die an inflammatorischen Reaktionen beteiligt sind. Es kommt auf B-Lymphozyten (Yamashita et al. 1999), Makrophagen (Yeaman et al. 1993), neutrophilen Granulozyten (Kaneider et al. 2001) und Monozyten des peripheren Blutes vor (Kaneider et al. 2002). Es ist also ubiquitär im Organismus vertreten (Simons et al. 2001).

Wachstumsfaktoren wie TGF- β 2 führen zu einer Hochregulation von Syndecan-4 in epithelialen Zellen, während FGF-2 die Expression von Syndecan-4 in glatten Muskelzellen der Aorta induziert (Tkachenko et al. 2005). Hypoxische Mäusekardiomyozyten sezernieren TNF- α , welches wiederum die Syndecan-4 Expression auf Endothelzellen bewirkt (Zhang et al. 1999). Syndecan-4 ist außerdem an Heilungsprozessen beteiligt (Zhang et al. 1999, Wilcox-Adelman et al. 2003).

Andere Studien lassen vermuten, dass Syndecan-4 bei der Bekämpfung von physikalischem Stress und/oder für die Aufrechterhaltung der Homeostase von Bedeutung ist (Wilcox-Adelman et al. 2003). Syndecan-4-defiziente Mäuse zeigen eine Verzögerung in der Heilungsphase von Wunden und einen Defekt in der Angiogenese von Granulationsgewebe. Das wird an der veränderten Größe der infiltrierenden Blutgefäße deutlich. In vitro-Wundheilungsstudien bestätigen, dass dermale Fibroblasten von Syndecan-4 knockout-Mäusen langsamer wandern als die von ihrem Wildtyp (Echtermeyer et al. 2001).

In Fibroblasten vom Wildtyp vermittelt Syndecan-4 die Matrix-induzierte PKC-abhängige Aktivierung von Rac1. Es reguliert die Rac1-Aktivität und hilft bei der Ausrichtung der Membran zur führenden Zellseite, was zu einer persistierenden und gerichteten Migration der Zelle führt. Fibroblasten dagegen, die keine Syndecan-4-Expression aufweisen, wandern wahllos und nicht zielgerichtet (Bass et al. 2007).

Bei renalen Erkrankungen scheint die Syndecan-4 Expression ebenfalls von Bedeutung zu sein. Mäuse, bei denen Syndecan-4 nicht gebildet wird, versterben frühzeitig an obstruktiver Nephropathie (Ishiguro et al. 2001).

Da der zytoplasmatische Anteil von Syndecan-4 in der Lage ist, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) zu binden und die Proteinkinase C α zu aktivieren (s.o.), wird angenommen, dass Syndecan-4 Signalfunktionen übernimmt (Simons et al. 2001, Horowitz et al. 2002). Dass Syndecan-4 möglicherweise an der Übertragung von Signalen beteiligt ist, wird vermutet, da es ein Bestandteil bei der Ausführung fokaler Adhäsionen ist, bei denen extrazelluläre Matrixproteine Signale induzieren und die Inkorporation von Syndecan-4 dabei durch die PKC α reguliert wird (Woods et al. 1994, Baciú et al. 1995).

Die Anwesenheit von PIP₂, während die PKC α an die zytoplasmatische Region von Syndecan-4 bindet und somit aktiviert wird, liefert einen weiteren Hinweis dafür, dass das Kernprotein von Syndecan-4 an der zellulären Signaltransduktion mitwirkt (Oh et al. 1997). Seine Signalfunktion wird ebenfalls bei der Modulation der Aktivität von Antithrombin III in Bezug auf die Leukozytenchemotaxis deutlich (Götte 2003).

Syndecan-4 ist der Hauptvermittler, wenn es um die Ausbildung einer Fibronectin-induzierten fokalen Adhäsion geht (Bass et al. 2007). Fokale Adhäsionen und Aktin-Fibrillenbündel werden erst dann von Fibroblasten gebildet, wenn diese nach Inkubation von Antikörpern gegen die extrazelluläre Domäne von Syndecan-4 an die Zellbindungsdomäne von Fibronectin gebunden haben. Die Bildung Syndecan-4-abhängiger fokaler Adhäsionen und Fibrillenbündel hängt von einem Rho-abhängigen Mechanismus ab (Saoncella et al. 1999). Das Ausbleiben der Signalgebung durch Syndecan-4 leitet einen Caspase-vermittelten Apoptosevorgang ein (Jeong et al. 2001).

Syndecan-4 ist an der Aktivierung zahlreicher Signalmoleküle beteiligt, die den Vorgang der fokalen Adhäsion beeinflussen (Bass et al. 2002). Hierzu gehört nicht nur die direkte Aktivierung der Proteinkinase C α mit Hilfe von PIP₂ (Oh et al. 1997), sondern ebenfalls die Aktivierung der Focal Adhesion Kinase (FAK) oder heparinbindender Liganden (Wilcox-Adelman et al. 2002) sowie die Regulation von Rac1 (Bass et al. 2007).

Wie bereits oben erwähnt, besteht eine enge Verbindung zwischen der Expression von Wachstumsfaktoren und der Syndecan-4 Expression. Syndecan-4 ist als stark negativ geladenes Molekül in der Lage verschiedene Wachstumsfaktoren zu binden. Es ist somit an der Bildung eines Zytokingradienten beteiligt und nimmt an der Regulation lokal begrenzter Entzündungsreaktionen teil. Wenn Syndecan-4 nicht exprimiert wird, kann dies zur einer Sepsis führen. Ishiguro et al. konnten dies an einem Mäusemodell nachweisen (Ishiguro et al. 2003).

Die Beteiligung von Syndecan-4 an einer Reihe von Prozessen sowie seine Expression bei verschiedenen pathologischen Vorgängen veranlasste uns zu der Annahme, dass Syndecan-4 auch bei der aseptischen Prothesenlockerung von Bedeutung ist.

2. MATERIAL UND METHODEN

Materialien

2.1.1 Biopsie- und Patientenkollektiv

Das Gewebe für die immunhistochemischen Untersuchungen und zur Herstellung der Zellkulturen wurde im Rahmen von Prothesenwechseloperationen an der Orthopädischen Klinik der Universitätsklinik Magdeburg während eines Zeitraums von 2007 bis 2008 gewonnen.

Beim Patientenkollektiv handelte es sich hauptsächlich um Patienten mit einer aseptischen Prothesenlockerung von Knie- oder Hüftprothesen. Im Rahmen der Wechseloperationen wurde das periprothetische Granulationsgewebe entfernt und ein Teil davon zur histopathologischen Aufbereitung bzw. Untersuchung in das Institut für Pathologie geschickt. Im Zugschnittlabor wurden daraufhin mehrere Paraffinblöcke angefertigt und diese später weiterverarbeitet.

Ein kleiner Teil des entnommenen Gewebematerials, der nicht für diagnostische Zwecke benötigt wurde und ansonsten verworfen worden wäre, wurde im Labor der Pathologie zur Anfertigung von Zellkulturen von Prothesenlockerungsfibroblasten (PLFs) genutzt. Neben den PLFs wurden Synovialfibroblasten der Osteoarthritis und Rheumatoiden Arthritis aus Geweben von Patienten isoliert, die sich aufgrund einer Rheumatoiden Arthritis bzw. einer Osteoarthritis einer Operation unterziehen mussten.

Die Gewebsentfernung gehörte u.a. zur routinemäßigen Vorbereitung für die erneute Implantation einer Prothese. Es handelte sich hierbei daher nicht um Material, das speziell für diese Forschungsarbeit entnommen wurde.



Abbildung 4: Makroskopische Aufnahme des periprothetischen Gewebes

Methoden

2.1.2 Histologische Methoden

2.1.2.1 Fixierung

Zur Fixation des eingesandten Gewebes wurde als Standardlösung 10%iges Formalin verwendet, das durch Verdünnung aus einer Stammlösung hergestellt wurde. Zur Pufferung wurde Phosphat-Puffer eingesetzt. Durch die Fixierung wurde das Gewebe haltbar und ließ sich somit weiterverarbeiten.

2.1.2.2 Paraffineinbettung

Für die Paraffinhistologie musste das Gewebe entwässert und entfettet werden, erst dann ließ sich das Gewebe mit Paraffin durchtränken und wurde für die Histologie schneidbar. Der Einbettungsprozess erfolgte im Automaten über Nacht. Zur Entwässerung diente Ethanol in absteigender Konzentration (100 %-100 %-96 %-75 %). Zusätzlich musste das Material mit Xylol entfettet werden.

2.1.2.3 Schneiden der Blöcke

Das in Paraffin eingebettete Gewebe wurde von den medizinisch-technischen Assistentinnen am Rotationsmikrotom in hauchdünne Scheiben geschnitten, damit bei der Durchlichtmikroskopie ein scharfes und überlagerungsfreies Bild entstand. Die Dicke der Schnitte betrug ca. 2 bis 5 µm. Es wurden dabei mehrere Schnitte hintereinander ausgeführt, so dass Serienschnitte entstanden.

2.1.2.4 Immunhistochemie

Von den Paraffinblöcken wurden insgesamt jeweils vier Serienschnitte hergestellt. Um ein fast identisches morphologisches Bild zu erhalten, wurden möglichst dünne Schnitte angefertigt.

Die Sichtbarmachung bestimmter Gewebsstrukturen erfolgte mittels der Routinefärbung Hämatoxylin-Eosin und speziellen Antikörperfärbungen gegen Vimentin, CD68 und Syndecan-4.

Antikörper	Host	Firma	Verdünnung	Vorbehandlung	Methode
Vimentin	Mouse	Dako	1:500	cc1 mild	XT DAB
CD68	Mouse	Dako	1:3000	cc1 mild	XT DAB
Syndecan-4	Rabbit	Santa Cruz	1:50	20 min. mit Protease	Nexes iView AB

Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE):

Die Hämatoxylin-Eosin-Färbung ist die Standardfärbung für die Routine des histologischen Labors. Aufgrund der unterschiedlichen Ladung beider Farbstoffe werden unterschiedliche Strukturen in der Zelle angefärbt. Der blaue Farbstoff Hämatoxylin hat dabei als basischer Farbstoff eine Affinität zu den negativ geladenen Ribonukleinsäuren (DNA und RNA) und färbt die Kerne blau an. Die Proteine des Zytoplasmas und das extrazellulär gelegene Kollagen werden durch den sauren Farbstoff Eosin rot angefärbt (Turzynski 2001-2007).

Vimentin:

Vimentin ist ein filamentäres Protein, also ein Bestandteil des Zytoskeletts. Es handelt sich um ein Intermediärfilamentprotein vom Typ III. Es kommt in mesenchymalen Zellen wie u.a. Fibroblasten, Chondrozyten, Osteozyten, Endothelien vor. Es wird generell in Sarkomen gebildet und als übergeordneter Marker für Weichgewebstumoren eingesetzt (Turzynski 2001-2007).

CD68:

Dieser Antikörper erkennt das Antigen CD68. Er gehört zu einer Familie lysosomaler Glykoproteine. CD68 ist auf einer Reihe von Zellen zu finden, so z.B. auf Makrophagen, Monozyten, neutrophilen und basophilen Granulozyten, Kupffer-Sternzellen etc. CD68-positive Makrophagen sind in einem aktivierten Zustand (Peters et al. 2008, Santa Cruz Biotechnology 2008).

Syndecan-4:

Der polyklonale Antikörper Syndecan-4 (H146) dient dem Nachweis der Ektodomäne des menschlichen Syndecan-4 (Santa Cruz Biotechnology 2008).

2.1.2.5 Antikörperfärbungen

Die immunhistochemischen Antikörperfärbungen gegen Vimentin, CD68 und Syndecan-4 wurden mit Hilfe von Färbeautomaten durchgeführt. Die Färbungen erfolgten nach vorgefertigten Protokollen des Herstellers (siehe Anhang).

2.1.3 Zellbiologische Methoden

2.1.3.1 Isolation von Fibroblasten mit Hilfe des Enzyms Dispase II

Materialien:

Dispase II (Cat No 165859, 5g, Roche Diagnostics)

DMEM ohne Zusätze

500 ml DMEM Biochrom + 5 ml HEPES (1 M, pH 7,4)
+ 50 ml FCS 20%
+ 5 ml Amphotericin
+ 5 ml Penicilin/Streptomycin 10.000U/10.000µg/ml -> in 5 ml
Aqua dest

Zur Vorbereitung wurden bei 37°C 75 mg Dispase II mit 50 ml Medium (DMEM ohne Zusätze) verdünnt. Beide Substanzen wurden in ein 50 ml Röhrchen gefüllt. Das zu bearbeitende Gewebe wurde in der Zwischenzeit in eine sterile Petrischale überführt. 5 ml der hergestellten Verdünnung von Dispase II und dem Medium DMEM wurden dem Gewebe zugefügt. Für das weitere Vorgehen musste das Gewebe mit Hilfe des sterilen Skalpells zerkleinert werden. Anschließend filtrierte man das Gewebe durch den 0,2 µm Fiter in ein 50 ml Röhrchen und füllte es mit 15 – 20 ml Dispase-DMEM-Lösung auf. Das Röhrchen wurde mit dem gesamten Inhalt für eine Stunde bei 37°C inkubiert, während es kontinuierlich geschüttelt wurde.

Zur Herstellung eines Pellets wurde die Zellsuspension bei 400 Umdrehungen pro Minute für 5 min. bei 22°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde 1x mit PBS gewaschen, und anschließend wurden 5 ml DMEM plus Zusätze dazugegeben. Der gesamte Inhalt wurde in eine 25 cm² große Kulturflasche pipettiert. Die Aufbewahrung erfolgte in einem Brutschrank bei 37°C.

Die Isolation der OASFs und RASFs wurde auf die gleiche Weise durchgeführt.

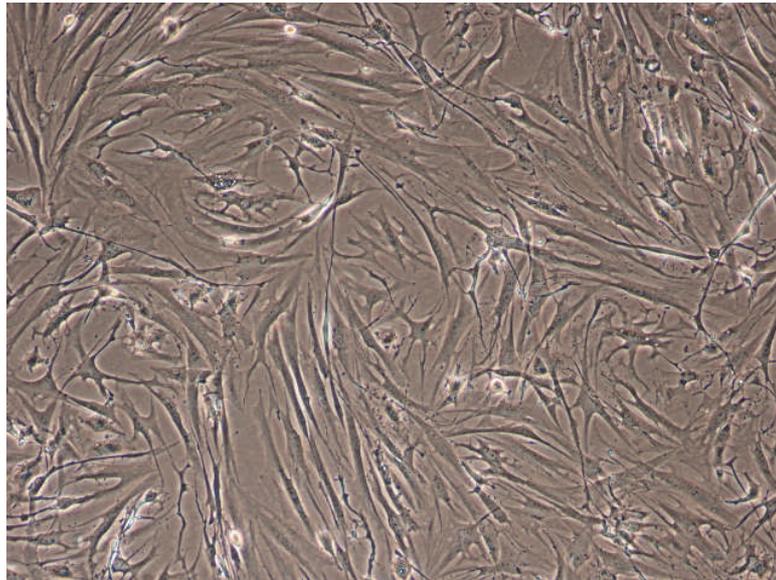


Abbildung 5: Kultivierte Prothesenlockerungsfibroblasten (PLFs)

2.1.3.2 Mediumwechsel und Umsetzen der Primärkulturen

Die Prothesenlockerungsfibroblasten vermehrten sich in den Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 5 % CO₂ und einer Temperatur von 37°C. Der Mediumwechsel erfolgte am ersten Tag mit DMEM plus Zusätze. Danach wurde das Medium in größeren Zeitabständen (alle 7 – 10 Tage) ausgetauscht.

Bei ausreichendem Wachstum konnten die Zellkulturen in 75 cm² große Zellkulturflaschen umgesetzt werden. Dazu wurde das Medium vollständig mit einer sterilen Pipette entfernt und verworfen. Durch Zugabe von 6 ml PBS wurden die Zellen für 5 min. gewaschen. Das PBS wurde entfernt und 1 ml Trypsin in die Flasche pipettiert. Nach weiteren 5 min. bei 37°C im Brutschrank ließen sich die Zellen durch Beklopfen der Flasche vom Boden ablösen. Der gesamte Inhalt wurde in 15 – 18 ml DMEM plus Zusätze aufgenommen und mit einer Pipette in eine größere sterile Zellkulturflasche umgesetzt. Das identische Prozedere erfolgte bei den kultivierten OASFs und RASFs.

2.1.3.3 Invasionsassay

Das Invasionsassay ist ein von Repesh (1989) entwickeltes Testverfahren, in dem die Invasion von Tumorzellen in einem *in vitro* Modell dargestellt wurde. Hierbei wurde ein mit Matrigel beschichtetes Transwell chamber benutzt. In unserem Fall wurde anstelle von Matrigel Kollagen Typ I als Beschichtung der Filter verwendet.

Vorbereitung der Transwelleinsätze

Das Kollagen wurde langsam auf Eis aufgetaut. Zur Beschichtung der Transwelleinsätze wurden das Kollagen und das Kulturmedium im Verhältnis 1:4 benötigt. Die entsprechende Verdünnung musste angesetzt und in die Einsätze pipettiert werden. Die beschichteten Filter mussten nun für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur ruhen.

Ansetzen des Invasionsassays

In der Zwischenzeit wurden die Zellen (PLFs, OASFs, RASFs) vorbereitet. Das Medium wurde aus den Zellkulturflaschen entfernt. Das Waschen der Zellen erfolgte für 5 min. mit 10 ml PBS. Nachdem das PBS abpipettiert wurde, wurden die Zellen mit 2,5 ml Trypsin-EDTA vom Flaschenboden abgelöst. Nach einer fünfminütigen Inkubation erfolgte der Lösungsvorgang, unterstützt durch das Beklopfen des Flaschenbodens. Die Zellsuspension wurde daraufhin in 7 ml DMEM-Medium durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren aufgenommen und in ein Röhrchen (Tube) gefüllt. Als Nächstes schloss sich die Zentrifugation des Tubes bei 1400 Umdrehungen pro Minute bei 20°C für 5 min. an. Am Boden entstand dadurch ein Zellpellet. Die Zellen wurden gezählt, und es wurde eine Verdünnung mit Medium angesetzt. Die Verdünnung betrug 1×10^5 Zellen/ml.

Aus den beschichteten Einsätzen wurde anschließend der Überstand an Kollagen und Medium entfernt. In die 24-Well-Platte kamen jeweils 500 µl DMEM und in den oberen Einsatz 300 µl der verdünnten Zellsuspension. Zum Schluss wurde die Transwell chamber mit den Einsätzen zusammen für 48 h bei 37°C inkubiert.

Das Ansetzen des Invasionsassays erfolgte während des gesamten Zeitraums unter sterilen Bedingungen auf der Werkbank.

Ernten der invasiven Zellen

Nach 48 h wurde das Kulturmedium entfernt. In die 24-Well-Platte wurde in jede Kammer 1 ml PBS gegeben, um die Unterseite des Einsatzes zu waschen. Nach 5 min. wurde das PBS abpipettiert, und 500 µl Trypsin/EDTA-Lösung wurden zum Lösen der Zellen in die Kammern gefüllt. Die Trypsin/EDTA-Lösung wurde nach 1 min. abgenommen und die Platte bei 37°C für 5 min. inkubiert. Dann erfolgte der Vorgang des „Erntens“. Die Zellen an der Unterseite der Einsätze wurden mit 500 µl PBS abgespült. Die 500 µl der Zellsuspension kamen in ein Zählgefäß, das mit 9,5 ml isotonische Kochsalzlösung aufgefüllt wurde. Zum Schluss erfolgte die Zählung der Zellen im Coulter Counter. Das Verhältnis zur Gesamtzellzahl (Kontrollplatte) liefert den prozentualen Anteil invasiver Zellen. Alle Bestimmungen wurden dreifach durchgeführt.

2.1.4 Molekularbiologische Methoden

2.1.4.1 Isolation von Gesamt-RNA aus kultivierten Zellen

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus den Zellkulturen wurde das High Pure RNA Isolation Kit von der Firma Roche verwendet.

Die isolierten und kultivierten Zellen wurden zu Beginn der RNA-Präparation in 200 µl PBS resuspendiert. Es wurden 400 µl Lysis/-Binding Puffer hinzugefügt, und das Röhrchen wurde mit dem gesamten Inhalt für 15 s geschüttelt. Um den Inhalt in ein high pure filter tube zu überführen, musste zunächst ein high pure filter tube auf ein collection tube gesteckt werden. Anschließend wurden 700 µl der Zellsuspension in das obere filter tube pipettiert. Beide Röhrchen kamen in eine Zentrifuge und wurden zusammen für 15 s bei 8000 x g zentrifugiert. Die filtrierte Flüssigkeit im collection tube wurde verworfen.

Als Nächstes wurden 90 µl DNase Inkubationspuffer und 10 µl DNase I in ein steriles Tube pipettiert und vermischt. Die gesamte Lösung wurde in das Filterröhrchen pipettiert, und beide Röhrchen wurden erneut bei Raumtemperatur für 15 min. inkubiert.

In den zwei folgenden Arbeitsschritten wurden einmal 500 µl Waschpuffer I und im nächsten Schritt 500 µl Waschpuffer II in das obere Reservoir des Filterröhrchens gegeben und das Ganze jeweils bei 8000 x g für 15 s zentrifugiert. Die filtrierte Flüssigkeit wurde jedes Mal verworfen.

Zum Abschluss wurde erneut mit 200 µl Waschpuffer II gewaschen und der Inhalt für 2 min. bei einer maximalen Geschwindigkeit von 13.000 x g zentrifugiert, um den restlichen Waschpuffer zu entfernen.

Das benutzte Collection Tube wurde verworfen und das Filter Tube in ein steriles 1,5 ml Mikrozentrifugationsröhrchen gesteckt. Um die RNA zu eluieren, wurden 50 µl Elution Puffer ins Filterröhrchen pipettiert und der Inhalt bei 8000 x g für 1 min. zentrifugiert. Das Mikrozentrifugationsröhrchen enthielt somit die isolierte RNA.

Die isolierte RNA konnte direkt für die RT-PCR verwendet oder für spätere Analysen bei -80°C gelagert werden. Alle Arbeiten mit der RNA wurden unter RNase-freien Bedingungen durchgeführt. Es wurden grundsätzlich immer Handschuhe getragen.

2.1.4.2 Quantifizierung der RNA

Zur Kalibrierung des Photometers wurden 70 µl DEPC benötigt. Anschließend konnte die Messung der RNA beginnen. Dazu wurden 65 µl DEPC und jeweils 5 µl der gewonnenen RNA vermischt. Die gesamten 70 µl wurden in eine saubere Küvette pipettiert und zentrifugiert. Die Messung der RNA erfolgte dann mit Hilfe des Eppendorf - Photometers.

Danach wurde die Konzentration der RNA berechnet mit der Gleichung:

$$(c \times \mu\text{g} / \text{ml} \times 70) / 1000 = \mu\text{g} / \mu\text{l}$$

und

$$2\mu\text{g} / X \times \mu\text{g}/\mu\text{l} = X \mu\text{IRNA}$$

2.1.4.3 RNA-Agarosegelelektrophorese

Zur Herstellung des 1,5%-igen denaturierenden Formamidgels mussten 1,5 g Agarose in der Mikrowelle gelöst werden. Anschließend erfolgte eine Abkühlung auf 50°C. Danach wurden 10 ml 10x MOPS und 17 ml Formaldehyd (37 %) hinzugefügt. Das Ganze wurde auf 100 ml mit DEPC-Wasser aufgefüllt. Bevor das Gel unter dem Abzug gegossen werden konnte, mussten die Materialien gut vermischt werden.

Zur Probenvorbereitung wurden 5 µg der RNA-Probe mit 12,5 µl Formamid, 2,5 µl 10x MOPS sowie 4 µl Formaldehyd vermischt und für 5 min. bei 65°C denaturiert. Anschließend wurde das Ganze mit Probenpuffer versetzt. Die Probe konnte dann auf das vorbereitete Gel aufgetragen werden. Als Laufpuffer diente hierbei 1x MOPS-Puffer. Der Lauf der Gele erfolgte bei 20 - 100 V bis maximal 8 V/cm Laufstrecke.

2.1.4.4 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wurde die isolierte RNA durch das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben.

Zunächst mussten alle gefrorenen Reagenzien aufgetaut und kurz zentrifugiert werden, bevor sie verwendet werden konnten. Während der gesamten Arbeitsschritte wurden die nicht verwendeten Reagenzien auf Eis gelagert.

Anschließend wurde auf Eis in einem sterilen PCR-Röhrchen die Primermixtur hergestellt. Für eine Reaktion von 20 µl mussten verschiedene Komponenten zusammengefügt werden (siehe Anhang).

Die Reagenzien wurden vorsichtig im Röhrchen vermischt, bevor es in den Thermal Block Cycler kam. Anschließend wurde das Röhrchen für 30 min. bei 55°C inkubiert.

Um die Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase zu inaktivieren, wurde der gesamte Inhalt des Röhrchens für 5 min. bis 85°C erhitzt. Die Reaktion wurde beendet, indem das Röhrchen auf Eis gelagert wurde. Die gewonnene cDNA konnte dann direkt für die PCR verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

2.1.4.5 Oligonukleotide und Vektoren (Plasmide)

Die PCR-Oligonukleotide wurden von der Firma Invitek BZW: BioTeZ (Berlin), die anti-sense (as) bzw. non-sense (ns) Oligonukleotide von der Firma Sigma Genosys (Taufkirchen) synthetisiert.

Bezeichnung	Sequenz 5' → 3'	Orientierung/ Modifizierung	Annealing- Temperaturen T _m
TNF α (219 bp)	5' GCT CTG GAG AGC AAA CAC GGA C 3' 5' GCT GAG GAG AGG CAC ATG GAA G 3'	sense anti-sense	56°C
Syn-4 (201 bp)	5' CGG GCA GGA ATC TGA TGA CTT TGA 3' 5' GCT TCA CGC GTA GAA CTC ATT GTT 3'	sense anti-sense	54°C
18sRNA (186 bp)	5'CGG CTA CCA CAT CCA AGG3' 5'GCT GGA ATT ACC GCG GCT3'	sense anti-sense	60°C

Die Plasmid-Präparation wurde vom Personal des Labors des Instituts für Pathologie durchgeführt. Die Präparation der Plasmid DNA erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.1.4.6 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die gewonnene DNA-Lösung wurde mit DEPC-Wasser 1:50 verdünnt. Die Extinktion wurde mittels Spektralphotometer bei 260 nm bestimmt. Durch die Gleichung: $1E_{260} = 50 \mu\text{g/ml}$ dsDNA ergab sich die Konzentration.

2.1.4.7 Plasmidverdünnung – Kopienberechnung

Die Mitführung einer Standardverdünnungsreihe mit bekannter Konzentration an eingesetzten DNA-Molekülen ermöglichte die genaue Quantifizierung der cDNA-Moleküle jeder Probe. Die Kopienzahl berechnete sich folgendermaßen:

PCR-Produktlänge: 447 bp
Vektorgröße: 3900 bp
Summe: 4347 bp

1 Basenpaar hat ein Molekulargewicht von 660 g
1 Mol enthält $6,02 \times 10^{23}$ Moleküle (Avogadro-Konstante)
 $(4347 \text{ bp} \times 660 \text{ g}) / 6,02 \times 10^{23} = 4,76 \times 10^{-18} \text{ g/Kopie}$
Plasmidkonzentration: $6,88 \times 10^{-7} \text{ g}$

1 Kopie: $4,76 \times 10^{-18} \text{ g}$

X Kopien: $6,88 \times 10^{-7} \text{ g}$

$X = (6,88 \times 10^{-7} \text{ g} \times 1 \text{ Kopie}) / 4,76 \times 10^{-18} \text{ g} = 1,4 \times 10^{11} \text{ Kopien} / 2\mu\text{l}$

2.1.4.8 Quantitative Real-Time PCR am Light Cycler

Der Light Cycler gehört zu den schnellsten Thermocyclern und ist mit einem Microvolumen-Fluorimeter kombiniert. Unter Einsatz des Light Cyclers sind PCRs mit 30-40 Zyklen in weniger als 30 min. möglich. Außerdem wird durch den Einbau eines Fluophores in das entstehende PCR-Produkt und Fluoreszenz-Monitoring die Analyse und Quantifizierung der Ergebnisse bei laufender Amplifikation (Real-Time- oder auch sog. Echtzeit-PCR) möglich. In dieser Arbeit wurde von den Fluophoren SYBR Green I verwendet.

Das Fluoreszenz-Signal von SYBR Green I wird bei 530 nm gemessen und steigt proportional zur Menge des PCR-Produktes. Eine abschließende Schmelzkurvenanalyse erlaubt die genaue Schmelzpunktbestimmung und somit die Charakterisierung des PCR-Produktes.

Das PCR-Programm bestand aus folgenden Schritten:

Prädenaturierung	30 s	94°C	20°C/s
Amplifikation: 35-40 Zyklen, Synthesegeschwindigkeit: 23 b/s	0 s	94°C	20°C/s
	10s	T_m	20°C/s
	t	72°C	20°C/s
Schmelzkurve	0 s	95°C	20°C/s
	15 s	$(T_m+5-10^\circ \text{ C})$	20°C/s
	0 s	95°C	0,1°C/s
Abkühlen	30 s	40°C	20°C/s

Die Mitführung einer Standardverdünnungsreihe mit bekannter Konzentration an eingesetzten DNA-Molekülen ermöglicht eine genaue Quantifizierung der cDNA-Moleküle jeder Probe.

Zur Herstellung eines spezifischen Standards wurde im Vorfeld das zu analysierende PCR-Fragment in einen geeigneten Vektor kloniert, und man lässt mindestens 3 Verdünnungsstufen des Plasmids als Standard bei jedem Lauf mitamplifizieren.

Der Abgleich der mRNA-Mengen untereinander erfolgt durch Amplifikation eines Haushaltsgens (z. B. 18S rRNA) mit entsprechendem Standard im Parallelansatz. Durch die Bildung

des Quotienten aus der Molekülzahl der zu analysierenden cDNA bzw. mRNA und der Molekülzahl des Haushaltsgens lassen sich die einzelnen Proben untereinander vergleichen.

Zu Beginn mussten alle Reagenzien aufgetaut und auf Eis gestellt werden. Das Ausgangsplasmid wurde verdünnt, so dass eine Verdünnung von 10^{-4} entstand. Anschließend wurden die Reagenzien des Mastermixes zusammen pipettiert.

18 μ l des Mastermixes wurden in jede Glaskapillare gefüllt. 2 μ l der Probe mit der entsprechenden cDNA kamen hinzu. Für die Leerwertbestimmung war es in diesem Fall Wasser, und zur Plasmidbestimmung waren es 2 μ l der Plasmidverdünnung. Am Ende enthielt eine Kapillare ein Gesamtvolumen von 20 μ l.

Die Kapillaren wurden verschlossen und bei 1000 Umdrehungen pro min. zentrifugiert. Die Glaskapillaren wurden dann in den Rotor gestellt, und der Light Cycler konnte gestartet werden.

2.1.4.9 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Herstellung des Gels wurden 1 g Agarosegel und 100 ml 1x TBE zusammengebracht. Beides wurde in der Mikrowelle für 2 bis 3 min. gekocht, dabei musste sich das Pulver vollständig lösen. Unter kaltem Wasser wurde das Ganze kurz abgekühlt, bevor 5 μ l Ethidiumbromid hinzugefügt wurden. Anschließend konnte das Gel in den Gelträger gegossen werden. Der Kamm wurde eingeführt und das Gel zum Aushärten stehen gelassen.

Zur Vorbereitung der DNA-Proben wurden zunächst 5 μ l des DNA Loading Puffers in 1,5 ml Tubes pipettiert. Nach der Amplifizierung im Light-Cycler wurden Glaskapillaren in die Tubes invertiert und anschließend bei 1000 Umdrehungen pro min. zentrifugiert. Die Tubes enthielten damit die DNA-Fragmente. Die Glaskapillaren wurden verworfen. Bevor der Lauf gestartet werden konnte, wurden 12,5 μ l der Suspension in die Taschen des Agarosegels pipettiert. In die erste Tasche des 2-%igen Agarosegels kam der Marker Hyperladder IV. Die Elektrophorese erfolgte bei 50- 100 V.

2.1.5 Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate

Die lichtmikroskopische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Serienschritte erfolgte bei Vergrößerungen von 4- bis 40-fach. Es wurden zu Beginn zwei Ausschnitte des Präparates auf dem Objektträger mit der HE-Färbung markiert. Die entsprechenden Markierungen wurden bei allen anderen Schnitten vorgenommen, die mit den Antikörpern gegen Vimentin, CD68 und Syndecan-4 gefärbt wurden. Das wurde auf diese Weise durchgeführt, um jeweils zwei möglichst identische Ausschnitte eines Präparates auszuwerten.

Die Auswertung erfolgte in 40-facher Vergrößerung, indem das Gesichtsfeld in vier Quadranten eingeteilt wurde. Die Quadranten wurden daraufhin im Uhrzeigersinn ausgewertet.

Es wurde jede Zelle, die z.B. eine Vimentin-Färbung aufwies, als positiv bewertet, ungeachtet der Intensität der Braunfärbung. Das Verhältnis der Vimentin-positiven Zellen zur Gesamtzellzahl wurde anschließend bestimmt. Dementsprechend erfolgte die Auswertung während des Mikroskopierens nach Auszählung und Abschätzung des Prozentsatzes der angefärbten Zellpopulation im Verhältnis zur nicht-angefärbten Population. Die weiteren Paraffinschnitte mit den Antikörperfärbungen gegen CD68 und Syndecan-4 wurden nach demselben Prinzip ausgewertet.

2.1.6 Auswertung der HE-Schnitte mit Hilfe des „Synovialitis Scores“

Neben der Auswertung der periprothetischen Membran nach dem Graduierungsschema nach Krenn und Morawietz (2006) erfolgte bei der histologischen Untersuchung eine Auswertung der routinemäßig gefärbten HE-Schnitte mit Hilfe des Synovialitis-Scores. Dieses ebenfalls von *Krenn und Morawietz* entwickelte Grading-System diente der Beurteilung von ursprünglich synovialen Gewebe.

Da es sich bei der Lockerungsmembran um ein heterogenes Gewebe handelt, wurde eine zusätzliche Auswertung mittels des Synovialitis-Scores durchgeführt, um der Frage nachzugehen, ob dieser Score zu einer weiteren Spezifizierung des Gewebes beitragen kann.

Es wurden zusätzlich zur Klassifikation der periprothetischen Membran daher drei weitere Merkmale untersucht: zum einen die synoviale Deckzellschicht, zum anderen die Zelldichte des synovialen Stromas und letztlich die Ausprägung des leukozytären Infiltrats. Den einzelnen Merkmalen wurden je nach Ausprägung Punktwerte von 0 bis 3 zugeordnet (0 = normal, 1 = leichtgradig, 2 = mäßiggradig, 3 = schwergradig). Bei Addition dieser Punktwerte ergab sich bei den HE-Schnittpräparaten eine Punktschme zwischen 0 und 9. Der daraus resultierende Synovialitis-Score wurde folgendermaßen interpretiert: 0 – 1 Punkte = keine Entzündung (keine Synovialitis), 2 – 3 Punkte = leichtgradige Entzündung (leichtgradige Synovialitis), 4 - 6 Punkte = mäßiggradige Entzündung (mäßiggradige Synovialitis), 7 – 9 Punkte = hochgradige Entzündung (hochgradige Synovialitis) (Krenn et al. 2011).

2.1.7 Statistische Analyse

Die Auswertung der erhobenen Daten erfolgte mit freundlicher Unterstützung von Frau Dipl.-Ök. B. Peters vom Institut für Biometrie und medizinische Informatik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg.

Für die statistische Analyse wurde das Statistikprogramm SPSS Version 17.0. verwendet. Es erfolgte die Bearbeitung mit einem Mittelwerttest (t-Test) und der einfaktoriellen Varianz-

analyse (ANOVA). Bei Mehrfachvergleichen kam der Bonferroni-Test zur Anwendung. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Bei Bedarf wurde bei stetigen Größen die Korrelation nach Pearson angewandt.

Mittelwerte und Standardabweichungen wurden außerdem unter Zuhilfenahme von Microsoft Excel® ermittelt.

3. ERGEBNISSE

Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

3.1.1 Patientenkollektiv

Zur immunhistochemischen Untersuchung wurden 50 Gewebeproben untersucht. Statistisch wurden Proben von 24 Patienten ausgewertet. Darunter befand sich Material von 16 weiblichen (67 %) und 8 männlichen (33 %) Patienten. Das entspricht einem Verhältnis weiblicher zu männlicher Patient von etwa 2 : 1.

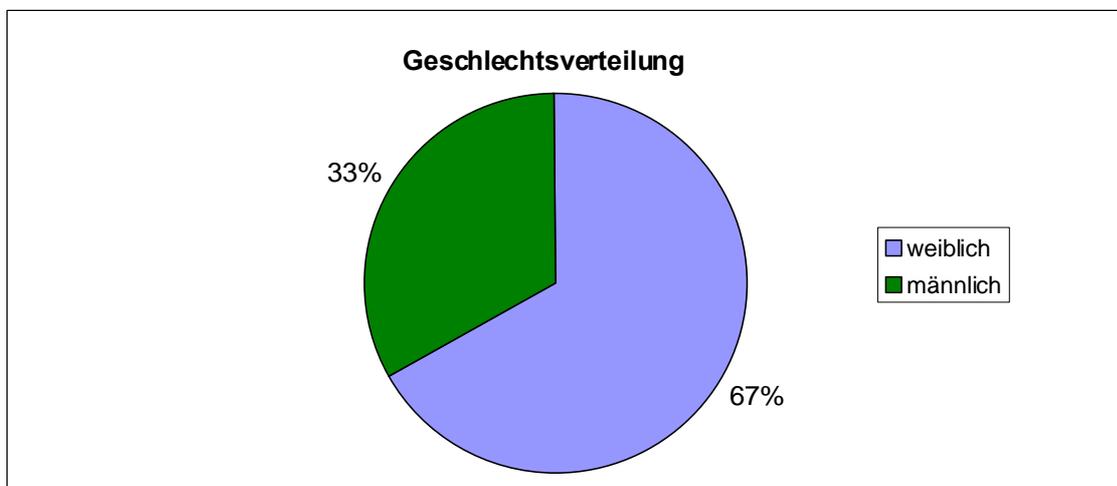


Abbildung 6: Geschlechtsverteilung innerhalb des Patientenkollektivs

Das Durchschnittsalter der Patienten betrug insgesamt 71,5 Jahre \pm 10,5 Jahre (Minimum 44 Jahre, Maximum 87 Jahre). Der Median lag bei 69 Jahren.

Der Altersdurchschnitt bei den weiblichen Patienten betrug 72,3 Jahre \pm 9,2 Jahre (Median 69 Jahre). Die jüngste Patientin war 56 Jahre alt. Das Alter der ältesten Patientin lag bei 87 Jahren. Bei den männlichen Patienten betrug das mittlere Alter 69,8 Jahre \pm 13,3 (Median 69,5 Jahre). Der jüngste Patient hatte ein Alter von 44 Jahren, während der älteste männliche Patient 87 Jahre alt war.

Bei 62,5 % der Patienten (n = 15) lag das Alter zwischen 60 und 79 Jahren. Etwa 29,2 % der operierten Männer und Frauen (n = 7) waren 80 Jahre und älter. Das Alter der restlichen Patienten 8,3 % (n = 2) lag zwischen 40 und 59 Jahren.

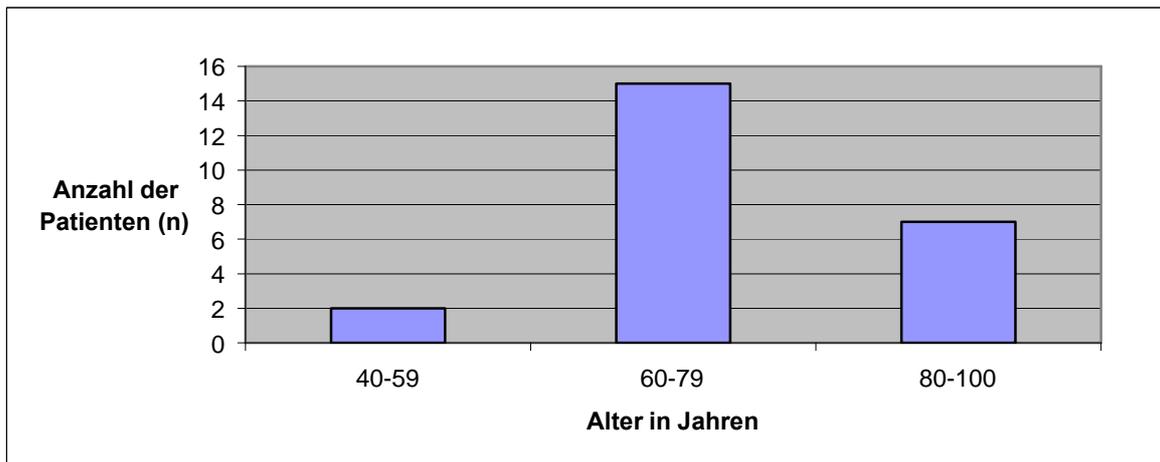


Abbildung 7: Altersstruktur des Patientenkollektivs

In der folgenden Abbildung ist die Altersverteilung innerhalb des Patientenkollektivs, nach dem Geschlecht unterteilt, dargestellt.

Die Mehrzahl der weiblichen und männlichen Patienten befand sich im Alter zwischen 60 und 79 Jahren. Bei den Prothesenträgerinnen waren es 68,8 % (n = 11), bei den männlichen Patienten 50 % (n = 4).

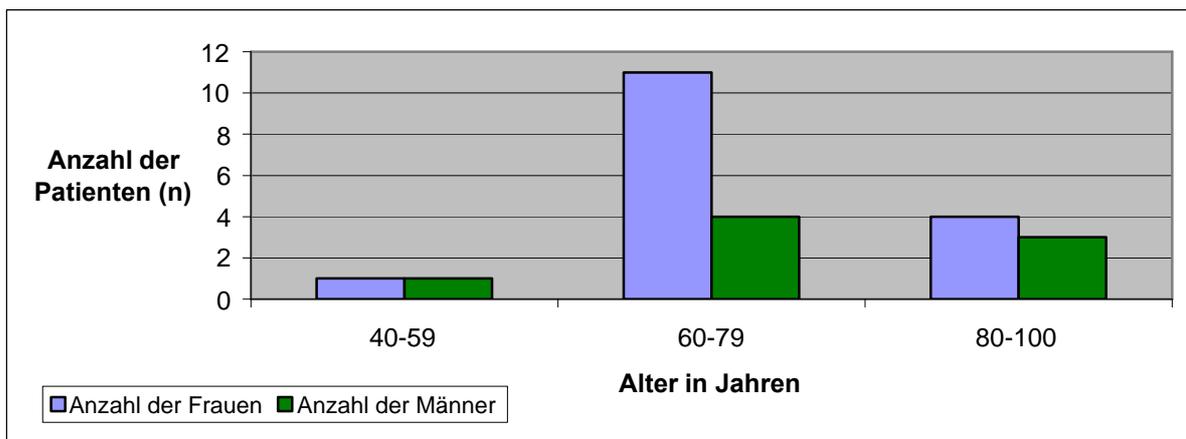


Abbildung 8: Altersstruktur des Patientenkollektivs, nach dem Geschlecht unterteilt

Bei dem Patientenkollektiv handelte es sich bei 24 Patienten um 18 Patienten mit einer aseptischen Prothesenlockerung (APL). Zwei Patienten hatten eine septische Prothesenlockerung. Bei diesen Patienten erzielte die mikrobiologische Untersuchung einen Keimnachweis im Punktat der Gelenkflüssigkeit. Sie wurden als positive Kontrollgruppe mit untersucht. Vier Patienten klagten über klinische Beschwerden einer Prothesenlockerung, bei jedoch einem radiologisch sowie intraoperativ fest sitzenden Implantat. Sie galten als Negativkontrollgruppe.

In unserer Arbeit waren die Patienten mit der Diagnose aseptische Prothesenlockerung (APL) von primärem Interesse.

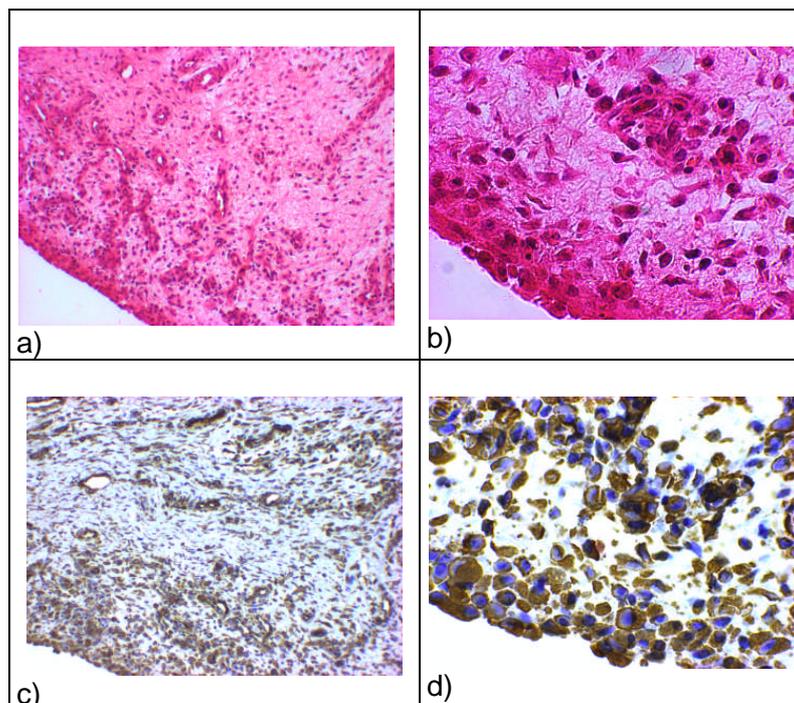
3.1.2 Syndecan-4 Expression in der periprothetischen Membran („Synovial-like interface membrane“) bei aseptischer Prothesenlockerung

Die periprothetische Membran zeigte bei 50 % der Präparate (n = 9) eine Färbung aller Zellen in zwei repräsentativen Ausschnitten mit dem Antikörper gegen Vimentin. Es wurde jeweils der Mittelwert aus den ermittelten Werten beider Ausschnitte für alle 18 Präparate bestimmt. Im Durchschnitt färbten sich $96,5 \% \pm 4,1 \%$ der Zellen (Minimum 90 %, Maximum 100 %) mit dem Antikörper gegen Vimentin.

Von den Vimentin-positiven Zellen waren wiederum im Mittel $58,3 \% \pm 30,1 \%$ CD68-positiv (Minimum 10 %, Maximum 100 %), während im Mittel bei $41,7 \% \pm 30,1 \%$ der Vimentin-positiven Zellen (Minimum 0 %, Maximum 90 %) keine Anfärbbarkeit für CD68 nachgewiesen werden konnten.

Im letzten Schritt erfolgte die Bestimmung der Syndecan-4 Expression bei CD68-positiven Zellen. Hier ließ sich bei den vorliegenden Präparaten im Durchschnitt bei etwas weniger als der Hälfte der CD68-positiven Zellen eine Syndecan-4 Expression nachweisen (Mittelwert $46 \% \pm 18,5 \%$; Minimum 11,3 %, Maximum 82,5 %).

Die folgende Abbildung zeigt an einem Präparat die unterschiedlichen Färbungen bei verschiedenen Vergrößerungen unter dem Mikroskop.



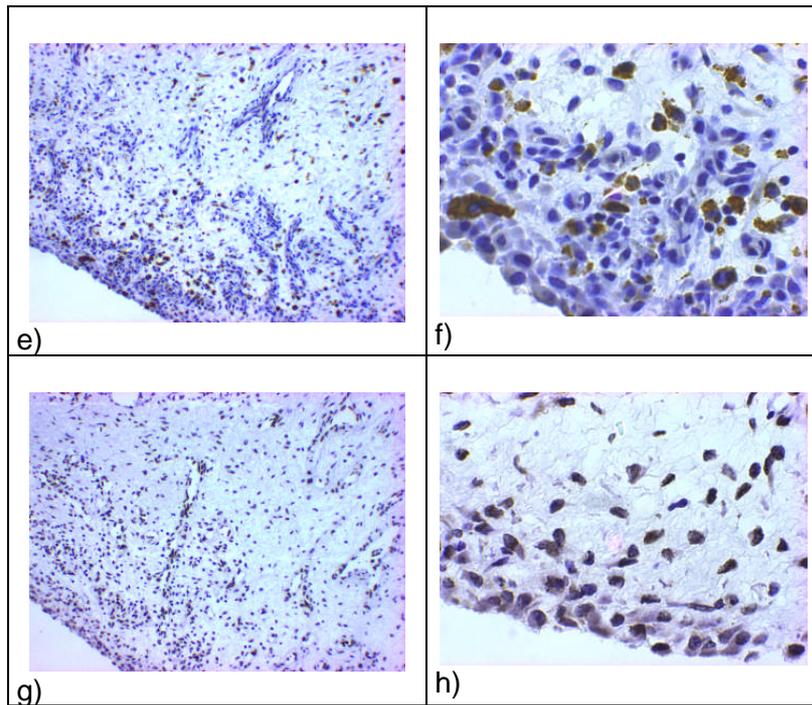


Abbildung 9: Histologische Schnittpräparate mit HE-Färbungen (a,b) und Antikörperfärbungen gegen Vimentin (c,d), CD68 (e,f) sowie Syndecan-4 (g,h) in 10facher und 40facher Vergrößerung bei einem Patienten mit APL

3.1.3 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit klinischen Daten

Die Datenerhebung erfolgte retrospektiv anhand von Patientenakten aus dem Archiv der Orthopädischen Klinik der Universitätsklinik Magdeburg. Es wurden die patientenbezogenen Daten gesammelt. Um einen klinischen Bezug herzustellen, sollte untersucht werden, ob eine Korrelation zwischen der Syndecan-4 Expression in den Zellen der periprothetischen Membran und den erhobenen klinischen Parametern der Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung bestand.

3.1.3.1 Prothesenstandzeit und Body Mass Index (BMI)

Als **Prothesenstandzeit** wird die Zeit bezeichnet, die zwischen der primären Implantation einer Knie- oder Hüftprothese und einer sekundären (Wechsel-)Operation liegt. Die durchschnittliche Standzeit der Endoprothesen der Patienten mit APL betrug 9,3 Jahre \pm 7,6 Jahre (Minimum 0,5 Jahre, Maximum 31 Jahre).

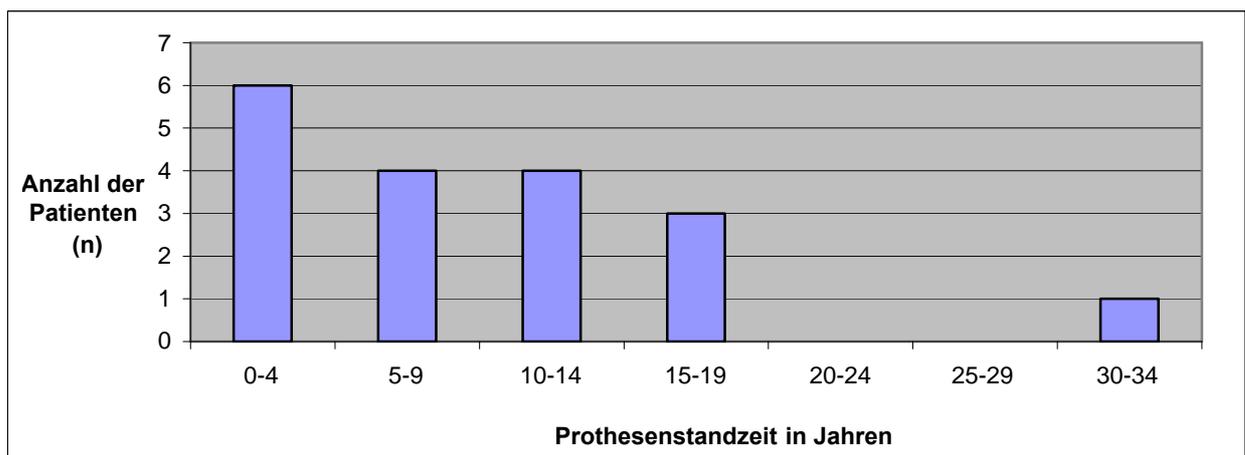


Abbildung 10: Prothesenstandzeit in Jahren bei 18 Patienten mit APL

Der **BMI** betrug im Mittel $30,5 \text{ kg/m}^2 \pm 4,3 \text{ kg/m}^2$ (Minimum $24,4 \text{ kg/m}^2$, Maximum $38,9 \text{ kg/m}^2$). 11,1 % der Patienten ($n = 2$) wiesen einen BMI zwischen $18,5 - 24,9 \text{ kg/m}^2$ auf und waren damit nach der BMI-Klassifikation der Weltgesundheitsorganisation WHO normalgewichtig.

27,8 % der Patienten ($n = 5$) zeigten eine Präadipositas. 44,4 % der Patienten ($n = 8$) litten an einer Adipositas Grad I, bei 16,7 % der Fälle ($n = 3$) bestand eine Adipositas Grad II, während eine Adipositas Grad III nicht vertreten war.

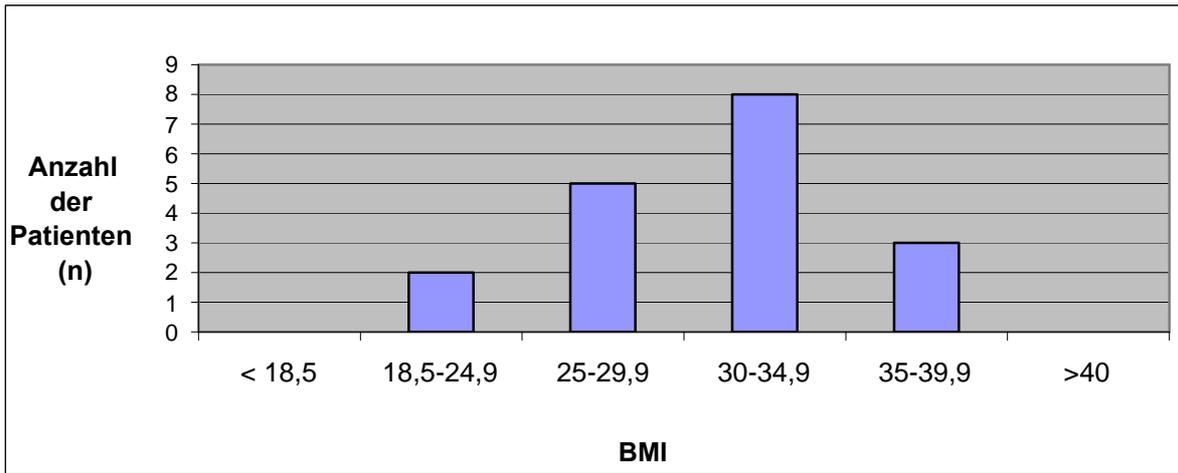


Abbildung 11: Einteilung des Patientenkollektivs (n = 18) nach dem Body-Mass-Index (BMI)

Die Untersuchung ergab weder einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen der Prothesenstandzeit und der Expression von Syndecan-4 in CD68-positiven Zellen, noch zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Syndecan-4 Expression und dem Body-Mass-Index.

		Prothesen-standzeit	Body-Mass-Index (BMI)
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	Korrelation nach Pearson	0,198	0,067
	p-Wert	0,430	0,791
	Anzahl (n)	18	18

Tabelle 1: Vergleich der mittleren Syndecan-4 Expression mit der Prothesenstandzeit und dem BMI (Korrelation nach Pearson)

3.1.3.2 Nebendiagnosen

Bei der retrospektiven Datenerhebung wurden folgende Nebendiagnosen der Patienten erhoben: Osteoporose, Hyperurikämie und Diabetes mellitus Typ 2. Die Rheumatoide Arthritis wäre aufgrund ihrer destruktiven Wirkung an den Gelenken von besonderem Interesse gewesen. Dieses Patientenkollektiv wies jedoch eine zu kleine Patientenzahl mit dieser Nebendiagnose auf, so dass kein repräsentatives Ergebnis erzielt werden konnte.

Da einige Patienten mehrere Nebendiagnosen aufwiesen, sind hier bei der Auswertung Überlappungen möglich. Bei 16,7 % der Patienten (n = 3) lag eine Osteoporose vor. Bei 33,3 % der Fälle (n = 6) wurde eine Hyperurikämie nachgewiesen, während 33,3 % der Patienten (n = 6) des Gesamtkollektivs (n = 18) an Diabetes mellitus Typ 2 erkrankt waren. Für die drei

Nebendiagnosen, Osteoporose, Hyperurikämie und Diabetes mellitus Typ 2, konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von Syndecan-4 in den CD68-positiven Zellen ermittelt werden (siehe Tabelle).

	Osteoporose	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	nein	46,4	18,9	0,498
	ja	28,3	28,8	
	Hyperurikämie	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	nein	39,3	20,1	0,248
	ja	51,7	21,9	
	Diabetes mellitus Typ 2	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	nein	45,5	21,5	0,56
	ja	39,2	21,0	

Tabelle 2: Vergleich der mittleren Syndecan-4 Expression mit den Nebendiagnosen (Osteoporose, Hyperurikämie und Diabetes mellitus Typ 2)

3.1.3.3 Medikamente

Aus den Patientenkurven der Krankenakten von den 18 Patienten, bei denen eine aseptische Prothesenlockerung vorlag, wurde die Medikamentenanamnese entnommen. 11,1 % der Patienten nahmen ein Statin (n = 2) und 27,8 % der Patienten (n = 5) ein Medikament gegen Hyperurikämie (Allopurinol) ein. 16,7 % der Patienten (n = 3) spritzten sich Insulin. 72,2 % der Patienten (n = 13) standen unter medikamentöser Therapie eines NSARs, während 11,2 % der Patienten (n = 2) Acetylsalicylsäure (ASS) einnahmen. Die Hälfte der Patienten erhielt zum Schutz der Magenschleimhaut einen Protonenpumpen-inhibitor (PPI). Hier sind ebenfalls Doppelt- sowie Mehrfachnennungen möglich.

In der statistischen Auswertung wurde auch hier die Einnahme des jeweiligen Medikaments mit der Expression von Syndecan-4 in den Zellen des periprothetischen Gewebes verglichen. Bei den verschiedenen Medikamenteneinnahmen zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Expression des Heparansulfatproteoglykans Syndecan-4 in den untersuchten CD68-positiven Zellen der periprothetischen Membran.

	Statin	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	nein	44,5	20,3	0,534
	ja	34,4	32,7	
	Allopurinol	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	nein	40,3	19,6	0,324
	ja	51,5	24,5	
	Insulin	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	nein	41,7	22,6	0,448
	ja	52,1	5,6	
	NSAR	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	nein	42,0	14,4	0,866
	ja	43,9	23,5	
	ASS	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	nein	43,1	22,2	0,879
	ja	45,6	6,2	
	PPI	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	nein	50,8	17,0	0,136
	ja	36,0	22,8	

Tabelle 3: Vergleich der mittleren Syndecan-4 Expression mit der Einnahme verschiedener Medikamente

3.1.3.4 Entzündungsparameter (C-reaktives Protein) und mikrobiologische Untersuchung

Als Entzündungsparameter wurde bei der stationären Aufnahme der Patienten mit APL das C-reaktive Protein (CRP) bestimmt. Bei der Hälfte der Patienten (n = 9) lagen die Werte unter 5 mg/l. Bei 44 % der Fälle (n = 8) ermittelte man einen CRP-Wert zwischen 5 und 15 mg/l. Bei einem Patienten lag der Wert bei 21 mg/l. Ein Keimnachweis wurde hier nicht erzielt.

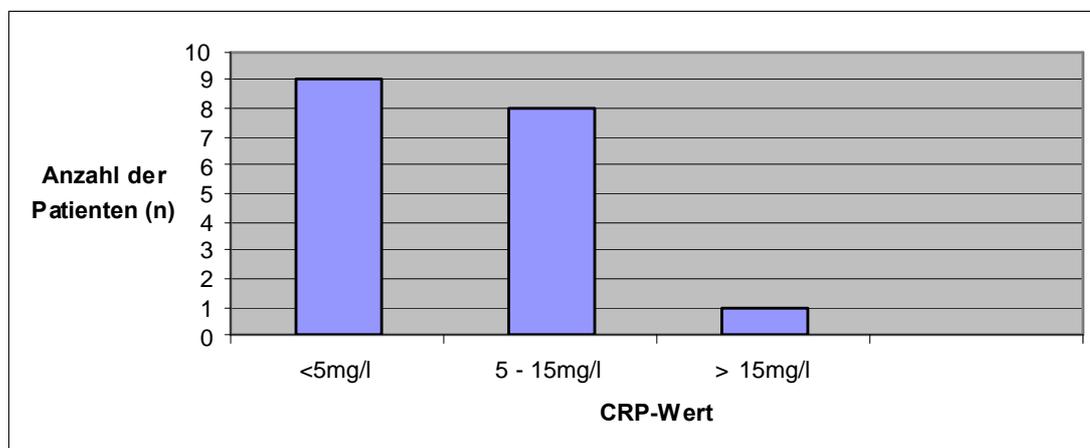


Abbildung 12: Verteilung der CRP-Werte im Patientenkollektiv

	CRP	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	<5 mg/l	47,5	15,9	0,730
	5 - 15 mg/l	39,1	27,1	
	>15 mg/l	41,3	-	

Tabelle 4: Vergleich der mittleren Syndecan-4 Expression mit der Höhe der CRP-Werte

Die statistische Auswertung ergab hier keinen signifikanten Unterschied zwischen der Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen und der Höhe des CRP-Wertes der Patienten. Es war allerdings zu erkennen, dass tendenziell bei geringeren CRP-Werten die lokale periprothetische Syndecan-4-Expression höher war.

3.1.3.5 Knochenzement

Neben der Datenerhebung aus den Patientenakten erfolgte die Befundung von Röntgenbildern. Ein Augenmerk lag dabei auf der Darstellung von Knochenzement in den radiologischen Aufnahmen. Die Verwendung von Knochenzement ist bei Endoprothesenoperationen nicht obligat. Bei unserem Patientenkollektiv mit einer aseptischen Prothesenlockerung (n = 18) wurden bei 22,2 % der Patienten (n = 4) Zement verwendet, während bei den restlichen 77,8 % der Männer und Frauen (n = 14) auf dessen Verwendung bei der Operation verzichtet wurde.

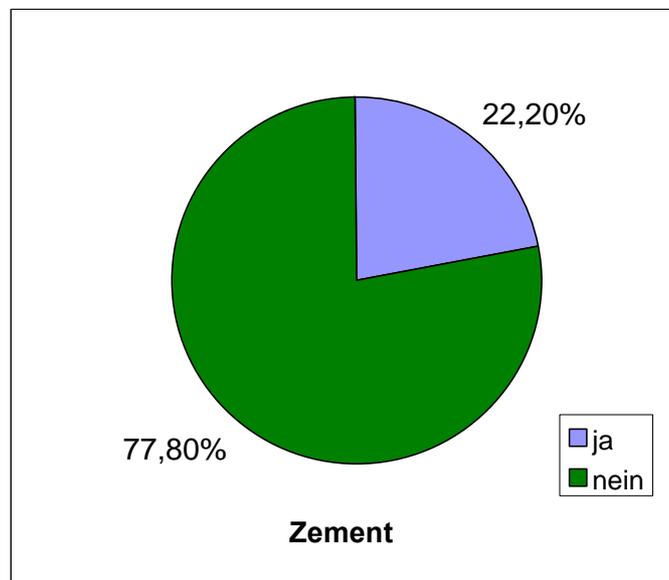


Abbildung 13: Prozentuale Verteilung der Verwendung von Knochenzement im Patientenkollektiv mit APL

Es sollte untersucht werden, ob das Vorliegen von Knochenzement einen Einfluss auf die Syndecan-4 Expression in den CD68-positiven Zellen der periprothetischen Membran hat. Bei der statistischen Auswertung konnte hier kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ($p = 0,431$).

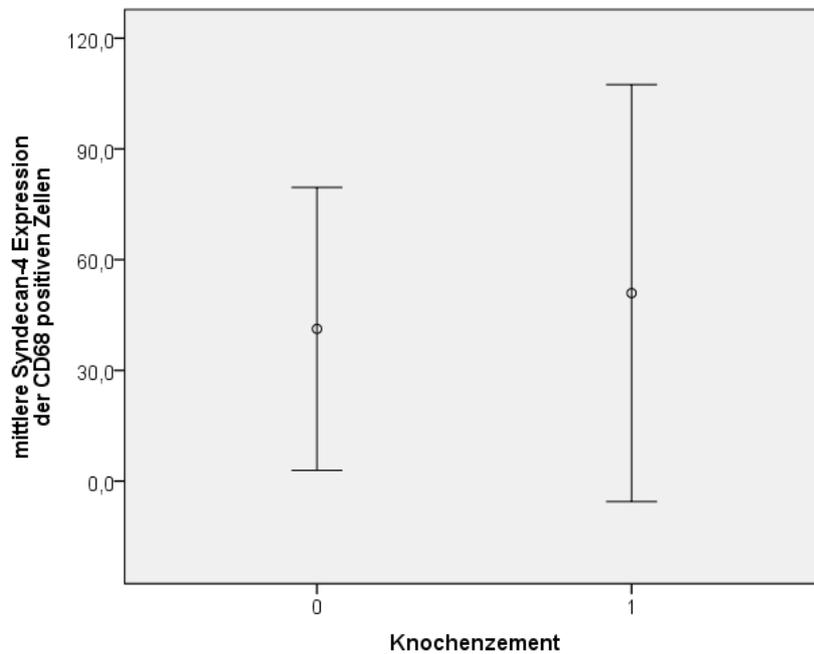


Abbildung 14: Mittlere Syndecan-4 Expression bei Vorliegen von Knochen- bzw. keinem Knochenzement (0 = kein Zement, 1 = Zement)

3.1.4 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit den Klassifikationstypen der periprothetischen Membran

Die HE-gefärbten Schnitte der Patienten mit einer aseptischen Prothesenlockerung (n = 18) wurden unter dem Mikroskop betrachtet, und es wurde jeweils eine Klassifikation der periprothetischen Membran vorgenommen. Diese wurde jeweils einem der von *Krenn und Morawietz* vorgeschlagenen vier Typen zugeordnet (Typ I = abriebinduziert, Typ II = infektiös, Typ III = Mischtyp = abriebinduziert und infektiös, Typ IV = Indifferenztyp = nichtabriebinduziert, nichtinfektiös). In der folgenden Abbildung ist die Verteilung der Typen der periprothetischen Membran bei unserem Patientenkollektiv dargestellt.

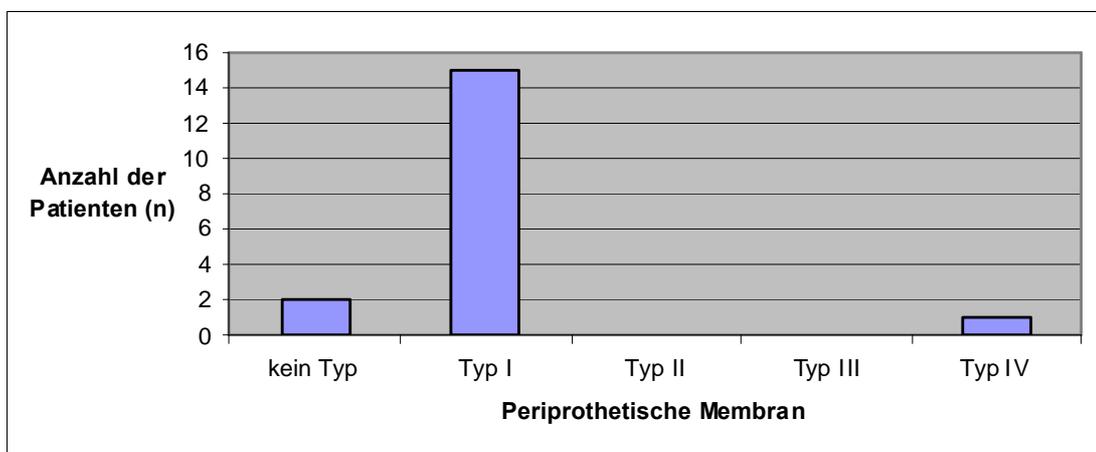


Abbildung 15: Verteilung der 4 Typen der periprothetischen Membran beim Patientenkollektiv (kein Typ = keine eindeutige Zuordnung möglich, Typ I = abriebinduzierter Typ, Typ IV = Indifferenztyp)

Bei 83,3 % der Fälle (n = 15) wurde eine periprothetische Membran vom abriebinduzierten Typ (Typ I) diagnostiziert, während bei 5,6 % (n = 1) eine Membran vom Indifferenz-Typ vorlag. Bei 11,1 % der Patienten (n = 2) war das eingesandte Gewebe nicht eindeutig beurteilbar und konnte somit keinem Typ zugeordnet werden.

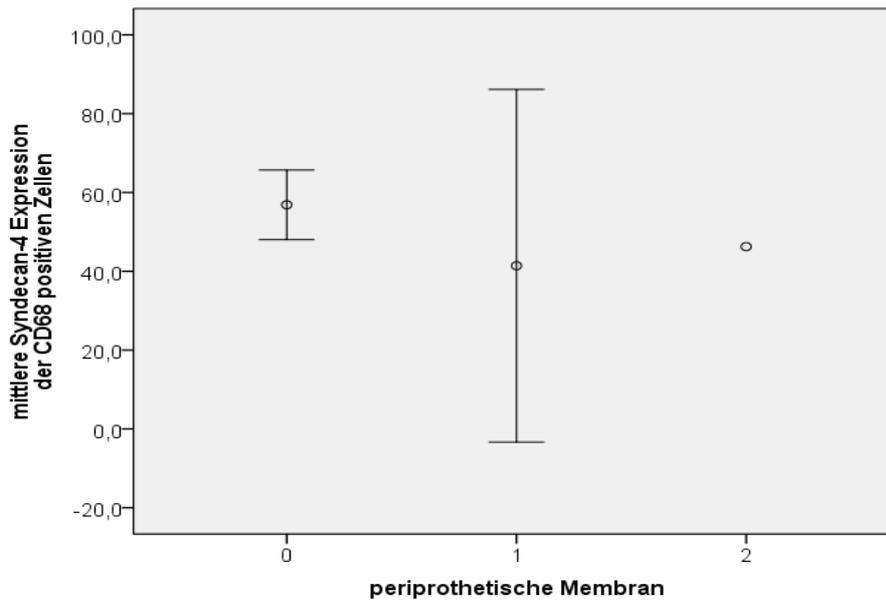


Abbildung 16: Mittlere Syndecan-4 Expression in der periprothetischen Membran nach Klassifikation in die verschiedenen Typen (0 = kein Typ, 1 = Abriebtyp, 2 = Indifferenztyp)

Es konnte keine statistische Signifikanz zwischen der Expression von Syndecan-4 in den CD68-positiven Zellen ($p = 0,64$) und den verschiedenen Typen der periprothetischen Membran festgestellt werden.

3.1.5 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit dem Synovialitis-Score

Neben der Klassifikation der periprothetischen Membran in die unterschiedlichen histologischen Typen nach *Krenn und Morawietz* wurde eine Einteilung der periprothetischen Membran oder Synovial-like interface membrane nach dem oben erläuterten Graduierungsschema, dem Synovialitis Score, vorgenommen.

Nach Bestimmung der Gesamtpunktzahl erfolgte die Beurteilung des Entzündungsgrades der Synovial-like interface membrane. Bei 5,6 % der Patienten ($n = 1$) lag keine Entzündung vor, und bei 27,8 % der Fälle ($n = 5$) bestand eine leichtgradige Entzündung. Bei 61,1 % ($n = 11$) wurde eine mäßiggradige Entzündung festgestellt, während bei 5,6 % ($n = 1$) eine hochgradige Entzündung ermittelt wurde.

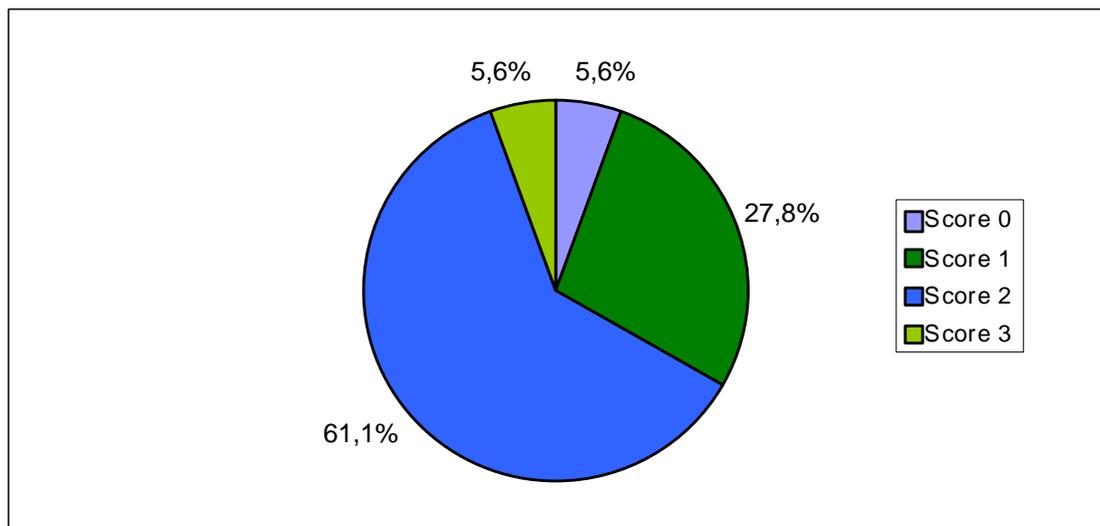


Abbildung 17: Prozentuale Verteilung des „Synovialitis Scores“ im Patientenkollektiv (Score 0 = 0-1 Punkte = keine Entzündung, Score 1 = 2-3 Punkte = leichtgradige Entzündung, Score 2 = 4-6 Punkte = mäßiggradige Entzündung, Score 3 = 7-9 Punkte = hochgradige Entzündung)

Hier wurde untersucht, ob nach Klassifikation des Gewebes mit Hilfe des Synovialitis-Scores ein Unterschied in der Expression von Syndecan-4 nachweisbar war. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Syndecan-4 Expression und den ermittelten Scores (Entzündungsgrade) festgestellt werden.

	Synovialitis-Score	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	1	40,5	23,0	0,481
	2	48,1	17,7	

Tabelle 5: Vergleich der mittleren Syndecan-4 Expression mit den ermittelten „Synovialitis-Scores“

3.1.6 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit verschiedenen histologischen Merkmalen (Pannus, Makrophagen und Abriebtyp)

Neben der Klassifikation der periprothetischen Membran in vier Typen und der Anwendung des Synovialitis Scores auf das Gewebe wurden die Paraffinschnitte der 18 Patienten mit einer aseptischen Prothesenlockerung auf das Vorliegen weiterer histologischer Merkmale untersucht. Die HE-Schnitte wurden im Einzelnen ausgewertet: nach dem Vorkommen von **Pannus** (ja/nein), nach dem **Abriebtyp** (0 = kein Abriebtyp, 1 = Kunststoff, 2 = Metall, 3 = Kunststoff und Metall) und schließlich nach der Dichte der **Makrophagen** (0 = wenige Makrophagen, 1 = geringe Dichte, 2 = mäßige Dichte, 3 = hohe Dichte).

Pannus ließ sich bei 27,8 % der Fälle (n = 5) finden. Bei 72,2 % (n = 13) war kein Pannus vorhanden.

Die folgende Tabelle zeigt die Verteilung der Abriebtypen in den Präparaten des Patientenkollektivs.

Abriebtyp		
Abriebmaterial	Anzahl (n)	Prozent (%)
Kein Abriebtyp	2	11,1
Kunststoff	1	5,6
Metall	5	27,8
Kunststoff /Metall	10	55,6
Gesamt	18	100

Tabelle 6: Anzahl (n) und prozentuale Verteilung der Makrophagendichte sowie der Abriebtypen im Patientenkollektiv

Zwischen der Expression von Syndecan-4 in den CD68-positiven Zellen und den histologischen Merkmalen (Pannus und Dichte der Makrophagen) ließ sich kein signifikanter Unterschied ermitteln.

	Pannus	Mittelwert (%)	Standardabweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	nein	40,7	24,0	0,202
	ja	50,5	7,1	

Tabelle 7: Vergleich der mittleren Sydecn-4 Expression mit Pannus

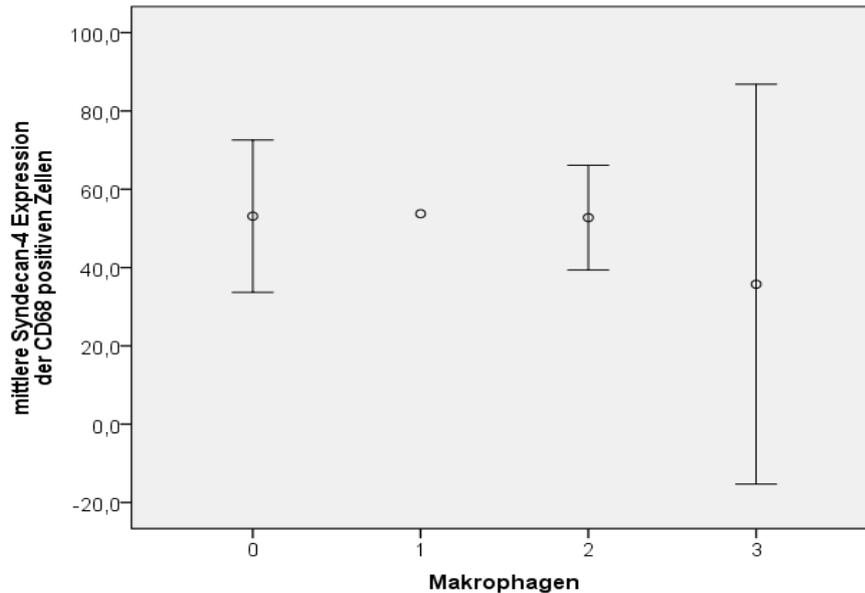


Abbildung 18: Mittlere Syndecan-4 Expression und die Makrophagendichte (0 = wenige Makrophagen, 1 = geringe Dichte, 2 = mäßige Dichte, 3 = hohe Dichte).

Bei der statistischen Auswertung zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von Syndecan-4 und der Makrophagendichte ($p = 0,421$). Zwischen der Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen und den verschiedenen Abriebtypen lag ein statistisch signifikanter Unterschied vor ($p 0,028$).

	Abriebtyp	Mittelwert (%)	Standard-abweichung (%)	p-Wert
Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen	Kein Abriebtyp	43,0	1,1	0,028
	Kunststoff	49,3	22,6	
	Kunststoff/Metall	20,5	13,4	

Tabelle 8: Vergleich der mittleren Syndecan-4 Expression mit verschiedenen Abriebtypen

Um zu unterscheiden, welche Abriebtypen sich signifikant unterschieden, wurde ein Post-Hoc Test (Bonferroni) durchgeführt. Der Vergleich zwischen den verschiedenen Abriebtypen und den CD68-positiven Zellen, die Syndecan-4 exprimieren, ist in folgender Tabelle dargestellt.

Abhängige Variable	Test	Abriebtyp		p-Wert
CD68-positive Zellen mit Syndecan-4 Expression	Bonferroni	0	1	1,000
			3	0,145
		1	0	1,000
			3	0,029
		3	0	0,145
			1	0,029

Tabelle 9: p-Werte bei Mehrfachvergleichen (Vergleiche zwischen den Abriebtypen (0=kein Abriebtyp, 1=Kunststoff, 3=Kunststoff-Metallgemisch) und der mittleren Syndecan-4 Expression in CD68-pos. Zellen)

Der Mehrfachvergleich zeigt, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen und den Abriebtypen Kunststoff und Kunststoff-Metall-Gemisch sowie bei keinem Abrieb und Kunststoff-Metall-Gemisch bestand. Wenn in der periprothetischen Membran Abriebpartikel in Form von Kunststoff gefunden wurden, war hier die mittlere Syndecan-4 Expression höher als bei einem Partikelgemisch aus Kunststoff und Metall.

Ergebnisse der molekular- und zellbiologischen Untersuchungen

3.1.7 Expression von Zytokinen in PLFs

Mit Hilfe der quantitative Real Time-PCR wurde die Expression von Zytokinen in Prothesenlockerungsfibroblasten (PLFs) bestimmt. Dafür wurden die PLFs von acht verschiedenen Männern und Frauen (n = 8) mit einer aseptischen Prothesenlockerung verwendet. Die folgende Abbildung veranschaulicht die mittlere Zytokinexpression bei den Zellen dieser Patienten.

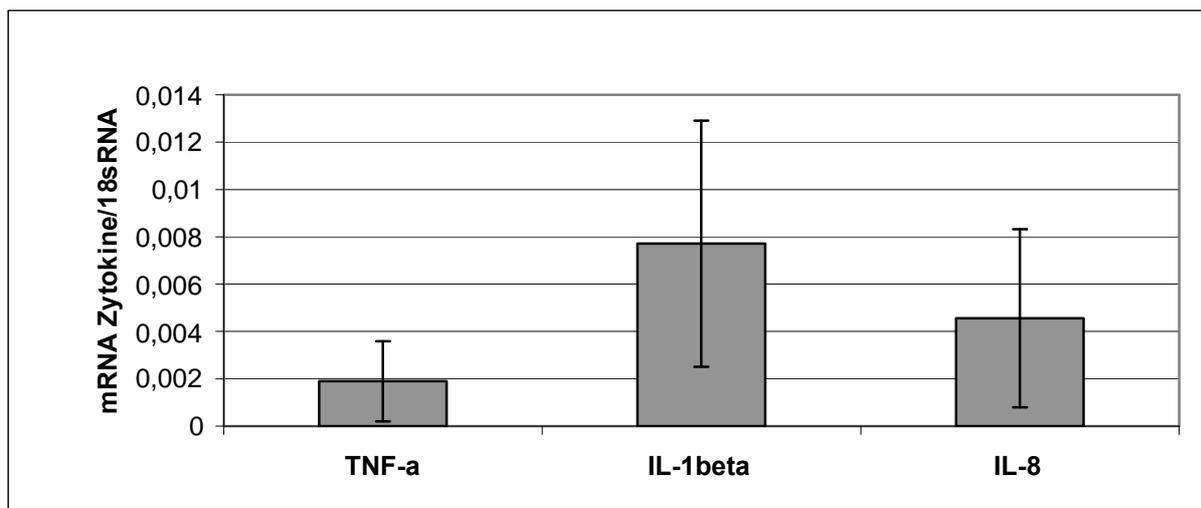


Abbildung 19: Zytokinexpression in Prothesenlockerungsfibroblasten (PLFs)

Man erkennt, dass kaum TNF- α (MW 0,0019 \pm 0,0017) und nur wenig IL-8 (MW 0,0046 \pm 0,0038) in diesen Prothesenlockerungsfibroblasten exprimiert wurden, während am meisten IL-1 β (MW 0,0078 \pm 0,0052) nachzuweisen war.

3.1.8 Expression von Syndecan-4 in Prothesenlockerungsfibroblasten (PLFs)

Auf zellulärer Ebene wurde die mRNA Expression von Syndecan-4 in den Prothesenlockerungsfibroblasten und RASFs mittels Real-Time PCR ermittelt.

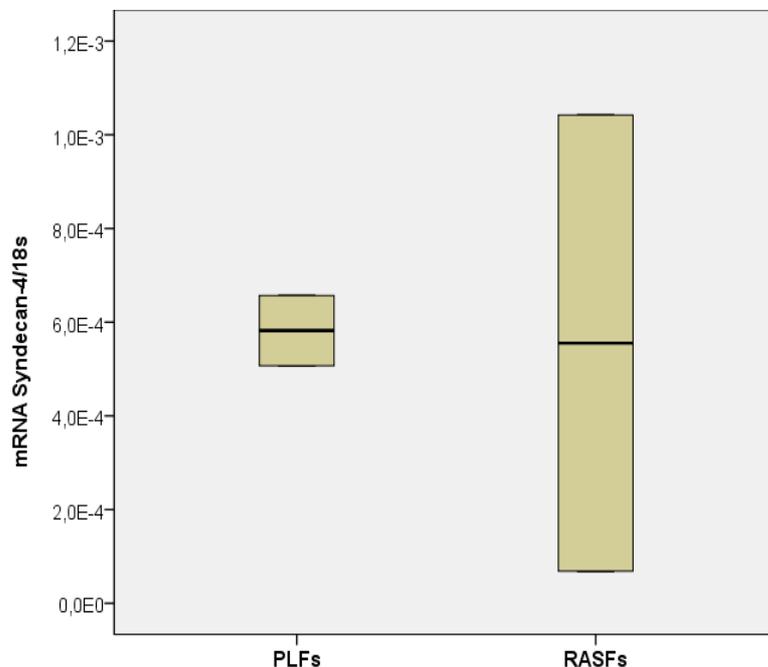


Abbildung 20: Mittlere mRNA Expression von Syndecan-4 in PLFs und RASFs

Die Prothesenlockerungsfibroblasten stammten von fünf verschiedenen Patienten ($n = 5$), die sich einer Wechseloperation einer Knie- oder Hüftprothese aufgrund einer aseptischen Prothesenlockerung unterziehen mussten. Zwei Patienten ($n = 2$) mit einer rheumatoiden Arthritis lieferten im Rahmen einer Synovektomie das Gewebe für die Isolation und Kultivierung von RASFs.

Bei den Prothesenlockerungsfibroblasten lag die mRNA Expression von Syndecan-4 im Mittel bei $0,85 \times 10^{-3} \pm 0,51 \times 10^{-3}$ (Minimum $0,51 \times 10^{-3}$, Maximum $1,76 \times 10^{-3}$). Bei den RASFs betrug der Quotient aus mRNA von Syndecan-4 und 18sRNA im Mittel $0,86 \times 10^{-3} \pm 0,25 \times 10^{-3}$ (Minimum $0,69 \times 10^{-3}$, Maximum $1,04 \times 10^{-3}$).

Dementsprechend unterschied sich die durchschnittliche mRNA Expression von Syndecan-4 bei diesen PLFs und RASFs nur minimal. Die mRNA Expression von Syndecan-4 in den PLFs unterschied sich nicht signifikant von der mRNA Expression von Syndecan-4 in den RASFs ($p = 0,974$). Allerdings zeigte die mRNA Expression von Syndecan-4 in den RASFs eine beträchtliche Schwankungsbreite.

3.1.9 Ergebnisse der Invasionsassays

Die isolierten und kultivierten Prothesenlockerungsfibroblasten (PLFs) von zehn verschiedenen Patienten ($n = 10$) mit einer aseptischen Prothesenlockerung wurden zur Durchführung von Invasionsassays verwendet. Zusätzlich wurden von sechs Patienten ($n = 6$), die an Arthrose litten, OASFs (Osteoarthrose synoviale Fibroblasten) gewonnen. Von vier weiteren Patienten ($n = 4$) wurden RASFs isoliert und ebenfalls für die Durchführung von Invasionsassays bereitgestellt.

Bei der Untersuchung der PLFs hinsichtlich ihres invasiven Verhaltens zeigten im Mittel $9,9 \% \pm 9,1 \%$ dieser Zellen ein invasives Verhalten (Minimum $0,2 \%$, Maximum 31%), während es bei den OASFs $25,4 \% \pm 17 \%$ der Zellen waren (Minimum $5,7 \%$, Maximum $52,1 \%$). Bei den Rheumathoide Arthritis synoviale Fibroblasten (RASFs) wurden im Durchschnitt $33,8 \% \pm 19,1 \%$ der Zellen (Minimum $12,4 \%$, Maximum $58,6 \%$) ermittelt, die ein invasives Verhalten durch die mit Kollagen beschichteten Wells zeigten.

Bei der statistischen Auswertung konnte nachgewiesen werden, dass die PLFs und OASFs einen signifikanten Unterschied in ihrem invasiven Verhalten aufwiesen ($p = 0,035$). Außerdem unterschieden sich die RASFs in ihrer Invasivität signifikant vom invasiven Verhalten der PLFs ($p = 0,007$).

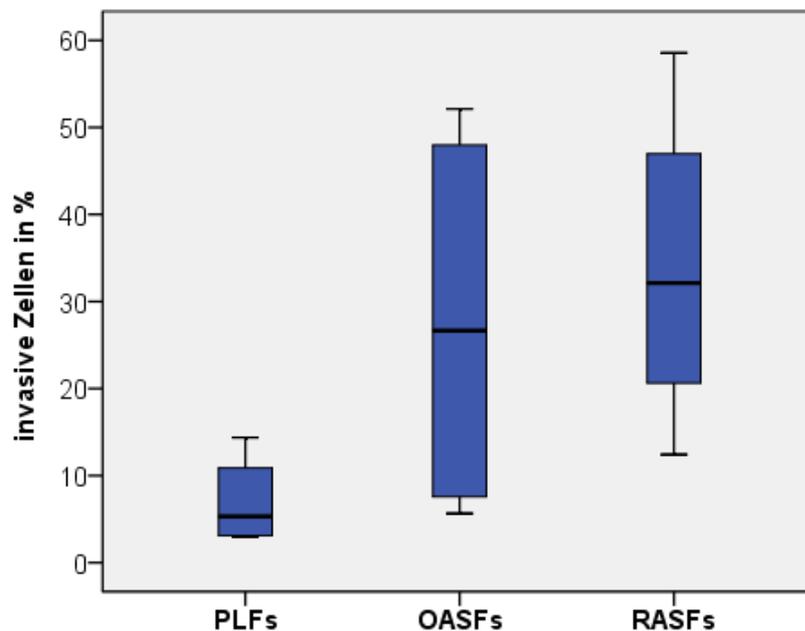


Abbildung 21: Durchgeführte Invasionsassays mit Darstellung invasiver Zellen (PLFs, OASFs und RASFs) in Prozent

4. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung des Heparansulfatproteoglycans Syndecan-4 bei der aseptischen Prothesenlockerung untersucht. Dabei gliedert sich die Arbeit in immunhistochemische und molekular- bzw. zellbiologische Untersuchungen. Es wurde die Expression von Syndecan-4 in der periprothetischen Membran der APL anhand immunhistochemisch gefärbter Präparate ermittelt. Um einen klinischen Bezug herstellen zu können, wurden diese Ergebnisse im Zusammenhang klinisch relevanter und patientenbezogener Daten betrachtet. Bei den molekular- und zellbiologischen Untersuchungen lag der Fokus auf einem bestimmten Zelltyp, den Prothesenlockerungsfibroblasten (PLFs). Einige Autoren haben bereits eine zellspezifische Expression von Syndecan-4 in Fibroblasten (Tkachenko et al. 2005) beschrieben, aber die Expression von Syndecan-4 in den Zellen der periprothetischen Membran sowie die Funktion von Syndecan-4 bei der aseptischen Prothesenlockerung wurden bisher nicht näher untersucht.

Diskussion der immunhistochemischen Ergebnisse

4.1.1 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit den histologischen Typen der periprothetischen Membran

Die Diagnosestellung der aseptischen Prothesenlockerung erfolgte bei den 18 Patienten, die in unsere Arbeit eingeschlossen wurden, präoperativ anhand von klinischen, laborchemischen und radiologischen Kriterien. Das intraoperativ gewonnene Gewebe wurde routinemäßig im Institut für Pathologie aufbereitet, und nach Anfertigung von HE-gefärbten Paraffinschnitten wurde die Klassifikation der periprothetischen Membran in die verschiedenen Typen vorgenommen.

Bei 83,3 % der Fälle (n = 15) wurde eine periprothetische Membran vom abriebinduzierten Typ (Typ I) diagnostiziert. Bei 11,1 % der Patienten (n = 2) war das eingeschickte Gewebe nicht beurteilbar. Bei 5,6 % (n = 1) lag laut pathologischem Befund eine Membran vom Indifferenztyp vorlag.

Die Klassifikation nach Morawietz et al. teilt die aseptische Prothesenlockerung histologisch anhand der periprothetischen Membran in drei unterschiedliche Typen. Es konnte gezeigt werden, dass sich die klinisch gestellte Diagnose mit der histopathologischen Diagnose in den meisten Fällen deckte. Ein signifikanter Unterschied zwischen der Expression von Syndecan-4 und den histologischen Typen lag nicht vor.

Diese Einteilung berechtigt zwar die Verwendung der periprothetischen Membran im Allgemeinen als diagnostisches Feature bei dem Lockerungsprozess (Morawietz et al. 2006), es ist jedoch schwierig differenzialtherapeutischen Schlüsse daraus zu ziehen, da diesen

Typen meist keine einheitliche Entität zugrunde liegt. Eine Einordnung ist nur möglich bei gemeinsamer Betrachtung des klinischen, laborchemischen und radiologischen Verlaufs (Wirtz et al. 2008).

4.1.2 Die Syndecan-4 Expression und die Anwendung des Synovialitis-Score bei der APL

Die periprothetische Membran wird auch als Synovial-like interface membrane (SLIM) bezeichnet, da sie Ähnlichkeiten mit dem hyperplastischen Synovium aufweist, wie es bei Patienten mit rheumatoider Arthritis zu finden ist (Goldring et al. 1983). Die Ähnlichkeiten zwischen der periprothetischen Membran bei der APL und dem Synovium bei RA sollten bei unseren Untersuchungen ebenfalls berücksichtigt werden. Die Klassifikation der periprothetischen Membran trägt zwar zur Diagnosefindung einer aseptischen Prothesenlockerung bei, aber sie wird der Heterogenität des Gewebes nicht vollends gerecht. Aus diesem Grund wurde zusätzlich der Synovialitis-Score bei der mikroskopischen Betrachtung der SLIM angewandt. Dieses Scoring-System wurde ebenfalls von Morawietz et al. entwickelt.

Mit Hilfe des Synovialitis-Scores ergab sich bei den HE-gefärbten Schnittpräparaten der 18 Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung folgendes: Bei 5,6 % der Patienten (n = 1) lag keine Entzündung vor. Bei 27,8 % der Fälle (n = 5) bestand eine leichtgradige Entzündung. Bei 61,1 % (n = 11) wurde eine mäßiggradige Entzündung festgestellt, während bei 5,6 % (n = 1) eine hochgradige Entzündung ermittelt wurde. Bei der Mehrheit der Patienten lag nach Anwendung des Synovialitis-Scores also eine leicht- bis mäßiggrade Entzündung (Synovialitis) vor.

Der ermittelte Synovialitis-Score wurde im Zusammenhang mit der Expression von Syndecan-4 betrachtet. Es konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Syndecan-4 Expression und den ermittelten Scores (Entzündungsgrade) festgestellt werden. Das statistische Ergebnis zeigte jedoch, dass bei einer mäßiggradigen Entzündung (Score 2) bei beiden Zelltypen im Vergleich zu einem geringeren Entzündungsgrad (Score 1) eine höhere Syndecan-4 Expression vorlag, wenn auch statistisch nicht signifikant. Auch ist der Befund der high grade Synovialitis zumindest für den klinischen Verlauf (z.B. bei anhaltender Wundheilungsstörung) von Bedeutung.

4.1.3 Die Syndecan-4 Expression und weitere histologische Kriterien

Neben der Klassifikation der periprothetischen Membran in vier Typen und der Anwendung des Synovialitis Scores auf das Gewebe wurden die Paraffinschnitte der 18 Patienten mit einer aseptischen Prothesenlockerung auf das Vorliegen weiterer histologischer Merkmale untersucht (Pannus, Abriebtyp, Dichte der Makrophagen).

Zwischen der Expression von Syndecan-4 und den histologischen Merkmalen (Pannus und Dichte der Makrophagen) ließ sich in den CD68-positiven Zellen kein signifikanter Unterschied ermitteln.

Zwischen der Syndecan-4 Expression in CD68-positiven und den verschiedenen Abriebtypen lag ein signifikanter Unterschied vor. Der Post-Hoc Test (Bonferroni) zeigte, dass ein signifikanter Unterschied zwischen der Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen und den Abriebtypen Kunststoff und Kunststoff-Metall-Gemisch bestand. Wenn in der periprothetischen Membran Abriebpartikel in Form von Kunststoff gefunden wurden, war hier die mittlere Syndecan-4 Expression höher als bei einem Partikelgemisch aus Kunststoff und Metall. Demnach scheint Kunststoff allein einen größeren Einfluss auf die Syndecan-4 Expression zu haben als ein Gemisch aus Metall und Kunststoff. Metalle scheinen eher einen negativen Effekt auf die Syndecan-4-Expression zu haben.

4.1.4 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit klinischen Daten

4.1.4.1 Vergleich der Syndecan-4 mit dem BMI und der Prothesenstandzeit

Ein erhöhter **BMI** bzw. die Adipositas der Patienten spielt bei vielen Gesundheitsproblemen wie u.a. beim Diabetes mellitus, bei der arteriellen Hypertonie eine wichtige Rolle (Stukenborg-Colsman et al. 2005). Das statistische Bundesamt zeigte 2004, dass 20,1 % aller Menschen im Alter zwischen 65 und 70 Jahren in der BRD einen BMI $\geq 30 \text{ kg/m}^2$ aufwiesen. Orthopädische klinische Studien konnten ebenfalls einen Zusammenhang zwischen dem Übergewicht und der Entstehung einer Arthrose nachweisen (Schmalzried et al. 2000, Stukenborg-Colsman et al. 2005).

Die Adipositas wird bei operativen Eingriffen häufig als Risikofaktor für das vermehrte Auftreten von tiefen Beinvenenthrombosen, Wundinfektionen, erhöhtem Blutverlust, postoperativen respiratorischen Insuffizienzen angegeben. Eine Studie wies jedoch eine statistisch signifikante Abnahme der intraoperativen und der postoperativen Komplikationen sowie der notwendigen Transfusionseinheiten mit zunehmendem BMI nach. Für Revisionseingriffe am Hüftgelenk und elektive Kniegelenksalloarthroplastiken konnten Studien einen Zusammenhang zwischen dem BMI und der post-operativen Komplikationsrate ausschließen (Perka et al. 2004, Stukenborg-Colsman et al 2005).

Hinsichtlich des Effekts von Übergewicht auf die klinischen und radiologischen Ergebnisse von Hüft- und Knieendoprothesen bestehen unterschiedliche Ansichten. Einige Autoren sehen keinen Zusammenhang zwischen dem Gewicht und dem Ergebnis nach dem Einsatz einer Knie- oder Hüftprothese (Chan et al. 1996, Griffin et al. 1998, Insall et al. 1979, Mont et al. 1996, Smith et al. 1992, Stukenborg-Colsman et al 2005), während andere Studien einen Einfluss des Übergewichts auf die klinischen und radiologischen Ergebnisse nachweisen

konnten (Aglietti et al. 1984, Ahlberg et al. 1981, Dannenmaier et al. 1985, Moreland et al. 1988, Winiarsky et al. 1998). Es wird angenommen, dass das erhöhte Gewicht zu einer verstärkten Belastung der Prothesenteile und des Knochens führt. Bei klinischen Untersuchungen konnte jedoch nicht gezeigt werden, dass bei adipösen Patienten vermehrt aseptische Lockerungsraten auftreten (Chan et al. 1996, Mont et al. 1996, Stern et al. 1990, Stukenborg-Colsman et al 2005, Winiarsky et al. 1998). Eine mögliche Erklärung könnte hierfür sein, dass übergewichtige Patienten eine geringere körperliche Aktivität aufweisen und die erhöhte Belastung der Prothesenkomponenten ausgeglichen wird (Stukenborg-Colsman et al 2005).

Wir ermittelten ebenfalls den BMI unserer Patienten und verglichen den zu untersuchenden Parameter, die Syndecan-4 Expression, mit dem Gewicht. Es wurde kein signifikanter Unterschied zwischen der Syndecan-4 Expression und dem BMI der Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung festgestellt. Es gibt also bei unserem Patientengut keinen Hinweis darauf, dass der BMI-Wert die Expression von Syndecan-4 beeinflusst.

Als **Prothesenstandzeit** bezeichnet man den Zeitraum zwischen der Primärimplantation einer Endoprothese und der Revisionsoperation. Bei zementierter und unzementierter Implantation von Prothesen findet man aseptische Prothesenlockerungen in 5-12 % der Fälle nach einer Prothesenstandzeit von 10 Jahren (Gallo et al. 2002, Morawietz et al. 2006, Otto et al. 2006). Nach etwa 20 Jahren sinkt die Funktionsrate der Endoprothesen auf 63 % (Morawietz et al. 2006).

In unserer Arbeit wurde die Syndecan-4 Expression mit der Prothesenstandzeit verglichen. Bei der Auswertung konnten wir keinen signifikanten Unterschied zwischen der Expression von Syndecan-4 und der Prothesenstandzeit ermitteln. Möglicherweise war die Anzahl der untersuchten Patienten zu gering und ihre Verteilung, bezogen auf die Prothesenstandzeit, zu heterogen.

4.1.4.2 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit verschiedenen Nebendiagnosen

Osteoporose

Nach einem Gelenkersatz kommt es postoperativ nicht selten zu einer periprothetischen Knochenresorption und damit als Folge zur aseptischen Prothesenlockerung. Wie bereits unter 1. erläutert, sind die Ursachen vielfältig, die den Einsatz einer Hüft- oder Knieendoprothese nötig machen. Neben der Arthrose liegt öfters eine diagnostizierte oder eine nicht diagnostizierte Osteoporose (25 %) und/oder ein nicht beachteter Vitamin-D-Mangel (22 %) vor. Die veränderte Kraftwirkung auf den Knochen durch das Implantat und

eine Immobilisationsosteoporose können somit zu einem lokalen periprothetischen Knochen-schwund beitragen (Bartel 2004). Das zusätzliche Auftreten einer Osteoporose könnte die Osteointegration des Implantats stärker beeinflussen als bei Patienten, die nicht an Osteoporose leiden. Wir haben getestet, ob sich diese Hypothese in der Expression von Syndecan-4 in der periprothetischen Membran widerspiegelt. Es zeigte sich, dass die Syndecan-4 Expression bei den Patienten ohne diagnostizierte Osteoporose durchschnittlich höher war. Es ist möglich, dass bei diesen Patienten (n = 15) eine Osteoporose bisher unentdeckt geblieben ist und die Patienten daher bei der Aufnahmeuntersuchung keine Angaben dazu machen konnten. Die Diagnostik der Osteoporose gehört nicht zum Routine-repertoire vor einer Revisionsoperation.

Um einen Zusammenhang zwischen der Syndecan-4 Expression und einer bestehenden Osteoporose definitiv ausschließen zu können, wäre ein größeres Kollektiv mit Osteoporose-patienten und einer gesunden Kontrollgruppe nötig. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, dass die Syndecan-4 Expression bei der APL mit dem Knochenstoffwechsel und der Osteogenese assoziiert ist. Untersuchungen an Mäusen legen einen Zusammenhang zwischen der Syndecan-4 Expression und Osteoporose nahe (Stange et al. 2008).

Diabetes mellitus Typ 2

Bei unserem Kollektiv von 18 Patienten bestand bei sechs Fällen als Nebendiagnose ein Diabetes mellitus Typ 2. Studien, die sich mit dem Outcome von Patienten mit totaler Knieendoprothese beschäftigten, wiesen bei Patienten mit Diabetes mellitus eine höhere Inzidenz für postoperative Komplikationen nach als bei gesunden Patienten. Als Komplika-tionen können Wundinfektionen, tiefe Infektionen, periprothetische Frakturen und letztendlich eine aseptische Prothesenlockerung auftreten (Papagelopoulos et al. 1996).

Das Wissen über das klinische Outcome und die Inzidenz für aseptische Prothesen-lockerungen bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 ist jedoch noch gering (England et al. 1990, Serna et al. 1994). Untersuchungen konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen der Rate an Revisionsoperationen bei Patienten mit Diabetes mellitus und einer nicht-erkrankten Kontrollgruppe ermitteln. Die Rate an aseptischen Prothesenlockerungen war zwar höher bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 und die Inzidenz an Lysesäumen > 2 mm an der Knochen-Zement-Grenze war ebenfalls höher, die Ergebnisse waren jedoch nicht signifikant (Papagelopoulos et al. 1996).

Bei unserem Patientenkollektiv mit einer APL haben wir keinen signifikanten Unterschied in der Expression von Syndecan-4 in den CD68-positiven Zellen und dem Vorliegen von Diabetes mellitus Typ 2 feststellen können. Bei dem Gewebe unserer Diabetiker mit einer aseptischen Prothesenlockerung fiel die Syndecan-4 Expression sogar geringer aus als bei den Nicht-Diabetikern.

Hyperurikämie

Bei unserem Patientenkollektiv von 18 Patienten mit einer APL litten sechs Fälle an einer Hyperurikämie. Fünf Patienten wurden medikamentös mit Allopurinol behandelt. Da es sich hierbei um 1/3 aller Patienten handelte, wurde hier ebenfalls ermittelt, ob ein Unterschied in der Syndecan-4 Expression bei Patienten mit bzw. ohne eine Hyperurikämie bestand. Wir konnten zwar keinen signifikanten Unterschied herausarbeiten, aber bei den Patienten mit einer Hyperurikämie lag die mittlere Syndecan-4 Expression bei höheren Werten.

In einem einzelnen Casereport konnte gezeigt werden, dass z.B. Gichtknoten für die Lockerung von Prothesenteilen verantwortlich waren. Die Autoren erklärten die frühe Lockerung und den Verlust der Prothese damit, dass es durch die Ablagerung von Uraten in Verbindung mit der normalen täglichen Beanspruchung und der periodisch wiederkehrenden mechanischen Belastung zu einer Veränderung des lokalen Knochens gekommen sein könnte (Ortman et al. 1987).

4.1.4.3 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit der Einnahme verschiedener Medikamente

Aus den Akten der 18 Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung wurde die Medikamentenanamnese entnommen. 11,1 % der Patienten nahmen ein Statin (n = 2) und 16,7 % der Patienten (n = 3) injizierten sich Insulin. 72,2 % der Patienten (n = 13) standen unter medikamentöser Therapie eines NSARs.

Statine

Eine aktuelle experimentelle Studie aus Asien zeigte an einem Zellmodell, dass die Anwendung von Statinen wie Simvastatin die Expression von Faktoren, die an der Knochenresorption beteiligt sind, hemmen konnte. Im Speziellen handelte es sich hierbei um ein phosphoryliertes Protein (ERK1/2), das durch Abriebpartikel stimuliert wurde und gleichzeitig an der Aktivierung von Makrophagen beteiligt war. Diese Forschungsgruppe nahm daher an, dass Simvastatin möglicherweise zur Prävention und Behandlung von aseptischer Prothesenlockerung eingesetzt werden könnte (Wang et al. 2010). Ein weiteres Team aus China fand in Bezug auf die Syndecan-4 Expression in glatten Gefäßmuskelzellen von Ratten heraus, dass durch die Zugabe eines weiteren Statins (Pravastatin) die Zellproliferation und die Syndecan-4 Expression in diesen Zellen gehemmt wurden (Zhang et al. 2010). Bei unserem Kollektiv nahmen zwei Patienten aufgrund einer Hypercholesterinämie ein Statin ein. Obwohl die Fallzahl gering war, konnten wir zeigen, dass bei den CD68-positiven der Patienten, die ein Statin einnahmen, die mittlere Syndecan-4 Expression geringer ausfiel als beim restlichen Patientengut. Zwar ist dieser Unterschied nicht signifikant, aber er könnte darauf hinweisen, dass die Einnahme von Statinen nicht nur

die Expression von Syndecan-4 in glatten Gefäßmuskelzellen beeinflusst, sondern auch bei dessen Expression in Zellen der aseptischen Prothesenlockerung eine Rolle spielt.

NSAR

Die Nichtsteroidalen Antirheumatika (kurz: NSAR) sind weitverbreitete Medikamente, die u.a. zur analgetischen Therapie verschiedener Schmerzformen eingesetzt werden. 13 Patienten des Kollektivs mit APL standen unter Dauertherapie eines NSAR's. Verschiedene Studien konnten nachweisen, dass diese Medikamentengruppe einen Einfluss auf den Knochenmetabolismus ausübt. Es ist insbesondere die Knochenheilung, die durch die NSAR gehemmt wird (Keller et al. 1987, Espenhaug et al. 1997). Espenhaug et al. zeigten in ihrer Studie, dass Patienten, die Analgetika einnahmen, ein zweifach höheres Revisionsrisiko aufwiesen als Patienten ohne Schmerzmedikation (Esenhaug et al. 1997).

Bei unserer Untersuchung konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von Syndecan-4 zwischen den CD68-positiven Zellen der Patienten mit bzw. ohne Einnahme von NSAR festgestellt werden.

Viele Patienten stehen aufgrund ihrer Grunderkrankungen (Arthrose, Rheumatoide Arthritis etc.) bereits vor der Primäroperation unter einer analgetischen Dauertherapie, so dass die genaue Wirkung der NSAR auf den Lockerungsvorgang oder auf die Syndecan-4 Expression anhand klinischer Studien schwierig zu beurteilen ist.

Insulin

Drei Patienten der insgesamt 18 Männer und Frauen mit aseptischer Prothesenlockerung waren insulinpflichtige Diabetiker. Bei diesen drei Patienten wurde eine höhere mittlere Expression von Syndecan-4 in CD68-positiven Zellen der periprothetischen Membran nachgewiesen. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant. Das lässt vermuten, dass möglicherweise die Gabe von Insulin einen Einfluss auf die Expression von Syndecan-4 hat und damit auch den Lockerungsprozess beeinflussen könnte.

Die Literaturrecherche ergab kein Resultat, ob der Einfluss von Insulin auf die Syndecan-4 Expression bereits untersucht wurde. Espenhaug et al. beschrieben in ihrer Studie zwar, dass die Einnahme antidiabetischer Medikamente das Risiko einer Revisionsoperation erhöhen, aber ob sie direkt am Lockerungsprozess beteiligt sind, wurde nicht herausgearbeitet (Esenhaug et al. 1997).

4.1.4.4 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit dem Entzündungsparameter C-reaktives Protein

Bei der stationären Aufnahme der Patienten zur Revisionsoperation erfolgte eine präoperative Laborkontrolle. Hier wurde u.a. das C-reaktive Protein als Entzündungsparameter bestimmt.

Die statistische Auswertung ergab auch hier keinen signifikanten Unterschied zwischen der Syndecan-4 Expression in CD68-positiven Zellen und der Höhe des CRP-Wertes der Patienten. Durch die Bestimmung der Entzündungsparameter (CRP, BSG) kann zwar eine infektiöse Genese weitgehend ausgeschlossen werden, aber sie genügen nicht als einziges Kriterium, um die Diagnose einer APL zu stellen (Löhr et al. 2005).

4.1.4.5 Vergleich der Syndecan-4 Expression mit der Verwendung von Knochenzement

Bei unserem Patientenkollektiv mit einer aseptischen Prothesenlockerung (n = 18) wurde bei 22,2 % der Patienten (n = 4) Knochenzement verwendet, während bei den restlichen 77,8 % der Männer und Frauen (n = 14) auf dessen Verwendung bei der Operation verzichtet wurde. Die Expression von Syndecan-4 unterschied sich nicht signifikant zwischen den Zellen der periprothetischen Membran der Patienten, bei denen Knochenzement und bei denen kein Zement verwendet wurde. Die Expression von Syndecan-4 war jedoch in beiden Zelltypen der Patienten höher, bei deren Operation zur Fixation der Prothese zusätzlich Knochenzement eingesetzt wurde.

Studien haben nachgewiesen, dass sich die Art des Knochenzements auf die Lebenszeit einer Prothese auswirkt. Mit Hilfe des Norwegischen Arthroplastieregisters konnte in einem Zeitraum von 1987 bis 2000 gezeigt werden, dass es erhebliche Unterschiede in der Verlustrate von Hüftprothesen gab, wenn verschiedene Typen von Knochenzement verwendet wurden. Boneloc wird z.B. aufgrund der schlechten Langzeitergebnisse nicht mehr hergestellt. Die Knochenzementformen Sufix und CMW3 werden in bestimmten Ländern nicht mehr eingesetzt (Espehaug et al. 2002). Die Auswirkung der Zementwahl hat demnach einen erheblichen Einfluss auf die Standzeit eines Implantats.

Unser Patientenkollektiv war nicht groß genug, um eine Unterteilung nach dem Zementtyp vorzunehmen. Auch wenn wir keinen signifikanten Unterschied zwischen der Verwendung von Zement bzw. keinem Zement und der Syndecan-4 Expression nachweisen konnten, ermittelten wir eine höhere mittlere Expression von Syndecan-4 bei den zementierten Implantaten im Vergleich zu den nicht-zementierten Prothesen. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Verwendung von Zement Einfluss auf die Höhe der Syndecan-4 Expression nimmt.

Diskussion der molekular- und zellbiologischen Ergebnisse

Goldring beschrieb als Erster die histologische Ähnlichkeit zwischen der hyperplastischen Synovia bei Patienten mit rheumatoider Arthritis und der periprothetischen Membran von Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung (Goldring et al. 1983). Aus molekularbiologischer Sicht zeigen z.B. die RASFs (Rheumatoide Arthritis Synoviale Fibroblasten) und die PLFs (Prothesenlockerungsfibroblasten) einige gemeinsame Eigenschaften (Drees et al. 2007). Diese beinhalten die freie Proliferation der Fibroblasten, d.h. ohne dass eine Zellanheftung für ihre Ausbreitung notwendig ist (Lafyatis et al. 1989), sowie die Flucht vor Kontakthemmung. Des Weiteren sind sie an der Aktivierung Tumor-assoziiierter Vorgänge beteiligt wie der Expression von Protoonkogenen (Grimbacher et al. 1998, Pap et al. 2000) und führen zu Veränderungen bei der Apoptose (Franz et al. 2000). Schließlich spielen sie eine wichtige Rolle bei der Osteoklasten-unabhängigen Knochenresorption (Pap et al. 2003). Wie bereits erläutert wurde, enthält die periprothetische Membran bei aseptischen Prothesenlockerungen unter mikroskopischer Betrachtung verschiedene Zellen wie Makrophagen, Prothesenlockerungsfibroblasten (PLFs) und Osteoklasten. T- und B-Lymphozyten sind nur spärlich vertreten (Drees et al. 2007).

In unseren zell- und molekularbiologischen Untersuchungen lag das Hauptaugenmerk auf den Prothesenlockerungsfibroblasten, da sie den Hauptanteil der periprothetischen Zellen ausmachen. Zudem wird ihre Rolle bei der APL immer noch kontrovers diskutiert und ihre Bedeutung ist nicht vollständig geklärt.

Diese Arbeit beschäftigte sich mit der Expression und Funktion von Syndecan-4 in der periprothetischen Membran bei APL. Da die PLFs einen wesentlichen Bestandteil der Membran darstellen, haben wir zunächst die Expression von Syndecan-4 in isolierten PLFs und zum Vergleich in RASFs ermittelt. Die mRNA Expression von Syndecan-4 in den PLFs unterschied sich dabei nicht signifikant von der mRNA Expression von Syndecan-4 in den RASFs ($p = 0,974$). In den RASFs wurde durchschnittlich nur eine gering höhere Menge an mRNA von Syndecan-4 Expression ermittelt. Dies zeigt, dass die Fibroblasten bei RA und bei APL nicht nur in anderen Bereichen ähnliche Eigenschaften, sondern auch in der Expression von Syndecan-4 Parallelen aufweisen.

Da den RASFs, PLFs wie auch den OASFs ein Migrationsverhalten und eine Invasionsfähigkeit zugeschrieben wird, erfolgte die Durchführung von Invasionsassays. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Invasionsverhalten der Zellen. Den Prothesenlockerungsfibroblasten konnte ein invasives Verhalten nachgewiesen werden. Sie waren jedoch im Durchschnitt weniger invasiv als die RASFs und OASFs. Das lässt sich möglicherweise damit erklären, dass der Verlauf einer Rheumatoide Arthritis und einer

Osteoarthrose eher destruktiv und meist in Schüben verläuft, während die aseptische Prothesenlockerung einen kontinuierlichen Prozess darstellt. Auch scheint Syndecan-4 bei dieser Eigenschaft eine Rolle zu spielen.

In der Einleitung wurde bereits auf die Abriebpartikel eingegangen, die nach der Implantation einer Prothese im periprothetischen Gewebe vorzufinden sind. Diese Abriebpartikel interagieren an der Knochen-Zement-Grenze mit verschiedenen Zelltypen wie Osteoblasten, Osteoklasten, Fibroblasten-ähnlichen Zellen und Makrophagen. Als Hauptverantwortliche für eine nachfolgende periprothetische Knochenresorption werden Osteoklasten, Prothesenlockerungsfibroblasten und Makrophagen angesehen (Dress et al. 2007).

Viele Studien haben sich mit der Rolle der Zytokine bei dem Lockerungsprozess beschäftigt, die von den verschiedenen Zelltypen in unterschiedlicher Form sowie Menge produziert und abgegeben werden. Dabei stellen besonders der Tumornekrose Faktor (TNF), die Interleukine (IL-1, IL-6, IL-17) und der M-CSF Schlüsselfaktoren in der Regulation der Osteoklastogenese und der Knochenresorption dar (Neale et al. 1999). Untersuchungen haben ergeben, dass die Bindung von Biomaterialien an die Oberfläche von Phagozyten zur Ausschüttung von TNF α und IL-1 führen (Ingham et al. 2005). In unseren Untersuchungen bestätigten wir die Ergebnisse von Sabokbar et al., dass nicht nur Makrophagen, sondern auch Prothesenlockerungsfibroblasten an der Produktion von Zytokinen beteiligt sind (Sabokbar et al. 2005). In unseren kultivierten PLFs wurde nur wenig TNF- α exprimiert, während am meisten IL-1 β nachzuweisen war. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass Fibroblasten nicht nur selbst aktiv an der Knochenresorption teilnehmen, sondern durch Zytokinausschüttung eine Differenzierung von Vorläuferzellen im Knochenmark zur Osteoklasten bewirken können.

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle von Syndecan-4 in der periprothetischen Membran bei der aseptischen Prothesenlockerung (APL) untersucht. Mittels dieser Untersuchungen wurde die Syndecan-4 Expression nicht nur mit histologischen Merkmalen der periprothetischen Membran verglichen, sondern es wurden auch klinische Parameter zum Vergleich hinzugezogen.

In den immunhistochemischen und zell- sowie molekularbiologischen Untersuchungen konnte zunächst gezeigt werden, dass Syndecan-4 von den Hauptvertretern (Makrophagen und Fibroblasten) der periprothetischen Membran exprimiert wird.

Auf unsere Präparate kam die Klassifikation der periprothetischen Membran nach Krenn und Morawietz zur Anwendung. Die histopathologisch gestellte Diagnose deckte sich hierbei annähernd mit der klinisch gestellten Diagnose der APL.

Neben der Klassifikation der periprothetischen Membran in die histologischen Typen wurde der Synovialitis-Score angewendet. Dieser kann als nützliches Tool zur Subdifferenzierung der Aktivität im periprothetischen Gewebe bei der APL fungieren. Möglicherweise kann der Synovialitis-Score ebenfalls bei der Diagnosestellung von Nutzen sein. Bei keiner dieser beiden Einteilungen der periprothetischen Membran konnte jedoch eine Verbindung zur Syndecan-4 Expression festgestellt werden.

Unsere Untersuchungen lassen eine Abhängigkeit der Syndecan-4 Expression zum Vorhandensein von Abriebpartikeln vermuten. Metall-Kunststoffabrieb zeigte eine verminderte Syndecan-4 Expression, während beim alleinigen Vorkommen von Kunststoff eine erhöhte Expression von Syndecan-4 nachzuweisen war.

Die Mehrheit des Patientenkollektivs litt unter Adipositas. Auswirkungen des Übergewichts sowie der Prothesenstandzeit auf die Syndecan-4 Expression haben unsere Untersuchungen nicht ergeben.

Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Syndecan-4 Expression mit dem Knochenstoffwechsel, somit auch bei Osteoporose assoziiert ist.

Bei Patienten mit einer APL und gleichzeitig bestehender Hyperurikämie war eine erhöhte mittlere Syndecan-4 Expression, bei Diabetikern dagegen eine verminderte mittlere Expression von Syndecan-4 festzustellen.

Eine erhöhte Expression von Syndecan-4 konnte bei der Einnahme von Insulin bzw. eines Statins nachgewiesen werden. Ob die Einnahme dieser Medikamente einen Einfluss auf den Lockerungsprozess einer Prothese bei der APL hat, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

In den molekular- sowie zellbiologischen Untersuchungen zeigten sich ähnliche Eigenschaften zwischen den PFLs und RASFs in der Expression von Syndecan-4 sowie dem Migrationsverhalten dieser Zellen.

Die aseptische Prothesenlockerung stellt sich als ein heterogenes Krankheitsbild dar. Die Ätiologie der APL ist multifaktoriell und meist nicht das Resultat einer einzelnen Ursache, sondern eine Kombination aus verschiedenen Faktoren. Es werden weitergehende Untersuchungen notwendig sein, um den Pathomechanismus zu entschlüsseln und ein Verfahren zu entwickeln, das den betroffenen Patienten hilft und darüber hinaus auch unser Gesundheitssystem entlastet.

5. LITERATURVERZEICHNIS

Abu-Amer Y, Darwech I, Clohisy JC: Aseptic loosening of total replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies. *Arthritis Res and Therapy*. 9 (1): 1-7 (2007)

Aglietti P, Rinonapoli E: Total condylar knee arthroplasty: a five year follow-up study of 33 knees. *Clin Orthop*. 186: 104-111 (1984)

Ahlberg A, Lunden A: Secondary operations after knee joint replacement. *Clin Orthop*. 156: 170-174 (1981)

Akisue T, Bauer TW, Farver CF, Mochida Y: The effect of particle wear debris on NFkB activation and pro-inflammatory cytokine release in differentiated THP-1 cells. *J Biomed Mater Res*. 59 (3): 507-515 (2002)

Aspenberg P, Goodman S, Toksvig-Larsen S, Ryd L, Albrektsson T: Intermittent micromotion inhibits bone ingrowth. Titanium implants in rabbits. *Acta Orthop Scand*. 63 (2): 141-145 (1992)

Aspenberg P, Herbertsson P: Periprosthetic bone resorption. Particles versus movement. *J Bone Joint Surg Br*. 78 (4) : 641-646 (1996)

Aspenberg P, Van der Vis H. Fluid pressure may cause periprosthetic osteolysis. Particles are not the only thing. *Acta Orthop Scand*. 69 (1): 1-4 (1998a)

Aspenberg P, Van der Vis H. Migration, particles, and fluid pressure. A discussion of causes of prosthetic loosening. *Clin Orthop*. 352: 75-80 (1998b)

Baciu PC, Goetinck PF: Proteinkinase C regulates the recruitment of syndecan-4 into focal contacts. *Mol Biol Cell*. 6 (11): 1503-1513 (1995)

Bartel R: Osteoporose. George Thieme Verlag. 2. Auflage. S. 138-139 (2004)

Bass MD, Humphries MJ: Cytoplasmic interactions of syndecan-4 orchestrate adhesion receptor and growth factor receptor signalling: *J Biochem*. 368 (1): 1-15 (2002)

Bass MD, Roach KA, Morgan MR, Mostafavi-Pour Z, Schoen T, Muramatsu T, Mayer U, Ballstrem C, Spatz JP, Humphries MJ. Syndecan-4 dependent Rac1 regulation determines

directional migration in response to the extracellular matrix. *J Cell Biol.* 177 (3): 527-538 (2007)

Bauer TW: Particles and periimplant bone resorption. *Clin Orthop.* 405: 138-143 (2002)

Baumann B, Rader CP, Seufert J, Noth U, Rolf O, Eulert J, Jakob F: Effects of polyethylene and TiAlV wear particles on expression of RANK, RANKL and OPG mRNA. *Acta Orthop Scand.* 75: 295-302 (2004)

Baumann B, Rolf O, Jakob F, Goebel S, Sterner T, Eulert J, Rader CP: Synergistic effects of mixed TiAlV and Polyethylene wear particles on TNF α response in THP-1 macrophages. *Biomed Tech (Berlin).* 51: 360-366 (2006)

Baumann B, Rader CP: Ätiologie und Pathogenese der periprothetischen Osteolyse. *Fortbildung Osteologie.* 2 (3): 57-69 (2008)

Bernfield M, Kokenyesi R, Kato M, Hinkes MT, Spring J, Gallo RL, Lose E: Biology of the syndecans: a family of transmembrane heparan sulfate proteoglycans. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8: 365-393 (1992)

Bernfield M, Götte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M: Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans *Annu. Rev. Biochem.* 68: 729-777 (1999)

Bi Y, Seabold JM, Kaar SG, Ragab AA, Goldber VM, Anderson JM, Greenfield EM: Adherent endotoxin on orthopedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res.* 16 (11): 2982 – 2091 (2001)

Bos I: Gewebereaktionen um gelockerte Hüftgelenkendoprothesen. *Der Orthopäde.* 30 (11): 881-889 (2001)

Breitenseher MJ, Mayerhöfer M, Gottsauner-Wolf F, Krestan C, Toma CD, Imhof H: Bildgebung bei Hüftprothesen. *Radiologe.* 42: 474-479 (2002)

Brooks RA, Wimhurst JA, Rushton N: Endotoxin contamination of particles produces misleading inflammatory cytokine responses from macrophages in vitro. *J Bone Joint Surg Br.* 82 (4) : 295-200 (2002)

Bund. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. 37-39 (2006)

Callaghan JJ, Dysart SH, Savory CG: The uncemented porous-coated anatomic total hip prosthesis. Two-year results of a prospective consecutive series. *J Bone Joint Surg Am.* 70: 337–346 (1988)

Chan CLH, Villar RN: Obesity and quality of life after primary hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Br.* 78: 78-81 (1996)

Charnley J: *Low friction arthroplasty of the hip.* Berlin, Springer-Verlag. 78-87 (1979)

Childs LM, Goater JJ, O'Keefe RJ, Schwarz EM: Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis. *J Bone Miner.* 16: 338-347 (2001)

Couchman JR: Syndecans: Proteoglycan regulators of cell-surface microdomains. *Nature.* 4: 926-937 (2003)

Dannenmaier WC, Haynes DW, Nelson CL: Granulomatous reaction and cystic bony destruction associated with wear rate in total knee prosthesis. *Clin Orthop.* 198: 224-230 (1985)

David G, Van der Schueren B, Marynen P, Cassiman JJ, Van der Berghe H: Molecular cloning of amphiglycan, a novel integral membrane heparan sulfate proteoglycan expressed by epithelial and fibroblast cells. *J Cell Biol.* 118 (15;4): 961-969 (1992)

Davies AP, Willert HG, Campbell PA, Learmonth ID, Case CP: An Unusual Lymphocytic Perivascular Infiltration in Tissues Around Contemporary Metal-on-Metal Joint Replacements. *J Bone Joint Surg Am.* 87 (1): 18-27 (2005)

DeLee JG, Charnley J: Radiological demarcation of cemented sockets in total hip replacement. *Clin Orthop.* 121: 20-32 (1976)

Drees P, Eckhardt A, Gay RE, Gay S, Huber LC: Mechanisms of disease: molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants. *Nature.* 3 (3): 165-169 (2007)

Drees P, Eckhardt A, Gay RE, Gay S, Huber LC: Molecular pathways in aseptic loosening of orthopaedic endoprosthesis, *Biomed Tech.* 53: 93-103 (2008)

Echtermeyer F, Streit M, Wilcox-Adelman S, Saoncella S, Denhez F, Detmar M, Goetinck P: Delayed wound repair and impaired angiogenesis in mice lacking syndecan-4. *J Clin Invest.* 107 (2): R9-14 (2001)

Engl CA, Bobyn JD: The influence of stem size and extent of porous coating on femoral bone resorption after primary cementless hip arthroplasty. *Clin Orthop.* 231: 7-28 (1988)

England SP, Stern SH, Insall JN, Windsor RE: Total knee arthroplasty in diabetes mellitus. *Clin Orthop.* 260: 130-134 (1990)

Espenhaug B, Havelin LI, Engesaeter LB, Langeland N, Vollset SE: Patient-related risk factor for early revision of total hip replacements. A population register-based-control study of 674 revised hips. *Acta Orthop Scand.* 68 (3): 207-215 (1997)

Espenhaug B, Furnes O, Havelin LI, Engesaeter LB, Vollset SE: The type of cement and failure of total hip replacements. *J Bone Joint Surg Br.* 84-B : 832-838 (2002)

Ewald FC: The knee society total knee arthroplasty: Roentgenographic evaluation and scoring-system. *Clin Orthop and Rel Res.* 9-12 (1989)

Filmus J: Glypicans in growth and cancer. *Glycobiology.* 11: 19R-23R (2001)

Firestein GS: Invasive fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis. Passive responders or transformed aggressors. *Arthr and Rheum.* 39 (11): 1781-1790 (1996)

Franz JP, Pap T, Hummel KM, Nawrath M, Aicher WK, Shigeyama, Müller-Ladner U, Gay RE, Gay S: Expression of sentrin, a novel antiapoptotic molecule, at sites of synovial invasion in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43: 599-607 (2000)

Gallo J, Kaminek P, Tichá V, Riháková P, Ditmar R: Particle disease. A comprehensive theory of periprosthetic osteolysis: A review. *Biomed.* 146 (2): 21-28 (2002)

Gentzsch C, Kaiser E, Plutat J, Sellckau R, Wodtke J, Delling G: cDNA-Arrays – Zytokin-Expressionsprofil aseptisch gelockerter Femurschaftprothesen. *Der Pathologe.* 5 (23): 373-378 (2002)

Götte M: Syndecans in Inflammation, *The FASEB Journal.* 17: 575-591 (2003)

Goldring SR, Schiller AL, Roelke M, Rourke CM, O'Neil DA, Harris WH: The synovial-like membrane at the bone-cement interface in loose total hip replacements and its proposed role in bone lysis. *J Bone Joint Surg Am.* 65: 575-584 (1983)

Goldring SR, Jasty M, Roelke M, Rourke CM, Bringhurst FR, Harris WH: Formation of a synovial-like membrane at the bone-cement interface. Its role in bone resorption and implant loosening after total hip replacement. *Arthritis Rheum.* 29 (7): 836-842 (1986)

Goodman SB: The effects of micromotion and particulate materials on tissue differentiation: Bone chamber studies in rabbits. *Acta Orthopaedica.* 65 (s258): 1–43 (1994)

Gravius S, Mumme T, Delank KS, Echardt A, Maus U, Andereya S, Hansen T: Immunohistochemische Analyse periprothetischer Osteolysen aseptischer Hüftprothesenlockerungen, *Z Orthop Unfallchir.* 145: 169-175 (2007)

Green TR, Fisher J, Stone M, Wroblewski BM, Ingham E. Polyethylene particles of a “critical size” are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials.* 19 (24): 2297-2302 (1998)

Greenfield EM, Bi Y, Miyauchi A: Regulation of osteoclast activity. *Life Sci.* 65 (11): 1087-1102 (1999)

Greenfield EM, Bi Y, Ragab AA, Goldberg VM, Van De Motter RR: The role of osteoclast differentiation in aseptic loosening. *J Orthop Res.* 20 (1): 1-8 (2002)

Griffin FM, Giles SR, Insall JN, Wayne C.: Total knee arthroplasty in patients who were obese with 10 years follow-up. *Clin Orthop.* 356: 28 (1998)

Grimbacher B, Aicher WK, Peter HH, Eibel H: TNF- α induces the transcription factor Egr-1, pro-inflammatory cytokines and cell proliferation in human skin fibroblasts and synovial lining cells. *Rheumatol Int.* 17:185-192 (1998)

Gruen TA, McNeice GM, Amstutz HC: “Modes of failure” of cemented stem-type femoral components. *Clin Orthop and Relat Res.* 141: 17-27 (1979)

Haddad FS, Cobb AG, Bentley G, Levell NJ, Dowd PM: Hypersensitivity in aseptic loosening of total hip replacements. The role of constituents of bone cement. *J Bone Joint Surg Br.* 78-B : 546-549 (1996)

Halden Y, Rek A, Atzenhofer W, Szilak L, Wabnig A, Kungl AJ: Interleukin-8 binds to syndecan-2 on human endothelial cells. *Biochem J.* 377: 533-538 (2004)

Hansen T, Otto M, Buchhorn GH, Scharnweber D, Gaumann A, Delank KS, Eckardt A, Willert HG, Kriegsmann J, Kirkpatrick CJ: New aspects in histological examination of polyethylene wear particles in failed total joint replacements. *Acta Histochem.* 104 (3): 263-269 (2002)

Hitchins VM, Merritt K: Decontaminating particles exposed to bacterial endotoxin (LPS). *J Biomed Mater Res.* 46 (3): 434-437 (1999)

Horowitz A, Tkachenko E, Simons M: fibroblast growth factor-specific modulation of cellular response by syndecan-4. *J Cell Biol.* 157: 715-725 (2002)

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

Insall J, Scott WN, Ranawat CS: The total condylar knee prosthesis. *J Bone Joint Surg Am.* 61: 173-180 (1979)

Ishiguro K, Kadomatsu K, Kojima T, Muramatsu H, Matsuo S, Kusugami K, Saito H, Muramatsu T: Syndecan-4 Deficiency Increases Susceptibility to k-Carrageenan-Induced Renal Damage. *Lab Invest.* 81 (4): 509-516 (2001)

Ishiguro K, Kojima T, Muramatsu T: Syndecan-4 as a molecule involved in defense mechanisms. *Glycoconjugate Journal.* 19: 315-318 (2003)

Jacobs JJ, Hallab NJ: Loosening and Osteolysis Associated with Metal-on-Metal Bearings: A Local Effect of Metal Hypersensitivity?. *J Bone Joint Surg Am.* 88 (6):1171-1172 (2006)

Jeong J, Han I, Lim Y, Kim J, Park I, Woods A, Couchman JR, Oh ES: Rat embryo fibroblasts require both the cell-binding and the heparin-binding domains of fibronectin for survival. *Biochem J.* 356: 531-537 (2001)

Kaddick C, Catelas I, Pennekamp PH, Wimmer MA: Verschleiß und aseptische Prothesenlockerung. Eine Bestandsaufnahme. Orthopäde. 38: 690-697 (2009)

Kaneider NC, Egger P, Dunzendorfer S, Römisch J, Wiedermann CJ: Syndecan-4 as antithrombin receptor of human neutrophils. Biochem Biophys Res Commun. 287 (1): 42-46 (2001)

Kaneider NC, Reinisch CM, Dunzendorfer S, Römisch J, Wiedermann CJ: Syndecan-4 mediates antithrombin-induced chemotaxis of human peripheral blood lymphocytes and monocytes. J Cell Sci. 1115: 227-236 (2002)

Kim CW, Goldenberger OA, Gallo RL, Bernfield M : Members of the syndecan family of heparan sulfate proteoglycans are expressed in distinct cell-, tissue-, and development-specific patterns. Mol Biol Cell. 5: 797-805 (1994)

Katzer A, Löhr J: Frühlockerung von Hüftgelenkendoprothesen. Deutsches Ärzteblatt, Jg. 100, Heft 12. A784-A790 (2003)

Kottinen YT, Xu JW, Päätiälä H, Imai S, Waris V, Li TF, Goodman SB, Nordsletten L, Santavirta S: Cytokines in aseptic loosening of total hip replacement. Curr Orth. 11: 40-47 (1997)

Krenn V, Morawietz L: Periprothetische Membran gelockerter Endoprothesen, <http://www.charite.de/ch/patho/Webpage/pages/diagnostik/diagnostik-richtlinien/biopsie/pp-membran/pp-membran.htm>, 07.12.2008

Krenn V, Morawietz L:
http://pathologie-ccm.charite.de/diagnostik/diagnostische_richtlinien/synovitis_score/, 2011

Krukemeyer MG, Möllenhoff G: Endoprothetik. 8:175-183 (2009)

Lafyatis R, Remmers EF, Roberts AB, Yocum DE, Sporn MB, Wilder RL: Anchorage-independent Growth of Synoviocytes from Arthritic and Normal Joints. Stimulation by Exogenous Platelet-derived Growth Factor and Inhibition by Transforming Growth Factor-Beta and Retinoids. J Clin Invest. 83: 1267-1276 (1989)

Linder L, Lindberg L, Carlsson A: Aseptic loosening of hip prostheses. A histologic and enzyme histochemical study. Clin Orthop. 175: 93-104 (1983)

Löhr JF, Katzer A: Die aseptische Hüftprothesenlockerung. Hüftchirurgie in der Praxis, Springer-Verlag.17: 235-246 (2005)

McFall AJ, Rapraeger AC: Identification of an adhesion site within the syndecan-4 extracellular protein domain. J Biol Chem. 272 (20): 12901-12904 (1997)

McFall AJ, Rapraeger AC: Characterization of the high affinity cell-binding domain in the cell surface proteoglycan syndecan-4. J Biol Chem. 273 (43): 28270-28276 (1998)

Menge M: Current concepts of hip arthroplasty with bone preserving femoral implants. <http://www.st-marienkrankenhaus.de/downloads/>, 2003. 1-11

Merkel KD, Erdmann JM, McHugh KP, Bu-Amer Y, Ross FP, Teitelbaum SL: Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. Am J Pathol. 154: 203-210 (1999)

Morawietz L, Gehrke T, Classen RA, Barden B, Otto M, Hansen T, Aigner T, Stiehl P, Neidel J, Schröder JH, Frommelt L, Schubert T, Meyer-Scholten C, König A, Ströbel P, Rader CP, Kirschner S, Lintner F, Rüter W, Skwara A, Bis I, Kriegsmann J, Krenn V: Vorschlag für eine Konsensus-Klassifikation der periprothetischen Membran gelockerter Hüft- und Knieendoprothesen. Pathologe. 25 (5): 375-384 (2004)

Morawietz L, Gehrke T, Schröder JH, Krenn V: Histopathologische Diagnostik der Endoprothesenlockerung. Der Pathologe. 27 (6): 439-446 (2006)

Mont MA, Marthur SK, Krackow KA, Loewy JW, Hungerford DS.: Cementless total knee arthroplasty in obese patients : a comparison with matched control group. J Arthroplasty. 11 (2): 153-156 (1996)

Moreland JR: Mechanism of failure in total knee arthroplasty. Clin Orthop. 226: 49-64 (1988)

Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Chun LE, Song Y, Maloney WJ, Goodman SB, Schurman DJ, Smith RL: Signaling pathways for TNF α and IL-6 expression in human makrophages exposed to titanium-alloy particulate debris in vitro. J Bone Joint Surg Am. 81: 603-615 (1999)

Neale SD, Sabokbar A, Howie DW, Murray DW, Athanasou NA: Macrophage colony-stimulating factor and Interleukin-6 release by periprosthetic cells stimulates osteoclast formation and bone resorption. *J Orthop Res.* 17: 689-694 (1999)

Oh ES, Woods A, Couchman JR: Syndecan-4 proteoglycan regulates the distribution and activity of protein kinase C. *J Biol Chem.* 272 (13): 8133–8136 (1997)

Ortman BL, Pack LL: Aseptic loosening of total hip prosthesis secondary to tophaceous gout. A case report. *J Bone Joint Surg Am.* 69-A (7): 1096-1099 (1987)

Otto M, Kriegsmann J, Gehrke T, Bertz S: Abriebpartikel – Schlüssel der aseptischen Prothesenlockerung?. *Der Pathologe.* 27 (6): 447-460 (2006)

Otto M: Klassifikation bei Protheseninsuffizienz und Partikelbestimmung. *Der Pathologe.* 29 (2): 232-239 (2008)

Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA: An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *J Clin Pathol.* 52(2): 118–123 (1999)

Pap G, Machner A, Rinnert T, Hörler D, Gay RE, Schwarzberg H, Neumann W, Michel BA, Gay S, Pap T: Development and Characteristics of a Synovial-Like Interface Membrane Around Cemented Tibial Hemiarthroplasties in a Novel Rat Model of Aseptic Prosthesis Loosening. *Arthritis Rheum.* 44: 956-963 (2001)

Pap T, Shigeyama Y, Kuchen S, Fernhough JK, Simmen B, Gay RE, Billingham M, Gay S: Differential expression pattern of membrane-type matrix metalloproteinases in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 43: 1226-1232 (2000)

Pap T, Claus A, Ohtsu S, Hummel KM, Schwartz P, Drynda S, Pap G, Machner A, Stein B, George M, Gay RE, Neumann W, Gay S, Aicher WK : Osteoclast-independent bone resorption by fibroblast-like cells. *Arthritis Res Ther.* 5: R163-R173 (2003)

Papagelopoulos PJ, Idusuyi OB, Wallrichs SL, Morrey BF: Long term outcome and survivorship analysis of primary total knee arthroplasty in patients with diabetes mellitus. *Clin Orthop.* 330: 124-132 (1996)

Patterson AM, Cartwright A, David G, Fitzgerald O, Bresnihan B, Ashton BA, Middleton J: Differential expression of syndecans and glypicans in chronically inflamed synovium. *Ann Rheum Dis.* 67: 592-601 (2008)

Perka C, Paul C, Matziolis G: Einflussfaktoren auf die perioperative Morbidität und Mortalität in der primären Hüftendoprothetik. *Der Orthopäde.* 33: 715-720 (2004)

Perrimon N, Bernfiel M: Specificities of heparan sulphate proteoglycans in developmental processes. *Nature.* 404 (4): 725-727 (2000)

Peters KM, Fritzen ME, Klosterhalfen B: Aseptische versus septische Hüft-TEP-Lockerung: Gibt es zelluläre Unterschiede?. *Fortbildung Orthopädie 2, Steinkopff-Verlag.* 3:85-87 (2008)

Ragab AA, Van De MR, Lavish SA, Goldberg VM, Ninomiya JT, Carlin CR, Greenfield EM: Measurement and removal of adherent endotoxin from titanium particles and implant surfaces. *J Orthop Res.* 17 (6): 803-809 (1999)

Repeh LA: A new in vitro assay for quantitating tumor cell invasion. *Invasion Metastasis.* 9 (3): 192-208 (1989)

Ryd L, Linder L: On the correlation between micromotion and Histology of the bone-cement Interface. Report of three cases of knee arthroplasty followed by roentgen stereophotogrammetric analysis. *J Arthroplasty.* 4: 303-309 (1989)

Sabokbar A, Itonaga I, Sun SG, Kudo O, Athanasou NA : Arthroplasty membrane-derived fibroblasts directly induce osteoclast formation and osteolysis in aseptic loosening. *J Orthop Res.* 23: 511-519 (2005)

Sakai H, Jingushi S, Shuto T, Urabe K, Ikenoue T, Okazaki K, Kubita T, Kubita A, Iwamoto Y : Fibroblasts from inner granulation tissue of the pseudocapsule in hips at revision arthroplasty induce osteoclast-differentiation, as do stromal cells. *Ann Rheum Dis.* 61: 103-109 (2002)

Santa Cruz Biotechnology (2008): <http://datasheets.scbt.com/sc-70761.pdf> (14.12.2008)

Santavirta S, Konttinen YT, Bergroth V, Eskola A, Tallroth K, Lindholm TS: Aggressive granulomatous lesions associated with hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am.* 72 (2): 252-258 (1990)

Santavirta S, Konttinen YT, Hoikka V, Eskola A: Immunopathological response to loose cementless acetabular components. *J Bone Joint Surg Br.* 73 (1) : 38-42 (1991a)

Santavirta S, Pajamaki J, Eskola A, Konttinen YT, Lindholm T : Proliferative cell response to loosening of total hip replacements. *Arch Orthop Trauma Surg.* 111: 43-46 (1991b)

Sanocella S, Echtermeyer F, Denhez F, Nowlen JK, Mosher DF, Robinson SD, Hynes RO, Goetinck PF: Syndecan-4 signals cooperatively with integrins in rho-dependent manner in the assembly of focal adhesions and actin stress fibers. *Proc. of the National Academy of Sciences.* 96: 2805-2810 (1999)

Schmalzried TP, Jasty M, Harris WH: Periprosthetic loss in total hip arthroplasty. Polyethylene wear debris and the concept of effective joint space. *J Bone Joint Surg Am.* 74: 849-863 (1992)

Schmalzried TP, Akizuki KH, Fedenko AN, Mirra J: The role of access of joint fluid to bone in periarticular osteolysis: A report of four cases. *J Bone Joint Surg Am.* 79 (3): 447-452 (1997)

Schmalzried TP, Shepherd EF, Dorey FJ, Jackson WO, dela Rosa M, Fa'vae F, McKellop HA, McClung CD, Martell J, Moreland JR, Amstutz HC: The John Charnley Award. Wear is a function of use, not time. *Clin Orthop.* 381: 36-36 (2000)

Schneider U, Thernath S, Thomsen M, Brocai DRC, Niethard FU: Der Einsatz biochemischer Marker in der Lockerungsdiagnostik aseptischer Hüftprothesen. *Z Orthop.* 135(4): 297-300 (1997)

Selleck SB: Proteoglycans and pattern formation. Sugar biochemistry meets developmental genetics. *Trends Genet.* 16 (5): 206-212 (2000)

Shanbhag AS, Jacobs JJ, Black J, Galante JO, Glant TT: Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro. *Clin Orthop.* 342: 205-217 (1997)

Serna F, Mont MA, Krackow KA, Hungerford DS: Total knee arthroplasty in diabetic patients. Comparison to a matched control group. *J Arthroplasty*. 9 (4): 375-379 (1994)

Siebold R, Scheller G, Schreiner U, Jani L: Langzeitergebnisse mit dem zementfreien CLS-Schaft von Spotorno. *Orthopäde*. 30 (5): 317-322 (2001)

Simons M, Horowitz A: Syndecan-4-mediated signalling. *Cell Signal*. 13: 855-862 (2001)

Smith BE, Askew MJ, Gradisar IA, Gradisar JS, Lew MM : The effect of patients weight on the functional outcome of total knee arthroplasty. *Clin Orthop*. 276: 237-244 (1992)

Stange R, Timmen M, Stoltenberg T, Hidding H, Echtermeyer F, Neugebauer K, Pap T, Raschke M: Syndecan-4 deficiency leads to an osteoporotic bone structure in vivo and an impaired osteoblast functionality in vitro. *European Cells and Materials*. 16 (4): 3 (2008)

Stern SH, Insall JN: Total knee arthroplasty in obese patients. *J Bone Joint Surg Am*. 72: 1400-1404 (1990)

Stukenborg-Colsman C, Ostermeier S, Windhagen H: Welchen Einfluss hat Übergewicht auf die Ergebnisse von Hüft- und Knieendoprothesen?. *Der Orthopäde*. 34: 664-667 (2005)

Sundfeldt M, Carlsson L, Johansson CB, Thomsen P, Gretzer C: Aseptic loosening, not only a question of wear – A review of different theories. *Acta Orthopædica*. 77 (2): 177-197 (2006)

Teeny SM, York SC, Mesko JW, Rea RE: Long-term follow-up care recommendations after total hip and knee arthroplasty: Results of the American association of hip and knee surgeons' member survey. *J Arthroplasty* 18: 954-962 (2003)

Tkachenko E, Rhodes JM, Simons M: Syndecans – New Kids on the signaling block. *American Heart Association, Inc*. 488-500 (2005)

Tsuzuki S, Kojima T, Katsumi A, Yamazaki T, Sugiura I, Saito H : Molecular cloning, genomic organization, promoter activity, and tissue-specific expression of the mouse ryudocan gene. *J Biochem*. 122 (1): 17-24 (1997)

Turzynski A (2001-2007):

<http://www.pathologen-luebeck.de/Methoden/Histologie/histologie.html>, 14.12.2008

Volk R, Schwartz JJ, Li J, Rosenberg RD, Simons M: The role of syndecan cytoplasmatic domain in basic fibroblast growth factor-dependent signal transduction. *J Biol Chem.* 274 (34): 24417– 24424 (1999)

Wang Z, Gao X, Sun K, Jin Q: Experimental study on simvastatin in prevention and treatment of aseptic loosening of prosthesis. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi.* 24 (5): 544-547 (Abstract) (2010)

Wilcox-Adelman SA, Denhez F, Goetinck PF: Syndecan-4 modulates focal adhesion kinase phosphorylation. *J Biol Chem.* 277: p.32970-32977 (2002)

Wilcox-Adelman SA, Denhez F, Iwabuchi T, Saoncella S, Calautti E, Goetinck PF: Syndecan-4: Dispensable or indispensable?. *Glycoconjugate Journal.* 19: 305-313 (2003)

Willert HG: Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res.* 11 (2): 157-164 (1977)

Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Köster G, Lohmann CH: Metal-on-Metal Bearings and Hypersensitivity in Patients with Artificial Hip Joints. A Clinical and Histomorphological Study. *J Bone Joint Surg Am.* 87 (1): 28-36 (2005)

Winiarsky R, Barth P, Lotke PA: Total knee arthroplasty in morbidly obese patients. *J Bone Joint Surg Am.* 80: 1770-1774 (1998)

Wirtz DC, Niethard FU: Ursachen, Diagnostik und Therapie der aseptischen Hüftendoprothesenlockerung – eine Standortbestimmung. *Z Orthop.* 135: 270-280 (1997)

Wirtz DC, Rader C, Reichel H (Hrsg.): Revisionsendoprothetik der Hüftpfanne. Springer Medizin Verlag Heidelberg. 11-53 (2008)

Wirtz DC, Thielemann F, Holz U: Zementfreie Revisionsarthroplastik der Hüftpfanne – Mittelfristige Ergebnisse mit dem trabekulär orientierten Pfannenimplantat. *Z Orthop.* 135 (4): 301-309 (1997)

Woods A, Couchman JR: Syndecan-4 heparan sulfate proteoglycan is a selectively enriched and widespread foacal adhesion component. *Mol Biol Cell.* 5 (2): 183.192 (1994)

Yamashita Y, Oritani K, Miyoshi EK, Wall R, Bernfield M, Kincade PW: Syndecan-4 is expressed by B-lineage lymphocytes and can transmit a signal for formation of dendritic processes. *J Immunol.* 162: 5940-5948 (1999)

Yeaman C, Rapraeger AC: Membrane-anchored proteoglycans of mouse macrophages: P388D1 cells express a syndecan-4-like heparan sulfate proteoglycan and a distinct chondroitin sulfate form. *J Cell Physiol.* 157: 413-425 (1993)

Yang SY, Ren W, Park Y, Sieving A, Hsu S, Nasser S, Wooley PH: Diverse cellular and apoptotic responses to variant shapes of UHMWPE particles in a murine model of inflammation. *Biomaterials.* 23 (17): 3535-3543 (2002)

Zhang B, Ouyang P, Chen Y, Lai W, Xie J, Xu D: Tumor necrosis factor- α regulates the proliferation and syndecan-4 expression of human umbilical vein endothelial-like cells cultured in vitro. *J South Med Univ.* 496-498 (2007)

Zhang Y, Pasparakis M, Kollias G, Simons M: Monocyte-dependent regulation of endothelial cell syndecan-4 expression. Role of TNF- α . *J Biol Chem.* 274: 14786-14790 (1999)

Zhang Y, Ouyang P, Luo Y, Lai WY, Xu DL: Pravastatin inhibits the expression of syndecan-4 protein in tumor necrosis factor- α -induced rat vascular smooth muscle cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 30 (5): 998-1001 (Abstracts) (2010)

Zimmermann P, David G: The syndecans, turners of transmembrane signaling. *FASEB J.* 13: 91-100 (1999)

6. ANLAGE

Materialien für histologische Methoden

Artikel	Quelle	Artikelnummer
Formaldehyd 37 %; ≥37 %, Ph.Eur., BP, USP ; Histologie, zur Fixierung. Formalin, Formol, CH ₂ O, M 30,03 g/mol, Kochpunkt 99 °C, Dichte 1,09, Flammpunkt 62 °C, ADR 8 III / WGK 2 Volume: 5l	Carl Roth GmbH	Cat No 11-0705
Paraffin (Histowachs)	Leica	

Materialien für zellbiologische Methoden

Artikel	Quelle	Artikelnummer
DMEM/Ham`'s with L-Glutamin, Storage: 2 – 8 °C Volume: 500 ml	PAA Laboratoires GmbH	Cat No E15-813
Trypsin-EDTA 0,05%/0,02% in D-PBS, Storage: < - 15°C Volume: 100 ml	PAA Laboratoires GmbH	Cat No L11-004
Dulbecco`'s PBS (1x) without Ca and Mg, Storage: 15 – 25°C Volume: 500 ml	PAA Laboratoires GmbH	Cat No H15-002
Polycarbonate Membrane 24 Well Transwell Permeable Supports, 6.5mm Transwell® with 8.0µm Pore Polycarbonate Membrane Insert, Sterile	Corning Life Sciences	Cat No #3422
Foetal Bovine Serum Origin: EU Approved Volume: 100 ml	Invitrogen	Cat No 10270098
Penicillinstreptomycin	Biochrom AG	Cat No A2213

10.000 E/10.000 µg/ml Quantity 100 ml Lot No 1308L Storage: < - 20°C		
Amphotericin B 250 µg/ml Quantity 50 ml Lot No 1167L Storage: < - 20°C	Biochrom AG	Cat No A2612
Rat Collagen I, 100mg/20ml	Cultrex	Cat No 3440-100-01
Lipofectamine™ 2000	Invitrogen	Cat. No. 11668-500
Opti-MEM I Reduced Serum Medium	Invitrogen	Cat. No. 11058-021

Materialien für molekularbiologische Methoden

Artikel	Quelle	Artikelnummer
RPMI 1640 with L-Glutamin Storage: 2 – 8 °C Volume: 500 ml	PAA Laboratoires GmbH	Cat No E15-840
High Pure RNA Isolation Kit Storage: 15 – 25 °C	Roche Diagnostics GmbH	Cat No 11 828 665 001
DEPC = Diethylene-Pyrocabonate Storage: 2 – 8 °C Lot No 092K3682 Volume: 25 ml	Sigma	Cat No D5758
Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Sample Kid Storage: –15 bis -25°C	Roche Diagnostics GmbH	Cat No 05 081 866 001
Dulbecco`s PBS (1x) without Ca and Mg Storage: 15 – 25 °C Volume: 500 ml	PAA Laboratoires GmbH	Cat No H15-002
Light Cycler Capillaries (20 µl) 96 Capillaries	Roche Diagnostics GmbH	Cat No 04 929 292 001

Storage: 15 – 25 °C		
Light Cycler Centrifuge Adapters Storage: 2 – 8 °C	Roche Diagnostics GmbH	Cat No 1909312
HyperLadder™ IV	Bioline	Cat No BIO-33029
5x DNA Loading Buffer Blue 2 x 1ml Lot No #HLBB-104B	Bioline	Cat No BIO-37045
Sensi Mix Lite Contents: 5x Sensi Mix Lite, Enzyme Mix, 50 mM MgCl ₂ Solution, 30x Sybr Green Solution Storage : -20 °C	Quantace	Cat No QT450-05
Agarose SeaKem Lot No: 623695 Storage: 18 – 26°C Volume: 1kg	Biozym	Cat No 50005
Ethidiumbromid, C ₂₁ H ₂₀ BrN ₃ ~95% (HPLC) 260-262 °C (dec.)(lit.) Molecular Weight: 394.31	Sigma	Cat No E8751
Tris Base PUFFERAN® ≥99,3 %, Buffer Grade Für Elektrophoresepuffer und Waschlösungen. Tris- (hydroxymethyl)-aminomethan C ₄ H ₁₁ NO ₃ , M 121,14 g/mol, WGK 2 Volume: 1kg	Carl Roth GmbH	Cat No AE15.2
Borsäure ≥99,5 %, Ph.Eur., USP, BP Puffersubstanz, H ₃ BO ₃ , 61,83 g/mol Dichte 1,52, WGK 1 Volume: 1kg	Carl Roth GmbH	Cat No PO10.2
EDTA, Ethylenediaminetetraacetic acid dihydrate disodium salt for molecular biology, ≥99% C ₁₀ H ₁₄ N ₂ Na ₂ O ₈ · 2H ₂ O	Sigma	Cat No E5134

248 °C (dec.)(lit.) Molecular Weight:372.24		
--	--	--

Geräte

Werkbank Firma: Heraeus Kendro Laboratory Produces Serien-No. 40021792	Brutschrank Firma: Bioscience Nuaire DH Autoflow CO ₂ -Air-Jacketed Incubator Temperatur: 37,1°C 4,8 CO ₂ % Serien-No. 109750100306 Gerätetyp: NU-5500E Baujahr 2006
Coulter Firma: Beckman Coulter GmbH Particle count and size analyzer Instance-No. 826181 Instrument-Typ: Z2	Zentrifugen Firma: Eppendorf MiniSpin Cat No F45-12-11 Firma: Hettich Universal 32R
Elektronisches Rotationsmikrotom Firma: Microm Typ: HM 335 E	Färbeautomaten Firma: Ventana Typ: BenchMark® XT Typ: NexES® IHC
Mikroskop Firma: Nikon (Japan) Eclipse TE300	Light Cyclers Firma: Roche
Heater Firma: BIORAD Laboratories Gradient Cycler	Photometer Firma: Eppendorf BIOPhotometer

Ablauf der Antikörperfärbungen

Vimentin (Protokoll-Nr. 10):

Nachdem in den ersten beiden Schritten die Entparaffinierung und die Hitzebehandlung der Präparate vorgenommen wurden, erfolgte die Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens. Des Weiteren wurde der Coverslip aufgetragen, der Objektträger bis 37°C aufgeheizt und schließlich für 4 min. inkubiert. Erneut erfolgte die Spülung mit dem Reaktionspuffer sowie die Feineinstellung des Reaktionspuffervolumens, bis ein Tropfen des UV INHIBITOR auf den Objektträger aufgetragen wurde. Der Inhibitor diente der Blockierung der unspezifischen Peroxidase im Gewebe.

Im weiteren Verlauf schlossen sich nach jeder Inkubation Spül- bzw. Waschvorgänge an.

Als nächstes wurde ein Tropfen des Antikörpers (PREP KIT 10) im Verdünnungsverhältnis 1:500 aufgetragen und das Präparat für 32 min. inkubiert.

Nach den o.g. Waschvorgängen konnte ein Tropfen UV HRP (Horse Radish Peroxidase) UNIV MULT, der sog. Multi Link, auf den Objektträger aufgetragen werden. Bei einem Multi Link-Antikörper handelt es sich um eine Lösung, die sich aus Brückenantikörpern verschiedener Tierspezies zusammensetzt.

Nach der achtminütigen Inkubation und weiteren Spülvorgängen wurden jeweils ein Tropfen UV DAB und ein Tropfen UV DAB H₂O₂ aufgetragen, was zur Sichtbarmachung der Reaktion diente. Schließlich wurde ein LCS (Liquid Coverslip) aufgetragen.

Zur Verstärkung der Farbintensität wurde nach der letzten Inkubation von 8 min. und den Reinigungsvorgängen ein Tropfen UV COPPER hinzugefügt.

CD68 (Protokoll-Nr. 15):

Der Färbevorgang entspricht dem des „Vimentins“ (s.o.). Hier wurde jedoch der Antikörper (PREP KIT 15) im Verdünnungsverhältnis 1:3000 zugefügt.

Syndecan-4 (Protokoll-Nr. 505):

Bevor der Färbevorgang vorgenommen werden konnte, erfolgte in diesem Fall die Entparaffinierung per Hand. Die Entparaffinierung der Schnitte begann mit einer Inkubation in Xylol für 3 x 5 min. Die Schnitte wurden dann in absteigender Konzentration in Alkohol getränkt (2x in 100 % Alkohol, 1x in 96 % Alkohol, 1x in 75 % Alkohol). Am Ende wurden die Schnitte in Aqua dest stehen gelassen. Es schloss sich dann die Hitzebehandlung durch den Automaten an.

Wie bereits bei den anderen immunhistochemischen Färbungen erläutert, wurde ein Tropfen I-View INHIBITOR auf den Objektträger aufgetragen, um die unspezifische Peroxidase zu

blockieren. Anschließend wurde das Präparat für 4 min. inkubiert. Nach jeder Inkubation schlossen sich Waschvorgänge an.

Zur Vorbehandlung des Gewebes wurde ein Tropfen der Protease I auf den Objektträger aufgetragen und für 20 min. inkubiert.

Im Unterschied zu den anderen immunhistochemischen Färbungen erfolgte hier die Auftragung des primären Antikörpers im Verdünnungsverhältnis 1:50 per Hand.

Nach den gewohnten Inkubations- und Spülvorgängen wurde durch Zugabe von jeweils einem Tropfen Blocker A und B das endogene Biotin ausgeschaltet. Anschließend wurde nach einer vierminütigen Inkubation ein Tropfen des I-View Biotin Ig (biotinylated anti-rabbit IgG) dazugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 8 min. und weiteren Waschvorgängen wurde ein Tropfen I-View SA-HRP (Streptavidin-Peroxidase Complex) eingesetzt. Der weitere Verlauf entspricht dem unter Protokoll-Nr. 10 beschriebenen Vorgang der Sichtbarmachung der abgelaufenen Reaktion.

Reverse Transkription

Template-Primer Mix:

Komponenten	Volumen	Finale Konzentration
Gesamte RNA	Variable	1 ng bis 4 µg
Anchored-oligo(dT)18 Primer, 50 pmol/l	1 µl	2,5 µM
Wasser, PCR-grade	Variable	Um ein Gesamtvolumen von 11,4 µl zu erhalten
Gesamtvolumen	11,4 µl	

Danach wurden dem Röhrchen folgende Komponenten zugefügt:

Komponenten	Volumen	Finale Konzentration
Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase Reaction Buffer, 5x conc.	4 µl	1x (8 mM MgCl ₂)
Protector RNase Inhibitor, 40 U/l	0,5 µl	20 U
Deoxynucleotide Mix, jeweils 20 mM	2 µl	Jeweils 1 mM
DTT	1 µl	5 mM
Transcriptor High Fidelity	1,1 µl	10 U

Reverse Transcriptase 20 U/ l		
Gesamtvolumen	20 µl	

Quantitative Real-Time PCR am Light Cycler

Mastermix pro Probe:

Wasser:	9,7 µl
5x Sensi Mix:	4 µl
Enzym Mix:	1,5 µl
Primer 1 (3'):	1 µl
Primer 2 (5'):	1 µl
50x Syber Green I:	0,4 µl
Mg Cl ₂ :	0,4 µl

7. DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich allen, die mich bei der Vorbereitung, Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt haben, meinen Dank aussprechen. Ohne sie wäre diese Arbeit nicht denkbar gewesen.

Zuerst gilt dieser Dank Herrn Prof. Dr. med. Lohmann sowie in besonderem Maß Herrn Dr. med. Drange für die Ermöglichung dieser Arbeit, ihre wissenschaftliche Betreuung und für die Bereitstellung der Präparate, welche die Grundlage für meine Arbeit waren.

Ich danke Frau Dr. med. Küster, Frau Dr. rer. nat. Krüger, Frau Dr. rer. nat. Wilisch-Neumann, den medizinisch-technischen Assistentinnen sowie allen anderen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Pathologie (Medizinische Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) für die Anfertigung der Präparate und ihre sonstig geleistete Unterstützung.

Darüber hinaus möchte ich mich auch bei Frau Dipl.-Ök. B. Peters vom Institut für Biometrie und medizinische Informatik der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg bedanken, deren Hilfe bei der statistischen Analyse meiner Forschungsergebnisse überaus wertvoll war.

Ganz besonders danke ich natürlich meinen Eltern, die mir meine Ausbildung ermöglichten und mich jederzeit unterstützten.

8. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Nina Gilbert
Emdenstr. 2
30167 Hannover

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

Untersuchungen zur Expression und Funktion von Syndecan-4 in der aseptischen Prothesenlockerung (APL)

in der Klinik für Orthopäde der Medizinischen Fakultät Otto-von-Guericke-Universität
Magdeburg

mit Unterstützung durch

Herrn Prof. Dr. med. Lohmann

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Hannover, den 02.04.2013

9. CURRICULUM VITAE

Name: Nina Gilbert
Adresse: Emdenstr. 2
30167 Hannover
Telefon: +49 511 37061085
Mobiltelefon: +49 176 31159357
E-Mail: ninagilbert@arcor.de
Geburtsdatum: 18.12.1983
Geburtsort: Bremen
Familienstand: Ledig
Nationalität: Deutsch

Hochschulstudium

10/2003 - 04/2010 Studium der Humanmedizin, Otto-von-Guericke-Universität
Magdeburg

04/2006 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

02/2009 - 02/2010 Praktisches Jahr:
Viszeralchirurgie, Traumatologie, Neurochirurgie sowie
interdisziplinärer Notfall; Kantonsspital Winterthur, Schweiz
Innere Medizin; Universitätsspital Zürich, Schweiz
Gynäkologie und Geburtshilfe; Klinikum Magdeburg
gemeinnützige GmbH, Magdeburg

04/2010 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

04/2010 Approbation

Seit 12/2008 Promotionsstudium, Fachbereich für Orthopädie

Schulbildung

1990 - 1994 Grundschule Bremen-Grambke

1994 - 1996 Schulverbund Lesum, Orientierungsstufe, Bremen

1996 - 2000 Schulverbund Lesum, Gymnasium, Bremen

2000 - 2003 SZ Alwin-Lonke-Straße, Gymnasium, Bremen

Fremdsprachen

Englisch fließend

Französisch gute Sprachkenntnisse

Auslandsaufenthalt

Sommer 2000 Sechswöchiger Schüleraustausch in Windhoek, Namibia

Berufliche Weiterbildung und Wissenschaftliche Arbeit

06/2001 Englischsprachiges Fremdsprachenzertifikat: Cambridge First Certificate

06/2003 - 08/2003 Fünfwöchiges Pflegepraktikum auf einer Station der Chirurgischen Klinik für Allgemein- und Gefäßchirurgie im Zentralkrankenhaus Bremen-Nord

06/2004 - 09/2004 Achtwöchiges Pflegepraktikum auf einer Wachstation der Klinik für Hals-Nasen-Ohrenheilkunde des Universitätsklinikums Magdeburg

10/2005 - 08/2006 Studentische Hilfskraft im Institut für Anatomie der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

08/2006 - 10/2008 Famulaturen am Universitätsklinikum Magdeburg (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie sowie im Institut für Pathologie);
Universitätsklinikum der Medizinischen Universität Salzburg, Österreich (Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe);
Universitätsklinikum Magdeburg (Klinik für Orthopädie und Chirotherapie, Physikalische sowie Rehabilitative Medizin);
Gemeinschaftspraxis Schwanewede (Fachbereich Pädiatrie und Allgemeinmedizin)

Seit 2007

Forschung für die Dissertation im Fachbereich für Orthopädie,
Universität Magdeburg

Ehrenamtliche Tätigkeiten

Ehrenamtliches Engagement für die Bundesvertretung der
Medizinstudierenden in Deutschland e.V.; Organisation von
Famulaturen für ausländische Studierende

Berufliche Tätigkeiten

01/2011 – 03/2013

Ärztin

Friederikenstift Hannover

Prof. Dr. med. Leonhardt

Klinik für Innere Medizin

Seit 04/2013

Weiterbildungsassistentin für Allgemeinmedizin

Gemeinschaftspraxis am Klagesmarkt, Hannover

Lange/Meissner/Richter/Tiroke