

2 Patienten und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patienten mit Gonarthrose

Im Zeitraum von Juni 1999 - November 2000 wurde an der Orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums Charité, Berlin bei 55 Patienten (Tabelle 1), bei denen eine operative Versorgung mit einer Totalendoprothese des Kniegelenks aufgrund einer Gonarthrose geplant war, nach ausführlicher Anamnese, Untersuchung und Aufklärung präoperativ eine Knochendichtemessung durchgeführt. Zusätzlich wurden Röntgenaufnahmen des entsprechenden Kniegelenks in zwei Ebenen angefertigt.

Patienten mit Knochenerkrankungen wie Osteonekrosen, M. Paget oder chronischer Polyarthritits wurden von der Studie ausgeschlossen. Im letzten Jahr vor der Operation hatten die Patienten systemisch keine Medikamente wie Corticosteroide oder Biphosphonate erhalten, die in den Knochenstoffwechsel eingreifen.

Die bei der Operation gewonnenen Knochenproben des medialen und lateralen Femurkondylus wurden nach Entfernung des noch vorhandenen Knorpels mechanisch zerkleinert und bei -140°C bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

2.1.2 nicht-arthrotisch veränderte Kniegelenke

Die osteodensitometrischen und biochemischen Daten von normalen Kniegelenken wurden von verstorbenen Patienten (Tabelle 1) aus der Pathologie der Universitätsklinik Charite, Berlin im Zeitraum von Mai 2001– Januar 2002 gewonnen. Bei diesen Patienten waren in der Anamnese keine Kniegelenkserkrankungen und Knochenstoffwechselstörungen oder Einnahme von Medikamente, die in den Knochenstoffwechsel eingreifen, beschrieben. Die makroskopische Betrachtung der Femurkondylen zeigte keine wesentliche Knorpeldegeneration der Kniegelenke. Nach der Knochendichtemessung der explantierten Kniegelenke wurden die medialen und lateralen Femurkondylen abgetrennt und der Gelenkknorpel abpräpariert. Die subchondralen Knochenproben wurden mechanisch zerkleinert und bei -140°C gelagert.

	Patienten mit Gonarthrose	Kontrollgruppe ohne Arthrose
Anzahl	55	15
Frauen	42	6
Männer	13	9
Alter (Jahre) *	71,5 (57,0 - 90,9)	69,7 (57,1 - 76,6)
Gewicht (kg) *	79,0 (55,0 - 120)	79,2 (53,0 - 107)
Größe (cm) *	165 (148 - 196)	170 (150 – 190)
Linkes Kniegelenk	21	3
Rechtes Kniegelenk	34	12

Tabelle 1: Merkmale der Arthrose- und der Referenzgruppe,

* Angabe der Mittelwerte, sowie Minimal- und Maximalwerte in Klammern

2.2 Röntgenbefunde

Zur radiologischen Befundung wurden die standardisierten Langaufnahmen der Beine im Stehen, welche präoperativ zur Planung der endoprothetischen Versorgung angefertigt werden, verwendet (Abbildung 1).



Abbildung 1: Röntgenaufnahme des rechten Knies bei Gonarthrose

Die radiologischen Veränderungen wurden mittels der Stadieneinteilung nach Ahlbäck bei Gonarthrose klassifiziert 1 (Tabelle 2).

Stadium	Radiologische Veränderungen im Stehen
Stadium I	Reduktion der Knorpelhöhe über 50%
Stadium II	Komplette Reduktion der Knorpelhöhe (100%)
Stadium III	Knochenerosion < 5mm
Stadium IV	Knochenerosion > 5mm

Tabelle 2: Einteilung der radiologischen Veränderungen nach Ahlbäck (1968)

2.3 Osteodensitometrie

2.3.1 Messprinzip

Für die Bestimmung der Knochendichte kam das Verfahren der Absorptimetrie zweier Energiemaxima von Röntgenstrahlen (Dual Energy X-ray Absorptiometry, DEXA) zur Anwendung (standardisierter Osteodensitome-

ter DPX-L der Firma LUNAR Corporation Köln, Deutschland), was die Messung der mineralischen Dichte des Knochens unabhängig von dem ihn umgebenden Weichteilgewebe ermöglicht.

Das Ergebnis wird als „Bone Mineral Density“ (BMD) in g/cm^2 angegeben.

Die Kalibrierung wurde regelmäßig mittels eines standardisierten Programms entsprechend den Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Die Messungen bei den Patienten mit Gonarthrose wurden

- an der Lendenwirbelsäule
- an den Schenkelhälsen beider Hüftgelenke und
- vom distalen femoralen kontinuierlich bis zum proximalen tibialen Knochen

durchgeführt. Zur Beurteilung der Knochendichte wurden die in der mitgelieferten Software der Firma LUNAR angegebenen Referenzwerte verwendet, welche sowohl das Alter und Gewicht als auch die ethnische Herkunft berücksichtigen.

Bei den verstorbenen Patienten der Kontrollgruppe wurden lediglich die osteodensitometrischen Werte vom

- distalen Femur kontinuierlich bis zur proximalen Tibia erhoben.

2.3.2 Durchführung

Alle Knochendichtemessungen erfolgten im anterior-posterioren Strahlengang in horizontaler Lage.

Die Messung der Lendenwirbelsäule erfolgte kontinuierlich von LWK2-LWK4.

Die Knochendichte der Schenkelhälsa wurde bei in 14° Innenrotation fixiertem Bein bestimmt, um die Antetorsion des Schenkelhalses auszugleichen. Der Befund dieser beiden untersuchten Regionen wurde mithilfe der mitgelieferten standardisierten Software erhoben.

Bei der Bestimmung der Knochendichte der Kniegelenke der Patienten mit Gonarthrose wurde der Fuß an einer rechtwinkligen Schablone in aufrechter Position fixiert, um eine reproduzierbare Lage des Knies zu gewährleisten und Bewegungsartefakte zu minimieren. Die Position der Referenzknie auf dem Meßtisch wurde mittels Lagerungskissen im anterior-posterioren Strahlengang gesichert.

Sowohl für die Messung der Referenzknie als auch der Kniegelenke aus der Arthrosegruppe in Streckstellung wurde die installierte Software zur osteodensitometrischen Untersuchung des Schenkelhalses verwendet. Es war

deshalb ein mitgeliefertes Phantom zwischen Strahlenquelle und Knie eingesetzt worden, um die weitgehend fehlenden Weichteile zu imitieren.

Zur Bestimmung der Knochendichte des Knies am medialen und lateralen subchondralen Femurkondylus, am distalen Femur vor Übergang in den Kondylus sowie am medialen und lateralen subchondralen Tibiaplateau wurden sogenannte "Regions of Interest" (ROI) definiert (Abbildung 2). Diese Flächen waren im Regelfall quadratisch und 1,44 cm² groß.

Innerhalb dieser Regionen wurde durch die Software automatisch die Knochendichte (BMD) in g/cm² berechnet.

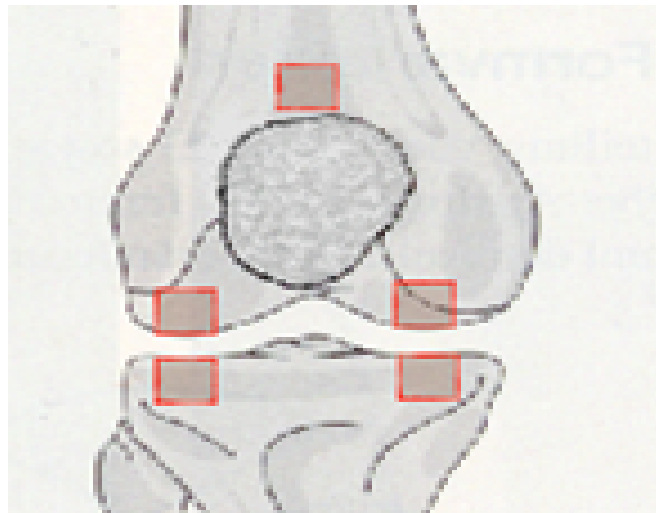


Abbildung 2: Schematische Darstellung der „regions of interest“ (orange Flächen) des Kniegelenks

2.4 Biochemische Analyse

2.4.1 Gewinnung des Knochenextrakts

Prinzip:

In Anlehnung an die von Pfeilschifter [86](#) beschriebene Methode wurden die Knochenproben zum Knochenextrakt aufgearbeitet. Zuerst wurden die zerkleinerten Proben mit Wasser und Äther von Blut und Fett gereinigt. Anschließend wurden die Knochenfragmente gemahlen. Das erhaltene Knochenpulver dialysiert, um den Knochenextrakt zu bekommen.

Zwischen den einzelnen Arbeitsschritten wurden die Proben bei -140°C gelagert.

2.4.1.1 Geräte und Materialien

Die neben der normalen Geräteausrüstung eines biochemischen Labors benutzten Geräte werden bei der Beschreibung ihrer Anwendung näher spezifiziert.

Chemikalien:

- Deionisiertes Wasser
- Diisopropylether
- Flüssiger Stickstoff
- 10 mM Essigsäure (pH 7,4)
- 50 mM EDTA
- 4 M Guanidin-HCl (GuHCl)
- 30 mM Tris-Puffer
- 1 mg/ml Bovine Serum Albumin, (BSA, Sigma, Steinheim)
- 5 mM Benzamidinhydrochlorid
- 1 mM Phenylmethyl-sulfonyl-florid, PMSF, (Serva, Heidelberg)
- 0,1 M ϵ -Aminocaprinsäure

(Alle hier aufgeführten Chemikalien ohne Herstellerbezeichnung wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen)

Material:

- 3,6ml-Cryoröhrchen (Firma Nunc, Wiesbaden)
- Eppendorf Pipetten der Größe: 0-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l und
- „Safe-lock micro test tubes" 2,0 ml (Eppendorf AG, Hamburg)
- 1,8-ml-Nunc-Röhrchen (Firma Nunc, Wiesbaden)
- SpectraPor 3 Membran, MWCO 3500 (Spektrum Medical Industries, Houston, TX)

2.4.1.2 Durchführung

Herstellung des Knochenpulvers:

1. Die noch gefrorenen Knochenproben werden auf einem Amboß mittels Meißels mechanisch zerkleinert und anschließend in die Cryoröhrchen gegeben
2. Zugabe von ca. 3ml destilliertem Wasser von 4° C
3. Waschvorgang für 10 Minuten auf Kreisschüttler bei 4°C
4. Absaugen des Überstandes mit Pipette
5. Wiederholen des Waschvorgangs 2.)-4.), insgesamt 5 X
6. Lyophilisieren der Proben
7. Fettextraktion durch Zugabe von ca. 3ml Diisopropylether
8. Mischen auf Kreisschüttler bei Raumtemperatur
9. Absaugen des Ethers mit Pipette
10. Wiederholen des Extraktionsvorgangs 7.)-9.) insgesamt 5X
11. Lufttrocken der Knochenfragmente bei Raumtemperatur
12. Kühlen der 5ml Mahlbecher mit den Fragmenten in flüssigem Stickstoff
13. Anschließend Mahlen der Knochenfragmente in einer Schwingmühle (Raetsch, Haan, Deutschland) in gefrorenem Zustand für 3 Minuten bei einer Frequenz von 26 Schwingungen/min

Gewinnung des Knochenextrakts:

1. Herstellen einer Extraktionslösung bestehend aus: 50 mM EDTA , 4 M Gu-HCl, 30 mM Tris, 1 mg/ml BSA, 5 mM Benzamidin-HCl, 1 mM PMSF, 0,1 M ϵ -Aminocapronsäure
2. Lyophilisieren des Knochenpulvers
3. Je Probe werden 24 bis 25 mg Knochenpulver in Safe Lock micro test tubes, deren Deckel ausgestanzt wurden, abgewogen
4. Zugabe von 1,7ml Extraktionslösung je Röhrchen

5. Verschuß der Röhrchen mit Spektra/Por 3 Membran
6. Dialyse von 22 Röhrchen in 500ml Extraktionslösung über 12 Stunden auf einem Kreisschüttler bei 4°C
7. Erneute Dialyse in 300ml Extraktionslösung über 12 Stunden auf dem Kreisschüttler bei 4°C
8. Anschließend Dialyse über 3 Tage mit 600ml 10 mM Essigsäure, welche alle 24 h gewechselt wird
9. Zentrifugation der Proben für 2 Minuten bei 10000g
10. Knochenextrakt abpipettieren und in ein 1,8-ml-Nunc-Röhrchen bis zur weiteren Verarbeitung bei -140°C aufbewahren

2.4.2 Bestimmung der Gewebehormone

2.4.2.1 Geräte und Material

Die erforderlichen Geräte werden soweit noch nicht erwähnt bei der Durchführung der Tests näher spezifiziert.

Außer den bereits oben erwähnten Materialien waren noch nötig:

Zur Messung der Konzentration wurden folgende kommerzielle Testkits verwendet:

-IGF-1: IGF-1 RIA (IGF-R20), Firma Mediagnost, Tübingen

-IGFBP-3: IGFBP-3 RIA (IGF-R10), Firma Mediagnost, Tübingen

-TGFB -1: TGFB -1 ELISA (DB100), R&D Systems, Wiesbaden

Chemikalien:

-HEPES

-1N HCl

-10N NaOH

2.4.2.2 Bestimmung der IGF-I Konzentration durch RIA

Die IGF-I-Konzentration wurde durch einen Radioimmunoassay (RIA) bestimmt.

Die Besonderheit der IGFs besteht darin, dass sie nur in geringer Konzentration frei zirkulieren und der größte Anteil an Trägerproteine gebunden ist. Es wird deshalb dem Extrakt ein Ansäurepuffer zugegeben, damit das IGF-1 von den IGF-BPs dissoziiert. Das anschließend zugegebene IGF-2 in hohem Überschuss neutralisiert die Proben und besetzt die Bindungsstelle der Bindungsproteine und erlaubt die Messung des nun freien IGF-1. Wegen der sehr niedrigen Kreuzreaktivität des spezifischen, hochaffinen IGF-I Antiserum mit IGF-II (0,05%) stört der hohe Überschuss an IGF-II die Interaktion des ersten Antikörpers mit IGF-I oder IGF-I-Tracer nicht. Im weiteren Verlauf schließt sich die Bestimmung des IGF-1 nach dem oben genannten Prinzip einer RIA an.

Die Empfindlichkeit des Tests wird mit 0,02 ng/ml angegeben.

Durchführung

Die Testdurchführung erfolgte entsprechend der Beschreibung des Testkits.

Die Knochenextrakte wurden nicht verdünnt, da in Vorversuchen bei einer Einwaage von 25 mg Knochenpulver die Konzentration des IGF-1 innerhalb der Eichkurve lag.

Der Verdünnungsfaktor betrug 1,1 (300 µl Extrakt + 30 µl Ansäuerungspuffer).

1. Vorbereitung der Röhren für Standards, Kontrollen und Patientenproben
2. Jeweils 100µl der Standards, Kontrollen und Knochenextrakte in die entsprechenden Röhren pipettieren.
3. Zugabe von 100µl des Reagenz mit 1. Antikörpers (anti-hIGF-1) aus Kaninchen ImmunglobulinG und rekombinantem hIGF-2 in entsprechende Röhren
4. Zugabe von 100µl des Reagenz mit J(125)-IGF-1 (Tracer) in alle Röhren
5. Mischen auf dem Vortex-Mixer und 48h bei 4°C inkubieren
6. Zugabe von 500µl des Präzipitationsreagenz (anti-Kaninchen-Immunglobulin als 2. Antikörper)
7. Mischen mit einem Vortex-Mixer und inkubieren bei 4°C für 1 Stunde
8. Zugabe von je 1ml kaltem entmineralisiertem Wasser
9. Zentrifugation der Röhren bei 4000 U/min für 30 Minuten bei 4°C

10. Vorsichtiges Absaugen des Überstandes
11. Messung der Radioaktivität aller Röhren im Gammacounter für 2 Minuten
12. Auswertung über ein counterspezifisches Auswertprogramm

Aus der Doppelbestimmung der einzelnen Knochenextrakte wurde der Mittelwert gebildet und die IGF-1 Konzentration im Knochen berechnet.

2.4.2.3 Bestimmung der Konzentration IGFBP-3 durch RIA

Der kommerzielle RIA für IGFBP-3 benützt ein spezifisches, hochaffines, polyklonales Antiserum für dieses Protein. Es erkennt quantitativ den kompletten ternären Komplex und wird auch von erhöhten IGF-1 bzw. -2 Werten nicht beeinflusst. Der Tracer wird durch direkte Radiojodierung von aufgereinigtem IGFBP-3 hergestellt. Die Sensitivität des Assays beträgt 0,06ng/ml. Gegenüber anderen IGFBP-3 zeigt sich keine Kreuzreaktivität.

Durchführung:

Der Testdurchführung liegt die Beschreibung des oben genannten Testkits zugrunde.

Alle Knochenextrakte wurden vor dem Einsatz in den Assay mit Verdünnungspuffer im Verhältnis 1:20 verdünnt.

1. Vorbereitung der Röhren für Standards, Kontrollen und Patientenproben
2. Jeweils 100µl der Standards, Kontrollen und verdünnten Patientenproben in die entsprechenden Röhren pipettieren
3. Zugabe von 100µl des Reagenz mit 1. Antikörper (Kaninchen anti-hIGFBP-3) in entsprechende Röhren
4. Zugabe von 100µl des Reagenz mit J(125)-IGFBP-3 (Tracer) in alle Röhren
5. Auf dem Vortex-Mixer kurz mischen und 48h bei 4°C inkubieren
6. Zugabe von 500µl des Präzipitationsreagenz (anti-Kaninchen-Immunglobulin als 2. Antikörper)
7. Mischen mit einem Vortex-Mixer und inkubieren bei 4°C für 1 Stunde
8. Zentrifugation der Röhren bei 4000 U/min für 20 Minuten bei 4°C
9. Vorsichtiges Absaugen des Überstandes

10. Zugabe von je 1ml 4°C kaltem entmineralisiertem Wasser
11. Zentrifugation der Röhrrchen bei 4000 U/min für 5 Minuten bei 4°C
12. Vorsichtiges Absaugen des Überstandes
13. Messung der Radioaktivität aller Röhrrchen im Gammacounter für 2 Minuten
14. Auswertung über ein counterspezifisches Auswertprogramm

Aus der Doppelbestimmung der einzelnen Knochenextrakte wurde der Mittelwert gebildet und die IGFBP-3 Konzentration im Knochen berechnet.

2.4.2.4 Bestimmung des TGFβ-1 durch ELISA

Die TGFβ-1- Konzentration wird mit Hilfe eines Enzyme Linked Immunoabsorbent Assay (ELISA) bestimmt.

Um latentes TGFβ-1 dem Test zugänglich zu machen, werden die Proben zuerst mit Säure versetzt und anschließend neutralisiert. Die Titrationsplatten sind mit dem TGF-β Rezeptor Typ II beschichtet. Das gebundene TGFβ-1 wird nach Waschung mit einem spezifischen Antikörper, welcher mit einer Hydrogenperoxidase markiert ist, detektiert. Als chromogenes Substrat dient Tetramethylbenzidin.

Die Sensitivität des Tests beträgt 7pg/ml.

Durchführung:

Die Testdurchführung erfolgte nach der Anleitung des verwendeten Testkits.

In Vorversuchen zeigte sich, dass die Knochenextrakte nicht verdünnt werden müssen.

1. 500µl der Extrakte werden mit 100µl 1N HCl versetzt
2. Proben mischen und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
3. Proben mit 100µl 1,2N NaOH/0,5 M HEPES neutralisieren
4. Vorbereitung der Standards und Kontrollen
5. 200µl der Kontrollen, Standards und der aktivierten Proben in die Mikroplatten pipettieren
6. Inkubation für 3 Stunden bei Raumtemperatur
7. 3X Waschen mit Waschpuffer und absaugen nach letztem Waschgang

8. Zugabe von 200µl des TGFβ-1-Konjugats
9. 1,5 Stunden inkubieren bei Raumtemperatur
10. Erneuter Waschvorgang vgl. 7.)
11. Zugabe von 200µl der Substrat-Lösung (Tetramethylbenzidin) in jedes Röhrchen
12. Inkubation für 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln
13. Zugabe von 50µl der Stop-Lösung (2N Schwefelsäure)
14. Photometrische Messung innerhalb 30 Minuten bei 450nm gegen 550nm im Revelation-Microplate-Reader (MRX Revelation-Microplate-Reader, Dynex Technologies, Denkendorf, Deutschland)
15. Auswertung mit gerätespezifischer Software

Aus der Doppelbestimmung der einzelnen Knochenextrakte wurde der Mittelwert gebildet und die TGFβ-1 Konzentration im Knochen berechnet.

2.5 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte mit der SPSS-Software (Version 11.0; SPSS Inc. Chicago Illinois). Folgende deskriptive Analysen und Tests wurden, wenn nicht anderes angegeben, verwendet. Es wurden die Mittelwerte und Standardabweichung bei den einzelnen Ergebnissen berechnet. Beim Vergleich innerhalb der Arthroseggruppe wurde der t-Test für gepaarte und ungepaarte Stichproben angewendet. Die Unterschiede zwischen der Arthrose- und Kontrollgruppe wurde mit dem ANOVA-Test für unabhängige Stichproben berechnet. Die Korrelation wurde mit dem parametrischen Test nach Pearson berechnet.

Als signifikant wurde ein Ergebnis bezeichnet, wenn der „P-Wert“ kleiner als 5% war ($P < 0,05$).