

Aus dem Institut für Experimentelle Orthopädie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Einfluss von CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln auf die Aktivierung des  
NLRP3-Inflammasoms in periprotetischen Zellen**

**D i s s e r t a t i o n**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

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

vorgelegt von Fenna Brunken

aus Oldenburg

Magdeburg 2023

## Bibliographische Beschreibung

Brunken, Fenna: Einfluss von CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln auf die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in periprothetischen Zellen. – 2023.- 64 Bl., 21 Abb., 19 Tab., 0 Anl.

## Kurzreferat

Die aseptische Prothesenlockerung ist einer der Hauptgründe für Revisionen von Totalendoprothesen. Eine mögliche Ursache stellen Metallabriebpartikel dar, die über verschiedene Signalwege zu einer proinflammatorischen Reaktion und nachfolgend Osteolysen führen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln auf die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in periprothetischen Zellen als mögliche Ursache für die aseptische Prothesenlockerung untersucht.

Es konnte gezeigt werden, dass 4-HNE als Marker für oxidativen Stress im periprothetischen Gewebe von Metall-auf-Metall-Hüft-TEPs im Vergleich zu nativem Synovialgewebe signifikant erhöht war. Die Aktivierung des Inflammasoms nach Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h wurde in MM6-, MG63- und Jurkat-Zellen mittels qRT-PCR, Western Blot und Immunocytochemie in vitro untersucht. Hier zeigten sich zellartenspezifische Unterschiede in der Partikelaufnahme und der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms. Es konnte gezeigt werden, dass das Inflammasom nicht nur in Zellen des Immunsystems, sondern auch in Osteoblasten durch Metallabriebpartikel aktiviert werden kann. Insgesamt zeigte sich eine stärkere Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch CoNiCrMo-Partikel im Vergleich zu TiAlV-Partikeln in MG63-Zellen (osteoblastenähnliche Zellen). Die vorliegenden Daten weisen auf eine unterschiedliche Aktivierung des Inflammasoms durch CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel hin und tragen zum besseren Verständnis der an der aseptischen Prothesenlockerung beteiligten Signalwege bei.

Schlüsselwörter: aseptische Prothesenlockerung, Inflammasom, NLRP3, ASC, Caspase-1, Metallabrieb, oxidativer Stress

## Inhaltsverzeichnis

Tabellenverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis.....	V
Abkürzungsverzeichnis .....	VI
1 Einführung.....	1
1.1 Epidemiologie .....	1
1.2 Aseptische Prothesenlockerung .....	2
1.3 Prothesenmaterialien.....	3
1.4 Pathophysiologie der aseptischen Prothesenlockerung .....	4
1.4.1 Abriebpartikel.....	4
1.4.2 Mechanische Faktoren .....	6
1.4.3 Risikofaktoren für eine aseptische Prothesenlockerung.....	7
1.5 Adverse Reaktionen auf Metallpartikel .....	7
1.6 Das NLRP3-Inflammasom .....	8
1.7 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms .....	8
1.8 IL-1 $\beta$ .....	9
1.9 Rolle des Inflammasoms bei verschiedenen Krankheiten .....	10
1.10 Rolle des Inflammasoms bei der aseptischen Prothesenlockerung .....	10
1.11 Hypothese und Fragestellung .....	12
2 Material und Methoden .....	13
2.1 Materialien .....	13
2.2 Methoden.....	18
2.2.1 Zellkultur .....	18
2.2.2 Partikelproduktion.....	19
2.2.3 Partikelanalyse im Rasterelektronenmikroskop.....	19
2.2.4 Größenbestimmung der Partikel.....	20
2.2.5 Water Soluble Tetrazolium Salt-1-Assay .....	20
2.2.6 Phalloidin-Red-Färbung.....	21
2.2.7 Immunhistochemie.....	22

2.2.8	Immuncytochemie.....	23
2.2.9	RNA-Isolierung .....	24
2.2.10	Reverse Transkription.....	25
2.2.11	qRT-PCR .....	25
2.2.12	Herstellung der Standards für die qRT-PCR .....	27
2.2.13	SDS-PAGE und Western Blot.....	27
2.3	Statistische Auswertung.....	29
3	Ergebnisse .....	30
3.1	Erhöhter oxidativer Stress in periprotetischem Gewebe von MoM-Patienten .....	30
3.2	Charakterisierung der eingesetzten Partikel .....	31
3.3	Geringer Einfluss der verwendeten Partikel auf die Zellviabilität .....	34
3.4	Unterschiede in der Partikelaufnahme zwischen den getesteten Zelllinien.....	38
3.5	Unterschiedliche Effekte der CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel auf die Genexpression in den getesteten Zelllinien .....	41
3.6	Erhöhte ASC-Speck-Bildung in periprotetischen Zellen durch Inkubation mit Partikeln.....	47
3.7	Steigerung der Caspase-1-Spaltung in den getesteten Zelllinien nach Partikelstimulation.....	51
4	Diskussion.....	54
4.1	Rolle von ROS bei der aseptischen Prothesenlockerung.....	54
4.2	Zytotoxizität der Metallpartikel .....	55
4.3	Unterschiede in der Partikelaufnahme der Zelllinien .....	55
4.4	Die Aktivierung des Inflammasoms ist abhängig von Partikelart und Zellart.....	58
4.4.1	Priming des Inflammasoms durch Metallpartikel.....	58
4.4.2	Aktivierung des Inflammasoms durch Metallpartikel.....	58
4.4.3	Zellartenspezifische Unterschiede.....	59
4.4.4	Partikelartenspezifische Unterschiede.....	60
4.5	Fazit .....	62
4.6	Ausblick.....	62
5	Zusammenfassung.....	64

6	Literaturverzeichnis .....	65
7	Danksagung .....	80
8	Ehrenerklärung.....	81
9	Darstellung des Bildungsweges .....	82
10	Publikation.....	83

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Geräte .....	13
Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien .....	14
Tabelle 3: Primärantikörper für die ICC/IHC.....	15
Tabelle 4: Isotypkontrollen für die ICC/IHC .....	15
Tabelle 5: Sekundärantikörper für die ICC/IHC.....	16
Tabelle 6: Primärantikörper für den Western Blot .....	16
Tabelle 7: Sekundärantikörper für den Western Blot .....	16
Tabelle 8: Gele für die SDS-Page .....	16
Tabelle 9: Puffer für SDS-Page/Western Blot .....	17
Tabelle 10: ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence) für den Western Blot.....	17
Tabelle 11: Zellkulturansätze und Partikelmengen für den WST-1-Assay .....	21
Tabelle 12: Übersicht der Zellkulturansätze und Partikelmengen für die ICC.....	24
Tabelle 13: Übersicht der Zellkulturansätze und Partikelmengen für die qRT-PCR .....	25
Tabelle 14: Mastermix für die Reverse Transkription.....	25
Tabelle 15: Primersequenzen für die qRT-PCR.....	26
Tabelle 16: Mastermix für die qRT-PCR .....	26
Tabelle 17: Einstellungen für die qRT-PCR .....	26
Tabelle 18: Verdünnung der Standards für die qRT-PCR.....	27
Tabelle 19: Übersicht der Zellkulturansätze und Partikelmengen für den Western Blot .....	29

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung der vier Modi der Abriebentstehung nach McKellop.	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Metallpartikel.	12
Abbildung 3: 4-HNE-Färbung	30
Abbildung 4: REM-Aufnahmen und EDS-Analysen der CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel.	32
Abbildung 5: Größenverteilung der CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel gemessen mit dem Mastersizer 3000E.	33
Abbildung 6: Analyse der Größenverteilung der CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel im Zetasizer Nano ZS.	33
Abbildung 7: Zellviabilität der MM6-Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln.	35
Abbildung 8: Zellviabilität der MG63-Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln.	36
Abbildung 9: Zellviabilität der Jurkat-Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln.	37
Abbildung 10: Partikelaufnahme in MM6-Zellen. Exemplarische Phalloidin-Red-Färbungen der MM6-Zellen nach Stimulation mit $10^7$ CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h.	38
Abbildung 11: Partikelaufnahme in MG63-Zellen. Exemplarische Phalloidin-Red-Färbungen der MG63-Zellen nach Stimulation mit $10^7$ CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h.	39
Abbildung 12: Partikelaufnahme in Jurkat-Zellen. Exemplarische Phalloidin-Red-Färbungen der Jurkat-Zellen nach Stimulation mit $10^7$ CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h.	40
Abbildung 13: Einfluss der Partikelstimulation auf die Expression von NLRP3, Capase-1 und IL-1 $\beta$ in MM6-Zellen.	42
Abbildung 14: Einfluss der Partikelstimulation auf die Expression von NLRP3, Capase-1 und IL-1 $\beta$ in MG63-Zellen.	44
Abbildung 15: Einfluss der Partikelstimulation auf die Expression von NLRP3, Capase-1 und IL-1 $\beta$ in Jurkat-Zellen.	46
Abbildung 16: Bildung von ASC-Specks in MM6-Zellen durch die Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h.	48
Abbildung 17: Bildung von ASC-Specks in MG63-Zellen durch die Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h.	49
Abbildung 18: Bildung von ASC-Specks in Jurkat-Zellen durch die Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h.	50
Abbildung 19: Caspase-1-Spaltung in MM6-Zellen nach Partikelstimulation.	51
Abbildung 20: Caspase-1-Spaltung in MG63-Zellen nach Partikelstimulation	52
Abbildung 21: Caspase-1-Spaltung in Jurkat-Zellen nach Partikelstimulation	53

## Abkürzungsverzeichnis

4-HNE	4-Hydroxynonenal
ALVAL	Aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesions
ARMD	Adverse reaction to metal debris
ASC	Apoptosis associated specklike protein containing a caspase recruitment domain
ATP	Adenosintriphosphat
CARD	Caspase recruitment domain
cDNA	Complementary deoxyribonucleic acid
CoC	Ceramic-on-ceramic
CoP	Ceramic-on-polyethylene
CoNiCrMo	Kobalt-Nickel-Chrom-Molybdän
DAMPs	Danger associated molecular patterns
EDS	Energy dispersive X-ray spectroscopy
ECL	Enhanced chemiluminescence
FCS	Fetal calf serum
ICC	Immuncytochemie
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
LRR	Leucin-rich repeats
MARS	Metal-artifact reduction sequence
MCP-1	Monocyte chemoattractant protein 1
MIP-1 $\alpha$	Macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$
MMP	Matrix-Metalloproteinasen
MoM	Metal-on-metal
MoP	Metal-on-polyethylene
MRT	Magnetresonanztomographie
MSU	Monosodium urate
NLRP3	NACHT-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3
P2X <sub>7</sub>	Purinergic receptor 7
PAMPs	Pathogen associated molecular patterns



PBS	Phosphate buffered saline
PE	Polyethylen
PMMA	Polymethylmethacrylat
PRR	Pattern recognition receptor
PYD	Pyrin domain
qRT-PCR	Quantitative real time polymerase chain reaction
RANKL	Receptor activator of NF- $\kappa$ B ligand
REM	Rasterelektronenmikroskop
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SPECT	Single photon emission computed tomography
TEP	Totalendoprothese
TiAlV	Titan-Aluminum-Vanadium
TLR	Toll-like receptor
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
UHMWPE	Ultra-high-molecular-weight polyethylene
WST-1	Water soluble tetrazolium salt-1

# 1 Einführung

## 1.1 Epidemiologie

Die Implantationen von Totalendoprothesen (TEPs) des Hüft- und Kniegelenks gehören zu den Routineeingriffen der Orthopädie und ermöglichen eine Verbesserung der Mobilität und Lebensqualität vieler Patienten (1). In Deutschland wurden 2018 mehr als 190.000 Knie- und 239.000 Hüft-TEPs implantiert. Damit belegte die Implantation einer Hüft-TEP den sechsten Platz unter den häufigsten Operationen bei stationär behandelten Patienten (2).

Der häufigste Grund für die Implantation einer TEP ist ein Gelenkschaden durch Arthrose, weitere Indikationen sind unter anderem Frakturen, rheumatoide Arthritis, aseptische Knochennekrosen, Tumore und Revisionseingriffe (3). Das Lebenszeitrisko, an einer symptomatischen Arthrose zu erkranken liegt bei ca. 45 % für das Kniegelenk und 25 % für das Hüftgelenk (4, 5). Das Risiko, an einer Arthrose zu erkranken, steigt mit dem Alter und ist bei übergewichtigen Patienten erhöht, weshalb aufgrund von demografischen Veränderungen in der Gesellschaft mit einem Anstieg der Fallzahlen gerechnet wird (6, 7). Die Implantation einer TEP stellt momentan die beste Therapieoption für eine fortgeschrittene Arthrose dar. Die Wahrscheinlichkeit, im Laufe des Lebens eine Knie-TEP zu benötigen, liegt bei ca. 11 % für Frauen und 8 % bei Männern, für Hüft-TEPs betragen die Wahrscheinlichkeiten rund 12 % bei Frauen und 7 % bei Männern (8). Trotz des allgemein großen Erfolgs dieser Eingriffe kommt es bei einigen Patienten im Verlauf zu einer Lockerung der TEP, die eine Revision erfordert.

Die Zahl der TEP-Implantationen ist weltweit in den letzten Jahren gestiegen und wird voraussichtlich noch weiter ansteigen (9). Im Durchschnitt sind Patienten bei der Erstimplantation einer TEP 70 Jahre alt, allerdings nimmt insbesondere bei Knie-TEPs der Anteil jüngerer Patienten (< 65 Jahre) zu (10). Zusammen mit der steigenden Lebenserwartung trägt das sinkende Alter bei der Primärimplantation zu höheren Erwartungen an die Standzeiten der Prothesen bei. Da das Risiko der aseptischen Prothesenlockerung mit zunehmender Tragedauer der Prothese ansteigt und aufgrund der erhöhten Zahl an Primärimplantationen wird in Zukunft auch mit einer Zunahme der Revisionseingriffe gerechnet (11, 12).

Es finden sich unterschiedliche Angaben zur Häufigkeit von Revisionseingriffen in der Literatur. Insgesamt ist die Revisionsrate von Hüft-TEPs höher als bei Knie-TEPs (13). Die Wahrscheinlichkeit für die Revision einer Hüft-TEP wird in verschiedenen Endoprothesenregistern mit ca. 12 - 16 % nach 15 Jahren und bis zu 42 % nach 20 Jahren angegeben (14, 15). Das Revisionsrisiko für Knie-TEPs beträgt ca. 7 % nach 15 Jahren und ca. 10 % nach 20 Jahren (16).

Bei Hüft-TEPs ist die aseptische Prothesenlockerung die Ursache für mehr als die Hälfte der Revisionseingriffe (52 - 55 %) (17, 18). Weitere häufige Gründe für das Versagen einer Hüft-TEP sind Dislokationen (11,8 %), Infektionen (7,5 %) und periprothetische Frakturen (6 %) (18). Bei Knie-TEPs ist der häufigste Revisionsgrund ebenfalls die aseptische Prothesenlockerung (22 - 31 %), gefolgt von Infektionen (15 - 16 %), Instabilität (19 - 22 %), Fehlstellung/-position (7 - 21 %) und PE-Abrieb (7 - 10 %) (18–20).

Die Revisionshäufigkeit hängt unter anderem von der Art des Implantats ab. Besonders hohe Revisionsraten wurden bei Großkopf-Metall-auf-Metall (MoM)-Hüft-TEPs festgestellt (21, 22). Die Revisionswahrscheinlichkeit dieser Prothesen liegt bei ca. 17 % innerhalb von zehn Jahren im Vergleich zu 8 % bei Metall-Polyethylen (PE)- und Keramik-Keramik-Gleitpaarungen (22). Heutzutage werden MoM-Hüft-TEPs aufgrund der adversen Reaktionen auf Metallabriebpartikel in der Regel nicht mehr verwendet.

Die Revisionseingriffe stellen eine hohe Belastung für die Patienten dar und gehen mit einem schlechteren Outcome und längeren Krankenhausaufenthalten einher als Primärimplantationen (23, 24). In bis zu 19 % der Fälle erfolgt innerhalb von fünf Jahren eine erneute Revision (24). Technisch stellen Revisionsoperationen unter anderem durch Osteolysen und Veränderungen des periprothetischen Gewebes besondere Anforderungen an den Operateur (3, 25). Außerdem stellen die Revisionseingriffe auch eine zunehmende ökonomische Belastung des Gesundheitssystems dar (23, 26).

## **1.2 Aseptische Prothesenlockerung**

Unter dem Begriff Prothesenlockerung versteht man den Verlust der festen Verbindung zwischen Prothese bzw. Knochenzement und Knochen mit periprothetischen Osteolysen (27). Klinisch kann sich die Lockerung von Prothesenbestandteilen durch Schmerzen im Bereich des betroffenen Gelenks zeigen (3). In späteren Stadien können zudem Bewegungseinschränkungen und Gangunsicherheiten auftreten (27).

Wichtigster Bestandteil der Diagnostik, neben der Anamnese und der klinischen Untersuchung, sind Röntgenaufnahmen des betroffenen Gelenks. Typische radiologische Zeichen der Prothesenlockerung sind eine Saumbildung um die Prothese, Migration von Prothesenkomponenten, Osteolysen und Sinterung (28). Eine Aufhellungslinie von mehr als 2 mm an der Grenze zwischen Zement bzw. Metall und Knochen wird als Hinweis für eine Prothesenlockerung gesehen (28). Bei unklaren Befunden kann zudem eine weitere Abklärung durch CT, Skelettszintigraphie, SPECT oder MARS (metal-artifact reduction sequence)-MRT hilfreich sein (28, 29). Zur Diagnostik von Pseudotumoren kann auch die Sonographie eingesetzt werden (29).

Zusätzlich sollte eine Untersuchung der Entzündungsparameter im Blutbild sowie ggf. eine Punktion des Gelenks erfolgen, um eine septische Prothesenlockerung auszuschließen. Bei MoM-Prothesen wird zudem eine Bestimmung der Metall-Ionen-Konzentration im Blut empfohlen (30).

Postoperativ kann eine Untersuchung der periprothetischen Membran Aufschluss über die Ursache der Prothesenlockerung geben (31). Eine frühe Diagnostik der aseptischen Prothesenlockerung ist entscheidend für eine erfolgreiche Therapie, daher sollten Patienten mit einem erhöhten Risiko (z. B. durch Großkopf-MoM-Hüft-TEPs) intensiver nachverfolgt werden (30).

### **1.3 Prothesenmaterialien**

In Endoprothesen kommen verschiedene Metalle und Metalllegierungen sowie Kunststoffe und Keramiken zum Einsatz. Zudem kann zur Fixierung der Implantate Knochenzement auf der Basis von Polymethylmethacrylat (PMMA) verwendet werden. Im folgenden Überblick werden die Werkstoffe der beiden häufigsten Endoprothesen, den Hüft- und Knie-TEPs, behandelt.

Für zementierte Schäfte bei Hüft-TEPs werden vor allem CoCrMo-Legierungen verwendet, während in unzementierten Schäften hauptsächlich Titan-Legierungen (TiAlV, TiAlNb) zum Einsatz kommen (3). Aktuell werden mehr als drei Viertel der primären Hüft-TEPs zementfrei implantiert (32). Die Pfannen von Hüft-TEPs bestehen insbesondere bei unzementierten Modellen in der Regel aus Reintitan oder Titan-Legierungen mit einer besonders hohen Oberflächenporosität, um die Osteointegration zu unterstützen (3). Für die Kopfkomponekte von Hüft-TEPs ist Keramik in Deutschland inzwischen das am häufigsten gewählte Material. Der Anteil von Keramikköpfen an allen Hüft-TEP-Köpfen ist von 2018 zu 2019 weiter von 87,6 % auf 88,8 % angestiegen (32, 33). Des Weiteren werden Köpfe für Hüft-TEPs auch aus Metalllegierungen (z. B. CoCrMo) oder keramisierten Metall (Alumina toughened zirconia (ATZ) und zirconia toughened alumina (ZTA)) hergestellt (3).

Moderne Keramik-Komponenten von Hüft-TEPs bestehen aus Mischoxidkeramiken, insbesondere auf der Basis von Aluminiumoxid. Ein Nachteil von Keramik ist das Risiko von Materialbrüchen, welche bei modernen Keramik-auf-Keramik (CoC)-Hüft-TEPs zwar in weniger als 1 % der Fälle auftreten, aber trotzdem einen häufigen Grund für die Revision von CoC-Prothesen darstellen (34). Zudem kann es zu Geräuscentwicklungen im Bereich der Artikulation kommen, die von den betroffenen Patienten als unangenehm empfunden werden können (34, 35).

Bei den Gleitpaarungen bei Hüft-TEPs kann zwischen Hart-Hart- und Hart-Weich-Gleitpaarungen unterschieden werden. Zu den Hart-Hart-Gleitpaarungen gehören Keramik-

Keramik-Gleitpaarungen und Metall-Metall-Gleitpaarungen. Als Hart-Weich-Gleitpaarungen können sowohl Keramik- als auch Metallköpfe mit einem ultra high molecular weight (UHMW)-PE (Ceramic-on-polyethylene (CoP) bzw. Metal-on-polyethylene (MoP)) kombiniert werden. Aktuell werden in Deutschland für Hüft-TEPs als Gleitpaarungen in absteigender Häufigkeit die Kombinationen aus Keramik/PE, Keramik/Keramik oder Metall/PE verwendet (32).

Für PE-Inlays in Hüft-TEPs wird vor allem hoch quervernetztes PE verwendet. Hierbei wird UHMW-PE mit Gammastrahlen behandelt, um eine höhere Vernetzung der Fasern zu erreichen. Bei diesem Prozess entstehen freie Sauerstoffradikale, welche degenerative Veränderungen und dadurch eine geringere Belastbarkeit verursachen können. Es wird versucht, die Schäden durch freie Radikale durch die Zugabe von Antioxidantien (z. B. Vitamin E) zu reduzieren (36).

Für die Tibia- und Femurkomponenten von Knie-TEPs werden häufig CoCr-Legierungen (z. B. CoCrMo) verwendet. Es gibt aber auch Prothesen aus Titanlegierungen (z. B. TiAlV und TiAlNb), bei denen allerdings die Abriebfestigkeit der Artikulationsflächen durch verschiedene Härtungsverfahren erhöht werden muss (37). Aktuell gibt es auch Studien, die den Einsatz von komplett metallfreien Knie-TEP-Modellen aus Keramik untersuchen (38). Knie-TEPs werden in 94,5 % der Fälle zementiert implantiert (32). Bei Knie-TEPs wird in der Regel ein Inlay aus herkömmlichem oder moderat quervernetztem UHMW-PE verwendet, hoch quervernetztes UHMW-PE wird nur in weniger als 20 % der Fälle verwendet (32). Während in Hüft-TEPs hoch quervernetztes PE standardmäßig aufgrund der besseren Abriebeigenschaften eingesetzt wird, gibt es bei Knie-TEPs keine eindeutigen Hinweise für eine Überlegenheit im Vergleich zu konventionellem oder moderat quervernetztem PE (39).

#### **1.4 Pathophysiologie der aseptischen Prothesenlockerung**

Es gibt verschiedene Hypothesen für die Entstehung der aseptischen Prothesenlockerung, von denen eine Verursachung durch Abriebpartikel am wahrscheinlichsten gilt (40). Ein typischer Befund der aseptischen Prothesenlockerung ist eine verbreiterte periprothetische Membran, die zahlreiche Makrophagen, Riesenzellen und Abriebpartikel enthält (31).

##### **1.4.1 Abriebpartikel**

Abriebpartikeln können aus den verschiedenen in TEPs eingesetzten Materialien entstehen. Nach McKellop werden vier Modi der Partikelentstehung in Endoprothesen unterschieden (41, 42). Der erste Modus beschreibt Abrieb, der durch Adhäsion und Abrasion beim Kontakt der beiden Artikulationsflächen der Prothese entsteht. Modus 2 beschreibt Abrieb, der zwischen einer primären Artikulationsfläche und einer eigentlich nicht lasttragenden Oberfläche entsteht. Bei Modus 3 kommt es durch Fremdkörper (z. B. Knochenfragmente, PMMA oder Abriebpartikel) zu einer verstärkten Abriebentstehung in Gleitpaarungen. Der

vierte Modus beschreibt Abrieb, der zwischen zwei nicht zur Artikulation vorgesehene Oberflächen entsteht, z. B. durch Verschleiß an der Kopf-Schaft-Verbindung von Hüft-TEPs. Zudem kann auch Materialermüdung zur Partikelabgabe führen. In Knie-TEPs kann es z. B. durch direkten Kontakt der Metallkomponenten infolge von Verschleiß des standardmäßig eingesetzten PE-Inlays oder Dislokationen zur Entstehung einer Metallose kommen (43). Gehäuft wurde dies auch bei Patellakomponenten mit einer Metallrückseite („metal-backed patella components“) nach Abrieb des PE-Anteils beobachtet (44). Die Partikel können zusätzlich durch Korrosion verändert und Ionen freigesetzt werden (41).

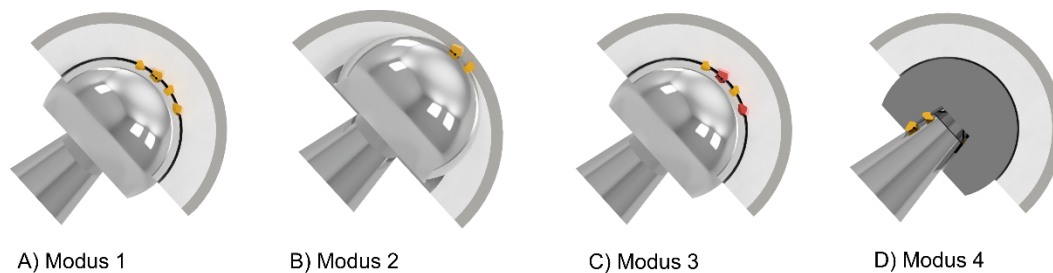


Abbildung 1: Schematische Darstellung der vier Modi der Abriebentstehung nach McKellop (42) am Beispiel einer MoP-Hüft-TEP. A: Modus 1 beschreibt Abrieb zwischen zwei zur Artikulation vorgesehenen Oberflächen, z. B. Kopf und Inlay. B: Modus 2: Abrieb entsteht zwischen einer zur Artikulation vorgesehenen Fläche (Kopf) und einer primär nicht zur Artikulation vorgesehenen Fläche (Pfanne). C: Modus 3 zeigt Abrieb, der durch Fremdkörper zwischen den beiden primären Artikulationspartnern entsteht. D: Als Beispiel für Modus 4 (Abrieb zwischen zwei nicht zur Artikulation vorgesehenen Oberflächen) ist die Abriebentstehung an der Kopf-Schaft-Verbindung gezeigt (Trunnionosis). (Grafik erstellt mit Autodesk Fusion 360)

Die aus dem Prothesenmaterial freigesetzten Partikel können eine Entzündungsreaktion verursachen, die zu Osteolysen und letztendlich zur Implantatlockerung führt (40, 45, 46). Diese Reaktion wurde zunächst vor allem dem verwendeten Knochenzement und PE-Partikeln zugeschrieben (46–49). Um diese negativen Auswirkungen zu reduzieren, wurden Anfang der 90er-Jahre MoM-Hüft-TEPs wieder eingeführt. Im Verlauf stellte sich aber heraus, dass diese Prothesen hohe Revisionsraten haben und Metallpartikel ebenfalls eine aseptische Prothesenlockerung verursachen können (21, 22, 50, 51). Die Reaktionen auf Abriebpartikel werden unter anderem von ihrer Menge, Größe und dem Material beeinflusst (52–54).

Der Metallabrieb in MoM-Prothesen hat im Durchschnitt einen deutlich kleineren Durchmesser als UHMW-PE Abrieb, bei gleichzeitig hohen Partikelzahlen (55–57). Die unterschiedlichen biologischen Auswirkungen der verschiedenen Abriebpartikel sind noch nicht endgültig untersucht. Es gibt Hinweise darauf, dass bei CoC-Prothesen weniger Osteolysen entstehen als bei MoM-Prothesen, unklar ist, ob die Revisionsraten und die Häufigkeit von aseptischen Prothesenlockerungen ebenfalls geringer sind (58). Metallabrieb entsteht hauptsächlich bei MoM-Prothesen an der Artikulationsfläche, aber auch bei CoC- oder MoP-Prothesen können durch Verschleiß an der Kopf-Schaft-Verbindung Metallpartikel freigesetzt werden (Trunnionosis) (59, 60). Zudem können durch Fehlbelastungen wie z. B.

bei einer starken Belastung des Prothesenrands größere Abriebmengen entstehen (61). Metall-Metall-Gleitpaarungen werden aktuell bei Hüft-TEPs aufgrund von adversen Reaktionen auf Metallabrieb in der Regel nicht mehr eingesetzt. Ein Vorteil der Hart-Hart-Gleitpaarungen ist das Fehlen von PE-Abrieb, dessen negative Auswirkungen auf die Prothesenumgebung seit Längerem bekannt sind (48, 49).

Bei den Hart-Weich-Gleitpaarungen scheint bei Keramik-PE-Gleitpaarungen eine geringere Menge an PE-Abrieb als bei Metall-PE-Kombinationen zu entstehen, allerdings sind die Auswirkungen auf das klinische Outcome noch nicht endgültig geklärt (62).

Der freigesetzte Abrieb wird von Makrophagen aufgenommen, bei großen Partikeln fusionieren mehrere Makrophagen zu Fremdkörperriesenzellen (63). Die Partikel können über die Aktivierung verschiedener Signalwege zu einer veränderten Expression von Zytokinen und Chemokinen führen (54, 64, 65). Insbesondere die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-1 $\beta$  steigt nach der Aufnahmen von UHMWPE- und Metallpartikeln in Makrophagen an (46, 65, 66). Durch die Ausschüttung von MCP-1 und MIP-1 $\alpha$  werden zudem weitere Makrophagen angelockt (67, 68).

Proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-6 oder IL-1 $\beta$  induzieren die Expression von RANKL und fördern somit die Reifung von Osteoklasten und Entstehung von Osteolysen (69, 70). Metallpartikel und -ionen hemmen zudem die Funktionsfähigkeit von Osteoblasten und die Differenzierung von mesenchymalen Stammzellen zu Osteoblasten, wodurch der Knochenaufbau zusätzlich gestört wird (71, 72). Insgesamt wird durch Abriebpartikel der Knochenaufbau gehemmt und der Knochenabbau gefördert, wodurch eine Lockerung der Prothesen begünstigt wird.

#### 1.4.2 Mechanische Faktoren

Bei der Entstehung der aseptischen Prothesenlockerung wird außerdem auch die Beteiligung von verschiedenen mechanischen Faktoren diskutiert (73).

Es gibt Hinweise dafür, dass die Osteointegration von Prothesen durch Mikrobewegungen gestört werden kann, was im Verlauf zu einer Lockerung der Prothese führt (74, 75). In einigen Studien konnten zudem Osteolysen durch Veränderungen des hydrostatischen Drucks und der Strömungsgeschwindigkeit der Synovialflüssigkeit verursacht werden (76).

Durch die Implantation einer Prothese kommt es zu einem belastungsabhängigen Remodelling des Knochens. Dies kann dazu führen, dass in manchen Bereichen der Knochen geringeren Belastungen ausgesetzt ist und es dadurch zu einem Abbau der Knochensubstanz kommt (77). Dieser Mechanismus wird als Stress Shielding bezeichnet.

Die genannten Faktoren könnten zudem die partikelinduzierten Effekte verstärken, indem sie zum Beispiel einen Übertritt der Synovialflüssigkeit in den Interface-Bereich ermöglichen,

wodurch sich die Partikel weiter ausbreiten und Osteolysen verursachen können. Dies wird mit dem Konzept des „effective joint space“ beschrieben (78).

#### 1.4.3 Risikofaktoren für eine aseptische Prothesenlockerung

Das Lebenszeitrisko für Revisionen ist bei jüngeren Patienten insgesamt erhöht. Für männliche Patienten mit einem Alter von 50 - 54 Jahren bei Primärimplantation liegt das Lebenszeitrisko für einen Revisionseingriff bei ca. 30 % für Hüft-TEPs und 35 % für Knie-TEPs, während es bei Patienten > 70 Jahre jeweils rund 5 % beträgt (12). Aufgrund der höheren Lebenserwartung dieser Patienten steigt auch das Risiko für Re-Revisionen. Ein niedriges Alter bei der Primärimplantation gilt nicht nur als Risikofaktor für ein erhöhtes Lebenszeitrisko für Revisionen, sondern auch als spezifischer Risikofaktor für die aseptische Prothesenlockerung. Jüngere Patienten (< 50 Jahre) haben im Vergleich zu älteren Patienten (> 65 Jahre) ein erhöhtes Risiko für ein aseptisches Prothesenversagen innerhalb eines Jahres nach Implantation einer Knie-TEP (79). Für Hüft-TEPs gelten auch ein hohes Aktivitätslevel und männliches Geschlecht als Risikofaktoren für eine aseptische Prothesenlockerung (80, 81). Der Einfluss von anderen Faktoren wie Übergewicht oder Vorerkrankungen auf die Entstehung einer aseptischen Prothesenlockerung steht noch nicht endgültig fest (80–82).

### 1.5 Adverse Reaktionen auf Metallpartikel

Unter dem Begriff ARMD (adverse reaction to metal debris) werden unterschiedliche lokale Reaktionen auf Metallabrieb zusammengefasst, z. B. die Entstehung von Pseudotumoren und ALVAL (aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesions) (83).

Als Pseudotumore werden zystische oder solide Raumforderungen bezeichnet, die von Abriebpartikeln wahrscheinlich durch eine aseptische Entzündung oder eine Hypersensitivitätsreaktion hervorgerufen werden (84, 85). Ausgedehnte Pseudotumore können zu einer erheblichen Einschränkung der Funktionsfähigkeit des Gelenks führen und einen Revisionseingriff nötig machen (84, 86).

Charakteristisch für das histologische Bild von ALVAL ist eine diffuse und perivaskuläre Infiltration von T- und B-Lymphozyten sowie Plasmazellen. Zudem finden sich eine verstärkte Exsudation von Fibrin, Nekrosen sowie eine erhöhte Zahl von Makrophagen im umliegenden Gewebe. Diese Reaktion gilt als eine durch Metallpartikel verursachte Typ IV-Allergie (85, 87, 88).

Der Begriff Metallose beschreibt allgemein eine makroskopisch sichtbare Verfärbung des periprothetischen Gewebes aufgrund von Metallabrieb und ist ein Hinweis auf eine verstärkte Abriebproduktion der Prothese (83).



Selten können die freigesetzten Metallpartikel und -ionen auch systemische Effekte verursachen, z. B. neurologische oder endokrinologische Störungen oder Kardiomyopathien (89, 90). Ein kanzerogener Effekt der Metallpartikel ist umstritten (91–93).

### **1.6 Das NLRP3-Inflammasom**

Abriebpartikel aus Endoprothesen können über die Aktivierung von spezifischen Signalwegen in Zellen eine Entzündungsreaktion und Osteolysen verursachen. Ein Signalweg, der an diesem Prozess beteiligt sein könnte, wird über das Inflammasom reguliert.

Als Inflammasom werden intrazelluläre Proteinkomplexe bezeichnet, deren Aktivierung im Rahmen der angeborenen Immunantwort zu einer Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen führt (94). Zur Subgruppe der Inflammasome mit einem NOD-like Rezeptor gehören z. B. NLRP1, NLRP3, NLRP6 und NLRC4, von denen das NLRP3-Inflammasom das am besten untersuchte ist (95).

Das NLRP3-Inflammasom ist ein Proteinkomplex, der im Zytosol von verschiedenen Zellen vorkommt (z. B. Monozyten, Neutrophile, dendritische Zellen, Lymphozyten, Osteoblasten) (96, 97). Es besteht aus NLRP3 (NOD-, LRR- and pyrin domain-containing protein 3), dem Adapterprotein ASC (apoptosis associated specklike protein containing a caspase recruitment domain) und pro-Caspase-1. Die Struktur von NLRP3 besteht aus der zentralen NACHT-Domäne, einer C-terminalen LRR-Domäne (leucin-rich repeat) und einer N-terminalen Pyrin-Domäne (PYD). Die Aktivierung führt zu einer Oligomerisierung von NLRP3-Monomeren über ihre NACHT-Domänen, woraufhin ASC über PYD-PYD-Interaktionen rekrutiert wird. ASC rekrutiert pro-Caspase-1 über CARD (caspase recruitment domain), welche sich autokatalysiert zu Caspase-1 spaltet. Die aktive Caspase-1 spaltet pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in ihre aktiven Formen IL-1 $\beta$  und IL-18, welche starke proinflammatorische Effekte haben (98–100) (siehe Abbildung 2).

### **1.7 Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms**

In der Regel erfolgt die Aktivierung des Inflammasoms in zwei Schritten. Durch den ersten Schritt, das Priming, wird die Transkription von Inflammasomkomponenten gesteigert und werden die posttranslationalen Modifikationen von NLRP3 beeinflusst (98, 101). Dieser Vorgang kann durch verschiedene Zytokine (z. B. TNF $\alpha$  oder IL-1 $\beta$ ) oder die Erkennung von DAMPs oder PAMPs durch PRRs wie z.B. TLR ausgelöst werden, die über NF $\kappa$ B die Transkription von NLRP3 und pro-IL-1 $\beta$  steigern (98, 102, 103).

Das zweite Signal sorgt dafür, dass sich das Inflammasom zusammensetzt und in der Folge IL-1 $\beta$  freigesetzt wird. Das Inflammasom kann durch unterschiedliche endogene und exogene Trigger aktiviert werden, wie z. B. Zellstress, bakterielle Infektionen oder

Fremdstoffe wie Asbest oder Nanopartikel (98, 104–106). Bei der Aktivierung des Inflammasoms kann man drei Hauptmechanismen (Ionenverschiebungen, ROS (reactive oxygen species), Schäden des Phagolysosoms) unterscheiden, die aber auch zum Teil miteinander interagieren.

Kaliumausstrom aus der Zelle gilt als ein potenter Aktivierungsmechanismus des Inflammasoms, der unter anderem durch bakterielle Toxine, ATP (Adenosintriphosphat) oder Partikel ausgelöst werden kann (107). Zum Beispiel führt extrazelluläres ATP über die Aktivierung des P2X<sub>7</sub>-Rezeptors zu einem Natrium- und Kalzium-Einstrom und in der Folge zu einem Ausstrom von Kalium-Ionen aus dem Zytoplasma über TWIK2-Kanäle (108). Es wurde zudem gezeigt, dass eine niedrige extrazelluläre Kalium-Konzentration in der Zellkultur zu einer Aktivierung des Inflammasoms führen kann, während hohe extrazelluläre Konzentrationen die Aktivierung des Inflammasoms verhindern können (107, 109). Auch ein Ausstrom von Chlorid-Ionen könnte in der Signalkaskade der Aktivierung des Inflammasoms eine Rolle spielen (110).

Im Rahmen der Zellatmung wird in den Mitochondrien physiologisch ROS produziert, die Produktion kann allerdings durch verschiedenen Faktoren wie Hypoxie, Fremdstoffe oder Infektionen erhöht sein und zu oxidativem Stress führen (105, 111). Es wurde gezeigt, dass die Freisetzung von ROS aus den Mitochondrien das Inflammasom unabhängig von anderen Signalwegen aktivieren kann (112, 113). Zusätzlich kann die Freisetzung von mtDNA in das Zytoplasma im Rahmen einer gestörten Mitochondrienfunktion auch das Inflammasom aktivieren (98, 114).

Nach der Phagozytose können fremdmaterialenthaltende Phagosomen mit den Lysosomen zu Phagolysosomen fusionieren. Die phagozytierte Partikel können zu einer Schwellung und Ruptur des Phagolysosoms führen. Hierdurch werden Lysosombestandteile wie Cathepsin B in das Zytoplasma freigesetzt und führen, vermutlich durch Kalium-Ausstrom vermittelt, zur Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (107, 115).

## 1.8 IL-1 $\beta$

IL-1 $\beta$  ist ein proinflammatorisches Zytokin, welches nach Aktivierung des Inflammasoms durch Caspase-1 in die aktive Form überführt und sekretiert wird. IL-1 $\beta$  selbst fördert die Ausschüttung weiterer proinflammatorischer Zytokine, wie z. B. IL-6 (116). Zudem fördert IL-1 $\beta$  die Expression von Adhärenzmolekülen, die die Migration von Leukozyten in das entzündete Gewebe verstärken (117). IL-1 $\beta$  spielt unter anderem bei der Pathogenese von Diabetes mellitus, Arteriosklerose und rheumatoider Arthritis eine Rolle (69, 117–119).

Außerdem fördert IL-1 $\beta$  die Synthese und Ausschüttung von Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) (120). MMPs schädigen das umliegende Gewebe unter anderem durch den Abbau

von Kollagen und spielen z. B. bei der Gelenkschädigung im Rahmen von rheumatoider Arthritis und Arthrose eine Rolle (69, 119, 120).

Des Weiteren fördert IL-1 $\beta$  das Überleben und die Differenzierung von Osteoklasten durch die Erhöhung der RANKL/OPG-Ratio in Osteoblasten und Stromazellen und kann dadurch Osteolysen fördern (121). In einem Tiermodell der aseptischen Prothesenlockerung konnte gezeigt werden, dass eine Blockade des IL-1-Signalweges die Induktion von Osteolysen durch UHMWPE- und Titan-Partikel reduzieren kann (122, 123). Außerdem wurden erhöhte IL-1- und TNF $\alpha$ -Konzentrationen in Gewebeproben von Patienten mit periprotetischen Osteolysen gefunden (124). Zudem gibt es Hinweise dafür, dass genetische Polymorphismen, die zu einer erhöhten Expression eines IL-1-Rezeptorantagonisten führen, mit einem geringeren Risiko für Osteolysen nach Implantation einer Hüft-TEP einhergehen (125).

### **1.9 Rolle des Inflammasoms bei verschiedenen Krankheiten**

Cryopyrin-assoziierte periodische Syndrome (CAPS) sind autoinflammatorische Erkrankungen, die durch gain-of-function-Mutationen des NLRP3-Gens verursacht werden (100, 126). Zu den CAPS gehören die familiäre Kälteurtikaria, das Muckle-Wells-Syndrom und neonatal-onset multisystem inflammatory disease (NOMID/CINCA). Diese Erkrankungen unterscheiden sich in ihrer Ausprägung und zeigen Symptome wie rezidivierende Fieberschübe, Urtikaria, Arthralgien oder Hörverlust (126, 127). CAPS können mit IL-1-Rezeptorantagonisten behandelt werden (127–129).

Außerdem spielt das NLRP3-Inflammasom eine Rolle bei der Entstehung von verschiedenen entzündlichen Erkrankungen. Das Inflammasom kann z. B. durch  $\beta$ -Amyloid-Plaques bei Alzheimer, Cholesterinkristalle bei Atherosklerose und MSU-Kristalle bei Gicht aktiviert werden (130–132). Des Weiteren könnte das NLRP3-Inflammasom auch an der Entstehung von Diabetes mellitus Typ 2 und rheumatoider Arthritis mitbeteiligt sein (118, 133).

### **1.10 Rolle des Inflammasoms bei der aseptischen Prothesenlockerung**

Eine erhöhte Ausschüttung von IL-1 $\beta$  durch die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Metall-, PMMA- und UHMWPE-Partikel konnte bereits in mehreren Studien gezeigt werden (65, 134–136). Sowohl für CoCrMo- als auch für Ti-Partikel sowie für verschiedene Metall-Ionen konnte die Aktivierung des Inflammasoms in Makrophagen nachgewiesen werden (65, 136, 137). Der Einfluss der Zusammensetzung der Partikel auf die Inflammasomaktivierung ist noch nicht ausreichend erforscht, um die proinflammatorischen Eigenschaften von CoCrMo- und TiAlV-Partikeln eindeutig vergleichen zu können (138, 139).

Wie genau die Abriebpartikel das Inflammasom aktivieren, ist noch nicht geklärt. Zum einen gibt es Hinweise dafür, dass phagozytierte Partikel durch die Zerstörung der Lysosomen zur

Freisetzung lysosomaler Enzyme (z. B. Cathepsin B) und somit zur Aktivierung des Inflammasoms führen (54, 65). Zum anderen gilt auch die Bildung von ROS durch Metallionen und -partikel als eine mögliche Ursache für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms (136, 140–142).

Ein möglicher Marker für oxidativen Stress ist 4-Hydroxynonenal (4-HNE). Durch oxidativen Stress kann es zur Peroxidation von Lipiden in der Zellmembran oder den Membranen der Zellorganellen kommen. Durch die entstehenden Lipidperoxyl-Radikale kommt es zu einer Kettenreaktion, bei der Lipidhydroperoxide entstehen. Beim Abbau von Lipidhydroperoxiden entstehen verschiedene kurzkettige Verbindungen, unter anderem 4-HNE. 4-HNE ist an verschiedenen physiologischen und pathologischen Prozessen beteiligt und könnte eine Rolle bei der Entstehung von verschiedenen inflammatorischen und degenerativen Erkrankungen spielen (143). Unter anderem wurde gezeigt, dass 4-HNE das NLRP3-Inflammasom aktivieren kann (144). In hohen Konzentrationen wirkt es zytotoxisch und führt z. B. in Osteoblasten zur Apoptose, weshalb ein Zusammenhang zur Entstehung von Osteoporose vermutet wird (145). Im periprothetischen Gewebe von MoP-Hüft-TEP-Revisionen konnte eine verstärkte ROS-Bildung nachgewiesen werden, welche möglicherweise über die Aktivierung des Inflammasoms an der Entstehung von aseptischen Prothesenlockerung sein könnte (146, 147).

Der Pathomechanismus der Inflammasomaktivierung könnte auch von der Größe und Form der Partikel abhängig sein (54). Zum Beispiel spielt die Größe der Partikel eine Rolle bei ihrer Aufnahme in Zellen. Partikel mit einer Größe von ca. 150 nm – 10 µm können von diversen Zellen (z. B. Makrophagen, Osteoblasten, Fibroblasten) phagozytiert werden, während kleinere Partikel mit einer Größe < 100 nm überwiegend über Clathrin-vermittelte und Calveolae-abhängige Endozytose in Zellen aufgenommen werden (57, 104, 148).

Die meisten Studien haben sich bislang auf die Aktivierung des Inflammasoms in Makrophagen konzentriert und die Beteiligung anderer Zellen der Prothesenumgebung an diesem Prozess ist noch nicht ausreichend untersucht.

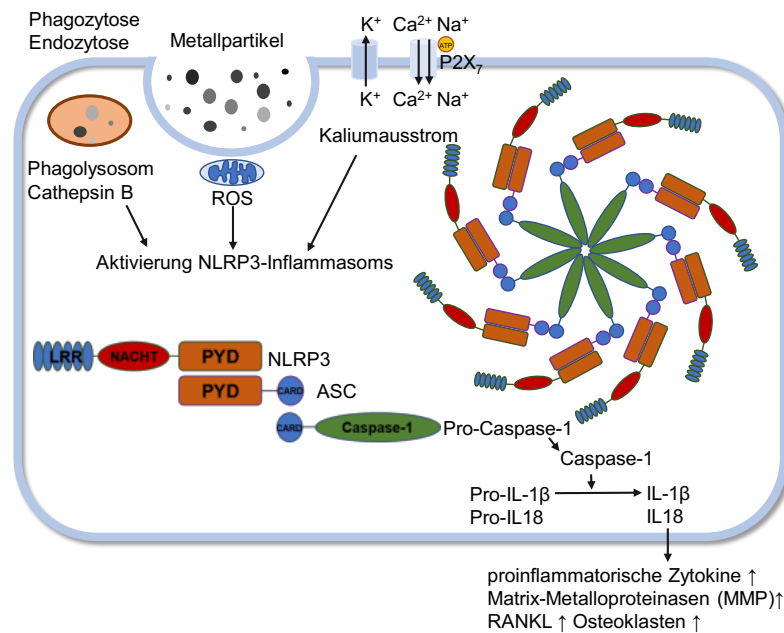


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Metallpartikel. Grafik modifiziert nach Seok et al. 2021 (149) und Swanson et al. 2019 (98).

### 1.11 Hypothese und Fragestellung

Diese Arbeit untersucht die Hypothese, dass Metallpartikel das Inflammasom in gelenkständigen Zellen aktivieren und somit durch eine Entzündungsreaktion zur Entstehung von aseptischen Prothesenlockerungen beitragen können. Hierfür wurden die Experimente mit drei verschiedenen Zelllinien (MM6 (Monozyten), Jurkat (T-Zellen) und MG63 (Osteoblasten)) und Metallpartikeln aus zwei verschiedenen Legierungen (TiAlV und CoNiCrMo) in unterschiedlichen Dosierungen durchgeführt. Um die Hypothese dieser Studie zu untersuchen, sollen folgende Zwischenfragen beantwortet werden:

1. Gibt es zellspezifische Unterschiede bei der Partikelaufnahme bzw. können alle Zellen der periprothetischen Umgebung Metallpartikel aufnehmen? Ist die Aufnahme der Partikel in die Zellen abhängig von ihrer Zusammensetzung?
2. Gibt Hinweise für einen erhöhten oxidativen Stress in Gelenkkapseln von Patienten mit MoM-Hüft-TEPs im Vergleich zu Gelenkkapseln von Patienten mit Primärimplantationen?
3. Aktivieren die untersuchten Metallpartikel das Inflammasom in allen Zelltypen oder gibt es eine Zellspezifität?
4. Ist die Aktivierung des Inflammasoms abhängig von der Zusammensetzung oder Menge der Metallpartikel?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Materialien

Tabelle 1: Verwendete Geräte

Geräte	Hersteller
Agarosegel Imager Infinity-1000	peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
Analysenwaage A 120 S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Axio Observer Z1 Kamera: Axiocam 702 mono Lampe: HXP 120 V	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Biorad ChemiDoc MP Imaging System	Bio-Rad, Hercules, USA
Biorad T100 Thermocycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Gelkämme 10-well, 1mm	Bio-Rad, Hercules, USA
Gewebeinfiltrationsautomat TP1020	Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland
Heraeus Fresco 21 Mikrozentrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Heraeus, Megafuge 16R	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
IKA Schüttler MTS 2	IKA, Staufen, Deutschland
Inkubator Binder CB150	Binder, Tuttlingen, Deutschland
Kipp-/Rollenmischer RS-TR 05	Phönix Instrument, Garbsen, Deutschland
Mastersizer 3000E	Malvern Panalytical GmbH, Nürnberg, Deutschland
Mikrotom Hyrax M55	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Mini-PROTEAN Short Plates	Bio-Rad, Hercules, USA
Mini-PROTEAN Spacer Plates	Bio-Rad, Hercules, USA
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad, Hercules, USA
NanoQuant Plate	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
PerfectSpin Plate Spinner C1000	PeqLab, Erlangen, Deutschland
Präzisionswaage EWB 620-2M	Kern, Balingen-Frommern, Deutschland
Rasterelektronenmikroskop FEI Scios DualBeam	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
See-saw Rocker SSL4	Stuart, Staffordshire, UK
Shandon HistoCentre 2	GMI, Ramsey, Minnesota, USA
Spannungsquelle für Gelelektrophorese Power Pack P25	Biometra, Göttingen, Deutschland
Sterilbank Herasafe KS18	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Sterilbank Maxisafe 2020 1.5	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Taqman ABI PRISM 7900HT	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Tecan infinite F200 pro	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
ThermoMixer C	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortex Genie 2 G560E	Scientific Industries, Bohemia, New York, USA
Wasserbad WT 12	MedingLab, Freital, Deutschland
Zählkammer Neubauer-improved	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Zetasizer Nano ZS	Malvern Panalytical GmbH, Nürnberg, Deutschland

Tabelle 2: Verwendete Verbrauchsmaterialien

<b>Verbrauchsmaterialien</b>	<b>Hersteller</b>
100 bp DNA ladder	New England Biolabs, Ipswich, USA
10x Tris/Glycine Buffer	Bio-Rad, Hercules, USA
20x Tris Buffered Saline (TBS)	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA
384-Well-Platte (MicroAmp Optical 384-Well Reaction Plate)	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Acrylamid Bis Solution 30 %	Serva, Heidelberg, Deutschland
Adhäsionsfolie qRT-PCR (MicroAmp Optical Adhesive Film)	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Agarose Basic	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Blot Filterpapier	Bio-Rad, Hercules, USA
Bromphenolblau	Applichem, Darmstadt, Deutschland
BSA Albumin Fraction V (pH 7,0)	Applichem, Darmstadt, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Citratpuffer pH 6 (Target Retrieval Solution x10)	Dako, Jena, Deutschland
Dako Pen	Dako, Jena, Deutschland
Antikörper Diluent	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dako Washbuffer	Dako, Jena, Deutschland
Deckgläser 10 mm	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
FCS	Biochrom, Berlin, Deutschland
Formaldehyd (4 %)	Otto Fische GmbH & Co. KG, Saarbrücken, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycerol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Loading Dye	New England Biolabs, Ipswich, USA
Luminol	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Menzel Gläser Superfrost	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Multiwellplatten (Cell Star) 12-Well-Platte (Oberfläche = 3,9 cm <sup>2</sup> ) 24-Well-Platte (Oberfläche = 1,9 cm <sup>2</sup> ) 48-Well-Platte (Oberfläche = 1 cm <sup>2</sup> ) 96-Well-Platte (Oberfläche = 0,35 cm <sup>2</sup> )	Greiner, Kremsmünster, Österreich
Nitrocellulose-Membran	Bio-Rad, Hercules, USA
Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Parafin (Paraplast)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PBS Dulbecco w/o Ca <sup>2+</sup> , w/o Mg <sup>2+</sup> low endotoxin	Biochrom, Berlin, Deutschland
p-Coumarnsäure	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, Deutschland
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

Polyester PETE Membrane Filters 47 mm, 0,1 µm	Sterlitech Corp., Washington, USA
Poly-L-Lysin	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
Ponceau S	Applchem, Darmstadt, Deutschland
RNase Away Spray	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
RNase freies Wasser	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Roti-Mount FluorCare DAPI	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure, rauchend 37 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TERGITOL solution NP - 40	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
TRIS PUFFERAN® ≥ 99,3 %	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Triton 0,1 % in 1% PBS Triton X 100	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trizol	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Trypsin/EDTA 10x	Biochrom, Berlin, Deutschland
Tubes (0,2 ml, 1 ml, 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Tween-20 (10 %)	Applchem, Darmstadt, Deutschland
VLE Dulbecco's MEM + 3,7 g/L NaHCO <sub>3</sub> + 4,5 g/L D-Glucose + Stabiles Glutamin + Na-Pyruvate (Zusatz: 10 % FCS, 1 % Pen/Strep.)	Biochrom, Berlin, Deutschland
VLE RPMI 1640 + stabiles Glutamin + 2,0 g/L NaHCO <sub>3</sub> (Zusatz: 10 % FCS, 1 % Pen/Strep.)	Biochrom, Berlin, Deutschland
Western Sure Pen	LI-COR, Lincoln, USA
WST-1 Assay Reagent	Abcam, Cambridge, UK
Xylol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellschaber	Sarstedt, Newton, USA
β-Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

In Tabelle 1 sind die für die Experimente verwendeten Geräte aufgelistet. Tabelle 2 zeigt die verwendeten Verbrauchsmaterialien.

Tabelle 3: Primärantikörper für die ICC/IHC

Antikörper	IgG	Verdünnung	Hersteller/Bestellnummer
4-HNE-Antikörper	rabbit	1:100	Abcam, Cambridge, UK, ab46545
ASC-Antikörper	mouse	1:100	Cell Signaling, Danvers, USA, sc-514414
Phalloidin Alexa Fluor 555	-	1:100	Cell Signaling, Danvers, USA, 8953

Tabelle 4: Isotypkontrollen für die ICC/IHC

Isotypkontrollen	Verdünnung	Hersteller/Bestellnummer
Mouse IgG Isotype Control	1:1250	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, 02-6502
Rabbit IgG Isotype Control	1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, 02-6102



Tabelle 5: Sekundärantikörper für die ICC/IHC

Sekundärantikörper	Reporter	Verdünnung	Hersteller/Bestellnummer
donkey anti rabbit IgG	Alexa Flour 555	1:1000	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, A-31572
donkey anti mouse IgG	Alexa Flour 555	1:200	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, A-31570

Tabelle 3 zeigt die für die ICC/IHC verwendeten Primärantikörper, in Tabelle 4 sind die Isotypkontrollen für die Färbungen aufgelistet und in Tabelle 5 sind die Sekundärantikörper aufgeführt.

Tabelle 6: Primärantikörper für den Western Blot

Primärantikörper	MW (kDa)	Verdünnung	Hersteller/Bestellnummer
Caspase-1-Antikörper	42 und 20 (p20)	1:400	eBioscience, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, 14-9823
GAPDH-Antikörper	37	1:1.000	Cell Signaling, Danvers, USA, 2118S

Tabelle 7: Sekundärantikörper für den Western Blot

Sekundärantikörper	Reporter	Verdünnung	Hersteller/Bestellnummer
Goat-anti-mouse IgG	HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, sc-2005
Goat-anti-rabbit IgG	HRP	1:10.000	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA, sc-2030

In Tabelle 6 sind die für den Western Blot eingesetzten Primärantikörper aufgeführt. In Tabelle 7 sind die verwendeten Sekundärantikörper für den Western Blot aufgelistet.

Tabelle 8: Gele für die SDS-Page

<b>Trenngel 10 % (5 ml)</b>	
ddH <sub>2</sub> O	1,9 ml
Acrylamid (30 %)	1,7 ml
Tris (1,5 M, pH: 8,8)	1,3 ml
SDS (10 %)	0,05 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	0,05 ml
TEMED:	0,002 ml
<b>Sammelgel 5 % (3 ml)</b>	
ddH <sub>2</sub> O	2,1 ml
Acrylamid (30 %)	0,5 ml
Tris (1 M, pH: 6,8)	0,38 ml
SDS (10 %)	0,03 ml
Ammoniumpersulfat (10 %)	0,03 ml
TEMED	0,003 ml

In Tabelle 8 ist die Zusammensetzung der Acrylamid-Gele für die SDS-Page gezeigt.

Tabelle 9: Puffer für SDS-Page/Western Blot

<b>NP - 40 Lysepuffer</b>	
Tris (pH 7,4)	50 mM
NaCl	150 mM
NP - 40	1 %
<b>Sample Buffer (5x)</b>	
Glycerol	5 ml
SDS	1 g
$\beta$ -Mercaptoethanol	2,56 ml
1M Tris-HCL pH 6,8	1,065 ml
Bromphenolblau	3 $\mu$ l
ddH <sub>2</sub> O	auf 10 ml auffüllen
<b>Laufpuffer (10x) pH 8,3</b>	
Tris	30 g
Glycin	144 g
SDS	15 g
ddH <sub>2</sub> O	auf 1 l auffüllen
<b>Blotpuffer</b>	
10x Tris/Glycin Puffer	100 ml
Methanol	200 ml
ddH <sub>2</sub> O	700 ml
<b>TBS-T</b>	
20x TBS	50 ml
Tween-20 (10 %)	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	950 ml
<b>Strippingpuffer</b>	
Guanin Hydrochlorid	286,5 g
Tris	1,645 g
ddH <sub>2</sub> O	auf 500 ml auffüllen
NP - 40	1 ml

Tabelle 9 zeigt die Zusammensetzungen der für die SDS-Page verwendeten Puffer.

Tabelle 10: ECL-Lösung (enhanced chemiluminescence) für den Western Blot

<b>ECL-Lösung: Lösung 1 und 2 im Verhältnis 1:1 gemischt</b>	
<b>Lösung 1:</b>	
250 mM Luminol	100 $\mu$ l
90 mM p-Coumarsäure	44 $\mu$ l
1M Tris-HCL (pH 8,5)	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	8,85 ml
<b>Lösung 2:</b>	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (30 %)	6 $\mu$ l
1M Tris-HCL (pH 8,5)	1 ml
ddH <sub>2</sub> O	9 ml

In Tabelle 10 ist die Herstellung der ECL-Lösung für die Detektion im Western Blot dargestellt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Für die Experimente wurden Mono-Mac-6- (MM6) (Monozyten), Jurkat- (T-Zellen) und MG63- (osteoblastenähnliche) Zelllinien verwendet. Alle Zellen wuchsen bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator und wurden mithilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

Bei den MM6-Zellen handelt es sich um eine humane Monozyten-Zelllinie, die aus dem peripheren Blut eines 64-jährigen Patienten mit dem Rezidiv einer akuten monozytischen Leukämie gewonnen wurde. Die MM6-Zellen weisen unter anderem in ihrer Phagozytosefähigkeit und Cytokinproduktion eine große Ähnlichkeit zu reifen Monozyten auf (150).

Die Jurkat-Zelllinie wurde aus T-Lymphozyten aus dem peripheren Blut eines 14-jährigen Patienten mit T-Zell-Leukämie hergestellt. Sie wird insbesondere im Bereich der immunologischen und infektiologischen Forschung eingesetzt, da die Zellen eine ähnliche Rezeptor-Expression und Interleukin-Produktion wie primäre humane T-Lymphozyten aufweisen (151). Über die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und RANKL können T-Zellen die Knochenhomöostase beeinflussen.

Die Suspensionszellen (MM6, Jurkat) wurden in Very Low Endotoxin-Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium (VLE-RPMI 1640) (Biochrom, Berlin, Deutschland) mit Zusatz von 10 % hitzeinaktiviertem fetalen Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen gesplittet. Hierfür wurden die Zellen aus den Zellkulturflaschen entnommen, für 5 min bei 700 g zentrifugiert, das Medium abgenommen, die Zellen in neuem Medium suspendiert und auf drei neue Flaschen aufgeteilt.

Bei den MG63-Zellen handelt es sich um eine immortalisierte Zelllinie aus osteoblastenähnlichen Zellen, welche aus dem Osteosarkom eines 14-jährigen Patienten gewonnen wurden. Die Zellen weisen ein adhärentes Wachstum auf und werden aufgrund ihrer geno- und phänotypischen Ähnlichkeit zu primären Osteoblasten häufig in der Grundlagenforschung z. B. in der Untersuchung von Zell-Material-Interaktionen verwendet (152). Osteoblasten sind für die Bildung der Knochenmatrix verantwortlich, zudem regulieren sie über die Produktion von Zytokinen und RANKL den Knochenumbau.

Die MG63 Zellen wurden in Very Low Endotoxin-Dulbecco's modified Eagle's medium (VLE-DMEM) (Biochrom, Berlin, Deutschland) kultiviert, dem 10 % FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin zugesetzt wurde. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage gesplittet, zuvor wurde das Zellwachstum und die Konfluenz am Mikroskop überprüft. Das Medium wurde entfernt und die Zellen wurden zwei Mal mit PBS gewaschen und anschließend für 7 min mit 4 ml 0,25 % Trypsin in EDTA im Inkubator bei 37° C bedeckt und dadurch von der

Oberfläche der Zellkulturflasche abgelöst. Das Trypsin wurde mit 10 ml VLE-DMEM Medium inaktiviert. Die Zellen wurden für 5 min bei 700 g zentrifugiert und danach in VLE-DMEM Medium suspendiert und auf drei neue Flaschen aufgeteilt.

Alle Zellen wurden 24 h vor der Stimulation mit den Metallpartikeln ausgesät. Nach 24 h wurden die Partikel in den entsprechenden Konzentrationen zu den Zellen gegeben. In den 12-Well-Platten (Oberfläche = 3,9 cm<sup>2</sup>) wurden  $1 \cdot 10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  Partikel verwendet, bei den anderen Wellgrößen wurden die Partikel- und Zellzahlen entsprechend an die Welloberfläche angepasst. Die Zellzahlen und Partikelmengen sind in den einzelnen Kapiteln dargestellt.

### 2.2.2 Partikelproduktion

Die verwendeten Partikel wurden aus einer Co-35Ni-20Cr-10Mo-Schmiedelegerung und einer Ti-6Al-4V-Legierung hergestellt (G. Buchhorn, Universitätsmedizin Göttingen, Göttingen, Deutschland). Hierfür wurden Stäbe einer Legierung in Metallcontainern mit derselben Zusammensetzung positioniert und mit 100 % Ethanol gefüllt. Die Container wurden kontinuierlich mit einer Frequenz von 1 Hz in einem schrägen Winkel kopfüber rotiert. Der Winkel der longitudinalen Achse der Container wurde regelmäßig verändert, um eine einseitige Abnutzung zu vermeiden. Durch die Reibung zwischen den Stäben und dem Behälter entstanden Abriebpartikel (153, 154).

Die Partikel wurden filtriert und Partikel mit einer Größe von mehr als 0,1 µm wurden für die folgenden Experimente verwendet. Dafür wurden die Partikel auf einen Filter mit einer Porengröße von 0,1 µm gegeben (Polyester PETE Membrane Filters 47mm, Sterlitech Corp., Washington, USA) und mittels Vakuumfiltration getrennt. Die Filter wurden getrocknet und die Partikel in DMEM-Medium suspendiert. Anschließend wurden die Partikel über Nacht mit UV-Licht bestrahlt und anschließend gezählt. Für die Partikelanalyse wurden die gefilterten Partikel in Ethanol statt in Medium gelagert und ebenfalls mit UV-Licht bestrahlt.

### 2.2.3 Partikelanalyse im Rasterelektronenmikroskop

Mit dem Rasterelektronenmikroskop (REM) wurden die Größe, Morphologie und Zusammensetzung der Metallpartikel untersucht. Im REM wird die Wechselwirkung eines Elektronenstrahls mit der Probe zur Bilderzeugung genutzt. Hierdurch sind Auflösungen von bis zu 1 nm möglich. Beim Auftreffen der Primärelektronen auf der Oberfläche des Untersuchungsobjekts entstehen durch die Wechselwirkungen mit der Probe unterschiedliche Signale. Die Oberflächentopografie der Probe kann durch die Detektion von Sekundärelektronen, die aus der oberflächlichen Schicht der Probe abgegeben werden, dargestellt werden. Die Anzahl der detektierten Sekundärelektronen hängt von der Neigung und der Struktur der Probenoberfläche ab.

Die energiedispersive Röntgenanalyse (energy dispersive X-ray spectroscopy, EDS) wird genutzt, um die chemische Zusammensetzung von Proben quantitativ und qualitativ zu bestimmen. Wenn die Primärelektronen auf Atome der Probe treffen, können sie Elektronen aus der inneren Schale herauslösen. Wird die entstandene Lücke durch Elektronen aus höheren Schalen aufgefüllt, entsenden sie dabei eine für das Element charakteristische Röntgenstrahlung, welche detektiert werden kann. Im EDS-Spektrum kann man die Verteilung der unterschiedlichen Elemente in der Probe ablesen.

Die gefilterten Partikel wurden für die Analyse im REM auf ein Kohlenstoff-Pad übertragen und es wurde mittels Sputtern eine Goldschicht aufgebracht, um die Leitfähigkeit zu erhöhen. Die Proben wurden im Vakuum im Rasterelektronenmikroskop FEI Scios DualBeam (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) untersucht und eine EDS-Analyse durchgeführt. Bei den REM-Untersuchungen wurde eine Beschleunigungsspannung von 10 keV bis 25 keV verwendet. Die Oberflächentopografie der zu untersuchenden Region wurde mittels Sekundärelektronen bei einer Vergrößerung von 1200x dargestellt. Die Morphologie der Partikel wurde bei einer 5000-fachen Vergrößerung genauer untersucht und die chemische Zusammensetzung in der EDS bestimmt.

#### 2.2.4 Größenbestimmung der Partikel

Zunächst wurde die Größenverteilung der Partikel mittels Laserbeugung im Mastersizer 3000E (Malvern Panalytical GmbH, Nürnberg, Deutschland) gemessen. Hierbei wurden die in Ethanol suspendierten Partikel mit einem Laser bestrahlt und die Intensität des Streulichtes gemessen. Anhand des Beugungsmusters kann die Größe der Partikel berechnet werden. Der Messbereich der Mastersizer 3000E liegt bei einer Partikelgröße von 0,1 bis 1000 µm.

Um eine Agglomeration der Partikel auszuschließen, erfolgte eine weitere Untersuchung der Partikel im Zetasizer Nano ZS (Malvern Panalytical GmbH, Nürnberg, Deutschland), wo die Partikel bei 25° C im Ultraschallbad untersucht wurden. Der Durchmesser der Partikel wurden mit dem Zetasizer Nano ZS mittels dynamischer Lichtstreuung (DLS) in NIBS-Technik (Non-Invasive Back Scatter) bestimmt. Der Messbereich des Zetasizer Nano-ZS liegt im Bereich von 0,3 nm bis 10 µm.

#### 2.2.5 Water Soluble Tetrazolium Salt-1-Assay

Zur Untersuchung der Auswirkungen der verschiedenen Metallpartikel-Konzentrationen auf die Zellviabilität wurde ein Water Soluble Tetrazolium Salt-1-Assay (WST-1) (Abcam, Cambridge, UK) verwendet. WST-1 wird in den Mitochondrien durch die Succinat-Tetrazolium-Dehydrogenase zu Formazan umgesetzt. Die Menge des gebildeten Formazans ist abhängig von der Zahl der intakten Zellen und kann photometrisch bestimmt werden.

Hierfür wurden die verschiedenen Zelllinien (MM6, Jurkat und MG63) für je 24 und 48 h mit TiAlV- und CoNiCrMo-Partikeln versetzt. Von allen verwendeten Zelllinien wurden  $1 \times 10^4$  Zellen pro Well einer 96-Well-Platte mit 100  $\mu$ l Medium angesetzt und nach 24 h mit TiAlV- und CoNiCrMo-Partikeln stimuliert. In Tabelle 11 sind die Zellkulturansätze und die Partikelmengen für den WST-1-Assay dargestellt. Nach der Stimulationszeit von 24 bzw. 48 h wurden in jedes Well 10  $\mu$ l des WST-1-Reagenz gegeben und für drei Stunden bei 37° C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend für eine Minute auf einem Plattenschüttler durchmischt. Die Menge des gebildeten Formazans wurde bei einer Wellenlänge von 430 nm in dem Plattenlesegerät Tecan infinite F200 pro gemessen. Jede Zelllinie wurde als Dreifachbestimmung mit allen Partikelmengen angesetzt. Von den Proben wurde der Leerwert eines Kontroll-Wells mit Medium und WST-1 abgezogen.

Tabelle 11: Zellkulturansätze und Partikelmengen für den WST-1-Assay

Zelllinie	Wellgröße	Zellzahl	Medium	Partikelanzahl pro Well
<b>MM6</b>	96-Well-Platte (Oberfläche = 0,35 cm <sup>2</sup> )	$1 \times 10^4$	100 $\mu$ l VLE-RPMI 1640 Medium	$0,972 \times 10^4, 10^5, 10^6$ Partikel
<b>Jurkat</b>	96-Well-Platte (Oberfläche = 0,35 cm <sup>2</sup> )	$1 \times 10^4$	100 $\mu$ l VLE-RPMI 1640 Medium	$0,972 \times 10^4, 10^5, 10^6$ Partikel
<b>MG63</b>	96-Well-Platte (Oberfläche = 0,35 cm <sup>2</sup> )	$1 \times 10^4$	100 $\mu$ l VLE- DMEM	$0,972 \times 10^4, 10^5, 10^6$ Partikel

### 2.2.6 Phalloidin-Red-Färbung

Mit der Phalloidin-Red-Färbung ist es möglich, das Zytoskelett von Zellen zu visualisieren. Phalloidin ist ein Toxin des Grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*) und bindet an F-Aktin. Für die Phalloidin-Red-Färbung wurden  $1 \times 10^6$  MM6- bzw. Jurkat-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät und mit VLE-RPMI 1640 Medium auf ein Gesamtvolumen von 1 ml aufgefüllt. Bei den MG63-Zellen wurden  $0,2 \times 10^5$  Zellen mit einem Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l VLE-DMEM in einer 48-Well-Platte ausgesät. Die Wells der MG63-Zellen enthielten Deckgläser mit einem Durchmesser von 10 mm, auf denen die Zellen anwuchsen. Nach 24 h wurden die Metallpartikel zu den Zellen gegeben (Partikelmengen siehe Tabelle 12). Nach 24 h Inkubation mit den Partikeln wurden die Suspensionszellen aus den Wells in Tubes überführt und herunterzentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 400  $\mu$ l FCS-freiem Medium resuspendiert.

Die Deckgläser für die Suspensionszellen wurden mit Poly-L-Lysin beschichtet, um die Haftung der Zellen zu unterstützen. Hierfür wurde in eine 48-Well-Platte ein Deckglas mit einem Durchmesser von 10 mm in jedes Well gelegt und mit 200  $\mu$ l Poly-L-Lysin für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser drei Mal mit FCS-freiem Medium gespült. In jedes Well mit einem Poly-L-Lysin-beschichteten Deckgläschen wurden 50  $\mu$ l der Zelllösung und 500  $\mu$ l FCS-freies Medium pipettiert und für 30 min bei 37° C und

5 % CO<sub>2</sub> in den Inkubator gestellt. Anschließend wurden die Deckgläschen drei Mal mit PBS gespült. Die Deckgläser der MG63-Zellen wurden ebenfalls drei Mal mit PBS gespült.

Für die Phalloidin-Red-Färbung wurden die Zellen anschließend mit 500 µl 4 % Paraformaldehyd (PFA) pro Well für 30 min bei Raumtemperatur auf den Deckgläsern fixiert. Danach wurden die Deckgläser erneut drei Mal für 5 min mit PBS gewaschen.

Für die Färbung wurden die Zellen für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln mit 150 µl Phalloidin-Alexa Fluor 555 (Cell Signaling, Danvers, USA) pro Well inkubiert (20x Lösung (6,6 µM), 1:100 mit PBS verdünnt). Danach wurden die Deckgläser zwei Mal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Deckgläser mit Roti-Mount Flourcare DAPI auf einem Objektträger eingedeckt und die Zellkerne dadurch mit DAPI angefärbt. Die Bilder wurden mit einem Axio Observer Z1 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einer 630-fachen Vergrößerung aufgenommen.

### 2.2.7 Immunhistochemie

Mit der 4-HNE-Färbung wurde Synovialgewebe von Primärimplantationen bzw. periprothetisches Gewebe von Revisionen von MoM-Hüft-TEPs untersucht. Die Patienten haben der Probenentnahme präoperativ schriftlich zugestimmt (Ethikkommissionsnummer: No. 150/12 und Tartu No. 227/T-14). Das Durchschnittsalter der Patienten mit Revisionseingriffen lag bei 70,43 ±5,53 Jahren. Bei den Primärimplantationen lag das Alter im Durchschnitt bei 63,20 ±6,14 Jahren.

Der Gewebeprobe wurden für 24 h in 4 % Formaldehyd fixiert und danach im Gewebefiltrationsautomaten (TP1020, Leica Biosystems, Nußloch, Deutschland) entwässert. Daraufhin wurde das Gewebe in Paraffin eingebettet, am Mikrotom in 3 - 4 µm dicke Proben geschnitten und auf Objektträger übertragen. Die Schnitte wurden zunächst für 2 x 10 min in Xylol entparaffiniert und anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 5 min in 100 % Ethanol, 96 % Ethanol, 70 % Ethanol, 50 % Ethanol). Danach wurden die Schnitte für 5 min auf einem Schüttler mit dem Dako Waschpuffer gewaschen.

Die Demaskierung wurde für die Färbung mit 4-HNE mit Trypsin durchgeführt. Hierfür wurden die Gewebe mit dem Dako Pen umrandet und für 10 min mit Trypsin bedeckt bei 37° C gelagert. Danach wurden die Schnitte drei Mal für 5 min mit dem Waschpuffer gewaschen und für eine Stunde mit 4 % BSA in PBS bei Raumtemperatur blockiert. Der Antikörper wurde 1:100 mit dem Antibody Diluent (Roth, Karlsruhe, Deutschland) verdünnt und die Isokontrolle aus rabbit IgG wurde 1:1000 verdünnt, um die gleiche Endkonzentration zu erreichen. Die Proben wurden über Nacht bei 4° C mit dem Primärantikörper inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wurden die Schnitte drei Mal für 10 min mit dem Dako Waschpuffer gewaschen und für eine Stunde mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor 555 rabbit

(Verdünnung 1:200) im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Objektträger erneut drei Mal für 10 min mit dem Waschpuffer gewaschen und mit Roti-Mount Flourcare DAPI eingedeckt. Die Bilder wurden mit einem Axio Observer Z1 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit einer 400-fachen Vergrößerung aufgenommen.

#### 2.2.8 Immuncytochemie

Für die ASC-Färbung wurden MM6- und Jurkat-Zellen in 24-Well-Platten ausgesät ( $1 \cdot 10^6$  Zellen pro Well in 500  $\mu$ l Medium). Die MG63-Zellen wurden in 48-Well-Platten angezüchtet ( $0,2 \cdot 10^5$  Zellen pro Well in 500  $\mu$ l Medium), deren Wells Deckgläschen mit einem Durchmesser von 10 mm enthielten. Nach 24 h wurden die Zellen mit den Partikeln stimuliert. Die Zellansätze und die Partikelmengen für die Stimulation sind in Tabelle 12 zu sehen. Nach einer Inkubationszeit von 24 h mit den Partikeln wurden die Suspensionszellen aus den Wells in Tubes überführt und für 5 min bei 700 g zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 400  $\mu$ l FCS-freiem Medium resuspendiert. In einer 48-Well-Platte wurden 50  $\mu$ l der Zelllösung und 500  $\mu$ l FCS-freies Medium pro Well auf ein mit Poly-L-Lysin beschichtetes Deckgläschen gegeben und für 30 min bei 37° C inkubiert (siehe 2.2.6 Phalloidin-Red-Färbung). Anschließend wurden die Deckgläschen aller Zelllinien drei Mal mit PBS gespült.

Zur Fixierung wurden 500  $\mu$ l einer gekühlten Methanol-Aceton-Lösung (1:1) für 5 min bei 4° C in jedes Well gegeben. Danach wurden die Deckgläschen erneut drei Mal mit PBS gespült. Anschließend wurden die Zellen mit Triton permeabilisiert. Dafür wurden 500  $\mu$ l Triton (0,1 % in PBS) in jedes Well auf die Deckgläser gegeben und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser drei Mal für je 5 min auf einem Schüttler mit PBS gewaschen. Danach erfolgte die Blockierung mit 4 % BSA in PBS für 1 h bei Raumtemperatur. In jedes Well wurden 150  $\mu$ l des ASC-Antikörpers (1:100, sc-514414, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA) bzw. der Isotyp-Kontrolle (1:1250, Mouse IgG Isotype Control, 02-6502, Thermo Fisher, Waltham, USA) gegeben und über Nacht bei 4° C auf dem Schüttler inkubiert. Nach 24 h wurden die Deckgläser erneut drei Mal für je 5 min mit PBS auf dem Schüttler gewaschen. Danach wurden 150  $\mu$ l des Sekundär-Antikörpers (1:200, Alexa Flour 555 anti mouse, A-31570, Thermo Fisher, Waltham, USA) in jedes Well gegeben und für 1 h im Dunkeln bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend wurden die Deckgläser erneut mit PBS gewaschen und mit Roti-Mount Flourcare DAPI auf Objektträgern eingedeckt. Die Färbungen wurden mit dem Axio Observer Z1 Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland) mit 630-facher Vergrößerung aufgenommen. Die vom ASC-Antikörper angefärbte Fläche wurde in Fiji (ImageJ) bestimmt und relativ zur Zellzahl ausgewertet (155).



Tabelle 12: Übersicht der Zellkulturansätze und Partikelmengen für die ICC

Zelllinie	Wellgröße	Zellzahl	Medium	Partikelanzahl pro Well
<b>MM6</b>	24-Well-Platte (Oberfläche = 1,9 cm <sup>2</sup> )	1 x 10 <sup>6</sup>	500 µl VLE- RPMI 1640 Medium	0,486 x 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> Partikel
<b>Jurkat</b>	24-Well-Platte (Oberfläche = 1,9 cm <sup>2</sup> )	1 x 10 <sup>6</sup>	500 µl VLE- RPMI 1640 Medium	0,486 x 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> Partikel
<b>MG63</b>	48-Well-Platte (Oberfläche = 1 cm <sup>2</sup> )	0,2 x 10 <sup>5</sup>	500 µl VLE- DMEM	0,255 x 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> Partikel

### 2.2.9 RNA-Isolierung

Für die Isolierung der Ribonukleinsäure (RNA) für die quantitative Echtzeit Polymerase-Kettenreaktion (qRT-PCR) wurden die MG63-Zellen in 12-Well-Platten ausgesät (3\*10<sup>5</sup> Zellen pro Well in 1 ml VLE-DMEM Medium) und die Suspensionszellen (MM6 und Jurkat) in 24-Well-Platten (1\*10<sup>6</sup> Zellen pro Well in 1 ml VLE-RPMI 1640 Medium). Nach 24 h wurden die Zellen für 24 h mit den Partikeln inkubiert. In Tabelle 13 sind die genauen Partikelmengen und Zellkulturansätze für die RNA-Isolierung dargestellt. Die Suspensionszellen (MM6 und Jurkat) wurden aus den Wells in ein Tube überführt und für 5 min bei 700 g zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und 500 µl Trizol zu dem Zellpellet hinzugegeben. Bei den MG63 Zellen wurde das Medium abgenommen, 500 µl Trizol zu den Zellen in das Well gegeben und die Zellen in ein Tube überführt. Während der RNA-Isolierung wurden die Proben auf Eis gelagert und die Zentrifugen auf eine Temperatur von 4° C gekühlt, die Arbeitsfläche wurde vorher mit RNase away Spray (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gereinigt.

Die Tubes wurden für 10 min bei 17.000 g zentrifugiert und der Überstand in ein neues Tube überführt. Als Nächstes wurden 100 µl Chloroform zu jeder Probe gegeben und für 20 s auf dem Vortexer durchmischt. Danach wurden die Proben für 2 min auf Eis inkubiert und dann für 15 min bei 10.000 g zentrifugiert. Die Proben trennen sich bei der Zentrifugation in drei Phasen, von denen die oberste wässrige Phase abgenommen und weiterverwendet wurde. Zu dieser Phase, die die RNA enthält, wurde 250 µl gekühltes Isopropanol gegeben. Die Proben wurden gevortext und für 20 min auf Eis inkubiert, anschließend wurden sie für 40 min bei 17.000 g zentrifugiert. Danach wurde das Isopropanol abgenommen und 500 µl vorgekühltes Ethanol (70 %) zu dem Pellet hinzugegeben und mehrfach mit der Pipette gemischt. Die Proben wurden anschließend für 5 min bei 17.000 g zentrifugiert und das Ethanol abgenommen. Das RNA-Pellet trocknete nun für ca. 30 min bei Raumtemperatur. Das Pellet wurde in 12 µl RNase-freiem Wasser gelöst und die RNA-Konzentration durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm am Tecan bestimmt. Zusätzlich wurde der Reinheitsgrad der Probe durch die 260/280-Ratio bestimmt.

Tabelle 13: Übersicht der Zellkulturansätze und Partikelmengen für die qRT-PCR

Zelllinie	Wellgröße	Zellzahl	Medium	Partikelanzahl pro Well
<b>MM6</b>	24-Well-Platte (Oberfläche = 1,9 cm <sup>2</sup> )	1 x 10 <sup>6</sup>	1000 µl VLE- RPMI 1640 Medium	0,486 x 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> Partikel
<b>Jurkat</b>	24-Well-Platte (Oberfläche = 1,9 cm <sup>2</sup> )	1 x 10 <sup>6</sup>	1000 µl VLE- RPMI 1640 Medium	0,486 x 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> Partikel
<b>MG63</b>	12-Well-Platte (Oberfläche = 3,9 cm <sup>2</sup> )	3 x 10 <sup>5</sup>	1000 µl VLE- DMEM	1 x 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> Partikel

### 2.2.10 Reverse Transkription

Für die qRT-PCR muss die RNA zunächst in cDNA transkribiert werden. Dafür wurden die Proben entsprechend ihres RNA-Gehaltes mit RNase-freiem Wasser so verdünnt, dass eine Endkonzentration von 1 µg RNA in 10 µL Wasser erreicht wurde. Zu den verdünnten Proben wurden jeweils 10 µl eines RT-Mastermixes hinzugefügt, sodass ein Gesamtvolumen von 20 µl entstand. Die Zusammensetzung des Mastermixes für die reverse Transkription in Tabelle 14 gezeigt.

Tabelle 14: Mastermix für die Reverse Transkription

<b>Mastermix für die Reverse Transkription pro Probe</b>	
RT-Buffer (10x):	2 µl
dNTPs (25x):	0,8 µl
RT Random Hexamer Primer (10x):	2 µl
Multi Scribe RT (50 U/µl):	1 µl
RNase-Inhibitor:	1 µl
RNase freies Wasser:	3,2 µl

Die Proben wurden im Thermocycler (Biorad T100, Bio-Rad, Hercules, USA) für 10 min bei 25° C, 120 min bei 37° C und 5 min bei 85° C transkribiert und anschließend bei -80° C gelagert.

### 2.2.11 qRT-PCR

In der qRT-PCR wurde die Expression der Inflammasom-Bestandteile Caspase-1 und NLRP3 sowie die Expression von IL-1β in MM6-, Jurkat- und MG63-Zellen nach Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln gemessen. GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) wurde als konstitutiv exprimiertes Referenzgen bestimmt. Die verwendeten Primer für die qRT-PCR sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Primersequenzen für die qRT-PCR

	Forward 5'-3'	Reverse 5'-3'
Caspase-1	GCC TGT TCC TGT GAT GTG GAG	TGC CCA CAG ACA TTC ATA CAG TTT C
NLRP3	GAT CTT CGC TGC GAT CAA CA	GGG ATT CGA AAC ACG TGC ATT A
IL-1 $\beta$	ACA GAT GAA GTG CTC CTT CCA	GTC GGA GAT TCG TAG CTG GAT
GAPDH	CCC ACT CCT CCA CCT TTG AC	AGC CAA ATT CGT TGT CAT ACC AG

Zunächst wurde die synthetisierte cDNA im Verhältnis 1:5 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Für jedes Gen wurde ein Mastermix angesetzt. Die Herstellung des Mastermixes ist in Tabelle 16 zu sehen. Pro Well der 384-Well-Platte wurden 7,5  $\mu$ l Mastermix und 2,5  $\mu$ l cDNA benötigt. Die Proben wurden als Doppelbestimmungen aufgetragen. Für jedes Gen wurden vier Standards und eine NTC (non-template control) mit Wasser ebenfalls als Doppelbestimmung aufgetragen. Die Proben und die Platte wurden auf Eis gelagert.

Tabelle 16: Mastermix für die qRT-PCR

<b>Mastermix für die qRT-PCR pro Probe</b>	
Forward Primer (10 $\mu$ M):	0,5 $\mu$ l
Reverse Primer (10 $\mu$ M):	0,5 $\mu$ l
SYBR Green Master Mix:	5 $\mu$ l
RNase-freies Wasser:	1,5 $\mu$ l

Nachdem die Proben aufgetragen wurden, wurde die Platte mit einer Folie verschlossen und für ca. 20 s in einer Plattenzentrifuge zentrifugiert. Die qRT-PCR wurde im Taqman ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit den in Tabelle 17 dargestellten Einstellungen durchgeführt.

Tabelle 17: Einstellungen für die qRT-PCR

	Temperatur	Dauer
<b>Prä-Inkubation</b>	95° C	15 min
<b>Amplifikation (x40)</b>	95° C (Denaturierung)	30 s
	60° C (Annealing)	30 s
	72° C (Elongation)	45 s
<b>Schmelzkurve</b>	95° C	15 s
	60° C	15 s
	95° C	15 s

Die Daten wurden mit SDS 2.4 (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ausgewertet. Mithilfe der Standards wurden Standardkurven für die Quantifizierung erstellt. Außerdem wurden die Schmelzkurven analysiert, um nachzuweisen, dass es sich bei den Produkten um die spezifischen PCR-Produkte handelt. Die mRNA-Expression der untersuchten Gene wurde relativ zur Expression von GAPDH betrachtet.

#### 2.2.12 Herstellung der Standards für die qRT-PCR

Für jeden Primer wurde zunächst ein Standard hergestellt und verdünnt. Hierfür wurde für jedes Gen eine PCR mit dem Bio Rad T100 Termocycler (Bio-Rad, Hercules, USA) durchgeführt. Der Ansatz erfolgte wie bei der qRT-PCR, es wurden 2,5 µl jeder Probe mit 7,5 µl des Mastermix (siehe Tabelle 14) angesetzt. Die Einstellungen für die PCR stimmten mit den Einstellungen für die qRT-PCR am Taqman überein (siehe Tabelle 17). Das PCR-Produkt wurde auf einem Agarosegel (2 %) bei 150 V für 45 min in der Elektrophoresekammer aufgetrennt. Hierfür wurden 6 µl des PCR-Produkts, 6 µl Wasser und 2 µl Loading Dye (6x) (New England Biolabs, Ipswich, USA) aufgetragen. Zusätzlich wurde ein Größenmarker (100 bp DNA ladder (New England Biolabs, Ipswich, USA)) aufgetragen, um die Größe des PCR-Produkts zu überprüfen. Die PCR-Produkte wurden mit dem Agarosegel Imager Infinity-1000 (peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland) dargestellt. Die Standards wurden wie in Tabelle 18 beschrieben verdünnt.

Tabelle 18: Verdünnung der Standards für die qRT-PCR

Standard 1	999 µl Wasser + 1 µl PCR-Produkt (1:1000)
Standard 2	31 µl Wasser + 1 µl Standard 1 (1:32)
Standard 3	31 µl Wasser + 1 µl Standard 2 (1:32)
Standard 4	15 µl Wasser + 1 µl Standard 3 (1:16)

#### 2.2.13 SDS-PAGE und Western Blot

Für den Western Blot wurden MM6- und Jurkat-Zellen in 24-Well-Platten angesetzt ( $1 \cdot 10^6$  Zellen pro Well) und auf 1 ml mit VLE-RPMI 1640 Medium aufgefüllt. Die MG63-Zellen wurden in 12-Well-Platten angesetzt ( $3 \cdot 10^5$  Zellen pro Well) und VLE-DMEM Medium bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml hinzugefügt. Nach 24 h Zellwachstum wurden die Zellen für 24 h mit den Metallpartikeln inkubiert. In Tabelle 19 sind die Zellkulturansätze und die Partikelmengen für die Zellstimulation für den Western Blot gezeigt. Nach 24 h Inkubation mit den Partikeln wurden die Suspensionszellen aus den Wells in Tubes überführt und für 5 min bei 700 g und 4° C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgenommen und 500 µl gekühltes PBS zu dem Zellpellet hinzugefügt. Daraufhin wurden die Proben erneut für 5 min bei 700 g zentrifugiert, der Überstand wurde abgenommen und 150 µl NP - 40 Lysepuffer (1 % NP - 40) hinzugefügt. Bei den MG63-Zellen wurde nach 24 h das Medium

abgenommen und 500 µl gekühlte PBS in die Wells gegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Boden der Wells gelöst und in ein Tube überführt. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 700 g zentrifugiert und wie oben beschrieben mit Lysepuffer behandelt. Die Proben wurden für 1 h bei 4° C auf einem Rollschüttler gemischt und anschließend für 10 min bei 12.000 g zentrifugiert.

Die Proteinkonzentrationen der Zelllysate wurde mit dem Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA), wie vom Hersteller empfohlen, bestimmt. Anschließend wurden die Proben mit PBS auf eine Konzentration von 20 µg Protein/20 µl PBS verdünnt.

Zu jeder Probe mit einem Volumen von 20 µl wurde im Anschluss 4 µl Sample Buffer hinzugegeben. Die Proben wurden für 5 min bei 95° C im Heizblock (ThermoMixer C, Eppendorf, Hamburg) denaturiert, kurz herunterzentrifugiert und auf Eis gelagert. Die Proben und der Größenmarker wurden in die Kammern eines 10 % Acrylamid-Gels gefüllt.

Zum Gießen der Acrylamidgele wurden zwei Glasplatten in einem Abstand von 1 mm in eine Halterung eingespannt. Die entstandene Kammer wurde erst zu ca. 4/5 mit Trenngel (siehe Tabelle 8) befüllt und mit Isopropanol bedeckt. Nach 30 min Polymerisierung wurde das Isopropanol entfernt und das Gel mit dH<sub>2</sub>O gespült. Danach wurde das Sammelgel (siehe Tabelle 8) eingefüllt, ein 10er-Gelkamm eingesetzt und ebenfalls 30 min Polymerisierung abgewartet.

Die Proben wurden für 60 min bei einer Spannung von 130 V in einer mit Laufpuffer gefüllten Elektrophoresekammer aufgetrennt. Nach einer Stunde wurde das Gel aus der Kammer entfernt und das Sammelgel abgetrennt.

Für den Western Blot wurde die Gelhalterkassette von der Kathode zur Anode in der folgenden Anordnung befüllt: Schaumstoffpolster, Filterpapier, Gel, Nitrocellulosemembran, Filterpapier, Schaumstoffpolster. Alle Bestandteile wurden dabei in Blotpuffer gelagert. Die Elektrophoresekammer wurde auf einen Magnetrührer gestellt. Nachdem die Gelhalterkammer und ein Kühlakku in die Kammer gestellt wurden, wurde sie mit Blotpuffer aufgefüllt. Das Blotting erfolgte bei einer Stromstärke von 350 mA für 1 h. Die Übertragung der Proteine auf die Membran wurde mit der Ponceau S-Färbung überprüft. Anschließend wurde die Membran mehrfach gewaschen. Danach wurden die Membranen für 1 h mit 1 % BSA in TBS-T bei Raumtemperatur auf dem Schüttler blockiert. Über Nacht wurden die Membranen bei 4° C mit dem Primärantikörper gegen das p20-Fragment von Caspase-1 (1:400, Caspase-1-Antikörper, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) auf einem Schüttler inkubiert. Im Anschluss wurden die Membranen 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen. Danach wurden sie für 1 h mit dem Sekundärantikörper (1:10.000, goat anti-mouse IgG HRP, Santa

Cruz Biotechnology, Dallas, USA) bei Raumtemperatur inkubiert und erneut 3 x 10 min mit TBS-T gespült. Zum Detektieren wurde 1 ml der ECL-Lösung (siehe Tabelle 10) auf jede Membran gegeben. Die Banden des Größenmarkers wurden mit dem WesternSure Pen nachgezeichnet und die Membranen im Imager (Biorad ChemiDoc MP Imaging System, Bio-Rad, Hercules, USA) detektiert.

Für die Markierung mit GAPDH wurden die Membranen gestriipt, d. h. die Antikörperbindungen wurden aufgelöst, sodass die Bindung eines neuen Antikörpers erfolgen konnte. Hierfür wurden die Membranen zuerst 5 min in TBS gewaschen und dann für 2 x 5 min mit 10 ml Stripping Buffer (Tabelle 9) und 70 µl Mercaptoethanol inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3 x 10 min mit TBS-T gewaschen und für 1h mit 1 % BSA in TBS-T blockiert. Im Anschluss wurden die Membranen mit dem GAPDH-Antikörper (1:1.000, Cell Signaling, Danvers, USA) wie für Caspase-1 beschrieben behandelt (Sekundärantikörper: 1:10.000, goat-anti-rabbit IgG HRP (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, USA)).

Tabelle 19: Übersicht der Zellkulturansätze und Partikelmengen für den Western Blot

Zelllinie	Wellgröße	Zellzahl	Medium	Partikelanzahl pro Well
MM6	24-Well-Platte (Oberfläche = 1,9 cm <sup>2</sup> )	1 x 10 <sup>6</sup>	1000 µl VLE-RPMI 1640 Medium	0,486 x 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> Partikel
Jurkat	24-Well-Platte (Oberfläche = 1,9 cm <sup>2</sup> )	1 x 10 <sup>6</sup>	1000 µl VLE-RPMI 1640 Medium	0,486 x 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> Partikel
MG63	12-Well-Platte (Oberfläche = 3,9 cm <sup>2</sup> )	3 x 10 <sup>5</sup>	1000 µl VLE-DMEM	1 x 10 <sup>5</sup> , 10 <sup>6</sup> , 10 <sup>7</sup> Partikel

### 2.3 Statistische Auswertung

Die Daten wurde mit GraphPad Prism 9 (GraphPad Software, San Diego, USA) ausgewertet. Die Werte sind als Mittelwerte ± SEM dargestellt. Für Analysen mit zwei Gruppen wurde der t-Test verwendet. Bei mehr als zwei Gruppen wurde ein one-way ANOVA mit dem Fisher's least significant difference oder Dunnett's multiple comparisons test als post-hoc-Test angewendet. P-Werte  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant angesehen.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Erhöhter oxidativer Stress in periprothetischem Gewebe von MoM-Patienten

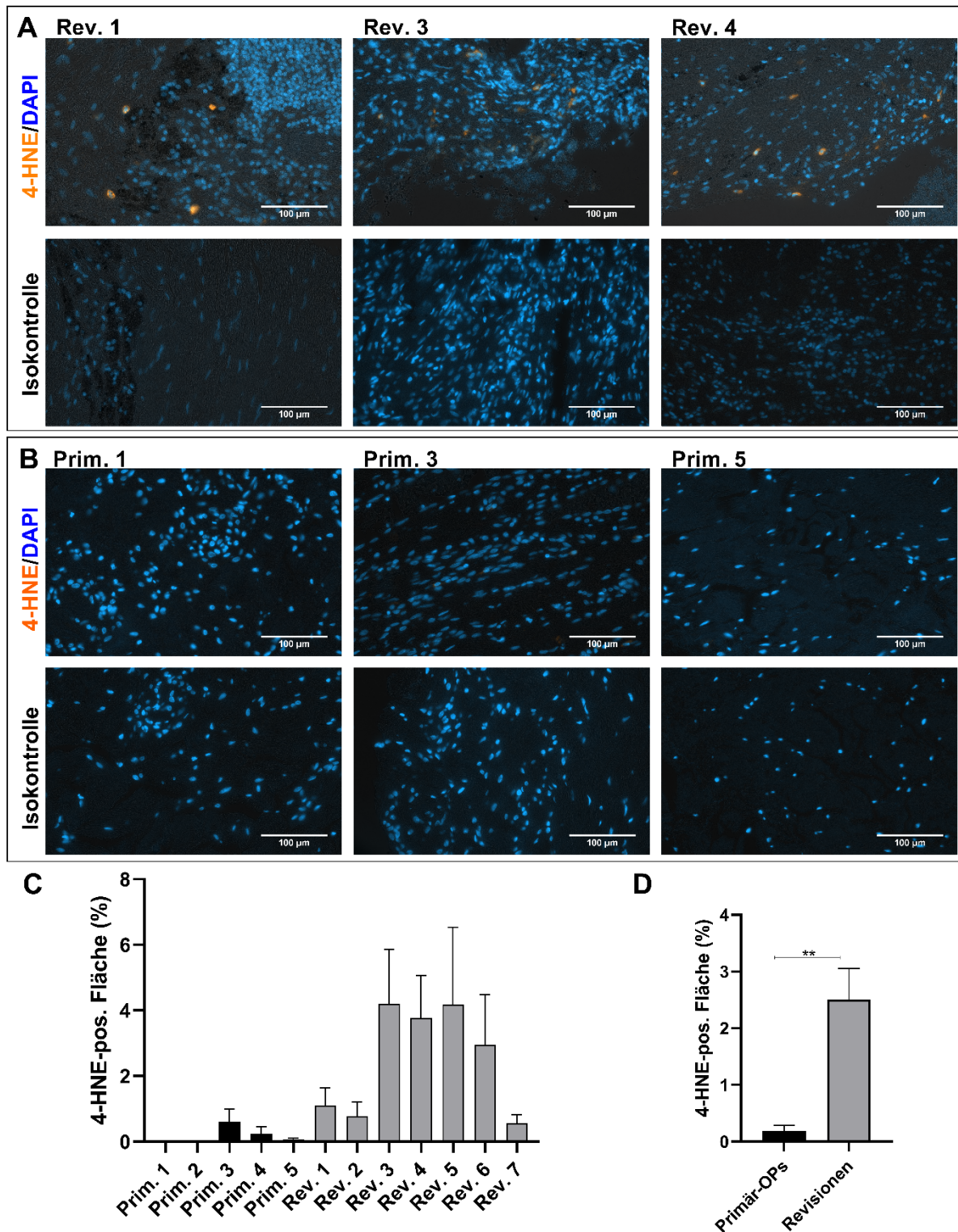


Abbildung 3: 4-HNE-Färbung von Gewebe der Gelenkkapsel von Revisionsoperationen von MoM-Hüft-TEPs (A); und von Primärimplantationen (B) (orange: 4-HNE, blau: DAPI, 400x Vergrößerung); C) 4-HNE-pos. Fläche der einzelnen Gewebeproben (Mittelwerte  $\pm$  SEM, 3 Werte pro Probe); D) Ergebnisse des ungepaarten t-Tests für die Mittelwerte der 4-HNE-pos. Fläche von Primär- und Revisionseingriffen (Mittelwert  $\pm$  SEM). \*\*entspricht  $p \leq 0,01$

Da oxidativer Stress die Basis für die Aktivierung des Inflammasoms durch metallische Abriebpartikel sein könnte, habe ich zunächst die Lipidperoxidation mittels 4-HNE Färbung im Gewebe von fünf Patienten mit primären TEP-Implantationen mit Gewebeproben von sieben Patienten mit Revisionen von MoM-Hüft-TEPs aufgrund von aseptischen Prothesenlockerungen verglichen. Von jeder Patientenprobe wurden drei Bilder aufgenommen und analysiert. In Abbildung 3 kann man erkennen, dass in den Geweben von MoM-Revisionseingriffen deutlich mehr 4-HNE-positive Zellen zu sehen sind als bei den Proben der Primäreingriffe. In den Aufnahmen der Revisionsproben ist zudem der Metallabrieb in der Hellfeld-Aufnahme zu sehen.

Der Mittelwert der 4-HNE-positiven Fläche war bei den Geweben der Revisionseingriffe signifikant höher als bei den Proben von Primärimplantationen (Primäreingriffe: 0,19 %, Revisionseingriffe: 2,51 %,  $p = 0,0012$ ). Der Unterschied zwischen den Mittelwerten betrug  $2,32 \pm 0,66$  %. Der niedrigste Mittelwert der 4-HNE-positiven Fläche bei den Revisionsproben lag bei  $0,56 \pm 0,26$  % (Rev. 7) und der höchste bei  $4,21 \pm 1,65$  % (Rev. 3). Bei den Primäreingriffen lag der niedrigste Mittelwert der mit dem 4-HNE-Antikörper angefärbten Fläche bei  $0,0024 \pm 0,0018$  % (Prim. 1) und das Maximum bei  $0,61 \pm 0,38$  % (Prim. 3).

### **3.2 Charakterisierung der eingesetzten Partikel**

Die Partikel wurden auf ihre chemische Zusammensetzung und Morphologie im REM untersucht. Die Übersichtsaufnahmen zeigen, dass die Partikel von beiden Legierungen eine große Diversität in ihren Formen und Größen aufweisen. Eine Messung einzelner Partikelgrößen ergab Größen von ca. 50 nm bis 15  $\mu$ m. In den Aufnahmen mit 5000-facher Vergrößerung zeigt sich eine Agglomeration der Partikel. Beide Partikelarten haben eine unregelmäßige Form und eine überwiegend raue Oberfläche. Die EDS-Spektren der Partikel zeigen, dass nur Bestandteile der jeweiligen Legierung enthalten sind. Die Analyse der Partikelzusammensetzung zeigt bei beiden Legierungen, dass die Verteilungen der Elemente mit kleineren Abweichungen mit den Anforderungen der ISO-Normen (ISO 5832-2, 5832-6) übereinstimmen.



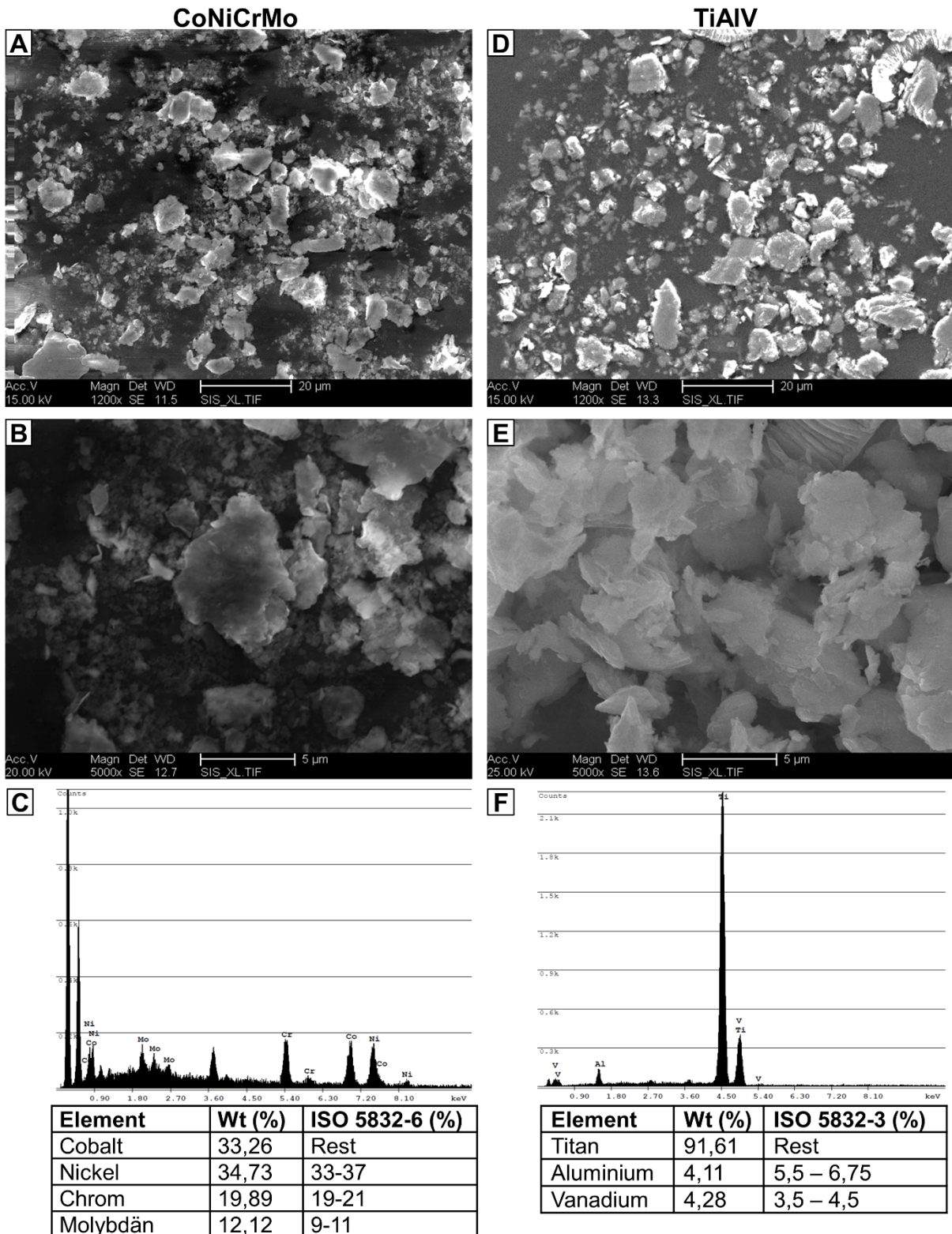


Abbildung 4: REM-Aufnahmen und EDS-Analysen der CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel. A) REM-Aufnahme der CoNiCrMo-Partikel bei 1200x Vergrößerung. B) REM-Aufnahme der CoNiCrMo-Partikel bei 5000x Vergrößerung. C) EDS-Spektrum der analysierten CoNiCrMo-Partikel und Vergleich mit der ISO 5832-6. D) REM-Aufnahme der TiAlV-Partikel bei 1200x Vergrößerung. E) REM-Aufnahme der TiAlV-Partikel bei 5000x Vergrößerung. F) EDS-Spektrum der analysierten TiAlV-Partikel und Vergleich mit der ISO 5832-3. (156, 157)

Bei der Messung im Mastersizer 3000E wurde die Größenverteilung der Partikel mittels Laserbeugung bestimmt. Die Auswertung basiert auf dem Anteil der Partikel der jeweiligen Größenklasse an dem Gesamtvolumen der gemessenen Partikel. Es war ein Unterschied in der Größenverteilung zwischen den CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln erkennbar. Bei der CoNiCrMo-Partikellösung war der Volumenanteil von Partikeln mit einer Größe  $> 100 \mu\text{m}$  deutlich größer als in der TiAlV-Partikellösung. In beiden Lösungen machen die Partikel mit einer Größe von ca.  $10 \mu\text{m}$  den größten Teil des Volumens aus. Im Größenbereich  $< 10 \mu\text{m}$  weisen beide Partikelarten eine nahezu identische Größenverteilung auf.

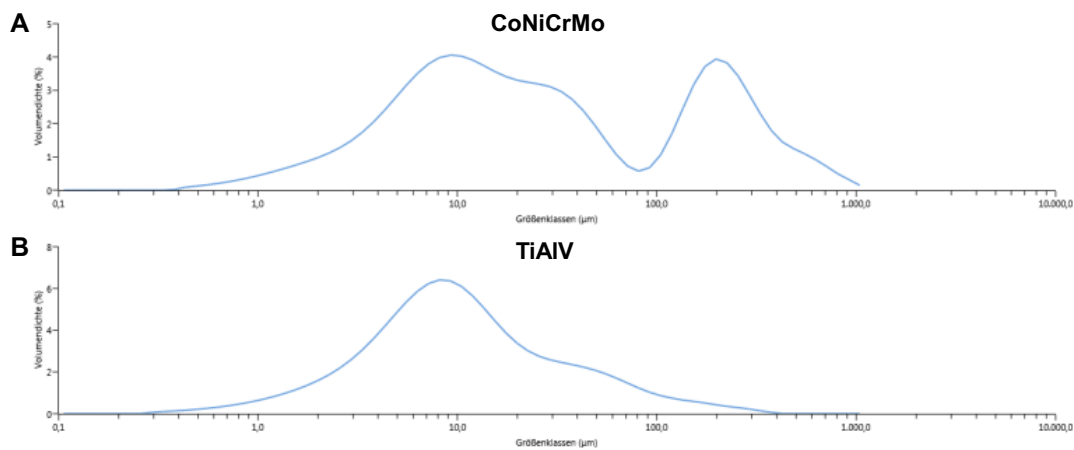


Abbildung 5: Größenverteilung der CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel gemessen mit dem Mastersizer 3000E. A) Größenverteilung der CoNiCrMo-Partikel. B) Größenverteilung der TiAlV-Partikel.

Die Größenanalyse der Partikel im Zetasizer Nano ZS erfolgte mittels dynamischer Lichtstreuung und ist ebenfalls volumenbasiert. Die Messung fand im Ultraschallbad statt. Die Analyse ergab deutlich kleinere Werte für die Partikelgrößen als die Messung im Mastersizer 3000E. Die Auswertung zeigte bei den CoNiCrMo-Partikeln einen Peak der volumenbasierten Größenverteilung bei einer Partikelgröße von  $675 \pm 153,7 \text{ nm}$ . Der Mittelwert der Partikeldurchmesser lag bei  $1,17 \mu\text{m}$ . Bei den TiAlV-Partikeln gab es einen kleineren Peak bei einem Partikeldurchmesser von  $255,3 \pm 47,88 \text{ nm}$  und einen zweiten bei  $919,8 \pm 240,8 \text{ nm}$ . Der mittlere Durchmesser der TiAlV-Partikel betrug  $909,4 \text{ nm}$ . Der PDI (polydispersity index) war in beiden Proben  $> 0,4$  (CoNiCrMo:  $0,574$ ; TiAlV:  $0,695$ ), was auf eine breite Verteilung der Partikelgrößen hinweist.

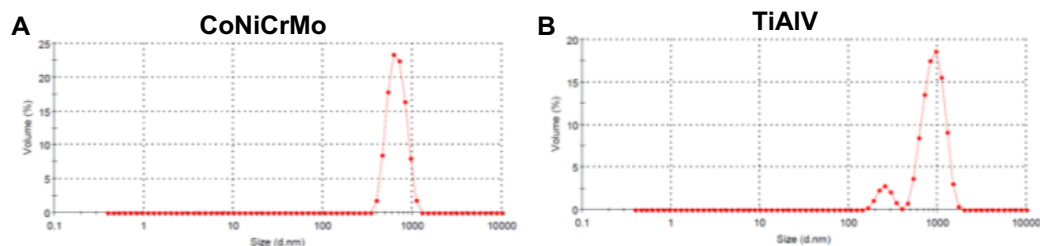


Abbildung 6: Analyse der Größenverteilung der CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel im Zetasizer Nano ZS. Der Anteil der Partikel der jeweiligen Größenklasse am Gesamtvolumen der Probe ist auf der y-Achse dargestellt. A) Größenverteilung der CoNiCrMo-Partikel. B) Größenverteilung der TiAlV-Partikel.

### 3.3 Geringer Einfluss der verwendeten Partikel auf die Zellviabilität

Mit dem WST-1-Assay wurde die metabolische Aktivität der Zellen nach der Inkubation mit den getesteten Partikelmengen untersucht, um einen Eindruck über die Zellviabilität zu bekommen. Insgesamt zeigte sich, dass die Zellviabilität der untersuchten Zellen durch die Stimulation mit den getesteten Partikelmengen über 24 h nicht oder nur geringfügig reduziert wurde.

Abbildung 7 zeigt die Zellviabilität der MM6-Zellen nach der Stimulation mit den CoNiCrMo- bzw. TiAlV-Partikeln für 24 h und 48 h. Es zeigte sich eine leichte Reduktion der Zellviabilität nach der Inkubation mit CoNiCrMo-Partikeln für 24 h in allen getesteten Mengen. Nach der Stimulation mit  $10^5$  CoNiCrMo-Partikeln war die Zellviabilität um  $3,31 \pm 0,25$  % ( $p = 0,0169$ ) reduziert. Die stärkste Reduktion zeigte sich nach der Stimulation mit  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln ( $5,87 \pm 0,53$  %,  $p = 0,0005$ ), nach der Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln zeigte sich ein Abfall um  $4,28 \pm 1,1$  % ( $p = 0,004$ ). Abbildung 7B zeigt, dass die Stimulation der MM6-Zellen mit TiAlV-Partikeln für 24 h nicht zu einer signifikanten Veränderung der Zellviabilität führte.

In Abbildung 7C sind die Ergebnisse nach einer Stimulation der MM6-Zellen mit CoNiCrMo-Partikeln für 48 h gezeigt. Es zeigte sich eine dosisabhängige signifikante Reduktion der Zellviabilität nach der Stimulation mit allen getesteten Partikelmengen ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $4,22 \pm 0,53$  %,  $p = 0,0019$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $11,72 \pm 0,61$  %,  $p < 0,0001$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $13,17 \pm 0,79$  %,  $p < 0,0001$ ). Bei der Inkubation der MM6-Zellen mit TiAlV-Partikeln für 48 h zeigte sich bei einer Partikelmenge von  $10^6$  Partikeln eine Reduktion der Zellviabilität um  $5,44 \pm 1,45$  % ( $p = 0,007$ ). Die anderen getesteten Partikelmengen der TiAlV-Partikel hatten keinen Einfluss auf die Viabilität der MM6-Zellen.

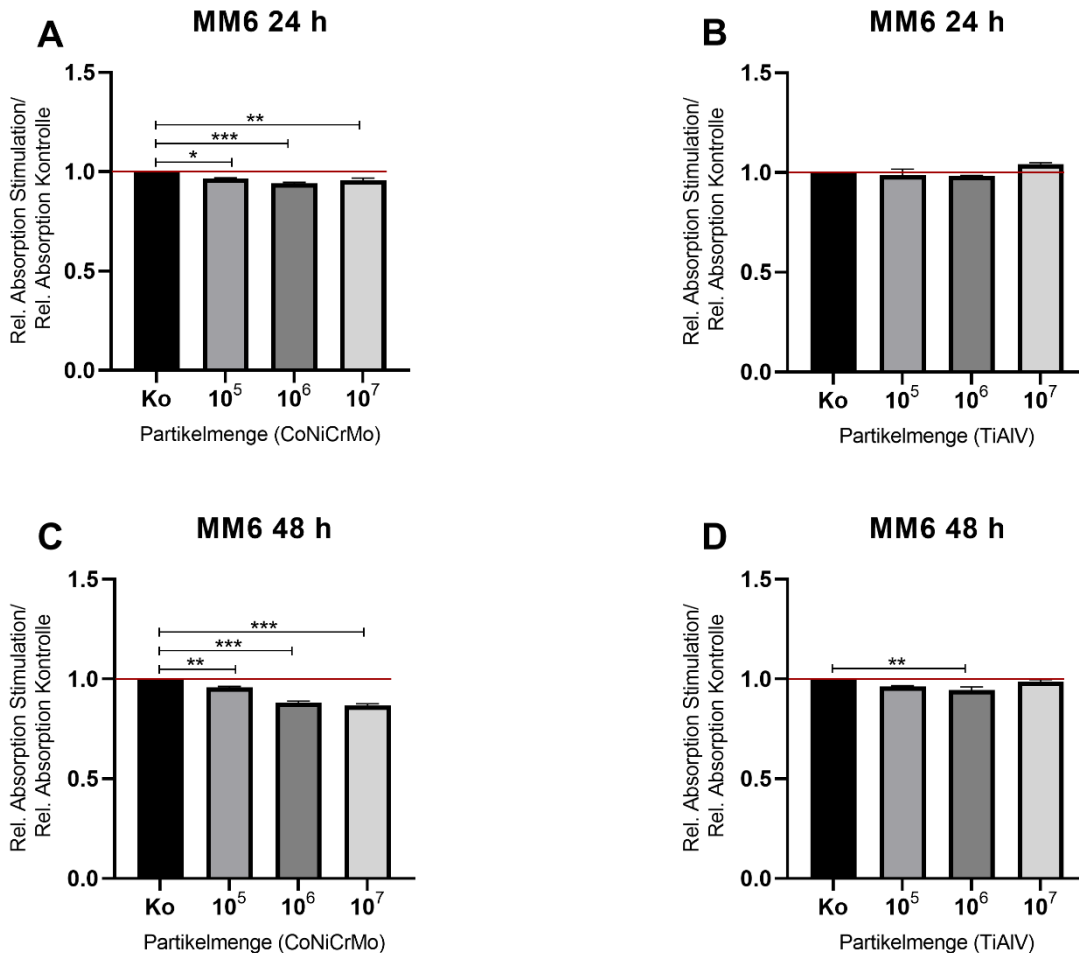


Abbildung 7: Zellviabilität der MM6-Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln. Die Partikelmengen von  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  Partikeln beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurden an die Oberflächen der verwendeten Wells angepasst. Die Zellviabilität wurde zur unbehandelten Kontrolle normiert. A) 24 h Inkubation mit CoNiCrMo-Partikeln führt zu einer leichten Reduktion der Viabilität von MM6-Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,967 \pm 0,003$ ,  $p = 0,017$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,941 \pm 0,005$ ,  $p = 0,0005$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,957 \pm 0,011$ ,  $p = 0,004$ ). B) Die Inkubation mit TiAlV-Partikeln für 24 h hat keinen Einfluss auf die Viabilität von MM6-Zellen. ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $0,987 \pm 0,030$ ,  $p = 0,872$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,984 \pm 0,002$ ,  $p = 0,803$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $1,043 \pm 0,006$ ,  $p = 0,188$ ). C) 48 h Inkubation mit CoNiCrMo-Partikeln führt zu einer Reduktion der Viabilität der MM6-Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,958 \pm 0,005$ ,  $p = 0,002$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,883 \pm 0,006$ ,  $p < 0,0001$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,868 \pm 0,008$ ,  $p < 0,0001$ ). D) Die Inkubation von MM6-Zellen mit  $10^6$  TiAlV-Partikeln für 48 h führt zu einer Reduktion der Zellviabilität ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $0,963 \pm 0,004$ ,  $p = 0,05$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,946 \pm 0,014$ ,  $p = 0,007$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $0,986 \pm 0,01$ ,  $p = 0,598$ ). Die statische Analyse wurde mit einer ANOVA und einem Dunnett's multiple comparisons-post-hoc Test durchgeführt.  $n = 3$ . \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

Der Einfluss der Partikelstimulation auf die Viabilität der MG63-Zellen ist in Abbildung 8 gezeigt. Die Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln für 24 h führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der Viabilität der MG63-Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Inkubation der MG63-Zellen mit  $10^5$  und  $10^6$  TiAlV-Partikeln für 24 h führte zu einer Abnahme der Zellviabilität ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $4,31 \pm 0,85 \%$ ,  $p = 0,008$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $4,05 \pm 0,80 \%$ ,  $p = 0,012$ ). Nach der Stimulation der MG63-Zellen mit  $10^7$  TiAlV-Partikel für 24 h zeigte sich keine Veränderung der Zellviabilität. Die Inkubation der MG63-Zellen mit  $10^5$  und  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln für 48 h hatte gleichfalls keinen Einfluss auf die Zellviabilität.

Nach der Stimulation der MG63-Zellen mit  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln für 48 h zeigte sich im Vergleich zu unstimulierten Kontrolle eine erhöhte Zellviabilität ( $6,6 \pm 0,90 \%$ ,  $p < 0,0001$ ). Die Funktionsfähigkeit der MG63-Zellen wurde durch die Stimulation mit TiAlV-Partikeln in den untersuchten Dosierungen für 48 h nicht beeinflusst.

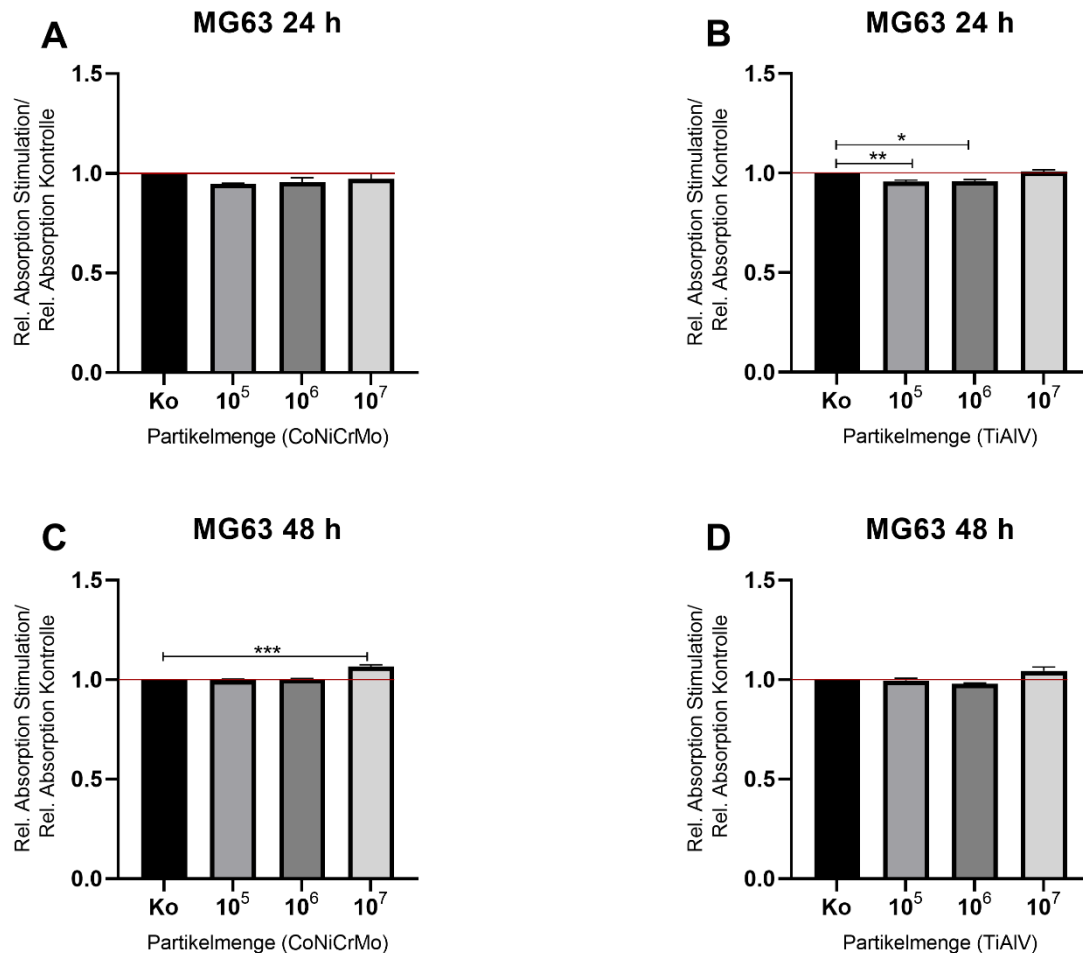


Abbildung 8: Zellviabilität der MG63-Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln. Die Partikelmengen von  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  Partikeln beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurden an die Oberflächen der verwendeten Wells angepasst. Die Zellviabilität wurde zur unbehandelten Kontrolle normiert. A) Die Inkubation der MG63-Zellen mit CoNiCrMo-Partikeln für 24 h beeinflusst die Zellviabilität nicht ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,95 \pm 0,0024$ ,  $p = 0,167$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,96 \pm 0,022$ ,  $p = 0,263$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,97 \pm 0,027$ ,  $p = 0,58$ ). B) Die Inkubation der MG63-Zellen mit TiAlV-Partikeln für 24 h führt zum Teil zu einer Reduktion der Zellviabilität ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $0,96 \pm 0,008$ ,  $p = 0,008$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,96 \pm 0,008$ ,  $p = 0,012$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $1,01 \pm 0,009$ ,  $p = 0,76$ ). C) Die Inkubation der MG63-Zellen mit CoNiCrMo-Partikeln für 48 h führt nicht zu einer Reduktion der Zellviabilität ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,99 \pm 0,004$ ,  $p = 0,99$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,003 \pm 0,003$ ,  $p = 0,97$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,066 \pm 0,009$ ,  $p < 0,0001$ ). D) 48 h Inkubation von MG63-Zellen mit TiAlV-Partikeln hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $0,99 \pm 0,012$ ,  $p = 0,98$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,98 \pm 0,006$ ,  $p = 0,45$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $1,04 \pm 0,019$ ,  $p = 0,072$ ). Die statistische Analyse wurde mit einer ANOVA und einem Dunnett's multiple comparisons-post-hoc Test durchgeführt.  $n = 3$ . \* entspricht  $p \leq 0,05$ , \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$ .

In Abbildung 9 ist der Einfluss der Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 und 48 h auf die Viabilität der Jurkat-Zellen dargestellt. Bei den Jurkat-Zellen zeigte sich nach der Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln für 24 und 48 h keine signifikante Veränderung der Zellviabilität. Die Stimulation mit  $10^5$  und  $10^6$  TiAlV-Partikeln für 24 und 48 h hatte ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die Viabilität der Jurkat-Zellen. Bei der Inkubation der Jurkat-Zellen mit  $10^7$  TiAlV-Partikeln war ein Anstieg der Formazanproduktion im Vergleich zur Kontrolle um  $3,8 \pm 2,12$  % ( $p = 0,35$ ) nach 24 h Stimulation und  $2,4 \pm 0,42$  % ( $p = 0,039$ ) nach 48 h Stimulation feststellbar.

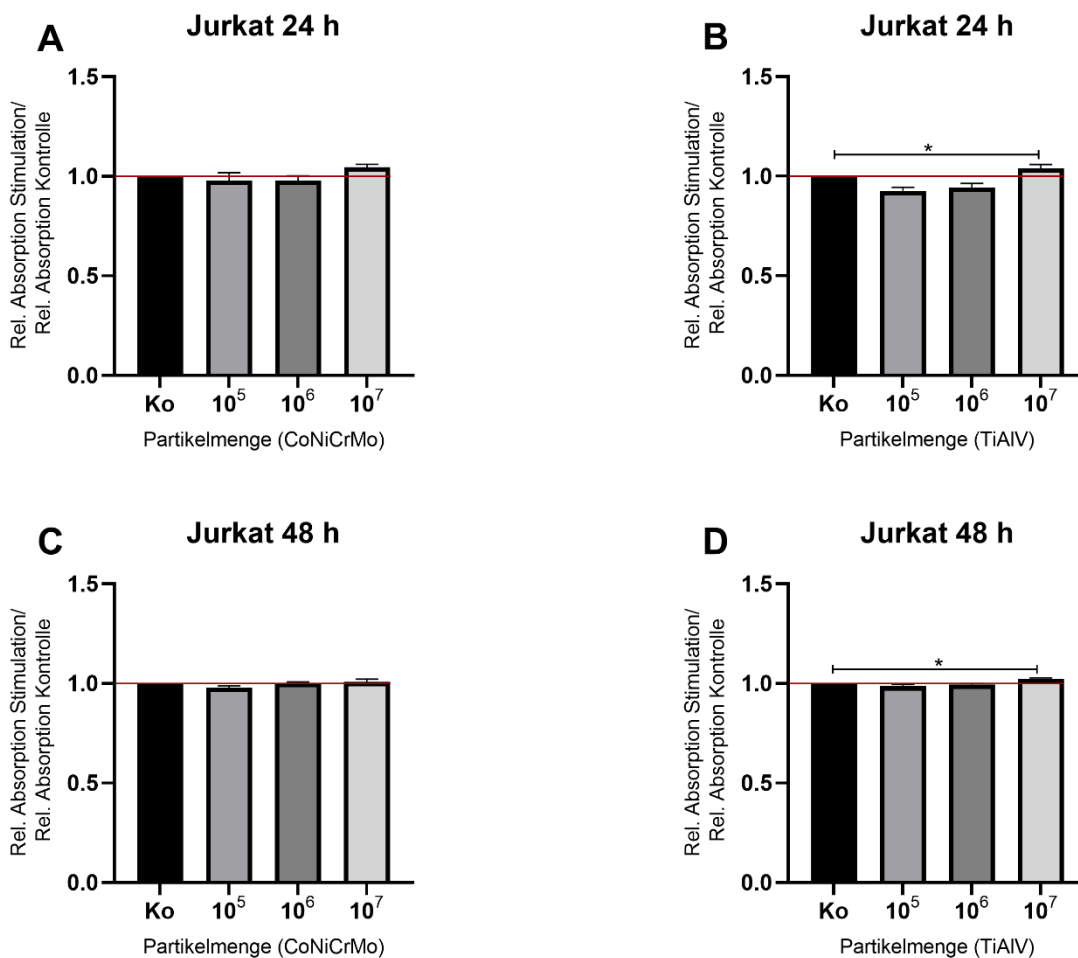


Abbildung 9: Zellviabilität der Jurkat-Zellen nach 24 h und 48 h Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln. Die Partikelmengen von  $10^5$ ,  $10^6$  und  $10^7$  Partikeln beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurden an die Oberflächen der verwendeten Wells angepasst. Die Zellviabilität wurde zur unbehandelten Kontrolle normiert. A) Die Inkubation der Jurkat-Zellen mit CoNiCrMo-Partikeln für 24 h beeinflusst die Zellviabilität nicht ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,98 \pm 0,039$ ,  $p = 0,88$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,98 \pm 0,026$ ,  $p = 0,86$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,05 \pm 0,015$ ,  $p = 0,46$ ). B) Inkubation mit TiAlV-Partikeln für 24 h reduziert die Zellviabilität der Jurkat-Zellen nicht ( $10^5$  TiAlV Partikel:  $0,93 \pm 0,018$ ,  $p = 0,044$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,94 \pm 0,021$ ,  $p = 0,12$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $1,04 \pm 0,021$ ,  $p = 0,35$ ). C) Die Inkubation der Jurkat-Zellen mit CoNiCrMo-Partikeln für 48 h hat keinen Einfluss auf die Zellviabilität ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,98 \pm 0,009$ ,  $p = 0,26$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,003 \pm 0,005$ ,  $p = 0,86$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,05 \pm 0,015$ ,  $p = 0,46$ ). D) Die Inkubation von Jurkat-Zellen mit TiAlV-Partikeln für 48 h führt nicht zu einer Reduktion der Zellviabilität ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $0,99 \pm 0,009$ ,  $p = 0,297$ ;  $10^6$  TiAlV Partikel:  $0,996 \pm 0,005$ ,  $p = 0,915$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $1,024 \pm 0,004$ ,  $p = 0,039$ ). Die statistische Analyse wurde mit einer ANOVA und einem Dunnett's multiple comparisons-post-hoc Test durchgeführt.  $n = 3$ . \* entspricht  $p \leq 0,05$

### 3.4 Unterschiede in der Partikelaufnahme zwischen den getesteten Zelllinien

Mit der Phalloidin-Red-Färbung wurde das Zytoskelett der Zellen angefärbt, um die Aufnahme der Metallpartikel zu visualisieren. In den Abbildungen 10 bis 12 sind repräsentative Beispiele der Phalloidin-Red-Färbungen der getesteten Zelllinien nach Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h gezeigt. Die Phalloidin-Red-Färbung zeigt, dass alle getesteten Zelllinien in der Lage waren CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel aufzunehmen. In den untersuchten Zelllinien gibt es keinen Unterschied bei der Aufnahme zwischen den beiden getesteten Partikelarten. Allerdings scheint es zellartenspezifische Unterschiede bei der Menge der aufgenommenen Partikel zu geben.

Abbildung 10 zeigt die Aufnahme der CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel durch die MM6-Zellen nach 24 h Inkubationszeit. Man erkennt insbesondere in der Detailaufnahme, dass bei beiden Partikelarten Partikel innerhalb des Zytoskeletts sichtbar sind.

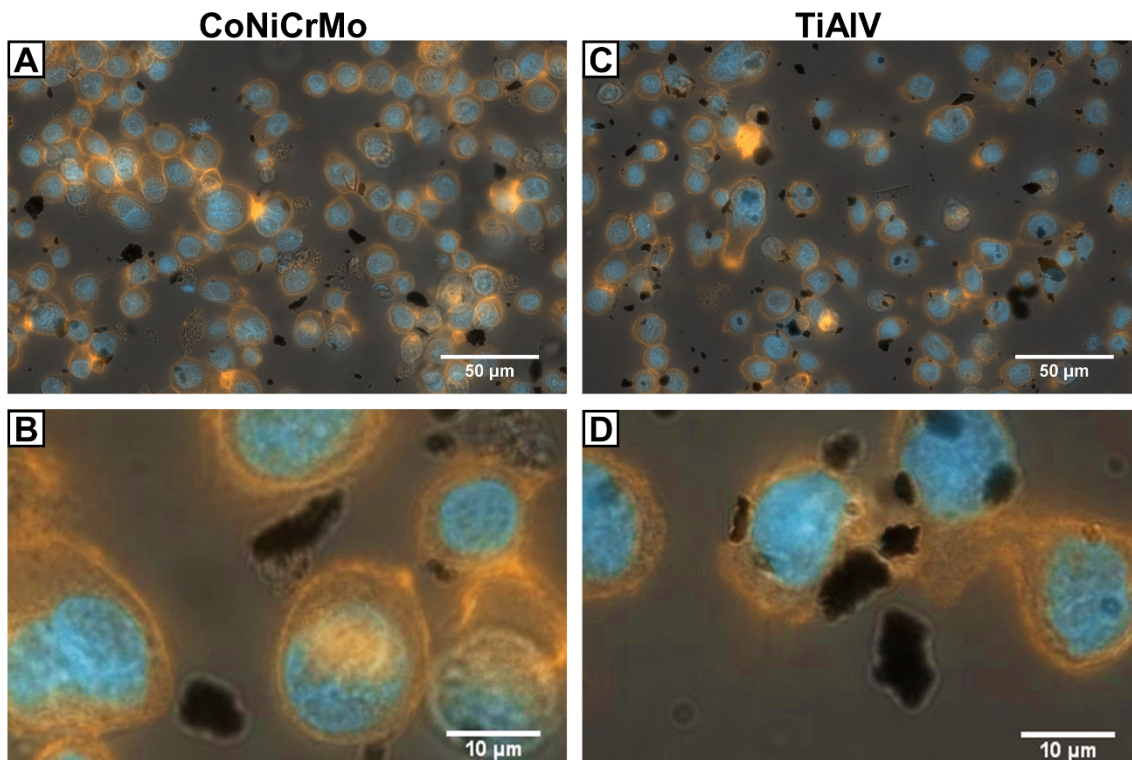


Abbildung 10: Partikelaufnahme in MM6-Zellen. Exemplarische Phalloidin-Red-Färbungen der MM6-Zellen nach Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h. Die Partikelmenge von  $10^7$  Partikeln bezieht sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurde an die Oberflächen der verwendeten Wells angepasst. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt, das Zytoskelett der Zellen ist mit Phalloidin-Red (orange/rot) angefärbt, durch die Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme sind die Partikel zu sehen. Die Bilder wurden mit 630x Vergrößerung aufgenommen, für jedes Bild ist eine Übersicht und ein Detailausschnitt gezeigt. A/B) Phalloidin-Red-Färbungen der MM6-Zellen nach Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln. C/D) Phalloidin-Red-Färbungen der MM6-Zellen nach Stimulation mit TiAlV-Partikeln.

In Abbildung 11 ist die Partikelaufnahme durch die MG63-Zellen dargestellt. Beide Partikelarten werden von den Zellen gleich gut aufgenommen und befinden sich insbesondere in der Nähe des Zellkerns. Die MG63-Zellen scheinen im Vergleich zu den anderen beiden getesteten Zelllinien mehr Partikel aufzunehmen.

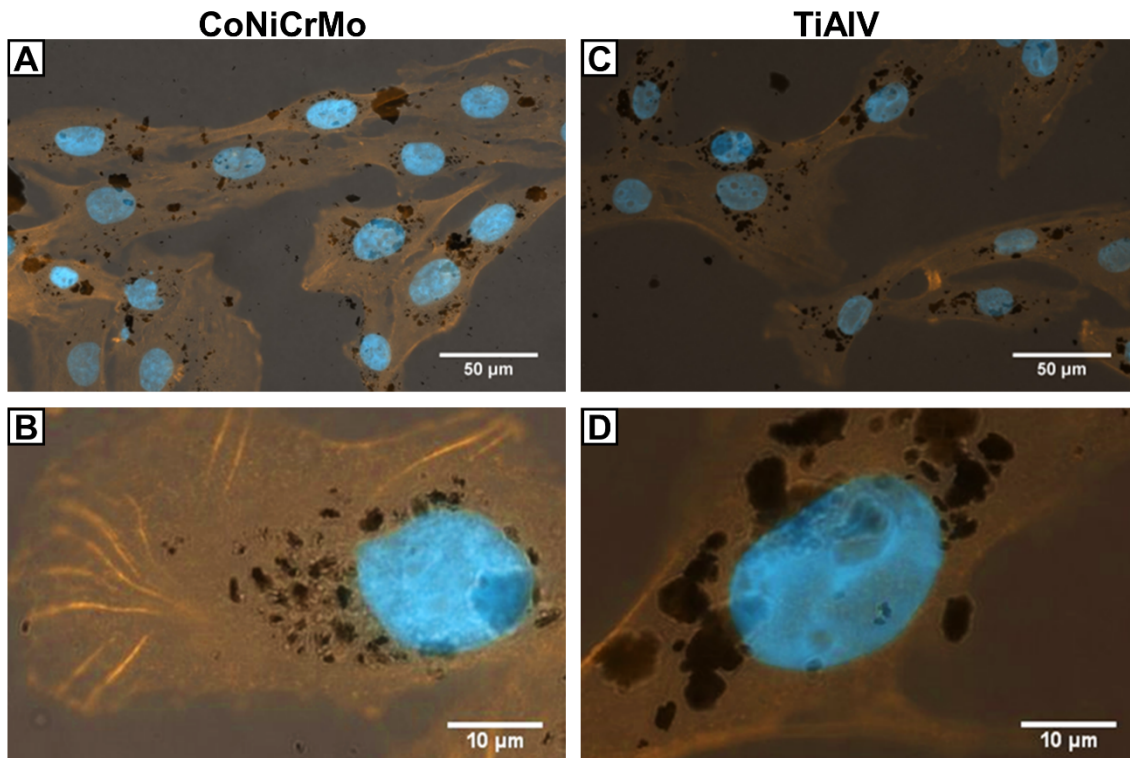


Abbildung 11: Partikelaufnahme in MG63-Zellen. Exemplarische Phalloidin-Red-Färbungen der MG63-Zellen nach Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h. Die Partikelmenge von  $10^7$  Partikeln bezieht sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurde an die Oberflächen der verwendeten Wells angepasst. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt, das Zytoskelett der Zellen ist mit Phalloidin-Red (orange/rot) angefärbt, durch die Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme sind die Partikel zu sehen. Die Bilder wurden mit 630x Vergrößerung aufgenommen, für jedes Bild ist eine Übersicht und ein Detailausschnitt gezeigt. A/B) Phalloidin-Red-Färbungen der MG63-Zellen nach Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln. C/D) Phalloidin-Red-Färbungen der MG63-Zellen nach Stimulation mit TiAlV-Partikeln.



Die Aufnahme der Metallpartikel durch die Jurkat-Zellen ist in Abbildung 12 gezeigt. Es ist zu erkennen, dass die Zellen ebenfalls in der Lage sind, beide Partikelarten aufzunehmen, es besteht hierbei kein Unterschied zwischen den beiden getesteten Legierungen. Allerdings ist die Menge der intrazellulären Partikel bei den Jurkat-Zellen geringer als bei den anderen beiden Partikelarten.

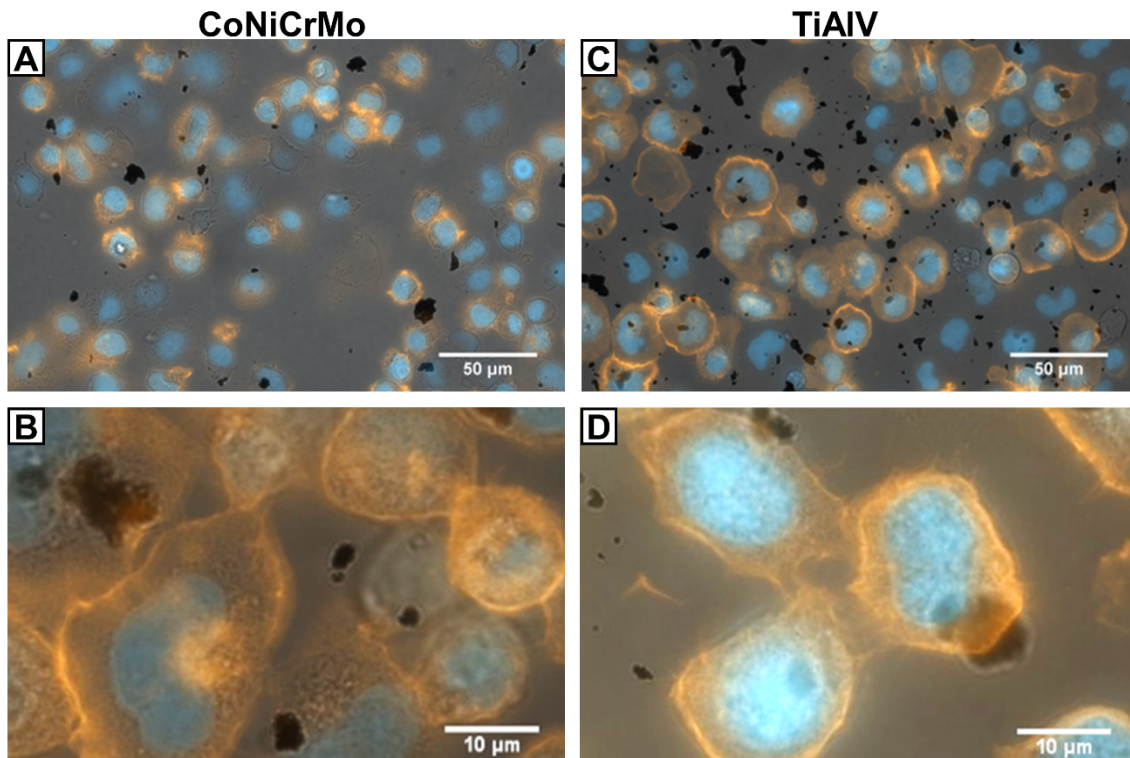


Abbildung 12: Partikelaufnahme in Jurkat-Zellen. Exemplarische Phalloidin-Red-Färbungen der Jurkat-Zellen nach Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h. Die Partikelmenge von  $10^7$  Partikeln bezieht sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurde an die Oberflächen der verwendeten Wells angepasst. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) angefärbt, das Zytoskelett der Zellen ist mit Phalloidin-Red (orange/rot) angefärbt, durch die Überlagerung mit der Hellfeld-Aufnahme sind die Partikel zu sehen. Die Bilder wurden mit 630x Vergrößerung aufgenommen, für jedes Bild ist eine Übersicht und ein Detailausschnitt gezeigt. A/B) Phalloidin-Red-Färbungen der Jurkat-Zellen nach Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln. C/D) Phalloidin-Red-Färbungen der Jurkat-Zellen nach Stimulation mit TiAlV-Partikeln.

### 3.5 Unterschiedliche Effekte der CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel auf die Genexpression in den getesteten Zelllinien

Um eine potentielle Aktivierung des Inflammasoms zu untersuchen, habe ich in der qRT-PCR die Expression von NLRP3, Caspase-1 und IL-1 $\beta$  relativ zu GAPDH in MM6-, MG63- und Jurkat-Zellen nach der Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h gemessen. Die Expression in den stimulierten Zellen wurde relativ zur unstimulierten Kontrolle betrachtet.

In den MM6-Zellen war ein Anstieg der NLRP3-Expression nach der Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln zu beobachten. Nach der Stimulation mit  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln war die NLRP3-Expression in MM6-Zellen signifikant erhöht ( $1,74 \pm 0,29$ ,  $p = 0,0073$ ). Die Stimulation mit den anderen getesteten Mengen von CoNiCrMo-Partikeln führte ebenfalls zu einer leichten Zunahme der NLRP3-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die Caspase-1-Expression der MM6-Zellen war nach der Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln nicht signifikant verändert, es zeigte sich aber ein konzentrationsabhängiger Anstieg. Die IL-1 $\beta$ -Expression der MM6-Zellen war nach der Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln erhöht. Die anderen Mengen von CoNiCrMo-Partikeln hatten keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -Expression in MM6-Zellen.

Die NLRP3-Expression war in MM6-Zellen nach der Stimulation mit TiAlV-Partikeln erhöht. Nach der Stimulation der MM6-Zellen mit  $10^5$  TiAlV-Partikeln kam es zu einer Verdoppelung der NLRP3-Expression ( $2,10 \pm 0,43$ ,  $p = 0,0085$ ) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Caspase-1-Expression war nach der Stimulation mit  $10^5$  und  $10^7$  TiAlV-Partikeln in den MM6-Zellen etwa um das 1,5-fache erhöht, während die Stimulation mit  $10^6$  TiAlV-Partikeln keinen Effekt hatte. Insgesamt war die Expression von Caspase-1 in den MM6-Zellen nach der Stimulation mit TiAlV-Partikeln aber nicht signifikant verändert. Die IL-1 $\beta$ -Expression der MM6-Zellen war nach der Stimulation mit  $10^7$  TiAlV-Partikeln erhöht ( $1,52 \pm 0,36$ ,  $p = 0,13$ ). Die anderen Partikelmengen hatten keinen Einfluss auf die IL-1 $\beta$ -Expression in MM6-Zellen.

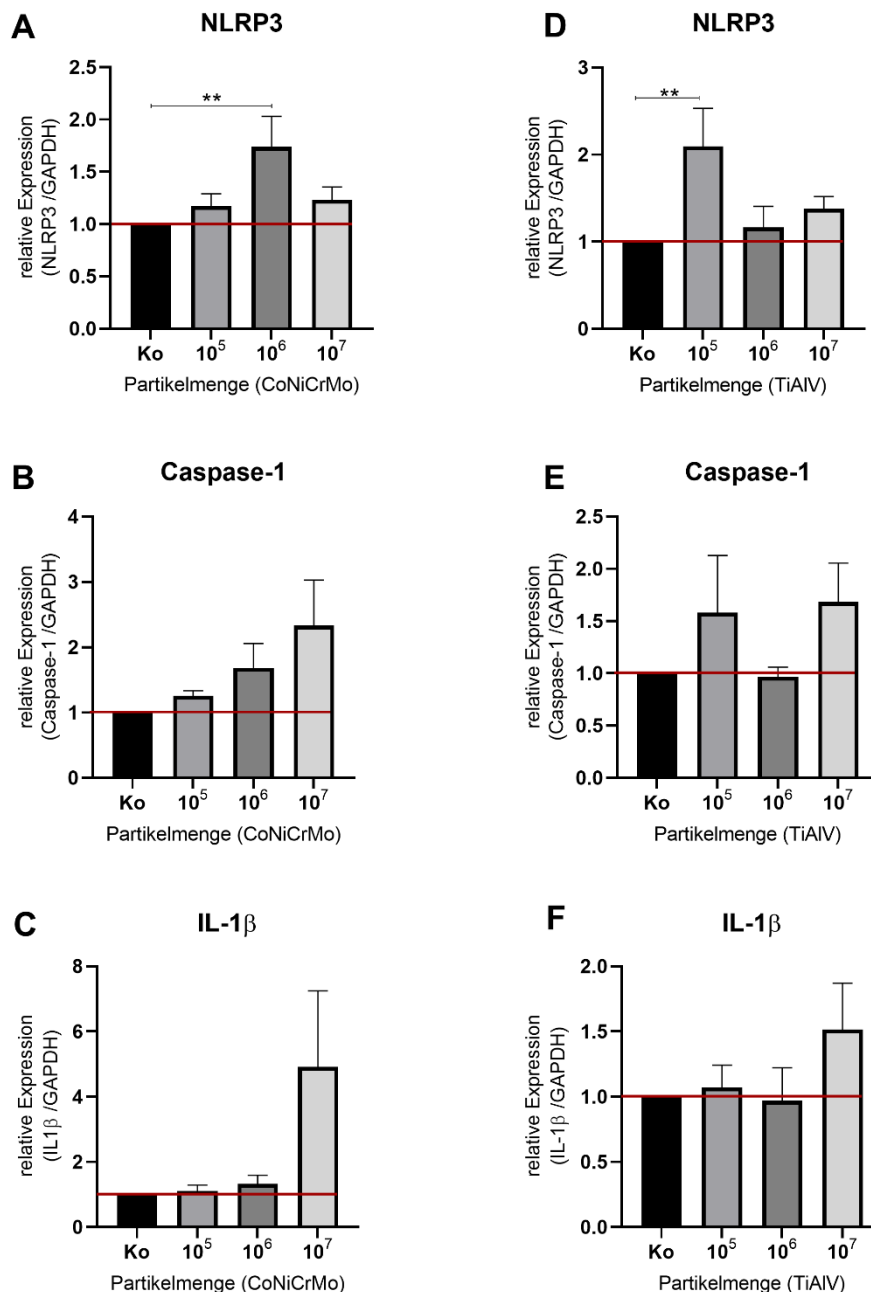


Abbildung 13: Einfluss der Partikelstimulation auf die Expression von NLRP3, Caspase-1 und IL-1 $\beta$  in MM6-Zellen. Die Expression der untersuchten Gene wurde relativ zu GAPDH ausgewertet und auf die unbehandelten Kontrollen normiert. Die Dosierungen vom  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  Partikeln pro Well beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurden auf die Oberfläche der verwendeten Wells angepasst. A) Die Inkubation mit CoNiCrMo-Partikeln führt zu einer gesteigerten NLRP3-Expression in MM6-Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,17 \pm 0,12$ ,  $p = 0,48$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,74 \pm 0,29$ ,  $p = 0,0073$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,23 \pm 0,12$ ,  $p = 0,37$ ). B) Die Inkubation mit CoNiCrMo-Partikeln führt nicht zu einem signifikanten Anstieg der Caspase-1 Expression in MM6 Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,26 \pm 0,08$ ,  $p = 0,65$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,68 \pm 0,38$ ,  $p = 0,24$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $2,33 \pm 0,70$ ,  $p = 0,03$ ). C) Die Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der IL-1 $\beta$ -Expression der MM6-Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,11 \pm 0,18$ ,  $p = 0,95$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,33 \pm 0,26$ ,  $p = 0,85$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $4,92 \pm 2,34$ ,  $p = 0,03$ ). D) Die Inkubation mit TiAlV-Partikeln führt zu einer gesteigerten NLRP3-Expression in MM6-Zellen ( $10^5$  TiAlV Partikel:  $2,10 \pm 0,43$ ,  $p = 0,0085$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $1,16 \pm 0,24$ ,  $p = 0,66$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $1,38 \pm 0,14$ ,  $p = 0,31$ ). E) Die Inkubation der MM6-Zellen mit TiAlV-Partikel verändert die Caspase-1-Expression nicht signifikant ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $1,58 \pm 0,55$ ,  $p = 0,23$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,97 \pm 0,09$ ,  $p = 0,95$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $1,68 \pm 0,37$ ,  $p = 0,17$ ). F) Die Inkubation mit TiAlV-Partikeln führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der IL-1 $\beta$ -Expression in MM6-Zellen ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $1,07 \pm 0,17$ ,  $p = 0,83$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,97 \pm 0,25$ ,  $p = 0,93$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $1,52 \pm 0,36$ ,  $p = 0,13$ ). Die Statistik wurde mit einer ANOVA und einem Fisher's LSD-post-hoc-Test berechnet. Alle Versuche wurden mit  $n = 6$  durchgeführt. \*\* entspricht  $p \leq 0,01$

In den MG63-Zellen zeigten sich keine statistisch signifikanten Veränderungen der Expression von NLRP3, Caspase-1 und IL-1 $\beta$  durch die Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln. Nach der Stimulation mit  $10^5$  und  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln war die NLRP3-Expression in MG63-Zellen in etwa verdoppelt. Nach der Inkubation mit  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln war die Expression von NLRP3 nicht verändert. Die Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln führte zu einer Erhöhung der Caspase-1-Expression, während die anderen Partikelmengen nicht zu einer Steigerung der Caspase-1-Expression führten. Die IL-1 $\beta$ -Expression in MG63-Zellen war nach der Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln erhöht, der Anstieg war nach der Inkubation mit  $10^7$  Partikeln am größten.

Nach der Stimulation mit TiAlV-Partikeln zeigte sich in den MG63-Zellen bei allen untersuchten Genen keine Induktion, sondern eine Reduktion der Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die NLRP3-Expression war nach der Stimulation mit TiAlV-Partikeln insbesondere in den Dosierungen von  $10^5$  und  $10^6$  reduziert. Die Expression von Caspase-1 war nach der Stimulation mit allen getesteten Dosierungen von TiAlV-Partikeln reduziert ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $0,23 \pm 0,07$ ,  $p < 0,0001$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,17 \pm 0,07$ ,  $p < 0,0001$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $0,29 \pm 0,08$ ,  $p < 0,0001$ ). Nach der Stimulation mit TiAlV-Partikeln war die IL-1 $\beta$ -Expression in MG63-Zellen im Vergleich zur Kontrolle bei allen Dosierungen signifikant reduziert ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $0,03 \pm 0,02$ ,  $p = 0,0005$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,3 \pm 0,29$ ,  $p = 0,007$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $0,16 \pm 0,15$ ,  $p = 0,002$ ).

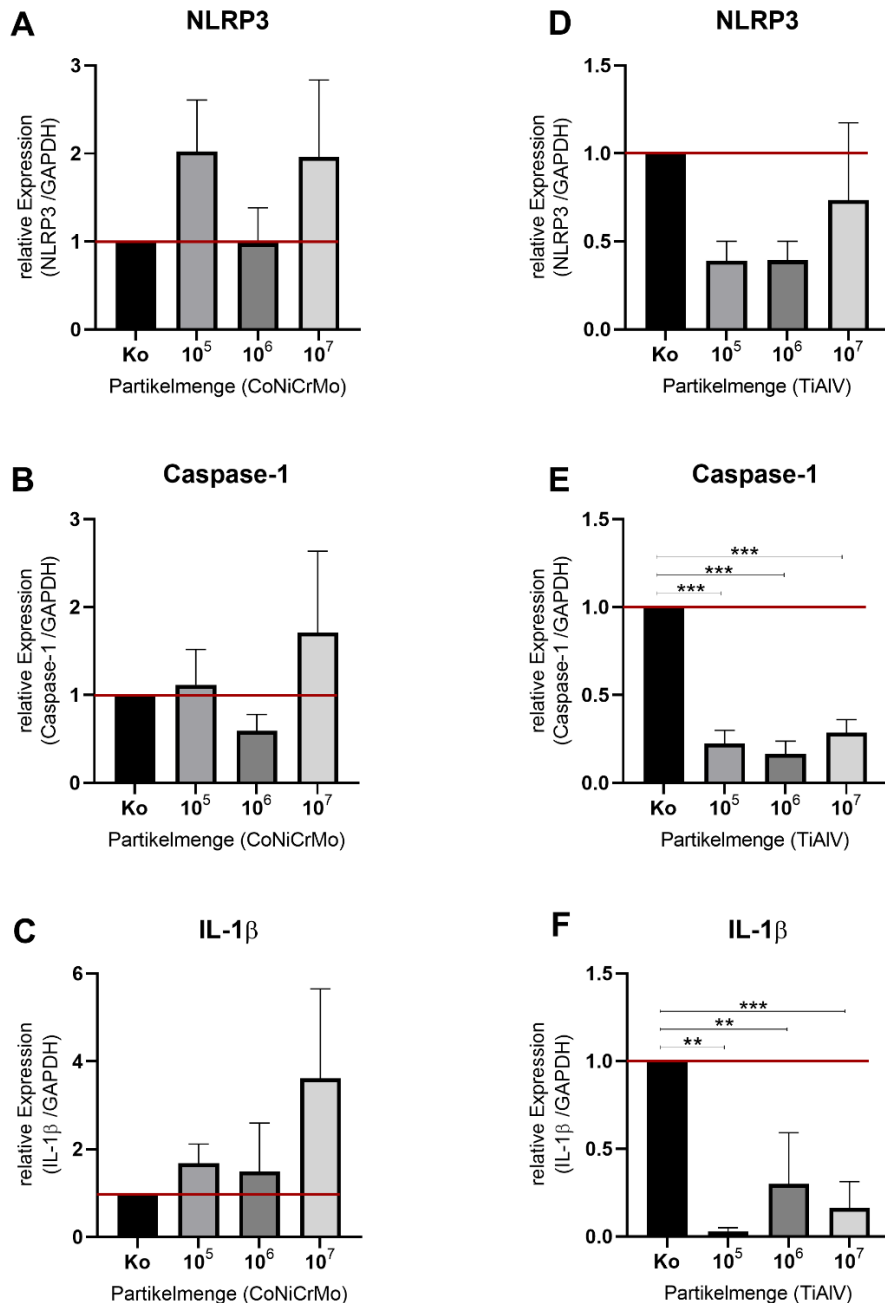


Abbildung 14: Einfluss der Partikelstimulation auf die Expression von NLRP3, Caspase-1 und IL-1 $\beta$  in MG63-Zellen. Die Expression der untersuchten Gene wurde relativ zu GAPDH ausgewertet und auf die unbehandelten Kontrollen normiert. Die Dosierungen von  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  Partikeln pro Well beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurden auf die Oberfläche der verwendeten Wells angepasst. A) Die Stimulation von MG63-Zellen mit CoNiCrMo-Partikeln führt zu einer nicht signifikanten Steigerung der NLRP3-Expression ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $2,03 \pm 0,58$ ,  $p = 0,21$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,98 \pm 0,40$ ,  $p = 0,98$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,96 \pm 0,87$ ,  $p = 0,24$ ). B) Die Inkubation der MG63-Zellen mit CoNiCrMo-Partikeln führt nicht zu einer signifikanten Veränderung der Caspase-1-Expression ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,12 \pm 0,40$ ,  $p = 0,87$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $0,59 \pm 0,18$ ,  $p = 0,58$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,71 \pm 0,93$ ,  $p = 0,34$ ). C) Die Inkubation mit CoNiCrMo-Partikeln führt nicht zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 $\beta$ -Expression in MG63-Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,69 \pm 0,43$ ,  $p = 0,69$ ;  $10^6$  CoNiCrMo-Partikel:  $1,49 \pm 1,11$ ,  $p = 0,77$ ;  $10^7$  CoNiCrMo-Partikel:  $3,61 \pm 2,04$ ,  $p = 0,13$ ). D) Die Inkubation der MG63-Zellen mit TiAlV-Partikeln verändert die NLRP3-Expression nicht ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $0,39 \pm 0,11$ ,  $p = 0,079$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,39 \pm 0,11$ ,  $p = 0,081$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $0,74 \pm 0,44$ ,  $p = 0,43$ ). E) Die Inkubation mit TiAlV-Partikeln führt zu einer im Vergleich zur Kontrolle reduzierten Caspase-1-Expression in MG63-Zellen ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $0,23 \pm 0,07$ ,  $p < 0,0001$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,17 \pm 0,07$ ,  $p < 0,0001$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $0,29 \pm 0,08$ ,  $p < 0,0001$ ). F) Die Inkubation mit TiAlV-Partikeln führt zu einer reduzierten IL-1 $\beta$ -Expression im Vergleich zur Kontrolle in MG63-Zellen ( $10^5$  TiAlV-Partikel:  $0,03 \pm 0,02$ ,  $p = 0,0005$ ;  $10^6$  TiAlV-Partikel:  $0,3 \pm 0,29$ ,  $p = 0,007$ ;  $10^7$  TiAlV-Partikel:  $0,16 \pm 0,15$ ,  $p = 0,002$ ). Die Statistik wurde mit einer ANOVA und einem Fisher's LSD-post-hoc Test berechnet. Alle Versuche wurden mit  $n = 6$  durchgeführt. \*\* entspricht  $p \leq 0,01$ , \*\*\* entspricht  $p \leq 0,001$

In den Jurkat-Zellen zeigte sich keine signifikante Veränderung der Expression der untersuchten Gene durch die Partikelstimulation. Die NLRP3-Expression der Jurkat-Zellen war nach der Stimulation mit  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln leicht erhöht, nach der Stimulation mit den anderen Partikelmengen zeigte sich keine Veränderung der NLRP3-Expression im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Stimulation mit  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln war die Caspase-1-Expression in Jurkat-Zellen ebenfalls leicht erhöht. Die IL-1 $\beta$ -Expression der Jurkat-Zellen war nach der Stimulation mit  $10^5$  CoNiCrMo-Partikeln reduziert und nach der Stimulation mit  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln leicht gesteigert.

Nach der Stimulation mit den getesteten Dosierungen von TiAlV-Partikeln war die NLRP3-Expression in Jurkat-Zellen nicht verändert. Nach der Inkubation mit  $10^5$  TiAlV-Partikeln war die Caspase-1-Expression in den Jurkat-Zellen minimal erhöht. Die Stimulation mit  $10^6$  und  $10^7$  TiAlV-Partikeln führte hingegen zu einer Reduktion der Caspase-1-Expression im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Nach der Inkubation mit  $10^7$  TiAlV-Partikeln war die IL-1 $\beta$ -Expression im Vergleich zur Kontrolle reduziert, während die anderen untersuchten Dosierungen von TiAlV-Partikeln keinen Effekt zeigten.

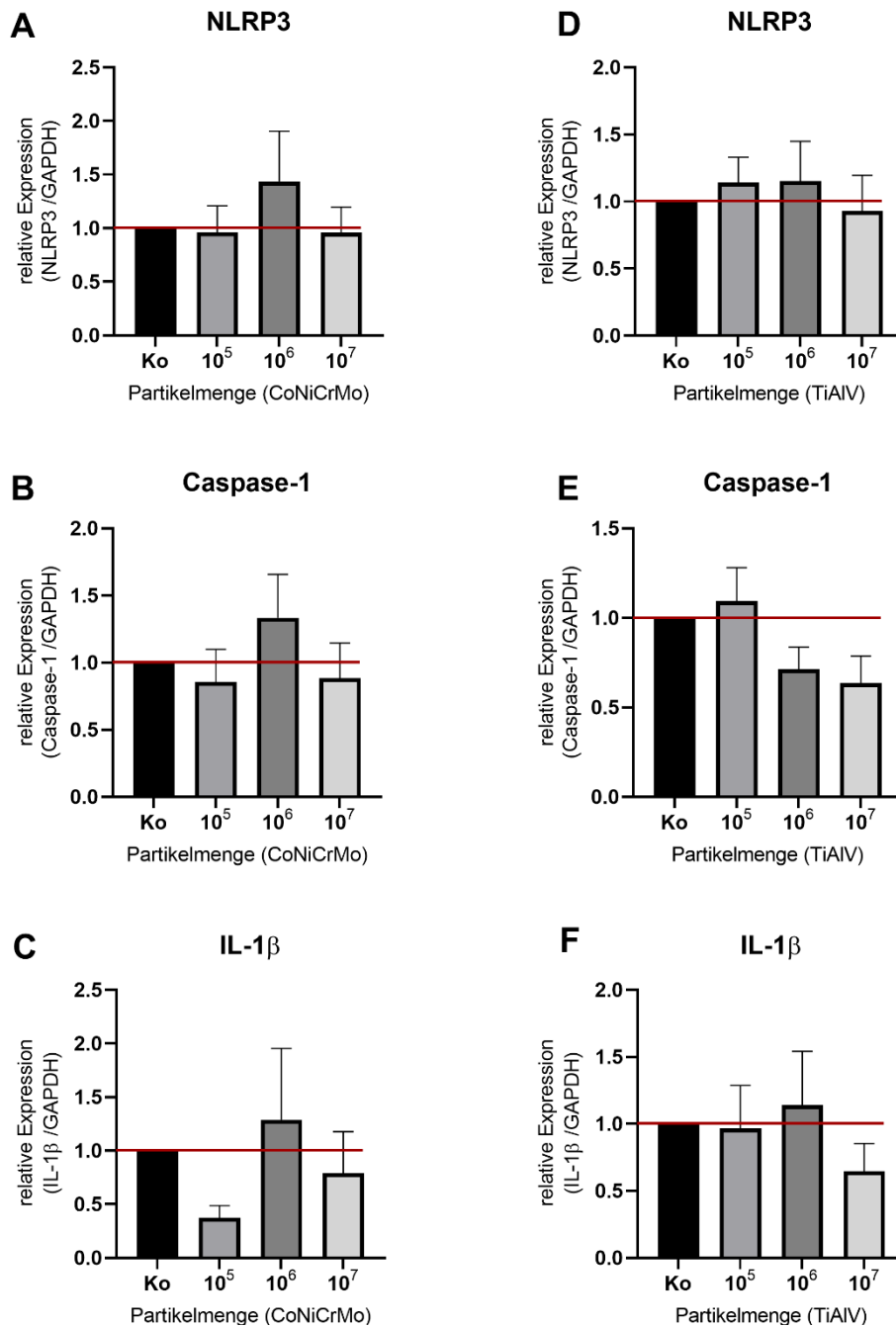


Abbildung 15: Einfluss der Partikelstimulation auf die Expression von NLRP3, Caspase-1 und IL-1β in Jurkat-Zellen. Die Expression der untersuchten Gene wurde relativ zu GAPDH ausgewertet und auf die unbehandelten Kontrollen normiert. Die Dosierungen vom 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> Partikeln pro Well beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von 3,9 cm<sup>2</sup> und wurden auf die Oberfläche der verwendeten Wells angepasst. A) Die Stimulation von Jurkat-Zellen mit CoNiCrMo-Partikeln verändert die NLRP3-Expression nicht (10<sup>5</sup> CoNiCrMo-Partikel: 0,96 ± 0,25, p = 0,93; 10<sup>6</sup> CoNiCrMo-Partikel: 1,44 ± 0,47, p = 0,30; 10<sup>7</sup> CoNiCrMo-Partikel: 0,96 ± 0,24, p = 0,92). B) Die Stimulation von Jurkat-Zellen mit CoNiCrMo-Partikeln führt nicht zu einer veränderten Caspase-1-Expression (10<sup>5</sup> CoNiCrMo-Partikel: 0,88 ± 0,26, p = 0,74; 10<sup>6</sup> CoNiCrMo-Partikel: 1,33 ± 0,32, p = 0,34; 10<sup>7</sup> CoNiCrMo-Partikel: 0,79 ± 0,39, p = 0,71). C) Die IL-1β-Expression in Jurkat-Zellen wird durch die Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln nicht verändert (10<sup>5</sup> CoNiCrMo-Partikel: 0,37 ± 0,11, p = 0,27; 10<sup>6</sup> CoNiCrMo-Partikel: 1,29 ± 0,67, p = 0,61; 10<sup>7</sup> CoNiCrMo-Partikel: 0,79 ± 0,39, p = 0,71). D) Die Inkubation mit TiAlV-Partikeln führt nicht zu einer Veränderung der NLRP3-Expression in Jurkat-Zellen (10<sup>5</sup> TiAlV-Partikel: 1,14 ± 0,19, p = 0,66; 10<sup>6</sup> TiAlV-Partikel: 1,15 ± 0,30, p = 0,63; 10<sup>7</sup> TiAlV-Partikel: 0,93 ± 0,27, p = 0,83). E) Die Inkubation der Jurkat-Zellen mit TiAlV-Partikeln verändert die Caspase-1-Expression nicht (10<sup>5</sup> TiAlV-Partikel: 1,10 ± 0,19, p = 0,62; 10<sup>6</sup> TiAlV-Partikel: 0,71 ± 0,12, p = 0,15; 10<sup>7</sup> TiAlV-Partikel: 0,64 ± 0,15, p = 0,07). F) Die Inkubation der Jurkat-Zellen mit TiAlV-Partikeln hatte keinen Effekt auf die IL-1β-Expression (10<sup>5</sup> TiAlV-Partikel: 0,97 ± 0,32, p = 0,93; 10<sup>6</sup> TiAlV-Partikel: 1,41 ± 0,40, p = 0,72; 10<sup>7</sup> TiAlV-Partikel: 0,65 ± 0,21, p = 0,38). Die Statistik wurde mit einer ANOVA und einem Fisher's LSD-post-hoc-Test berechnet. Alle Versuche wurden mit n = 6 durchgeführt.

### 3.6 Erhöhte ASC-Speck-Bildung in periprothetischen Zellen durch Inkubation mit Partikeln

In der Immunocytochemie (ICC) wurden ASC-Specks in den Zellen nach Stimulation mit Metallpartikeln sichtbar gemacht. ASC-Specks entstehen bei der Aktivierung des Inflammasoms durch die Aggregation von ASC-Filamenten (158, 159). Bei der ASC-Färbung wurde die vom Antikörper angefärbte Fläche pro Zelle ausgewertet und die Veränderung in den stimulierten Zellen relativ zur Kontrolle bestimmt.

In den MM6-Zellen zeigte sich eine signifikante Zunahme der ASC-Specks nach der Stimulation mit  $10^6$  und  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln (CoNiCrMo  $10^6$ :  $3,66 \pm 0,78$ ,  $p = 0,0075$ ; CoNiCrMo  $10^7$ :  $3,06 \pm 0,83$ ,  $p = 0,028$ ). Nach der Stimulation mit  $10^5$  CoNiCrMo-Partikeln zeigte sich nur eine geringe Zunahme der ASC-positiven Fläche. Die Stimulation mit  $10^5$  TiAlV-Partikeln führte zu einer signifikanten Steigerung der ASC-Färbung in den MM6-Zellen (TiAlV  $10^5$ :  $2,59 \pm 0,56$ ,  $p = 0,036$ ). Nach der Stimulation mit  $10^7$  TiAlV-Partikeln war die ASC-Färbung in den MM6-Zellen ebenfalls gesteigert, während nach der Stimulation mit  $10^6$  TiAlV-Partikeln eine Reduktion der ASC-positiven Fläche im Vergleich zur Kontrolle zu beobachten war.



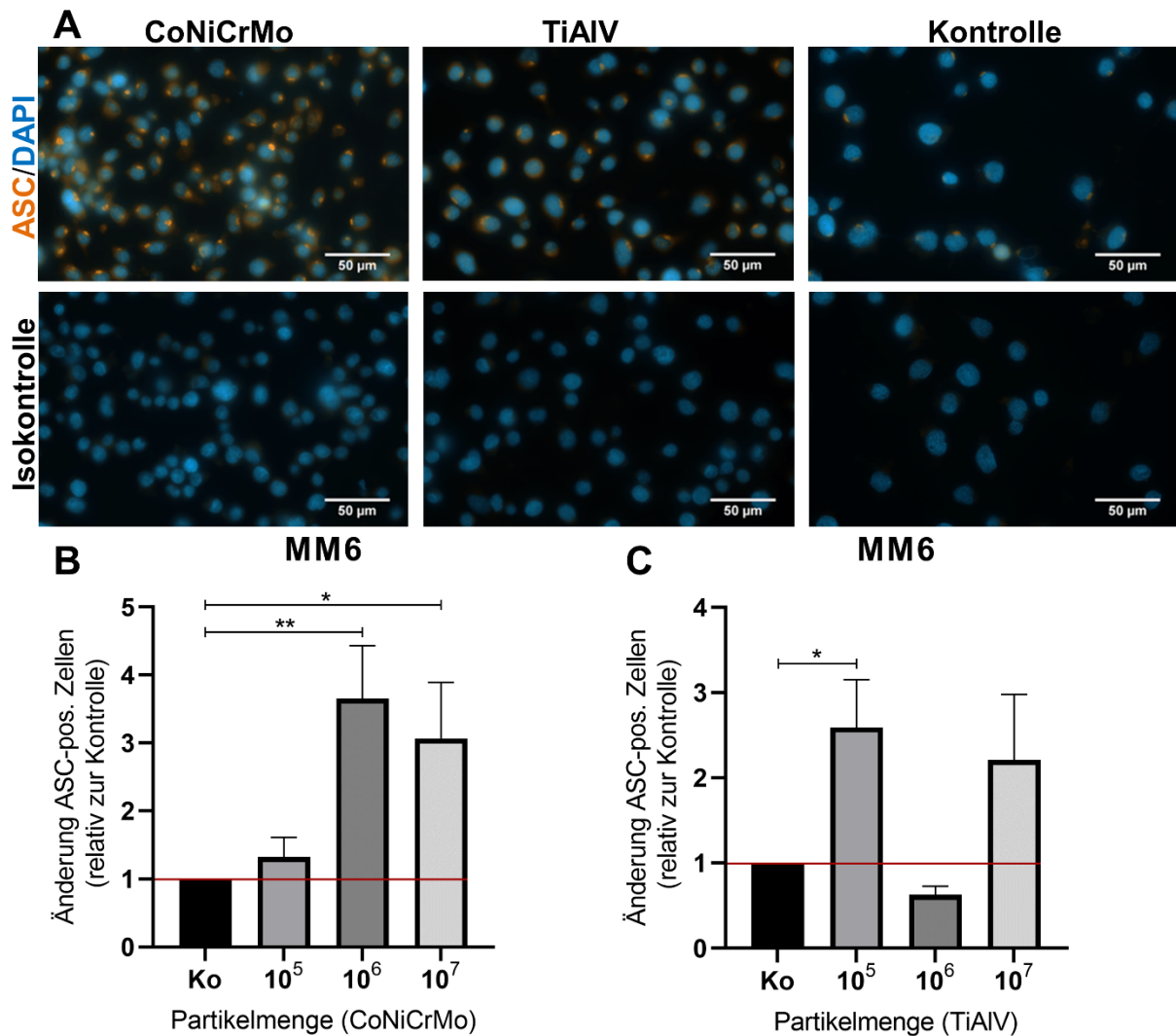


Abbildung 16: Bildung von ASC-Specks in MM6-Zellen durch die Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h. Die ASC-positive Fläche ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Dosierungen von 10<sup>5</sup>, 10<sup>6</sup>, 10<sup>7</sup> Partikeln pro Well beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von 3,9 cm<sup>2</sup> und wurden auf die Oberfläche der verwendeten Wells angepasst. A) Repräsentative Aufnahmen der ASC-Färbung der MM6-Zellen nach Stimulation mit 10<sup>5</sup> CoNiCrMo bzw. TiAlV-Partikeln für 24 h oder ohne Partikelstimulation (Kontrolle) (ASC: orange, DAPI: blau), Vergrößerung 630x. B) Die Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln führt zu einer verstärkten Bildung von ASC-Specks in MM6-Zellen (10<sup>5</sup> CoNiCrMo: 1,32 ± 0,29, p = 0,70; 10<sup>6</sup> CoNiCrMo: 3,66 ± 0,78, p = 0,0075; 10<sup>7</sup> CoNiCrMo: 3,06 ± 0,83, p = 0,028). C) Die Inkubation von MM6-Zellen mit TiAlV-Partikeln führt zu einer Steigerung der ASC-Färbung (10<sup>5</sup> TiAlV: 2,59 ± 0,56, p = 0,036; 10<sup>6</sup> TiAlV: 0,63 ± 0,10, p = 0,59; 10<sup>7</sup> TiAlV: 2,21 ± 0,77, p = 0,099). Die Statistik wurde mit einer ANOVA und einem Fisher's LSD-post-hoc-Test berechnet. n = 4. \* entspricht p ≤ 0,05, \*\* entspricht p ≤ 0,01

Bei den MG63-Zellen war insbesondere nach der Stimulation mit  $10^5$  und  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln eine nicht signifikante Zunahme der ASC-Färbung zu beobachten. Nach der Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln zeigte sich keine Veränderung der ASC-positiven Fläche im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Stimulation mit TiAlV-Partikeln hatte keinen Einfluss auf die ASC-Färbung in MG63-Zellen.

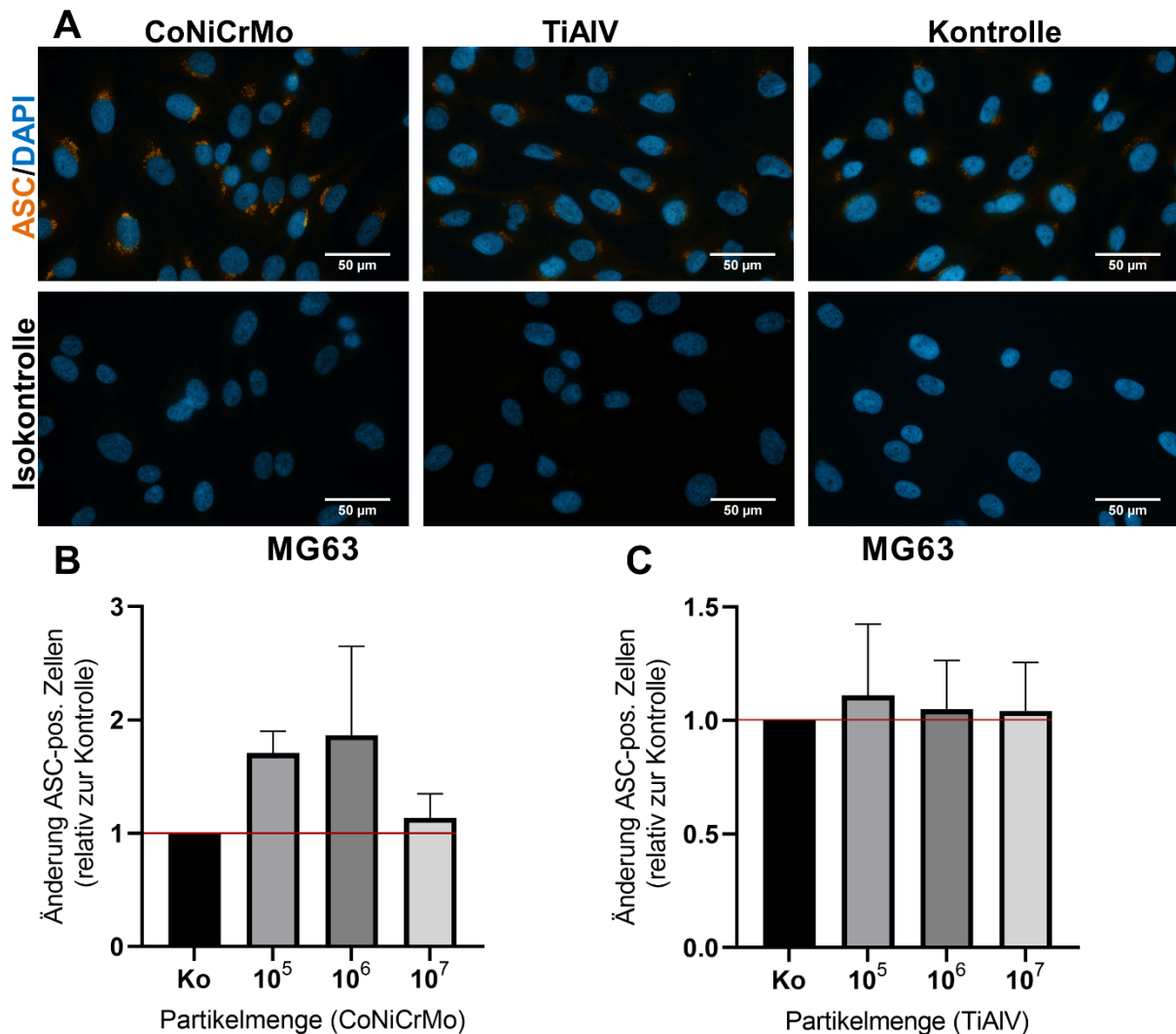


Abbildung 17: Bildung von ASC-Specks in MG63-Zellen durch die Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h. Die ASC-positive Fläche ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Dosierungen vom  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  Partikeln pro Well beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurden auf die Oberfläche der verwendeten Wells angepasst. A) Repräsentative Aufnahmen der ASC-Färbung der MG63-Zellen nach Stimulation mit  $10^5$  CoNiCrMo bzw. TiAlV-Partikeln für 24 h oder ohne Partikelstimulation (Kontrolle) (ASC: orange, DAPI: blau), Vergrößerung 630x. B) Die Stimulation mit  $10^5$  und  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln führt zu einer verstärkten Bildung von ASC-Specks in MG63-Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo:  $1,71 \pm 0,19$ ,  $p = 0,24$ ;  $10^6$  CoNiCrMo:  $1,87 \pm 0,78$ ,  $p = 0,15$ ;  $10^7$  CoNiCrMo:  $1,14 \pm 0,21$ ,  $p = 0,82$ ); C) Die Inkubation von MG63-Zellen mit TiAlV-Partikeln führt nicht zu einer Veränderung der ASC-Färbung ( $10^5$  TiAlV:  $1,11 \pm 0,31$ ,  $p = 0,72$ ;  $10^6$  TiAlV:  $1,05 \pm 0,22$ ,  $p = 0,87$ ;  $10^7$  TiAlV:  $1,04 \pm 0,21$ ,  $p = 0,89$ ). Die Statistik wurde mit einer ANOVA und einem Fisher's LSD-post-hoc-Test berechnet.  $n = 7$

In den Jurkat-Zellen zeigte sich nach der Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln keine signifikante Veränderung der ASC-Färbung. Nach der Stimulation mit  $10^5$  CoNiCrMo-Partikeln war ein Anstieg der ASC-positiven Fläche zu beobachten ( $1,80 \pm 0,37$ ,  $p = 0,023$ ). Die Stimulation mit den anderen CoNiCrMo-Konzentrationen führte zu einer geringeren Steigerung. Nach der Stimulation mit  $10^6$  und  $10^7$  TiAlV-Partikeln war die ASC-Fläche um ca. 50 % im Vergleich zur Kontrolle erhöht (TiAlV  $10^6$ :  $1,51 \pm 0,42$ ,  $p = 0,23$ ; TiAlV  $10^7$ :  $1,51 \pm 0,16$ ,  $p = 0,23$ ). Die Stimulation mit  $10^5$  TiAlV-Partikeln hatte keine Auswirkungen auf die Bildung von ASC-Specks in Jurkat-Zellen.

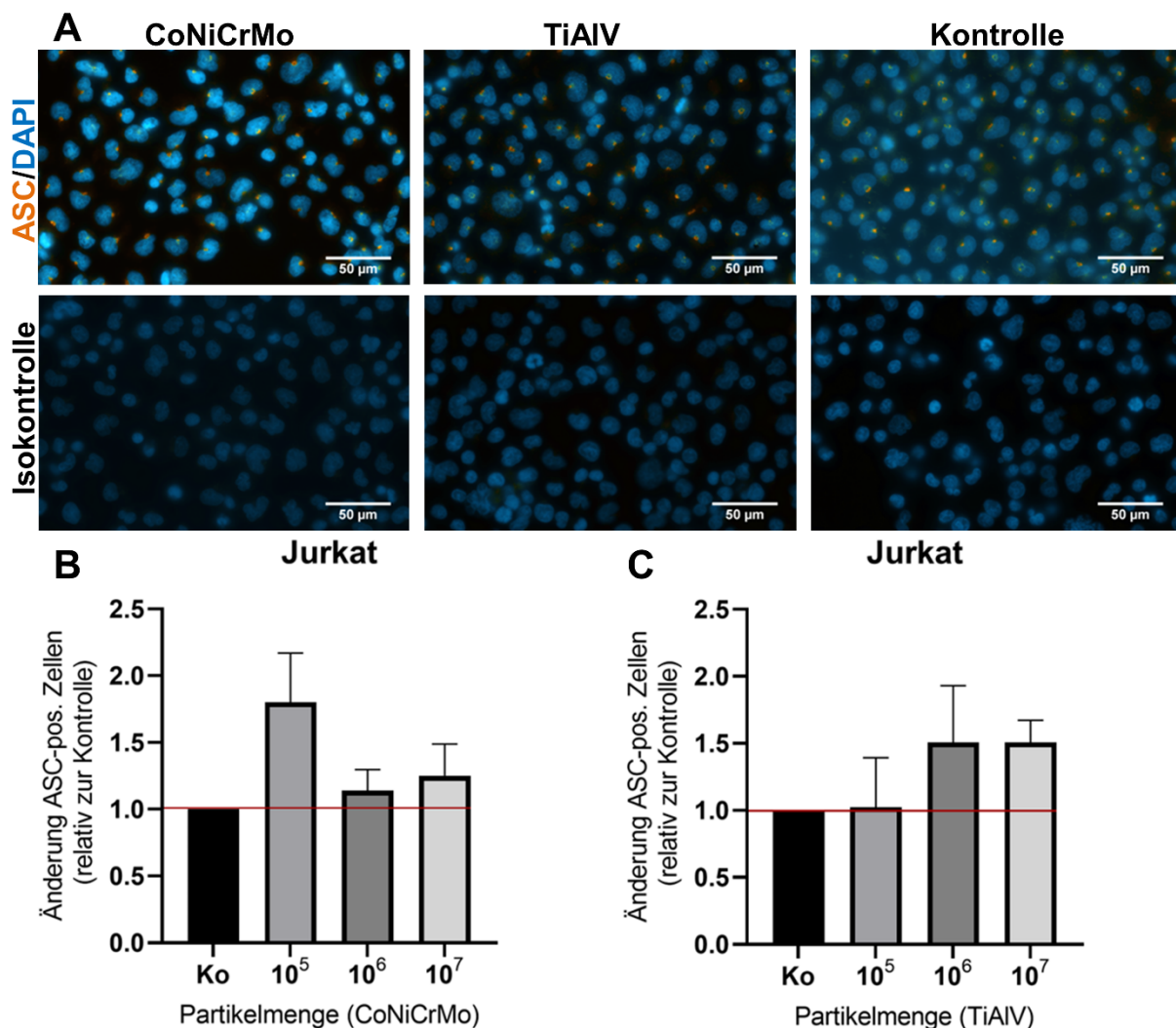


Abbildung 18: Bildung von ASC-Specks in Jurkat-Zellen durch die Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h. Die ASC-positive Fläche ist relativ zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Die Dosierungen vom  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  Partikeln pro Well beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurden auf die Oberfläche der verwendeten Wells angepasst. A) Repräsentative Aufnahmen der ASC-Färbung der Jurkat-Zellen nach Stimulation mit  $10^5$  CoNiCrMo bzw. TiAlV-Partikeln für 24 h oder ohne Partikelstimulation (Kontrolle) (ASC: orange, DAPI: blau), Vergrößerung 630x. B) Die Stimulation mit  $10^5$  CoNiCrMo-Partikeln führt zu einer verstärkten Bildung von ASC-Specks in Jurkat-Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo:  $1,80 \pm 0,37$ ,  $p = 0,023$ ;  $10^6$  CoNiCrMo:  $1,14 \pm 0,16$ ,  $p = 0,67$ ;  $10^7$  CoNiCrMo:  $1,25 \pm 0,24$ ,  $p = 0,46$ ). C) Die Inkubation von Jurkat-Zellen mit  $10^5$  und  $10^6$  TiAlV-Partikeln führte zu einer Steigerung der ASC-Färbung ( $10^5$  TiAlV:  $1,02 \pm 0,37$ ,  $p = 0,96$ ;  $10^6$  TiAlV  $1,51 \pm 0,42$ ,  $p = 0,23$ ;  $10^7$  TiAlV:  $1,51 \pm 0,16$ ,  $p = 0,23$ ). Die Statistik wurde mit einer ANOVA und einem Fisher's LSD-post-hoc-Test berechnet.  $n = 7$

### 3.7 Steigerung der Caspase-1-Spaltung in den getesteten Zelllinien nach Partikelstimulation

Im Western Blot wurde das p20-Fragment der Caspase-1 untersucht, welches bei der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch Spaltung von pro-Caspase-1 entsteht.

In den MM6-Zellen zeigte sich ein nicht signifikanter Anstieg des p20-Fragments von Caspase-1 nach der Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln. Nach der Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln zeigte sich ein Anstieg von Caspase-1 (p20) im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Die Stimulation von MM6-Zellen mit  $10^5$  und  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln hatte keine Auswirkungen auf die Menge der p20 Caspase-1. Nach der Stimulation mit TiAlV-Partikeln zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg des p20-Fragments von Caspase-1.

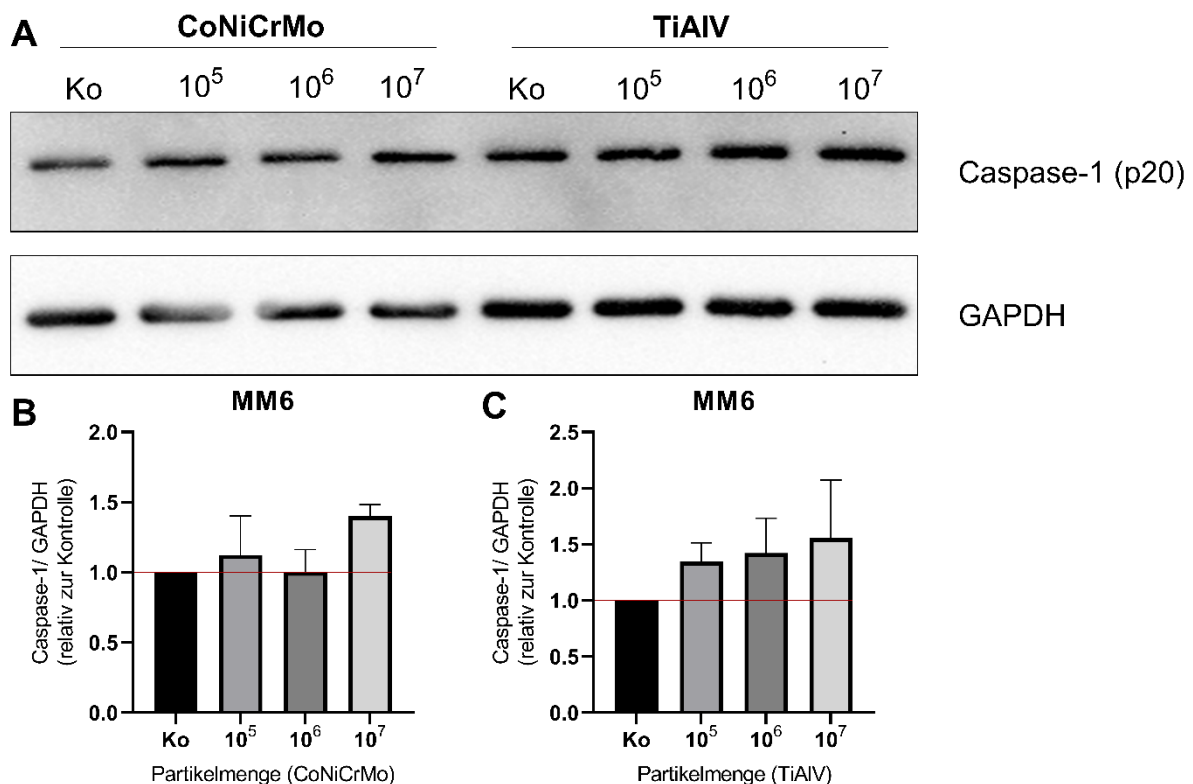


Abbildung 19: Caspase-1-Spaltung in MM6-Zellen nach Partikelstimulation. Die Caspase-1 (p20) Menge ist relativ zu GAPDH dargestellt und die Veränderung wurde auf die unbehandelten Kontrollen normiert. Die Dosierungen von  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  Partikeln pro Well beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurden auf die Oberfläche der verwendeten Wells angepasst. A) Repräsentative Aufnahme des Western Blots für das p20-Fragment von Caspase-1 mit MM6-Zellen nach der Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h. B) Die Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln führt zum Teil zu einer Erhöhung des p20-Fragments von Caspase-1 in MM6-Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo:  $1,12 \pm 0,28$ ,  $p = 0,61$ ;  $10^6$  CoNiCrMo:  $1,01 \pm 0,16$ ,  $p = 0,98$ ;  $10^7$  CoNiCrMo:  $1,41 \pm 0,08$ ,  $p = 0,12$ ). C) Die Inkubation mit TiAlV-Partikel führt zu einer Steigerung der Caspase-1-Spaltung in MM6-Zellen ( $10^5$  TiAlV:  $1,35 \pm 0,17$ ,  $p = 0,46$ ;  $10^6$  TiAlV:  $1,42 \pm 0,31$ ,  $p = 0,37$ ;  $10^7$  TiAlV:  $1,55 \pm 0,52$ ,  $p = 0,25$ ). Die statistische Analyse wurde mit einer ANOVA und einem Fisher's LSD-post-hoc-Test berechnet.  $n = 3$

Bei den MG63-Zellen zeigte sich ein Anstieg von Caspase-1 (p20) nach der Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln. Nach der Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln zeigte sich eine Verdoppelung des p20-Fragments der Caspase-1 ( $1,96 \pm 0,35$ ,  $p = 0,0098$ ). Nach der Stimulation mit  $10^5$  CoNiCrMo-Partikeln zeigte sich im Vergleich ein geringerer Anstieg der Proteinmenge von Caspase-1 (p20). Die Stimulation der MG63-Zellen mit TiAIV-Partikeln führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der Caspase-1 (p20)-Menge. Nach der Inkubation mit  $10^5$  TiAIV-Partikeln war die Menge an Caspase-1 (p20) im Vergleich zur Kontrolle leicht reduziert. Die Stimulation mit  $10^6$  TiAIV-Partikeln führte nicht zu einer relevanten Veränderung der Caspase-1-Spaltung im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Inkubation mit  $10^7$  TiAIV-Partikeln kam es zu einer leichten Erhöhung der Caspase-1 (p20)-Konzentration in MG63-Zellen.

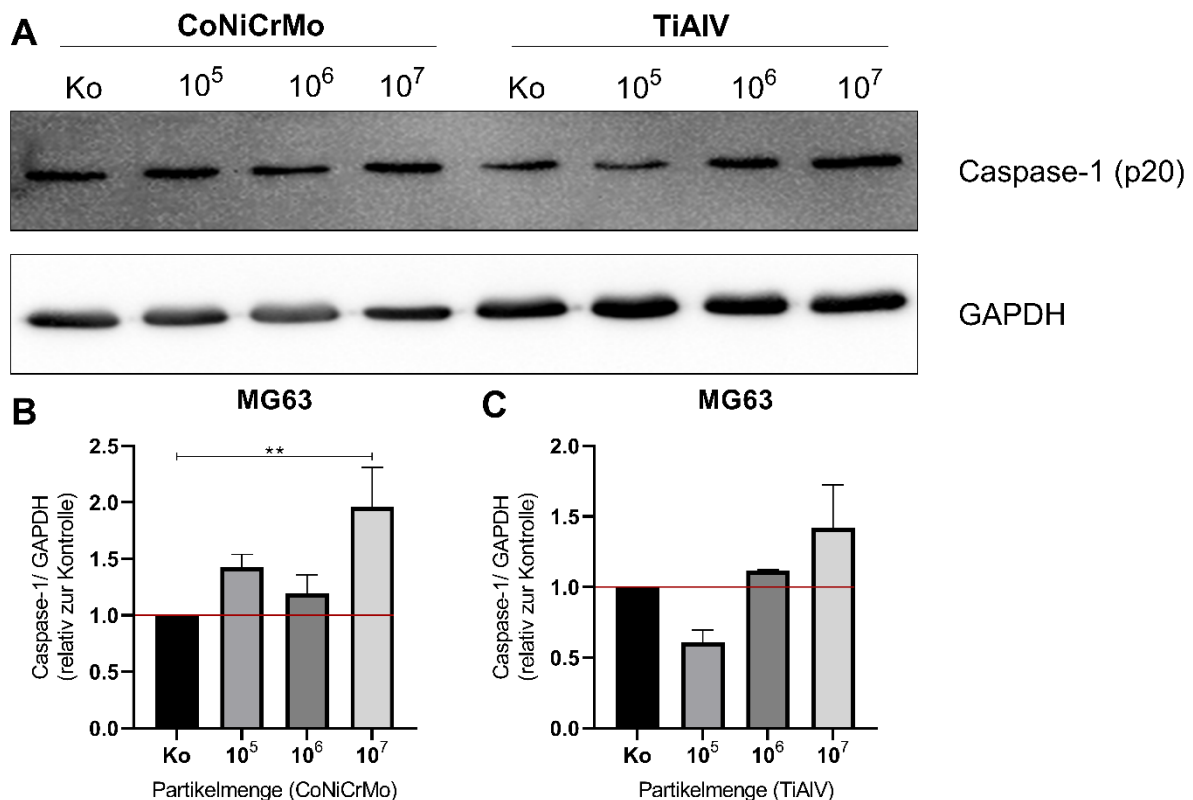


Abbildung 20: Caspase-1-Spaltung in MG63-Zellen nach Partikelstimulation Die Caspase-1(p20)-Menge ist relativ zu GAPDH dargestellt und die Veränderung wurde auf die unbehandelten Kontrollen normiert. Die Dosierungen vom  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  Partikeln pro Well beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurden auf die Oberfläche der verwendeten Wells angepasst. A) Repräsentative Aufnahme des Western Blots für das p20-Fragment von Caspase-1 mit MG63-Zellen nach der Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAIV-Partikeln für 24 h. B) Die Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln führt insbesondere nach einer Stimulation mit  $10^7$  Partikeln zu einer Erhöhung des p20-Fragments von Caspase-1 in MG63-Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo:  $1,43 \pm 0,11$ ,  $p = 0,17$ ;  $10^6$  CoNiCrMo:  $1,19 \pm 0,17$ ,  $p = 0,52$ ;  $10^7$  CoNiCrMo:  $1,96 \pm 0,35$ ,  $p = 0,0098$ ). C) Die Inkubation mit TiAIV-Partikel führt zum Teil zu einer Steigerung und zum Teil zu einer Reduktion der Caspase-1-Spaltung in MG63-Zellen ( $10^5$  TiAIV:  $0,61 \pm 0,09$ ,  $p = 0,12$ ;  $10^6$  TiAIV:  $1,12 \pm 0,005$ ,  $p = 0,61$ ;  $10^7$  TiAIV:  $1,42 \pm 0,30$ ,  $p = 0,1$ ). Die statistische Analyse wurde mit einer ANOVA und einem Fisher's LSD-post-hoc-Test berechnet.  $n = 3$ . \*\* entspricht  $p \leq 0,01$

Die Inkubation der Jurkat-Zellen führte nicht zu einer signifikanten Veränderung der Spaltung von Caspase-1. In den Jurkat-Zellen zeigte sich nach der Stimulation mit  $10^5$  und  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln eine leichte Reduktion der Caspase-1 (p20) im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln war eine minimale Steigerung der Caspase-1 (p20) zu beobachten. Die Stimulation mit TiAlV-Partikeln hatte ebenfalls nur geringfügige Auswirkungen auf die Caspase-1-Level in Jurkat-Zellen.

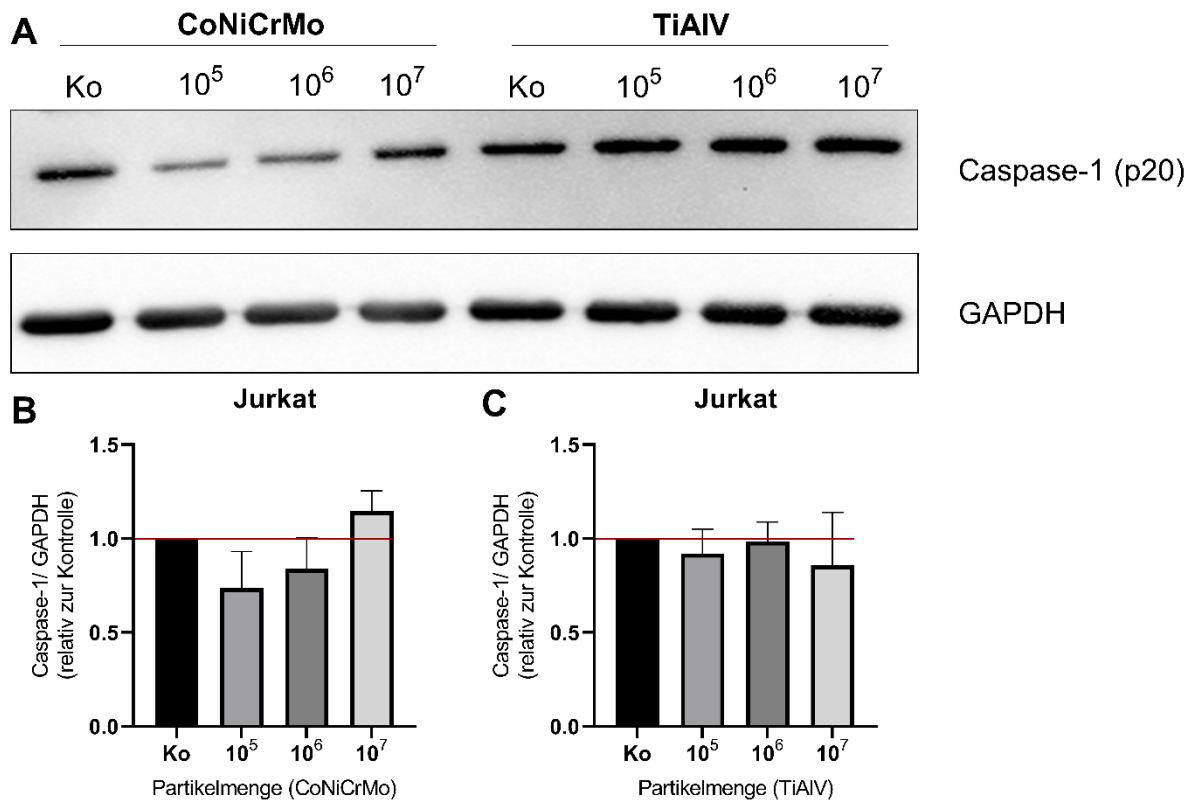


Abbildung 21: Caspase-1-Spaltung in Jurkat-Zellen nach Partikelstimulation Die Caspase-1(p20)-Menge ist relativ zu GAPDH dargestellt und die Veränderung wurde auf die unbehandelten Kontrollen normiert. Die Dosierungen von  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  Partikeln pro Well beziehen sich auf eine Well-Oberfläche von  $3,9 \text{ cm}^2$  und wurden auf die Oberfläche der verwendeten Wells angepasst. A) Repräsentative Aufnahme des Western Blots für das p20-Fragment von Caspase-1 mit Jurkat-Zellen nach der Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h. B) Die Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln führte zu keiner signifikanten Veränderung der Menge des p20-Fragments von Caspase-1 in Jurkat-Zellen ( $10^5$  CoNiCrMo:  $0,74 \pm 0,19$ ,  $p = 0,22$ ;  $10^6$  CoNiCrMo:  $0,84 \pm 0,17$ ,  $p = 0,43$ ;  $10^7$  CoNiCrMo:  $1,15 \pm 0,11$ ,  $p = 0,48$ ). C) Die Inkubation mit TiAlV-Partikeln führt nicht zu Veränderungen der Caspase-1-Spaltung in Jurkat-Zellen ( $10^5$  TiAlV:  $0,92 \pm 0,13$ ,  $p = 0,74$ ;  $10^6$  TiAlV:  $0,99 \pm 0,10$ ,  $p = 0,95$ ;  $10^7$  TiAlV:  $0,86 \pm 0,28$ ,  $p = 0,56$ ). Die statistische Analyse wurde mit einer ANOVA und einem Fisher's LSD-post-hoc-Test berechnet.  $n = 3$

## 4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln auf die Bildung und Aktivierung des Inflammasoms in MM6-, MG63- und Jurkat-Zellen mittels qRT-PCR, Western Blot und ICC untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass es Unterschiede bei der Aktivierung des Inflammasoms sowohl zwischen den verschiedenen Zellarten als auch zwischen den getesteten Partikelarten in der MG63-Zelllinie gibt.

### 4.1 Rolle von ROS bei der aseptischen Prothesenlockerung

Als potentieller Auslöser für die Bildung des Inflammasoms wurde der oxidative Stress im periprothetischen Gewebe von Patienten mit Revisionen von MoM-Hüft-TEPs mit Gewebe von Primärimplantationen durch die Bestimmung von 4-HNE verglichen. 4-HNE entsteht durch Lipidperoxidation und ist somit ein Marker für oxidativen Stress. Zudem ist 4-HNE selbst auch zytotoxisch und kann über verschiedene Signalwege proinflammatorische Effekte auslösen (143). Der genaue Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und der Aktivierung des NLRP3-Inflammasom ist noch nicht endgültig geklärt. Während in einigen Studien eine Aktivierung des Inflammasoms durch ROS und 4-HNE gezeigt werden konnte, haben Hsu et al. 2022 eine mögliche Inhibition des NLRP3-Inflammasoms durch 4-HNE in Makrophagen festgestellt (112, 144, 160).

Die 4-HNE-Färbung war im Gewebe von Revisionseingriffen signifikant höher als im Gewebe von Primäreingriffen. Es gab allerdings zum Teil relativ große Unterschiede der positiv gefärbten Flächen innerhalb der Patientengruppen und zwischen den einzelnen Aufnahmen der einzelnen Patienten. Zudem war die Anzahl der untersuchten Proben relativ gering ( $n = 12$ ).

Die Ergebnisse stimmen mit Studien überein, die die Bildung von ROS im periprothetischen Gewebe von MoP-Hüft-TEP-Revisionen untersucht haben. Im Gewebe von Revisionen von MoP-Hüft-TEPs konnte ebenfalls eine erhöhte Konzentration von Lipidperoxidationsprodukten im Vergleich zu Primärimplantationen gefunden werden (147). Steinbeck et al. haben zudem einen Zusammenhang zwischen 4-HNE im Gewebe von MoP-Hüft-TEP-Revisionen und dem Osteolysegrad sowie der Menge an PE-Partikeln festgestellt (146).

Für MoM-Prothesen wurde die Entstehung von ROS im periprothetischen Gewebe noch nicht so intensiv untersucht. Allerdings konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Antioxidantien die durch Titanpartikelstimulation ausgelöste Ausschüttung von TNF $\alpha$  und Aktivierung von NF $\kappa$ B in Makrophagen senken können (161). In anderen Studien konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von ROS die durch verschiedene Partikel (MSU, Asbest, CoCrMo) oder Metallionen (Co, Cr, Mo, Ni) induzierte Produktion von IL-1 $\beta$  in THP-1-Zellen reduzieren konnte (105, 136).

## 4.2 Zytotoxizität der Metallpartikel

Im WST-1-Assay konnte zwar nur eine geringfügige Reduktion der Zellviabilität durch die Partikelstimulation beobachtet werden, allerdings scheinen die Zelllinien unterschiedlich auf die beiden Partikelarten zu reagieren. Insbesondere nach Inkubation mit CoNiCrMo-Partikeln konnte bei den MM6-Zellen im Gegensatz zu den anderen Zellarten ein Abfall der funktionsfähigen Zellen beobachtet werden, dieser Effekt war nach 48 h und bei höheren Partikelmengen verstärkt. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass CoNiCrMo-Partikel auf MM6-Zellen stärker zytotoxisch wirken als TiAlV-Partikel und dass eine längere Stimulationszeit und höhere Partikelkonzentrationen diesen Effekt zusätzlich verstärken können. Für die durchgeführten Experimente wurde allerdings nur die Stimulationszeit von 24 h genutzt, in der keine relevanten zytotoxischen Effekte festgestellt werden konnte.

Ein zytotoxischer Effekt von Metallpartikeln oder -ionen in hohen Konzentrationen auf verschiedene Zelllinien konnte in einigen Studien nachgewiesen werden, während andere Studien keine Effekte auf die Zellviabilität feststellen konnten (154, 162, 163). Insgesamt gelten CoCr-Legierungen, unter anderem aufgrund der Effekte freigesetzter Co- und Cr-Ionen, als toxischer im Vergleich zu TiAlV-Legierungen (163, 164). Dies stimmt mit den Ergebnissen des WST-1-Assay für die MM6-Zellen überein. In einer Untersuchung von Dalal et al. zeigte sich ebenfalls eine stärkere Reduktion der Zellviabilität von Makrophagen nach Stimulation mit CoCrMo-Partikel im Vergleich zu TiAlV-Partikeln, während in Fibroblasten und Osteoblasten nur nach Stimulation mit höheren Dosen CoCrMo-Partikeln ein negativer Effekt auf die Zellviabilität nachweisbar war (163). In den meisten Studien wurden allerdings nur die Effekte von Partikeln auf eine Zelllinie untersucht, weshalb sich die unterschiedlichen Reaktionen der Zelllinien auf die getesteten Partikelarten nicht vergleichen lassen.

## 4.3 Unterschiede in der Partikelaufnahme der Zelllinien

Die Aufnahme der Partikel in die verschiedenen Zellen wurde durch die Färbung des Zytoskeletts mit Phalloidin-Red überprüft. Es konnte gezeigt werden, dass das Zytoskelett der Zellen durch die Partikelstimulation nicht geschädigt wurde. Bei allen Zelllinien konnten intrazellulär Partikel nachgewiesen werden. Ein Unterschied in der Aufnahme zwischen CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln konnte nicht festgestellt werden. Allerdings waren in den MG63- und MM6-Zellen mehr intrazelluläre Partikel nachweisbar als in den Jurkat-Zellen. Diese Ergebnisse zeigen, dass es einen Unterschied in der Phagozytosefähigkeit der verwendeten Zelllinien gibt, der eventuell die Aktivierung des Inflammasoms durch die Partikel beeinflussen könnte. Ein Rückschluss auf den Mechanismus der Partikelaufnahme ist durch die Phalloidin-Red-Färbung allerdings leider nicht möglich.

Monozyten sind ein Bestandteil des mononukleären Phagozytensystems (MPS), dessen Zellen auf die Phagozytose von Pathogenen spezialisiert sind (165). Obwohl es nicht eine



ihrer Hauptfunktionen ist, besitzen auch Osteoblasten und T-Zellen die Fähigkeit zur Phagozytose (166, 167). Die verwendeten Zelllinien wurden auch schon in anderen Studien zur Untersuchung von adversen Effekten durch Metallpartikel oder -ionen genutzt, Unterschiede in den intrazellulär nachweisbaren Partikelmengen wurden allerdings noch nicht verglichen (72, 142, 166, 168).

Für den Aufnahmemechanismus der Zellen spielen insbesondere die Größe und Oberfläche der Partikel eine Rolle. Partikel mit einer Größe von 150 nm – 10 µm werden insbesondere über Phagozytose in die Zellen aufgenommen (z. B. in Osteoblasten, Makrophagen). Bei kleineren Partikeln (< 150 nm) spielen die Clathrin-vermittelte und Calveolae-abhängige Endozytose eine wichtige Rolle (57, 104, 148). Die Clathrin-vermittelte Endozytose ist insbesondere bei Partikeln mit einer Größe von ca. 120 nm relevant, während über die Calveolae-abhängige Endozytose vor allem kleinere Partikel (ca. 60 nm) unspezifisch aufgenommen werden. Zudem gibt es noch Clathrin- und Calveolae-unabhängige Endozytosewege und die Makropinozytose (> 1 µm) (148, 169).

Die Größe der verwendeten Partikel wurde mit zwei verschiedenen Methoden bestimmt. Die Analyse mit dem Mastersizer 3000E ergab, dass Partikel mit einer Größe von 10 µm den größten Anteil am Gesamtvolumen hatten und der Anteil von Partikeln > 100 µm bei den CoNiCrMo-Partikeln größer war als bei den TiAlV-Partikeln. Eine von Katzer et al. durchgeführte Analyse der verwendeten Partikel ergab eine Größenverteilung zwischen < 0,5 µm und 200 µm, wobei mehr als 80 % der Partikel eine Größe < 5 µm hatten (154). Beim Vergleich dieser Werte muss allerdings beachtet werden, dass die Auswertung der Partikelgrößen im Mastersizer 3000E und Zetasizer Nano ZS auf dem Anteil der Partikel einer Größenklasse am Gesamtvolumen der gemessenen Partikel und nicht auf einer Zählung der Partikel basiert. Dadurch haben Partikel mit einem großen Volumen bei der gleichen Anzahl einen höheren Anteil am Gesamtvolumen als kleinere Partikel.

Um einen Effekt der Agglomeration der Partikel auf die gemessenen Größen auszuschließen, wurden die Partikel im Zetasizer Nano ZS im Ultraschallbad desagglomeriert und dispergiert. Die Messung im Zetasizer Nano ZS ergab bei beiden Partikelarten einen deutlich größeren Anteil von Partikeln < 1 µm am Gesamtvolumen im Vergleich zu den Messungen im Mastersizer 3000E. Der Mittelwert der Partikeldurchmesser lag bei 1,17 µm für die CoNiCrMo-Partikel und 0,91 µm für die TiAlV-Partikel. Ein Problem bei der Auswertung der Partikelgrößen im Zetasizer Nano ZS ist, dass von einer monodispersen Lösung ausgegangen wird. Es ist aber zu erwarten, dass die Partikel sehr unterschiedliche Größen aufweisen, worauf auch der hohe PDI hinweist. Zudem ist die Methode am besten für die Auswertung runder Partikel geeignet, da unebene Partikel andere Streuungseigenschaften aufweisen. In den REM-Aufnahmen kann man allerdings die

unregelmäßige, eckige Form und raue Oberfläche der Partikel erkennen. Dies entspricht der Morphologie von Abriebpartikeln aus Gewebeproben (170, 171).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die Analyse im Zetasizer Nano ZS die Größe der einzelnen Partikel besser darstellt, während die Ergebnisse der Mastersizer 3000E-Messungen die Agglomeration der Partikel widerspiegeln. Eine nicht repräsentative Messung der Partikelgrößen im REM bestätigte Partikelgrößen zwischen ca. 80 nm und 15 µm, wobei die meisten gemessenen Partikel < 2 µm groß waren. Zudem sind in den REM-Aufnahmen die Partikelagglomerate sichtbar, wie sie auch oft in Gewebeproben beobachtet werden können (56, 172).

Die Größenangaben von Partikeln, die aus dem Gewebe aus der Prothesenumgebung gewonnen wurden, schwanken stark im Bereich von wenigen Nanometern bis zu mehreren Mikrometern. In mehreren Studien wurden Partikel mit einer Größe von 1 - 100 µm aus Gewebe von Revisionsoperationen isoliert (171, 172). Ein Großteil der Partikel scheint allerdings einen Durchmesser < 1 µm zu haben. In einer Studie von Singh et al. hatte die Mehrheit der Partikel aus Gewebeproben von MoM-Hüft-TEPs eine Größe von 100 - 500 nm (170). Zum Teil konnten aber noch kleinere Partikel nachgewiesen werden, in einer Analyse von Doorn et al. hatten CoCrMo-Partikel aus Gewebeschnitten von MoM-Hüft-TEPs z. B. eine Durchschnittsgröße von 42 nm (6 - 744 nm) (56).

Obwohl allgemein angenommen wird, dass insbesondere Partikel mit einer Größe < 10 µm phagozytiert werden, ist unklar, in welchem Größenbereich die Partikel die stärksten proinflammatorischen Effekte auslösen (57, 173). Für Metallpartikel wurde eine Aktivierung des Inflammasoms durch Ti- und CoCrMo-Partikel mit einer Größe von 1,1 - 7,3 µm nachgewiesen (54, 65). Caicedo et al. haben gezeigt, dass die IL-1β Sekretion in THP-1-Zellen nach Stimulation mit CoCrMo-Partikeln mit einem Durchmesser von 6,3 bzw. 7,3 µm größer war als bei Partikeln mit einem Durchmesser von 1,1 bzw. 1,4 µm. Zudem war in dieser Studie die Reaktion bei Partikeln mit einer ungleichmäßigen Oberfläche stärker als bei runden Partikeln (54).

Die verwendeten Partikelmengen orientieren sich an Werten für CoCrMo-Partikel, für die in anderen Studien bereits eine Stimulation des Inflammasoms nachgewiesen werden konnte (136). In den durchgeführten Experimenten war keine eindeutige Abhängigkeit der Inflammasom-Reaktion von der verwendeten Partikelmenge zu beobachten. Eine mögliche Erklärung dafür wäre eine limitierte Aufnahmekapazität der Zellen, durch die höhere extrazelluläre Partikelmengen nicht unbedingt zu einer höheren Partikelaufnahme führen, insbesondere wenn es zu einer Agglomeration der Partikel kommt, wodurch die Phagozytose aufgrund der zunehmenden Größe zusätzlich erschwert wird.

Für die Experimente wurde eine Inkubationszeit mit den Metallpartikeln von 24 h gewählt. Diese Zeit hat sich in anderen Studien bereits als geeignet herausgestellt, um eine Aktivierung des Inflammasoms beobachten zu können (54, 136, 137).

#### **4.4 Die Aktivierung des Inflammasoms ist abhängig von Partikelart und Zellart**

##### 4.4.1 Priming des Inflammasoms durch Metallpartikel

In der qRT-PCR wurde die Expression der Inflammasom-Bestandteile Caspase-1 und NLRP3 sowie von IL-1 $\beta$  in den verwendeten Zelllinien nach Partikelstimulation bestimmt. Die Expression von NLRP3 wird im Rahmen des Primings gesteigert und für die darauffolgende Aktivierung des Inflammasoms benötigt (103). Auch wenn Caspase-1 und ASC in den meisten Zellen konstitutiv exprimiert werden, konnte eine gesteigerte Caspase-1-Expression im Rahmen von Entzündungsreaktionen nachgewiesen werden (174, 175). Die Expression von IL-1 $\beta$  reguliert die Menge an inaktivem pro-IL-1 $\beta$ , welches nach der Spaltung durch Proteolyse für die proinflammatorischen Effekte der Inflammasom-Aktivierung verantwortlich ist. Die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms wird zudem durch posttranslationale Modifikationen wie Ubiquitinierung und Phosphorylierung beeinflusst, welche im Rahmen des Primings induziert werden (98, 101).

Die Ergebnisse der qRT-PCR zeigten eine signifikante Steigerung der NLRP3-Expression in MM6-Zellen nach der Stimulation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln. Die Caspase-1- und IL-1 $\beta$ -Expressionen konnten in MM6-Zellen ebenfalls durch beide Partikelarten gesteigert werden, wobei die Steigerung nach Stimulation mit CoNiCrMo-Partikeln größer war als nach der Stimulation mit TiAlV-Partikeln.

Bei den MG63-Zellen konnte eine Steigerung der Expression der untersuchten Gene durch CoNiCrMo-Partikel, nicht aber durch TiAlV-Partikel beobachtet werden.

Die Stimulation der Jurkat-Zellen mit den Metallpartikeln löste keine eindeutigen Veränderungen in der Expression von NLRP3, Caspase-1 oder IL-1 $\beta$  aus. Nach der Stimulation mit 10<sup>6</sup> CoNiCrMo-Partikeln war ein geringfügiger Anstieg der untersuchten Gene zu beobachten, während die anderen Partikelmengen keinen Effekt hatten.

##### 4.4.2 Aktivierung des Inflammasoms durch Metallpartikel

Die Aktivierung des Inflammasoms in den untersuchten Zelllinien durch die Partikel wurde durch die Auswertung von ASC-Specks und die Bestimmung des p20-Fragments der Caspase-1 im Westernblot bestimmt.

Bei der Aktivierung des Inflammasoms entstehen ASC-Filamente, welche sich zu sogenannte ASC-Specks zusammenlagern und für die Rekrutierung von pro-Caspase-1 verantwortlich sind. Die Färbung der ASC-Specks mittels ICC ermöglicht somit eine Detektion der Inflammasomaktivierung in einzelnen Zellen (158, 159, 176). Pro-Caspase-1

wird nach Bildung der ASC-Specks über CARD-CARD-Interaktionen an ASC gebunden und autokatalysiert in eine p10- und eine p20-Untereinheit gespalten. Der aktive Caspase-1-Komplex spaltet pro-IL-1 $\beta$  und pro-IL-18 in ihre aktiven Formen. Im Western Blot wurde das p20-Fragment der Caspase-1 als Marker für die Aktivierung des Inflammasoms untersucht.

In den MM6-Zellen konnte die Zahl der ASC-Specks durch  $10^6$  und  $10^7$  CoNiCrMo- und  $10^5$  TiAlV-Partikel signifikant gesteigert werden. Bei den MG63-Zellen zeigte sich nur nach der Stimulation mit  $10^5$  und  $10^6$  CoNiCrMo-Partikeln eine Steigerung der ASC-Specks, während die Stimulation mit TiAlV-Partikeln keinen Effekt hatte. Bei der Stimulation von Jurkat-Zellen mit  $10^5$  CoNiCrMo-Partikeln und  $10^6$  und  $10^7$  TiAlV-Partikeln zeigte sich eine leichte Steigerung der ASC-Specks. Im Vergleich war der Anstieg der ASC-Specks in den MM6-Zellen stärker als in den anderen beiden Zelllinien. In allen verwendeten Zelllinien ließen sich zudem auch in den unstimulierten Kontrollen ASC-Specks nachweisen, was ein Hinweis auf eine Grundaktivität des Inflammasoms in den untersuchten Zellen sein könnte.

Im Western Blot zeigte sich ein ähnliches Bild der Inflammasomaktivierung wie bei der Analyse der ASC-Specks. Bei den MM6-Zellen wurde nach der Stimulation mit  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln ein Anstieg des Caspase-1 p20-Fragments beobachtet, zudem löste die Stimulation mit TiAlV-Partikeln einen konzentrationsabhängigen Anstieg aus. Die Stimulation der MG63-Zellen mit  $10^7$  CoNiCrMo-Partikeln bewirkte einen signifikanten Anstieg der aktiven Caspase-1. Nach Stimulation der MG63-Zellen mit TiAlV-Partikeln zeigte sich nur nach Stimulation mit  $10^7$  Partikeln ein Anstieg der p20-Caspase-1, welcher im Vergleich zu der gleichen Menge CoNiCrMo-Partikel aber geringer ausfiel. In den Jurkat-Zellen konnte kein Anstieg der p20-Caspase-1 beobachtet werden. Bei der Bewertung der Ergebnisse müssen die zum Teil großen Standardabweichungen und die limitierte Zahl der Western Blots ( $n = 3$ ) berücksichtigt werden.

#### 4.4.3 Zellartenspezifische Unterschiede

Die meisten Studien haben sich bislang auf die Aktivierung des Inflammasoms durch Metallpartikel in Makrophagen konzentriert. Eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms konnte aber auch bereits in anderen Zellen des Immunsystems, Osteoblasten und Epithelzellen beobachtet werden (97, 177, 178).

Eine mögliche Erklärung für die Unterschiede in der Inflammasomaktivierung zwischen den Zelllinien könnte die Spezialisierung der MM6-Zellen auf die Aufnahme und Verarbeitung von Pathogenen sein. Es gibt Hinweise dafür, dass die Aktivierung des Inflammasoms in Makrophagen zumindest zum Teil von der Aufnahme von Partikeln in das Phagolysosom und der Freisetzung lysosomaler Enzyme abhängt (54, 65, 179). Da die Jurkat-Zellen in der Phalloidin-Red-Färbung die geringste Partikelaufnahme gezeigt haben, könnte dies eine mögliche Erklärung für die geringe Aktivierung des Inflammasoms in dieser Zelllinie

darstellen. Li et al. konnten eine geringfügige Steigerung der NLRP3-, ASC-, und Caspase-1-Expression in Jurkat-Zellen durch alleinige Stimulation mit Ti-Ionen nachweisen, eine Steigerung der IL-1 $\beta$ -Sekretion wurde aber erst durch Kostimulation mit PHA erreicht, wodurch ebenfalls eine Steigerung der ROS-Produktion erreicht wurde (142). Die partikelartenspezifischen Unterschiede in der Aktivierung des Inflammasoms in MG63-Zellen können ebenfalls ein Hinweis auf die Aktivierung verschiedener Signalwege in den unterschiedlichen Zelllinien sein.

Die Sekretion und Expression verschiedener proinflammatorischer Zytokine nach Partikelstimulation in Osteoblasten und Makrophagen wurden bereits in mehreren Studien miteinander verglichen, entsprechende Daten für IL-1 $\beta$  oder die Aktivierung des Inflammasoms liegen aber noch nicht vor (180).

#### 4.4.4 Partikelartenspezifische Unterschiede

Obwohl es allgemein akzeptiert ist, dass Metallpartikel das Inflammasom aktivieren können, ist es umstritten, ob Abriebpartikel unabhängig von anderen Faktoren ein Priming des Inflammasoms auslösen können. Die Bindung von PAMPs an Metallpartikel galt als Voraussetzung für das Priming des Inflammasoms in Makrophagen, inzwischen wurde allerdings auch ein Priming durch endotoxinfreie CoCrMo- und Ti-Partikel nachgewiesen (54, 179, 181, 182). In einer aktuellen Studie von Jämsen et al. wurde gezeigt, dass ein Priming des Inflammasoms durch TNF unter aseptischen Bedingungen die Aktivierung des Inflammasoms in Makrophagen durch Ti-, Cr- und Mo-Partikel ermöglicht (183). Die isolierte Stimulation mit Metallpartikeln spiegelt außerdem nicht unbedingt die Bedingungen in vivo wider, wo das Priming des Inflammasoms zudem durch eine Reihe an DAMPs oder PAMPs aus dem periprothetischen Gewebe erfolgen könnte.

Der Unterschied zwischen CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln in der Aktivierung des Inflammasoms in MG63-Zellen könnte für eine verstärkte Beteiligung anderer Aktivierungsmechanismen, wie z. B. ROS, in Osteoblasten sprechen. Caideco et al. haben gezeigt, dass CoCrMo-Partikel mit einer unebenen Oberfläche das Inflammasom in Makrophagen phagozytoseunabhängig aktivieren können, zudem zeigte sich bei Partikeln mit einem Durchmesser von 6,3  $\mu\text{m}$  eine stärkere IL-1 $\beta$  Sekretion als bei Partikeln mit einem Durchmesser von 1,1  $\mu\text{m}$  (54). In dieser Arbeit war der Durchmesser der CoNiCrMo-Partikel im Vergleich zu den TiAlV-Partikeln leicht erhöht, was die beobachteten partikelspezifischen Unterschiede zusätzlich verstärkt haben könnte, da von Partikeln mit einer größeren Oberfläche mehr Ionen freigesetzt werden können. Metallionen steigern die Bildung von ROS in den Mitochondrien und können über diesen Mechanismus zu einer Aktivierung des Inflammasoms führen (136, 140–142). Samelko et al. haben zudem gezeigt, dass CoCrMo-Partikel im Vergleich zu TiAlV-Partikeln eine höhere Produktion von ROS in Makrophagen

verursachen (184). In einem Mausmodell konnten eine höhere Produktion von IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  sowie eine stärkere Induktion von Osteolysen durch CoCrMo-Partikel im Vergleich zu Ti-Partikeln beobachtet werden (139). Insgesamt müssen die Signalwege der Inflammation durch Partikel in den unterschiedlichen Zellen noch weiter untersucht werden, um sichere Rückschlüsse auf die Effekte von verschiedenen Materialien ziehen zu können.

Die Co-35Ni-20Cr-10Mo-Legierung, aus der die verwendeten CoNiCrMo-Partikel hergestellt wurden, ist für den Einsatz in medizinischen Implantaten zugelassen und wird hauptsächlich in zementierten Prothesenschäften eingesetzt (156). Heutzutage kommen allerdings in der Regel CoCrMo-Legierungen nach ISO 5832-4 mit einem Nickel-Anteil  $\leq 1\%$  zum Einsatz (3).

Inwieweit eine bestehende Kontaktsensibilisierung gegen Nickel das Risiko von Komplikationen nach Implantation einer Prothese mit einer CoNiCrMo-Legierung steigert, ist umstritten (3). Es gibt Hinweise dafür, dass Nickel-Ionen über die Aktivierung des NLRP3-Inflammationssoms und die Sekretion von IL-1 $\beta$  die Produktion von IL-17 A/F durch CD4 $^{+}$ -T-Zellen fördern und dadurch eine Rolle bei der Entstehung einer Typ IV-Allergie auf Metallabrieb spielen könnten (185).

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind vergleichbar mit Studien, in denen CoCrMo-Legierungen mit einem deutlich geringeren Nickel-Anteil ( $< 1\%$ ) verwendet wurden (51, 54). In Studien, die die proinflammatorischen Eigenschaften verschiedener Ionen verglichen haben, wurde festgestellt, dass Chrom-Ionen das Inflammationssom stärker aktivieren als Nickel-Ionen (141). Dies lässt darauf schließen, dass Nickel im Vergleich zu den anderen Bestandteilen der getesteten Legierung wahrscheinlich nicht den Hauptfaktor für die Aktivierung des Inflammationssoms darstellt. Um Effekte des Nickel-Anteils der Legierung sicher auszuschließen, müsste man aber die Legierungen direkt miteinander vergleichen.

Die untersuchte TiAl6V4-Legierung gehört zu den am häufigsten in Implantaten verwendeten Legierungen. Sie wird unter anderem bei Hüft-TEPs für unzementierte Pfannen oder Schäfte verwendet (3). Die Tibia- und Femurkomponenten von Knie-TEPs werden ebenfalls aus TiAlV- und TiAlNb- oder CoCrMo-Legierungen hergestellt (37).

In den meisten vergleichbaren Studien wurden reine Ti-Partikel eingesetzt (65, 75, 161). Reintitan wird aber aufgrund der geringen Festigkeit in Endoprothesen seltener eingesetzt als Titanlegierungen. Der Mengenanteil von Aluminium und Vanadium in der TiAlV-Legierung liegt zwar nur bei 6 bzw. 4 %, trotzdem kann ein Einfluss auf die Aktivierung des Inflammationssoms nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere Vanadium steht auch im Verdacht, zytotoxische oder allergische Effekte auszulösen (186–188). Da die verwendete TiAlV- neben der TiAlNb-Legierung sehr häufig zum Einsatz kommt, entsprechen die

verwendeten Partikel in ihrer Zusammensetzung eher den Abriebpartikeln von Patienten mit einer Endoprothese als reine Ti-Partikel (3).

Die Analyse der chemischen Zusammensetzung der Partikel in der EDS ergab, dass sie größtenteils mit den Angaben für die jeweilige Legierung aus den ISO-Normen übereinstimmen. Die geringfügigen Abweichungen in der Verteilung der Elemente könnten dadurch bedingt sein, dass für jede Probe nur ein Ausschnitt gemessen wurde.

Auch wenn die getesteten Legierungen nicht in MoM-Prothesen eingesetzt werden, können trotzdem Abriebpartikel aus ihnen entstehen. In Hüft-TEPs werden Metallpartikel und -ionen unter anderem an der Steckverbindung von Prothesenkopf und -schaft durch Reibung und Korrosion freigesetzt. Durch diesen Mechanismus können auch bei der Verwendung von MoP-Gleitpaarungen oder Keramik-Köpfen klinische relevante Mengen an Metallabrieb entstehen (59, 60, 189).

#### **4.5 Fazit**

In dieser Arbeit wurden erstmalig die Effekte von CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel auf unterschiedliche gelenkständige Zellarten verglichen. Zusammenfassend zeigten sich zellartenspezifische Unterschiede in der Partikelaufnahme und der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms. Es konnte gezeigt werden, dass das Inflammasom nicht nur in Makrophagen, sondern auch in einer osteoblastenähnlichen Zelllinien (MG63) durch Metallpartikel aktiviert werden kann. Hier zeigte sich, dass das Inflammasom in MG63-Zellen fast ausschließlich durch CoNiCrMo-Partikel und nicht durch TiAlV-Partikel aktiviert werden kann. Möglicherweise spielen ROS eine Rolle bei der Aktivierung des Inflammasoms durch Metallpartikel. Im periprothetischen Gewebe von Revisionseingriffen zeigte sich eine signifikant erhöhte Menge an 4-HNE als Marker für oxidativen Stress im Vergleich zu Synovialgewebe von Primärimplantationen. Es sind weitere Untersuchungen nötig, um die Aktivierungsmechanismen des Inflammasoms in den unterschiedlichen Zellarten zu verstehen. Sollte sich der Unterschied in der Aktivierung des Inflammasoms zwischen CoNiCrMo- und TiAlV- Partikel in Osteoblasten bestätigen, könnte dies bei der Weiterentwicklung von Prothesenmaterialien eine Rolle spielen. Zudem wäre es sinnvoll, die gegenseitige Beeinflussung der gelenkständigen Zellen, z. B. in einer Co-Kultur, zu untersuchen.

#### **4.6 Ausblick**

Die Implantation von TEPs des Hüft- und Kniegelenks gehört zu den am häufigsten durchgeführten Operationen. Zudem wird in Zukunft mit einem weiteren Anstieg der Implantationszahlen gerechnet (9). Trotz stetiger Verbesserungen des Implantatdesigns von Hüft- und Knie-TEPs ist es bislang nicht möglich, das Auftreten von aseptischen Prothesenlockerungen zu verhindern. Im Moment stellt eine Revisionsoperation die Therapie

der Wahl bei einer aseptischen Prothesenlockerung dar. Es wurden diverse pharmakologische Therapien mit dem Ziel, den periprothetischen Knochenverlust aufzuhalten und somit die Revisionsoperation hinauszuzögern, untersucht, von denen aber bislang keine für den routinemäßigen klinischen Einsatz geeignet ist.

Falls sich die Hypothese bestätigt, dass die Aktivierung des Inflammasoms eine Hauptursache für eine aseptische Prothesenlockerung darstellt, könnte eine Inhibition von IL-1 oder Inflammasombestandteilen zur Therapie genutzt werden (190, 191). IL-1-Antikörper wie z. B. Anakinra, Rilonacept oder Canakinumab werden unter anderem erfolgreich in der Therapie der rheumatoiden Arthritis oder CAPS angewendet (127–129, 192). Außerdem könnten in Zukunft NLRP3-Inhibitoren eine Möglichkeit darstellen, die Produktion von IL-1 $\beta$  deutlich zu reduzieren (99, 193, 194). NLRP3-Inhibitoren werden aktuell auch als potentielle Therapieoption für Osteoporose untersucht (194, 195).

Zudem könnte die Entwicklung von haltbareren und bioverträglicheren Prothesenmaterialien die Abriebmenge und die adversen Reaktionen auf Abriebpartikel reduzieren und somit zu einer Verbesserung der Prothesenstandzeiten beitragen.



## 5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln auf die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in periprotetischen Zellen als mögliche Ursache für aseptische Prothesenlockerungen untersucht.

Oxidativer Stress stellt einen potentiellen Aktivator des NLRP3-Inflammasoms dar. In der immunhistochemischen Färbung von Gewebeschnitten von Revisionen von MoM-Hüft-TEPs war die Menge von 4-HNE als Marker für oxidativen Stress im Vergleich zu Primärimplantationen signifikant erhöht.

Die Aktivierung des Inflammasoms nach Inkubation mit CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln für 24 h wurde in MM6-, MG63- und Jurkat-Zellen mittels qRT-PCR, Western Blot und Immuncytochemie (ICC) untersucht. In der Phalloidin-Red-Färbung zeigte sich kein Unterschied in der Aufnahme zwischen den beiden untersuchten Partikelarten, allerdings war die Partikelaufnahme der Jurkat-Zellen geringer als bei den anderen Zelllinien. Im WST-1-Assay konnte ein negativer Einfluss der Inkubation mit den getesteten Metallpartikeln für 24 h auf die Zellviabilität ausgeschlossen werden. In den MM6-Zellen wurden ein Priming und eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms durch beide Partikelarten beobachtet. Bei den MG63-Zellen konnte eine vermehrte Expression von Inflammasom-Bestandteilen und eine Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms im Western Blot und der ICC hauptsächlich nach einer Inkubation mit CoNiCrMo-Partikeln nachgewiesen werden, während die Inkubation mit TiAlV-Partikeln keinen Effekt hatte. In den Jurkat-Zellen zeigte sich bis auf eine leichte Erhöhung der ASC-Specks in der ICC keine Reaktion des Inflammasoms auf die Inkubation mit den getesteten Partikeln.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass es zellartenspezifische Unterschiede in der Partikelaufnahme und der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms gibt. Zudem zeigte sich in den MG63-Zellen eine Aktivierung des Inflammasoms durch CoNiCrMo-Partikel, während die Inkubation mit TiAlV-Partikeln keinen Effekt hatte.

Die Ergebnisse stimmen mit anderen Studien überein, in denen stärkere proinflammatorische Effekte von CoCr- im Vergleich zu Ti-Legierungen nachgewiesen wurden (139). Bislang wurden die Effekte von Metallpartikeln auf die Aktivierung des Inflammasoms überwiegend in Makrophagen untersucht. In dieser Arbeit wurden erstmalig die Unterschiede in der Inflammasomaktivierung zwischen verschiedenen periprotetischen Zellen verglichen und ein partikelartenspezifischer Unterschied in der Aktivierung des Inflammasoms in MG63-Zellen durch CoNiCrMo- und TiAlV-Partikel nachgewiesen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Jones CA, Voaklander DC, Johnston DW, Suarez-Almazor ME. Health related quality of life outcomes after total hip and knee arthroplasties in a community based population. *J Rheumatol* (2000) 27:1745–52.
2. Statistisches Bundesamt. Die 20 häufigsten Operationen insgesamt (OPS 5) (2019). <https://www.destatis.de/DE/Themen/Gesellschaft-Umwelt/Gesundheit/Krankenhaeuser/Tabellen/drg-operationen-insgesamt.html> (Accessed April 6, 2020).
3. Claes L, Kirschner P, Perka C, Rudert M. AE-Manual der Endoprothetik: Hüfte und Hüftrevision. Berlin, Heidelberg: Springer (2012). pp. 15-16, pp. 68-69, pp. 74-78, pp. 441-574.
4. Murphy L, Schwartz TA, Helmick CG, Renner JB, Tudor G, Koch G, et al. Lifetime risk of symptomatic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* (2008) 59:1207–13. doi:10.1002/art.24021
5. Murphy LB, Helmick CG, Schwartz TA, Renner JB, Tudor G, Koch GG, et al. One in four people may develop symptomatic hip osteoarthritis in his or her lifetime. *Osteoarthr Cartil* (2010) 18:1372–9. doi:10.1016/j.joca.2010.08.005
6. Silverwood V, Blagojevic-Bucknall M, Jinks C, Jordan JL, Protheroe J, Jordan KP. Current evidence on risk factors for knee osteoarthritis in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthr Cartil* (2015) 23:507–15. doi:10.1016/j.joca.2014.11.019
7. Järvholm B, Lewold S, Malchau H, Vingård E. Age, bodyweight, smoking habits and the risk of severe osteoarthritis in the hip and knee in men. *Eur J Epidemiol* (2005) 20:537–42. doi:10.1007/s10654-005-4263-x
8. Culliford DJ, Maskell J, Kiran A, Judge A, Javaid MK, Cooper C, et al. The lifetime risk of total hip and knee arthroplasty: results from the UK general practice research database. *Osteoarthr Cartil* (2012) 20:519–24. doi:10.1016/j.joca.2012.02.636
9. Sloan M, Premkumar A, Sheth NP. Projected Volume of Primary Total Joint Arthroplasty in the U.S., 2014 to 2030. *J Bone Joint Surg Am* (2018) 100:1455–60. doi:10.2106/JBJS.17.01617
10. Kurtz SM, Lau E, Ong K, Zhao K, Kelly M, Bozic KJ. Future young patient demand for primary and revision joint replacement: national projections from 2010 to 2030. *Clin Orthop Relat Res* (2009) 467:2606–12. doi:10.1007/s11999-009-0834-6
11. Schwartz AM, Farley KX, Guild GN, Bradbury TL. Projections and Epidemiology of Revision Hip and Knee Arthroplasty in the United States to 2030. *J Arthroplasty* (2020). doi:10.1016/j.arth.2020.02.030
12. Bayliss LE, Culliford D, Monk AP, Glyn-Jones S, Prieto-Alhambra D, Judge A, et al. The effect of patient age at intervention on risk of implant revision after total replacement of the hip or knee: a population-based cohort study. *The Lancet* (2017) 389:1424–30. doi:10.1016/S0140-6736(17)30059-4
13. McGrory BJ, Etkin CD, Lewallen DG. Comparing contemporary revision burden among hip and knee joint replacement registries. *Arthroplast Today* (2016) 2:83–6. doi:10.1016/j.artd.2016.04.003

14. Evans JT, Evans JP, Walker RW, Blom AW, Whitehouse MR, Sayers A. How long does a hip replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *The Lancet* (2019) 393:647–54. doi:10.1016/S0140-6736(18)31665-9
15. Mäkelä KT, Matilainen M, Pulkkinen P, Fenstad AM, Havelin LI, Engesaeter L, et al. Countrywise results of total hip replacement. An analysis of 438,733 hips based on the Nordic Arthroplasty Register Association database. *Acta Orthop* (2014) 85:107–16. doi:10.3109/17453674.2014.893498
16. Evans JT, Walker RW, Evans JP, Blom AW, Sayers A, Whitehouse MR. How long does a knee replacement last? A systematic review and meta-analysis of case series and national registry reports with more than 15 years of follow-up. *The Lancet* (2019) 393:655–63. doi:10.1016/S0140-6736(18)32531-5
17. Ulrich SD, Seyler TM, Bennett D, Delanois RE, Saleh KJ, Thongtrangan I, et al. Total hip arthroplasties: what are the reasons for revision? *Int Orthop* (2008) 32:597–604. doi:10.1007/s00264-007-0364-3
18. Sadoghi P, Liebensteiner M, Agreiter M, Leithner A, Böhler N, Labek G. Revision surgery after total joint arthroplasty: a complication-based analysis using worldwide arthroplasty registers. *J Arthroplasty* (2013) 28:1329–32. doi:10.1016/j.arth.2013.01.012
19. Lombardi AV, Berend KR, Adams JB. Why knee replacements fail in 2013: patient, surgeon, or implant? *Bone Joint J* (2014) 96-B:101–4. doi:10.1302/0301-620X.96B11.34350
20. Thiele K, Perka C, Matziolis G, Mayr HO, Sostheim M, Hube R. Current failure mechanisms after knee arthroplasty have changed: polyethylene wear is less common in revision surgery. *J Bone Joint Surg Am* (2015) 97:715–20. doi:10.2106/JBJS.M.01534
21. Smith AJ, Dieppe P, Vernon K, Porter M, Blom AW. Failure rates of stemmed metal-on-metal hip replacements: analysis of data from the National Joint Registry of England and Wales. *The Lancet* (2012) 379:1199–204. doi:10.1016/S0140-6736(12)60353-5
22. Seppänen M, Laaksonen I, Pulkkinen P, Eskelinen A, Puhto A-P, Kettunen J, et al. High Revision Rate for Large-head Metal-on-metal THA at a Mean of 7.1 Years: A Registry Study. *Clin Orthop Relat Res* (2018) 476:1223–30. doi:10.1007/s11999.0000000000000159
23. Bozic KJ, Katz P, Cisternas M, Ono L, Ries MD, Showstack J. Hospital resource utilization for primary and revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* (2005) 87:570–6. doi:10.2106/JBJS.D.02121
24. Ong KL, Lau E, Suggs J, Kurtz SM, Manley MT. Risk of subsequent revision after primary and revision total joint arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* (2010) 468:3070–6. doi:10.1007/s11999-010-1399-0
25. Law JI, Crawford DA, Adams JB, Lombardi AV. Metal-on-Metal Total Hip Revisions: Pearls and Pitfalls. *J Arthroplasty* (2020) 35:S68–S72. doi:10.1016/j.arth.2020.01.011
26. Kallala RF, Vanhegan IS, Ibrahim MS, Sarmah S, Haddad FS. Financial analysis of revision knee surgery based on NHS tariffs and hospital costs: does it pay to provide a revision service? *Bone Joint J* (2015) 97-B:197–201. doi:10.1302/0301-620X.97B2.33707

27. Schaumburger J, Winkler S, Handel M, Grifka J, Baier C. Prothesenlockerung. *Z Rheumatol* (2012) 71:785–97. doi:10.1007/s00393-012-1042-4
28. Mushtaq N, To K, Gooding C, Khan W. Radiological Imaging Evaluation of the Failing Total Hip Replacement. *Front. Surg.* (2019) 6:35. doi:10.3389/fsurg.2019.00035
29. Lohmann CH, Rampal S, Lohrengel M, Singh G. Imaging in peri-prosthetic assessment: an orthopaedic perspective. *EFORT Open Reviews* (2017) 117–25. doi:10.1302/2058-5241.2.160058
30. Hannemann F, Hartmann A, Schmitt J, Lützner J, Seidler A, Campbell P, et al. European multidisciplinary consensus statement on the use and monitoring of metal-on-metal bearings for total hip replacement and hip resurfacing. *Orthop Traumatol Surg Res* (2013) 99:263–71. doi:10.1016/j.otsr.2013.01.005
31. Morawietz L, Classen R-A, Schröder JH, Dynybil C, Perka C, Skwara A, et al. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol* (2006) 59:591–7. doi:10.1136/jcp.2005.027458
32. Grimberg A, Jansson V, Lützner J, Melsheimer O, Morlock M, Steinbrück A. Endoprothesenregister Deutschland (EPRD) - Jahresbericht 2020. Berlin: EPRD Deutsches Endoprothesenregister (2020). p. 20.
33. Grimberg A, Jansson V, Melsheimer O, Steinbrück A. Endoprothesenregister Deutschland (ERP) - Jahresbericht 2019. Berlin: EPRD Deutsches Endoprothesenregister (2019). p. 18.
34. Kim S-M, Rhyu KH, Yoo JJ, Lim S-J, Yoo JH, Kweon SH, et al. The reasons for ceramic-on-ceramic revisions between the third- and fourth-generation bearings in total hip arthroplasty from multicentric registry data. *Sci Rep* (2021) 11:5539. doi:10.1038/s41598-021-85193-7
35. Mai K, Verioti C, Ezzet KA, Copp SN, Walker RH, Colwell CW. Incidence of 'squeaking' after ceramic-on-ceramic total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* (2010) 468:413–7. doi:10.1007/s11999-009-1083-4
36. Grothe T, Postler A, Nowotny J, Lützner J, Günther KP, Klemm H-T. Endoprothetik der großen Gelenke. *Trauma Berufskrankh* (2019) 21:127–43. doi:10.1007/s10039-019-0423-1
37. Wirtz DC. AE-Manual der Endoprothetik Knie. Berlin, Heidelberg: Springer (2011). pp. 57-59.
38. Trieb K, Ullmann D, Metzinger K, Kramar R, Mauerer A, Hofstätter S, et al. Prospektiver Vergleich einer metallfreien Keramik-Knietotalendoprothese mit der identen Metallversion. *Z Orthop Unfall* (2018) 156:46–52. doi:10.1055/s-0043-118600
39. Paxton EW, Inacio MCS, Kurtz S, Love R, Cafri G, Namba RS. Is there a difference in total knee arthroplasty risk of revision in highly crosslinked versus conventional polyethylene? *Clin Orthop Relat Res* (2015) 473:999–1008. doi:10.1007/s11999-014-4046-3
40. Goodman SB, Gallo J. Periprosthetic Osteolysis: Mechanisms, Prevention and Treatment. *J Clin Med* (2019) 8:(12):2091. doi:10.3390/jcm8122091

41. McKellop HA, Hart A, Park S-H, Hothi H, Campbell P, Skinner JA. A lexicon for wear of metal-on-metal hip prostheses. *J Orthop Res* (2014) 32:1221–33. doi:10.1002/jor.22651
42. McKellop HA. The lexicon of polyethylene wear in artificial joints. *Biomaterials* (2007) 28:5049–57. doi:10.1016/j.biomaterials.2007.07.040
43. Salem KH, Lindner N, Tingart M, Elmoghazi AD. Severe metallosis-related osteolysis as a cause of failure after total knee replacement. *J Clin Orthop Trauma* (2020) 11:165–70. doi:10.1016/j.jcot.2019.04.010
44. Andersen HN, Ernst C, Frandsen PA. Polyethylene failure of metal-backed patellar components. 111 AGC total knees followed for 7-22 months. *Acta Orthop Scand* (1991) 62:1–3. doi:10.3109/17453679108993081
45. Yang S, Zhang K, Jiang J, James B, Yang S-Y. Particulate and ion forms of cobalt-chromium challenged preosteoblasts promote osteoclastogenesis and osteolysis in a murine model of prosthesis failure. *J Biomed Mater Res A* (2019) 107:187–94. doi:10.1002/jbm.a.36553
46. Hirashima Y, Ishiguro N, Kondo S, Iwata H. Osteoclast induction from bone marrow cells is due to pro-inflammatory mediators from macrophages exposed to polyethylene particles: a possible mechanism of osteolysis in failed THA. *J Biomed Mater Res* (2001) 56:177–83. doi:10.1002/1097-4636(200108)56:2<177:aid-jbm1082>3.0.co;2-h
47. Willert HG, Bertram H, Buchhorn GH. Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of bone cement fragmentation. *Clin Orthop Relat Res* (1990) 108–21.
48. Harris WH. Osteolysis and particle disease in hip replacement. A review. *Acta Orthop Scand* (1994) 65:113–23. doi:10.3109/17453679408993734
49. Willert HG, Bertram H, Buchhorn GH. Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. *Clin Orthop Relat Res* (1990) 95–107.
50. Lombardi AV, Berend KR, Adams JB, Satterwhite KL. Adverse Reactions to Metal on Metal Are Not Exclusive to Large Heads in Total Hip Arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res* (2016) 474:432–40. doi:10.1007/s11999-015-4539-8
51. Landgraeber S, Samelko L, McAllister K, Putz S, Jacobs JJ, Hallab NJ. CoCrMo alloy vs. UHMWPE Particulate Implant Debris Induces Sex Dependent Aseptic Osteolysis Responses In Vivo using a Murine Model. *Open Orthop J* (2018) 12:115–24. doi:10.2174/1874325001812010115
52. Jiang Y, Jia T, Gong W, Wooley PH, Yang S-Y. Effects of Ti, PMMA, UHMWPE, and Co-Cr wear particles on differentiation and functions of bone marrow stromal cells. *J Biomed Mater Res A* (2013) 101:2817–25. doi:10.1002/jbm.a.34595
53. Zhang K, Yang S-Y, Yang S, Bai L, Li P, Liu D, et al. Different influence of Ti, PMMA, UHMWPE, and Co-Cr particles on peripheral blood monocytes during periprosthetic inflammation. *J Biomed Mater Res A* (2015) 103:358–64. doi:10.1002/jbm.a.35176
54. Caicedo MS, Samelko L, McAllister K, Jacobs JJ, Hallab NJ. Increasing both CoCrMo-alloy particle size and surface irregularity induces increased macrophage inflammasome activation in vitro potentially through lysosomal destabilization mechanisms. *J Orthop Res* (2013) 31:1633–42. doi:10.1002/jor.22411

55. Topolovec M, Cör A, Milošev I. Metal-on-metal vs. metal-on-polyethylene total hip arthroplasty tribological evaluation of retrieved components and periprosthetic tissue. *J Mech Behav Biomed Mater* (2014) 34:243–52. doi:10.1016/j.jmbbm.2014.02.018.
56. Doorn PF, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC. Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: Transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. *J Biomed Mater Res* (1998) 42:103–11. doi:10.1002/(SICI)1097-4636(199810)42:1<103:AID-JBM13>3.0.CO;2-M
57. Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bull NYU Hosp Jt Dis* (2009) 67:182–8.
58. Higuchi Y, Seki T, Takegami Y, Komatsu D, Morita D, Ishiguro N. Same survival but higher rate of osteolysis for metal-on-metal Ultamet versus ceramic-on-ceramic in patients undergoing primary total hip arthroplasty after 8 years of follow-up. *Orthop Traumatol Surg Res* (2018) 104:1155–61. doi:10.1016/j.otsr.2018.08.005
59. Lindgren JU, Brismar BH, Wikstrom AC. Adverse reaction to metal release from a modular metal-on-polyethylene hip prosthesis. *J Bone Joint Surg Br* (2011) 93:1427–30. doi:10.1302/0301-620X.93B10.27645
60. Bhalekar RM, Smith SL, Joyce TJ. Wear at the taper-trunnion junction of contemporary ceramic-on-ceramic hips shown in a multistation hip simulator. *J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater* (2019) 107:1199–209. doi:10.1002/jbm.b.34213
61. Hart AJ, Muirhead-Allwood S, Porter M, Matthies A, Ilo K, Maggiore P, et al. Which factors determine the wear rate of large-diameter metal-on-metal hip replacements? Multivariate analysis of two hundred and seventy-six components. *J Bone Joint Surg Am* (2013) 95:678–85. doi:10.2106/JBJS.J.01447
62. Wang S, Zhang S, Zhao Y. A comparison of polyethylene wear between cobalt-chrome ball heads and alumina ball heads after total hip arthroplasty: a 10-year follow-up. *J Orthop Surg Res* (2013) 8:20. doi:10.1186/1749-799X-8-20
63. Grosse S, Haugland HK, Lilleng P, Ellison P, Hallan G, Høl PJ. Wear particles and ions from cemented and uncemented titanium-based hip prostheses—a histological and chemical analysis of retrieval material. *Journal of biomedical materials research. Part B* (2015) 103:709–17. doi:10.1002/jbm.b.33243
64. Nich C, Takakubo Y, Pajarinen J, Ainola M, Salem A, Sillat T, et al. Macrophages – Key Cells in the Response to Wear Debris from Joint Replacements. *J Biomed Mater Res A* (2013) 101:3033–45. doi:10.1002/jbm.a.34599
65. St Pierre CA, Chan M, Iwakura Y, Ayers DC, Kurt-Jones EA, Finberg RW. Periprosthetic osteolysis: Characterizing the innate immune response to titanium wear-particles. *J Orthop Res* (2010) 28:1418–24. doi:10.1002/jor.21149
66. Kaufman AM, Alabre CI, Rubash HE, Shanbhag AS. Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays. *J Biomed Mater Res A* (2008) 84:464–74. doi:10.1002/jbm.a.31467
67. Gibon E, Ma T, Ren P-G, Fritton K, Biswal S, Yao Z, et al. Selective inhibition of the MCP-1-CCR2 ligand-receptor axis decreases systemic trafficking of macrophages in the presence of UHMWPE particles. *J Orthop Res* (2012) 30:547–53. doi:10.1002/jor.21548

68. Nakashima Y, Sun DH, Trindade MC, Chun LE, Song Y, Goodman SB, et al. Induction of macrophage C-C chemokine expression by titanium alloy and bone cement particles. *J Bone Joint Surg Br* (1999) 81:155–62. doi:10.1302/0301-620x.81b1.8884
69. Ruscitti P, Cipriani P, Carubbi F, Liakouli V, Zazzeroni F, Di Benedetto P, et al. The role of IL-1 $\beta$  in the bone loss during rheumatic diseases. *Mediators Inflamm* (2015) 2015:782382. doi:10.1155/2015/782382
70. Lorenzo J, Horowitz M, Choi Y. Osteoimmunology: Interactions of the bone and immune system. *Endocr Rev* (2008) 29:403–40. doi:10.1210/er.2007-0038
71. Rakow A, Schoon J, Dienelt A, John T, Textor M, Duda G, et al. Influence of particulate and dissociated metal-on-metal hip endoprosthesis wear on mesenchymal stromal cells in vivo and in vitro. *Biomaterials* (2016) 98:31–40. doi:10.1016/j.biomaterials.2016.04.023
72. Vermes C, Chandrasekaran R, Jacobs JJ, Galante JO, Roebuck KA, Glant TT. The effects of particulate wear debris, cytokines, and growth factors on the functions of MG-63 osteoblasts. *J Bone Joint Surg Am* (2001) 83-A:201–11. doi:10.2106/00004623-200102000-00007.
73. Sundfeldt M, Carlsson LV, Johansson CB, Thomsen P, Gretzer C. Aseptic loosening, not only a question of wear: a review of different theories. *Acta Orthop* (2006) 77:177–97. doi:10.1080/17453670610045902
74. Aspenberg P, Goodman S, Toksvig-Larsen S, Ryd L, Albrektsson T. Intermittent micromotion inhibits bone ingrowth. Titanium implants in rabbits. *Acta Orthop Scand* (1992) 63:141–5. doi:10.3109/17453679209154809
75. Amirhosseini M, Andersson G, Aspenberg P, Fahlgren A. Mechanical instability and titanium particles induce similar transcriptomic changes in a rat model for periprosthetic osteolysis and aseptic loosening. *Bone Rep* (2017) 7:17–25. doi:10.1016/j.bonr.2017.07.003
76. Fahlgren A, Bostrom MPG, Yang X, Johansson L, Edlund U, Agholme F, et al. Fluid pressure and flow as a cause of bone resorption. *Acta Orthop* (2010) 81:508–16. doi:10.3109/17453674.2010.504610
77. van Lenthe GH, Waal Malefijt MC de, Huiskes R. Stress shielding after total knee replacement may cause bone resorption in the distal femur. *J Bone Joint Surg Br* (1997) 79:117–22. doi:10.1302/0301-620x.79b1.6808
78. Schmalzried TP, Jasty M, Harris WH. Periprosthetic bone loss in total hip arthroplasty. Polyethylene wear debris and the concept of the effective joint space. *J Bone Joint Surg Am* (1992) 74:849–63.
79. Meehan JP, Danielsen B, Kim SH, Jamali AA, White RH. Younger age is associated with a higher risk of early periprosthetic joint infection and aseptic mechanical failure after total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* (2014) 96:529–35. doi:10.2106/JBJS.M.00545
80. Cherian JJ, Jauregui JJ, Banerjee S, Pierce T, Mont MA. What Host Factors Affect Aseptic Loosening After THA and TKA? *Clin Orthop Relat Res* (2015) 473:2700–9. doi:10.1007/s11999-015-4220-2

81. Münger P, Röder C, Ackermann-Liebrich U, Busato A. Patient-related risk factors leading to aseptic stem loosening in total hip arthroplasty: a case-control study of 5,035 patients. *Acta Orthop* (2006) 77:567–74. doi:10.1080/17453670610012629
82. Lübbecke A, Stern R, Garavaglia G, Zurcher L, Hoffmeyer P. Differences in outcomes of obese women and men undergoing primary total hip arthroplasty. *Arthritis Rheum* (2007) 57:327–34. doi:10.1002/art.22542
83. Haddad FS, Thakrar RR, Hart AJ, Skinner JA, Nargol AVF, Nolan JF, et al. Metal-on-metal bearings: the evidence so far. *J Bone Joint Surg Br* (2011) 93:572–9. doi:10.1302/0301-620X.93B4.26429
84. Campbell P, Ebrahimzadeh E, Nelson S, Takamura K, Smet K de, Amstutz HC. Histological Features of Pseudotumor-like Tissues From Metal-on-Metal Hips. *Clin Orthop Relat Res* (2010) 468:2321–7. doi:10.1007/s11999-010-1372-y
85. Pandit H, Vlychou M, Whitwell D, Crook D, Luqmani R, Ostlere S, et al. Necrotic granulomatous pseudotumours in bilateral resurfacing hip arthroplasties: evidence for a type IV immune response. *Virchows Arch* (2008) 453:529–34. doi:10.1007/s00428-008-0659-9
86. Bisschop R, Boomsma MF, van Raay JJAM, Tiebosch ATMG, Maas M, Gerritsma CLE. High prevalence of pseudotumors in patients with a Birmingham Hip Resurfacing prosthesis: a prospective cohort study of one hundred and twenty-nine patients. *J Bone Joint Surg Am* (2013) 95:1554–60. doi:10.2106/JBJS.L.00716
87. Watters TS, Cardona DM, Menon KS, Vinson EN, Bolognesi MP, Dodd LG. Aseptic lymphocyte-dominated vasculitis-associated lesion: a clinicopathologic review of an underrecognized cause of prosthetic failure. *Am J Clin Pathol* (2010) 134:886–93. doi:10.1309/AJCLPTNEUAH8XI4W
88. Miller RA, Ro JY, Schwartz MR. Adverse tissue reactions after total hip arthroplasty. *Ann Diagn Pathol* (2017) 27:83–7. doi:10.1016/j.anndiagpath.2016.07.006
89. Steens W, Foerster G von, Katzer A. Severe cobalt poisoning with loss of sight after ceramic-metal pairing in a hip--a case report. *Acta Orthop* (2006) 77:830–2. doi:10.1080/17453670610013079
90. Bradberry SM, Wilkinson JM, Ferner RE. Systemic toxicity related to metal hip prostheses. *Clin Toxicol (Phila)* (2014) 52:837–47. doi:10.3109/15563650.2014.944977
91. Wagner P, Olsson H, Lidgren L, Robertsson O, Ranstam J. Increased cancer risks among arthroplasty patients: 30 year follow-up of the Swedish Knee Arthroplasty Register. *Eur J Cancer* (2011) 47:1061–71. doi:10.1016/j.ejca.2010.11.023
92. Mäkelä KT, Visuri T, Pulkkinen P, Eskelinen A, Remes V, Virolainen P, et al. Risk of cancer with metal-on-metal hip replacements: population based study. *BMJ* (2012) 345:e4646. doi:10.1136/bmj.e4646
93. Hunt LP, Blom AW, Matharu GS, Porter ML, Whitehouse MR. The risk of developing cancer following metal-on-metal hip replacement compared with non metal-on-metal hip bearings: Findings from a prospective national registry "The National Joint Registry of England, Wales, Northern Ireland and the Isle of Man". *PLoS ONE* (2018) 13.9:e0204356. doi:10.1371/journal.pone.0204356



94. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome. *Molecular Cell* (2002) 10:417–26. doi:10.1016/S1097-2765(02)00599-3
95. Schroder K, Tschopp J. The inflammasomes. *Cell* (2010) 140:821–32. doi:10.1016/j.cell.2010.01.040
96. Kummer JA, Broekhuizen R, Everett H, Agostini L, Kuijk L, Martinon F, et al. Inflammasome components NALP 1 and 3 show distinct but separate expression profiles in human tissues suggesting a site-specific role in the inflammatory response. *J Histochem Cytochem* (2007) 55:443–52. doi:10.1369/jhc.6A7101.2006
97. McCall SH, Sahraei M, Young AB, Worley CS, Duncan JA, Ting JP-Y, et al. Osteoblasts express NLRP3, a nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat region containing receptor implicated in bacterially induced cell death. *J Bone Miner Res* (2008) 23:30–40. doi:10.1359/jbmr.071002
98. Swanson KV, Deng M, Ting JP-Y. The NLRP3 inflammasome: molecular activation and regulation to therapeutics. *Nat Rev Immunol* (2019) 19:477–89. doi:10.1038/s41577-019-0165-0
99. Ozaki E, Campbell M, Doyle SL. Targeting the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases: Current perspectives. *J Inflamm Res* (2015) 8:15–27. doi:10.2147/JIR.S51250
100. Agostini L, Martinon F, Burns K, McDermott MF, Hawkins PN, Tschopp J. NALP3 Forms an IL-1 $\beta$ -Processing Inflammasome with Increased Activity in Muckle-Wells Autoinflammatory Disorder. *Immunity* (2004) 20:319–25. doi:10.1016/S1074-7613(04)00046-9
101. Juliana C, Fernandes-Alnemri T, Kang S, Farias A, Qin F, Alnemri ES. Non-transcriptional priming and deubiquitination regulate NLRP3 inflammasome activation. *J Biol Chem* (2012) 287:36617–22. doi:10.1074/jbc.M112.407130
102. Franchi L, Eigenbrod T, Núñez G. Cutting edge: TNF-alpha mediates sensitization to ATP and silica via the NLRP3 inflammasome in the absence of microbial stimulation. *J Immunol* (2009) 183:792–6. doi:10.4049/jimmunol.0900173
103. Bauernfeind FG, Horvath G, Stutz A, Alnemri ES, MacDonald K, Speert D, et al. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol* (2009) 183:787–91. doi:10.4049/jimmunol.0901363
104. Yazdi AS, Guarda G, Riteau N, Drexler SK, Tardivel A, Couillin I, et al. Nanoparticles activate the NLR pyrin domain containing 3 (Nlrp3) inflammasome and cause pulmonary inflammation through release of IL-1 $\alpha$  and IL-1 $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A* (2010) 107:19449–54. doi:10.1073/pnas.1008155107
105. Dostert C, Pétrilli V, van Bruggen R, Steele C, Mossman BT, Tschopp J. Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica. *Science* (2008) 320:674–7. doi:10.1126/science.1156995
106. Sha W, Mitoma H, Hanabuchi S, Bao M, Weng L, Sugimoto N, et al. Human NLRP3 inflammasome senses multiple types of bacterial RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2014) 111:16059–64. doi:10.1073/pnas.1412487111

107. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K<sup>+</sup> efflux is the common trigger of NLRP3 inflammasome activation by bacterial toxins and particulate matter. *Immunity* (2013) 38:1142–53. doi:10.1016/j.immuni.2013.05.016
108. Di A, Xiong S, Ye Z, Malireddi RKS, Kometani S, Zhong M, et al. The TWIK2 Potassium Efflux Channel in Macrophages Mediates NLRP3 Inflammasome-Induced Inflammation. *Immunity* (2018) 49:56-65.e4. doi:10.1016/j.immuni.2018.04.032
109. Pétrilli V, Papin S, Dostert C, Mayor A, Martinon F, Tschopp J. Activation of the NALP3 inflammasome is triggered by low intracellular potassium concentration. *Cell Death Differ* (2007) 14:1583–9. doi:10.1038/sj.cdd.4402195
110. Tang T, Lang X, Xu C, Wang X, Gong T, Yang Y, et al. CLICs-dependent chloride efflux is an essential and proximal upstream event for NLRP3 inflammasome activation. *Nat Commun* (2017) 8:202. doi:10.1038/s41467-017-00227-x
111. Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol (Lond)* (2003) 552:335–44. doi:10.1113/jphysiol.2003.049478
112. Zhou R, Yazdi AS, Menu P, Tschopp J. A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation. *Nature* (2011) 469:221–5. doi:10.1038/nature09663
113. Groß CJ, Mishra R, Schneider KS, Médard G, Wettmarshausen J, Dittlein DC, et al. K<sup>+</sup> Efflux-Independent NLRP3 Inflammasome Activation by Small Molecules Targeting Mitochondria. *Immunity* (2016) 45:761–73. doi:10.1016/j.immuni.2016.08.010
114. Shimada K, Crother TR, Karlin J, Dagvadorj J, Chiba N, Chen S, et al. Oxidized mitochondrial DNA activates the NLRP3 inflammasome during apoptosis. *Immunity* (2012) 36:401–14. doi:10.1016/j.immuni.2012.01.009
115. Hornung V, Bauernfeind F, Halle A, Samstad EO, Kono H, Rock KL, et al. Silica crystals and aluminum salts activate the NALP3 inflammasome through phagosomal destabilization. *Nat Immunol* (2008) 9:847–56. doi:10.1038/ni.1631
116. Attur MG, Patel IR, Patel RN, Abramson SB, Amin AR. Autocrine production of IL-1 beta by human osteoarthritis-affected cartilage and differential regulation of endogenous nitric oxide, IL-6, prostaglandin E2, and IL-8. *Proc Assoc Am Physicians* (1998) 110:65–72.
117. Wang X, Feuerstein GZ, Gu JL, Lysko PG, Yue TL. Interleukin-1 beta induces expression of adhesion molecules in human vascular smooth muscle cells and enhances adhesion of leukocytes to smooth muscle cells. *Atherosclerosis* (1995) 115:89–98. doi:10.1016/0021-9150(94)05503-b
118. Masters SL, Dunne A, Subramanian SL, Hull RL, Tannahill GM, Sharp FA, et al. Activation of the NLRP3 inflammasome by islet amyloid polypeptide provides a mechanism for enhanced IL-1 $\beta$  in type 2 diabetes. *Nat Immunol* (2010) 11:897–904. doi:10.1038/ni.1935
119. Dong X, Zheng Z, Lin P, Fu X, Li F, Jiang J, et al. ACPAs promote IL-1 $\beta$  production in rheumatoid arthritis by activating the NLRP3 inflammasome. *Cell Mol Immunol* (2020) 17:261–71. doi:10.1038/s41423-019-0201-9
120. Kobayashi M, Squires GR, Mousa A, Tanzer M, Zukor DJ, Antoniou J, et al. Role of interleukin-1 and tumor necrosis factor alpha in matrix degradation of human osteoarthritic cartilage. *Arthritis Rheum* (2005) 52:128–35. doi:10.1002/art.20776

121. Nakashima T, Kobayashi Y, Yamasaki S, Kawakami A, Eguchi K, Sasaki H, et al. Protein expression and functional difference of membrane-bound and soluble receptor activator of NF-kappaB ligand: modulation of the expression by osteotropic factors and cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 275:768–75. doi:10.1006/bbrc.2000.3379
122. Epstein NJ, Warme BA, Spanogle J, Ma T, Bragg B, Smith RL, et al. Interleukin-1 modulates periprosthetic tissue formation in an intramedullary model of particle-induced inflammation. *J Orthop Res* (2005) 23:501–10. doi:10.1016/j.orthres.2004.10.004
123. Yang S-Y, Wu B, Mayton L, Mukherjee P, Robbins PD, Evans CH, et al. Protective effects of IL-1Ra or vIL-10 gene transfer on a murine model of wear debris-induced osteolysis. *Gene Ther* (2004) 11:483–91. doi:10.1038/sj.gt.3302192
124. Stea S, Visentin M, Granchi D, Ciapetti G, Donati ME, Sudanese A, et al. Cytokines and osteolysis around total hip prostheses. *Cytokine* (2000) 12:1575–9. doi:10.1006/cyto.2000.0753
125. Gordon A, Kiss-Toth E, Stockley I, Eastell R, Wilkinson JM. Polymorphisms in the interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 genes affect risk of osteolysis in patients with total hip arthroplasty. *Arthritis Rheum* (2008) 58:3157–65. doi:10.1002/art.23863
126. Aganna E, Martinon F, Hawkins PN, Ross JB, Swan DC, Booth DR, et al. Association of mutations in the NALP3/CIAS1/PYPAF1 gene with a broad phenotype including recurrent fever, cold sensitivity, sensorineural deafness, and AA amyloidosis. *Arthritis Rheum* (2002) 46:2445–52. doi:10.1002/art.10509
127. Kuemmerle-Deschner JB. CAPS - pathogenesis, presentation and treatment of an autoinflammatory disease. *Semin Immunopathol* (2015) 37:377–85. doi:10.1007/s00281-015-0491-7
128. Lachmann HJ, Kone-Paut I, Kuemmerle-Deschner JB, Leslie KS, Hachulla E, Quartier P, et al. Use of Canakinumab in the Cryopyrin-Associated Periodic Syndrome.
129. Sibley CH, Plass N, Snow J, Wiggs EA, Brewer CC, King KA, et al. Sustained response and prevention of damage progression in patients with neonatal-onset multisystem inflammatory disease treated with anakinra: a cohort study to determine three- and five-year outcomes. *Arthritis Rheum* (2012) 64:2375–86. doi:10.1002/art.34409
130. Halle A, Hornung V, Petzold GC, Stewart CR, Monks BG, Reinheckel T, et al. The NALP3 inflammasome is involved in the innate immune response to amyloid-beta. *Nat Immunol* (2008) 9:857–65. doi:10.1038/ni.1636
131. Duewell P, Kono H, Rayner KJ, Sirois CM, Vladimer G, Bauernfeind FG, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals. *Nature* (2010) 464:1357–61. doi:10.1038/nature08938
132. Martinon F, Pétrilli V, Mayor A, Tardivel A, Tschopp J. Gout-associated uric acid crystals activate the NALP3 inflammasome. *Nature* (2006) 440:237–41. doi:10.1038/nature04516
133. Guo C, Fu R, Wang S, Huang Y, Li X, Zhou M, et al. NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Clin Exp Immunol* (2018) 194:231–43. doi:10.1111/cei.13167

134. Burton L, Paget D, Binder NB, Bohnert K, Nestor BJ, Sculco TP, et al. Orthopedic wear debris mediated inflammatory osteolysis is mediated in part by NALP3 inflammasome activation. *J Orthop Res* (2013) 31:73–80. doi:10.1002/jor.22190
135. Maitra R, Clement CC, Scharf B, Crisi GM, Chitta S, Paget D, et al. Endosomal damage and TLR2 mediated inflammasome activation by alkane particles in the generation of aseptic osteolysis. *Mol Immunol* (2009) 47:175–84. doi:10.1016/j.molimm.2009.09.023
136. Caicedo MS, Desai R, McAllister K, Reddy A, Jacobs JJ, Hallab NJ. Soluble and particulate Co-Cr-Mo alloy implant metals activate the inflammasome danger signaling pathway in human macrophages: A novel mechanism for implant debris reactivity. *J Orthop Res* (2009) 27:847–54. doi:10.1002/jor.20826
137. Pettersson M, Kelk P, Belibasakis GN, Bylund D, Molin Thorén M, Johansson A. Titanium ions form particles that activate and execute interleukin-1 $\beta$  release from lipopolysaccharide-primed macrophages. *J Periodont Res* (2017) 52:21–32. doi:10.1111/jre.12364
138. Granchi D, Verri E, Ciapetti G, Stea S, Savarino L, Sudanese A, et al. Bone-resorbing cytokines in serum of patients with aseptic loosening of hip prostheses. *J Bone Joint Surg Br* (1998) 80:912–7. doi:10.1302/0301-620x.80b5.8513
139. Li J, Li Y, Peng X, Li B, Qin H, Chen Y. In vivo analysis of the effects of CoCrMo and Ti particles on inflammatory responses and osteolysis. *RSC Adv.* (2018) 8:5151–7. doi:10.1039/C7RA12325F
140. Li X, Zhong F. Nickel induces interleukin-1 $\beta$  secretion via the NLRP3-ASC-caspase-1 pathway. *Inflammation* (2014) 37:457–66. doi:10.1007/s10753-013-9759-z
141. Ferko M-A, Catelas I. Effects of metal ions on caspase-1 activation and interleukin-1 $\beta$  release in murine bone marrow-derived macrophages. *PLoS ONE* (2018) 13:e0199936. doi:10.1371/journal.pone.0199936
142. Li X, Tang L, Ye MT, Chen D. Titanium Ions Play a Synergistic Role in the Activation of NLRP3 Inflammasome in Jurkat T Cells. *Inflammation* (2020) 43:1269–78. doi:10.1007/s10753-020-01206-z
143. Csala M, Kardon T, Legeza B, Lizák B, Mandl J, Margittai É, et al. On the role of 4-hydroxynonenal in health and disease. *Biochim Biophys Acta* (2015) 1852:826–38. doi:10.1016/j.bbadis.2015.01.015
144. Kauppinen A, Niskanen H, Suuronen T, Kinnunen K, Salminen A, Kaarniranta K. Oxidative stress activates NLRP3 inflammasomes in ARPE-19 cells--implications for age-related macular degeneration (AMD). *Immunol Lett* (2012) 147:29–33. doi:10.1016/j.imlet.2012.05.005
145. Almeida M, Ambrogini E, Han L, Manolagas SC, Jilka RL. Increased lipid oxidation causes oxidative stress, increased peroxisome proliferator-activated receptor-gamma expression, and diminished pro-osteogenic Wnt signaling in the skeleton. *J Biol Chem* (2009) 284:27438–48. doi:10.1074/jbc.M109.023572
146. Steinbeck MJ, Jablonowski LJ, Parvizi J, Freeman TA. The role of oxidative stress in aseptic loosening of total hip arthroplasties. *J Arthroplasty* (2014) 29:843–9. doi:10.1016/j.arth.2013.09.001

147. Kinov P, Leithner A, Radl R, Bodo K, Khoschorur G-A, Schauenstein K, et al. Role of free radicals in aseptic loosening of hip arthroplasty. *J Orthop Res* (2006) 24:55–62. doi:10.1002/jor.20013
148. Kou L, Sun J, Zhai Y, He Z. The endocytosis and intracellular fate of nanomedicines: Implication for rational design. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences* (2013) 8:1–10. doi:10.1016/j.ajps.2013.07.001
149. Seok JK, Kang HC, Cho Y-Y, Lee HS, Lee JY. Therapeutic regulation of the NLRP3 inflammasome in chronic inflammatory diseases. *Arch Pharm Res* (2021) 44:16–35. doi:10.1007/s12272-021-01307-9
150. MacLeod RA, Voges M, Drexler HG. Mono Mac 6: a mature monoblastic leukemia cell line with t(9;11)(p21;q23). *Blood* (1993) 82:3221–2. doi:10.1182/blood.V82.10.3221.3221
151. Schwenk HU, Schneider U. Cell cycle dependency of a T-cell marker on lymphoblasts. *Blut* (1975) 31:299–306. doi:10.1007/BF01634146
152. Staehlke S, Rebl H, Nebe B. Phenotypic stability of the human MG-63 osteoblastic cell line at different passages. *Cell Biol Int* (2019) 43:22–32. doi:10.1002/cbin.11073
153. Buchhorn GH, Willert H-G, Semlitsch M, Schoen R, Steinemann S, Schmidt M. “Preparation, Characterization, and Animal Testing for Biocompatibility of Metal Particles of Iron-, Cobalt-, and Titanium-Based Implant Alloys”. In: St. John KR, editor. *Particulate debris from medical implants: Mechanisms of formation and biological consequences*. Philadelphia, Pa: American Society for Testing and Materials (1992). pp. 177–188.
154. Katzer A. In vitro toxicity and mutagenicity of CoCrMo and Ti6Al wear particles. *Toxicology* (2003) 190:145–54. doi:10.1016/S0300-483X(03)00147-1
155. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, et al. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* (2012) 9:676–82. doi:10.1038/nmeth.2019
156. Deutsches Institut für Normung e. V. ISO 5832-6:1997, Chirurgische Implantate - Metallische Werkstoffe - Teil 6: Kobalt-Nickel-Chrom-Molybdän-Schmiedelegerung. Beuth Verlag GmbH, Berlin (2001).
157. Deutsches Institut für Normung e. V. DIN EN ISO 5832-3:2016, Chirurgische Implantate - Metallische Werkstoffe - Teil 3: Titan 6-Aluminium 4-Vanadium Knetlegierung. Beuth Verlag GmbH, Berlin (2017).
158. Sahillioglu AC, Sumbul F, Ozoren N, Haliloglu T. Structural and dynamics aspects of ASC speck assembly. *Structure* (2014) 22:1722–34. doi:10.1016/j.str.2014.09.011
159. Stutz A, Horvath GL, Monks BG, Latz E. ASC speck formation as a readout for inflammasome activation. *Methods Mol Biol* (2013) 1040:91–101. doi:10.1007/978-1-62703-523-1\_8
160. Hsu CG, Chávez CL, Zhang C, Sowden M, Yan C, Berk BC. The lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal inhibits NLRP3 inflammasome activation and macrophage pyroptosis. *Cell Death Differ* (2022) 29:1790–803. doi:10.1038/s41418-022-00966-5
161. Luo G, Li Z, Wang Y, Wang H, Zhang Z, Chen W, et al. Resveratrol Protects against Titanium Particle-Induced Aseptic Loosening Through Reduction of Oxidative Stress

- and Inactivation of NF- $\kappa$ B. *Inflammation* (2016) 39:775–85. doi:10.1007/s10753-016-0306-6
162. Fleury C, Petit A, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ, Tabrizian M, et al. Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: morphology, cytotoxicity, and oxidative stress. *Biomaterials* (2006) 27:3351–60. doi:10.1016/j.biomaterials.2006.01.035
163. Dalal A, Pawar V, McAllister K, Weaver C, Hallab NJ. Orthopedic implant cobalt-alloy particles produce greater toxicity and inflammatory cytokines than titanium alloy and zirconium alloy-based particles in vitro, in human osteoblasts, fibroblasts, and macrophages. *J Biomed Mater Res A* (2012) 100:2147–58. doi:10.1002/jbm.a.34122
164. Lochner K, Fritsche A, Jonitz A, Hansmann D, Mueller P, Mueller-Hilke B, et al. The potential role of human osteoblasts for periprosthetic osteolysis following exposure to wear particles. *Int J Mol Med* (2011) 28:1055–63. doi:10.3892/ijmm.2011.778
165. van Furth R, Cohn ZA, Hirsch JG, Humphrey JH, Spector WG, Langevoort HL. The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bull World Health Organ* (1972) 46:845–52.
166. Lohmann CH, Schwartz Z, Köster G, Jahn U, Buchhorn GH, MacDougall MJ, et al. Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition. *Biomaterials* (2000) 21:551–61. doi:10.1016/S0142-9612(99)00211-2
167. Zhang M, Zhu Q, Shi M, Liu Y, Ma L, Yang Y, et al. Active phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) by T lymphocytes (Jurkat cells). *Mol Immunol* (2015) 66:429–38. doi:10.1016/j.molimm.2015.04.018
168. Lawrence H, Deehan D, Holland J, Kirby J, Tyson-Capper A. The immunobiology of cobalt: demonstration of a potential aetiology for inflammatory pseudotumours after metal-on-metal replacement of the hip. *Bone Joint J* (2014) 96-B:1172–7. doi:10.1302/0301-620X.96B9.33476
169. Pulido-Reyes G, Leganes F, Fernández-Piñas F, Rosal R. Bio-nano interface and environment: A critical review. *Environ Toxicol Chem* (2017) 36:3181–93. doi:10.1002/etc.3924
170. Singh G, Nuechtern JV, Meyer H, Fiedler GM, Awiszus F, Junk-Jantsch S, et al. Particle characterisation and cytokine expression in failed small-diameter metal-on-metal total hip arthroplasties. *Bone Joint J* (2015) 97-B:917–23. doi:10.1302/0301-620X.97B7.35163
171. Schmiedberg SK, Jones LC, Chang DH, Hungerford DS, Frondoza CG. Extraction and characterization of metallic wear debris from total joint arthroplasty. *Biomed Sci Instrum* (2007) 43:104–9.
172. Topolovec M, Milošev I, Cör A, Bloebaum R. Wear debris from hip prostheses characterized by electron imaging. *Open Medicine* (2013) 8:476–84. doi:10.2478/s11536-013-0156-7
173. Fang HW, Yang CB, Chang CH, Huang CH, Liu HL, Fang SB. The potential role of phagocytic capacity in the osteolytic process induced by polyethylene wear particles. *J Int Med Res* (2006) 34:655–64. doi:10.1177/147323000603400611

174. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and Regulation of NLRP3 Inflammasome Activation. *Trends in Biochemical Sciences* (2016) 41:1012–21. doi:10.1016/j.tibs.2016.09.002
175. Ranson N, Veldhuis M, Mitchell B, Fanning S, Cook AL, Kunde D, et al. NLRP3-Dependent and -Independent Processing of Interleukin (IL)-1 $\beta$  in Active Ulcerative Colitis. *Int J Mol Sci* (2018) 20:57. doi:10.3390/ijms20010057
176. Hoss F, Rodriguez-Alcazar JF, Latz E. Assembly and regulation of ASC specks. *Cell Mol Life Sci* (2017) 74:1211–29. doi:10.1007/s00018-016-2396-6
177. Winsor N, Krustev C, Bruce J, Philpott DJ, Girardin SE. Canonical and noncanonical inflammasomes in intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* (2019) 21:e13079. doi:10.1111/cmi.13079
178. Guarda G, Zenger M, Yazdi AS, Schroder K, Ferrero I, Menu P, et al. Differential expression of NLRP3 among hematopoietic cells. *J Immunol* (2011) 186:2529–34. doi:10.4049/jimmunol.1002720
179. Fort BP, Dubyak GR, Greenfield EM. Lysosomal disruption by orthopedic wear particles induces activation of the NLRP3 inflammasome and macrophage cell death by distinct mechanisms. *J Orthop Res* (2021) 39:493–505. doi:10.1002/jor.24826
180. Jonitz-Heincke A, Lochner K, Schulze C, Pohle D, Pustlauk W, Hansmann D, et al. Contribution of human osteoblasts and macrophages to bone matrix degradation and proinflammatory cytokine release after exposure to abrasive endoprosthetic wear particles. *Mol Med Rep* (2016) 14:1491–500. doi:10.3892/mmr.2016.5415
181. Manzano GW, Fort BP, Dubyak GR, Greenfield EM. Wear Particle-induced Priming of the NLRP3 Inflammasome Depends on Adherent Pathogen-associated Molecular Patterns and Their Cognate Toll-like Receptors: An In Vitro Study. *Clin Orthop Relat Res* (2018) 476:2442–53. doi:10.1097/CORR.0000000000000548
182. Samelko L, Landgraerber S, McAllister K, Jacobs J, Hallab NJ. Cobalt Alloy Implant Debris Induces Inflammation and Bone Loss Primarily through Danger Signaling, Not TLR4 Activation: Implications for DAMP-ening Implant Related Inflammation. *PLoS ONE* (2016) 11:e0160141. doi:10.1371/journal.pone.0160141
183. Jämsen E, Pajarinen J, Kouri V-P, Rahikkala A, Goodman SB, Manninen M, et al. Tumor necrosis factor primes and metal particles activate the NLRP3 inflammasome in human primary macrophages. *Acta Biomater* (2020) 108:347–57. doi:10.1016/j.actbio.2020.03.017
184. Samelko L, Caicedo MS, Lim S-J, Della-Valle C, Jacobs J, Hallab NJ. Cobalt-alloy implant debris induce HIF-1 $\alpha$  hypoxia associated responses: a mechanism for metal-specific orthopedic implant failure. *PLoS ONE* (2013) 8:e67127. doi:10.1371/journal.pone.0067127
185. Samelko L, Caicedo MS, Jacobs J, Hallab NJ. Transition from metal-DTH resistance to susceptibility is facilitated by NLRP3 inflammasome signaling induced Th17 reactivity: Implications for orthopedic implants. *PLoS ONE* (2019) 14:e0210336. doi:10.1371/journal.pone.0210336
186. Chandar S, Kotian R, Madhyastha P, Kabekkodu SP, Rao P. In vitro evaluation of cytotoxicity and corrosion behavior of commercially pure titanium and Ti-6Al-4V alloy for

- dental implants. *J Indian Prosthodont Soc* (2017) 17:35–40. doi:10.4103/0972-4052.197936
187. Costa BC, Tokuhara CK, Rocha LA, Oliveira RC, Lisboa-Filho PN, Costa Pessoa J. Vanadium ionic species from degradation of Ti-6Al-4V metallic implants: In vitro cytotoxicity and speciation evaluation. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* (2019) 96:730–9. doi:10.1016/j.msec.2018.11.090
188. Peat F, Coomber R, Rana A, Vince A. Vanadium allergy following total knee arthroplasty. *BMJ Case Rep* (2018) 2018:bcr-2017-222092. doi:10.1136/bcr-2017-222092
189. Hsu AR, Gross CE, Levine BR. Pseudotumor from modular neck corrosion after ceramic-on-polyethylene total hip arthroplasty. *Am J Orthop* (2012) 41:422–6.
190. Wang H, Jia T-H, Zacharias N, Gong W, Du H-X, Wooley PH, et al. Combination gene therapy targeting on interleukin-1 $\beta$  and RANKL for wear debris-induced aseptic loosening. *Gene Ther* (2013) 20:128–35. doi:10.1038/gt.2012.1
191. Eger M, Hiram-Bab S, Liron T, Sterer N, Carmi Y, Kohavi D, et al. Mechanism and Prevention of Titanium Particle-Induced Inflammation and Osteolysis. *Front Immunol* (2018) 9:2963. doi:10.3389/fimmu.2018.02963
192. Dinarello CA, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in humans. *Semin Immunol* (2013) 25:469–84. doi:10.1016/j.smim.2013.10.008
193. Coll RC, Robertson AAB, Chae JJ, Higgins SC, Muñoz-Planillo R, Inserra MC, et al. A small-molecule inhibitor of the NLRP3 inflammasome for the treatment of inflammatory diseases. *Nat Med* (2015) 21:248–55. doi:10.1038/nm.3806
194. Chen W, Tang P, Fan S, Jiang X. A Novel Inhibitor INF 39 Promotes Osteogenesis via Blocking the NLRP3/IL-1 $\beta$  Axis. *Biomed Res Int* (2022) 2022:7250578. doi:10.1155/2022/7250578
195. Jiang N, An J, Yang K, Liu J, Guan C, Ma C, et al. NLRP3 Inflammasome: A New Target for Prevention and Control of Osteoporosis? *Front Endocrinol (Lausanne)* (2021) 12:752546. doi:10.3389/fendo.2021.752546



## **7 Danksagung**

Die Danksagung ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## 8 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel „**Einfluss von CoNiCrMo- und TiAlV-Partikeln auf die Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms in periprothetischen Zellen**“ im Institut für Experimentelle Orthopädie mit Unterstützung durch Prof. Dr. Bertrand 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.

Magdeburg, den 20.03.2023

## **9 Darstellung des Bildungsweges**

Der Lebenslauf ist in dieser Version aus Datenschutzgründen nicht enthalten.

## 10 Publikation

Teilergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht in:

Brunken F, Senft T, Herbst M, Relja B, Bertrand J, Lohmann CH. CoNiCrMo Particles, but Not TiAlV Particles, Activate the NLRP3 Inflammasome in Periprosthetic Cells. *Int J Mol Sci* 2023;24(6):5108.