

# **Untersuchung der aseptischen Hüftprothesenlockerung unter Einfluss von Antioxidantien auf zellulärer Ebene**

Dissertation

Universitätsklinik für Orthopädie und orthopädischer Chirurgie  
Medizinische Universität Graz

Autor:

Cand.med. Elisabeth Traunwieser

1	<a href="#">Einleitung</a>	1
1.1	<a href="#">Fragestellung</a>	1
1.2	<a href="#">Die Coxarthrose</a>	2
1.3	<a href="#">Arthroseformen</a>	4
1.4	<a href="#">Therapiemöglichkeiten der Coxarthrose</a>	4
1.4.1	<a href="#">Konservative Therapieschemata</a>	4
1.4.2	<a href="#">Operative Therapie</a>	6
1.5	<a href="#">Prothesenmaterialien</a>	6
1.6	<a href="#">Entstehung der Abriebpartikel</a>	7
1.6.1	<a href="#">Keramikpartikel</a>	9
1.6.2	<a href="#">Polyethylenpartikel</a>	10
1.6.3	<a href="#">Metallpartikel</a>	10
1.7	<a href="#">Zusammenhang Prothesenkopfgröße und Partikelentstehung</a>	11
1.8	<a href="#">Oxidation und freie Radikale</a>	12
1.9	<a href="#">Aseptische Hüftprothesenlockerung</a>	13
1.10	<a href="#">Entzündungsreaktion</a>	14
1.10.1	<a href="#">Pathway der Entzündungsreaktion</a>	17
1.10.2	<a href="#">Zusammenhang Osteolyse und aseptische Prothesenlockerung durch Abriebpartikel</a>	19
1.11	<a href="#">Antioxidantien</a>	21
1.11.1	<a href="#">Vitamin C</a>	21
1.11.2	<a href="#"><math>\alpha</math>-Tocopherol</a>	22
1.11.3	<a href="#">Resveratrol</a>	22
1.11.4	<a href="#">N-Acetyl-Cystein</a>	23
1.11.5	<a href="#">Quercetin</a>	23
2	<a href="#">Material und Methoden</a>	25
2.1	<a href="#">Material</a>	25
2.1.1	<a href="#">Nährmedien und Reagenzien</a>	25
2.1.2	<a href="#">Verbrauchsmaterial und Geräte</a>	25
2.1.3	<a href="#">Test Kits</a>	26
2.2	<a href="#">Zellkultur</a>	27
2.2.1	<a href="#">Nährmedium und Stocksolution</a>	27
2.2.2	<a href="#">Monozytenisolierung</a>	31
2.2.3	<a href="#">Splitten und Einfrieren</a>	33
2.3	<a href="#">Antioxidantien – Behandlung</a>	34
2.3.1	<a href="#">Seeden</a>	34
2.3.2	<a href="#">Starving</a>	35
2.3.3	<a href="#">Treatment</a>	35
2.3.4	<a href="#">LPS</a>	38
2.3.5	<a href="#">Probengewinnung</a>	39
2.4	<a href="#">PEROX Assay</a>	39
2.5	<a href="#">Human TNF-<math>\alpha</math>/TNFSF1A Quantikine Kit von R&amp;D Systems #DTA00C</a>	43
3	<a href="#">Ergebnisse</a>	45
3.1	<a href="#">Vergleich von Zellkulturüberstand und Lysat von mononukleären Zellen zum Nachweis des oxidativen Stresslevels</a>	45
3.2	<a href="#">TNF<math>\alpha</math>-Immunoassay zum Vergleich verschiedener LPS-Konzentrationen</a>	47
3.3	<a href="#">Vergleich der Nährmedien RPMI und <math>\alpha</math>MEM</a>	49
3.4	<a href="#">Einfluss verschiedener Antioxidantien auf das oxidative Stresslevel mononukleärer Zellen</a>	50
3.4.1	<a href="#">Vitamin C</a>	50

3.4.2	<u>Gegenüberstellung der Antioxidantien Quercetin, Resveratrol, NAC und <math>\alpha</math> – Tocopherol</u> .....	52
3.4.3	<u>Zusammenfassung aller relevanten Ergebnisse des TNF-<math>\alpha</math> – Immunoassays an RAW293 Mausmakrophagen und humanen MNC</u> .....	59
4	<u>Diskussion</u> .....	63

# 1 Einleitung

## 1.1 Fragestellung

Die Arthroplastik des Hüftgelenks gehört zu den häufigsten und geläufigsten Operationen der chirurgischen Orthopädie (1). Dem, an einer schmerzhaften Hüftdegeneration leidenden Patienten, kann durch eine Hüfttotalendoprothese ermöglicht werden, seine Mobilität zu erhalten ohne seine Lebensgewohnheiten wesentlich umzustellen. Die Entstehungsmechanismen der aseptischen Prothesenlockerung sind derzeit allerdings noch ungeklärt. Aseptische Prothesenlockerung, oder generell eine Prothesenlockerung ohne Anzeichen von Infektion, wird unter anderem von Abriebpartikel induziert (2-4). Durch Abriebpartikel wird die Produktion der Zytokine Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) und eine dadurch hervorgerufene Entzündungsreaktion in Gang gesetzt (2, 5). Durch diese Zytokine wird ein Ausreifen von Präosteoklasten in Osteoklasten hervorgerufen, wodurch Knochenabbau generiert wird (6).

Im Zuge dieser Dissertation sollte der Pathway der aseptischen Hüftprothesenlockerung auf zellulärer Ebene, sowie die Auswirkung von Antioxidantien auf das oxidative Stresslevel und die dadurch induzierte Zytokinfreisetzung *in vitro* sowohl an humanen Primärzellen, als auch an einer Mausmakrophagenzelllinie, identifiziert werden, um die Basis für einen denkbaren Therapieansatz zu ermöglichen.

## 1.2 Die Coxarthrose

Die häufigste Erkrankung der menschlichen Hüfte wird durch die Coxarthrose verursacht.

Hierbei handelt es sich um eine degenerative Hüftgelenkserkrankung, die immer am Gelenksknorpel beginnt. Die Coxarthrose hat mehrere Synonyme und wird auch als Arthritis deformans, Arthrosis deformans, Osteoarthrose oder Osteoarthrosis deformans bezeichnet. Die wesentlichen Charakteristika dieser degenerativen Erkrankung sind die Schmerzhaftigkeit und der Funktionsverlust des Gelenks. Man unterscheidet zwischen der primären und sekundären Coxarthrose bzw. peripherer Arthrosen im Allgemeinen. Bei der primären Coxarthrose handelt es sich um eine idiopathische Erkrankung, die in der Regel zwischen dem 50. und 60. Lebensjahr auftritt. Bei der sekundären Coxarthrose wird als Ursache eine nicht vollständig ausgeheilte Hüfterkrankungen vermutet, die zu einer massiven Beeinträchtigung der Knorpelsubstanz führt. Die Sekundäre Coxarthrose manifestiert sich schon vor dem 50. Lebensjahr und betrifft nur ein Gelenk, was auch als monoartikulärer Verlauf bezeichnet wird.

Die häufigsten Ursachen, die zu einer Coxarthrose führen, sind die Hüft dysplasie, eine Epiphysiolysis capitis femoris, das Femoroacetabuläres Impingement, die Rheumatische Coxitis, die bakteriell bedingte Coxitis, Morbus Perthes und Traumata.

Sowohl exogene als auch endogene, gelenkinterne mechanische Störfaktoren spielen bei diesem Krankheitsbild eine wesentliche Rolle. Ein hoher Gelenkdruck, der wiederum durch pathologische Lastübertragungen zustande kommt, führt zu einem Missverhältnis zwischen Belastung und Belastbarkeit eines Gelenkes und zum Verschleiß. Ein weiteres unerlässliches ätiologisches Motiv wird durch das Aufheben des Gleichgewichts zwischen Synthese und Abbau der Knorpelmatrix beschrieben. Dadurch kommt es zu einer Matrixdegradation, die durch einen metabolischen Leistungsverlust von Chondrozyten bedingt ist, und durch die Aktivitätssteigerung der Zytokine Interleukin 1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor -  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) herbeigeführt wird. Dies bildet die Voraussetzung für eine spätere produktive und nekrotisierende knöcherne Reaktion, die zu einer beschleunigten Knorpelzerstörung führt (7, 8). Der Entstehungsmechanismus einer Arthrose kann sowohl positiv, beispielsweise durch Bewegung, Gewichtsreduktion, oder orthopädisches Schuhwerk, als auch negativ, durch Übergewicht, Überbelastung, Alter, Geschlecht und Präarthrosen, beeinflusst werden (Abb.1). Eine genetische Disposition, hormonelle Faktoren und Enzyme können zur Entstehung einer

Coxarthrose ebenfalls beitragen. Es handelt sich hierbei um systemische Einflüsse, die zu einer Verminderung der Knorpelqualität führen oder aber auch eine Kollagenbiosynthesestörung induzieren und so die Basis einer Sekundärarthrose bilden können.

Otte (2000) beschreibt in einer wissenschaftlichen Arbeit erstmals ein protektives System der Gelenkorganisation, wo die Last auf die Gelenkflächen homogen übertragen wird und so auf die größtmögliche Fläche verteilt werden kann. Dies wirkt aufgrund einer enormen Drucksenkung arthroprotektiv. Herrscht eine pathologische Druckverteilung, funktioniert das System nicht mehr adäquat, wodurch es am Diskus zu Rissbildungen kommt und so ein Circulus vitiosus in Gang gesetzt wird (9). Durch eine irreparable Knorpeldegradation wird die Elastizität und Homogenität des Gewebes massiv gesenkt, es entstehen zuerst Mikroinkongruenzen der kommunizierenden Gelenkoberflächen und in weiterer Folge Makroinkongruenzen, die durch einen massiven Knorpeldefekt und vermehrte Knochenbeteiligung charakterisiert werden (8). Jede Form des Gelenkverschleißes wird großteils von typischen Umbauvorgängen begleitet. Häufig treten Osteophyten auf, bei denen es sich um akkumulierte Detritusbestandteile handelt, die im Laufe der Zeit verkalken. Weiters werden Pseudof Geröllzysten beschrieben, die durch den Abbau von Nekrosearealen entstehen und mit der Gelenkhöhle in Verbindung treten können (10).

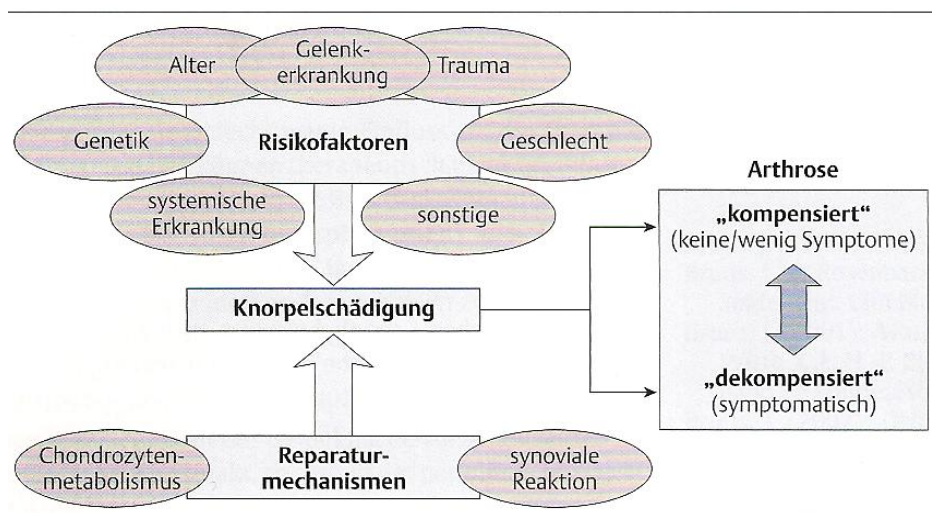


Abbildung 1  
Die Arthroseentstehung-Risikofaktoren und Reperaturmechanismen

### 1.3 Arthroseformen

Neben der Einteilung in Primär- und Sekundärarthrosen gibt es noch weitere Arthroseformen. Hauptcharakteristikum aller ist die klare, bernsteinfarbene, stark visköse Gelenksflüssigkeit.

Primär generalisierte Osteoarthrose: Hier sind mindestens 3 Gelenke gleichzeitig betroffen. Die nodale Form der Fingerpolyarthrose wird ebenfalls zu dieser Gruppe gezählt.

Manifeste Arthrose: Sowohl die bildgebende Diagnostik als auch die Schmerzsymptomatik erweisen sich als interventionsbedürftig.

Latente Arthrose: Trotz der eindeutigen Bildgebung ist der Krankheitsverlauf bei vielen Betroffenen eher schleichend und ohne nennenswerte Schmerzsymptomatik.

Aktivierete Arthrose: Sehr schmerzhafte entzündliche Kapselschwellungen, die meist von einer überwärmten Region und einem Gelenkserguss begleitet wird. Es kommt zu einem schmerzinduzierten Hypertonus der gelenkübergreifenden Muskulatur.

Dekompensierte Arthrose: Diese Form ist durch ein komplettes Gelenksversagen charakterisiert. Als Ultima ratio gilt nur mehr eine gelenkersetzende Operation.

### 1.4 Therapiemöglichkeiten der Coxarthrose

#### 1.4.1 Konservative Therapieschemata

In der Frühphase wird die Coxarthrose konservativ therapiert, um Schmerzlinderung, eine verbesserte Beweglichkeit, bessere Belastbarkeit und eine Progredienzvermeidung zu erzielen.

Zu den konservativen Möglichkeiten zählen allgemeine Maßnahmen, wie Belastungsregulation, Gewichtsreduktion, Vermeidung von Nässe und Kälte und tägliche Eigengymnastik. Die physikalischen Therapieoptionen beinhalten Kälte- und Wärmeanwendungen, Bäder, Massagen, elektrotherapeutische Anwendungen und Ultraschallbehandlungen. Manualtherapeutisch wird mittels Traktion, oder Dehnung von verkürzter Muskulatur interveniert. Die medikamentöse Therapie wird meist parallel zu den oben angeführten Behandlungsformen angeboten, beziehungsweise ist sie vor allem in der

Akutphase sehr effektiv und meist unumgänglich (11). Zu den gängigen Therapeutika gehören Chondroprotektiva, welche allerdings nur in der Frühphase verordnet werden, nichtsteroidale Antiphlogistika oder Antirheumatika (NSARs), Analgetika, und Myotonolytika. Bei der Schmerztherapie wird nach dem WHO-Stufen-Schema vorgegangen (8) (Abb.2).

Grundlagen dieses Stufen Schemas sind die Unterscheidung zwischen akuten nozizeptiven und neuropathischen Schmerzen, und chronischen Schmerzen der Stütz- und Bewegungsorgane. Da akute Schmerzen bedarfsbezogen, chronische Schmerzen aber durch Antizipation, wo mit Hilfe von Retardpräparaten ein kontinuierlicher Wirkspiegel herbeigeführt wird, behandelt werden, ist die Beurteilung der Schmerzqualität wesentlich.

Ziel der Schmerztherapie ist es, eine schnelle Mobilisierung zu ermöglichen, eine Chronifizierung der Schmerzen zu unterbinden, und eine Steigerung der physischen, psychischen und sozialen Funktionskapazität herbeizuführen, und dadurch auch eine verbesserte Lebensqualität für den Patienten zu ermöglichen (8). Intraartikuläre Injektionen und orthopädietechnische Versorgung stellen zwei weitere Formen der konservativen Therapie bei der Coxarthrose dar (12). Durch die intraartikuläre Injektion von Hyaluronsäure stösst man an die Grenzen der konservativen Therapie, da der Nutzen der Therapieform nicht eindeutig erwiesen ist, und die Möglichkeit einer iatrogenen Schädigung des Gelenks besteht (13, 14).

Gerade bei jüngeren Patienten führt im Frühstadium Mobilisation und Dehnung kombiniert mit Propriozeptivtraining oftmals zu einer dauerhaften Verbesserung des Ist-Zustandes. Da dieser Erfolg nicht bei jedem Patienten zu verzeichnen ist, ist der Physiotherapiewert umstritten (15). Das Propriozeptivtraining versucht eine physiologische Kräftebalance zwischen den einzelnen Extremitäten durch Eigenempfinden und Tiefenwahrnehmung herzustellen.

WHO-Stufen-Schema zur Schmerztherapie

STUFE 1: MÄßIGE SCHMERZEN	STUFE 2: STARKE SCHMERZEN	STUFE 3: STÄRKSTE SCHMERZEN
Nichtopioidanalgetika	Niederpotente Opioidanalgetika Nichtopioidanalgetika	Hochpotente Opioidanalgetika Nichtopioidanalgetika

Das Suchtrisiko ist bei einer bedarfsgerechten Schmerzmedikation mit Opioiden sehr gering, solange die Dosierung, die zur reinen Antagonisierung des Schmerzes notwendig ist, nicht überschritten wird. Dies schließt Schmerzmittelmissbrauch nicht aus!

Abbildung 2  
WHO-Stufen-Schema zur Schmerztherapie

## 1.4.2 Operative Therapie

Die Indikation für einen operativen Eingriff besteht, wenn sowohl klinische und subjektive Symptomatik existieren und zusätzlich der radiologische Befund nicht mehr mit konservativen Maßnahmen beherrscht werden kann. Bei einer derartigen Operation kann entweder gelenksteilerhaltend mittels einer Hemiendoprothese (HEP), oder gelenksersetzend durch eine Totalendoprothese (TEP) vorgegangen werden. Das Ziel aller korrigierender Osteotomien ist es, die Gelenksverbindung zu verbessern und so eine gute Beweglichkeit wieder herzustellen. Dadurch kann eine gelenksersetzende Operation so lange wie möglich hinausgezögert werden (11, 16). Ist diese allerdings unumgänglich, so können Komplikationen, wie eine septische oder aseptische Prothesenlockerung auftreten. Trotz immer neuer Entwicklungen kommt es innerhalb der ersten 15 Jahren bei 10 – 15% der Patienten zu einer vorzeitigen Prothesenlockerung ohne vorhergegangenen Infekt und ohne stattgefundenes Trauma (17). Hierbei spricht man von einer aseptischen Prothesenlockerung.

## 1.5 Prothesenmaterialien

Im Fachbereich der Tribologie wird versucht, die bestmögliche Gleitpaarung für die Endoprothetik zu finden.

Derzeit handelsübliche Materialien sind:

Keramik – Keramik – Paarung

Polyethylen – Keramik – Paarung

Metall – Keramik – Paarung

Bei den Prothesen handelt es sich vorwiegend um eine Weich-Hart-Gleitpaarung, was bedeutet, dass sich die Paarung aus einem ultrahochmolekularem Polyethylen (ultra-high-molecular-weight-Polyethylen = UHMPE), Metall und Keramik zusammensetzt. Der Prothesenkopf ist entweder aus Metall oder Keramik, der Prothesenstiel aus diversen Metalllegierungen, wie zum Beispiel Titan, Cobalt-Chrom, oder aber auch Stahl. Wird die Prothese zementiert, so verwendet man hierbei einen zwei Phasen Zement, der dann zu Polymethylmetacrylat (PMMA) aushärtet (8).

## **1.6 Entstehung der Abriebpartikel**

Mikroskopisch betrachtet berühren auch scheinbar exakt gefertigte Oberflächen einander nur punktuell. Kommt es zu einer physiologischen Bewegung, verformen sich diese oft sehr kleinen Berührungspunkte unter Druck und Reibung, oder es splintern durch die Krafteinwirkung kleine Partikel ab. Man unterscheidet mechanische und chemische Verschleißmechanismen.

Bei Abrasion und Oberflächenermüdung kommt es zur mikroskopischen Rissbildung und Rissausbreitung, während bei der Adhäsion und den so genannten tribochemischen Reaktionen chemische Prozesse vorausgeschaltet sind. Je nach chemischer Reaktionsfähigkeit der Prothesenmaterialien kommt es zu neuen chemischen Verbindungen zwischen den Reibpartnern oder mit Stoffen aus der Umgebung (18). Durch diese mikroskopisch nachweisbaren Vorgänge der Partikelentstehung, lässt sich nun auch der Vorgang der Prothesenerwärmung erklären. Betrachtet man nur diesen sehr kleinen Berührungspunkt, kann sogar eine Erwärmung von bis zu 80°C für einige Nanosekunden gemessen werden (19). Die dadurch ausgelösten chemischen Reaktionen können jenseits des thermodynamischen Gleichgewichts liegen und Reaktionspunkte auf Hüftpfanne und Hüftkugel verursachen. Für Metall-Metall-Paarungen, bewirkt dies ein messbares erhöhtes Anlaufmoment, welche für

Großkopfprothesen klinisch relevante Werte nach sich ziehen (20). Um eine Minimierung von Abriebpartikel und Verschleißreduktion zu erzielen, versucht man mittels eines Schmierfilms beide Gleitpartner völlig voneinander zu trennen. Dabei müssen 3 Teilbereiche unterschieden werden:

1. Grenzreibung
2. Mischreibung
3. hydrodynamische Schmierung

Bei der Grenzreibung sind die kommunizierenden Flächen noch vollständig miteinander in Kontakt, durch einen Schmierfilm erfolgt allerdings eine Reibungsreduktion.

Bei der Mischreibung sind die kommunizierenden Flächen durch einen Schmierfilm voneinander getrennt, stellenweise entsteht aber durch Unebenheiten Punktreibung. Dies verdeutlicht, wie wichtig eine glatte Oberfläche ist. Bei der hydrodynamischen Schmierung wird die vollständige Trennung der kommunizierenden Gelenkbestandteile durch einen Schmierfilm ermöglicht. Es resultiert wieder ein Anstieg der Reibung und der damit verbundenen Reibungswärme, da es zu einer weiteren Zunahme der Schmierfilmdicke kommt. Großkopfendoprothesen versuchen diesen drei Teilbereichen gerecht zu werden (18).

Der größere Durchmesser des Gelenkkopfes soll einerseits eine bessere Stabilität gewährleisten, andererseits wird dadurch ein kleineres Spiel zwischen Kopf und Pfanne induziert. Mit einer Oberflächenlegierung die eine optimale Glattheit verspricht, soll so eine hydrodynamische Schmierung erzeugt werden und somit ein lebenslanges verschleißfreies Implantat gewährleistet werden können. Studien belegen, dass kein Unterschied zwischen verschleißreduzierter Gruppe und Referenzgruppe besteht (21). Möglicherweise liegt die Ursache dafür im täglichen Bewegungsmuster der Implantatträger, wo zu langsames Gehen und zu häufige Start und Stopp Abläufe eine wesentliche Rolle spielen. Unter physiologischen Bewegungsabläufen kommt es bei einer Metall-Metall-Prothese durch die einwirkenden Kräfte zu Deformierung der Legierung an Berührungspunkten, und in weiterer Folge zu Abriebpartikelentstehung. Bis dato gibt es noch keine Simulatoren, die auch Stoßbewegungen nachahmen, sodass über den genauen Ablauf der Entstehung dieser Partikel nur gemutmaßt werden kann. Wahrscheinlich ist jedoch, dass es zu suboptimalen Bedingungen im Gelenkspalt kommt. Es wurde eine Studie mit einem endoprotheseversorgten Marathonläufer durchgeführt, die zeigt, dass während der Wettkampfphase ein erhöhter Cr-Anteil im Urin nachgewiesen werden konnte, was nur auf

eine unter Mischreibung arbeitende Gleitpaarung zutreffen kann (22).

Alle Implantate, die unter physiologischen Bedingungen der Grenz- und Mischreibung arbeiten produzieren Abriebpartikel (18). Durch die Beobachtungen des Abriebverhaltens bei Simulatoren gelang es 1960, das ursprünglich verwendete Teflon durch Polyethylen zu ersetzen, und werden auch weiterhin Verbesserungen ermöglicht (23).

### 1.6.1 Keramikpartikel

Die Keramikpartikel sind vorwiegend kugelig, können aber auch bizarr geformt sein und eine span- oder fetzenförmige Morphologie mit einer Größe weit über  $250\mu\text{m}$  aufweisen (24, 25). Bei Keramik-Keramik-Gleitpaarungen können Partikelgrößen im Nanometerbereich beobachtet werden (26). Bei normalem Kontakt der Gelenkflächen werden vorwiegend Partikel in der Größenordnung zwischen  $5\text{-}90\text{nm}$  generiert, bei einem unphysiologischen Zusammenspiel der Gelenkflächen entstehen Partikelgrößen zwischen  $0,05$  bis  $3,2\mu\text{m}$  (27).

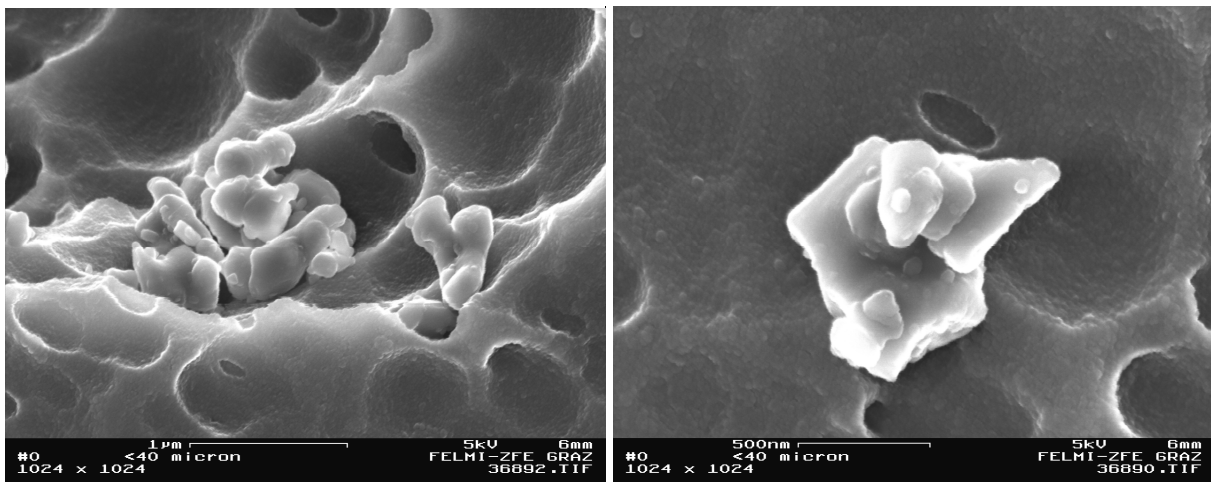


Abbildung 3  
Elektronenmikroskopische Aufnahme mit LEO Gemini DSM 982 (FELMI-Austrian Centre for Electron Microscopy and Nanoanalysis Technische Universität Graz) von Keramikpartikel bei einer Geräteeinstellung von  $5\text{kV}$ .

## 1.6.2 Polyethylenpartikel

Neue Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass die Größe der UHMWPE Partikel im Nanometerbereich liegt (28). Dabei wurde ebenfalls Material aus periprothetischem Gewebe extrahiert und die Partikel isoliert. Lange war diese Gewinnung nur aus Schmiermedien von Hüftgelenkssimulatoren möglich. Bei der Größe wird 60nm als Untergrenze angegeben (29), von vernetztem Polyethylen wurden auch schon kleinere Partikel nachgewiesen. Dadurch ist es möglich, dass auch bei geringerer Abriebmenge weitaus mehr Partikel freigesetzt werden können. Berechnungen gängiger Verschleißraten von vernetztem und unvernetztem Polyethylen führen zu einer Gesamtpartikelzahl von rund 1 Mio. Abriebpartikel pro Schritt (18).

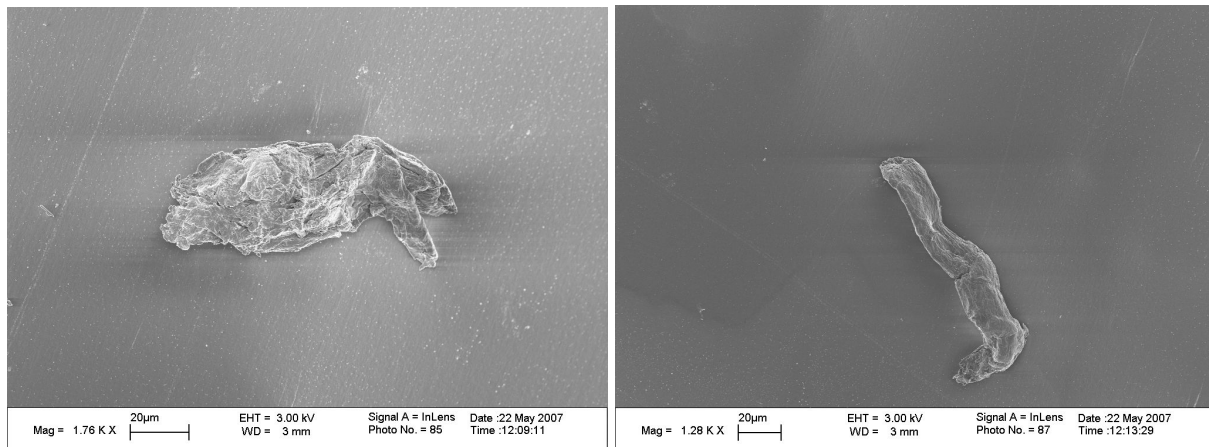


Abbildung 4

Elektronenmikroskopische Aufnahme von Polyethylenpartikel im Mykrometerbereich. Mit freundlicher Genehmigung des Forschungslabors Leeds (Institute of Medical & Biological Engineering, University of Leeds, U.K.)

## 1.6.3 Metallpartikel

Bei Metall-Metall-Gleitpaarungen werden Chromoxydpartikel im Nanometerbereich generiert. Die durchschnittliche Größe liegt etwa bei 50nm. Metallpartikel sind durch rundlich, ovale Morphologie charakterisiert. Handelt es sich um eine Molybdänverbindung, kann die Struktur auch nadelförmig sein (30-32).

Bis dato wurde bewiesen, dass bei Weich-Hart-Endoprothesenpaarungen entstehende Partikel zwar in deutlich geringere volumetrischer Abriebrate vorkommen, aber die periprothetische

Partikellast, aufgrund der im Nanometerbereich liegenden Partikelgröße, viel höher ist (18). Destruktion lässt den Übertritt von Kobalt oder Chrom in die direkte Implantatumgebung zu, was in weiterer Folge zu einer Streuung in die Körperperipherie führt (18).

## **1.7 Zusammenhang Prothesenkopfgröße und Partikelentstehung**

In Bezug auf Polyethylen ist bekannt, dass der Verschleiß zunimmt, umso größer der Prothesenkopfdurchmesser ist, was auf die größere Kontaktfläche zurückzuführen ist (33, 34). Der Einfluss der Prothesenkopfgröße wurde von Tarasevicius et al 2006 untersucht, und zeigt dass, bei einem Vergleich von 22 und 32mm Kugeln ein dreifach höheres Revisionsrisiko besteht (35). Bei Polyethylen-Keramik Paarungen mit einem Kopfdurchmesser von 28mm konnte sich sogar eine mittlere Verschleißrate von 19,38mg/Mio. Bewegungszyklen errechnen. *In vivo* entspricht dies einer Zeit von etwa einem Jahr, bevor es aufgrund der durch Partikel induzierter Entzündungsreaktion zu einer aseptischen Prothesenlockerung kommen kann (35). Dabei ist wesentlich, dass die Verschleißrate vom Winkel zwischen der Bewegungsrichtung und der Ausrichtung der Polyethylenketten in Lastrichtung abhängig ist (36). Läuft die Bewegung nur in eine Richtung ab, kommt es zur Ausrichtung der Molekülketten des Polyethylens entlang der Bewegungsrichtung, was zu einer erhöhten Verschleißstabilität führt (37).

Vergleichsstudien haben gezeigt, dass die Größe des Prothesenkopfes und die Gleitpaarung soweit Einfluss nehmen, dass sogar die beste Paarung mit einem Durchmesser von 55mm, nicht so viel Abrieb produzieren würde, wie die schlechteste Paarung bei einem Durchmesser von 28mm (18). Bei der *in vitro* durchgeführten Verschleißprüfung können keine, für alle Paarungen des gleichen Materials und Durchmessers gültigen Verschleißraten ermittelt werden. Bei dem derzeit handelsüblichen „cross-linked“ oder auch vernetzten Polyethylenen lassen sich Verschleißraten im Bereich von 10-50% errechnen (38, 39). Solche „cross-linked“ Polyethylene nehmen im Simulator und auch *in vivo* mehr Flüssigkeit aus dem Umgebungsmilieu auf, wodurch es zu einer Ergebnisverfälschung kommt, die mittels einer bei den Studien durchgeführten Abwägung nicht erfasst werden kann (39). Viele wissenschaftliche Arbeiten, die die Annahme durch diese verfälschten Ergebnisse hatten, es

mit einem absolut verschleißfreien Polyethylen zu tun zu haben, sind daher zu vernachlässigen (39).

Durch die reduzierte Bruchzähigkeit der „cross-linked“ Polyethylene ist ein guter Schutz vor *in vivo* Oxidation besonders wichtig. Bei den vernetzten Polyethylengleitpaarungen unterscheidet man zwischen den so genannten „cross-linked“ Polyethylenen der ersten Generation und solcher der zweiten Generation. Bei der zweiten Generation versucht man mit Antioxidantien wie zum Beispiel Vitamin E ( $\alpha$ -Tocopherol) zu arbeiten, die sowohl als Radikalfänger fungieren, als auch für längere und bessere Elastizität sorgen (40, 41). Durch Hüftsimitatoren lassen sich die Verschleißraten und der Einfluss der Steifigkeit des Bandapparats auf das Bewegungsmuster des Implantats gut vorhersagen. Auch moderne Simulatoren stellen keinen ausreichenden Nachweis für Ermüdungserscheinungen, die Material- und designspezifisch überprüft werden müssten, dar (42, 43).

## 1.8 Oxidation und freie Radikale

Bei freien Radikalen handelt es sich um sehr reaktionsfreudige Verbindungen mit einem ungepaarten Elektron, die vielfältige irreversible Reaktionen auslösen. Sie entstehen durch Zufuhr von Energie, zum Beispiel durch ionisierende Strahlung, durch Noxen, wie zum Beispiel Rauchen, oder aber auch bei Elektronenübertragung (44). Biochemisch betrachtet führt dabei eine Ein-Elektronenreduktion von molekularem Sauerstoff zum Superoxidradikal, aus dem Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) und Hydroxyradikal ( $OH^+$ ) entstehen (45).

Bei der Oxidation werden Biomoleküle durch reaktive Sauerstoffspezies angegriffen und geschädigt (45). Dieser Vorgang spielt nicht nur im Bereich der klinischen Orthopädie eine wichtige Rolle. Freie Radikale schädigen in verschiedenen Reaktionen Biomoleküle wie DNA, Aminosäurereste in Proteinen, Fettsäurereste in Lipidmembranen und Heteroglykane. Um die zerstörerische Wirkung freier Radikale verhindern zu können, müssen diese abgebaut werden. Diese Elimination findet mit Hilfe zwei bedeutende Mechanismen statt, bevor wichtige Biomoleküle zu Schaden kommen (45). Der Abbau erfolgt einerseits enzymatisch durch die Superoxiddismutase, Katalase und Glutathionperoxidase, andererseits können Lipidperoxide mit Vitamin E reagieren, wodurch ein Tocopherolradikal entsteht und dieses

durch Ascorbat neutralisiert werden können (45).

In Bezug auf die klinische Relevanz freier Radikale gibt es auch im Bereich der Orthopädie nach wie vor ein schwerwiegendes, bis heute unlösbares Problem. Die Diskrepanz zwischen den klinisch teilweise verheerenden Verschleißbildern und den im Simulator bestimmten Verschleißraten wird vorrangig durch die Alterung des Polyethylens, was wiederum unter anderem durch eine Oxidation hervorgerufen wird, erklärt (18). Mit fortschreitender Oxidation neigt der Kunststoff zu Ermüdungsversagen, wodurch abweichend von den beschriebenen Vorgängen des adhäsiven und abrasiven Verschleißes die so genannte Oberflächenermüdung in den Vordergrund tritt. Diese Verschleißart führt zu Rissausbreitung die teilweise unterhalb der Implantatoberfläche abläuft, und ganze Bereiche delaminiert. In vergleichsweise kurzer Zeit kann es hierbei zu extremen Verschleißerscheinungen kommen (18). Bis dato gelang es im Labor noch nicht, diesen Effekt zufriedenstellend nachzubilden.

Im Zuge meiner Dissertation wurde versucht, die aseptische Hüftprothesenlockerung auf zellulärer Ebene unter Einfluss von Antioxidantien genauer zu untersuchen.

## **1.9 Aseptische Hüftprothesenlockerung**

Die vorzeitige aseptische Lockerung ist die Hauptkomplikation implantierter Prothesen. Dabei kann es im Anschluss an eine hüftgelenkersetzende Operation im Abstand von zehn bis zwanzig Jahren zu einer aseptischen Prothesenlockerung kommen. Eine derartige Operation ist für Gelenkserkrankungen wie Osteoarthritis und Rheumatoide Arthritis ein effektiver Eingriff (46, 47). Abriebpartikel, die durch Prothesenmaterialien generiert werden, stellen nach wie vor die Hauptursache für die limitierte Lebensdauer der Implantate dar. Aufgrund von Primärinstabilität kommt es zu Mikrobewegungen des Implantats. Durch ein Ungleichgewicht zwischen Flüssigkeitsfluss und Flüssigkeitsinnendruck kann es zur Bildung von periartikulären Zysten kommen, wodurch es zu einem Zytokinanstieg kommt. Ein vermehrter Flüssigkeitsfluss unterstützt den Abtransport von Abriebpartikel der Implantate, welche zu einer Entzündung führen und bei der aseptischen Lockerung eine wichtige Rolle spielen (46, 48). Dieser Vorgang wird auch als biologische Antwort bezeichnet, und gilt nach

wie vor als noch nicht vollständig geklärt. Diese Antwort ist das Resultat diverser Faktoren, die sowohl biologischer als auch physikalischer Natur sind (49, 50). Die Zellantwort auf Partikel ist abhängig von der Größe, Form, Beschaffenheit und unter anderem auch von der Partikelanzahl (51, 52). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass Polymethylmethacrylatpartikel (PMMAP) und Polyethylenpartikel mit einer Größe kleiner als 20µm eine stärkere Zellantwort hervorrufen, als es durch TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, PGE<sub>2</sub>, Matrixmetalloproteinasen und anderen Faktoren quantifiziert werden kann (51, 53-55). Gonzalez et al (1996) und Gallo et al (2002) haben gezeigt, dass die Phagozytose von Abriebpartikel eine wesentliche Komponente bei der Induktion der zellulären Antwort darstellt. Die Interaktion zwischen Partikel und der Zelloberfläche zeigt, dass dies alleine ausreicht, um eine Aktivierung der Osteoklasten hervorzurufen (51, 56).

## 1.10 Entzündungsreaktion

Bei der klassischen Entzündungsreaktion treten fünf Symptome, Dolor, Rubor, Calor, Tumor und Functio laesa, auf. Diese werden auch als Kardinalsymptome bezeichnet.

In Hinblick auf die aseptische Hüftprothesenlockerung, kommt es durch eine Oberflächenermüdung und dadurch entstehende Abriebpartikel zu einer fremdkörperinduzierten Entzündungsreaktion (Abb.3).

Dabei wird der Partikel als Fremdkörper im Gewebe erkannt und induziert eine Inflammation. Bei diesen Zellen handelt es sich um gewebständige phagozytosebefähigte Makrophagen.

Um diese Reaktion ausführen zu können, sind Phagozyten, die einen Teil der zellulären Abwehr darstellen, mit speziellen Oberflächenrezeptoren, die zur Identifizierung körperfremden Materials dienen, ausgestattet. Jeder Rezeptortyp nutzt einen anderen Angriffspunkt zur Phagozytose von Mikroorganismen oder Fremdkörper wie Abriebpartikel.

Die drei wichtigsten Rezeptortypen sind:

### Mannoserezeptor

Dieser Rezeptor interagiert mit Bakterien ohne zusätzlichen akzessorischen Proteinen und löst durch die Aktivierung eine Phagozytose aus.

### Komplementrezeptoren

Diese werden erst wirksam, wenn der Erreger bereits durch Komplementkomponenten markiert wurde.

### Fc-Rezeptoren

Sie kommen erst zum Einsatz, wenn bereits ausreichend viele spezifische Antikörper an ihren antigenen Strukturen auf dem eindringenden Erreger gebunden haben. Das Fc-Stück der Antikörper interagiert dann mit dem Fc-Rezeptor der Makrophagen und vermittelt die Phagozytose des Antikörper/Erreger-Komplexes. Voraussetzung ist allerdings, dass mehrere Fc-Rezeptoren durch multiplen Antikörperbesatz auf dem Bakterium quervernetzt werden. Die dadurch induzierte Immobilität der Fc-Rezeptoren führt zur Aktivierung des Makrophagen.

Bei der Phagozytose handelt es sich um einen aktiven Prozess, bei dem das Fremdmaterial zuerst von der Zellmembran des Makrophagen umschlossen, und dann in einen Vesikel (Phagosom), aufgenommen wird (Abb.3, Abb.4). Es kommt in weiterer Folge zu einer Ansäuerung des Phagosoms und ein dadurch entstehendes bakteriostatisches Milieu. Durch die Phagozytose selbst wird die Freisetzung weiterer antibakterieller Wirkstoffe ausgelöst, die sowohl intrazellulär als auch in der näheren Umgebung wirksam sind. Dazu gehören reaktive Sauerstoffspezies, die bei sauerstoffabhängigen Redoxreaktionen zustande kommen, und Stickstoffoxide, die durch einen respiratorischen Burst hergestellt werden.

Beim Großteil, der von den Makrophagen sezernierten Regulatorsubstanzen, handelt es sich um Zytokine, die andere Zellen der Immunabwehr stimulieren und mobilisieren. Neben den Makrophagen spielen auch natürliche Killerzellen (NK) eine wesentliche Rolle, da diese Zytokine produzieren können, die eine stark regulierende Wirksamkeit auf die T-Lymphozyten besitzen und diese bei Entzündung essentiell sind.

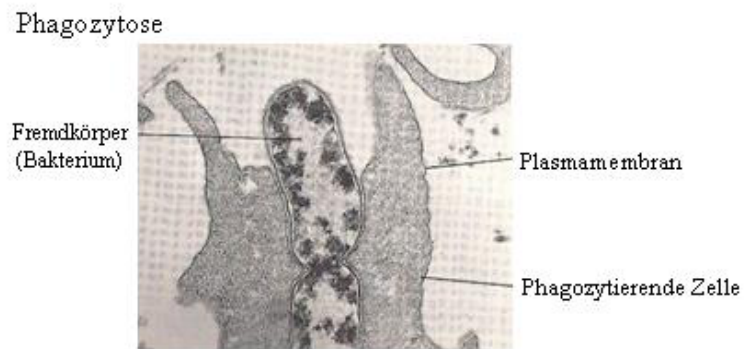


Abbildung 5

Elektronenmikroskopische Aufnahme einer phagozytierenden Makrophage, die ein sich teilendes Bakterium verschlingt. Damit eine Phagozytose ablaufen kann, muss die Fresszelle zuerst an die Oberfläche der phagozytierenden Zelle binden und einen aus einer Vielzahl von Oberflächenrezeptoren aktivieren. Phagozytierende Zellen sind mit Pseudopodien (Membranfortsätze) ausgestattet, die in zunehmenden Maße den Fremdkörper umhüllen(57).

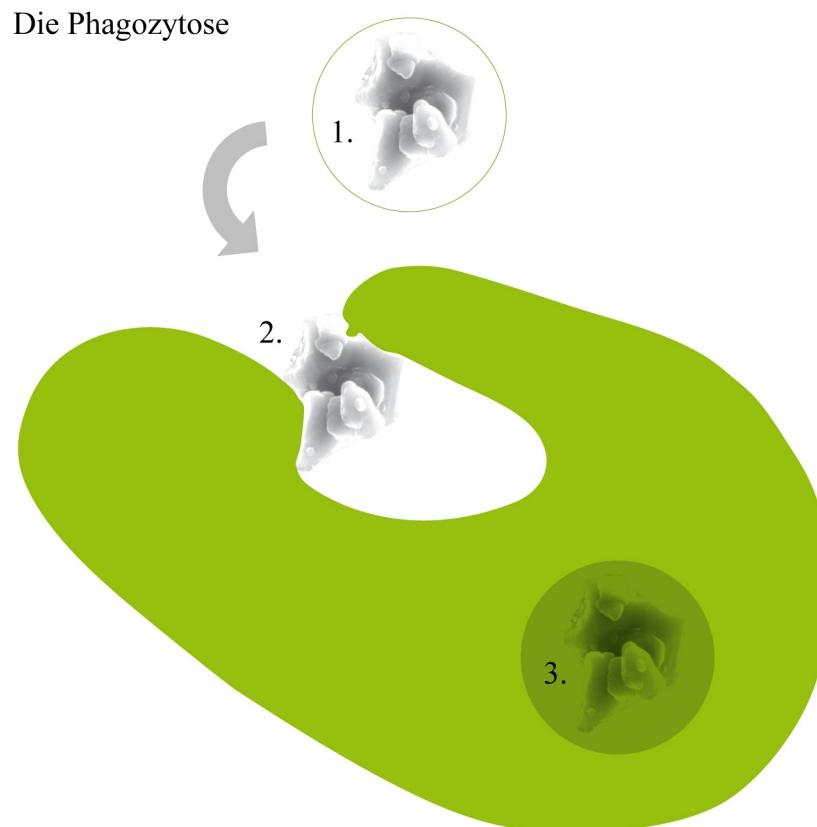


Abbildung 6

Phagozytose eines Polyethylenpartikels durch eine Makrophage

1. Polyethylenpartikel in periprothetischer Umgebung.

2. Aufnahme des Partikels mittels Phagozytose. Die Einverleibung des Partikels geht ohne Formveränderung der Makrophage einher. Dabei wird der Partikel durch eine Invagination aufgenommen wobei es zur Bildung eines Phagosoms kommt.

3. Phagosomen konfluieren in weiterer Folge mit Lysosomen und bilden ein Phagolysosom. Die im Lysosom enthaltenen Enzyme ermöglichen den Abbau von Fremdmaterial.

### 1.10.1 Pathway der Entzündungsreaktion

Bei der Entzündungsreaktion spielen Makrophagen und die Zellwandkomponente Lipopolysaccharid (LPS) eine bedeutende Rolle. LPS bindet an den CD-14 Membranrezeptor und löst über eine noch nicht genau geklärte Signaltransduktionskaskade auf Makrophagen/Monozyten und neutrophile Granulozyten die Freisetzung großer Mengen proinflammatorischer, chemotaktischer und immunmodulatorischer Zytokine aus (Abb.5) (45). Zu den vier wichtigsten Vertretern der Zytokine gehören Interleukin 1 (IL-1), 6 (IL-6), 8 (IL-8), 12 (IL-12) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ ).

Die von aktivierten Makrophagen ausgeschütteten Zytokine haben teils systemische, teils lokale Wirkung, einige besitzen auch beides. IL-1 und IL-6 aktivieren beispielsweise Endothelzellen, aber auch B- und T-Lymphozyten, sind hauptverantwortlich für die Fieberentstehung und stimulieren gemeinsam mit dem TNF- $\alpha$  die Akut-Phase-Protein-Synthese in der Leber. Die Synthese des TNF- $\alpha$  wird über TOLL-ähnliche Rezeptoren (TLR) vermittelt (58). Bei TOLL-ähnlichen Rezeptoren handelt es sich um eine Familie von Rezeptoren der Immunerkennung (pattern recognition) des Immunsystems, die eine Vielfalt verschiedener pathogener Mikroorganismen, wie zum Beispiel Bakterien, Viren und Pilze, anhand von für diese Organismen typischer "Muster"-Moleküle erkennen. Nach der Erkennung des jeweiligen mikrobiellen Ligandenmoleküls aktivieren TLRs spezifische intrazelluläre Signalwege. Dies geschieht durch Kopplung an rezeptornahe Adaptormoleküle und führt über die Transkriptionsfaktoren Nekrosefaktor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) oder Interferon-regulierender Faktor (IRF) 3, 5 und 7 zur Aktivierung der Transkription von Genen, die weitere angeborene Immunreaktionen initiieren, sowie adaptive Immunantworten in Gang setzen. Solche Rezeptoren können auf phagozytierende Zellen unterschiedliche molekulare Strukturen, die von Erregern stammen, binden (58). Einer der bekanntesten Vertreter TOLL-ähnlicher Rezeptoren ist TLR-4, ein Transmembranlipopolysaccharidrezeptor, welcher für die Aktivierung der im Blut befindlicher Lipopolysaccharide verantwortlich ist, und für die Freisetzung von entzündungsinduzierten Zytokinen und Chemokinen wesentlich ist und somit eine wichtige Funktion bei der Auslösung der Immunantwort hat (59).

Der TNF- $\alpha$  besitzt folgende Hauptfunktionen:

1. Reduktion der Expression der natürlichen Gegenspieler der Matrixmetalloproteinasen (tissue inhibitors of metalloproteinases(MMP) = TIMP), was eine verstärkte Knochenresorption zur Folge hat.
2. Fibroblastenstimulation
3. Regulation der Genexpression des Rezeptoraktivators des Nekrosefaktors-kappa-beta (NF- $\kappa$  $\beta$ ) Liganden (RANKL) und dessen Antagonist Osteoprotegerin (OPG).
4. Hauptaufgaben von IL-8 und IL-12 beschränken sich weitgehend auf lokale Reaktionen, wie eine Zellmobilisation und eine Degranulationsunterstützung (58).

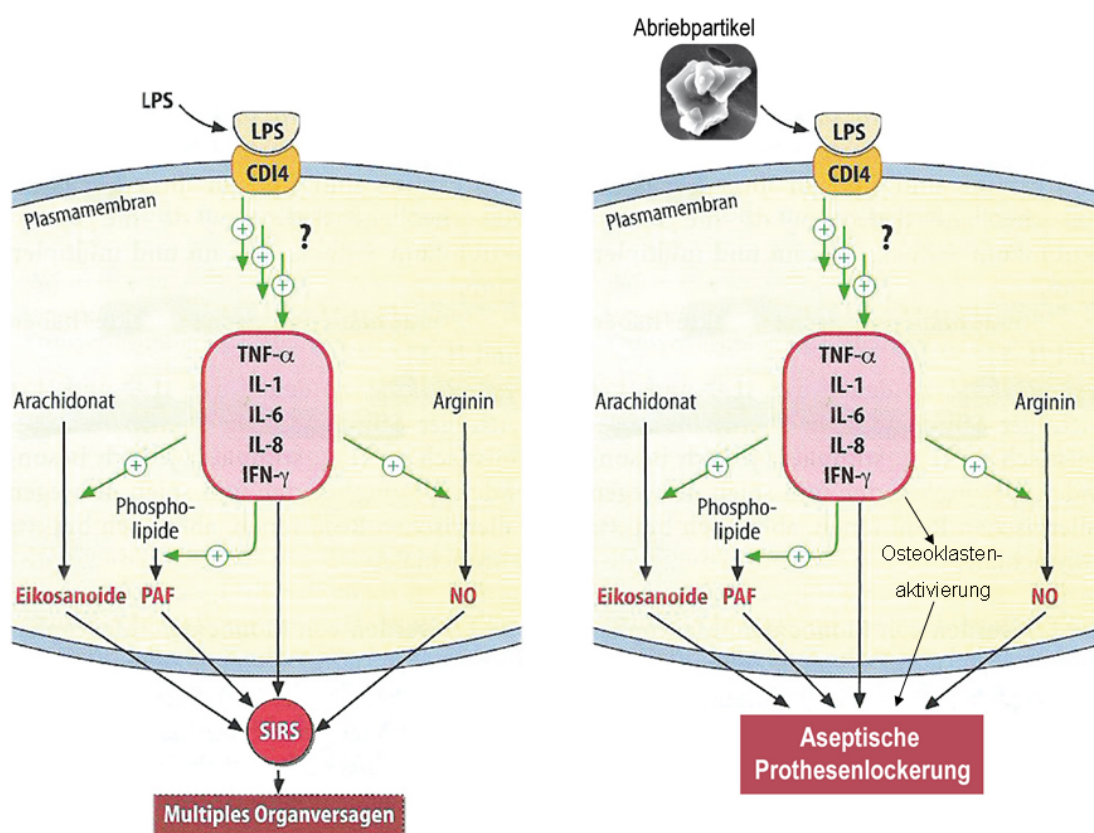


Abbildung 7

Vergleich Entzündungsreaktion mit der Hypothese der aseptischen Prothesenlockerung (nach Löffler, Basiswissen Biochemie, 2002)

Bis dato ist der biologische Background der partikelinduzierten Osteolyse nicht geklärt, sicher aber ist, dass das Ausmaß der inflammatorischen Zellantwort von partikelspezifischen Charakteristika wie ihrer Materialkomposition, Partikelgröße, Form und Anzahl abhängig ist (60).

### **1.10.2 Zusammenhang Osteolyse und aseptische Prothesenlockerung durch Abriebpartikel**

Die aseptische periprothetische Lockerung eines Implantats kommt im Wesentlichen durch die Anhäufung von Abriebpartikel, und durch mechanische Faktoren, wie zum Beispiel dem Flüssigkeitsdruck zu Stande.

Willert et al beschrieb 1990 in einer Studie, dass vor allem große Mengen von UHMWPE Partikel in periprothetischem Gewebe von osteolytisch gelockerten Implantaten nachgewiesen werden können. Durch diese Abriebpartikel kommt es zur Infiltration des Gewebes mit Makrophagen, wobei kleinere Teile ( $<1\mu\text{m}$ ), phagozytiert werden und größere Partikel von mehreren Zellen, die zu einem Fremdkörper fusionieren, umgeben werden, was auch als Granulombildung bezeichnet wird. Weiters kommt es zu einer partikelinduzierten Aktivierung des Monozyten-Makrophagensystems, was, wie bei der Entzündungsreaktion bereits erklärt, zu einer Zytokinfreisetzung (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , Prostaglandin E2, und IL-6) führt. Durch Rezeptoraktivatoren wie RANK (Receptor Activator of NF- $\kappa$ B), welcher Nuclear-Factor- $\kappa$ B aktiviert und als Protein an der Oberfläche von Osteoklasten exprimiert wird, und RANK-Ligand (RANKL), wird sowohl die Freisetzung als auch die Osteolyse unterstützt (61). Durch die Aktivierung von RANK folgt eine gesteigerte Bildung unreifer Osteoklasten. Osteoblasten hingegen exprimieren RANKL und binden an RANK-Rezeptoren, was zu einer Differenzierung der Präosteoklasten zu reifen Osteoklasten mit osteolytischer Aktivität führt. Zu einer partikelinduzierten Knochenresorption trägt sowohl die gesteigerte Bildung freier Radikale von Makrophagen und Osteoklasten, als auch eine gestörte periprothetische Knochenhomöostase, die durch eine vermehrte Knochenneubildung hervorgerufen wird, bei. Eine kompromittierte Knochenregeneration, die durch zytotoxische Effekte der Abriebpartikel gegenüber mesenchymaler Stammzellen bedingt ist, ist ebenfalls verantwortlich für eine partikelinduzierten Knochenresorption (62). Der wesentliche Unterschied zwischen Makrophagen und Osteoklasten ist, dass die Makrophagen den Hauptzelltyp in der periprothetischen Membran bilden und so für die direkte Knochenresorption verantwortlich sind. Sie liegen hauptsächlich an der Knochenoberfläche und bilden kleinerer Lakunen. Osteoklasten hingegen sind für eine außergewöhnlich schnelle und intensive Knochenresorption sowie für die Bildung größere Lakunen verantwortlich.

Studien wiesen nach, dass sich bei individuellen Materialien häufiger Zeichen einer spezifischen Immunreaktion zeigen (18). Dies lässt sich durch die Aktivierung des Monozyten-Makrophagen-Systems erklären. Nach Exposition mit metallischen Verschleißprodukten treten häufiger Zeichen einer spezifischen Immunantwort auf (18). Bei einer Vergleichsstudie zwischen Hüftendoprothesen mit Gleitpaarungen aus Metall-Metall mit Endoprothesen der Gleitpaarung Metall-UHMWPE war eine tendenzielle Zunahme von Lymphozyten in der Metall-Metall-Gruppe zu verzeichnen (63). Der Nachweis gelang, indem man Gewebeproben von Prothesen mit Gleitpaarungen Metall-Metall gegenüber Metall-UHMWPE (MPE) untersuchte, und deutlich mehr Lymphozyten in der Metall-Metall-Gruppe nachweisen konnte (24). Ähnliche Feststellungen machte man auch bei einer Untersuchung von gelockerten Metall-Metall-Gleitpaarungsendoprothesen (64). Man fand eine perivaskuläre Ansammlung von lymphozytären Infiltrationen mit Charakteristika von Spättypüberempfindlichkeitsreaktionen. Zusätzlich wurden auch noch Gewebeproben gelockerter Metall-Metall-Implantate geprüft, und auch hier zeigte sich, dass es zu einer perivaskulären Ansammlung lymphozytärer Infiltrationen mit Charakteristika der Spättypüberempfindlichkeitsreaktionen kommt (64). Es wird vermutet, dass es sich dabei um die Freisetzung ionaler Korrosionsprodukte handelt, die in weiterer Folge zu einer immunologischen Gewebereaktion gegenüber metallischen Abrieb führt und nach dem Prinzip der Komplexbildung mit körpereigenen Proteinen, die als Antigene fungieren, funktioniert und so eine allergische Reaktion auslösen können. Nach wie vor herrscht allerdings Unklarheit darüber, ob ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten der aseptischen Prothesenlockerung und einer gesteigerten Reaktivität lymphozytärer Zellen gegenüber Metall-Partikel besteht (46, 65-67).

Smith et al beschäftigt sich in einer aktuellen Studie (2009) mit dem Vergleich der immuninduzierten Antwort von Makrophagen, durch Polycarbonat-Urethan (PCU), einer gängigen Alternative zu Polyethylen, mit „cross-linked“ UHMWPE (xUHMWPE), bei Anwesenheit oder Fehlen von Endotoxin (68). Polyethylenabrieb, welcher in Hüfttotalendoprothesen generiert wird, besitzt osteolytische Aktivität und induziert eine verkürzte Lebensdauer der implantierten Prothese. Unter Betrachtung einer humanen Monozytenzelllinie (TH1) wurde sowohl PCU als auch xUHMWPE mit LPS-freien und endotoxingetriggerten Partikel in Verbindung gebracht. Die Zellaktivität, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) wurden nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden ermittelt.

Ergebnisse zeigten, dass die Partikel, sowohl PCU als auch xUHMWPE, keinen signifikanten Anstieg im Vergleich zu den Basiswerten, weder bei TNF- $\alpha$ , noch bei IL-1 $\beta$  oder PGE<sub>2</sub>, folgerten. PCU-Partikel, die Endotoxin ausgesetzt waren, riefen sogar einen bedeutend geringeren Anstieg von TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  hervor, als endotoxingetriggerte xUHMWPE-Partikel. Dieser Nachweis zeigt, dass, falls Endotoxin für eine Partikelbindung *in vivo* zur Verfügung steht, xUHMWPE eine höhere Wahrscheinlichkeit besitzt, eine Entzündungsreaktion hervorzurufen (68).

## 1.11 Antioxidantien

Derzeit gibt es einige Untersuchungen, in denen Antioxidantien, wie zum Beispiel Resveratrol,  $\alpha$ -Tocopherol, N-Acetyl-Cystein, und Quercetin verwendet werden, um eine Downregulation des oxidativen Stresslevels herbeizuführen, was auch das Hauptaugenmerk meiner Dissertation war. Dies ist bei der aseptischen Prothesenlockerung ein wichtiger Punkt, da es aufgrund dessen zur Aktivierung der Makrophagen und in weiterer Folge der gesamten Entzündungskaskade kommt, wodurch wiederum Osteoklasten aktiviert werden.

### 1.11.1 Vitamin C

Bei Vitamin C (Ascorbinsäure) handelt es sich um ein wasserlösliches, leicht oxidierbares Vitamin (45). Dieser Vitaminvertreter ist ein guter Radikalfänger, dient als Redoxcofaktor bei der Hydroxylierung, und ist am mikrosomalen Elektronentransport beteiligt. Die Ascorbinsäure hemmt die Nitrosaminbildung, fördert die Eisenresorption und hat eine immunsystemstärkende Wirkung (44).

Im Zuge dieser Dissertation wurde Vitamin C als Antioxidans eingesetzt, um eines down Regulation des oxidativen Stresslevels zu erzielen. Aufgrund eines sehr umfangreichen Pathways, welcher durch dieses Vitamin in Gang gesetzt wird, wurde anstelle von Vitamin C  $\alpha$ -Tocopherol für die Experimente eingesetzt.

### 1.11.2 $\alpha$ -Tocopherol

$\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), gehört zur Gruppe der fettlöslichen Vitamine. Es ist thermostabil und leicht oxidierbar. Bei den Tocopherolen gibt es insgesamt acht Untergruppen,  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - und  $\delta$ -Tocopherol beziehungsweise Tocotrienol. Biologisch am Wichtigsten ist das  $\alpha$ -Tocopherol. Tocopherole sind Antioxidantien und haben unter anderem Einfluss auf die Proteinsynthese und auf das neuromuskuläre System (44). Seine Hauptfunktion besteht in der Wirkung als Antioxidans, wo es als Reduktionsmittel schädliche Stoffe, insbesondere freie Radikale, entgiftet und unschädlich macht. Vitamin E schützt die Zellmembran vor oxidativer Regulation (69). Als lipophile Substanz wirkt es in lipidreicher Umgebung und schützt vor allem Carotinoide, Thiolgruppen, und ungesättigte Fettsäuren (45). Aufgrund der Verhinderung der Lipidperoxidation gilt Vitamin E als Substanz, welche Atherosklerose und damit verbundene Schädigung des Herzkreislaufsystems, verhindern kann (70).

$\alpha$ -Tocopherol wird ausschließlich im Pflanzenreich synthetisiert, es findet sich in pflanzlichen und tierischen Lebensmittel, wie zum Beispiel in Ölen, Nüssen, Getreidekeimlingen, Gemüse, Milch und Butter. Der Tagesbedarf an Vitamin E beträgt 12mg/Tag, der bei durchschnittlicher Ernährung gedeckt werden kann. Bei Mangel an  $\alpha$ -Tocopherol, was alimentär nur selten vorkommt, kann es zu Störungen der Muskulatur, des Nervensystems, des Gehirns, des kardiovaskulären Systems, der Erythrozyten und der Leber kommen. Eine aktuelle Studie von Kaur et al.(2009) beschreibt den möglichen Schutz von Makrophagen vor oxidativen Stress durch  $\alpha$ -Tocopherol, der durch Cumol (Isopropylbenzol) induziert wird (69). Dabei wurden Mausmakrophagen mit 10 – 200 $\mu$ M Cumol-Hydroperoxid (Cum-OOH) belastet, und somit einem physiologischen Stress ausgesetzt. Dabei wurde beobachtet, dass unter dieser Belastung, der für die Phagozytose relevante Mannoserezeptor, vermindert wurde. Bei einem zweiten Versuch, wo die Zellen zuvor 24 Stunden mit  $\alpha$ -Tocopherol inkubiert wurden, konnte keine Verminderung des Mannoserezeptors im Vergleich zur Kontrollgruppe unter der gleichen Belastung nachgewiesen werden.

### 1.11.3 Resveratrol

Resveratrol kommt in Trauben und Pflanzen vor und wirkt als Phytoalexin. Es besitzt eine schützende Wirkung vor Infektionen und anderen Stressfaktoren (71).

Bei dieser Substanz handelt es sich um ein Antioxidans, das vor allem in letzter Zeit häufig in den Schlagzeilen aufgetaucht ist. Resveratrol senkt das Risiko der Herz-Kreislauf-Erkrankungen und somit auch das Risiko einen Herzinfarkt zu erleiden. Es wirkt atheroskleroseprotektiv, indem es die Akkumulation von oxidierten low-density-Lipids (LDL's) bei atherosklerotisch veränderten Gefäßen verhindert (71). Dabei ist ein mäßiger Weinkonsum wesentlich, da eine große Menge an Resveratrol, wie bereits erwähnt, in Trauben und weiterer Folge auch in Wein, aber auch in dunkler Schokolade, vorkommt (72). Weiters besitzt es auch eine entzündungshemmende (73) und eine antikarzinogene Wirkung (74).

Kowalski et al beschäftigte sich 2005 unter anderem mit diesem Antioxidans. Dabei wurde die hemmende Wirkung auf den oxidativen Stress und auf die Bildung freier Radikale untersucht. Die Synthese proinflammatorischer Zytokine, wie zB.: IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ . und die antiinflammatorische Wirkung von Resveratrol bei IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  von Mausmakrophagen (J774.2) wurden ebenfalls erforscht. Ergebnisse dieser Versuche zeigten, dass Resveratrol bei der LPS-stimulierten Zelllinie J774.2, nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden, eine Abnahme von TNF- $\alpha$  induzierte (75).

#### **1.11.4 N-Acetyl-Cystein**

N-Acetyl-Cystein (NAC), auch als N-Acetyl-L-Cystein bekannt, wird aufgrund seiner Fähigkeit, durch reduktiver Spaltung von Disulfidbrücken, hauptsächlich als Mukolytikum verwendet. Über die Glutathion-Synthese wirkt es auch als hervorragendes Antioxidans (45). Bei einem Forschungsbericht aus dem Jahr 1996 wurde eine hemmende Wirkung von NAC auf TNF- $\alpha$  bei Synovialzellen nachgewiesen (76). Es wurde auch belegt, dass dieses Antioxidans die durch TNF- $\alpha$  induzierte Synovialzellproliferation hemmt (76).

#### **1.11.5 Quercetin**

Quercetin gehört zur Gruppe der Flavanole (Flavanoide), und kommt im Pflanzenzellsaft von Teeblättern, Zwiebeln und Äpfel, entweder frei oder als Glykosid vor (45, 77). Bei Flavanoide handelt es sich um stickstofffreie phenolische Pflanzenstoffe mit einem Phenylchroman-Grundgerüst, die ihre Anwendung bei Venenerkrankungen, koronaren und peripheren Durchblutungsstörungen und Lebererkrankungen finden (78). Aufgrund der

positiven Beeinflussung der Permeabilität der Kapillaren durch verschiedene Flavanoide, wurden diese auch als Vitamin-P-Faktor bezeichnet. Außerdem besitzt diese Substanz sowohl eine diuretische und spasmolytische Wirkung (45), als auch eine antikanzerogene Wirkung (79). 1997 wurde in einer Studie nachgewiesen, dass Quercetin eine hemmende Wirkung auf die Wachstumstendenz von Krebszellen und den Einfluss von Entzündungsreaktionen besitzt (80). Nakamura beschäftigte sich 2008 in einer Studie erstmals mit der Wirkung von Quercetin auf die Hemmung von TNF- $\alpha$  anhand der Betrachtung von LPS-stimulierten Mausmakrophagen einer speziellen Zelllinie (RAW 264.7) (81).

Im Bezug auf mein Dissertationsthema wurde ebenfalls mit Quercetin gearbeitet. Es fungierte als Antioxidans bei LPS stimulierten Mausmakrophagen, aber auch bei LPS-stimulierten humanen Makrophagen, die aus dem Buffy Coat isoliert wurden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Nährmedien und Reagenzien

RPMI mit Phenolrot; Gibco; #31870; 500ml  
RPMI ohne Phenolrot; Gibco; #32404; 500ml  
Foetal Bovine Serum; Gibco; #10270-106; 50ml 10%  
Penicillin Streptomycin; Gibco; #15140; 5ml  
Amphotericin B; PAA; #P11-001; 1ml  
Ficoll Plaque Premium; GE healthcare; # 17-5442-03; 1l  
Gelatine from bovine skin; Sigma Aldrich; G9391; 100g  
Aqua dest.; Fresenius Kabi; #0712221; 1000ml  
PBS 10x; Gibco; 70011-036; 500ml  
Lipopolysaccharide; Sigma Aldrich; #L4516; 1mg  
Lipopolysaccharide; Sigma Aldrich; #L6529; 1mg  
PMA Phorbol Myristate Acetate; Sigma Aldrich; #P8139  
alpha - Tocopherol acetate; Sigma Aldrich; #T1157  
Resveratrol; Sigma; #R5010; 100mg  
Quercetin dihydrate; Sigma Aldrich; #Q0125; 10g  
N-Acetyl-L-cysteine; Sigma Aldrich; #A9165; 5g  
Horse Serum; Gibco; #26050-070; 100ml  
L-Glutamin; Gibco; #25030; 200ml  
Vitamin B12; Lannacher  
Trypan Blue 0,4%; Sigma Aldrich; #T8154; 100ml

#### 2.1.2 Verbrauchsmaterial und Geräte

Zentrifugenröhrchen; 50ml; FALCON; #352070  
Zentrifugenröhrchen; 15ml; TPP; #91015

Pipette 2ml von Roth; #BD352070

Pipette 5ml; #BD353743

Pipette 10ml; # BDAA356551

Pipette 25ml; # BDAA356525

Pipette 50ml; #BDAA356550

Zellkulturplatte; TPP; #92024

Zellkulturplatte; TPP; #92012

Zellkulturplatte; TPP; #92006

Pipettenspitzen; EP-Dips 2-200 $\mu$ l; EPP.0030000870

Pipettenspitzen; Eppend. Dips 50-1000 $\mu$ l; EPP.0030000919

Multireaktionsgefäße; Boettger; #421/8; 1,5ml

Cell Strainer; Falcon; #322340

Cryoröhrchen von Roth; #E310.1

Kulturflaschen 175cm<sup>2</sup> von Nunk; #159926

Autoklav: 2540 ELV der Firma Systec (N54852)

Brutschrank; HEPA CLASS 100 der Firma Thermo Electron Corporation (N54835) und 06-08260 der Firma Binder (N55999)

Mikroskop; IX2-ILL100 der Firma Olympus (N54836)

Lamina; EN 12469 Der Firma CleanAir (N54834)

-80°C Tiefkühlschrank: ULT 2586 -9- V40 der Firma Thermo Electron Corporation

Hexazytometer

### **2.1.3 Test Kits**

Human TNF-alpha /TNFSF1A Quantikine Kit von R Human TNF-&D Systems; #DTA00C

PerOX (TOS= total oxidative status) Kit von Dr. Franz Tatzber KEG

## 2.2 Zellkultur

Die Makrophagen wurden unter sterilen Bedingungen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die humanen Primärzellen wurden vom Buffy Coat (von der Blutbank der Universitätsklinik Graz zur Verfügung gestellt), isoliert. Bei den Makrophagen Zelllinien wurde mit RAW 293 (ATCC) gearbeitet. Die mononukleären Zellen wurden in sechs bzw. zwölf Well Platten, die Mausmakrophagen in T175 Kulturflaschen im Inkubator bei 37°C und einer 5%igen CO<sub>2</sub> Konzentration, kultiviert. Der Mediumwechsel erfolgte alle drei Tage mit Kulturmedium ohne Phenolrot. Die Mausmakrophagen der Zelllinie RAW 293 wurden in T175 Kulturflaschen zu den gleichen Bedingungen versorgt.

### 2.2.1 Nährmedium und Stocksolution

Für die Kultivierung der Zellkulturen RAW 293 wurde folgendes Nährmedium verwendet:

RPMI 1640 mit Phenolrot	500,0ml
Foetal Bovine Serum 10%	50,0ml
Penicillin/Streptomycin	5,5ml
L-Glutamin	5,5ml

Nährmedien für humane Primärzellen:

Transfere Medium (TM):

RPMI mit oder ohne Phenolrot	500ml
Penicillin/Streptomycin	5ml
L-Glutamin	5ml

## Culture Medium (CM):

RPMI mit oder ohne Phenolrot	500ml
Fetal Bovine Serum (FBS)	50ml
Penicillin/Streptomycin	5ml
L-Glutamin	5ml

Um ein verbessertes Anhaften der Primärzellen an den Untergrund der Wellplatte zu ermöglichen, wurde diese mit einer 1%igen Gelatinelösung beschichtet.

Gelatinepulver	0,5g
Aqua dest.	ad 50,0ml

Die Lösung wurde autoklaviert, pro Well 800 $\mu$ l pipettiert und über Nacht bei 4°C gelagert. Abschließend wurde der Überstand mit dem Vakuumsauger abgesaugt und 2ml Zellsuspension pro Well pipettiert. Die Lagerung erfolgte im Inkubator bei 37°C.

Die Stocksolution für  $\alpha$ -Tocopherol wurde folgendermaßen hergestellt:

MW = 472,8

SS 100mM	MW: 472,8 $\rightarrow$ solubility EtOH
	0,1 M=100mM: 100mg in 2,11ml EtOH lösen
SS 1mM	250 $\mu$ l von der SS 100mM + 24,75ml RPMI

Verdünnungsreihe  $\alpha$ -Tocopherol

100 $\mu$ M	= 100 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI
50 $\mu$ M	= 50 $\mu$ l der SS 1mM /ml RPMI
25 $\mu$ M	= 25 $\mu$ l der SS 1mM /ml RPMI
10 $\mu$ M	= 10 $\mu$ l der SS 1mM /ml RPMI
1 $\mu$ M	= 1 $\mu$ l der SS 1mM /ml RPMI

Die Stocksolution für Quercetin wurde folgendermaßen hergestellt:

MW = 302.24

## Verdünnungsreihe Quercetin

SS1mM	= 68 $\mu$ l SS (14,7mM) + 932 $\mu$ l RPMI
50 $\mu$ M	= 50 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

25 $\mu$ M = 25 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

10 $\mu$ M = 10 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

Die Stocksolution für Resveratrol wurde folgendermaßen hergestellt:

MW = 228,25

SS 100mM MW: 118,25  $\rightarrow$  solubility EtOH

Verdünnungsreihe Resveratrol

SS 1mM = 22,8 $\mu$ l SS(21,9 mM) + 5ml RPMI

50 $\mu$ M = 50 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

25 $\mu$ M = 25 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

10 $\mu$ M = 10 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

Die Stocksolution für NAC wurde folgendermaßen hergestellt:

MW:163,2

SS 0,5 M

MW: 163,2  $\rightarrow$  solubility H<sub>2</sub>O: 100mg/ml erwärmen

0,5 M: 0,816g/10ml H<sub>2</sub>O

Um eine vollständige Lösung der Substanz zu gewährleisten, wurde auf 37°C erhitzt und anschließend filtriert.

Verdünnungsreihe NAC:

100 mM: 200 $\mu$ l/ml RPMI

50 mM: 100 $\mu$ l/ml RPMI

25 mM: 50 $\mu$ l/ml RPMI

10 mM: 20 $\mu$ l/ml RPMI

1 mM: 2 $\mu$ l/ml RPMI

Die Stocksolution für Vitamin C wurde folgendermaßen hergestellt

MW = 176,13

Cevitol Ampullen - 500mg in 2ml Ampullenlösung

1:100 Verdünnung: 10 $\mu$ l Cevitol + 990 $\mu$ l RPMI

100 $\mu$ g/ml: 40 $\mu$ l 1:100 Verdünnung/ml CM

75 µg/ml: 30µl 1:100 Verdünnung/ml CM  
50 µg/ml: 20µl 1:100 Verdünnung/ml CM  
25 µg/ml: 10µl 1:100 Verdünnung/ml CM  
10 µg/ml: 4µl 1:100 Verdünnung/ml CM

Die Stocksolution für LPS wurde folgendermaßen hergestellt

LPS: SS 1mg/ml

SS 10ng/µl: 10µl (SS1mg/ml) + 990µl RPMI

RAW293: 10µl/ml RPMI (=endconc. 100ng/ml)

BC: 2,5µl/ml RPMI (=endconc. 25ng/ml)

Der RIPA Puffer wurde folgendermaßen hergestellt

RIPA 100ml: SS 1mM

Tris -HCL pH 7,4	50mM
1% NP-40	
NaCl	150mM
EDTA	1mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	1mM
NaF	1mM
PMSF	1mM
Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin	1µg/ml

Tris (TRIZMA-HCL von Sigma T5941 FW157,6) 790mg

A.d. (Aqua Bidest von Fresenius) 75ml

NaCl (Sodium chloride von Sigma S3014 FW58,44) 800mg

10%igen NP-40 (Fulka 74385 1L) 10ml

100mM EDTA( Sigma E5134 FW 372,2) 1ml

NaF (Sigma S1504 FW 41,99)

Aqua dest. ad 100ml

Die Substanz autoklavieren und anschließend bei 4°C lagern.

## 2.2.2 Monozytenisolierung

### 2.2.2.1 Buffy Coat

Beim Buffy Coat handelt es sich um eine Schicht aus Leukozyten und Thrombozyten zwischen Blutplasma und Erythrozyten, die sich nach längerem Stehen oder Zentrifugieren einer Vollblutkonserve bildet (Abb. 8) (44). Um humane mononukleäre Zellen zu isolieren, wurde uns der Buffy Coat von der Blutbank der Universitätsklinik Graz zur Verfügung gestellt. Die Zellisolierung erfolgt dabei über den Dichtegradienten, der eine Aufteilung der Partikel gemäß der Dichte des Homogenisats ohne Vermischung ermöglicht (Abb.8).

Bei der Monozytenisolierung wird nach folgendem Protokoll gearbeitet:

1. Buffy Coat Nummer notieren
2. Buffy Coat in der sterilen Werkbank öffnen und Blut in einen 50ml Falcon überführen
3. Volumen ermitteln und ebenfalls notieren.
4. Volumen des Buffy Coats in 4 50ml Falcons aufteilen
5. Falcons jeweils mit Transportmedium auf 30ml auffüllen
6. Vorsichtig 14ml Ficoll-Plaque Plus jedem Falcon unterlegen
7. Anschließend bei 1600rpm für 30 Minuten bei Raumtemperatur ohne Bremswirkung zentrifugieren.
8. Nach dem zentrifugieren wird ein weißer Ring sichtbar, welcher durch die mononukleären Zellen des Blutes gebildet wird. Der Überstand der sich über diesem Ring befindet wird vorsichtig mit einer serologischen Pipette abgesaugt, anschließend wird auch der Ring mittels einer 5ml serologischen Pipette abgenommen und in 2 50ml Falcons aufgeteilt.
9. Jedes Falcon wird nun mit Transportmedium auf 50ml aufgefüllt.
10. Bei 600rpm für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert
11. Anschließend den Überstand wieder abnehmen, und das Pellett, das sich am Boden des Falcons gebildet hat, mit 5ml Transportmedium resuspendieren.
12. Zelllysate von Falcon 1 und Falcon 2 nun in 1 Falcon zusammenlegen und den Waschschrift wiederholen.
13. Abermals bei 600rpm für 30 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren.

14. Überstand wieder abheben und das Pellet mit 40ml Kulturmedium resuspendieren.
15. Zellzahl mittels Zählkammer und Trypanfärbung 1:1 bestimmen.
16. Seeden von 3 x 6 Well Platten, die mit einer 1%igen Gelatinelösung beschichtet wurde.

Monozytenisolierung

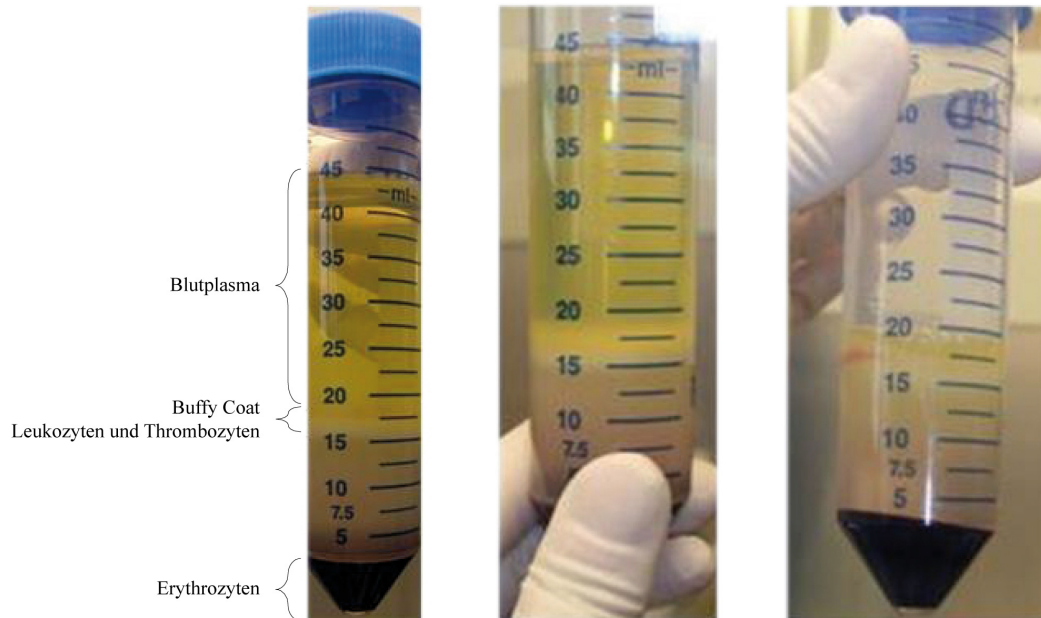


Abbildung 8  
 Monozytenisolierung aus dem Buffy Coat. Dabei werden die einzelnen Bestandteile über den Dichtegradienten aufgeteilt.

### 2.2.3 Splitten (Aufteilen) und Einfrieren

Kulturen wurden bei einer Konfluenz von 80-90% nach folgendem Schema gesplittet:

1. Altes Nährmedium mit der Vakuumpumpe absaugen
2. Kulturen mit 7ml 1xPBS waschen
3. Waschschrift wiederholen
4. 7ml 10x Trypsin auf die Kultur pipettieren und im Anschluss bei 37°C für 5 Minuten inkubieren.
5. Kulturflasche aus dem Inkubator nehmen, sanft klopfen, um die Zellen vom Kulturflaschenboden zu lösen
6. Das Zelllösen lichtmikroskopisch überprüfen
7. Um das Trypsin abzustoppen, pro Kulturflasche mindestens 14ml Kulturmedium zuführen
8. Zellsat in 50ml Falcontubes überführen und bei 1300 rpm für 7 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren
9. Überstand der Falcons in der sterilen Werkbank mit der Vakuumpumpe absaugen
10. 10ml Nährmedium in die neue Kulturflasche vorlegen
11. Pellet aufklopfen und weiters mit 10 ml Nährmedium resuspendieren.
12. Zellsuspension zu den bereits vorgelegten 10ml Nährmedium zuführen.
13. Kulturen bei 37°C wieder lagern.

Um die Zellen in einer bestimmten Passage für längere Zeit ordnungsgemäß aufzubewahren, werden diese eingefroren:

1. Altes Nährmedium mit der Vakuumpumpe absaugen
2. Kulturen mit 7ml 1xPBS waschen
3. Vorgang wiederholen
4. 7ml 10x Trypsin auf die Kultur pipettieren und im Anschluss bei 37°C für 5 Minuten inkubieren.
5. Kulturflasche aus dem Inkubator nehmen, sanft klopfen, um dadurch die Zellen vom Kulturflaschenboden zu lösen
6. Das Zelllösen lichtmikroskopisch überprüfen
7. Um das Trypsin abzustoppen, pro Kulturflasche mindestens 14ml Kulturmedium zuführen

8. Zelllysats in 50ml Falcontubes überführen und bei 1300 rpm für 7 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugieren
9. Überstand der Falcons in der sterilen Werkbank mit der Vakuumpumpe absaugen
10. Zellpellet aufklopfen und mit 1-2 ml Einfriermedium resuspendieren
11. Überführen des Zelllysats in Cryovials
12. Lagerung bei -80°C

## **2.3 Antioxidantien – Behandlung**

### **2.3.1 Seeden (Aussetzen)**

Um die Zellen in der richtigen Konzentration pro Well pipettieren zu können, muss die Zellzahl bestimmt werden:

1. Bei allen 4 Kulturfalschen Kulturmedium abpipetieren.
2. 2x mit jeweils 10ml gut vorgewärmten PBS waschen.
3. Pro Flasche 7ml ebenfalls gut vorgewärmtes Trypsin pipetieren.
4. Bei 37°C (Inkubator) inkubieren, bis sich mindestens  $\frac{2}{3}$  die Zellen zu lösen beginnen.  
(Kontrolle mittels Mikroskop)
5. Doppelte Menge an Nährmedium (in unserem Fall 14ml) zupipetieren um das Trypsin abzustoppen.
6. Überführen der Lösung in ein 50ml Falcon.(Jeweils 2 T175 zusammen → insgesamt 2 Falcons)
7. Zentrifugieren bei 1300rpm für 7 Minuten bei Raumtemperatur.
8. Überstand abnehmen und Pellet aufklopfen
9. Mit 5-10ml RPMI ohne Supplements resuspendieren.
10. Zellzahlbestimmung pro Falcon mit jeweils 25µl Zellsuspension und 25µl Trypanblau in einer 32Well Platte gut mischen und in der Zählkammer (BückerTürk) auszählen und im Anschluss berechnen.  
Pro Well werden  $1 \times 10^6$  Zellen geseedet.

Im Anschluss wird der Falcon auf 45ml mit RPMI ohne Supplements aufgefüllt (2ml pro Well – insgesamt 21 Wells – 3ml als Reserve).

Rechenschema mit Beispiel:

Zellzahl x Verdünnungsfaktor (2, da die Zellsuspension in einem Verhältnis von 1:1 mit Trypanblau vermischt wurde)  $\times 10^4 = \text{Zellen/ml}$

Beispiel:

196 Zellen (2 Quadrate wurden ausgezählt):  $2 = 98$

$98 \times 2 (\text{Verdünnungsfaktor}) \times 18 (\text{Volumen, auf das aufgefüllt wurde}) \times 10^4 = \underline{3528 \times 10^4 \text{ Zellen/18ml}}$   
 $= \underline{35,28 \times 10^6 / 18 \text{ml}}$

Geht man davon aus, dass man pro Well  $1 \times 10^6$  Zellen benötigt und insgesamt 16 Wells hat, errechnet man die Menge folgendermaßen:

$35,28 \times 10^6 \dots\dots\dots 18,00 \text{ml}$

$16 \times 10^6 \dots\dots\dots X,00 \text{ml}$

$16 \times 10^6 \dots\dots\dots 8,16 \text{ml}$

8,16ml aus der aktuellen Zellsuspension auf 35ml mit RPMI (OHNE ZUSÄTZE!) auffüllen und pro Well 2ml Suspension seeden.

### **2.3.2 Starving (Hungerprotokoll)**

Bevor die Antioxidantien auf die Zellen pipettiert wurden, unterzieht man sie einer vierstündigen Hungerphase, um das oxidative Stresslevel so gering wie möglich zu halten.

Beim Aushungern wird als Medium RPMI 1640 ohne Zusätze, also ohne FBS, ohne L-Glutamin und ohne Penicillin/Streptomycin, verwendet. Die Starvingdauer erfolgt bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>.

### **2.3.3 Treatment (Behandlung)**

Als Treatment wurden für diesen Versuch  $\alpha$ -Tocopherol, Quercetin, Resveratrol und NAC verwendet. Die Stocksolutions wurden wie bereits unter 2.2.1 beschrieben vorbereitet und nach dem Hungerintervall nach folgendem Pipettierschema pipettiert (Abb.2):

Platte 1  $\alpha$ -Tocopherol

SS 1mM      250 $\mu$ l von der SS 100mM + 24,75ml RPMI

100  $\mu$ M: 100 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

25  $\mu$ M: 25 $\mu$ l der SS 1mM /ml RPMI

10  $\mu$ M: 10 $\mu$ l der SS 1mM /ml RPMI

1  $\mu$ M: 1 $\mu$ l der SS 1mM /ml RPMI

Well 1 : Negativkontrolle – nur 1ml CM (= RPMI + Supplements)

Well 2 : 100ng/ml LPS (= 10 $\mu$ l) CAVE:erst NACH 2 Stunden Inkubation!!!

Well 3 : 100 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

Well 4 : 25 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

Well 5 : 10 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

Well 6 : 1 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

Platte 2 Quercetin

SS1mM = 68 $\mu$ l SS (14,7mM) + 932 $\mu$ l RPMI

50  $\mu$ M: 50 $\mu$ l der SS1mM/ml RPMI

25  $\mu$ M: 25 $\mu$ l der SS1mM/ml RPMI

10  $\mu$ M: 10 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI

Well 1 : Negativkontrolle – nur 1ml CM

Well 2 : 100ng/ml LPS (= 10 $\mu$ l) CAVE:erst NACH 2 Stunden Inkubation!!!

Well 3 : 50 $\mu$ l (der 1mM SS) + 950  $\mu$ l RPMI

Well 4 : 25 $\mu$ l (der 1mM SS) + 975 $\mu$ l RPMI

Well 5 : 10 $\mu$ l (der 1mM SS) + 990 $\mu$ l RPMI

Platte 3 Resveratrol

SS 100 $\mu$ M: 22,8 $\mu$ l (SS21,9mM) + 5ml RPMI

50 $\mu$ M: 500 $\mu$ l (100 $\mu$ M) + 500 $\mu$ l RPMI

25 $\mu$ M: 250 $\mu$ l (100 $\mu$ M) + 750 $\mu$ l RPMI

10 $\mu$ M: 100 $\mu$ l (100 $\mu$ M) + 900 $\mu$ l RPMI

Well 1 : Negativkontrolle – nur 1ml CM

Well 2 : 100ng/ml LPS (=10µl) CAVE:erst NACH 2 Stunden Inkubation!!!

Well 3 : 500µl (der 100µM SS) + 500µl RPMI

Well 4 : 250µl (der 100µM SS) + 750µl RPMI

Well 5 : 100µl (der 100µM SS) + 900 µl RPMI

Platte 4 NAC

SS 0,5 M

50 mM: 100µl/ml RPMI

25 mM: 50µl/ml RPMI

10 mM: 20µl/ml RPMI

Well 1 : Negativkontrolle – nur 1ml CM

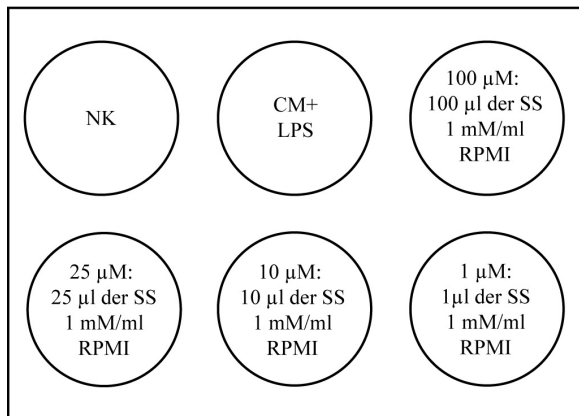
Well 2 : 100ng/ml LPS (=10µl) CAVE:erst NACH 2 Stunden Inkubation!!!

Well 3 : 100µl/ml

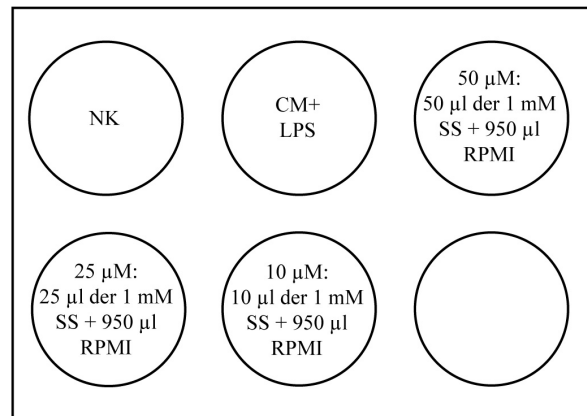
Well 4 : 50µl/ml

Well 5 : 20µl/ml

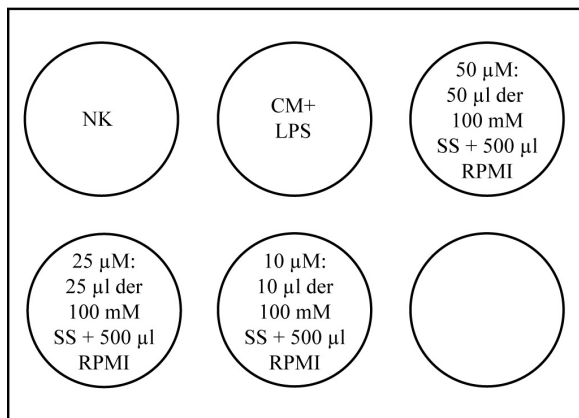
Platte 1: Alpha-Tocopherol



Platte 2: Quercetin



Platte 3: Resveratrol



Platte 4: NAC

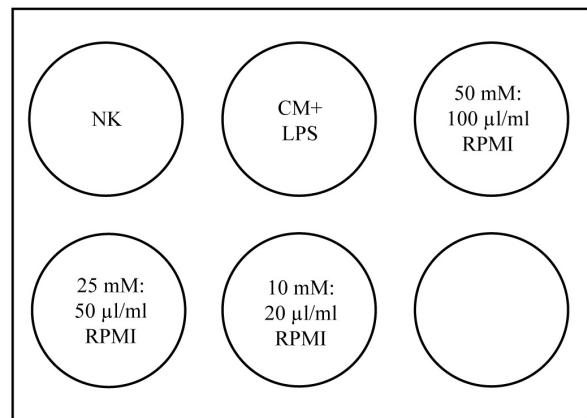


Abbildung 9

## Pipettierschema Versuch Antioxidantien

NK: Negativkontrolle – nur Kulturmedium mit Zusätzen LPS: 100ng/ml wurde erst nach einer Inkubationszeit des Zellsuspensats von 2 Stunden zupipettiert. Von Alpha-Tocopherol wurden jeweils in Well drei bis sechs die Konzentrationen von 100µM bis 1µM getestet, von Quercetin und Resveratrol wurden jeweils in Well drei bis sechs die Konzentrationen von 50µM bis 10µM getestet und von NAC wurden ebenfalls in den Wells drei bis sechs die Konzentrationen 50mM bis 10mM ausgetestet.

### 2.3.4 LPS

Bei Lipopolysacchariden handelt es sich um hochmolekulare Komplexe, die sich aus Lipid, Kernregion und Polysacchariden zusammensetzen, und Zellwandbestandteile von gramnegativen Bakterien sind. LPS wirkt unter anderem als Endotoxin, B-Zell-Mitogen oder auch als immunologisches Adjuvans (44). Bei den Versuchen mit Antioxidantien wurde LPS als Stimulans verwendet, um sowohl die humanen Monozyten aus dem Buffy Coat (BC), als auch die Mausemakrophagen RAW293 in eine adäquate Stresssituation zu versetzen, so wie es

bei Abriebpartikel angenommen wird (61). Die mononukleären Zellen (MNC) des BC wurden mit einer LPS Konzentration von 25ng/ml, die Mausmakrophagen RAW293 mit einer Konzentration von 100ng/ml stimuliert. Beim Arbeitsprotokoll wurde nach zwei Stunden Inkubation bei 37°C bei Platte 1 in die Wells 2-6 100ng/ml und bei den Platten 2-4 jeweils in Well 2-5 100ng/ml pipettiert, um eine Stresssituation zu simulieren. Im Anschluss abermals in den Inkubator für weitere vier Stunden.

### **2.3.5 Probengewinnung**

Nach der abgelaufenen Inkubationszeit von zwei Stunden, werden von jedem Well 200µl aus dem Überstand entnommen und in ein steriles Multireaktionsgefäß. Der Rest wird abgesaugt. Für eine spätere Bestimmung des TNF- $\alpha$  wird die Probe bei -20°C zwischengelagert. Im Anschluss wird in jedes Well 150µl vier Grad Celsius kalter RIPA-Puffer pipettiert. Dann werden die Platten für ca. 10-15 Minuten im Kühlschrank inkubiert. Es erfolgt das Resuspendieren des Lysats mit anschließendem Überführen in ein Eppendorfer Multireaktionsgefäß, sowie die Lagerung bei -20°C. Aus dem Lysat werden später die Peroxide durch den PerOx-Kit eruiert.

## **2.4 PEROX Assay**

### PerOX (TOS= total oxidative status) Kit von Dr. Franz Tatzber KEG

Dieser photometrische Test, dient zur Bestimmung des gesamten oxidativen Status in EDTA-Plasma, Serum und Zellkultur - Überständen.

#### Prinzip:

Über eine Reaktion von Peroxidase und Peroxid und einer weiteren Substratumsetzung erfolgt die Bestimmung von Peroxiden. Nach der Zugabe der Stopplösung erfolgt eine photometrische Messung.

Reagenzien:

OX 20-4201: STD A:	0 mmol/l;	250 µl	ready for use
OX 20-4202: STD B:	0,125 mmol/l;	250 µl	ready for use
OX 20-4203: STD C:	0,25 mmol/l;	250 µl	ready for use
OX 20-4204: STD D:	0,5 mmol/l;	250 µl	ready for use
OX 20-4205: STD E:	1 mmol/l;	250 µl	ready for use
OX 20-4251: Control 1:		250 µl	ready for use
OX 20-4252: Control 2:		250 µl	ready for use
OX 20-4113: ASSAY BUFF:		50 ml	ready for use
OX 20-4136: PEROXIDASE:		250 µl	ready for use
OX 20-4155: SUBSTRATE:		250 µl	ready for use
OX 20-4180: STOP- SOLN:		5,5 ml	ready for use
OX 20-0032: MIT- STRIPS:		12 x 8 Wells	ready for use

Durchführung:

1. Reagenzien richten

Reagent Mixture: Assay Buffer (96 Wells): 20 ml

Substrate 200 µl

Peroxidase 20 µl

Der Reagent-Mix muss innerhalb von 15 Minuten verwenden werden.

Standarts mit je 250 µl Aqua dest lösen, aliquotieren und anschließend bei – 20°C im Eisfach lagern.

Kontrollen ebenfalls mit 250 µl Aqua dest lösen, aliquotieren und bei – 20°C im Gefreirschrank lagern.

2. T\_O\_C Assay:

Dieser erfolgt bei Raumtemperatur und in Doppelbestimmung

10 µl Standard, Kontrollgruppe oder Probe pro Well pipettieren

200 µl Reagent Mixture innerhalb einer Minute zupipettieren und exakt 20 Minuten inkubieren.

Nach der Inkubationszeit 50 µl Stop Solution innerhalb einer Minute pro Well pipettieren.

3. Messung bei 450 nm mit dem Photometer

4. Kontrollen kontrollieren mithilfe des QC Protokolls

5. Ergebnisse berechnen

Prinzip:

Über eine Reaktion von Peroxidase und Peroxid und einer weiteren Substratumsetzung erfolgt die Bestimmung von Peroxiden. Nach der Zugabe der Stopplösung erfolgt eine photometrische Messung.

Standardreihe (ready to use):

Vial	Final Concentration
A	0 mmol/l
B	0,125 mmol/l
C	0,250 mmol/l
D	0,5 mmol/l
E	1 mmol/l

Tabelle 1 Standardreihe für TNF-alpha-Kit

Reagent mix: 21 Proben in Doppelbestimmung + 5x Standard (insgesamt 47 Wells á 200µl = 9,4ml)

1. Reagent mix: 10ml Assay Buffer + 100µl Substrate + 10µl Peroxidase pro Well pipettieren.
2. 10µl Standard (ready to use), Probe (10µl) und Control (10µl) vorlegen.  
Proben in der 96well platte vorlegen und danach mit der Mehrkanalpipette 200µl Reagent Mix dazupipettieren (Farbumschlag!)
3. 50µl Stop Solution (Farbumschlag blau-gelb) zupipettieren, nachdem ein Farbumschlag gut sichtbar ist.
4. Messung mit SpektraMax bei 450 nm.

Std	Std	Q	Q	Res	Res	NAC	NAC
A	A	1	1	6	6	11	11
B	B	2	2	7	7	12	12
C	C	3	3	8	8	13	13
D	D	4	4	9	9	14	14
E	E	5	5	10	10	15	15
F							
G	Contr1						
H	Contr2						

Tabelle 2

Pipettierschema des TNF-alpha-Kits bei Antioxidantierversuch. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung betrachtet

Std	Std	Q	Res	NAC
A	A	NK	NK	NK
B	B	CM+LPS	CM + LPS	CM + LPS
C	C	100 $\mu$ M: 100 $\mu$ l der SS 1mM/ml RPMI	50 $\mu$ M: 500 $\mu$ l (100 $\mu$ M) + 500 $\mu$ l RPMI	50 mM: 100 $\mu$ l/ml RPMI
D	D	25 $\mu$ M: 25 $\mu$ l der SS 1mM /ml RPMI	25 $\mu$ M: 250 $\mu$ l (100 $\mu$ M) + 750 $\mu$ l RPMI	25 mM: 50 $\mu$ l/ml RPMI
E	E	10 $\mu$ l der 1mM SS + 950 $\mu$ l RPMI	10 $\mu$ M: 100 $\mu$ l (100 $\mu$ M) + 900 $\mu$ l RPMI	10 mM: 20 $\mu$ l/ml RPMI
F		1 $\mu$ M: 1 $\mu$ l der SS 1mM /ml RPMI		
G	Contr1			
H	Contr2			

Tabelle 3

Beispiel für ein Pipettierschema des TNF-alpha im Bezug auf folgende Antioxidantien : Quercetin, Resveratrol und NAC in unterschiedlichen Konzentrationen.

## **2.5 Human TNF- $\alpha$ /TNFSF1A Quantikine Kit von R&D Systems #DTA00C**

Zur quantitativen Bestimmung der humanen TNF- $\alpha$ -Konzentration in Zellkulturüberständen, Serum und Plasma.

### Testprinzip:

Dieser Kit arbeitet nach der Sandwich Elisa-Methode. Ein TNF- $\alpha$  spezifischer monoklonaler Antikörper (AK) wurde an eine Mikrotiterplatte gebunden. Sowohl Standard als auch Proben werden in die Wells pipettiert. Das vorhandene TNF- $\alpha$  bindet und wird somit immobilisiert. Die Platte im Anschluss waschen, um so die ungebundenen Bestandteile zu entfernen und einen Enzym-linked polyklonalen AK, spezifisch für TNF- $\alpha$ , zufügen. Die Platte abermals waschen um ungebundene Bestandteile zu entfernen und das Substrat zufügen. Es kommt zu einer, zur TNF- $\alpha$  Konzentration direkt proportionalen, Farbentwicklung. Assay nach Farbumschlag abstoppen und anschließend mit dem Photometer vermessen.

### Probenlagerung:

Zellkulturüberstände, Serum und Plasma werden bei -20°C gelagert.

### Reagenzienvorbereitung:

Alle Reagenzien auf Raumtemperatur bringen

Wash Buffer : 20ml Wash Buffer Konzentrat

Ad 480ml Aqua dest.

Calibrator Diluent RD6-35 CC: 20ml Calibrator Diluent RD6-35

80ml Aqua dest.

Substrat Solution: Color Reagents A und B in gleichen Teilen mischen, vor Licht schützen und innerhalb von 15 min verwenden (200 $\mu$ l/Well).

TNF- $\alpha$  Standard (10 000pg/ml) nach Angabe auf dem Fläschchen mit Aqua dest. lösen, 15 min leicht schwenken und nach Bedarf verdünnen.

Verdünnungsreihe (verdünnten Calibrator Diluent RD6-35 CC):

- 1000 pg/ml → 100µl TNF- $\alpha$  Standard 10 000pg/ml + 900µl verdünnten Calibrator Diluent RD6-35 CC
- 500 pg/ml → 500µl 1000 pg/ml + 500µl verdünnten Calibrator Diluent RD6-35 CC
- 250 pg/ml → 500µl 500 pg/ml + 500µl verdünnten Calibrator Diluent RD6-35 CC
- 125 pg/ml → 500µl 250 pg/ml + 500µl verdünnten Calibrator Diluent RD6-35 CC
- 62,5 pg/ml → 500µl 125 pg/ml + 500µl verdünnten Calibrator Diluent RD6-35 CC
- 31,2 pg/ml → 500µl 62,5 pg/ml + 500µl verdünnten Calibrator Diluent RD6-35 CC
- 15,6 pg/ml → 500µl 31,2 pg/ml + 500µl verdünnten Calibrator Diluent RD6-35 CC
- 0 pg/ml → 500µl verdünnten Calibrator Diluent RD6-35 CC)

Assaydurchführung:

1. Proben, Kit, etc. auf RT bringen, gut mischen und alle Arbeitsutensilien herrichten.
2. 50µl Assay Diluent RD1F in jedes Well pipettieren
3. 200µl STD oder Probe zufügen
4. 2h bei RT inkubieren, abdecken
5. Platte ausklopfen und 4-mal mit 400µl Waschbuffer waschen
6. 200µl TNF- $\alpha$  Conjugate pipettieren
7. 1h bei RT inkubieren, abdecken
8. Platte ausklopfen und 3mal mit 400µl Waschbuffer waschen
9. 200µl Substrate Solution zufügen
10. 20 min bei RT inkubieren, und durch Alufolie gut abdecken, da ein Lichtschutz erforderlich ist
11. 50µl Stop Solution zufügen, und durch auf- und absampeln gut durchmischen
12. Bei 450nm innerhalb von 30 Minuten messen.

### 3 Statistik

Alle Versuche wurden statistisch ausgewertet. Dabei wurde Mittelwert, Standardabweichung, Standarderror und der Student-T-Test ermittelt.

#### 3.1 Mittelwert

Beim Mittelwert handelt es sich um die Kenngröße für die Lage einer Messreihe. Im Allgemeinen wird der Mittelwert als Synonym für das arithmetische Mittel verwendet, und berechnet sich aus der Summe der Messwerte und ihrer Anzahl  $n$ .

#### 3.2 Standardabweichung

Ist das Maß für die Streuung der Werte einer Zufallsvariablen um ihren Mittelwert. Die Standardabweichung zeigt die reale Streubreite, die der erhobene Wert, z. B. ein Laborwert, innerhalb der untersuchten Gruppe von Patienten aufweist.

#### 3.3 Standarderror

Beim Standarderror handelt es sich um die theoretische Streubreite der Gruppenmittelwerte, die sich ergeben würde, wenn theoretisch unendlich viele Stichproben aus der sogenannten Grundgesamtheit gezogen werden würde.

#### 3.4 Student–T-Test

Der t-Test ist eine Entscheidungsregel auf einer mathematischen Grundlage, mit deren Hilfe ein Unterschied zwischen den empirisch gefundenen Mittelwerten zweier Gruppen näher analysiert werden kann. Er liefert nur für intervallskalierte Daten zuverlässige Informationen. Deshalb gehört er zur Gruppe der parametrischen Verfahren.

#### 3.5 Signifikanz

Die statistische Signifikanz gibt an, wie groß die Wahrscheinlichkeit ( $p$ ) ist, dass der mittlere Wert einer Messreihe von einem angenommenen Wert abweicht, das heißt, ob die Hypothese

die Abweichung sei rein zufällig, zurückgewiesen werden kann. Je größer die Anzahl der Messungen, je präziser das Messinstrument und je größer der gewählte  $p$ -Wert, desto kleiner ist der Unterschied, der ermittelt werden kann. Die Voraussetzung ist, dass es sich dabei um rein zufällige Wiederholungen der Messung eines Objekts handelt, das sich durch und während der Messung nicht verändert. In diesem und nur in diesem Fall kann angenommen werden, dass der Messfehler ab einer bestimmten Anzahl von Messungen ( $>10$ ) nahezu normalverteilt ist, also eine Glockenkurve bildet. Die Signifikanz kann in gering signifikant ( $p < 0,05$ ) (\*) und hoch signifikant ( $p < 0,001$ ) (\*\*) bzw. ( $p < 0,0001$ ) (\*\*\*)).

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Vergleich von Zellkulturüberstand und Lysat von mononukleären Zellen zum Nachweis des oxidativen Stresslevels

Da zu Beginn nicht bekannt war, ob die, durch oxidativen Stress entstandenen Peroxide, bei mononukleären Zellen in Zellkultur im Überstand oder im Lysat nachzuweisen sind, wurde sowohl Überstand als auch Lysat mittels PerOx – Kit untersucht und mittels anschließender photometrischen Messung bei 450nm vermessen (Abb.10A und B). Zur Stimulation der mononukleären Zellen wurde Lipopolysaccharid (LPS) und Phorbol 12-myristat 13-Acetat (PMA) in unterschiedlichen Konzentrationen verwendet (siehe Pipettierschema, Tabelle 4). Der oxidative Status ist demnach im Lysat nachzuweisen, wie auch die nachfolgenden Abbildungen zeigen.

96	Std	Std	BC ÜSt	BC Lysat	BC ÜSt	BC Lysat	RAW293 ÜSt	RAW293 Lysat
A	A	A	NK	NK	NK	NK	NK	NK
B	B	B	PMA 50ng/ml	PMA 50ng/ml	LPS 2,5µg/ml	LPS 2,5µg/ml	LPS 2,5µg/ml	LPS 2,5µg/ml
C	B 1:10	B 1:10	PMA 100ng/ml	PMA 100 ng/ml	LPS 10µg/ml	LPS 10µg/ml	LPS 10µg/ml	LPS 10µg/ml
D	B 1:5	B 1:5	LPS 0,5µg/ml	LPS 0,5µg/ml	LPS 25µg/ml	LPS 25µg/ml	LPS 25µg/ml	LPS 25µg/ml
E	C	C	LPS 2,0µg/ml	LPS 2,0µg/ml	LPS 50µg/ml	LPS 50µg/ml	LPS 50µg/ml	LPS 50µg/ml
F	D	D			PMA 100ng/ml	PMA 100ng/ml	PMA 100ng/ml	PMA 100ng/ml

Tabelle 4 : Pipettierschema mit der Übersicht der verwendeten Konzentrationen von PMA und LPS bei mononukleären Zellen des Buffy Coats und der Mausemakrophagen RAW293. Die Konzentrationen reichen bei PMA von 50 bis 100ng/ml und bei LPS von 0,5µg bis 50µg.

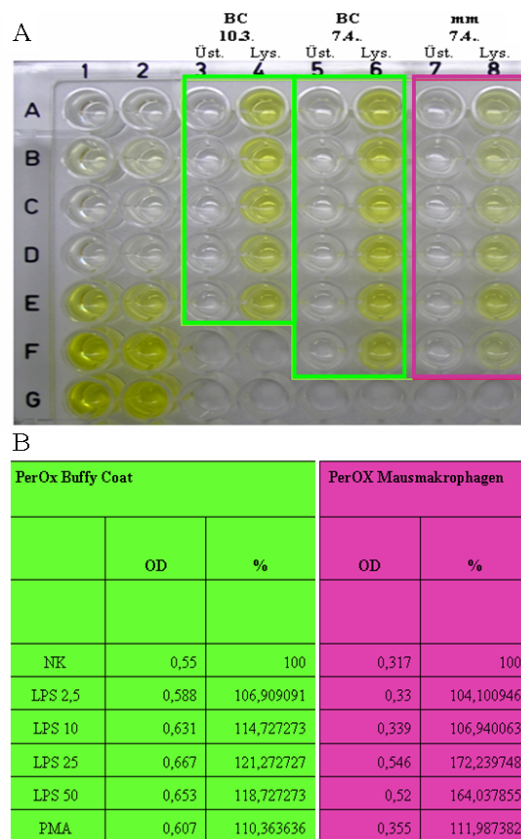


Abbildung 10

A) Fotografische Darstellung der PerOx – Analyse von mononukleäre Zellen des Buffy Coats (BC) und RAW293 Mausmakrophagen zur Eruiierung des oxidativen Stresslevels. Spalten 1 und 2 zeigen die Standardkurve in Doppelbestimmung. Sowohl beim Buffy Coat, als auch bei den Mausmakrophagen zeigte der Vergleich des Zellkultur-Überstands mit dem Lysat, dass die Peroxide im Zelllysat nachgewiesen werden konnten. B) Photometrische Auswertung des PerOx - Kits mit dem Spectramax bei 450nm und die prozentuelle Quantifizierung der OD450nm-Werte.

Korrespondierend zur unbehandelten Negativkontrollgruppe verringert sich der OD450nm – Wert nicht signifikant von  $0,64 \pm 0,05$  ( $N = 3$ ) bei einer Behandlung der humanen Zellen eines Buffy Coats (BC) mit  $0,5\mu\text{g/ml}$  LPS auf  $0,568 \pm 0,03$  und bei  $2,5\mu\text{g/ml}$  LPS auf  $0,539 \pm 0,01$ . Bei einer Behandlung der humanen Primärzellen mit höheren Konzentrationen kommt es zu einer leichten nicht signifikanten Zunahme der OD450nm – Werte von  $0,628 \pm 0,01$  bei  $10\mu\text{g/ml}$  LPS,  $0,667 \pm 0,01$  bei  $25\mu\text{g/ml}$  LPS und  $0,652 \pm 0,01$  ( $N = 6$ ) bei  $50\mu\text{g/ml}$  (Abb. 11A).

Ein ähnliches Ergebnis zeigen die RAW293 Mausmakrophagen. Nur die Behandlung der Zellen mit  $0,5\mu\text{g/ml}$  LPS zeigen im Vergleich zur korrespondierenden, unbehandelten Kontrollgruppe einen signifikanten Anstieg der OD450nm – Werte von  $0,277 \pm 0,09$  auf

0,879 ± 0,03 (\*). Bei einer Behandlung der Mausmakrophagen mit 2,5µg/ml LPS verringern sich die OD450nm – Werte nicht signifikant von 0,203 ± 0,103. Stimuliert man die Zelllinie mit 10µg/ml LPS, 25µg/ml und 50µg/ml LPS, steigen die OD450nm – Werte von 0,376 ± 0,055 auf 0,467 ± 0,068, beziehungsweise auf 0,499 ± 0,118 (N = 6) an (Abb.11B).

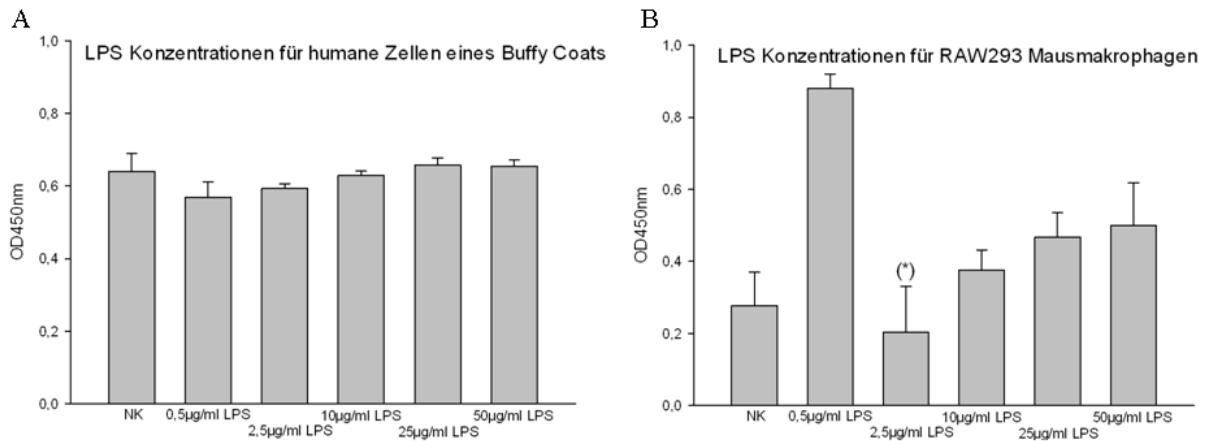


Abbildung 11

und B) zeigen die statistischen Auswertungen der humanen Primärzellen und der RAW293 Mausmakrophagen im Vergleich. Es erfolgte jeweils eine LPS – Stimulation in unterschiedlichen Konzentrationen. Bei den Mausmakrophagen ist bei einer Stimulation der Zellen mit 0,5µg/ml LPS im Vergleich zur korrespondierenden, unbehandelten Kontrollgruppe eine signifikanten Anstieg der OD450nm Werte von 0,277 ± 0,09 (N = 3) auf 0,879 ± 0,03 (N = 3) (\*) zu verzeichnen.

## 4.2 TNFα-Immunoassay zum Vergleich verschiedener LPS-Konzentrationen

Parallel zum dem Nachweis der Peroxide wurde, mit den bereits im vorhergehenden Experiment verwendeten Proben, ein TNFα-Immunoassay durchgeführt. Es wurden verschiedene Konzentrationen von LPS und PMA zur Stimulierung der Zellen verglichen. Korrelierend zu Angaben in der Literatur (82) wurde nachgewiesen, dass höhere Konzentrationen als 2,5µg/ml LPS, keine Stimulation der RAW293 Mausmakrophagen induzieren. Höhere LPS-Konzentrationen unterdrücken die Stimulierung und TNF-α Produktion (Abb.12A und B). Spalten 1 und 2 zeigen die TNFα-Standardkurve im Konzentrationsbereich zwischen 15,6pg/ml und 1000pg/ml in Doppelbestimmung. Spalte 3 zeigt mononukleare Zellen, welche aus einem BC isoliert wurden, bei denen die LPS- und

PMA-Stimulierung ohne vorhergehendes Hungerprotokoll durchgeführt wurde. Die Makrophagen sind hoch stimuliert, was durch die OD450nm – Messwerte quantifiziert wird. Vergleicht man die Werte mit denen der Standardreihe, liegen sie außerhalb des Messbereiches. In den Spalten 4 und 5 sind die Auswertungen des Hungerprotokolls dargestellt. Es ist eine Regulation des Stoffwechsellniveaus auf ein Minimum zu verzeichnen. Bei einer Konzentration von 2,5µg/ml LPS lassen sich die Zellen gut auf > 1000pg/ml TNF-α stimulieren.

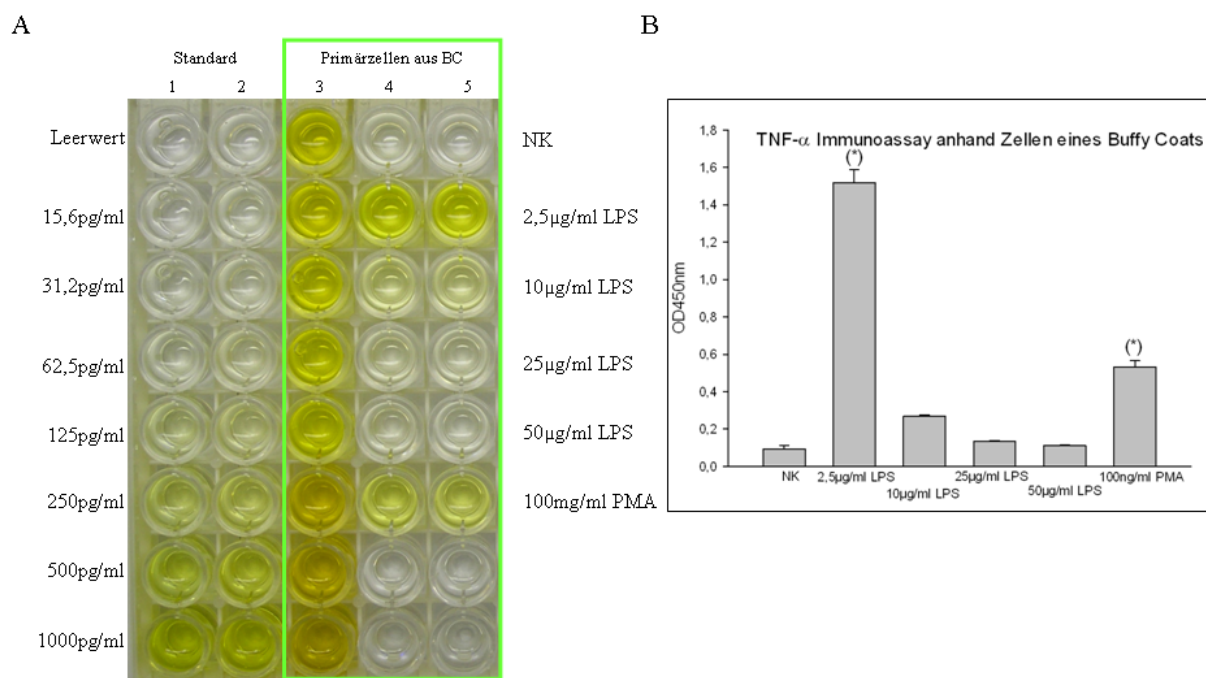


Abbildung 12

## TNF-alpha aus mononukleären Zellen des BC

Die Spalten 1 und 2 zeigen die Standardkurve in Doppelbestimmung. Spalte 3 (BC) zeigt Primärzellen vorhergegangenes Hungerprotokoll, die Zellen reagieren nicht mehr auf das LPS bzw. PMA, weshalb auch kein Farbanstieg nachweisbar ist. Die Spalten 4 und 5 zeigen Mausmakrophagen RAW293 in Doppelbestimmung. Die Stimulation erfolgte mit einer LPS – Konzentration zwischen 2,5µg/ml und 50µg/ml, und einer PMA – Stimulation von 100ng/ml. Gut zu erkennen ist, dass sowohl 2,5µg/ml LPS als auch 100ng/ml PMA eine ähnliche Stimulation hervorrufen. Eine Stimulation mittels einer LPS - Konzentration von 2,5µg/ml ist auch in der Literatur (82) zu finden.

Korrespondierend zu der unbehandelten Negativkontrollgruppe erhöhen sich die OD450nm – Werte mit einer Signifikanz von  $0,092 \pm 0,019$  auf  $1,518 \pm 0,071$  (\*) bei 2,5µg/ml LPS. Bei einer LPS Konzentration von 10µg/ml verringern sich die OD450nm – Werte nicht signifikant

auf  $0,267 \pm 0,006$ . Ebenfalls ohne Signifikanz verringern sich die Werte bei  $25\mu\text{g/ml}$  LPS und  $50\mu\text{g/ml}$  LPS auf  $0,135 \pm 0,003$  beziehungsweise  $0,11 \pm 0,005$  ( $N = 3$ ). Bei der Behandlung der Zellen mit einer Konzentration von  $100\text{ng/ml}$  PMA zeigt sich ein signifikanter Anstieg auf  $0,530 \pm 0,035$  ( $N = 3$ ) (\*).

### **4.3 Vergleich der Nährmedien RPMI und $\alpha$ MEM**

Um den Einfluss des Nährmediums auf die Zellkulturen und die nachfolgenden Messungen zu untersuchen, wurden PerOx Analysen mit RPMI Vollmedium und  $\alpha$ MEM Minimalmedium durchgeführt (Abb.13A). Spalten 1 und 2 zeigen die PerOx-Standardkurve in Doppelbestimmung. Spalte 3 und 4 zeigt jeweils Überstand und Lysat, wobei die mononukleären Zellen (MNC) jeweils mit RPMI kultiviert wurden. Die Peroxide sind, wie in Grafik 1, im Zellysat nachweisbar. Die Spalten 5 und 6 zeigen ebenfalls Zellkulturüberstand und Lysat, wobei diese Mausmakrophagen mit  $\alpha$ MEM kultiviert wurden. Die Peroxide sind ebenfalls im Zellysat nachweisbar. Spalte 7 zeigt die Kontrolle. Es hat sich gezeigt, dass es keinen wesentlichen Unterschied bei den gemessenen OD450 nm Werten gibt (Abb.13B), weshalb dieser Versuch nur einmal durchgeführt wurde bei allen weiterführenden Experimenten ausschließlich RPMI mit diversen Supplements verwendet wurde.

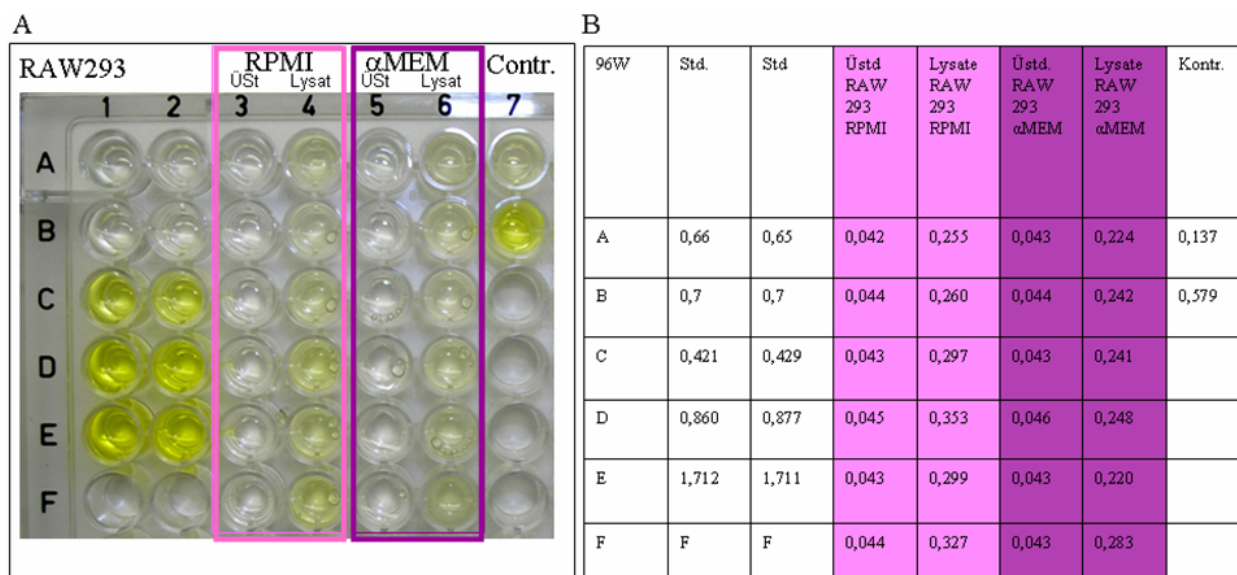


Abbildung 13

A) Photographische Darstellung der PerOx – Analyse von mononukleäre Zellen RAW293 Mausemakrophagen zur Ermittlung des oxidativen Stresslevels. Spalten 1 und 2 zeigen die Standardkurve in Doppelbestimmung. Spalte 3 und 4 zeigt jeweils Überstand und Lysat, wobei die mononukleären Zellen jeweils mit RPMI Vollmedium kultiviert wurden. Die Spalten 5 und 6 zeigen ebenfalls Zellkulturüberstand und Lysat, wobei diese Mausemakrophagen mit αMEM Minimalmedium kultiviert wurden. Spalte 7 zeigt die Kontrolle. Es ist keine wesentliche Abweichung in den Ergebnissen bezüglich der unterschiedlichen Nährmedien nachweisbar. B) Photometrische Auswertung des PerOx - Kits mit dem Spectramax bei 450nm. Die Werte, die sich zwischen 0,04 und 0,3 befinden, zeigen, dass die unterschiedlichen Nährmedien keinen Einfluss auf die Ergebnisse haben.

## 4.4 Einfluss verschiedener Antioxidantien auf das oxidative Stresslevel mononukleärer Zellen

### 4.4.1 Vitamin C

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, handelt es sich bei Vitamin C um ein sehr bekanntes und potentes Antioxidans. Im Zuge dieser Dissertation wurde, nach einer vorausgegangenen Hungerperiode von vier Stunden und einer Stimulation durch 25µg/ml LPS, die antioxidative Wirkung von Vitamin C in unterschiedlichen Konzentrationen untersucht (Abb.14). Spalten 1 und 2 zeigen die PerOx-Standardkurve in Doppelbestimmung. Spalte 3 zeigt eine 15 minütige

Inkubation mit Vitamin C in einer Konzentration von 10mg/ml bis 1µg/ml. In Spalte 4 wurde ebenfalls Vitamin C in den gleichen Konzentrationen bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten getestet. Spalte 5 zeigt die Kontrolle. Sowohl bei der 15 minütigen als auch bei der 90 minütigen Inkubation zeigt sich eine Reduktion des oxidativen Stresslevels. Die statistische Auswertung der normierten Werte durch dem Spectramax bei 450nm dieses Experimentes (Abb.15A und 15B) zeigen, dass durch eine Verlängerung der Inkubationszeit von 15 auf 90 Minuten keine wesentliche Veränderung der Downregulation durch Vitamin C als Antioxidants resultiert.

#### Mausmakrophagen RAW293

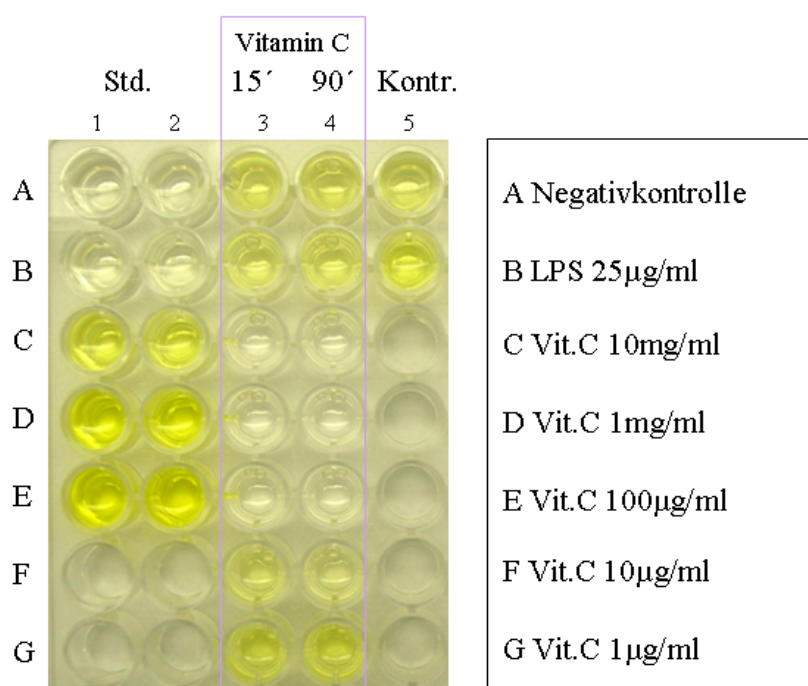


Abbildung 14

Fotographische Darstellung der Perox – Analyse von mononukleäre Zellen RAW293 Mausmakrophagen (mm) zur Eruiierung der Reduktion des oxidativen Stresslevels mittels Vitamin C in den Konzentrationen 10mg/ml bis 1µg/ml. Spalten 1 und 2 zeigen die Standardkurve in Doppelbestimmung. Spalte 3 zeigt die Vitamin C Verdünnungsreihe von 10mg/ml bis 1 µg/ml bei einer Inkubation von 15 Minuten. Spalte 4 zeigt die Vitamin C Verdünnungsreihe von 10mg/ml bis 1 µg/ml bei einer Inkubation von 90 Minuten. Die Spalte 5 zeigt wieder die Kontrolle.

Vergleichend mit der unbehandelten Negativkontrolle verringern sich die OD450nm – Werte bei einer Stimulation mit 25µg/ml LPS nicht signifikant von  $0,549 \pm 0,085$  auf  $0,329 \pm 0,117$ . Bei einer Zugabe von 1mg/ml Vitamin C kommt es zu einer signifikanten Verringerung auf

OD – Werte von  $0,089 \pm 0,009$  (\*). Bei einem Zusatz von  $100\mu\text{g/ml}$ ,  $10\mu\text{g/ml}$  und  $1\mu\text{g/ml}$  zeigt sich jeweils ein erneuter, jedoch nicht signifikanter Anstieg der OD<sub>450nm</sub> – Werte auf  $0,240 \pm 0,102$ ,  $0,346 \pm 0,139$ , sowie auf  $0,412 \pm 0,158$  (N = 3) (Abb.15). Bei einer Inkubationszeit von 90 Minuten zeigen sich ähnliche Werte, jedoch kommt es bei der Zufuhr von  $1\text{mg/ml}$  Vitamin C im Vergleich zum Ergebnis der 15 minütigen Inkubationszeit, zu keiner signifikanten Abnahme des photometrisch ermittelten Wertes. Bei beiden Inkubationszeiten sieht man jedoch eine schöne Dosis – Wirkungsabhängigkeit. Bei der Behandlung der RAW293 Mausemakrophagen kommt es korrespondierend zur unbehandelten Negativkontrollgruppe zu einer Verringerung der OD<sub>450nm</sub> – Werte von  $0,391 \pm 0,134$  (N = 3) auf  $0,358 \pm 0,126$ , und bei einer Behandlung der Zellen mit  $1\text{mg/ml}$  Vitamin C auf  $0,085 \pm 0,009$ . Bei geringeren Vitamin C Konzentrationen wie  $100\mu\text{g/ml}$  steigen die OD – Werte nicht signifikant auf  $0,128 \pm 0,053$  an, bei  $10\mu\text{g/ml}$  Vitamin C auf  $0,295 \pm 0,137$  und bei einer Konzentration von  $1\mu\text{g/ml}$  Vitamin C auf  $0,448 \pm 0,105$  (N = 3) (Abb.15).

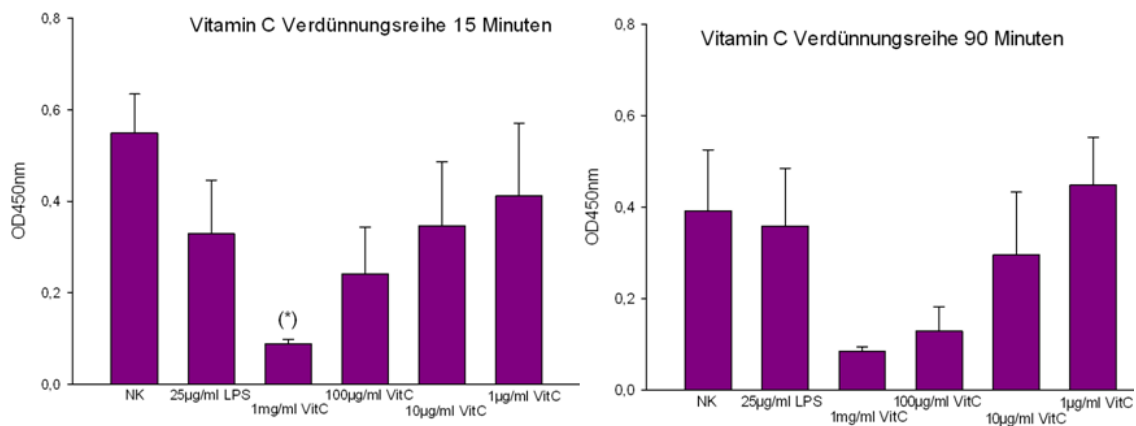


Abbildung 15

A) und B) zeigen die statistische Auswertung der OD<sub>450nm</sub> - Werte der Vitamin C Verdünnungsreihen bei 15 und 90 minütiger Inkubationszeit. Bei beiden Inkubationszeiten zeigt die steigende Antioxidanzkonzentration eine Dosis – Wirkungsabhängigkeit.

#### 4.4.2 Gegenüberstellung der Antioxidantien Quercetin, Resveratrol, NAC und $\alpha$ – Tocopherol

Die Antioxidantien Quercetin, Resveratrol, NAC und  $\alpha$ -Tocopherol wurden in weiteren Versuchsreihen sowohl an RAW293 Mausemakrophagen als auch an humanen Primärzellen aus dem BC untersucht, um die Reduktion des oxidativen Stresslevels im Vergleich zur korrespondierenden unbehandelten Kontrollgruppe zu eruieren. Die fotografische Abbildung der PerOx-Analyse (Abb.16A und B) zeigt die Ergebnisse der RAW293 Mausemakrophagen in der Standardreihe und in den Verdünnungsreihen der Antioxidantien  $\alpha$ -Tocopherol, Quercetin, Resveratrol und NAC. Bei  $\alpha$ -Tocopherol wurden Konzentrationen von  $1\mu\text{M}$  bis  $100\mu\text{M}$  getestet, bei Quercetin und Resveratrol von  $10\mu\text{M}$  bis  $50\mu\text{M}$  und bei NAC wurden Konzentrationen von  $10\text{mM}$  bis  $50\text{mM}$  getestet. Die Auswertungen der PerOx-Analysen zeigen, dass NAC die stärkste Reduktion des oxidativen Stresslevels bewirkt.

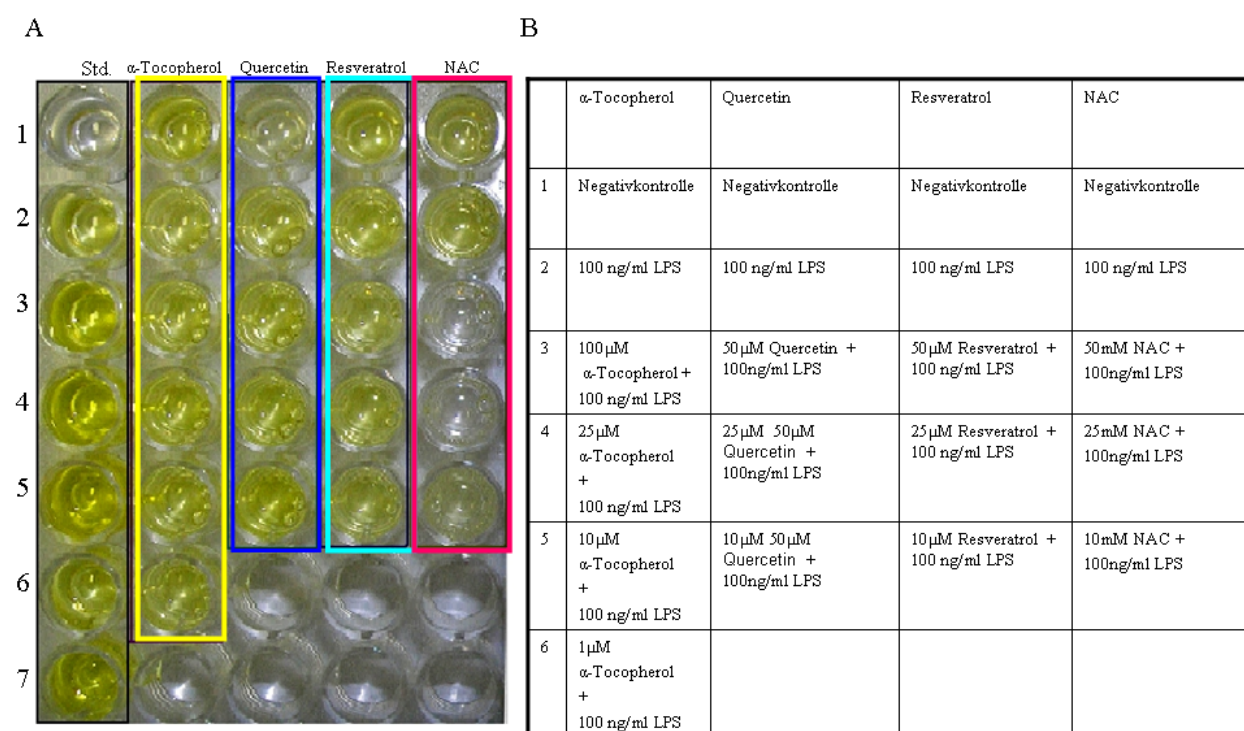


Abbildung 16

Fotografische Darstellung einer repräsentativen PerOx-Analyse von RAW293 Mausemakrophagen. B) zeigt das Pipettierschema für die Konzentrationen der Antioxidantien dieses Experiments.

Korrespondierend zur unbehandelten Negativkontrollgruppe zeigt das Experiment bei Quercetin bei mononukleären Zellen der RAW293 Mausemakrophagen einen nicht signifikanten Anstieg der OD450nm – Werte von  $0,407 \pm 0,038$  (N = 6) auf  $0,415 \pm 0,039$  (N = 6). Bei einer Behandlung der Zellen mit  $10\mu\text{M}$  Quercetin kommt es zu einem weiteren Anstieg auf  $0,452 \pm 0,029$ , bei  $25\mu\text{M}$  auf  $0,479 \pm 0,042$  (N = 6) und bei  $50\mu\text{M}$  Quercetin auf einen ebenfalls nicht signifikanten Anstieg der OD450nm – Werte auf  $0,481 \pm 0,036$  (N = 6). Bei den humanen Primärzellen, die aus dem Buffy Coat isoliert wurden, zeigt sich ein ähnliches Bild. Nach der Dosis-Wirkungsabhängigkeit zeigt sich auch bei diesem Versuch ein Anstieg der photometrisch ermittelten Werte mit steigender Konzentration von Quercetin (Abb. 17A und B).

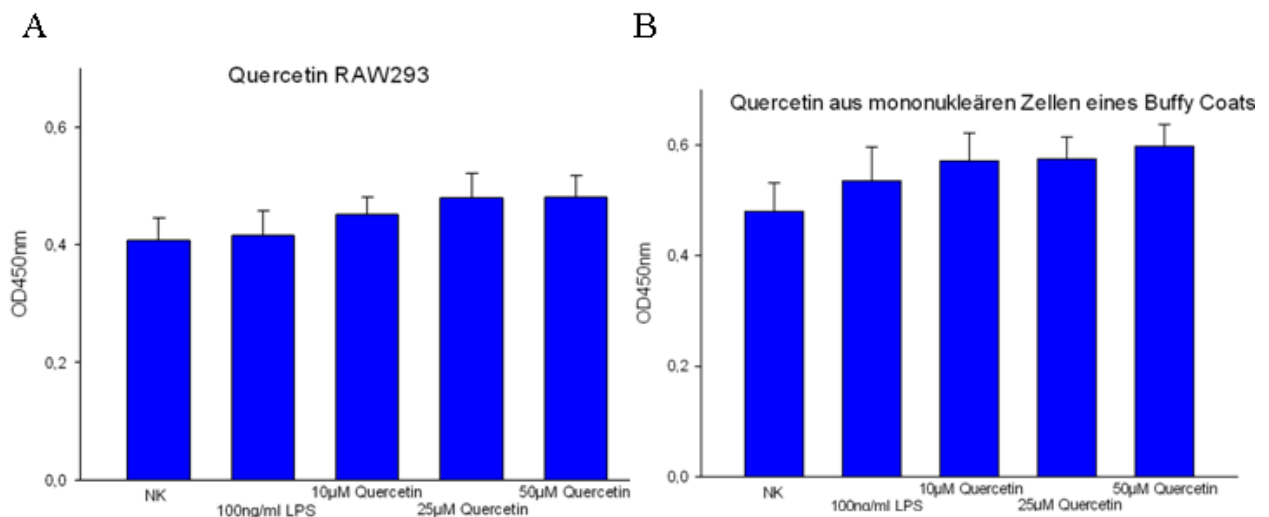


Abbildung 77

Statistische Auswertung der PerOx-Analysen nach Behandlung mit Quercetin bei A) RAW293 und B) humanen Primärzellen.

Bei Resveratrol kommt es vergleichend zur Negativkontrollgruppe bei den Mausemakrophagen bei der Stimulierung von 10ng/ml LPS zu einem Anstieg von  $0,402 \pm 0,022$  auf  $0,438 \pm 0,04$ . Bei einer Behandlung der Zellen mit  $10\mu\text{M}$  Resveratrol kommt es zu einem sehr geringen Anstieg der OD450nm – Werte auf  $0,438 \pm 0,040$ . Bei  $25\mu\text{M}$  Resveratrol nehmen die Werte weiter ab auf  $0,408 \pm 0,030$ , und bei einer Konzentration von  $50\mu\text{M}$  Resveratrol kommt es zu einem Anstieg der OD450nm – Werte auf  $0,430 \pm 0,064$  (N = 5). Bei allen Werten waren keine Signifikanzen erkennbar. Im Vergleich dazu zeigen die humanen Primärzellen keine wesentlichen Unterschiede in den Ergebnissen.

Korrespondierend zur Negativkontrolle erhöhen sich die OD<sub>450nm</sub> – Werte bei 100ng/ml LPS von  $0,546 \pm 0,045$  auf  $0,477 \pm 0,033$ . Bei 10 $\mu$ M und 25 $\mu$ M Resveratrol zeigen die photometrisch ermittelten Werte einen nicht signifikanten Anstieg auf  $0,555 \pm 0,055$  und  $0,564 \pm 0,064$ . Werden die Zellen des BC mit 50 $\mu$ M Resveratrol versetzt, kommt es zu einer nicht signifikanten Verringerung der OD - Werte auf  $0,535 \pm 0,038$  (N = 5). Hoch signifikante Werte zeigen hingegen die Ergebnisse dieser Experimente von NAC. Betrachtet man die unbehandelte Negativkontrollgruppe im Vergleich mit der LPS stimulierten Gruppe, so steigen die OD<sub>450nm</sub> – Werte nicht signifikant von  $0,397 \pm 0,033$  auf  $0,437 \pm 0,044$  (N = 5) (Abb18A und B).

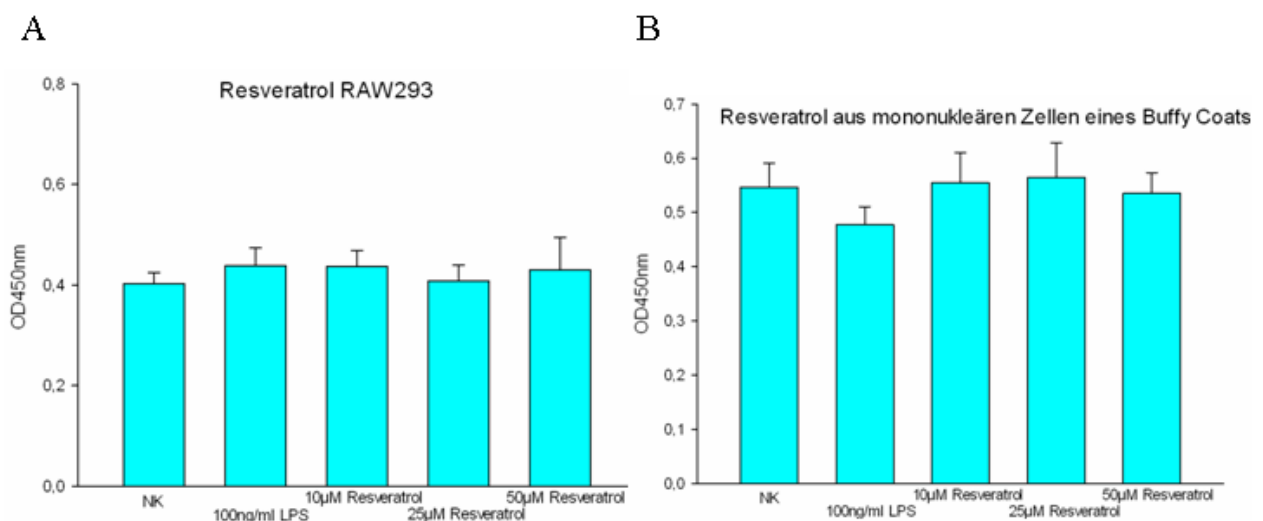


Abbildung 18

Statistische Auswertung der PerOx-Analysen nach Behandlung mit Resveratrol bei A) RAW293 und B) humanen Primärzellen.

Bei einer Behandlung der Zellen mit 10mM NAC manifestiert sich jedoch eine hoch signifikante Verringerung der photometrischen Werte auf  $0,128 \pm 0,025$  (\*\*\*), bei 25mM NAC auf  $0,116 \pm 0,043$  (\*\*\*) und bei 50mM NAC eine ebenfalls hoch signifikante Verringerung der OD<sub>450nm</sub> – Werte auf  $0,047 \pm 0,001$  (N = 6)(\*\*\*). Im Vergleich dazu zeigen auch die humanen Primärzellen ähnliche Werte. Korrespondieren zur Negativkontrollgruppe kommt es bei einer Stimulation mit 100ng/ml LPS zu einem nicht signifikanten Abfall der photometrisch ermittelten Werte von  $0,560 \pm 0,024$  auf  $0,544 \pm 0,039$ . Hoch signifikant ist hingegen der Abfall der OD - Messwerte bei einer Zufuhr von 10mM NAC auf  $0,07 \pm 0,012$  (\*\*\*). Bei 25mM NAC verringern sich die bei OD<sub>450nm</sub>

ermittelten Werte mit einer hohen Signifikanz auf  $0,048 \pm 0,004$  (\*\*) und bei 50mM NAC zeigt sich ein erneuter ebenfalls hoch signifikanter Anstieg der Werte auf  $0,042 \pm 0,001$  (N = 5) (\*\*) (Abb. 19A und B).

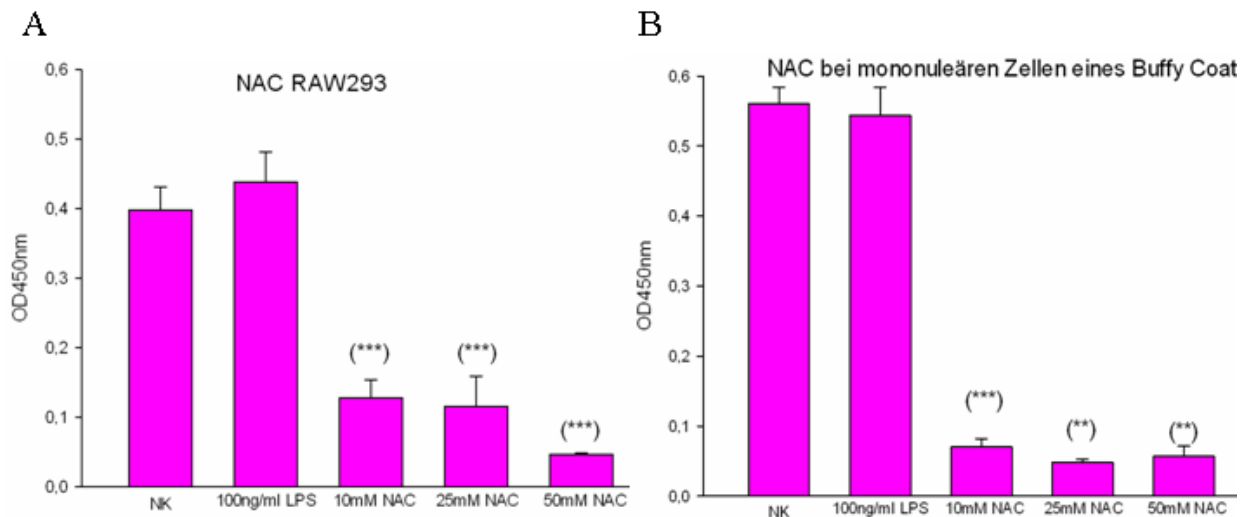


Abbildung 19

Statistische Auswertung der PerOx-Analysen nach Behandlung mit NAC bei A) RAW293 und B) humanen Primärzellen. Steigende Konzentrationen des Antioxidants zeigen einen hochsignifikanten Rückgang des oxidativen Stresslevels (N = 5).

Betrachtet man die Ergebnisse dieses Versuchs mit  $\alpha$ -Tocopherol, so zeigt sich beim Vergleich der unbehandelten Negativkontrollgruppe mit der mit 100ng/ml LPS stimulierten Gruppe bei den RAW293 Mausemakrophagen eine Verringerung der OD<sub>450nm</sub> – Werte von  $0,472 \pm 0,057$  auf  $0,413 \pm 0,125$ . Bei der Zufuhr von  $100\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol steigt der Messwert auf  $0,496 \pm 0,097$ , bei  $50\mu\text{M}$  auf  $0,671 \pm 0,026$ , bei  $25\mu\text{M}$  auf  $0,523 \pm 0,134$ , bei  $10\mu\text{M}$  auf  $0,518 \pm 0,095$  und bei einer Konzentration von  $1\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol auf einen OD<sub>450nm</sub> – Messwert von  $0,520 \pm 0,149$  (N = 5) (Abb.20A). Keiner dieser Werte zeigt dabei eine Signifikanz. Vergleicht man die RAW293 Mausemakrophagen mit den humanen mononukleären Zellen des Buffy Coats, sind die Ergebnisse ähnlich. Bezugnehmend auf die Negativgruppe steigt der Wert bei einer Stimulation mit 100ng/ml LPS nicht signifikant von  $0,594 \pm 0,004$  auf  $0,613 \pm 0,007$ . Bei einer zusätzlichen Stimulation der Zellen mit  $100\mu\text{M}$   $\alpha$ -Tocopherol kommt es zu einem weiteren nicht signifikanten Anstieg auf  $0,634 \pm 0,022$ , bei  $50\mu\text{M}$  auf  $0,647 \pm 0,015$ , bei  $25\mu\text{M}$  auf  $0,649 \pm 0,001$ , bei  $10\mu\text{M}$  auf  $0,658 \pm 0,016$  und bei einer  $\alpha$ -Tocopherolkonzentration von  $1\mu\text{M}$  auf einen OD<sub>450nm</sub> – Messwert von  $0,715 \pm 0,029$  (N = 5) (Abb.20B). Auch hier weist kein Anstieg eine Signifikanz auf.

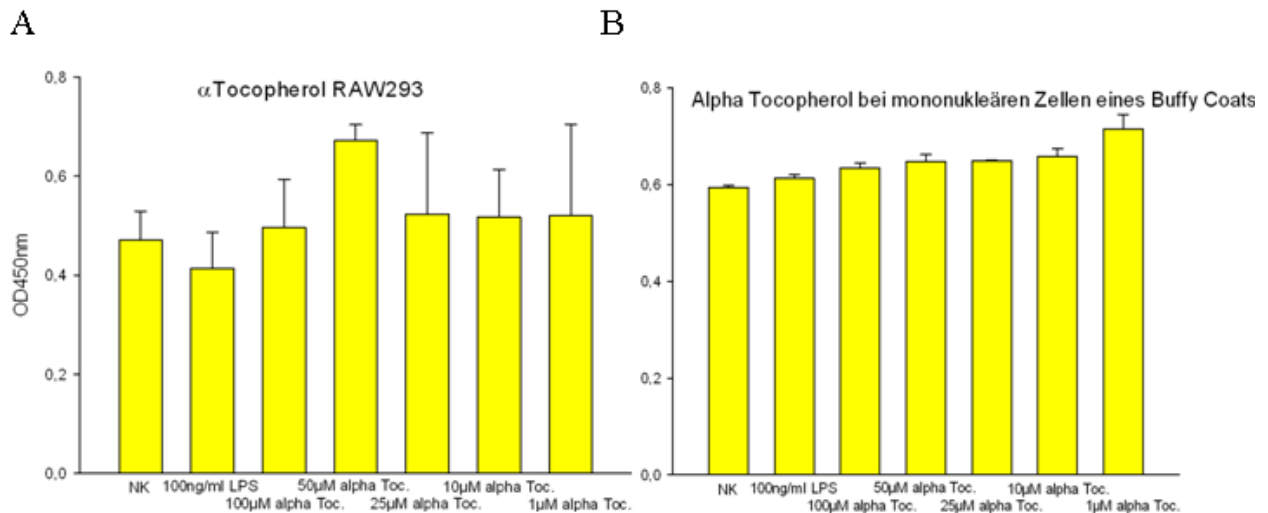


Abbildung 80

Statistische Auswertung der PerOx-Analysen nach Behandlung mit Resveratrol bei A) RAW293 und B) humanen Primärzellen.

Alle vorhandenen Daten (Tabelle 5) dieses Versuchs wurden auf die korrespondierende, unbehandelte Negativkontrollgruppe des jeweiligen Experiments normiert und mittels der prozentuellen Veränderung dargestellt (Abb.21A und B).

Dabei sind die Ergebnisse der Versuchsreihe mit NAC besonders bedeutend. Es zeigt sich korrelierend zur unbehandelten Negativgruppe bei den RAW293 ein Anstieg um  $0,578\% \pm 3,308\%$ , wogegen sich bei den Zellen des Buffy Coats eine Verringerung um  $3,188\% \pm 3,292\%$  zeigt. Zu einer hoch signifikanten Veränderung der Werte kommt es bei der Zufuhr von 10mM NAC. Bei den Mausmakrophagen resultiert eine Verringerung der Prozentwerte um  $75,832\% \pm 4,264\%$  (\*\*\*) und bei den MNC des Buffy Coats um  $87,554\% \pm 1,622\%$  (\*\*\*). Bei der Behandlung der Zellen mit 25mM NAC kommt es zu abermals zu einem signifikanten Absinken der Werte. Bei den RAW293 Mausmakrophagen verringern sich die Werte um  $82,373\% \pm 1,942\%$  (\*\*\*). Im Vergleich dazu kommt es bei den humanen Primärzellen zu einer Verringerung der Messwerte um  $91,273\% \pm 1,033\%$  (\*\*). Bei einer Konzentration von 50mM NAC zeigen die RAW293 – Zellen eine hoch signifikante Abnahme der ermittelten Werte um  $88,713\% \pm 1,069\%$  (N = 5) (\*\*\*) und die Zellen des Buffy Coats eine ebenfalls hoch signifikante Abnahme der Messwerte um  $92,411\% \pm 0,345\%$  (N = 5) (\*\*) (Abb21 A und B).

RAW293	% - Veränderung					
	NK	100ng/ml LPS	10µM bzw. 10mM	25µM bzw. 25mM	50µM bzw. 50mM	N
Antioxidants	NK	100ng/ml LPS	10µM bzw. 10mM	25µM bzw. 25mM	50µM bzw. 50mM	N
Quercetin [µM]	100 ± 2,041	(+)7,180 ± 8,260	(+)0,638 ± 7,573	(+)14,355 ± 5,48	(+)12,113 ± 4,606	5
Resveratrol [µM]	100 ± 2,041	(-)4,76 ± 6,700	(-)1,778 ± 4,924	(-)6,241 ± 5,66	(+)6,388 ± 21,131	5
NAC [mM]	100 ± 2,041	(+)0,578 ± 3,308	(-)75,832 ± 4,264 (***)	(-)82,373 ± 1,942 (***)	(-)88,713 ± 1,069 (***)	5
α-Tocopherol [µM]	100 ± 0	(+)7,068 ± 1,513	(+)12,88 ± 5,212	(-)6,959 ± 0,562	(+)5,411 ± 3,905	5
<b>BC</b>	NK	100ng/ml LPS	10µM bzw. 10mM	25µM bzw. 25 mM	50µM bzw. 50mM	
Quercetin [µM]	100 ± 2,5	(+)17,376 ± 10,294	(+)20,563 ± 9,059	(+)21,321 ± 7,463	(+)26,26 ± 8,91	5
Resveratrol [µM]	100 ± 2,5	(-)11,99 ± 4,23	(+)1,334 ± 1,643	(+)2,848 ± 2,987	(-)1,586 ± 3,189	5
NAC [mM]	100 ± 2,5	(-)3,188 ± 3,292	(-)87,554 ± 1,622 (***)	(-)91,273 ± 1,033 (***)	(-)92,411 ± 0,345 (***)	5
α-Tocopherol [µM]	100 ± 0	(-)30,771 ± 34,424	(+)15,95 ± 36,729	(-)28,054 ± 35,904	(-)34,573 ± 32,573	5

Tabelle 5

Normierte Werte der Daten dieses Versuches auf die korrespondierende unbehandelte Negativkontrollgruppe.

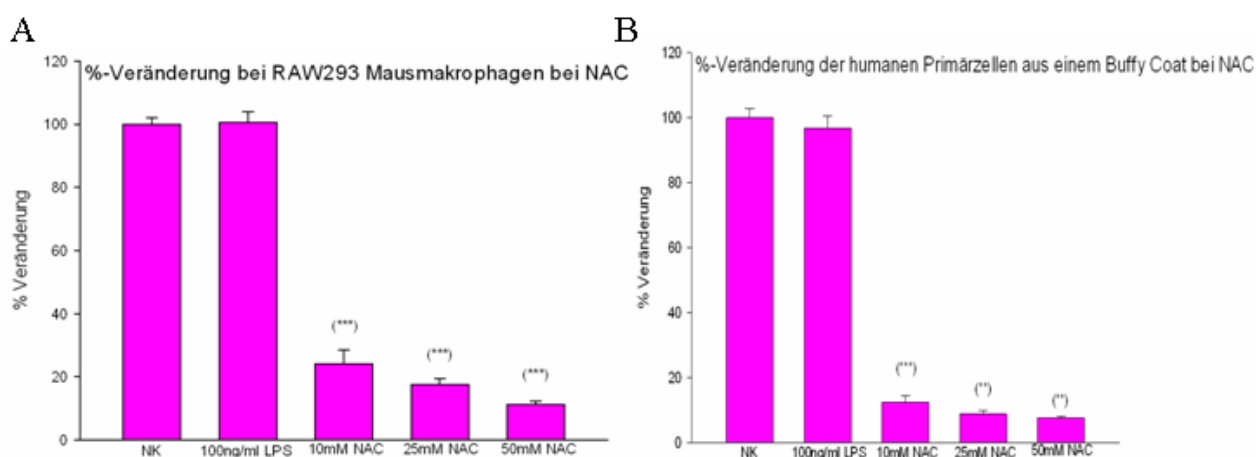


Abbildung 21

A) und B) zeigen die statistischen Auswertungen der normierten Werte der PerOx – Analysen, sowohl von RAW293 Mausemakrophagen als auch von humanen Primärzellen des Buffy Coats (N = 5) beim Versuch mit NAC. Bei den Mausemakrophagen ist bei einer Stimulation der Zellen mit 10mM NAC, 25mM NAC und 50mM NAC jeweils eine hochsignifikante Verringerung der prozentuierten Werte nachweisbar, wogegen es bei den humanen Primärzellen bei einer Stimulation der Zellen mit 25mM und 50mM NAC zu einer zwei-Stern-Signifikanz kommt.

#### 4.4.3 Zusammenfassung aller relevanten Ergebnisse des TNF- $\alpha$ – Immunoassays an RAW293 Mausemakrophagen und humanen MNC

RAW293	% - Veränderung					
	NK	100ng/ml LPS	10 $\mu$ M bzw. 10mM	25 $\mu$ M bzw. 25mM	50 $\mu$ M bzw. 50mM	N
Antioxidants						
Quercetin [ $\mu$ M]	100 $\pm$ 1,581	(-)12,902 $\pm$ 5,315	(-)14,74 $\pm$ 4,340 (*)	(+)14,355 $\pm$ 5,48	(+)12,113 $\pm$ 4,606	5
Resveratrol [ $\mu$ M]	100 $\pm$ 2,041	(-)4,76 $\pm$ 6,700	(+)1,778 $\pm$ 4,924	(-)6,241 $\pm$ 5,66	(+)6,388 $\pm$ 21,131	5
NAC [mM]	100 $\pm$ 2,041	(+)0,578 $\pm$ 3,308	(-)75,832 $\pm$ 4,264 (***)	(-)82,373 $\pm$ 1,942 (***)	(-)88,713 $\pm$ 1,069 (***)	5
BC						
Quercetin [ $\mu$ M]	100 $\pm$ 0	(+)641,452 $\pm$ 50,623 (***)	(+)825,425 $\pm$ 311,196 (*)	(+)1031,820 $\pm$ 84,418 (***)	(+)938,394 $\pm$ 87,713 (***)	5
Resveratrol [ $\mu$ M]	100 $\pm$ 0	(+)1075,216 $\pm$ 182,701 (**)	(+)753,304 $\pm$ 160,822 (**)	(+)631,787 $\pm$ 128,849 (**)	(+)309,603 $\pm$ 108,766 (*)	5
NAC [mM]	100 $\pm$ 1,290	(+)1157,209 $\pm$ 147,047 (***)	(+)810,062 $\pm$ 114,116 (***)	(+)83,717 $\pm$ 33,700	(-)57,629 $\pm$ 8,180 (***)	5

Tabelle 6

Normierte Werte aller vorhandener Daten der TNF- $\alpha$ -Analyse dieses Versuches auf die korrespondierende unbehandelte Negativkontrollgruppe.

Alle vorhandenen Daten wurden auf die korrespondierende, unbehandelte Negativkontrollgruppe des jeweiligen Experimentes normiert und die prozentuelle Veränderung in den Abbildungen dargestellt (Abb.22 bis 24). Bei einer Behandlung der RAW293 Mausemakrophagen mit 100ng/ml LPS zeigt sich eine prozentuelle, nicht signifikante Verringerung von 12,902%  $\pm$  5,315%. Bei einem Zusatz von 10  $\mu$ M Quercetin kommt es zu einer gering signifikanten Abnahme von 14,74%  $\pm$  4,340% (\*). Bei einem Zusatz von 25  $\mu$ M und 50  $\mu$ M Quercetin, kommt es zu einer nicht signifikanten Verringerung der Messwerte von 7,226%  $\pm$  9,315% und 9,178%  $\pm$  4,561% (N = 5) (Abb.22A). Bei den MNC des BC zeigen sich ein unterschiedliches Ergebnis (Abb.22B). Im Bezug zur Negativkontrolle zeigt sich bei einer Stimulation mit einer Konzentration von 100ng/ml LPS eine hoch signifikante Zunahme um ein Sechsfaches, 641,452%  $\pm$  7,8% (\*\*\*) , bei einer zusätzlichen Stimulation mit 10  $\mu$ M Quercetin eine gering signifikante Zunahme der

Messwerte um ein Achteinhalbfaches,  $867,111\% \pm 537,587\%$  (\*), bei  $25\mu\text{M}$  abermals eine hoch signifikante Steigerung um ein Elfeinhalbfaches,  $1159,105\% \pm 44,018\%$  (\*\*\*) und bei einer Behandlung der Zellen mit  $50\mu\text{M}$  Quercetin ein ebenfalls hoch signifikanter Anstieg der Messwerte um ein Elffaches,  $1118,673\% \pm 33,477\%$  (N = 5) (\*\*\*) (Abb.22B).

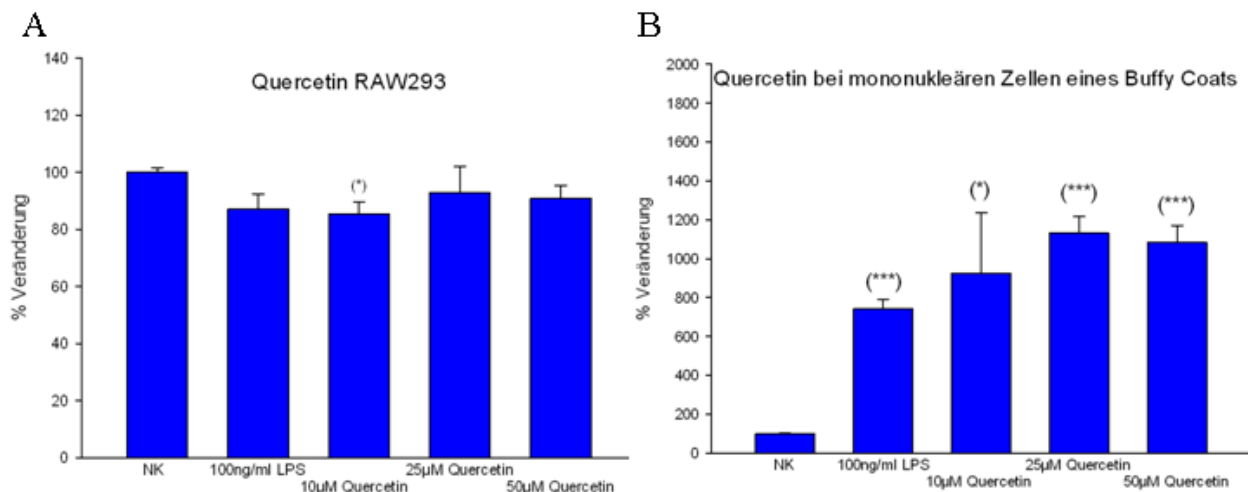


Abbildung 22

A)und B) zeigen die statistischen Auswertungen der normierten Werte der TNF-α Analysen, sowohl von RAW293 als auch von humanen Zellen des Buffy Coats (N = 5).

Betrachtet man die Auswertungen der normierten Werte bei Resveratrol anhand von Mausmakrophagen, so zeigt sich im Vergleich zur Negativkontrolle bei einer LPS Stimulation von 100ng/ml eine Steigerung der Werte um  $3,733\% \pm 8,412\%$ . Bei einer zusätzlichen Stimulation der Zellen mit  $10\mu\text{M}$  Resveratrol manifestiert sich eine erneute Zunahme um  $18,471\% \pm 14,133\%$ . Bei  $25\mu\text{M}$  Resveratrol kommt es zu einer prozentuellen Abnahme von  $0,677\% \pm 9,556\%$ , dem gegenüber steht einer wiederholte Zunahme von  $70,812\% \pm 32,563\%$  (N = 5) bei einer Konzentration von  $50\mu\text{M}$  Resveratrol (Abb.23A). Bei den humanen Primärzellen zeigen sich Werte, die hohe Signifikanzen aufweisen (Abb.23B). Korrelierend zur unbehandelten Negativkontrollgruppe zeigt sich bei einer Stimulation mit 100ng/ml LPS eine hoch signifikante Zunahme der Werte um fast ein Elffaches,  $1075,216\% \pm 182,701\%$  (\*\*), bei einer Behandlung der Zellen mit  $10\mu\text{M}$  und  $25\mu\text{M}$  Resveratrol eine ebenfalls hoch signifikante Zunahme um ein Achtfaches beziehungsweise um ein Siebenfaches,  $753,304\% \pm 160,822\%$  (\*\*) bzw.  $631,787\% \pm 128,849\%$  (\*\*) und bei  $50\mu\text{M}$

Resveratrol zeigt sich eine gering signifikante Steigerung der Werte um ein Vierfaches,  $309,603\% \pm 108,766\%$  (N = 5) (\*).

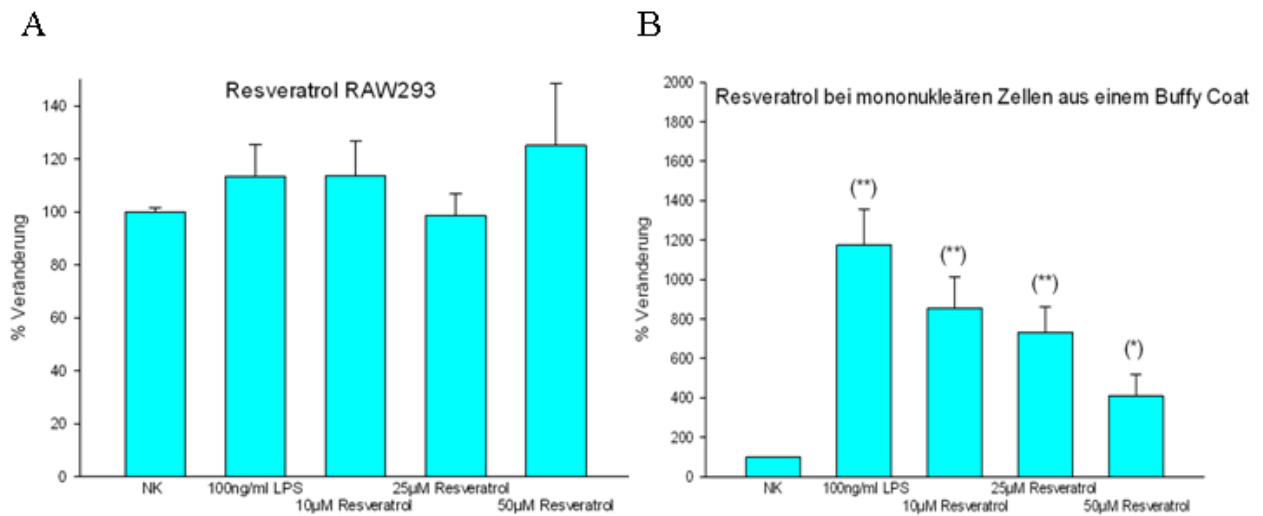


Abbildung 29

A) und B) zeigen die statistischen Auswertungen der normierten Werte der TNF- $\alpha$  Analysen, sowohl von RAW293 als auch von humanen Zellen des Buffy Coats (N = 5).

Durch die prozentuelle Darstellung der normierten Werte dieses Experimentes beim Versuch mit NAC, zeigt sich Bezug nehmend auf die Negativkontrolle bei den Mausmakrophagen kein signifikanter Anstieg der erfassten Werte von  $3,267\% \pm 4,997\%$  bei einer zusätzlichen LPS- Stimulation. Sowohl bei 10mM NAC als auch bei 25mM NAC zeichnet sich ein Abfall um  $14,37\% \pm 7,234\%$  und  $6,616\% \pm 4,447\%$  ab. Ein erneuter Anstieg ist bei einer Konzentration von 50mM NAC um  $70,812\% \pm 32,563\%$  (N = 5) zu erkennen (Abb24A). Auch hier lassen sich mittels dem Student-T Test keine Signifikanzen nachweisen. Bei den humanen Primärzellen hingegen stellt sich ein hoch signifikanter Anstieg des Wertes bei einer Konzentration von 100ng/ml LPS um ein Elfeinhalbfaches,  $1157,209\% \pm 147,046\%$  (\*\*\*). Bei einer Konzentration von 10mM und 50mM NAC kommt es ebenfalls zu einer hoch signifikanten Zunahme um ein Achtfaches,  $810,062\% \pm 114,116\%$  (\*\*\*), sowie zu einer hoch signifikanten Abnahme von  $57,629\% \pm 8,180\%$  (N = 5) (\*\*\*). Dieser Verlauf zeigt eine Dosis-Wirkungsabhängigkeit, die auch bei Resveratrol bei den humanen Primärzellen zu erkennen ist.

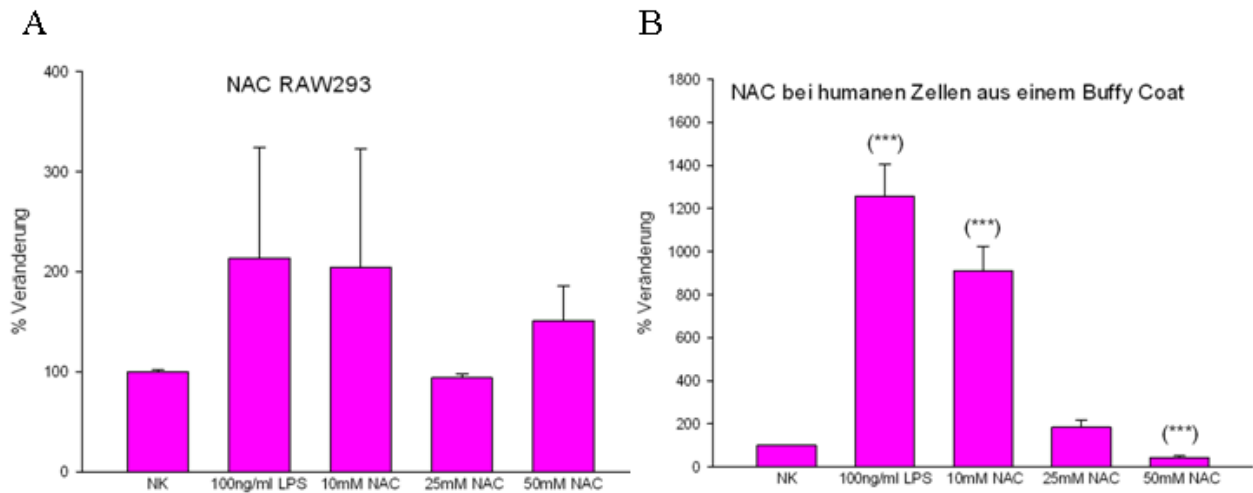


Abbildung 210

Statistische Auswertung der normierten Werte der TNF- $\alpha$  Analysen nach einer Behandlung mit NAC bei A) RAW293 Mausemakrophagen und B) humanen Primärzellen. Steigende Antioxidantienkonzentrationen zeigen im Diagramm eine Dosis – Wirkungsabhängigkeit. Bei den humanen Primärzellen ist bei einer Stimulation der Zellen mit 100ng/ml LPS eine hoch signifikante Erhöhung der Werte um  $1157,209\% \pm 147,047\%$  und bei 10mM NAC ebenfalls eine hochsignifikante Steigerung der prozentuellen Werte um  $810,062\% \pm 114,116\%$  nachweisbar. Auch bei einer Konzentration von 50mM NAC ist eine hoch signifikante Verringerung der Werte korrespondierend zur unbehandelten Negativkontrollgruppe um  $57,629\% \pm 8,180$  zu sehen.

---

## 5 Diskussion

Die Arthroplastik des Hüftgelenks gehört zu den häufigsten und geläufigsten Operationen der chirurgischen Orthopädie(1). Dennoch kommt es nach wie vor jährlich bei etwa 15% aller operierten Patienten zu einer Revisionsoperation der implantierten Hüftgelenksendoprothese aufgrund einer aseptischen Prothesenlockerung. Untersuchungen haben gezeigt, dass die Gründe der aseptischen Prothesenlockerung multifaktoriell sind und der Abrieb der artikulierenden Gelenkspartner eine wesentliche Rolle spielt (83).

Durch eine *in vivo* Oxidation wird eine Versprödung des Oberflächenmaterials der Prothese induziert, wodurch es zu einer vermehrten Produktion von Abriebpartikel kommt und in weiterer Folge eine Verringerung der Lebensdauer der Prothese um 10 bis 15 Jahre resultiert. Durch ein Ungleichgewicht zwischen Flüssigkeitsfluss und Flüssigkeitsinnendruck kann es zur Bildung von periartikulären Zysten kommen, wodurch es zu einem Zytokinanstieg kommt. Ein vermehrter Flüssigkeitsfluss unterstützt den Abtransport von Abriebpartikel der Implantate, welche zu einer Entzündungsreaktion führen (46, 48). Untersuchungen haben gezeigt, dass Polyethylenpartikel mit einer Größe kleiner als 20µm eine stärkere Zellantwort hervorrufen, als es durch TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, PGE<sub>2</sub>, Matrixmetalloproteinasen und anderen Faktoren quantifiziert werden kann (51, 53-55). Gonzalez et al (1996) und Gallo et al (2002) haben gezeigt, dass die Phagozytose von Abriebpartikel eine wesentliche Komponente bei der Induktion der zellulären Antwort darstellt. Die Interaktion zwischen Partikel und der Zelloberfläche zeigt, dass dies alleine ausreicht, um eine Aktivierung der Osteoklasten hervorzurufen (51, 56). Da bei der Entzündungsreaktion die Makrophagen und die Zellwandkomponente LPS eine bedeutende Rolle spielen, wurde im Zuge dieser Dissertation das Hauptaugenmerk auf mononukleäre Zellen sowohl aus dem Buffy Coat, als auch aus einer Mauszelllinie, RAW293, gelegt. Es wurde versucht, die Makrophagenaktivierung mittels LPS – Stimulation und einem Nachweis der Peroxid - Produktion zu eruieren. Hierbei zeigten sich Probleme bei der Messung des oxidativen Stresses, weil es sich bei den zu detektierenden Peroxiden um sehr instabile und flüchtige O<sub>2</sub> – Radikale handelt. Im Zuge dessen wurden bei allen Versuchen aus diesem Grund die Gesamtperoxide gemessen.

Im Vergleich dazu erfolgte sowohl an humanen Primärzellen als auch an RAW293 Mausmakrophagen ein Nachweis der TNF- $\alpha$  Expression. Verglichen mit Ergebnissen, die bereits in der Literatur zu finden sind (59 - 62) zeigte sich bei unseren Auswertungen bei

MNC aus dem BC durch die LPS - Stimulierung eine hochsignifikante Zunahme der TNF- $\alpha$  Expression korrespondierend mit der unbehandelten Negativkontrollgruppe. Um eine Verringerung des oxidativen Stresslevels zu induzieren, wurden bis dato zahlreiche Versuche mit Antioxidantien durchgeführt. Dabei hat sich gezeigt, dass  $\alpha$  - Tocopherol eine wesentliche Rolle spielt. Neueste Forschungsberichte beschreiben, dass es sich bei dem erst kürzlich entwickelten elektronenstrahlvernetzten UHMW-PE um einen vielversprechenden Werkstoff für Gleitflächen der Gelenkendoprothesen handelt, dieser zwar aufgrund der tribochemischen Eigenschaften und der Vernetzung zum einen eine erhöhte Abriebbeständigkeit aber auch eine höhere Oxidationsbeständigkeit aufweist, aber durch  $\alpha$  - Tocopherol mittels der zusätzlich antioxidativen Wirkung zu einer deutlichen Verbesserung dieses Produkts führen würde (84).

Aufgrund dieser neuen Erkenntnisse und weiteren Forschungsarbeiten, die sich mit der antioxidativen Wirkung von Vitamin E beschäftigten, wurde im Zuge dieser Dissertation der Vergleich mit anderen Antioxidantien, wie Vitamin C, Quercetin, Resveratrol und NAC durchgeführt. Quercetin und Resveratrol wurden aufgrund der bereits ertesteten antiinflammatorischen Wirkung (81) untersucht, wogegen NAC, das derzeit nur als Mukolytikum eine klinische Anwendung findet, ein bekanntes biochemisches Antioxidans ist.

Bei der Austestung dieser relevanten Antioxidantien zeigte sich, dass NAC bei unseren Experimenten die effektivste Verringerung des Stresslevels induziert, bis dato aber keine klinische Anwendung im Bereich der chirurgischen Orthopädie gefunden hat. Sowohl bei der PerOx – Analyse als auch bei der TNF- $\alpha$  Expression kommt es bei diesem Antioxidans bei beiden Zellarten zu hoch signifikanten Verringerungen der Messwerte. Betrachtet man die statistischen Auswertungen bei Quercetin, kommt es auch hier bei der TNF- $\alpha$  Expression bei den humanen Primärzellen zu hoch signifikanten Messwertveränderungen. Zusätzlich zeigt die ansteigende Konzentration eine Dosis – Wirkungsabhängigkeit. Auch bei Resveratrol manifestieren sich ähnliche Ergebnisse mit hoher Signifikanz bei MNC aus dem Buffy Coat bei der TNF- $\alpha$  Expression.

Um in Zukunft die Problematik der aseptischen Prothesenlockerung in den Griff zu bekommen, könnten Antioxidantien wie NAC aber auch Resveratrol eine mögliche Basis für einen Therapieansatz darstellen.

1. Zambelli P-Y, Jolles B. Die Hüftgelenkarthroplastik: das tägliche Brot des orthopädischen Chirurgen. *Schweiz Med Forum* 2006.
2. Wright, Goodman. Implant wear in total joint replacement. *American Academy of Orthopaedic Surgeons*. p.224 2001.
3. Wilkinson, Hamer, Stockley, Eastell. polyethylene wear rate and osteolysis: Critical Threshold versus continuous dose-response relationship. *J Orthop Res* 23:520-525 2005.
4. Greenfield, Bi, Ragab, Goldberg, Nalepka, Seibold. Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopaedic implants? *J Biome Mater Res B Appl Biomater* 72B:179-185 2005.
5. Greenfield, Bischoff HP, Ragab, Goldberg, VanDeMotte. The role of osteoclast differentiation in aseptic loosening. *J Orthop Res* 20:1-8 2002.
6. Bi, Seibold, Kaar, Ragab, Goldberg, Anderson, et al. Adherent endotoxin on orthopaedic wear particles stimulates cytokine production and osteoclast differentiation. *J Bone Miner Res*. 16:2082-209 2001.
7. Bischoff HP, Heisel J, Locher H. *Praxis der konservativen Orthopädie*; 2007.
8. Breusch S, Clarius M, Mau H, Sabo D. *Klinikleitfaden Orthopädie Unfallchirurgie*; 2009.
9. Bohringer ME, Beyer WF, Weseloh G. [Comparative histomorphometry of subchondral bone density and articular cartilage thickness in the tibial head in early human arthritis]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* 1995;133(4):291-302.
10. Wirth CJ, Mutschler W. *Praxis der Orthopädie und Unfallchirurgie*; 2009.
11. Honle, Jezussek, Bennemann, Schuh. Conservative and surgical therapy of hip osteoarthritis. *MMW Fortschr. Med* 2007.
12. Conrozier T, Mathieu P, Schott AM, Laurent I, Hajri T, Crozes P, et al. Factors predicting long-term efficacy of Hylan GF-20 viscosupplementation in knee osteoarthritis. *Joint Bone Spine* 2003;70(2):128-33.
13. Morshed S, Huffman GR, Ries MD. Septic arthritis of the hip and intrapelvic abscess following intra-articular injection of hylan G-F 20. A case report. *J Bone Joint Surg Am* 2004;86-A(4):823-6.
14. Rennesson-Rey B, Rat AC, Chary-Valckenaere I, Bettembourg-Brault I, Juge N, Dintinger H, et al. Does joint effusion influence the clinical response to a single Hylan GF-20 injection for hip osteoarthritis? *Joint Bone Spine* 2008;75(2):182-8.
15. Hoeksma HL, van den Ende CH, Breedveld FC, Ronday HK, Dekker J. A comparison of the OARSI response criteria with patient's global assessment in patients with osteoarthritis of the hip treated with a non-pharmacological intervention. *Osteoarthritis Cartilage* 2006;14(1):77-81.
16. Honle, Conservative and surgical therapy of hip osteoarthritis. *MMW Fortschr. Med* 2007.
17. Fender D, Harper WM, Gregg PJ. The Trent regional arthroplasty study. Experiences with a hip register. *J Bone Joint Surg Br* 2000;82(7):944-7.
18. Kaddick C, Catelas I. Verschleiß und aseptische Prothesenlockerung - eine Bestandsaufnahme. *Orthopäde* 2009.
19. MA W, J L, al NRe. The acting wear mechanism on metal-on-metal hip joint bearings - in vitro results. *Wear* 2001.
20. Bishop NE, Waldow F, Morlock MM. Friction moments of large metal-on-metal hip joint bearings and other modern designs. *Med Eng Phys* 2008;30(8):1057-64.
21. Daniel J, Ziaee H, Salama A, Pradhan C, McMinn DJ. The effect of the diameter of metal-on-metal bearings on systemic exposure to cobalt and chromium. *J Bone Joint Surg Br* 2006;88(4):443-8.

22. R D. Metal ion levels in a triathlete with a metal-on-metal resurfacing arthroplasty of the hip. *J Bone Joint Surg Am* 2007.
23. Charnley. low friction principle. In *low friction arthroplasty of the hip:Theory and practice*. 1979.
24. Campbell, Ma, Yeom. Isolation of predominantly submicron sized UHMWPE wear particles from periprosthetic tissues. *J Biome Mater Res* 1995.
25. Shanbhag, Jacobs, Glant. Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 2002.
26. Lerouge, Huk, Yahia, Sedel. Characterization of in vivo wear debris from ceramic-ceramic total hip arthroplasties. *J Biomed Mater Res* 1996.
27. Hatton, Nevelos. Alumina-alumina artificial hip joints. Part1:a histological analysis and characterization of wear debris by laser capture microdissection of tissues retrieved at revision. *Biomaterials* 2002.
28. Richards, Brown, Stone. Identification of nanometresized ultra-high molecular weight polyethylene wear particles in samples retrieved in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 2008.
29. Richards, Brown, Stone. Identification of nanometresized ultra-high molecular weight polyethylene wear particles in samples retrieved in vivo. *J Bone Joint Surg Br* 2008.
30. Catelas, Boby, Medley. Size, shape, and composition of wear particles from metal-metal hip simulator testing:Effects of alloy and number of loading cycles. *J Biomed Mater Res* 2003.
31. Catelas, Campbell, Boby. Wear particles from metal-on-metal total hip replacements:Effects of implant design and implantation time. *Proc Inst Mech Eng Med* 2006.
32. Catelas, Medley, Campbell. Comparison of in vitro with in vivo characteristics of wear particles from metal-metal hip implants. *J Biomed Mater Res B* 2004.
33. Clarke. Hip-simulator ranking of polyethylene wear. *Acta Orthop Scand* 2000.
34. Hermida, Bergula, Chen. Comparison of the wear rates of twenty-eight and thirty-two-millimeter femoral heads on cross-linked polyethylene acetabular cups in a wear simulator. *J Bone Joint Surg Am* 2003.
35. Tarasevicius, Kesteris, Robertsson. Femoral Head Diameter affects the Revision Rate in Total Hip Arthroplasty:an analysis of 1720 hip replacements with 9-21 years of follow up. *Acta Orthop* 2006.
36. Schwenke, Borgstede, Schneider. Slip velocity direction impacts wear in TKA. *J ASTM Intern* 3 2006.
37. Kang, Galvin, Brown. Quantification of the effect of cross-shear on the wear of conventional and highly cross linked UHMWPE. *J Biomech* 2008.
38. Geerdink, Grimm. Crosslinked Polyethylene compared to conventional polyethylene in total hip replacement. *Acta Orthop* 2006.
39. McKellop, Shen, Lu. Development of an extremely wear resistant ultra high molecular weight polyethylene for total hip replacement. *J Orthop Res* 1999.
40. Kurtz. *The UHMWPE handbook*. Elsevier 2004.
41. Dumbleton. The basis for a second generation highly crosslinked UHMWPE. *Clin Orthop Relat Res* 2006.
42. Halley, Glassman, Crowninshield. Recurrent dislocation after revision total hip replacement with a large prosthetic femoral head. A Case Report. *J Bone Joint Surg Am* 2004.
43. Haider, Walker, DesJardins. Effect of patient and surgical alignment variables on the kinematics in TKR simulation under force-control. *J ASTM Intern* 3:10 2006.
44. Pschyrembel. *Pschyrembel - klinisches Wörterbuch*. 259. Auflage ed. Berlin / New York: Walter de Gruyter; 2002.
45. Löffler. *Basiswissen Biochemie*. 5 ed: Springer; 2002.

46. Abu-Amer, Darwech, Clohisy. Aseptic loosening of total joint replacements: mechanisms underlying osteolysis and potential therapies. *Arthritis research&therapy* 2007.
47. Harris. The problem of osteolysis. *Clin Orthop Relat Res* 1995.
48. Bauer TW. Particles and periimplant bone resorption. *Clin Orthop Relat Res* 2002(405):138-43.
49. Kadoya Y KA, Ohashi H. Wear and osteolysis in total joint replacements. *Acta Orthop Scand* 1998.
50. Maloney W SR. Periprosthetic osteolysis in total hip arthroplasty:the role of particulate wear debris. *J Bone Joint Surg* 1995.
51. Gonzalez O SR, Goodman SB. Effect of size, concentration, surface area, and volume of polymethylmethacrylate particles on human macrophages in vitro. *J Biomed Mater Res* 1996.
52. Sabokbar A PR, Athanasou NA. The effect of particle size abd electrical charge on macrophage-osteoclast differentiation and bone resorption. *J Mater Sci Mater Med* 2003.
53. Shanbhang AS JJ, Glant TT, Gilbert JL, Black J, Galante JO. Composition and morphology of wear debris in failed uncemented total hip replacement. *J Bone Joint Surg Br* 1994.
54. Abbas S CJ, Abu-Amer Y. Mitogen-activated protein (MAP) kinases mediate PMMA-induction of osteoclasts. *J Orthop Res* 2003.
55. O'Keefe RJ RR, Teot LA, Stewart JM, Hicks DG. Cytokine and matrix metalloproteinase expression in pigmented villonodular synovitiy may mediate bone and cartilage destruction. *Iowa Orthop J* 1998.
56. Gallo J KP, Tichaa V, Rihaakovaa P, Ditmar R. Particle disease. A comprehensive theory of periprosthetic osteolysis:a review. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2002.
57. Alberts, Johnson, Raff L. *Molekularbiologie der Zelle*. 2003.
58. Hof, Dörries. *Medizinische Mikrobiologie: Duale Reihe MLP*; 2005.
59. Tuan, Lee. What are the local and systemic biologic reactions and mediators to wear debris, and what host factors determine or modulate the biologic response to wear particles? *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 2008.
60. Sprecher, Schneider, Wimmer. Generalized size and shape description of UHMWPE wear debris-A comparison of knee joint simulator. *Acta Orthop Unfallchirurg* 2004.
61. Haynes, Crotti, Potter. The osteocloastogenic molecules RANKL and RANK are associated with periprosthetic osteolysis. *J Bone Joint Surg Br* 2003.
62. Wang, Sharkey, Tuan. Particle Bioreactivity and Wear-Mediated Osteolysis. *J. Arthroplasty* 2004.
63. Campbell, Wang, Amstutz, Goodman. Positive cytokin production in failed meal-on-metal total hip replacements. *Acta Orthop Scand* 2002.
64. Willert, Buchhorn, Fayaayazi. Histopathological changes araound metal/metal joints indicate delayed type hypersensitivity. *Osteologie* 2000.
65. Jacobs, Hallab. Loosening and osteolysis associated with metal-on-metal bearings:A local effect of metal hypersensitivity? *J Bone Joint Surg Am* 2006.
66. Hallab, Anderson, Stafford. Lymphocyte responses in patients with total hip arthroplasty. *J Orthop Res* 2005.
67. Hallab, Jacobs. Biologic effects of implant debris. *Bulletin of the NYU hospital for joint deseases* 2009.
68. Smith, Hallab. In vitro macrophage response to polyethylene and polycarbonate-urethane particles. *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 2009.

- 
69. Kaur, Alam, Athar. Cumene hydroperoxide debilitates macrophage physiology by inducing oxidative stress: possible protection by alpha-tocopherol. 2009.
  70. Wachter, Hausen. Chemie für Mediziner; 1996.
  71. Bertelli AA GL, Bernini W, et al. Antiplatelet activity of cis-resveratrol. *Drugs Exp Clin Res* 1996; 22: 61-63 1996.
  72. Vivancos, Moreno. effect of resveratrol, tyrosol, and beta-sitosterol on oxidised low-density lipoprotein-stimulated oxidative stress, arachidonic acid release and prostaglandin E2 synthesis by RAW 264.7 macrophages. *British Journal of Nutrition* 2008.
  73. Kimura Y. OHAS. Effects of stilbenes on arachidonate metabolism in leucocytes. *Biochem. Biophys. Acta* 834, 275-278 1985.
  74. Jang M. CL, Udeani G.O., Slowing K.V., Thomas A.D., Mehta R.G., Moon R.C., Pezzuto J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 275, 218-220 1997.
  75. Kowalski, Samojedny. Effect of apigenin, kaempferol and resveratrol on the express of interleukin-1beta and TNF-alpha genes in J774.2 macrophages. *Pharmacological Reports* 2005.
  76. Fujisawa K AH, Hasunuma T, Yamamoto K, Mita S, Nishioka K. Activation of transcription factor NF-kappa B in human synovial cells in response to tumor necrosis factor alpha. *Arthritis Rheum.* 1996 Feb;39(2):197-203 1996.
  77. Ross, Kasum. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. *Annu Rev Nutr* 2002.
  78. Brooks, Digerness, Parks. Mitochondrial function in response to cardiac ischemia-reperfusion after oral treatment with quercetin. *Free Radic Biol Med* 2002.
  79. Casagrande, Darbon. Effects of structurally related flavonoids on cell cycle progression of human melanoma cells: regulation of cyclin-dependent kinases CDK2 and CDK1. *Biochem Pharmacol* 2001.
  80. Sato M MT, Kambe F, Maeda K, Seo H. Quercetin, a bioflavonoid, inhibits the induction of interleukin 8 and monocyte chemoattractant protein-1 expression by tumor necrosis factor-alpha in cultured human synovial cells. *J Rheumatol* 1997; 24: 1680-1684 1997.
  81. Nakamura, Omura. Quercetin regulates the inhibitory effect of monoclonal non-specific suppressor factor beta on tumor necrosis factor-alpha production in LPS-stimulated macrophages. *Biosci Biotech Biochem* 2008.
  82. Matthews J B GTR, Stone M H. Comparison of the response of three human monocytic cell lines to challenge with polyethylene particles of known size and dose. *Journal of Material Science: Materials in Medicine* 2001.
  83. Wirtz DC. Hüftrevisionsendoprothetik. *Der Orthopäde* 2009. Stabilisierung der Gleitflächen von Gelenkendoprothesen aus herkömmlichem sowie vernetztem ultra-hochmolekularem Polyethylenen mittels alpha-Tocopherol. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* 2009.
  84. Lederer K WC. Stabilisierung der Gleitflächen von Gelenkendoprothesen aus herkömmlichem sowie vernetztem ultra-hochmolekularem Polyethylenen mittels alpha-Tocopherol. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* 2009.

---

Abbildung 1	Die Arthroseentstehung-Risikofaktoren und Reperaturmechanismen .....	3
Abbildung 2	WHO-Stufen-Schema zur Schmerztherapie .....	6
Abbildung 3	Elektronenmikroskopische Aufnahme mit LEO Gemini DSM 982 (FELMI-Austrian Centre for Electron Microscopy and Nanoanalysis Technische Universität Graz) von Keramikpartikel bei einer Geräteeinstellung von 5kV ...	9
Abbildung 4	Elektronenmikroskopische Aufnahme von Polyethylenpartikel im Mykrometerbereich. Mit freundlicher Genehmigung des Forschungslabors Leeds (Institute of Medical & Biological Engineering, University of Leeds, U.K.) .....	10
Abbildung 5	Elektronenmikroskopische Aufnahme eines einer phagozytierenden Makrophage .....	16
Abbildung 6	Phagozytose eines Polyethylenpartikels durch eine Makrophage .....	16
Abbildung 7	Vergleich Entzündungsreaktion mit der Hypothese der aseptischen Prothesenlockerung .....	18
Abbildung 8	Monozytenisolierung aus dem Buffy Coat. Dabei werden die einzelnen Bestandteile über den Dichtegradienten aufgeteilt .....	32
Abbildung 9	Pipettierschema Versuch Antioxidantien .....	38
Abbildung 10	A) Fotografische Darstellung der PerOx – Analyse von mononukleäre Zellen des Buffy Coats (BC) und RAW293 Mausmakrophagen zur Eruierung des oxidativen Stresslevels. ....	48
Abbildung 11	A und B) zeigen die statistischen Auswertungen der humanen Primärzellen und der RAW293 Mausmakrophagen im Vergleich .....	49
Abbildung 12	TNF- $\alpha$ aus mononukleären Zellen des BC .....	50
Abbildung 13	A) Fotografische Darstellung der PerOx – Analyse von mononukleäre Zellen RAW293 .....	52
Abbildung 14	Fotografische Darstellung der PerOx .....	53
Abbildung 15	A) und B) zeigen die statistische Auswertung der OD450nm - Werte der Vitamin C Verdünnungsreihen .....	54
Abbildung 16	Fotografische Darstellung einer repräsentativen PerOx-Analyse von RAW293 Mausmakrophagen. B) zeigt das Pipettierschema für die Konzentrationen der Antioxidantien dieses Experiments .....	55
Abbildung 17	Vergleich Entzündungsreaktion mit der Hypothese der aseptischen Prothesenlockerung .....	56
Abbildung 18	Statistische Auswertung der PerOx-Analysen nach Behandlung mit Resveratrol bei A) RAW293 und B) humanen Primärzellen .....	57
Abbildung 19	Statistische Auswertung der PerOx-Analysen nach Behandlung mit NAC .....	58
Abbildung 20	Statistische Auswertung der PerOx-Analysen nach Behandlung mit Resveratrol .....	59
Abbildung 21	A) und B) zeigen die statistischen Auswertungen der normierten Werte der PerOx .....	60
Abbildung 22	A)und B) zeigen die statistischen Auswertungen der normierten Werte der TNF- $\alpha$ Analysen .....	62
Abbildung 23	A)und B) zeigen die statistischen Auswertungen der normierten Werte der TNF- $\alpha$ Analysen Statistische Auswertung der normierten Werte der TNF- $\alpha$ Analysen .....	63
Abbildung 24	Statistische Auswertung der normierten Werte der TNF- $\alpha$ Analysen .....	64

---

---

Tabelle 1	Standardreihe für TNF-alpha-Kit .....	41
Tabelle 2	Pipettierschema des TNF-alpha-Kits bei Antioxidantienversuch. Alle Proben wurden in Doppelbestimmung betrachtet .....	42
Tabelle 3	Beispiel für ein Pipettierschema des TNF-alpha im Bezug auf folgende Antioxidantien : Quercetin, Resveratrol und NAC in unterschiedlichen Konzentrationen .....	42
Tabelle 4	mit der Übersicht der verwendeten Konzentrationen von PMA und LPS 45 ..	47
Tabelle 5	Normierte Werte der Daten dieses Versuches auf die korrespondierende unbehandelte Negativkontrollgruppe .....	60
Tabelle 6	Normierte Werte aller vorhandener Daten der TNF- $\alpha$ -Analyse dieses Versuches auf die korrespondierende unbehandelte Negativkontrollgruppe ..	61