

Aus dem Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie
Klinik für Orthopädie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen und Matrix Metalloproteinasen in
der Synovialmembran

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von
Georgi Wassilew
aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. C. Perka
2. Prof. Dr. med. F. Buttgereit
3. Priv.-Doz. Dr. med. P. Biberthaler

Datum der Promotion: 03.09.2010

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Krankheitsbild der Osteoarthritis	7
1.2. Pathophysiologie des Osteoarthritis-Prozesses	7
1.3. Prävalenz und Inzidenz der Osteoarthritis	8
1.4. Verteilung, Symptome und Risikofaktoren der Osteoarthritis	8
1.5. Kniegelenkverletzungen	9
1.6. Aufbau und Funktion der Gelenkkapsel	10
1.7. Zytokine	10
1.8. Zytokine in der Osteoarthritis	11
1.9. Matrix Metalloproteinasen in der Osteoarthritis	13
1.10. Inflammatorische Faktoren, die durch proinflammatorische Zytokine induziert werden	14
1.11. Rolle des Chondrozyten in der Osteoarthritis	15
1.12. Rolle der Synovialmembran in der Osteoarthritis	16
1.13. C-reaktives Protein in der Osteoarthritis	17
2. Fragestellung	18
3. Material und Methoden	20
3.1. Untersuchungsmaterial	20
3.2. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score	20
3.3. Western Ontario and Mac Master Universities Osteoarthritis Index (WOMAC)	21
3.4. Klassifikation von Knorpelschäden	22
3.5. Verbrauchsmaterialien	23
3.6. Chemikalien, Puffer und Lösungen	25
3.7. RNA-Isolierung	26
3.8. Reverse Transkription	26
3.9. Polymerase Kettenreaktion	27
3.10. Statistik	27
4. Ergebnisse	28
4.1. Charakterisierung der Patientengruppen	28
4.1.1. Allgemeine Charakterisierung	28
4.1.2. Alters- und Geschlechtsverteilung	28
4.2. Bestimmung der relativen mRNA-Genexpressionslevel von IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3	28
4.2.1. Expression von IL-1 beta und TNF alpha in der Synovialmembran	29
4.2.2. Expression von MMP-1 und MMP-3 in der Synovialmembran	31
4.3. Korrelation zwischen IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 in der Synovialmembran	32

4.3.1. Korrelation zwischen IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP3 in der Synovialmembran von Patienten mit Kniegelenkverletzungen	33
4.3.2. Korrelation zwischen IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 in der Synovialmembran von Patienten mit Osteoarthritis.....	34
4.4. Korrelation zwischen IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 mit der Krankheitsdauer und der Chondromalazie von Patienten mit Kniegelenkverletzungen	35
4.4.1. Korrelation zwischen der Krankheitsdauer nach der initialen Kniegelenkverletzung und IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP3 von Patienten mit Kniegelenkverletzungen	35
4.4.2. Korrelation zwischen der Chondromalazie und IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 von Patienten mit Kniegelenkverletzungen.....	36
4.5. Vergleich der CRP-Serum-Konzentrationen zwischen Patienten mit primärer Osteoarthritis und Kniegelenkverletzungen	37
4.6. Korrelation des CRP mit den IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3.....	38
4.6.1. Korrelation des CRP mit den IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen.....	38
4.6.2. Korrelation des CRP mit den IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Osteoarthritis	39
4.7. Korrelation zwischen dem BMI und IL-1 beta, TNF alpha, MMP1 und MMP-3	39
4.7.1. Korrelation zwischen dem BMI und IL-1 beta, TNF alpha MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Osteoarthritis	40
4.7.2. Korrelation zwischen dem BMI und IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen.....	40
4.8. Verlauf der MMP-1 und MMP-3 Expression über die Krankheitsdauer bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen.....	41
4.8.1. Verlauf der MMP-3 Expression über die Krankheitsdauer bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen.....	41
4.8.2. Verlauf von MMP-1 über die Krankheitsdauer bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen ...	42
4.9. Vergleich KOOS zwischen Patienten mit primärer Osteoarthritis und Kniegelenkverletzungen.....	43
4.10. Vergleich WOMAC zwischen Patienten mit primärer Osteoarthritis und Kniegelenkverletzungen.....	45
5. Diskussion	47
5.1. Bewertungen der Methoden.....	47
5.2. Pathogenese der Gonarthrose.....	47
5.3. CRP in der Osteoarthritis	48
5.4. Expression proinflammatorischer Zytokine in der Synovialmembran	50
5.5. Regulation und Expression von MMPs in der Synovialmembran von Patienten mit Osteoarthritis	51
5.6. Bedeutung des BMI in der Osteoarthritis.....	52
5.7. Bedeutung der Expression von TNF alpha im Zeitverlauf nach dem initialen Trauma	53
5.8. Bedeutung der Expression von IL-1 beta im Zeitverlauf nach dem initialen Trauma	54
5.9. Die Bedeutung der Assoziation zwischen der Expression von TNF alpha und arthroskopisch visualisierter Chondromalazie	55

<i>5.10. Bedeutung der Expression von MMP-1 und MMP -3 im Zeitverlauf nach dem initialen Trauma</i>	55
<i>5.11. Bedeutung der Assoziation zwischen der Expression von MMP-1 und MMP-3</i>	56
<i>5.12. WOMAC und KOOS bei den verschiedenen Patientengruppen</i>	57
6. Zusammenfassung	58
<i>6.1. Abstract</i>	59
7. Literaturverzeichnis	60
8. Abkürzungsverzeichnis	79
9. LEBENSLAUF	81
10. DANKSAGUNG	82
11. ANHANG	83

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1 Relative mRNA-Expression von IL-1 beta (*) normalisiert mit GAPDH.</i>	29
<i>Abbildung 2 Relative mRNA-Expression von TNF alpha (*) normalisiert mit GAPDH.</i>	30
<i>Abbildung 3 Relative mRNA-Expression von MMP-1 (*) normalisiert mit GAPDH.</i>	31
<i>Abbildung 4 Relative mRNA-Expression von MMP-3 (*) normalisiert mit GAPDH.</i>	32
<i>Abbildung 5 Serumkonzentration des CRP.</i>	37
<i>Abbildung 6 Verlauf der MMP-3 Genexpression in der Synovialis (*) normalisiert mit GAPDH.</i>	41
<i>Abbildung 7 Verlauf von MMP-1 Genexpression in der Synovialis (*) normalisiert mit GAPDH.</i>	42
<i>Abbildung 8 KOOS Quantifizierung der Symptome, Schmerz, Funktion (I/II) und der Lebensqualität im KOOS Score.</i>	43
<i>Abbildung 9 WOMAC Quantifizierung der Bewegungseinschränkung, Funktion und Schmerz im WOMAC Score.</i>	45

1. Einleitung

1.1. Krankheitsbild der Osteoarthrose

Die Osteoarthrose ist ein multifaktorieller Prozess, in welchem mechanische, aber auch biologische Faktoren das Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau des Gelenkknorpels destabilisieren und so zur progressiven Knorpeldestruktion führen (Fernandes et al., 2002). Sie definiert des Weiteren den Rahmen einer Endstrecke vieler unterschiedlicher Prozesse, welche den Gelenkknorpel schädigen. In diesen Prozess ist das gesamte Gelenk mit einbezogen, welches den subchondralen Knochen, den medialen und lateralen Meniskus, die Ligamente, die periartikuläre Muskulatur, die Gelenkkapsel und die Synovialmembran beinhaltet (Buckwalter und Martin, 2006). Die Osteoarthrose ist durch Schmerzen und Dysfunktion im jeweiligen Gelenk charakterisiert, in fortgeschrittenen Phasen auch durch Gelenkkontrakturen, Muskelatrophien und Extremitätendeformitäten (Felson, 2006).

1.2. Pathophysiologie des Osteoarthrose-Prozesses

Verschiedene Gründe können zu einer Schädigung der Chondrozyten und der Knorpelgrundsubstanz führen, durch welche dann die Arthrose ausgelöst wird und progredient fortschreitet. Zwei Pathogenesekonzepte, das biomechanische und das biochemische, versuchen diese komplexe Erkrankung zu erklären (Goldring und Goldring, 2007).

Im biomechanischen Konzept wird davon ausgegangen, dass ein Teil der Arthrosen auf ein pathologisches Bewegungsmuster zurückzuführen ist, welches z.B. durch Gelenkinstabilität nach Kniegelenkverletzungen entsteht. Die abnormale Belastung eines normalen Knorpels oder die normale Belastung eines abnormalen Knorpels kann zur Osteoarthrose führen (Goldring und Goldring, 2007). Dennoch sind die molekularen Grundlagen dieses Prozesses unklar. Eine mögliche Erklärung wäre, dass ein repetitiver abnormaler mechanischer Stress auf die Knorpelzellen die Kapazität der normalen Regenerationsprozesse überschreitet (Guilak et al., 2004). Da der Grund für die Arthrose bekannt ist, spricht man auch von der sekundären Osteoarthrose.

Das biochemische Konzept postuliert einen unbekanntem entzündlichen Reiz, welcher durch eine Freisetzung von Mediatoren, wie Zytokine und Enzyme, die Zellfunktion beeinflusst (Fitzgerald et al., 2004; Kurz et al., 2005). Da kein Verdacht auf eine traumatische Genese, eine Erkrankung oder Fehlstellung besteht, wird die klinische Diagnose der primären oder idiopathischen Osteoarthrose gestellt. Diese Form kann grundsätzlich in jedem Alter auftreten und alle Ausprä-

gungsgrade zeigen. Ätiologisch gibt es für die primäre Arthrose bis heute keine einheitliche, plausible und lückenlose Erklärung. Vermutet wird ein multifaktorielles systemisches Geschehen. Zwillingsstudien legen auch eine genetische Disposition für diese Erkrankung nahe (Loughlin, 2001), welche zu einer frühzeitigeren Osteoarthrose führen kann (Valdes et al., 2007). Sowohl die primäre, als auch die sekundäre Osteoarthrose, führen gemeinsam durch Verminderung der Knorpel elastizität und Proteoglykanverlust zu Ermüdungsbrüchen der Kollagenfasern, bis hin zu einem progredienten Knorpelverlust und zu Rissen im Gelenkknorpel. Wenn die Arthrose weiter fortschreitet, kommt es zu einer Bildung von Osteophyten, Pseudonekrosen (Rhaney und Lamb, 1955) und einer leichten entzündlichen Reaktion der Synovialmembran (Benito et al., 2005).

1.3. Prävalenz und Inzidenz der Osteoarthrose

Die Prävalenz der Osteoarthrose steigt mit dem zunehmenden Alter an. Über 30 % der Menschen über 45 Jahren berichten über Symptome wie Gelenksteifigkeit, intermittierende, mit dem Aktivitätsgrad assoziierte Schmerzen, bis hin zu einem permanenten Verlust der Beweglichkeit (Felson, 2006).

Mehr als 75 % der Menschen über 65 Jahren leiden an einer Osteoarthrose, bei denen mehr als ein Gelenk involviert ist (Felson, 1995).

Die Inzidenz der Arthrose steigt nach dem 40. Lebensjahr rapide an. Für die meisten Gelenke, wie z.B. das Kniegelenk, ist die Inzidenz bei Frauen höher als bei Männern (Oliveria et al., 1995).

1.4. Verteilung, Symptome und Risikofaktoren der Osteoarthrose

Grundsätzlich kann sich die Osteoarthrose an allen Gelenken manifestieren. Die primäre Osteoarthrose zeigt sich selten am Sprunggelenk, Handgelenk, Ellenbogen oder an der Schulter. Häufiger ist die Inzidenz am Kniegelenk, gefolgt vom Hüftgelenk, den Fingerendgelenken, den Fingermittelgelenken und an der Wirbelsäule, den so genannten Spondylarthrosen (Buckwalter und Martin, 2006).

Das Risiko für die Entstehung der posttraumatischen Osteoarthrose scheint am Sprunggelenk, Handgelenk, Ellenbogengelenk und an dem Schultergelenk mindestens so groß zu sein, wie am Handgelenk, Fußgelenk, Kniegelenk und Hüftgelenk (Buckwalter und Martin, 2006).

Klinische Symptome einer Arthrose sind Morgensteifigkeit, Schmerzen und funktionelle Einschränkungen. Bei dem Verdacht auf eine Arthrose wird neben der Evaluation subjektiver Beschwerden, obwohl die klinische als auch die radiologische Diagnostik zur Sicherung des Befundes eingesetzt. Bemerkenswert ist, dass ca. 60 % der Patienten mit radiologischen Arthrosezeichen keinerlei subjektive Beschwerden haben. Kellgren und Lawrence (1957) definierten radiologische Kriterien, die bis heute Standard der Beurteilung der Gonarthrose sind.

Risikofaktoren der Gonarthrose sind das Geschlecht, die genetische Prädisposition, Adipositas, eine erhöhte Knochendichte und eine vergrößerte Gelenkklaxität. Weitere Risikofaktoren, die zur sekundären Arthrose führen können, sind Gelenkverletzungen, Gelenkdysplasien, eine aseptische Nekrose, Akromegalie, Morbus Paget, das Ehlers-Danlos-Syndrom, Gelenkinfektionen und die neuropathische Atrophie im Rahmen von Syphilis, Diabetes oder Syringomyelie (Buckwalter und Martin, 2006).

Erwiesen ist, dass die Häufigkeitsrelationen der Gonarthrose 1,5:1 bis 4:1 für Frauen gegenüber den Männern beträgt.

1.5. Kniegelenkverletzungen

Kniegelenkverletzungen sind als wichtiger prädisponierender Faktor bei der Entwicklung der Osteoarthrose beschrieben (Englund et al., 2001; Englund et al., 2003; Fairbank, 1948; Sherman et al., 1988; Cicuttini et al., 2002). Kniegelenkverletzungen, die zu einer posttraumatischen Instabilität oder einer pathologischen Biomechanik führen, beinhalten vor allem ligamentäre Verletzungen, Meniskusverletzungen oder Verletzungen der Gelenkkapsel. Rupturen des vorderen Kreuzbandes (VKB) treten vor allem als Sportverletzungen in der jüngeren Population auf (Arendt et al., 1999; Boden et al., 2000; Miyasaka et al., 1991).

Über eine erhöhte Prävalenz in der Osteoarthrose bei jüngeren Patienten nach Kniegelenkverletzungen wurde berichtet (Daniel et al., 1994; Kannus et al., 1989; Lohmander et al., 2004; Maletius und Messner, 1999; von Porat et al., 2004). Bis zu 50 % dieser Patienten zeigen in der bildgebenden Diagnostik nach 12 Jahren degenerative Veränderungen (Lohmander et al., 2004).

Die Effekte des pathologischen Bewegungsmusters nach Kniegelenkverletzungen auf den Chondrozytenmetabolismus wurden bislang unzureichend untersucht. Doch gibt es Hinweise, dass mechanischer Stress zu einer Erhöhung von entzündlichen Mediatoren führt (Pickvance et al., 1993). Allgemein gilt, dass eine Gewebeverletzung durch ein Trauma zu einem lokalen und systemischen Anstieg von proinflammatorischen Zytokinen führt (Perl et al., 2003; Holzheimer

und Steinmetz, 2000). Außerdem kann eine kurze Exposition von Chondrozyten mit Blut, wie es bei einer vorderen Kreuzbandruptur vorkommen kann, zu Apoptosen dieser Zellen führen (Hooiveld et al., 2003). Es gibt Hinweise darauf, dass inflammatorische Mediatoren bei der Entwicklung der posttraumatischen Osteoarthrose eine Rolle spielen (Fukui et al., 2001; Sandell und Aigner, 2001; Kerin et al., 2002; Hedbom und Häuselmann, 2002; Cameron et al., 1997; Cameron et al., 1994).

1.6. Aufbau und Funktion der Gelenkkapsel

Die Gelenkkapsel zeigt einen dreischichtigen Aufbau. Die Synovialmembran (Intima synovialis) befindet sich innen, nach außen gefolgt von der subsynovialen Schicht (Subintima) und der fibrösen Gelenkkapsel. Die subsynoviale Schicht enthält Gefäße und Nervenendigungen und bildet die Grenzschicht zwischen der fibrösen Gelenkkapsel und der Synovialmembran. Ferner sind Lymphozyten, Leukozyten, Plasma-, Mast- und Fettzellen in dieser Schicht präsent. Die Architektur, die Kinetik und Stabilität wird vor allem durch die fibröse Gelenkkapsel bestimmt. Die Synovialmembran besteht vorwiegend aus lockerem, zellreichem Bindegewebe, welches reich an Kollagen und Proteoglykanen ist. Sie setzt sich aus einer zweireihigen Zellschicht mit zwei verschiedenen Typen von Deckzellen (Typ A und Typ B) zusammen. Dazu gehören die synovialen Typ-A-Deckzellen, makrophagenähnliche Zellen, die aus Knochenmarkstammzellen entstehen. Sie werden dem Monozyten-Makrophagensystem zugeordnet. Funktionell dienen sie zur Immunabwehr und Phagozytose. Die synovialen Typ-B-Deckzellen sind Bindegewebszellen, welche die Synovia und Hyaluronsäure bilden. Die Hyaluronsäure verleiht der Synovia die viskösen Eigenschaften. Daneben enthält die Synovia Elektrolyte, Glukose, Laktat und Sauerstoff, und ist in ihrer Zusammensetzung mit dem Blutplasma vergleichbar. Des Weiteren kommt der Synovialmembran eine Grenzfunktion zu, wodurch die Diffusion größerer Moleküle verhindert wird.

1.7. Zytokine

Zytokine sind eine heterogene Gruppe von lokal wirkenden Glykoproteinen, die eine entscheidende Rolle bei den interzellulären Interaktionen spielen. Sie kommen entweder in löslicher Form vor oder sind an die Zelloberfläche gebunden.

Zytokine können hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Chondrozytenfunktion eingeteilt werden. So unterscheidet man anabol, katabol, antikatabol/inhibitorisch und modulatorisch wirkende Zytokine (Goldring und Goldring 2004).

Die katabolen Zytokine initiieren die Knorpeldestruktion. Die antikatabolen Zytokine inhibieren die katabol wirkenden Zytokine. Die anabol wirkenden Zytokine stimulieren wiederum Wachstum und differenzierungsfördernde Faktoren, welche in den Chondrozyten die Syntheseaktivität steigern.

Tabelle 1 Klassifikation der Chondrozyten-Zytokin Interaktionen (aus S. R. Goldring und M. B. Goldring, 2004).

Katabole Zytokine	Molatorische Zytokine	Antikatabole Zytokine	Anabole Zytokine
IL-1	IL-6	IL-4	IGF-1
TNF alpha	LIF	IL-10	TGF-beta 1, 2, 3
IL-17	IL-11	IL-13	BMP-2, 4, 6, 7, 9, 13
IL-18		IL-1ra	

Die modulierend wirkenden Zytokine interagieren zwischen den oben genannten Zytokinen und steuern deren Aktivitäten. Zytokine wirken sehr gewebespezifisch. Die Interaktion dieser strukturell und funktionell ähnlichen Faktoren läuft räumlich und zeitlich geordnet in einem Netzwerk von Faktoren ab. Die Integration einzelner Zytokine in diesem Netzwerk beschreibt ein Regulationssystem, in welchem ein Gleichgewicht zwischen inhibitorischen und stimulierenden Effekten herrscht (Goldring, 1999).

1.8. Zytokine in der Osteoarthritis

Zytokine besetzen eine Schlüsselrolle in der Entstehung und Aufrechterhaltung degenerativer, sowie inflammatorischer Erkrankungen, wie der Osteoarthritis und der rheumatoiden Arthritis. Eine besondere Rolle wird dabei speziell den proinflammatorischen Zytokinen zugeschrieben. Zu diesen zählen Interleukin-1 (IL-1) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF alpha). Es wird angenommen, dass erst die übermäßige Produktion dieser Zytokine ohne eine adäquate Inhibition über einen längeren Zeitraum den Weg eines progressiven Knorpelverlustes ebnet, welcher unwillkürlich zu einer Arthritis führt (Fernandes et al., 2002).

Fell und Jubb, (1977) beschrieben erstmalig IL-1 als einen wesentlichen Regulator der Chondrozytenfunktion. Seine Arbeitsgruppe kultivierte nicht entzündete Schweinesynovialzellen und beobachtete, dass sich diese Knorpelfragmente zersetzen können. Sie führten diese Fähigkeit

auf einen in den Synovialzellen produzierten Faktor zurück, das IL-1 (Fell und Jubb, 1977; Dingle et al., 1979).

Weitere Studien beobachteten eine ähnliche Aktivität in Kulturmedien von mononukleären und synovialen Zellen, welche die Produktion von proteolytisch wirkenden Enzymen stimulieren (Dayer et al., 1977; Dayer et al., 1984). Anschließend konnte dieses Zytokin isoliert und vervielfältigt werden. Nun war es möglich, die isolierte biologische Wirkung genauer zu identifizieren (Auron et al., 1984; March et al., 1985; Dodge und Pool, 1989; Goldring und Krane, 1987; Lin et al., 1988; Smith et al., 1989; Stephenson et al., 1987; Wood et al., 1983).

IL-1 Konzentrationen wurden via Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) in der Gelenkflüssigkeit bei Arthrosepatienten nachgewiesen (Schlaak et al., 1996), allerdings ist die genaue Quelle des IL-1 noch immer nicht eindeutig bekannt. Dabei gelten die Synovialmembran, ein Pannus-ähnliches Gewebe am Rand der Gelenkinnenfläche (Shibakawa et al., 2003) und die Chondrozyten (Melchiorri et al., 1998; Middleton et al., 1996; Moos, 1999; Towle et al., 1997) als möglicher Syntheseort.

Gegenwärtig ist die Wirkung von IL-1 auf die Chondrozyten im Prozess der Osteoarthrose gesichert (Goldring und Goldring, 2007). IL-1 stimuliert die Synthese von Kollagen Typ I und reguliert gleichzeitig die Synthese vom knorpeltypischen Kollagen Typ II herunter. IL-1 stimuliert den Abbau von Proteoglykanen, die Produktion neutraler Proteinasen und aktiviert Osteoklasten. Diese wiederum bauen die subchondrale Knochenstruktur ab. Außerdem hemmt IL-1 die Knorpelsynthese, indem es die Synthese von Metalloproteinasen (MMPs), Prostaglandinen und Stickoxid fördert (Fosang et al., 1991; Goldring, 1999; Goldring und Goldring, 2004; Di Battista et al., 2001). Nach der Freisetzung von IL-1 bindet es sich an einen Zellrezeptor und aktiviert eine Enzymkaskade, wodurch die Transkription im Zellkern induziert wird. IL-1 ist in der Lage, die Destruktion des Knorpelgewebes zu induzieren und die Regeneration des Knorpelgewebes zu hemmen (van den Berg und Bresnihan, 1999).

Die biologische Zellaktivierung wird über IL-1 Rezeptoren (IL-1R) vermittelt. Diese Zelloberflächenrezeptoren werden in Typ I- und Typ II-IL-1R eingeteilt (Slack et al., 1993). Der Typ I-IL-1R hat eine höhere Affinität zu IL-1 beta als zu IL-1 alpha. Beide Typen der IL-1R können auch als lösliche IL-1 Rezeptoren vorkommen. Die Membranen ungebundener Rezeptoren wirken auch als physiologische Zytokinantagonisten (Attur et al., 2000). Die Konzentration der Typ I-IL-1R sind in Chondrozyten und synovialen Fibroblasten von den an Osteoarthrose erkrankten Patienten signifikant erhöht (Martel–Pelletier et al., 1992; Sadouk et al., 1995).

Der Tumornekrosefaktor alpha (TNF alpha) gehört wie das IL-1 zu den proinflammatorischen Zytokinen. TNF alpha ist ebenso wie das IL-1 ein Schlüsselzytokin der Osteoarthritis. Er ist ein wichtiger Mediator der Matrixdegradation und das entscheidende Zytokin, welches die Entzündung der Synovialmembran entfacht (Pelletier et al., 2001).

Die TNF-Proform wird von dem Tumornekrosefaktor Converting Enzym (TNF-CE) aktiviert. TNF-CE befindet sich auf der Zelloberfläche und gehört zu der Enzymfamilie Adamalysin (Black et al., 1997). Studien berichteten über eine verstärkte Expression von TNF-CE im humanen Knorpel von Patienten mit Osteoarthritis (Amin, 1999). Nach der Sekretion bindet das TNF alpha sich an zwei spezifische Rezeptoren (TNFR) auf der Zellmembran. Diese zwei TNFR (Loetscher et al., 1990; Schall et al., 1990) werden nach ihrem Molekulargewicht benannt sTNFR55 und sTNFR75. Der sTNFR55 ist der dominante Mediator der TNF-Aktivität auf die Chondrozyten und synovialen Zellen. Über eine erhöhte Expression von TNFR55 auf diese Zellen in der Osteoarthritis wurde berichtet (Alaaeddine et al., 1997; Westacott et al., 1994). Die lösliche Form dieser Rezeptoren stabilisiert die molekulare Struktur des TNF alpha in der synovialen Flüssigkeit. So wird dessen Halbwertszeit in der Synovia erhöht. Stark erhöhte Konzentrationen hingegen reduzieren die biologische Aktivität von TNF alpha (Goldring, 2000).

TNF alpha zeigt eine ähnliche Wirkung auf die Chondrozyten wie IL-1. So stimuliert es beispielsweise die Produktion von MMPs und supprimiert die Knorpelmatrixsynthese (Fernandes et al., 2002). IL-1 hat jedoch eine 100- bis 1000-fach stärkere Wirkung als TNF alpha auf die Chondrozyten. TNF alpha und IL-1 zeigen einen starken synergistischen Effekt (van den Berg, 2001), wobei IL-1 eher eine entscheidende Rolle bei der Knorpeldestruktion spielt und TNF alpha bei der Induktion des Entzündungsprozesses (Zwerina et al., 2007).

1.9. Matrix Metalloproteinasen in der Osteoarthritis

Matrix Metalloproteinasen (MMPs) sind Zink- und Calcium-abhängige Enzyme, die hauptsächlich von Bindegewebszellen als inaktive Vorstufe synthetisiert und sezerniert werden. Aktiviert werden die MMPs erst nach der Abtrennung einer Pro-Domäne. Die MMPs spielen sowohl bei physiologischen, als auch bei pathologischen Prozessen der Gewebeumstrukturierung eine wichtige Rolle (Murphy et al., 2002; Knäuper et al., 2002; Nagase und Okada, 1998; Nagase et al., 1999). So sind sie in der Lage die extrazelluläre Matrix zu degradieren und Wachstumsfaktoren freizusetzen. Gegenwärtig sind 25 MMPs bekannt, welche nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung nummeriert sind. Daneben können diese Enzyme auch nach ihrer Substratspezifität in fünf Hauptgruppen eingeteilt werden.

Diese Gruppen sind die Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, Matrilysine und die membranständige Matrix Metalloproteinasen (MT-MMPs). Einige MMPs, wie die Makrophagen-Elastase (MMP-12), Stromelysin-3 (MMP-11), MMP-19, Enamelysin (MMP-20), Cysteine Array Matrix Metalloproteinase (CA-MMP oder MMP-23) und Epilysin (MMP-28) können keiner dieser Gruppen zugeordnet werden (Murphy et al., 2002). Andere Enzyme wie das MT-1 MMP (MMP-14) zeigen eine kollagenolytische Aktivität und sind membranassoziiert, so dass man diese Enzyme in mehr als eine Kategorie einteilen kann.

Einige MMPs haben in Studien gezeigt, dass sie eine entscheidende Rolle in der Arthrosegenese spielen. Zu diesen gehören MMP-1 und MMP-3 (Lohmander et al., 1993; Yoshihara et al., 2000; Kageyama et al., 2000; Okada et al., 1992; Hembry et al., 1995; Wernicke et al., 1996; Keyszer et al., 1998; Tolboom et al., 2002; Inoue et al., 2001).

Dabei ordnet man MMP-1 den Kollagenasen zu, welche die Fähigkeit besitzen, die native Tripelhelix fibrillären Kollagens (Typ I, Typ II und Typ III) in charakteristische Fragmente zu spalten. MMP-3 wiederum wird den Stromelysinen zugeordnet, welche eines der breitesten Wirkungsspektren der MMP Subgruppen aufweisen. Sie können die meisten Matrixkomponenten wie Gelatin, Fibronectin, Laminin und Aggrecan spalten und andere pro MMPs aktivieren. Sie werden von synovialen Fibroblasten in der rheumatoiden Arthritis (RA) exprimiert, aber nicht von normalen synovialen Zellen.

Es ist bekannt, dass die MMPs im physiologischen pH-Bereich ihr Wirkungsoptimum erreichen. Damit es nicht zum unkontrollierten Abbau des Knorpelgewebes kommt, müssen Abbau und Synthese der extrazellulären Matrix im Gleichgewicht stehen. Inhibitoren der MMPs, so genannte „Tissue inhibitors of metalloproteinases“ (TIMP), stehen mit den MMPs im gesunden Gelenk im Gleichgewicht (Gomez et al., 1997). Wenn ein Ungleichgewicht zugunsten der MMPs entsteht und ein relativer Mangel an TIMPs vorliegt, kann dies zur progressiven Knorpeldestruktion führen (Dean et al., 1989; Martel-Pelletier et al., 1994; Murphy und Nagase, 2008).

1.10. Inflammatorische Faktoren, die durch proinflammatorische Zytokine induziert werden

Zahlreiche inflammatorische Faktoren sind in der Lage, die Chondrozytenfunktion zu beeinflussen. Dazu gehören die induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (iNOS), die Cyclooxygenase 2 (COX-2) und die Phospholipase A2. Infolge der Stimulation der Chondrozyten durch IL-1 allein oder in Kombination mit TNF alpha wird die Genexpression dieser Enzyme gesteigert (Goldring, 1999; Lotz, 1999).

Wenn der Knorpel von Patienten mit Osteoarthritis iNOS und COX-2 produziert, kommt es zu einer spontanen Freisetzung von Stickoxid (NO) und Prostaglandin E₂. Endogen produziertes NO kann die Knorpelmatrixsynthese supprimieren und die Apoptose im Chondrozyten induzieren (Lotz, 1999; Lotz et al., 1999). Außerdem haben Prostaglandin E und Produkte des COX-1 und COX-2 Signalweges anabole und katabole Einflüsse auf den Knorpelstoffwechsel (Amin et al., 2000).

Proteinkinasen regulieren die Signaltransduktion von IL-1 und TNF alpha in Chondrozyten. Zu diesen gehören Stress-aktivierte-Proteinkinasen und p38 Mitogen-aktivierte-Proteinkinasen (Goldring et al., 2007).

1.11. Rolle des Chondrozyten in der Osteoarthritis

Biochemische, genetische (Valdes et al., 2006) und mechanische Faktoren können zu Knorpelläsionen führen, indem sie den Knorpelmetabolismus beeinflussen (Goldring und Goldring, 2007).

In der frühen Osteoarthritis zeigen die Chondrozyten eine reaktive Proliferation (klonales Wachstum) und eine gesteigerte Produktion sowohl an der Knorpelmatrix, als auch an katabolen Zytokinen sowie an matrixdegradierenden Enzymen. Katabole Zytokine könnten ebenso von den Fibroblasten- oder Makrophagen-ähnlichen Zellen der Synovialmembran als Reaktion auf die Abbauprodukte des Knorpelabbaus gebildet werden (Fernandes et al., 2002).

Ein lokaler Proteoglykanverlust und der Abbau von Kollagen Typ II entstehen in der frühen Phase der Osteoarthritis. Später liegen ein gesteigerter Wassergehalt und ein Verlust an mechanischer Stabilität vor. Die Beteiligung von chondrozytär produzierten MMPs in der Knorpeldegeneration und beim Abbau der Proteoglykane gilt als bewiesen (Smith, 2006).

MMPs wurden in Regionen des Knorpelabbaus lokalisiert (Hembry et al., 1995) und wiesen in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis erhöhte Werte auf (Tchetverikov et al., 2005). Die Konzentrationen der TIMPs sind ebenfalls in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis erhöht und korrelieren mit den MMP Konzentrationen. Durch lokale Inbalancen, zwischen Proteinase und Inhibitoren zugunsten der Proteinase, kommt es zu einer progressiven Knorpeldegeneration (Dean et al., 1989).

MMPs die zur Kollagenase- und Streptolysin-Familie gehören, spielen im Prozess der Knorpeldegeneration die zentrale Rolle, da sie spezifisch Kollagene und Proteoglykane degradieren. Vor allem MMP-1 ist in den Abbau des Kollagens Typ II eingebunden. Trotz der gesteigerten Typ II Kollagen Expression in der frühen Osteoarthritis (Aigner, 1997) ist die Reparatur der Matrix-

komponenten limitiert, da die normale Knorpelarchitektur durch den gereiften Chondrozyten nicht wiederhergestellt werden kann.

Das Scheitern des Matrixreparaturmechanismus in der Osteoarthritis könnte zum Teil an einem veränderten Genexpressionsmuster der Knorpelmatrix liegen. So ist z. B. Kollagen Typ X ein Marker des hypertrophen Chondrozyten, welcher im normalen Knorpel nicht nachweisbar ist. Diese Faktoren wurden in unterschiedlichen Phasen der Osteoarthritis und in unterschiedlichen Zonen des Knorpels gefunden (Aigner et al., 1997).

1.12. Rolle der Synovialmembran in der Osteoarthritis

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Osteoarthritis eine ausschließlich den Knorpel betreffende Erkrankung ist. Studien der letzten Jahre zeigten jedoch, dass die Synovialmembran in dem arthrotischen Prozess eine wichtige Rolle spielt und diese sehr frühzeitig beginnt. Es gibt eine Reihe von Hinweisen, dass die synoviale Entzündung mit Osteoarthritis typischen Symptomen wie Gelenkschwellung und Ergussbildung im Zusammenhang stehen (Pelletier et al., 2001; Benito et al., 2005). Histologisch zeigt die Synovialmembran eine Hyperplasie mit einer erhöhten Anzahl von Deckzellen und ein gemischtes entzündliches Infiltrat, welches hauptsächlich aus Makrophagen besteht (Farahat et al., 1993).

Die Synovitis in der Osteoarthritis ist sehr wahrscheinlich mit dem Progress der Erkrankung in Verbindung zu bringen. Ein Beweis dafür ist, dass eine Korrelation besteht zwischen biologischen Entzündungsmarkern und einem Knorpelabbauprodukt, dem Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP), sowie dass eine Progression der strukturellen Veränderungen vorliegt (Pelletier et al., 2001).

Die übermäßige Produktion an Zytokinen und Wachstumsfaktoren aus der entzündlichen Synovialmembran könnte eine Rolle in der Pathophysiologie der Osteoarthritis spielen (Bullough, 2003). Die Synovitis in der Osteoarthritis ist eine geringgradige Entzündung, welche von proinflammatorischen Zytokinen induziert und angetrieben wird. TNF alpha und IL-1 nehmen eine Schlüsselrolle bei der synovialen Entzündung und der Aktivierung der Chondrozyten ein

(Zwerina et al., 2007). Diese Zytokine können ihre eigene Produktion und die Produktion von IL-6, IL-8, Proteasen und Prostaglandinen induzieren (Pelletier et al., 2001; Fernandes et al., 2002).

Es ist bis heute relativ unklar, welche Zellen in der Synovialmembran des arthrotischen Prozesses die Hauptrolle spielen. Ausserdem gibt es wenige Daten über die Interaktion zwischen den proinflammatorischen Zytokinen und den Proteasen in der Synovialmembran. In der RA gelten die Makrophagen und deren TNF alpha Produktion als therapeutischer Hauptangriffspunkt. Histologische Studien haben gezeigt, dass die Makrophagen einen aktivierten Phänotyp aufweisen und proinflammatorische Zytokine und vaskuläre Wachstumsfaktoren produzieren (Haywood et al., 2003).

Die synoviale Makrophagendifferenzierung unterscheidet zwischen entzündlicher und nicht-entzündlicher Osteoarthritis, also der aktivierten und der nicht aktivierten Form (Danks et al., 2002). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass diese Makrophagen in der Bildung von Osteophyten und strukturellen Umbauprozessen von besonderer Bedeutung sind (Blom, 2004). Neuere Studien beobachteten in der frühen Osteoarthritis eine erhöhte Anzahl von proinflammatorischen Zytokin produzierenden Zellen in der Synovialmembran (Benito et al., 2005).

1.13. C-reaktives Protein in der Osteoarthritis

Die Osteoarthritis ist definiert als eine nicht entzündliche Gelenkerkrankung. Studien beschreiben jedoch eine geringe systemisch entzündliche Komponente. Ausdruck dieser ist die leichte Erhöhung des C-reaktiven Proteins (CRP) (Hulejová et al., 2007; Spetor et al., 1997; Stürmer et al., 2004).

Das CRP gehört zu den Akute-Phase-Proteinen. Es steigt an, wenn im Körper ein entzündlicher Prozess stattfindet. Außerdem gehören zu den Akute-Phase-Proteinen α 1-Antitrypsin, Serum Amyloid A, Serum Amyloid, Fibrinogen, Acid-Glykoprotein, Haptoglobin, Coeruloplasmin und Ferritin. Aus aktivierten Makrophagen und durch die Degranulation von Mastzellen werden Mediatoren der CRP-Synthese wie Interleukin IL-1, IL-6 und TNF beta freigesetzt (Herrmann et al., 1994).

Die genaue Wirkungsweise von CRP ist bis heute nicht vollständig geklärt. Fujimoto et al. (2003) postulieren eine Beteiligung dieses Proteins bei der Migration von Mastzellen in das entzündete Gewebe. In der Klinik wird das CRP als Marker für eine Vielzahl von Erkrankungen eingesetzt. Als unspezifischer Marker ist es auch ein Indikator für eine Gewebeschädigung, welche durch ein Trauma oder eine Entzündung hervorgerufen wird. Es gibt zunehmend Hinweise, dass eine geringgradige Erhöhung des CRP auch in der Osteoarthritis zu finden ist. Da durch das

CRP Messungen von anderen Faktoren, wie Übergewicht oder Diabetes, beeinflusst werden können, gilt das CRP nicht als exklusiver Marker für die Osteoarthritis.

2. Fragestellung

Biochemische Erklärungsmodelle zur Pathogenese der Osteoarthritis machen ein Ungleichgewicht der kartilaginären Matrixhomöostase zugunsten kataboler Prozesse für den beschleunigten Abbau der extrazellulären Knorpelmatrix verantwortlich. Entscheidend beteiligt an der enzymatischen Degradation der Knorpelmatrix und damit wesentliche katabole Einflussgrößen sind MMP-1 und MMP-3. Auf der anderen Seite wird den proinflammatorischen Zytokinen ein großes Potential zur Induktion kataboler Prozesse im Knorpel zugeschrieben. Dies gilt besonders für IL-1 und TNF alpha. Noch lückenhaft ist das Wissen über die Synthesequellen dieser proinflammatorischen Zytokine und MMPs. Während sich die wissenschaftliche Literatur der letzten Jahre hauptsächlich mit der Erforschung der Rolle von Chondrozyten im arthrotischen Prozess beschäftigte, ist die Rolle der Synovialmembran in diesem Zusammenhang vergleichsweise unklar. Daraus ergibt sich folgende Frage: Ist das Messenger Ribonukleinsäure (mRNA) Genexpressionslevel von MMP-1, MMP-3, IL-1 beta und TNF alpha in der Synovialmembran bei Arthrosepatienten und Patienten nach einem Kniegelenktrauma ähnlich oder zeigen sich signifikante Unterschiede?

Unbestritten ist, dass zahlreiche anabole und katabole Mechanismen, welche für die Gestaltung der Knorpelhomöostase bedeutsam sind, dem regulativen Einfluss von Zytokinen unterliegen. So beeinflussen Zytokine beispielsweise die Produktion matrixdegradierender Proteasen ebenso, wie die Kollagen- und Proteoglykansynthese. Es liegen kaum Veröffentlichungen über die Regulation der MMPs in Synovialfibroblasten durch Zytokine in-vivo vor. Folglich soll geklärt werden, ob eine Assoziation zwischen der Expression der MMPs und IL-1, als auch TNF alpha in Synovialfibroblasten vorliegt, und ob die MMPs als katabole Proteasen in der Arthrosegruppe unterschiedlich zu den Patienten nach Kniegelenktraumen reguliert werden.

Es gibt zwei Pathogenesekonzepte: das biochemische und das biomechanische Pathogenesekonzept. Diese beiden werden zum einen von Patienten mit primärer Osteoarthritis repräsentiert und zum anderen von Patienten mit verschiedenen Kniegelenkverletzungen, welche progredient zur posttraumatischen Osteoarthritis führen. Das Wissen über die molekulare Pathogenese bei der posttraumatischen Osteoarthritis ist noch sehr begrenzt, und über die Rolle der Synovialmembran gibt es kaum Daten.

Daraus ergeben sich folgende Fragen:

- Gibt es Unterschiede in der Expression von Zytokinen und Proteinasen im zeitlichen Verlauf nach dem initialen Kniegelenktrauma?
- Können Zusammenhänge zwischen proinflammatorischen oder enzymatischen Faktoren und dem BMI oder dem CRP hergestellt werden, um eine systemische und metabolische Komponente auszuschließen?

3. Material und Methoden

3.1. Untersuchungsmaterial

Synovialgewebe des Kniegelenkes von Patienten mit Meniskus- und Kreuzbandrissen, sowie Osteoarthrose wurden während einer Arthroskopie oder einer endoprothetischen Versorgung durch die orthopädische Abteilung des Universitätsklinikums Charité Berlin gewonnen. Die Patientendaten wurden den Krankenblättern und den pathologischen Befunden entnommen, wobei die Datenschutzbestimmungen der Stadt Berlin eingehalten worden sind. Für die Durchführung der Studie lag das positive Votum der Ethikkommission der Charité-Universitätsmedizin Berlin vor. Alle Patienten gaben ihr schriftliches Einverständnis, um an dieser Studie teilzunehmen. Außerdem wurden von allen Patienten paraklinische Daten, wie der CRP Wert (über das präoperative Routinelabor) und der Body Mass Index erhoben.

3.2. Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score

Der „Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score“ (KOOS) ist ein krankheitsspezifischer Fragebogen, welcher für Patienten mit Verletzungen des vorderen Kreuzbandes, Meniskus- und Knorpelschäden oder Osteoarthrose konzipiert wurde. Bei der Ausarbeitung des Fragebogens für fünf Patienten wurden relevante, subskale Krankheitssymptome, wie Schmerzen, Aktivitäten des täglichen Lebens, das Sport- und Freizeitverhalten sowie die Beeinflussung der Lebensqualität erarbeitet. Der KOOS-Fragebogen wird als Selbstausfüllfragebogen den Patienten zur Bearbeitung vorgelegt. Die Beantwortung jeder Frage erfolgt abgestuft anhand von fünf vorgegebenen Antwortmöglichkeiten, denen ein Zahlenwert von 0-4 zugeordnet ist. Die Berechnung des jeweiligen Subscorewertes erfolgt durch das Aufaddieren der angekreuzten Werte der betreffenden Subskala. Diese Zahlenwerte werden im Anschluss in einen Skalenwert zwischen 0 und 100 umgerechnet. Ein Skalenwert von 0 bedeutet extreme Knieprobleme, ein Zahlenwert von 100 steht für beschwerdefreie Kniegelenke. Die Bildung eines Gesamtsummenwertes unterbleibt, da von einem solchen wenig Aussagekraft erwartet wird.

3.3. Western Ontario and Mac Master Universities Osteoarthritis Index (WOMAC)

Dieser Fragebogen wurde zur Selbsteinschätzung von Patienten mit Kniegelenkosteoarthritis entwickelt. Der Fragebogen beinhaltet drei Bereiche:

1. Schmerz (5 Fragen)
2. Beweglichkeit (2 Fragen)
3. Schwierigkeiten beim Verrichten von Alltagstätigkeiten (Funktion; 17 Fragen)

3.4. Klassifikation von Knorpelschäden

Für die Klassifikation des Knorpelschadens der Gelenkknorpelverletzungen im arthroskopischen Erscheinungsbild wurde die Klassifikation von Noyes für die Analyse von Gelenkknorpeloberflächen verwendet (Noyes et al., 1989). Diese basiert auf vier separaten und klar erkennbaren Variablen:

1. der Beschreibung der Gelenkoberfläche
2. der Ausdehnung der beteiligten Fläche und der Tiefe der Läsion
3. dem Durchmesser der Läsion
4. die Lokalisation der Läsion

Die Punkteskala erleichtert die Erfassung und die statistische Auswertung der Daten (Noyes et al., 1989). Das Outerbridge-Klassifikationssystem wurde entwickelt, um die Chondromalazie der Patella zu beurteilen und es wird auch zur Klassifizierung von Gelenkknorpelverletzungen anderer Kniegelenkkompartimente benutzt. Dieses System teilt Knorpeldefekte vorwiegend aufgrund ihrer Tiefe ein (Tabelle 2).

Tabelle 2 Outerbridge-Klassifikation (aus Bobic, 1999).

Grad	Beschreibung
Grad 0	Normaler Gelenkknorpel
Grad I	Leichte Knorpelerweichung und –verdickung
Grad II	Frühe Risse, welche den subchondralen Knochen nicht erreichen und kleiner als 50 % der Knorpeldicke sind
Grad III	Die Risse reichen bis zum subchondralen Knochen, der nicht freigelegt ist und einen Durchmesser über 50 % der Knorpeldicke aufweist
Grad IV	Der subchondrale Knochen wird sichtbar (Knochenglatze)

3.5. Verbrauchsmaterialien

Pipet-Lite 2 µl	Rainin, Giessen / Deutschland
Pipet-Lite 2-10 µl	Rainin, Giessen / Deutschland
Pipet-Lite 10-100 µl	Rainin, Giessen / Deutschland
Pipet-Lite 20-200 µl	Rainin, Giessen / Deutschland
Pipet-Lite 100-1000 µl	Rainin, Giessen / Deutschland
Greenpak LTS 20UL Filter tip	Rainin, Giessen / Deutschland
Greenpak LTS 200UL Filter tip	Rainin, Giessen / Deutschland
Greenpak LTS 1000UL Filter tip	Rainin, Giessen / Deutschland
1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg / Deutschland
iCycler iQ	Bio Rad, Hercules / USA
Easy Freezer	Biozym, Oldendorf / Deutschland
Vortex-Genie 2	Merck, Darmstadt / Deutschland
iCycler iQ PCR Plates	Bio Rad, Hercules / USA
iCycler iQ Optical Quality Sealing Tape	Bio Rad, Hercules / USA
Tube Rack	Merck, Darmstadt / Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg / Deutschland
Jouan GR 412 Zentrifuge	Jouan GmbH, Hessen / Deutschland
Tisch-Zentrifuge	Eppendorf/Qualitron, Hamburg / Deutschland
Tube Rack	Merck, Darmstadt / Deutschland
iCycler iQ PCR Plates	Bio Rad, Hercules / USA

iCycler iQ Optical Quality Sealing Tape	Bio Rad, Hercules / USA
Computer	Max Data, Marl / Deutschland
iCycler	Bio Rad, Hercules / USA
Micro Amp Caps	Applied Biosystems, Foster City / USA
Micro Amp Tubes	Applied Biosystems, Foster City / USA
GeneQuant II RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotech, Freiburg / Deutschland
Ultra Turrax®T25 Basic	IKA® Werke GmbH & CoKG, Staufen / Deutschland

3.6. Chemikalien, Puffer und Lösungen

β-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt / Deutschland
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden / Deutschland
iScript c-DNA Synthesis Kit	Bio Rad, Hercules / USA
20× TaqMan Gene Expressions Assays on demand	Applied Biosystems, Foster City / USA
TaqMan Universal PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City / USA
No Amperase UNG (2×)	Applied Biosystems, Foster City / USA
Ultra Pure DNase/RNase Free Distilled Water	Invitrogen Corporation, Carlsbad / USA
Ultra Turrax®T25 Basic	IKA® Werke GmbH & CoKG, Staufen / Deutschland

Tabelle 3 Primer. Diese Tabelle zeigt die verwendeten Primer für die nachzuweisenden Gene und deren Hersteller.

Gen	Primer	Hersteller
GAPDH	Hs99999905_m1	Applied Biosystems
MMP3	Hs00233962_m1	Applied Biosystems
MMP1	Hs00233958_m1	Applied Biosystems
TNF-ALPHA	Hs00174128_m1	Applied Biosystems
IL1B	Hs00174097_m1	Applied Biosystems

3.7. RNA-Isolierung

Die Gesamt-RNA wurde aus dem Synovialgewebe (2-3 mg) mittels eines RNeasy Micro Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Zunächst wurde das Gewebe in 15 ml RLT-Puffer + β -Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland) bei 10000 rpm für 60 sek mit Hilfe eines Ultra Turrax®T25 Basic (IKA® Werke GmbH & CoKG, Staufen / Deutschland) lysiert. Anschließend wurde das Gewebe 10 min mit 10000 rpm bei 23°C zentrifugiert (Jouan GR 412 Zentrifuge, Jouan GmbH, Hessen / Deutschland). Der Überstand wurde in ein 50 ml Sammelröhrchen überführt, mit 15 ml 70 % -igen Ethanol versetzt und vorsichtig gemischt. Danach wurde die Probe auf eine Filtersäule aufgetragen, wodurch die Desoxyribonukleinsäure (DNA), die Nukleasen, die Proteine, die Ribonukleinsäure (RNA) und die Salze sich an eine Silica-Gel-Membran binden und 5 min zentrifugiert (10000 rpm, 21°C) werden. Der Durchlauf wurde verworfen und es erfolgte nun das Waschen (5 min, 10000 rpm, 21°C) durch Zugabe des RW 1-Puffers (15 ml). Die Filtersäule wurde in ein neues Kollektionsröhrchen überführt und dann zweimal mit je 1,5 ml RPE-Puffer gewaschen (5 min, 10000 rpm, 21°C). Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 10000 rpm, 21°C) wurde die Säule in ein neues Sammelröhrchen gesetzt und mit 14 μ l Ribonukleasen (RNase) freiem destilliertem Wasser 1 min inkubiert. Die RNA wurde mittels dreiminütiger Zentrifugation (10000 rpm, 21°C) eluiert. Für die Konzentrationsbestimmung wurde die RNA-Menge bei einer Wellenlänge von 260 nm photometrisch bestimmt (GeneQuant II RNA/DNA Calculator, Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland). Zusätzlich wird das Verhältnis der Absorptionswerte bei 260 nm und 280 nm (Radio) erhoben. Es erlaubt eine Aussage über mögliche Verunreinigungen der RNA-Probe. Der Reinheitsgrad sollte zwischen 1,5 und 1,8 liegen. Die RNA wurde bei -80°C aufbewahrt.

3.8. Reverse Transkription

Mittels iScript cDNA- Synthesis Kit (BioRad) wurde cDNA aus der zuvor gewonnenen mRNA, nach dem Protokoll des Herstellers umgeschrieben. Das Reaktionsvolumen betrug 20 μ l. Es wurde 0,35 μ g mRNA eingesetzt und mit 14 μ l Nuklease freiem Wasser in ein Micro Amp Reaction Tube versetzt. Dann wurden 4 μ l 5 \times iScript Reaction Mix, der eine Mischung aus dNTP Oligonukleotiden und random hexamer Primern enthält, in das Tube pipettiert. Zum Schluss wurde 1 μ l Reverse Transkriptase hinzugegeben, um die Reaktion zu starten. Das Tube wurde dann gevortext (Vortex-Genie 2), um die Komponenten zu mischen und danach abzuzentrifugieren (Tischzentrifuge, Qualitron). Anschließend wurde das Tube in den iCycler (BIO-RAD) gestellt und bei 25°C inkubiert. Daraufhin folgte eine 30 minütige Phase bei 42°C,

in der einzelne RNA-Abschnitte in cDNA umgeschrieben wurden. Dann wurde die Reaktion bei 85°C für 5 Minuten durch die Denaturierung des Enzyms abgestoppt. Danach wurde das Tube wiederholt gevortext (Vortex-Genie 2) und der Inhalt in ein Eppendorfgefäß abzentrifugiert (Tisch-Zentrifuge, Eppendorf/Qualitron Inc.).

3.9. Polymerase Kettenreaktion

Die Durchführung der quantitativen Realtime-Polymerase Kettenreaktion (RT PCR) fand in einem i-Cycler PCR System (BioRad) unter Verwendung von Taqman Gene Expression Assays (Applied Biosystems) statt.

Für die Dreifachbestimmung wurden 24 µl DNase/RNase freies destilliertes Wasser (Invitrogen) in die iCycler PCR Platten (Bio Rad) pipettiert. Daraufhin wurden 3 µl cDNA und 30 µl 20 × TaqMan Gene Expressions Assays (Applied Biosystems) sowie 30 µl TaqMan Gene Universal PCR Master Mix, No Amperase UNG (2 ×, Applied Biosystems) in die iCycler PCR Platten (Bio Rad) pipettiert. Danach wurden die iCycler iQ PCR Platten mit dem iCycler iQ Quality Sealing Tape zugeklebt, die Proben in das Gerät gestellt und das folgende Programm gestartet. Die Zyklenzahl betrug 40 bei folgender Einstellung: 95°C für 15 Sekunden zur Denaturierung und 60°C für 1 Minute zur Annulierung. Zuvor wurden zur Taq Aktivierung die Proben für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Folgende Oligonukleotide wurden für die Quantifizierung verwendet: GAPDH (Hs99999905_m1), IL-1 beta (Hs00174097_m1), TNF alpha (Hs00174128_m1), MMP-1 (Hs00233958_m1) und MMP-3 (Hs00233962_m1). Die relative Quantifizierung der Markergenexpression ist aus dem prozentualen Anteil des Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) Produktes gegeben. Das relative Expressionslevel der GAPDH wurde benutzt, um die Genexpression in der jeweiligen Probe zu normalisieren.

3.10. Statistik

Der nichtparametrische Mann-Whitney-U-Test wurde angewandt, um unabhängige Gruppen miteinander vergleichen zu können.

Die Rangkorrelations-Koeffizienten nach Spearman wurden verwendet, um Korrelationen zwischen unterschiedlichen Merkmalen und der Expression von Zytokinen und Proteasen zu berechnen.

In dieser Arbeit wurde das Signifikanzniveau mit $p < 0,05$ angesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. Charakterisierung der Patientengruppen

4.1.1. Allgemeine Charakterisierung

Die in diese Untersuchung einbezogenen 25 Patienten wurden zwischen 2005 und 2006 in der Klinik für Muskuloskeletale Chirurgie, Charite Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte, operiert.

4.1.2. Alters- und Geschlechtsverteilung

Zur Bestimmung des Alters der Patienten wurden die zum Zeitpunkt der Operation des Kniegelenks vollendeten Lebensjahre herangezogen. Es wurden zwei Patientengruppen gebildet. Die Patientengruppe mit primärer Gonarthrose bestand aus 5 Männern (41,7 %) und 7 Frauen (58,3 %), deren Alter zwischen 49 und 85 Jahren (Mittelwert = 69,6 Jahre, Standardabweichung (SD) = 11,1 Jahre) lag. Die Patientengruppe mit Kniegelenkverletzungen bestand aus 7 Männern (53,8 %) und 6 Frauen (46,2 %), deren Alter zwischen 16 und 67 Jahren (Mittelwert = 36,3 Jahre, SD = 17,3 Jahre) lag.

4.2. Bestimmung der relativen mRNA-Genexpressionslevel von IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3

Um herauszufinden, ob bei Patienten mit primärer Gonarthrose und Kniegelenkverletzungen eine veränderte Genexpression von IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 vorliegt, wurden die relativen mRNA-Genexpressionslevel in den Synovialmembranen (s.o.) von Patienten mit klinisch manifester Gonarthrose und mit anderen Kniegelenkverletzungen bestimmt.

4.2.1. Expression von IL-1 beta und TNF alpha in der Synovialmembran

Die Bestimmung der relativen IL-1 beta und TNF alpha mRNA-Genexpressionslevel wurden mit Hilfe eines TaqMan Gene Expression Assays durchgeführt. Es sind 12 Synovialmembranen von Patienten mit Gonarthrose und 13 Synovialmembranen von Patienten mit Kniegelenkverletzungen untersucht worden.

Das mittlere IL-1 beta mRNA-Genexpressionslevel lag bei Patienten mit Osteoarthritis bei 1,3 (SD = 1,7, von 0,07 bis 5,6) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 14,7 (SD = 51,1, von 0,01 bis 184,8 (Abbildung 1)).

IL - 1 beta mRNA Genexpressionslevel*

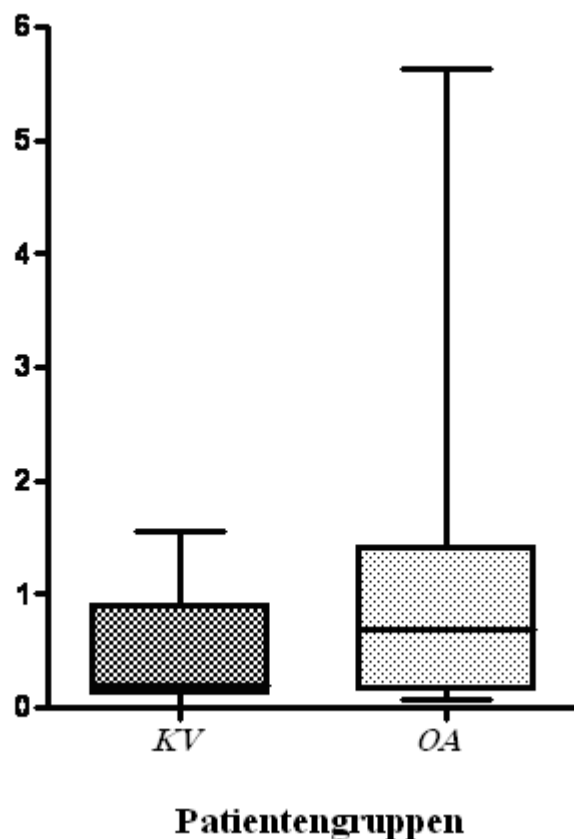


Abbildung 1: Relative mRNA-Expression von IL-1 beta (*) normalisiert mit GAPDH.

Die Boxplot zeigen den Median als horizontalen Balken, das obere und untere Quartil der Synovialmembranen der Patienten mit Gonarthrose (OA) und Kniegelenkverletzungen (KV). Für die graphische Darstellung wurde ein Ausreißer herausgenommen.

Der in Abbildung 1 dargestellte Median des relativen IL-1 beta mRNA-Genexpressionslevel lag bei Patienten mit Osteoarthritis bei 0,2 und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 0,2.

Das relative IL-1 beta mRNA-Genexpressionslevel von Patienten mit Osteoarthritis war statistisch nicht signifikant erhöht gegenüber den Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

Das mittlere TNF alpha mRNA-Genexpressionslevel lag bei Patienten mit Osteoarthritis bei 0,2 (SD = 0,17, von 0,01 bis 0,68) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 0,32 (SD = 0,3, von 0,05 bis 1,1).

TNF alpha mRNA Genexpressionslevel*

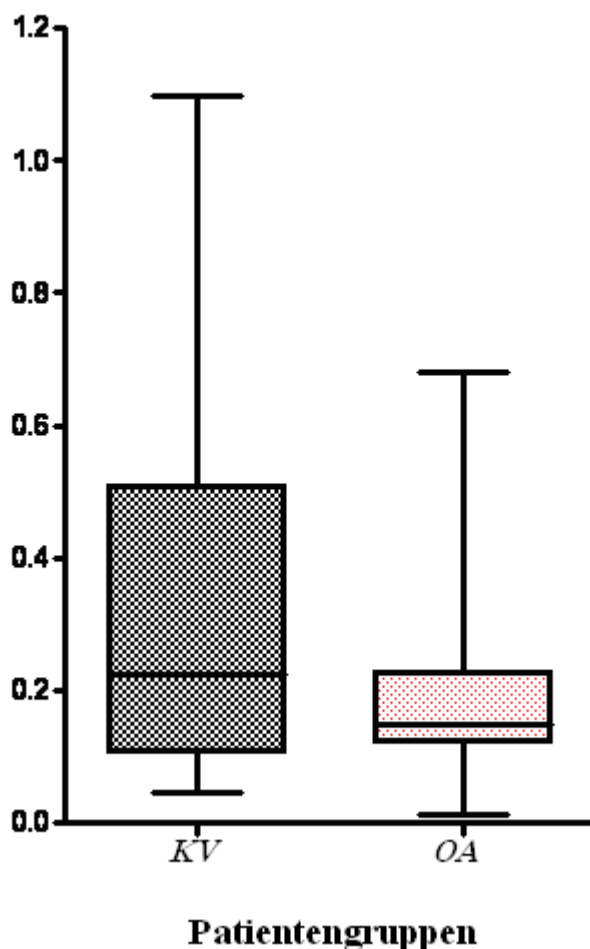


Abbildung 2: Relative mRNA-Expression von TNF alpha (*) normalisiert mit GAPDH.

Die Boxplot zeigen den Median als horizontalen Balken, das obere und untere Quartil der Synovialmembran bei den beiden Subgruppen: Patienten mit Gonarthrose (OA) und Patienten mit Kniegelenkverletzungen (KV).

Der in Abbildung 2 dargestellte Median des relativen TNF alpha mRNA-Genexpressionslevel lag bei Patienten mit Osteoarthritis bei 0,22 und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 0,2. Das relative TNF alpha mRNA-Genexpressionslevel der Osteoarthritis war statistisch nicht signifikant erhöht gegenüber den Kniegelenkverletzungen.

4.2.2. Expression von MMP-1 und MMP-3 in der Synovialmembran

Das mittlere MMP-1 alpha mRNA-Genexpressionslevel lag bei Patienten mit Osteoarthritis bei 22,2 (SD = 22,9, von 0,6 bis 69,3) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 36,4 (SD = 37,3, von 0,38 bis 117,01).

MMP - 1 mRNA Genexpressionslevel*

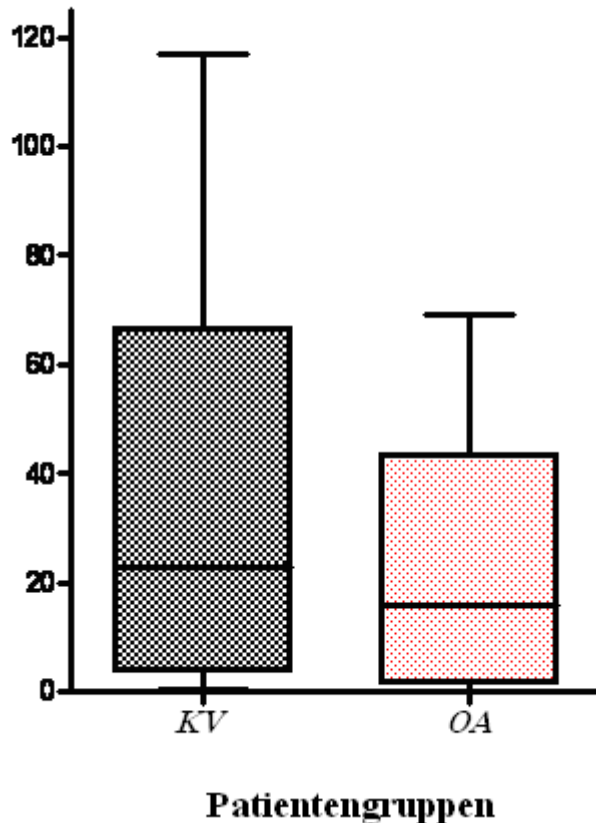


Abbildung 3: Relative mRNA-Expression von MMP-1 (*) normalisiert mit GAPDH.

Die Boxplot zeigen den Median als horizontalen Balken, das obere und untere Quartil der Synovialmembranen bei den beiden Subgruppen: Patienten mit Gonarthrose (OA) und Patienten mit Kniegelenkverletzungen (KV).

Der in Abbildung 3 dargestellte Median des relativen MMP-1 mRNA-Genexpressionslevel lag bei Patienten mit Osteoarthritis bei 15,95 und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 22,9. Das relative MMP-1 mRNA-Genexpressionslevel von Patienten mit Osteoarthritis war statistisch nicht signifikant erhöht gegenüber den Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

Das mittlere MMP-3 mRNA-Genexpressionslevel lag bei Patienten mit Osteoarthritis bei 261,4 (SD = 447,1, von 0,7 bis 1256,9) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 423,3 (SD = 451,7, von 2,6 bis 1249,7).

MMP - 3 mRNA Genexpressionslevel*

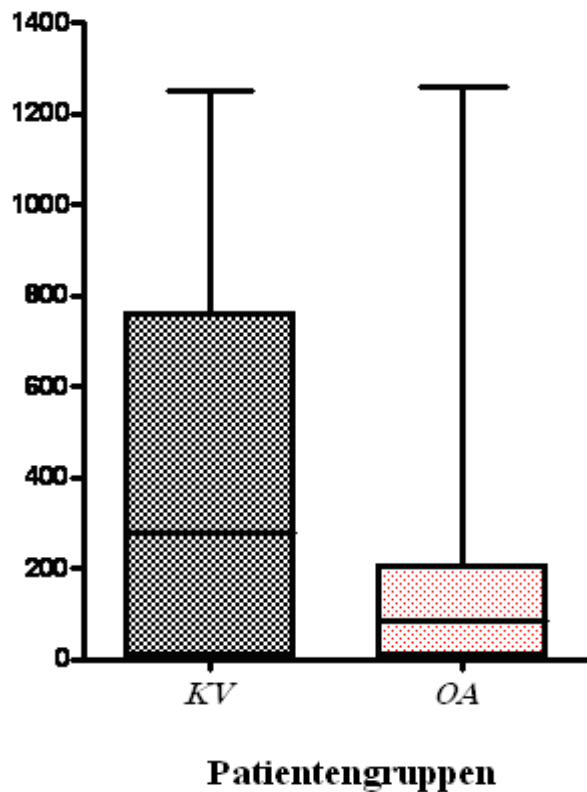


Abbildung 4: Relative mRNA-Expression von MMP-3 (*) normalisiert mit GAPDH.

Die Boxplot zeigen den Median als horizontalen Balken, das obere und untere Quartil der Synovialmembranen bei den beiden Subgruppen: Patienten mit Gonarthrose (OA) und Patienten mit Kniegelenkverletzungen (KV).

Der in Abbildung 4 dargestellte Median des relativen MMP-3 mRNA-Genexpressionslevel lag bei Patienten mit Osteoarthritis bei 83,4 und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 275,5.

Das relative MMP-3 mRNA-Genexpressionslevel von Patienten mit Osteoarthritis war statistisch nicht signifikant erhöht gegenüber den Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

4.3. Korrelation zwischen IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 in der Synovialmembran

Um weitere Anhaltspunkte für mögliche Wechselwirkungen der proinflammatorischen Zytokine untereinander und der MMPs in beiden Patientengruppen zu finden, wurde die Korrelation der relativen mRNA-Genexpressionslevel mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman untersucht (Tabelle 3 und 4).

4.3.1. Korrelation zwischen IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP3 in der Synovialmembran von Patienten mit Kniegelenkverletzungen

Die Korrelationsanalyse von MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,92 mit einer Signifikanz von p (zweiseitig) $< 0,01$. Zusätzlich wurde die Korrelation des MMP-1 mit IL-1 beta und TNF alpha überprüft. Hier konnte jedoch keine Signifikanz festgestellt werden. Auch MMP-3 zeigte mit TNF alpha und IL-1 beta keine signifikante Korrelation (Tabelle 4).

Tabelle 4 Korrelationskoeffizienten der Matrix Metalloproteinasen und der proinflammatorischen Zytokine bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

		MMP-1	TNF alpha	IL-1 beta
MMP-3	Korrelationskoeffizient	0,92**	-0,23	0,25
	p (zweiseitig)	0,0001	0,6	0,5
	N	13	13	13
MMP-1	Korrelationskoeffizient		-0,31	0,21
	p (zweiseitig)		0,4	0,6
	N		13	13
TNF alpha	Korrelationskoeffizient			0,03
	p (zweiseitig)			0,9
	N			13

* Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,05$ signifikant

** Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,01$ signifikant

4.3.2. Korrelation zwischen IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 in der Synovialmembran von Patienten mit Osteoarthritis

Die Korrelationsanalyse von MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Osteoarthrose ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,91 mit einer Signifikanz von p (zweiseitig) $< 0,01$. Zusätzlich wurde die Korrelation des MMP-1 und TNF alpha überprüft. Hier konnte eine Signifikanz mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,8 bei einer Signifikanz von p (zweiseitig) $< 0,05$ festgestellt werden. Auch bei TNF alpha und MMP-3 zeigte sich eine signifikante Korrelation mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,73 bei einer Signifikanz von p (zweiseitig) $< 0,05$.

Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen TNF alpha und IL-1 beta, sowie IL-1 beta mit MMP-1, als auch MMP-3 überprüft. Hier konnte jedoch keine statistische Signifikanz festgestellt werden (Tabelle 5).

Tabelle 5 Korrelationskoeffizienten der Matrix Metalloproteinasen und der proinflammatorischen Zytokine bei Patienten mit primärer Gonarthrose.

		MMP-1	TNF alpha	IL-1 beta
MMP-3	Korrelationskoeffizient	0,91**	0,73*	-0,13
	p (zweiseitig)	0,0001	0,03	0,6
	N	12	12	12
MMP-1	Korrelationskoeffizient		0,8*	-0,08
	p (zweiseitig)		0,02	0,9
	N		12	12
TNF alpha	Korrelationskoeffizient			0,5
	p (zweiseitig)			0,21
	N			12

* Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,05$ signifikant

** Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,01$ signifikant

4.4. Korrelation zwischen IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 mit der Krankheitsdauer und der Chondromalazie von Patienten mit Kniegelenkverletzungen

Um festzustellen, ob Zusammenhänge zwischen den relativen Expressionslevel von IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 in Bezug auf die Krankheitsdauer und der Chondromalazie zu beobachten sind, wurde deren Korrelation mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman untersucht (Tabelle 6 und 7).

4.4.1. Korrelation zwischen der Krankheitsdauer nach der initialen Kniegelenkverletzung und IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP3 von Patienten mit Kniegelenkverletzungen

Die Korrelationsanalyse von TNF alpha und der Krankheitsdauer bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,78 mit einer Signifikanz von p (zweiseitig) < 0,01. Zusätzlich wurde die Korrelation des IL-1 beta, MMP-1 und MMP-3 und der Krankheitsdauer überprüft. Hier konnte jedoch keine Signifikanz festgestellt werden (Tabelle 6).

Tabelle 6 Korrelationskoeffizienten der Zeit nach der Knieverletzung Zeit versus IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

		MMP-3	MMP-1	TNF alpha	IL-1 beta
Zeit nach der Verletzung	Korrelationskoeffizient	-0,14	-0,17	0,78**	-0,31
	p (zweiseitig)	0,7	0,7	0,003	0,7
	N	13	13	13	13

* Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) < 0,05 signifikant

** Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) < 0,01 signifikant

4.4.2. Korrelation zwischen der Chondromalazie und IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 von Patienten mit Kniegelenkverletzungen

Die Korrelationsanalyse von TNF alpha und der Chondromalazie nach Outerbridge ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,81 mit einer Signifikanz von p (zweiseitig) < 0,01. Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen IL-1 beta, MMP-1, MMP-3 und der Chondromalazie überprüft. Hier konnte jedoch keine Signifikanz festgestellt werden (Tabelle 7).

Tabelle 7 Korrelationskoeffizienten der Chondromalazie versus IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

		MMP-3	MMP-1	TNF alpha	IL-1 beta
Chondromalazie	Korrelationskoeffizient	0,03	-0,04	0,81**	-0,002
	p (zweiseitig)	0,9	0,9	0,001	0,9
	N	13	13	13	13

* Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) < 0,05 signifikant

** Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) < 0,01 signifikant

4.5. Vergleich der CRP-Serum-Konzentrationen zwischen Patienten mit primärer Osteoarthritis und Kniegelenkverletzungen

Um Unterschiede zwischen den CRP Serumkonzentrationen bei den Patientengruppen zu zeigen, wurde der Mann-Whitney-U-Test angewendet. Patienten mit einer Osteoarthritis zeigten eine CRP-Serumkonzentration von 0,08 bis 0,98 (Mittelwert = 0,36, SD = 0,3). Patienten nach einer Kniegelenkverletzung zeigten eine CRP Serumkonzentration von 0,02 bis 0,4 (Mittelwert = 0,12, SD = 0,12).

Der in Abbildung 5 dargestellte Median des Serum CRP lag bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 0,09 und bei Patienten mit Osteoarthritis bei 0,19.

Die CRP Werte in der Patientengruppe mit Osteoarthritis waren signifikant (p (zweiseitig) = 0,04) gegenüber der Patientengruppe mit Kniegelenkverletzungen erhöht.

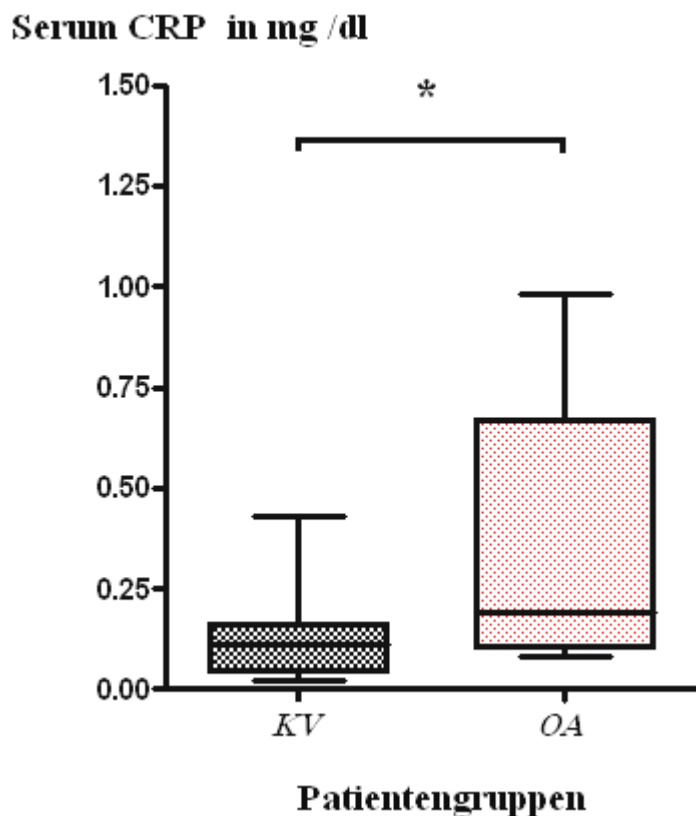


Abbildung 5: Serumkonzentration des CRP.

Die Boxplot zeigen den Median, das obere und untere Quartil und bei den beiden Subgruppen: Patienten mit Gonarthrose (OA) und Patienten mit Kniegelenkverletzungen (KV). Dabei zeigt sich eine Signifikanz von $p < 0,05$ (*).

4.6. Korrelation des CRP mit den IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3

Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Serum CRP und den proinflammatorischen Zytokinen sowie MMP-1 und MMP-3 besteht, wurde die Korrelation zwischen den relativen mRNA Genexpressionslevel der Zytokine, der MMPs, und dem CRP mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman untersucht (Tabelle 8 und 9).

4.6.1. Korrelation des CRP mit den IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen

Die Korrelationsanalyse des Serum CRP mit IL-1 beta und TNF alpha bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen ergab keine statistische Signifikanz. Zusätzlich wurde die Korrelation des Serum CRP mit MMP-1 und MMP-3 überprüft. Hier konnte ebenfalls keine Signifikanz festgestellt werden (Tabelle 8).

Tabelle 8 Korrelationskoeffizienten des Serum CRP bei Kniegelenkverletzungen CRP versus IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1, MMP-3 und Leukozyten bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

		IL-1 beta	TNF alpha	MMP-1	MMP-3
Serum CRP	Korrelationskoeffizient	0,61	0,55	-0,31	-0,35
	p (zweiseitig)	0,08	0,08	0,5	0,4
	N	11	11	11	11

* Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,05$ signifikant

** Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,01$ signifikant

4.6.2. Korrelation des CRP mit den IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Osteoarthritis

Die Korrelationsanalyse zwischen dem Serum CRP und dem MMP-1 bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,71 mit einer Signifikanz von p (zweiseitig) $< 0,05$. Zusätzlich wurde die Korrelation zwischen MMP-3 und dem Serum CRP überprüft. Auch hier konnte eine statistische Signifikanz mit einem Korrelationskoeffizienten von 0,81 und einer Signifikanz von p (zweiseitig) $< 0,01$ festgestellt werden. Das Serum CRP zeigte mit TNF alpha und IL-1 beta keine signifikante Korrelation (Tabelle 9).

Tabelle 9 Korrelationskoeffizienten des Serum CRP bei Gonarthrose CRP versus IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1, MMP-3 und Leukozyten bei Patienten mit primärer Gonarthrose.

		IL-1 beta	TNF alpha	MMP-1	MMP-3
Serum CRP	Korrelationskoeffizient	-0,29	0,54	0,71*	0,81**
	p (zweiseitig)	0,4	0,1	0,05	0,003
	N	11	11	11	11

* Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,05$ signifikant

** Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,01$ signifikant

4.7. Korrelation zwischen dem BMI und IL-1 beta, TNF alpha, MMP1 und MMP-3

Um festzustellen, ob ein Zusammenhang zwischen dem BMI und IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1, MMP-3 besteht, wurde die Korrelation mit Hilfe des Rangkorrelationskoeffizienten nach Spearman untersucht (siehe Tabelle 10 und 11).

4.7.1. Korrelation zwischen dem BMI und IL-1 beta, TNF alpha MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Osteoarthritis

Die Korrelationsanalyse zwischen dem BMI und dem IL-1 beta, ergab einen Korrelationskoeffizienten von 0,67 bei einer Signifikanz von $p < 0,05$. Außerdem wurde die Korrelation zwischen dem BMI und TNF alpha und MMP-1 und MMP-3. Hier zeigte sich jedoch keine signifikante Korrelation.

Tabelle 10 Korrelationskoeffizienten des BMI versus IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit primärer Gonarthrose.

		IL-1 beta	TNF alpha	MMP-1	MMP-3
BMI	Korrelationskoeffizient	0,67*	-0,09	0,2	0,31
	p (zweiseitig)	0,02	0,9	0,6	0,3
	N	12	12	12	12

* Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,05$ signifikant

** Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,01$ signifikant

4.7.2. Korrelation zwischen dem BMI und IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1 und MMP-3 bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen

Die Korrelationsanalyse zwischen IL-1 beta und dem BMI ergab keine statistisch signifikante Korrelation. Auch zwischen dem BMI und TNF alpha, MMP-1 sowie MMP-3 zeigte sich keine signifikante Korrelation (Tabelle 11).

Tabelle 11 Korrelationskoeffizienten des BMI versus IL-1 beta, TNF alpha, MMP-1, MMP-3 und Leukozyten bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

		IL-1 beta	TNF alpha	MMP-1	MMP-3
BMI	Korrelationskoeffizient	0,21	-0,22	-0,51	-0,41
	p (zweiseitig)	0,5	0,6	0,2	0,4
	N	13	13	13	13

* Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,05$ signifikant

** Korrelation ist auf dem Niveau von p (zweiseitig) $< 0,01$ signifikant

4.8. Verlauf der MMP-1 und MMP-3 Expression über die Krankheitsdauer bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen

Um den Verlauf der MMPs über die Krankheitsdauer in Monaten zu zeigen, wurden die relativen MMP-1 und MMP-3 Genexpressionslevel 5 Zeitfenstern zugeordnet. Dabei wurden folgende Zeitintervalle gewählt: 4 bis 9 Monaten (n = 3), 9 bis 12 Monaten (n = 3), 12 bis 32 Monaten (n = 3), 32 bis 52 Monaten (n = 3) und 52 bis 80 Monaten (n = 1).

4.8.1. Verlauf der MMP-3 Expression über die Krankheitsdauer bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen

Der Mittelwert des relativen MMP-3 mRNA Genexpressionslevel steigt vom ersten Zeitintervall (Mittelwert = 222,8, SD der Mittelwerte = 81,1) zum zweiten Zeitintervall (Mittelwert = 731,8, SD der Mittelwerte = 373,1) an. Danach ist ein Abfall der Mittelwerte über das dritte Zeitintervall (Mittelwert = 485,5, SD der Mittelwerte = 363,1) bis zum vierten Zeitintervall (Mittelwert = 219,9, SD der Mittelwerte = 110,6) zu beobachten. Danach kommt es zwischen dem vierten und fünften Zeitintervall (523,1) zu einem Anstieg.

MMP - 3 mRNA Genexpressionslevel*

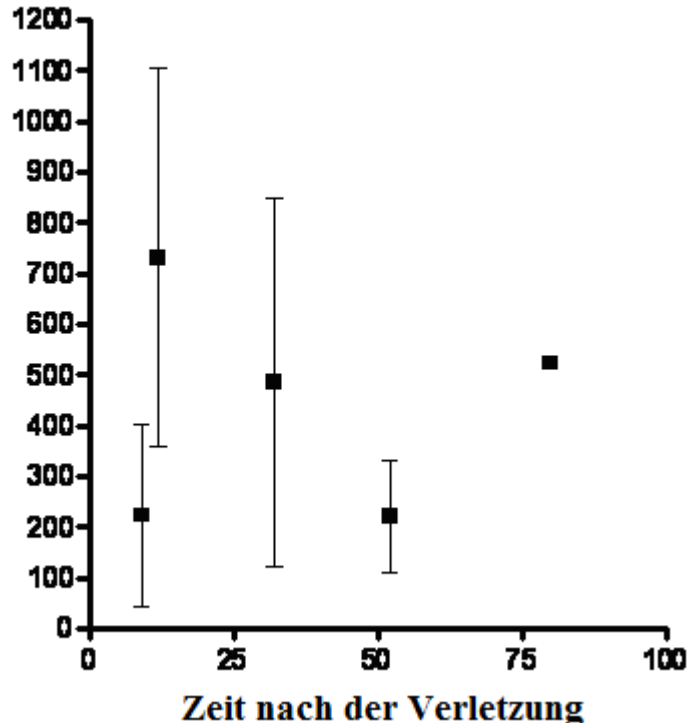


Abbildung 6: Verlauf der MMP-3 Genexpression in der Synovialis (*) normalisiert mit GAPDH.

Abgebildet ist der Median mit dem Standardfehler der Mittelwerte. Die gesamte Gruppe ist in Zeitfenster, basierend auf der Zeit nach der Verletzung in Monaten, eingeteilt: 4 bis 9 Monate (n = 3), 9 bis 12 Monate (n = 3), 12 bis 32 Monate (n = 3), 32 bis 52 Monate (n = 3), 52 bis 80 Monate (n = 1).

4.8.2. Verlauf von MMP-1 über die Krankheitsdauer bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen

Der Mittelwert des relativen MMP-1 mRNA Genexpressionslevel steigt vom ersten Zeitintervall (Mittelwert = 26,8, SD der Mittelwerte = 21,8) zum zweiten Zeitintervall (Mittelwert = 54,9, SD der Mittelwerte = 33,6) an. Danach ist ein Abfall der Mittelwerte über das dritte Zeitintervall (Mittelwert = 41,4, SD der Mittelwerte = 23,1) und vierte Zeitintervall (Mittelwert = 26,7, SD der Mittelwerte = 18,4) bis zum fünften Zeitintervall (Mittelwert = 22,9) zu beobachten (Abbildung 7).

MMP-1 mRNA Genexpressionslevel*

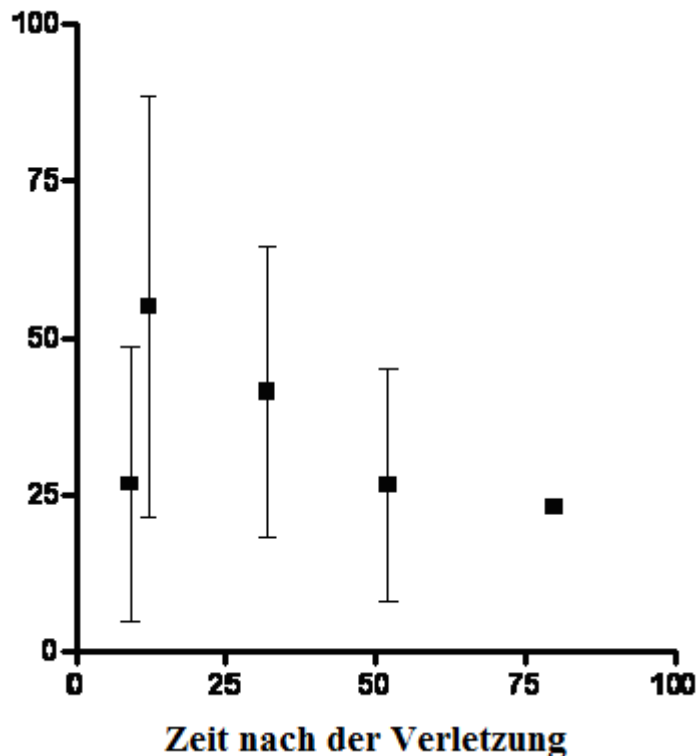


Abbildung 7: Verlauf von MMP-1 Genexpression in der Synovialis (*) normalisiert mit GAPDH.

Abgebildet ist der Median mit dem Standardfehler der Mittelwerte Die gesamte Gruppe ist in Zeitfenster, basierend auf der Zeit nach der Verletzung in Monaten, eingeteilt: 4 bis 9 Monate (n = 3), 9 bis 12 Monate (n = 3), 12 bis 32 Monate (n = 3), 32 bis 52 Monate (n = 3), 52 bis 80 Monate (n = 1).

4.9. Vergleich KOOS zwischen Patienten mit primärer Osteoarthritis und Kniegelenkverletzungen

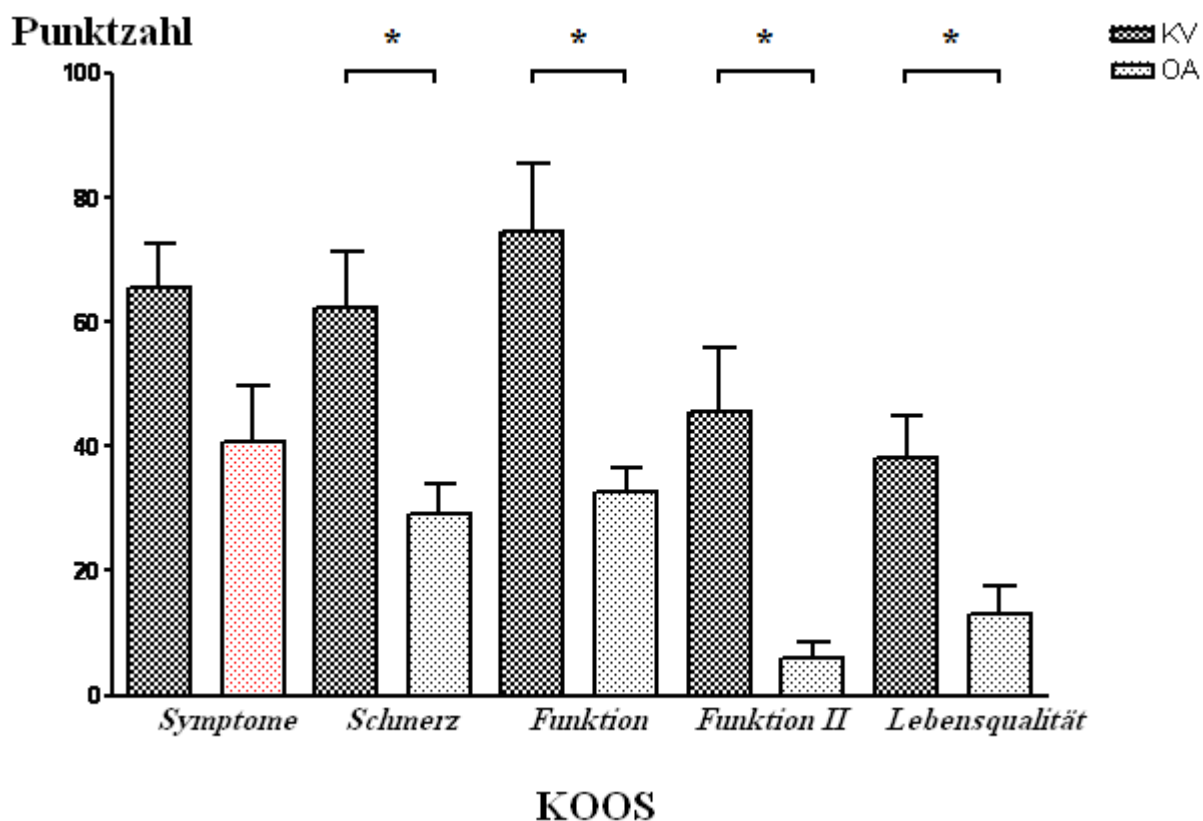


Abbildung 8: KOOS Quantifizierung der Symptome, Schmerz, Funktion (I/II) und der Lebensqualität im KOOS Score.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen bei Patienten mit Gonarthrose (OA) und Patienten mit Kniegelenkverletzungen (KV). Dabei zeigt sich eine Signifikanz von $p < 0,05$ (*).

Der in Abbildung 8 dargestellte Mittelwert der Symptome beim KOOS lag bei Patienten mit Osteoarthritis bei 40,8 (SD = 28,7 von 0 bis 90) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 65,4 (SD = 22,8 von 25 bis 92,9).

Die Punktzahl der Symptome beim KOOS der Osteoarthritis war statistisch nicht signifikant ($p = 0,08$) erhöht gegenüber den Kniegelenkverletzungen.

Der in Abbildung 8 dargestellte Mittelwert der Schmerzen beim KOOS lag bei Patienten mit Osteoarthritis bei 29,2 (SD = 15,2 von 8,3 bis 52,8) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 62,2 (SD = 28,9 von 18,9 bis 97,2).

Die Punktzahl des Schmerzes beim KOOS der Patienten mit Osteoarthritis war statistisch signifikant ($p = 0,01$) erhöht gegenüber den Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

Der in Abbildung 8 dargestellte Mittelwert der Funktion beim KOOS lag bei Patienten mit Osteoarthrose bei 32,8 (SD = 11,5 von 17,7 bis 48,5) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 74,4 (SD = 34,5 von 14,7 bis 100).

Die Punktzahl der Funktion beim KOOS bei Patienten mit Osteoarthrose war statistisch signifikant erhöht gegenüber den Patienten mit Kniegelenkverletzungen ($p = 0,02$).

Der in Abbildung 8 dargestellte Mittelwert der Funktion II beim KOOS lag bei Patienten mit Osteoarthrose bei 6,0 (Standardabweichung = 8,1 von 0 bis 20) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 45,5 (SD = 32,9 von 0 bis 100).

Die Punktzahl der Funktion II beim KOOS bei Patienten mit Osteoarthrose war statistisch nicht signifikant ($p = 0,007$) erhöht gegenüber den Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

Der in Abbildung 8 dargestellte Mittelwert der Lebensqualität beim KOOS lag bei Patienten mit Osteoarthrose bei 13,1 (SD = 13,9 von 0 bis 37,5) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 38,1 (SD = 21,5 von 6,3 bis 75). Die Lebensqualität beim KOOS bei Patienten mit Osteoarthrose war statistisch signifikant ($p = 0,007$) erhöht gegenüber den Patienten mit Kniegelenkverletzungen.

4.10. Vergleich WOMAC zwischen Patienten mit primärer Osteoarthrose und Kniegelenkverletzungen

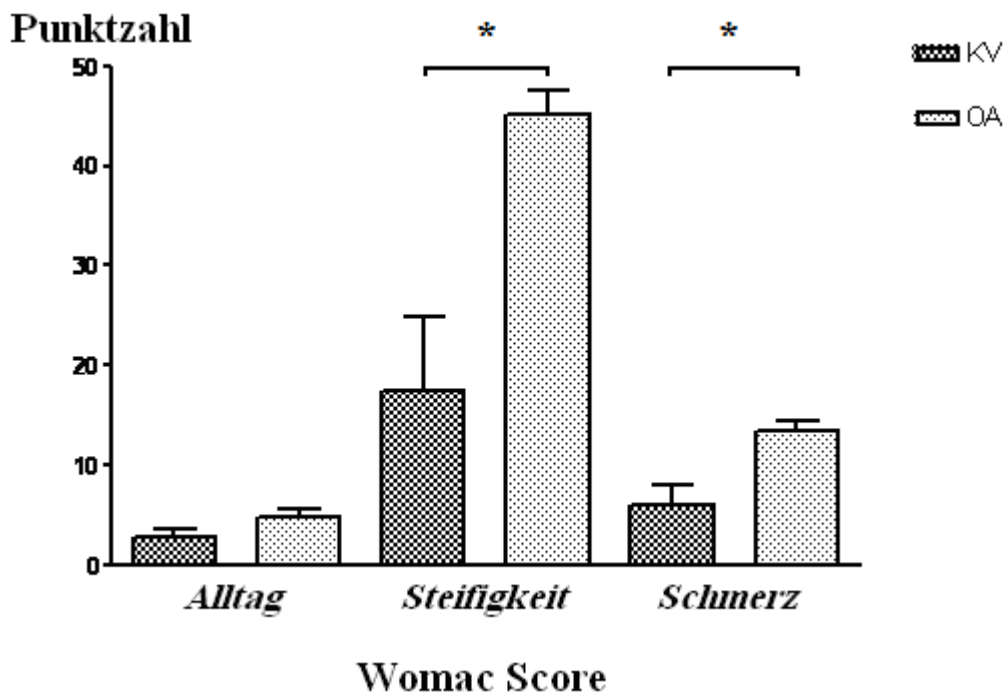


Abbildung 9: WOMAC Quantifizierung der Bewegungseinschränkung, Funktion und Schmerz im WOMAC Score.

Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichungen bei Patienten mit Gonarthrose (OA) und Patienten mit Kniegelenkverletzungen (KV). Dabei zeigt sich eine Signifikanz von $p < 0,05$ (*).

Der in Abbildung 9 dargestellte Mittelwert der Bewegungseinschränkung beim WOMAC lag bei Patienten mit Osteoarthrose bei 34,7 (SD = 28,5 von 0 bis 75) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 65,3 (SD = 35,2 von 0 bis 100).

Die Punktzahl der Bewegungseinschränkung beim WOMAC der Patienten mit Osteoarthrose war statistisch nicht signifikant erhöht gegenüber den Patienten mit Kniegelenkverletzungen ($p = 0,1$).

Der in Abbildung 9 dargestellte Mittelwert der Funktion beim WOMAC lag bei Patienten mit Osteoarthrose bei 35,1 (SD = 10,3 von 17,7 bis 48,5) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 72,4 (SD = 35,9 von 14,7 bis 100).

Die Punktzahl der Funktion beim WOMAC der Patienten mit Osteoarthrose war statistisch signifikant erhöht gegenüber den Patienten mit Kniegelenkverletzungen ($p = 0,03$).

Der in Abbildung 9 dargestellte Mittelwert der Schmerzen beim WOMAC lag bei Patienten mit Osteoarthrose bei 33,3 (SD = 16,2 von 5 bis 60) und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bei 67,8 (SD = 33,9 von 15 bis 100).

Die Punktzahl des Schmerzes beim WOMAC der Patienten mit Osteoarthrose war statistisch signifikant erhöht gegenüber den Patienten mit Kniegelenkverletzungen ($p = 0,02$).

5. Diskussion

5.1. Bewertungen der Methoden

Bevor die erhobenen Ergebnisse im Einzelnen diskutiert werden, soll kurz darauf eingegangen werden, welche allgemeinen Aussagen und Schlussfolgerungen aufgrund der angewandten Untersuchungsmethoden zulässig sind. Die mittels RT PCR-Analyse erhobenen Ergebnisse zeigen den Expressionsstatus der untersuchten Gene an. Wird also beispielsweise unter einer bestimmten Zytokinstimulation die Expression des IL-1-Gens gesteigert, so kann unter der Voraussetzung einer regelrecht ablaufenden Proteinbiosynthese darauf geschlossen werden, dass auch die Synthese der IL-1 stimuliert wird. Eine sichere Aussage über die Synthese und insbesondere über die proteolytische Aktivität der MMPs, IL-1 und TNF alpha kann jedoch nicht getroffen werden. Diese unterliegen möglicherweise weiteren regulierenden Mechanismen (posttranslationale Prozessierung, extrazelluläre Inhibition), welche durch die RT PCR nicht erfasst werden.

5.2. Pathogenese der Gonarthrose

Die primäre Osteoarthrose beschreibt eine Erkrankung, welcher eine unbekannte Ätiologie zu Grunde liegt (Buckwalter und Martin, 2006). Diese tritt bevorzugt in höheren Lebensdekaden auf (Hunter und Felson, 2006) und ist durch einen progressiven Verlauf gekennzeichnet. Als Risikofaktoren für die Entwicklung einer primären und sekundären Osteoarthrose gelten Übergewicht, Alter, Geschlecht, genetische oder ethnische Prädispositionen sowie Verletzungen des Gelenkes (Buckwalter und Martin, 2006; Goldring und Goldring, 2007). Besonders betroffen ist z.B. das Kniegelenk (Hunter und Felson, 2006). Der Progress der Osteoarthrose beinhaltet die Degeneration des artikulären Knorpels und die Remodelierung, sowie Sklerose des subchondralen Knochens (Goldring und Goldring, 2006). Kniegelenkverletzungen sind oft traumatischer Natur und führen vor allem in jüngeren Populationen zur sekundären Osteoarthrose.

Oft wurde die Osteoarthrose als nichtentzündliche Erkrankung beschrieben, jedoch konnten auch inflammatorische Ereignisse der Synovialmembran in frühen und späten Stadien der Osteoarthrose beobachtet werden (Benito et al., 2005; Smith et al., 1997; Myers et al., 1990).

So wird angenommen, dass die Synovitis in arthrotischen Gelenken zu den typischen Symptomen der Osteoarthrose, wie der Gelenkschwellung und der Ergussbildung führt (Fernandes et al., 2002). Histologisch ist die entzündete Synovialmembran durch eine Hyperplasie mit einer erhöh-

ten Anzahl von Deckzellen und einem gemischten entzündlichen Infiltrat, welches einen hohen Gehalt an Makrophagen aufweist, gekennzeichnet (Haywood et al., 2003).

Eine Schlüsselrolle bei der synovialen Entzündung und der Aktivierung der Chondrozyten nehmen die proinflammatorischen Zytokine TNF alpha und IL-1 ein. So stimulieren sie beispielsweise die Produktion von Matrix Metalloproteinasen (MMPs) in Chondrozyten und inhibieren die Knorpelmatrixsynthese (Buckwalter et al., 2005; Pelletier et al., 2001).

MMPs sind Proteasen, die unter anderem Bestandteile der extrazellulären Matrix (ECM) degradieren und folglich eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis spielen. MMP-1 besitzt die Fähigkeit, Kollagen Typ II in charakteristische Fragmente zu spalten, welche von MMP-3 weiter degradiert werden. Darüber hinaus aktiviert MMP-3 andere pro-MMPs und spaltet Komponenten der ECM wie Fibronectin und Laminin (Burrage et al., 2006).

Während pro-inflammatorische Zytokine und MMPs in der Gelenkflüssigkeit von Arthrosepatienten nachgewiesen wurden (Tchetverikov et al., 2005), ist der Entstehungsort dieser Mediatoren und Proteasen bislang nicht eindeutig geklärt. Die entzündete Synovialmembran gilt neben dem Pannus-ähnlichen Gewebe am Rand der Gelenkinnenfläche (Shibakawa et al., 2003) und den Chondrozyten (Goldring und Goldring, 2007) als mögliche Quelle. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Expression der proinflammatorischen Zytokine TNF alpha und IL-1 beta sowie der Proteasen MMP-1 und -3 zu charakterisieren, um so ein besseres Verständnis über deren Rolle in der arthrotischen Synovialmembran zu erlangen. Darüber hinaus wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen den Entzündungsprozessen und klinischen Parametern CRP und BMI vorliegt. Ausserdem wurde das Patientenempfinden mittels KOOS Fragebogen und WOMAC Score evaluiert.

5.3. CRP in der Osteoarthritis

Da die Entzündung eine entscheidende Rolle im Verlauf der Osteoarthritis spielen könnte, wird seit langem postuliert (Pelletier et al. 2001). So wurden Entzündungsprozesse in der arthrotischen Synovialmembran (Benito et al., 2005; Smith et al., 1997; Myers et al., 1990) beobachtet und eine verstärkte Synthese von proinflammatorischen Zytokinen in der Synovialis vermutet. Ferner wurde beobachtet, dass eine geringe systemische Entzündung mit einem leicht erhöhten Serum CRP einhergeht (Hulejová et al., 2007; Spetor et al., 1997; Stürmer et al., 2004). Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die o. g. Beobachtungen. Ebenfalls ist bekannt, dass das signifikant erhöhte Serum CRP Level schon in frühen radiologisch sichtbaren Stadien der

Osteoarthrose nachweisbar ist und somit auf einen beschleunigten Verlauf der Erkrankung hinweist (Spector et al., 1997).

Sowers et al. (2002) beobachteten, dass das Serum CRP mit dem Grad der Gelenkdestruktion nach Kellgren und Lawrence (1957) korreliert. Des Weiteren weisen Hulejová et al. (2007) auf einen signifikanten CRP Abfall nach der Implantation einer totalen Endoprothese (TEP) hin.

Die Beobachtung erhöhter CRP Werte in der RA, im Vergleich zur Osteoarthrose, lässt darüber hinaus eine mögliche Assoziation des Serums CRP mit einer progressiven Knorpeldestruktion vermuten (Tchetverikov et al., 2005).

Die Hepatozyten gelten als Hauptsyntheseort für dieses akute Phase Protein. Vermutet wird, dass CRP über proinflammatorische Zytokine wie IL-1 reguliert, immunmodulatorische Funktionen bei Gewebeverletzungen einnimmt und das Komplementsystem aktiviert. Im Verlauf der Osteoarthrose zeigt die Synovialis eine Infiltration mit mononukleären Zellen und eine Überexpression von inflammatorischen Mediatoren. Speziell TNF alpha und IL-1 beta produzierende Zellen wurden schon in frühen Stadien der Osteoarthrose beobachtet (Benito et al., 2005).

Da die Knorpeldestruktion vor allem durch die MMPs vermittelt wird, wurde untersucht, ob eine Korrelation zwischen den MMPs und dem CRP vorliegt. In dieser Studie konnte erstmals eine signifikante Korrelation zwischen dem Serum CRP Level und dem MMP-1 mRNA-Genexpressionslevel, sowie dem MMP-3 mRNA-Genexpressionslevel in der arthrotischen Synovialmembran gezeigt werden. Dies deckt sich mit den Analysen zur Bestimmung von MMPs und CRP in der Synovia und dem Serum von Patienten mit rheumatoider Arthritis. Hier konnte eine signifikante Korrelation zwischen dem MMP-3 im RA-Synovialfluid und dem Serum CRP gezeigt werden (Tchetverikov et al., 2005). Weitere Studien beobachteten eine Korrelation zwischen MMP-1 und -3 mit dem CRP in RA Serum (Mahmoud et al., 2005; Posthumus et al., 2003). Darüber hinaus wird vermutet, dass die progrediente Knorpeldestruktion und die dauerhaft persistierenden Knorpelabbauprodukte (Lohmander et al., 1994; Lohmander et al., 1999) in der Synovia zu einer Aktivierung der Synovialmembran mit Infiltration immunkompetenter Zellen (Cluster of Differentiation 68 (CD68), positiver Makrophagen, und CD4 positiver T-Lymphozyten) führen. Diese Prozesse könnten zu einer geringen lokalbedingten systemischen Aktivierung des Immunsystems mit einer gesteigerten Synthese von proinflammatorischen Zytokinen und einer reaktiven Erhöhung des Serum CRP führen.

5.4. Expression proinflammatorischer Zytokine in der Synovialmembran

Der Hypothese folgend, dass die Entzündung bei der Osteoarthritis ein entscheidender Prozess ist, wurden die Genexpressionslevel der proinflammatorischen Zytokine in der Synovialmembran bestimmt. Ferner ist bekannt, dass Zytokine eine entscheidende Rolle in der Pathogenese der Osteoarthritis spielen. Demnach induzieren IL-1 und TNF alpha neben der Aktivierung der MMP Synthese auch die Synthese von Prostaglandin E2 (PGE2) über die Stimulation von Cyclooxygenase (COX)-2, mikrosomaler PGE Synthase-1 (mPGES-1) und löslicher Phospholipase A2 (sPLA2). Außerdem regulieren sie die Produktion von Stickstoffmonoxid (NO) via induzierbarer Stickstoffmonoxid-Synthase oder Stickstoffmonoxid-Synthase-2 (iNOS oder NOS2) herauf (Goldring und Berenbaum, 2004; Goldring und Goldring, 2007). Dabei zeigen TNF alpha und IL-1 einen synergistischen Effekt (van den Berg, 2001).

Ebenso konnte im experimentellen Maus-Arthritismodell gezeigt werden, dass in Abwesenheit von IL-1 das TNF alpha eine Entzündung der Synovialmembran induzierte (Zwerina et al., 2007). Eine weitere Studie beschreibt den Schutz vor chirurgisch induzierter Osteoarthritis an IL-1 beta-knockout-Mäusen (Clements et al., 2003).

IL-1 Konzentrationen wurden in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis nachgewiesen (Schlaak et al., 1996). Dennoch ist der Syntheseort dieses Zytokins bislang nicht eindeutig geklärt. Die entzündete Synovialmembran gilt, wie auch die Chondrozyten, als mögliche Quelle erhöhter IL-1 Konzentrationen. In der vorliegenden Arbeit konnte die IL-1 und TNF alpha mRNA Expression in den untersuchten Synovialmembranen beider Patientengruppen nachgewiesen werden. Dies konnte auch die Studie von Brenner et al. (2004) für die IL-1, jedoch nicht für die TNF alpha Expression in der Synovialmembran zeigen, wobei sich dort die Patienten einer diagnostischen oder therapeutischen Arthroskopie unterzogen und im Gegensatz zu unserer Studie einen variablen radiologischen Kniearthrose-Degenerationsgrad nach Kellgren and Laurence (1957) zeigten (Brenner et al., 2004).

Andere Arbeiten, in denen die Proteine mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) quantitativ bestimmt wurden, beobachteten höhere Konzentrationen von IL-1 beta und TNF alpha in der RA Synovialmembran im Vergleich zur Osteoarthritis (Rosengren et al., 2003). Darüber hinaus zeigten Benito et al. (2005) mittels der Immunohistologie eine signifikant größere Anzahl von TNF alpha und IL-1 beta-produzierenden Zellen in frühen Stadien der Osteoarthritis im Vergleich zur fortgeschritteneren Osteoarthritis. Dagegen lagen keine signifikanten Konzentrationen

onsunterschiede von IL-1 und TNF alpha zwischen Patienten mit Osteoarthrose und den gesunden Kontrollen vor (Hulejová et al., 2007).

Die hier vorliegenden Untersuchungen zeigen, dass in allen Synovialmembranen von an Osteoarthrose erkrankten Patienten IL- 1 beta und TNF alpha exprimiert werden. Diese Beobachtung könnte auf eine entscheidene Bedeutung der Synovialfibroblasten hinsichtlich einer regulierbaren IL-1 und TNF alpha Synthesestelle bei der kartilaginären Homöostase hinweisen.

5.5. Regulation und Expression von MMPs in der Synovialmembran von Patienten mit Osteoarthrose

Dass die synoviale MMP-3 Synthese im Prozess der Knorpeldegeneration eine wichtige Rolle einnimmt, ist belegt (Blom et al., 2007). So zeigten in-vivo Untersuchungen eines osteoarthritischen Mausmodells, dass synoviale Makrophagen die Osteophytenentwicklung (Blom et al., 2004) vermittelten und die MMP Aktivität und Produktion früher als im Knorpel induzieren (Blom et al., 2007). Andere Studien zeigen, dass MMP-3 ein entscheidender Mediator für die Knorpeldestruktion ist (Mehraban et al., 1998) und die Proteinkonzentration im Vergleich zu gesunden Kontrollen erhöht ist (Hulejová et al., 2007).

Wie zuvor beschrieben, aktiviert MMP-3 andere pro-MMPs. Mittels Northern Blot und in-situ-Hybridisierung wurde eine mRNA-Expression von MMP-3 und MMP-1 in der Synovialmembran gezeigt (Zafarullah et al., 1993; Gravallesse et al., 1991). Mahmoud et al. (2005) beschrieben eine signifikante Korrelation zwischen MMP-3 und MMP-1 in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis, die auch in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthrose gezeigt werden konnte (Yoshihara et al., 2000; Väättäinen et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine signifikante Korrelation zwischen relativen mRNA Genexpressionen von MMP-1 und MMP-3 in der Synovialmembran von Patienten mit Osteoarthrose nachgewiesen. Wie oben erwähnt, schreibt die Literatur den proinflammatorischen Zytokinen die Fähigkeit zu, die MMP-Expression zu induzieren. Diese Erkenntnisse decken sich mit denen dieser Arbeit, da auch hier eine signifikante Korrelation zwischen den relativen mRNA Genexpressionslevel von TNF alpha und MMP-1, sowie zwischen TNF alpha mit MMP-1 gezeigt wurde. In Synovialzellkulturen konnte bereits eine stimulierende Wirkung von IL-1 beta und TNF alpha auf die Genexpression der MMPs nachgewiesen werden (Fuchs et al., 2004). Bestätigt wurde dies durch eine weitere Arbeit, in der durch Zugabe von IL-1 und TNF alpha-

Antikörper, die MMP-1 und MMP -3 Genexpression in der Zellkultur herunterreguliert wurde (Bondeson et al., 2006).

Wie zuvor beschrieben, spielen MMPs im Prozeß der Knorpeldegeneration eine zentrale Rolle. So wiesen Patienten mit RA höhere MMP-1 und MMP-3 mRNA Genexpressionslevel im Vergleich zu Patienten mit Osteoarthritis auf (Keyszer et al., 1998).

Immunhistochemische Studien konnten in der Synovialmembran von Patienten mit Osteoarthritis eine erhöhte MMP-3 Proteinexpression im Vergleich zu gesunden Kontrollen beobachten (Okada et al., 1992). Tchertverikov et al. (2004) wiesen erhöhte Konzentrationen von MMP-3 und MMP-1 im Synovialfluid von Patienten mit Osteoarthritis im Vergleich zu gesunden Kontrollen nach.

Zafarullah et al. (1994) konnten eine signifikant höhere MMP-1 und MMP-3 mRNA Genexpression bei Patienten mit Osteoarthritis im Vergleich zu gesunden Kontrollen nachweisen.

Die Expression von MMP-1 und MMP-3 mRNA wurde in dieser Studie in allen untersuchten Synovialmembranen nachgewiesen, jedoch zeigten sich keine signifikanten Expressionsunterschiede dieser Proteine zwischen den Patientengruppen.

Unsere Beobachtungen und die beschriebenen Studien deuten an, dass die Synovialmembran, sowohl in der Synthese, als auch die Regulation in der Synovialflüssigkeit vorkommenden MMPs eine entscheidene Rolle spielen könnte.

5.6. Bedeutung des BMI in der Osteoarthritis

Adipositas ist ein bedeutender Risikofaktor der Osteoarthritis. Das Risiko eine Osteoarthritis zu entwickeln, steigt an gewichtstragenden Gelenken, wie dem Hüft- und dem Kniegelenk. Jedoch konnte gezeigt werden, dass das Risiko an Osteoarthritis zu erkranken, bei Übergewicht an allen Gelenken erhöht ist (Felson et al., 1997). So wird angenommen, dass biochemische Mediatoren diesen Prozess vermitteln. Dumond et al. (2003) beobachteten wiederum eine signifikante Korrelation zwischen dem BMI und Leptin.

Es gibt Hinweise, dass Leptin über die Induktion der Stickoxid-Synthase-2 (NOS2) in Chondrozyten einen schädigenden Effekt auf den Gelenkknorpel hat. Darüber hinaus zeigt Leptin einen synergistischen Effekt mit dem in der Arthritis relevantesten Zytokin IL-1. Simopoulou et al. (2007) beschrieben eine Erhöhung der IL-1 beta mRNA Expression in kultivierten Chondrozyten nach Leptingabe. Überdies lag eine signifikante Korrelation zwischen dem BMI und der Leptin-mRNA-Genexpression der Chondrozyten vor (Simopoulou et al., 2007). Im

Gegensatz dazu konnte in der vorliegenden Arbeit keine Korrelation zwischen dem BMI und IL-1 beta gezeigt werden, und somit war kein kausaler Zusammenhang zwischen der Expression der hier untersuchten Zytokine und Proteasen in der Synovialmembran und dem BMI nachweisbar.

5.7. Bedeutung der Expression von TNF alpha im Zeitverlauf nach dem initialen Trauma

Die Rolle der proinflammatorischen Zytokine und der MMPs in der Pathogenese der Osteoarthritis wurden vielfach belegt (Fernandes et al., 2002; Goldring und Goldring, 2004; Goldring, 1999). Dennoch ist das Verständnis über die molekularen Grundlagen noch sehr lückenhaft. Auch die Beteiligung der Synovialmembran im Prozess der primären, aber vor allem in der posttraumatischen Osteoarthritis, ist noch unklar. Ein Grund dafür könnte sein, dass die Entwicklung der Osteoarthritis im humanen Individuum nicht von Beginn an und im Verlauf auf molekularer Ebene quantifiziert werden kann. Studien nach Kniegelenktraumen bieten diese Möglichkeit und könnten der Schlüssel für das Verständnis der Arthrosepathogenese sein. Unsere Studie untersuchte die IL-1 und TNF alpha mRNA Genexpression in der Synovialmembran bei Patienten mit verschiedenen Kniegelenkverletzungen. Diese Zytokine besitzen die Fähigkeit, in Chondrozyten ihre eigene Produktion und die Produktion anderer Zytokine wie IL-8, IL-6 und die Prostaglandine E2 (PGE2) zu induzieren. In vitro steigern sie die osteoklastische Knochenresorption (Bertolini et al., 1986) und sind in der Lage, die Synthese von verschiedenen extrazellulären Matrixkomponenten zu inhibieren (Hooiveld et al., 2003). Frühere Studien wiesen in der akuten Phase nach der initialen Knieverletzung im Vergleich zu gesunden Kontrollen signifikant erhöhte IL-1 und TNF alpha Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit auf (Irie et al., 2003). Allerdings ist die exakte Quelle dieser Zytokine noch immer nicht abschließend geklärt. In dieser Arbeit konnte erstmalig eine signifikante Korrelation zwischen der TNF alpha Genexpression und der Zeit nach dem initialen Trauma gezeigt werden. Dieser Trend wurde in früheren Untersuchungen nicht beobachtet. Eine Erklärung dafür könnten ein anderes Material und andere Quantifizierungstechniken in den vorangegangenen Studien sein. So wurden beispielsweise Proteinkonzentrationen im Synovialfluid mittels Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) quantifiziert (Irie et al. 2003). Demnach beobachteten Irie et al. (2003) einen signifikanten Anstieg der TNF alpha Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit während der ersten Woche nach der Verletzung. Nach drei Wochen sanken die Expressionswerte dieser Zytokine auf Werte, welche bei Patienten mit Osteoarthritis gemessen wurden (Irie et al., 2003). Eine andere klinische Studie zeigte kurz nach der Kniegelenkverletzung einen signifikanten Anstieg des TNF alpha in der Synovialflüssigkeit. Nach der akuten Phase sanken die Konzentrationen, blieben aber in der

chronischen Phase erhöht im Vergleich zu den Konzentrationen bei gesunden Patienten. Interessanterweise zeigte sich der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor (GM-CSF) initial normal und stieg nach 3 Monaten signifikant an (Cameron et al., 1997). Ferner konnte nach Stimulation mit rekombinanten humanen IL-1 und TNF alpha von kultivierten humanen Chondrozyten die Induktion der GM-CSF Produktion beobachtet werden. GM-CSF wiederum kann Makrophagen zur IL-1 und TNF alpha Synthese stimulieren, welche erneut Gewebszellen zur GM-CSF Synthese anregen (Hamilton, 2002).

Ob eine Assoziation zwischen der TNF alpha mRNA Genexpressionslevel und dem GM-GSF besteht, müssen künftige Studien klären, welche die Faktoren gemeinsam in der Synovialmembran, im Knorpelgewebe und in der Synovialflüssigkeit untersuchen. Diese Studie deutet darauf hin, dass die persistierend erhöhten TNF alpha und IL-1 beta Proteinkonzentrationen im Synovialfluid (Cameron et al., 1997) aus der Synovialmembran stammen könnten.

5.8. Bedeutung der Expression von IL-1 beta im Zeitverlauf nach dem initialen Trauma

Kniegelenkverletzungen sind ein Risikofaktor für die Entwicklung einer posttraumatischen Arthrose. Es ist beschrieben, dass nach der Ruptur des vorderen Kreuzbandes (VKB) und einer anschließenden Rekonstruktion, bei bis zu 60 Prozent der Patienten eine posttraumatische Osteoarthrose entsteht. Die molekularen Grundlagen sind jedoch nicht vollständig geklärt. Dass das IL-1 ein zentrales Zytokin des Arthroseprozesses ist, wurde vielfach belegt. Welche Rolle es im Prozeß der posttraumatischen Osteoarthrose spielt, ist Gegenstand dieser und gegenwärtiger Studien.

IL-1 beta zeigte in dieser Studie keinen eindeutigen Trend in dem Zeitverlauf nach dem initialen Trauma. Diese Beobachtung wird durch die Studie von Cameron et al. (1994) bestätigt, in der ein Teil der Patienten nach Kniegelenkverletzung eine starke initiale Erhöhung von IL-1 Konzentrationen zeigten, welche dann mit zunehmender Zeit auf moderate Werte sanken. Der andere Teil der Patienten wies initial moderat erhöhte Werte auf, welche keinen signifikanten Anstieg der Konzentrationen zeigten. Irie et al. (2003) beobachteten hingegen einen signifikanten Abfall der IL-1 beta Werte nach dem initialen Trauma in der Synovialflüssigkeit. Wie oben beschrieben (Abschnitt 5.7.), lag in diesen Studien ein anderer Beobachtungszeitraum vor. Darüber hinaus existiert bislang keine vergleichbare Studie mit dem in dieser Arbeit verwendeten Zeitintervall und Untersuchungsmaterial.

Diese, als auch unsere Beobachtungen deuten darauf hin, dass es Patienten mit initial hohen IL-1

beta Level und Patienten mit moderen Level gibt. Patienten mit initialem hohem Level von IL-1 beta könnten ein höheres Risiko der Arthroseentwicklung haben. Folgende Studien mit größeren Fallzahlen und Nachuntersuchungen dieser Patienten müssen klären, ob diese Vermutung zutrifft.

5.9. Die Bedeutung der Assoziation zwischen der Expression von TNF alpha und arthroskopisch visualisierter Chondromalazie

Wie einleitend beschrieben, gehen Chondrozyten bei nur kurzem Blutkontakt, wie bei einem Hämarthros nach einer vorderen Kreuzbandruptur, in Apoptose (Hamilton, 2002). Darüber hinaus zeigen Chondrozyten nach einem Trauma eine gesteigerte Genexpression, welche sich in einer verstärkten Expression von inflammatorischen Mediatoren und Proteasen widerspiegelt (Lee et al., 2005; Fitzgerald et al., 2004; Hooiveld et al., 2003).

Nach einer Kniegelenkverletzung persistieren Knorpelabbauprodukte wie Aggrecan-Fragmente und Cartilage Oligomeric Matrix Protein (COMP) über einen langen Zeitraum in der Synovialflüssigkeit (Lohmander et al., 1994; Lohmander et al., 1999). Postuliert wird auch, dass bei Osteoarthritis und rheumatoider Arthritis die Interaktion von infiltrierenden Entzündungszellen und Knorpelabbauprodukten mit einer Aktivierung von Zytokinen einhergehen (Tsuruha et al., 2001; Yuan et al., 2001).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine signifikante Korrelation zwischen der Chondromalazie und TNF alpha nachgewiesen. Auch Marks und Donaldson (2005) beschrieben steigende TNF alpha Level bei steigender Chondromalazie. Andere Studien zeigten eine erhöhte Inzidenz radiologischer Osteoarthritis Veränderungen nach einer Kniegelenkverletzung.

Diese, wie auch die vorliegenden Beobachtungen, deuten darauf hin, dass das Kniegelenktrauma ein entscheidender Risikofaktor für die Entstehung von chondralen Defekten auf molekularer Ebene sein kann und so progredient zur posttraumatischen Osteoarthritis führt.

5.10. Bedeutung der Expression von MMP-1 und MMP -3 im Zeitverlauf nach dem initialen Trauma

Die MMPs spielen bei der Entstehung der primären und sekundären Osteoarthritis, aber auch bei vielen nicht-pathologischen Vorgängen, eine wichtige Rolle. MMPs ergänzen sich in ihrer Substratspezifität. So sind bei pathologischen oder physiologischen Vorgängen meist mehrere MMPs gleichzeitig involviert. Ungeklärt ist jedoch ihre temporäre Aktivität im initialen Prozess der Knorpeldegeneration. In dieser Arbeit konnte ein initialer Anstieg des MMP-1 und MMP-3

bis zum zweiten Zeitintervall (9 bis 12 Monaten) beobachtet werden, wie auch ein Anstieg der MMP-1 und MMP-3 mRNA Expression zum fünften Zeitintervall (52 bis 80 Monaten). Diese Beobachtungen werden durch Tchetverikov et al. (2004) bestätigt. Sie zeigten in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Kniegelenkverletzungen einen signifikanten Anstieg der MMP-1 und MMP-3 Proteinkonzentrationen bis zur 17. Woche, gefolgt von einem signifikanten Abfall. Andere Studien wiederum zeigten, dass die MMPs und TIMPs nach der Kniegelenkverletzung ansteigen (Walakovits et al., 1992; Moore et al., 1999; Lohmander et al., 1993; Dahlberg et al., 1994; Roos et al., 1995). So wiesen in vitro Studien an kultivierten Knorpelzellen eine vorübergehende Erhöhung dieser Proteasen unter mechanischer Belastung nach (Pickvance et al., 1993). Bekannt ist auch, dass ein Trauma oder eine veränderte Biomechanik zu einer vorübergehenden Erhöhung dieser Proteasen in der Synovialflüssigkeit führen (Dahlberg et al., 1994; Lohmander et al., 1999; Lohmander et al., 1993; Walakovits et al., 1992; Tchetverikov et al., 2004).

Diese Zusammenhänge lassen darauf schließen, dass die in der Synovialflüssigkeit gemessenen Konzentrationen von MMP-1 und MMP-3 aus der Synovialmembran stammen könnten und darüber hinaus der initiale Anstieg der MMP-Konzentration auf das vermehrte Vorkommen von Knorpelabbauprodukten zurückzuführen sein könnte.

5.11. Bedeutung der Assoziation zwischen der Expression von MMP-1 und MMP-3

Zytokine besitzen die Fähigkeit, die Synthese von MMP-3 und MMP-1 zu induzieren (Bondeson et al., 2006; Fuchs et al., 2004). MMP-3 kann andere pro-MMPs aktivieren. Frühere Studien beobachteten erhöhte Konzentrationen von MMP-3 und MMP-1 in der Synovia von Patienten mit primärer Gonarthrose (Tchetverikov et al., 2004). Auch bei Patienten nach einer Kniegelenkverletzung zeigten sich erhöhte MMP Proteinkonzentrationen (Dahlberg et al., 1994; Roos et al., 1995; Lohmander et al., 1999; Lohmander et al., 1993; Moore et al., 1999; Walakovits et al., 1992).

Eine Studie, welche die Synovialmembran nach Kniegelenkverletzungen untersuchte, beobachtete eine mRNA MMP-3 Genexpression in 8 von 9 und eine mRNA MMP-1 Genexpression in 6 von 9 Proben (Kontinen et al., 1999). In der vorliegenden Arbeit konnten in allen Synovialmembranen MMP-1 und MMP-3 mRNA nachgewiesen werden., Dabei lag kein signifikanter Unterschied in der Expressionshöhe bei Patienten mit Osteoarthrose im Vergleich zu Patienten mit Kniegelenkverletzungen vor. Es wurde jedoch erstmals eine signifikante Korrelation

zwischen MMP-1 und MMP-3 mRNA-Genexpression in der Synovialis von Patienten mit Kniegelenkverletzungen beobachtet. Dies wurde ebenso an Untersuchungen der Synovialflüssigkeit von RA Patienten gezeigt (Mahmout et al., 2005), wie auch durch Analysen der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthritis bestätigt (Yoshihara et al., 2000; Väättäin et al., 1998). Diese Beobachtungen weisen auf eine starke Assoziation zwischen MMP-1 und MMP-3 in verschiedenen Geweben des Kniegelenks hin.

5.12. WOMAC und KOOS bei den verschiedenen Patientengruppen

Der Womac-Index und der KOOS-Fragebogen erwiesen sich als probates Mittel, die Beschwerden der Patienten zu quantifizieren und die Patientengruppen zu differenzieren.

Die vorliegende Arbeit wies signifikante Unterschiede in vier von fünf Subgruppen im KOOS, sowie in zwei von drei Subgruppen des Womac-Index auf. Die Unterschiede in dem subjektiven Patientenempfinden gehen folglich mit dem unterschiedlichen Degenerationsgrad der Patienten einher. Patienten mit Osteoarthritis standen zur Implantation einer totalen Knieendoprothese (KTEP) an und wiesen eine Pangenarthrose auf. Die zweite Gruppe von Patienten zeigte nach Kniegelenkverletzungen eine initiale Knorpeldegeneration. Diese zeigten sich nie an allen Kompartimenten des Kniegelenks. 25 % der Patienten nach Kniegelenkverletzungen gaben sogar nur geringe Beschwerden an. Das unterstreicht aber auch die Wichtigkeit des hier angewandten Verfahrens der visuellen Diagnosefindung.

6. Zusammenfassung

Um das Verständnis über die Pathologie der Osteoarthritis zu verbessern, wurden die relativen Genexpressionshöhen von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 beta und TNF alpha) und den Matrix Metalloproteinasen untersucht. Dabei wurden diese Faktoren in der Synovialmembran von Patienten mit Kniegelenkosteoarthritis und bei Patienten mit Kniegelenkverletzungen bestimmt. Ferner wurde überprüft, ob eine Korrelation zwischen diesen Faktoren und dem Body Mass Index und dem C-reaktiven Protein (CRP) besteht. Ausserdem wurde das subjektiv-objektive Patientenempfinden erhoben.

MMP-1, MMP -3, IL-1 beta and TNF alpha Genexpressionshöhen wurden mittels der Taqman-basierten RT PCR in der Synovialmembran von 12 Patienten mit Osteoarthritis und 13 Patienten mit Kniegelenkverletzungen untersucht. Der BMI aus Körpergröße und Gewicht und das C-reaktive Protein (CRP) wurden über das reguläre präoperative Labor erhoben.

Die quantitative Analyse zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen MMP-1, MMP-3, IL-1 beta and TNF alpha mRNA Genexpressionshöhe in der Synovialmembran von Patienten mit Osteoarthritis und Kniegelenkverletzungen. Das Serum CRP war signifikant bei Patienten mit Osteoarthritis erhöht, verglichen mit der Gruppe von Patienten mit Kniegelenkverletzungen. Eine positive signifikante Korrelation zeigte sich zwischen mRNA Genexpressionshöhen von MMP-1 und MMP-3 in beiden Patientengruppen, sowie zwischen CRP und MMP-1, MMP-3 bei den Patienten mit Osteoarthritis. Ausserdem zeigte sich eine signifikante Korrelation zwischen TNF alpha und MMP-1, MMP-3 in der Synovialmembran von Patienten mit Osteoarthritis. Es wurde u.a. eine positive signifikante Korrelation zwischen der TNF alpha mRNA Genexpressionshöhe und der Zeit nach der Verletzung beobachtet. Diese Studie zeigt ähnliche Entzündungsmuster in der Synovialmembran von Patienten mit Osteoarthritis und Patienten mit Kniegelenkverletzungen. Interessanterweise deuten unsere Daten daraufhin, dass TNF alpha eine Schlüsselrolle in beiden Krankheitsprozessen spielt und einen therapeutischen Ansatzpunkt darstellen könnte. Ausserdem könnte TNF alpha ein individueller Risikofaktor für die Entstehung einer sekundären Osteoarthritis darstellen.

Schlagwörter: Genexpression, Osteoarthritis, Kniegelenkverletzungen, TNF alpha

6.1. Abstract

To gain further insight into the pathology of osteoarthritis (OA), the expression of pro-inflammatory cytokines and matrix metalloproteinases (MMPs) in the synovial tissue of patients suffering from OA or non-inflammatory knee disorders (NKD) has been investigated.

Furthermore, to assess the influence of clinical parameters such as CRP and BMI in disease progression, we sought to correlate the expression profile of the cytokines and proteases tested.

MMP-1, -3, IL-1 β and TNF- α gene expression was quantified using Taqman-based real-time polymerase chain reaction (PCR) in synovial tissue samples obtained from 12 patients with OA and 13 with NKD. In addition, the levels of serum inflammatory parameter C reactive protein (CRP) were recorded.

Quantitative analysis revealed no significant differences in the expression levels of MMPs, IL-1 β or TNF- α mRNA between the synovial tissues of patients with OA and NKD, but CRP was significantly increased in the OA group. A significant correlation was also seen regarding the gene expression levels between MMP-1 and -3, and between the CRP and MMPs tested. Furthermore, a significant relationship between TNF- α and MMP-1 and MMP-3 was observed in osteoarthritic synovial tissue. In addition, the relative mRNA level of TNF- α in the synovial tissue correlated to the time after injury in patients with NKD.

This study demonstrates similar changes in the inflammatory pattern of synovial tissue of NKD and OA. Interestingly these results suggest that TNF- α is a key factor in both disease processes, and could provide a therapeutic target and an individual risk factor for the development of OA.

Keywords: gene expression, Osteoarthritis, non-inflammatory knee disorders, TNF alpha

7. Literaturverzeichnis

Aigner T, Glückert K, von der Mark K:

Activation of fibrillar collagen synthesis and phenotypic modulation of chondrocytes in early human osteoarthritic cartilage lesions.

Osteoarthritis Cartilage. 1997; 5(3):183-9.

Alaaeddine N, DiBattista JA, Pelletier JP, Cloutier JM, Kiansa K, Dupuis M, Martel-Pelletier J:

Osteoarthritic synovial fibroblasts possess an increased level of tumor necrosis factor-receptor 55 (TNF-R55) that mediates biological activation by TNF-alpha.

J Rheumatol. 1997; 24(10):1985-94.

Amin AR:

Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis.

Osteoarthritis Cartilage. 1999; 7(4):392-4.

Amin AR, Dave M, Attur M, Abramson SB:

COX-2, NO, and cartilage damage and repair.

Curr Rheumatol Rep. 2000; 2(6):447-53.

Arendt EA, Agel J, Dick R:

Anterior Cruciate Ligament Injury Patterns Among Collegiate Men and Women.

J Athl Train. 1999; 34(2):86-92.

Attur MG, Dave MN, Clancy RM, Patel IR, Abramson SB, Amin AR:

Functional genomic analysis in arthritis-affected cartilage: yin-yang regulation of inflammatory mediators by alpha 5 beta 1 and alpha V beta 3 integrins.

J Immunol. 2000; 164(5):2684-91.

Auron PE, Webb AC, Rosenwasser LJ, Mucci SF, Rich A, Wolff SM, Dinarello CA:

Nucleotide sequence of human monocyte interleukin 1 precursor cDNA.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1984; 81(24):7907-11.

Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B:

Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis.

Ann Rheum Dis. 2005; 64(9):1263-7.

Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF, Castner BJ, Stocking KL, Reddy P, Srinivasan S, Nelson N, Boiani N, Schooley KA, Gerhart M, Davis R, Fitzner JN, Johnson RS, Paxton RJ, March CJ, Cerretti DP:

A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells.

Nature. 1997; 385(6618):729-33.

Blom AB, van Lent PL, Holthuysen AE, van der Kraan PM, Roth J, van Rooijen N, van den Berg WB:

Synovial lining macrophages mediate osteophyte formation during experimental osteoarthritis.

Osteoarthritis Cartilage. 2004; 12(8):627-35.

Blom AB, van Lent PL, Libregts S, Holthuysen AE, van der Kraan PM, van Rooijen N, van den Berg WB:

Crucial role of macrophages in matrix metalloproteinase-mediated cartilage destruction during experimental osteoarthritis: involvement of matrix metalloproteinase 3.

Arthritis Rheum. 2007; 56(1):147-57.

Bobic V:

Autologous osteo-chondral grafts in the management of articular cartilage lesions

Orthopade. 1999; 28(1):19-25.

Boden BP, Dean GS, Feagin JA Jr, Garrett WE Jr:

Mechanisms of anterior cruciate ligament injury.

Orthopedics. 2000; 23(6):573-8.

Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE:

The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis.

Arthritis Res Ther. 2006; 8(6):R187.

Brenner SS, Klotz U, Alscher DM, Mais A, Lauer G, Schweer H, Seyberth HW, Fritz P, Bierbach U:

Osteoarthritis of the knee-clinical assessments and inflammatory markers.

Osteoarthritis Cartilage. 2004; 12(6):469-75.

Buckwalter JA, Martin JA:

Osteoarthritis.

Adv Drug Deliv Rev. 2006; 58(2):150-67.

Buckwalter JA, Mankin HJ, Grodzinsky AJ:

Articular cartilage and osteoarthritis.

Instr Course Lect. 2005; 54:465-80.

Burrage PS, Mix KS, Brinckerhoff CE:

Matrix metalloproteinases: role in arthritis.

Front Biosci. 2006; 11:529-43.

Cameron M, Buchgraber A, Passler H, Vogt M, Thonar E, Fu F, Evans CH:

The natural history of the anterior cruciate ligament-deficient knee. Changes in synovial fluid cytokine and keratan sulfate concentrations.

Am J Sports Med. 1997; 25(6):751-4.

Cameron ML, Fu FH, Paessler HH, Schneider M, Evans CH:

Synovial fluid cytokine concentrations as possible prognostic indicators in the ACL-deficient knee.

Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc. 1994; 2(1):38-44.

Cicuttini FM, Forbes A, Yuanyuan W, Rush G, Stuckey SL:

Rate of knee cartilage loss after partial meniscectomy.

J Rheumatol. 2002; 29(9):1954-6.

Clements KM, Price JS, Chambers MG, Visco DM, Poole AR, Mason RM:

Gene deletion of either interleukin-1 beta, interleukin-1 beta-converting enzyme, inducible nitric oxide synthase, or stromelysin 1 accelerates the development of knee osteoarthritis in mice after surgical transection of the medial collateral ligament and partial medial meniscectomy.

Arthritis Rheum. 2003; 48(12):3452-63.

Dahlberg L, Roos H, Saxne T, Heinegård D, Lark MW, Hoerrner LA, Lohmander LS:
Cartilage metabolism in the injured and uninjured knee of the same patient.
Ann Rheum Dis. 1994; 53(12):823-7.

Daniel DM, Stone ML, Dobson BE, Fithian DC, Rossman DJ, Kaufman KR:
Fate of the ACL-injured patient. A prospective outcome study.
Am J Sports Med. 1994; 22(5):632-44.

Danks L, Sabokbar A, Gundle R, Athanasou NA:
Synovial macrophage-osteoclast differentiation in inflammatory arthritis.
Ann Rheum Dis. 2002; 61(10):916-21.

Dayer JM, Graham R, Russell G, Krane SM:
Collagenase production by rheumatoid synovial cells: stimulation by a human lymphocyte factor.
Science. 1977; 195(4274):181-3.

Dayer JM, Zavadil-Grob C, Ucla C, Mach B:
Induction of human interleukin 1 mRNA measured by collagenase- and prostaglandin E2-stimulating activity in rheumatoid synovial cells.
Eur J Immunol. 1984; 14(10):898-901.

Dean DD, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Howell DS, Woessner JF Jr:
Evidence for metalloproteinase and metalloproteinase inhibitor imbalance in human osteoarthritic cartilage.
J Clin Invest. 1989; 84(2):678-85.

Di Battista JA, Fahmi H, He Y, Zhang M, Martel-Pelletier J, Pelletier JP:
Differential regulation of interleukin-1 beta-induced cyclooxygenase-2 gene expression by nimesulide in human synovial fibroblasts.
Clin Exp Rheumatol. 2001; 19(1 Suppl 22):S3-5.

Dingle JT, Saklatvala J, Hembry R, Tyler J, Fell HB, Jubb R:
A cartilage catabolic factor from synovium.
Biochem J. 1979; 184(1):177-80.

Dodge GR, Poole AR:

Immunohistochemical detection and immunochemical analysis of type II collagen degradation in human normal, rheumatoid, and osteoarthritic articular cartilages and in explants of bovine articular cartilage cultured with interleukin 1.

J Clin Invest. 1989; 83(2):647-61.

Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pottie P:

Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis.

Arthritis Rheum. 2003; 48(11):3118-29.

Englund M, Roos EM, Lohmander LS:

Impact of type of meniscal tear on radiographic and symptomatic knee osteoarthritis: a sixteen-year followup of meniscectomy with matched controls.

Arthritis Rheum. 2003; 48(8):2178-87.

Englund M, Roos EM, Roos HP, Lohmander LS:

Patient-relevant outcomes fourteen years after meniscectomy: influence of type of meniscal tear and size of resection.

Rheumatology (Oxford). 2001; 40(6):631-9.

Farahat MN, Yanni G, Poston R, Panayi GS:

Cytokine expression in synovial membranes of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

Ann Rheum Dis. 1993; 52(12):870-5.

Fell HB, Jubb RW:

The effect of synovial tissue on the breakdown of articular cartilage in organ culture.

Arthritis Rheum. 1977; 20(7):1359-71.

Felson DT:

Clinical practice. Osteoarthritis of the knee.

N Engl J Med. 2006; 354(8):841-8.

Felson DT, Zhang Y, Hannan MT, Naimark A, Weissman B, Aliabadi P, Levy D:

Risk factors for incident radiographic knee osteoarthritis in the elderly: the Framingham Study.

Arthritis Rheum. 1997; 40(4):728-33.

Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP:

The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology.

Biorheology. 2002; 39(1-2):237-46.

Fitzgerald JB, Jin M, Dean D, Wood DJ, Zheng MH, Grodzinsky AJ:

Mechanical compression of cartilage explants induces multiple time-dependent gene expression patterns and involves intracellular calcium and cyclic AMP.

J Biol Chem. 2004; 279(19):19502-11.

Fosang AJ, Tyler JA, Hardingham TE:

Effect of interleukin-1 and insulin like growth factor-1 on the release of proteoglycan components and hyaluronan from pig articular cartilage in explant culture.

Matrix. 1991; 11(1):17-24.

Fuchs S, Skwara A, Bloch M, Dankbar B:

Differential induction and regulation of matrix metalloproteinases in osteoarthritic tissue and fluid synovial fibroblasts.

Osteoarthritis Cartilage. 2004; 12(5):409-18.

Fujimoto T, Sato Y, Sasaki N, Teshima R, Hanaoka K, Kitani S:

The canine mast cell activation via CRP.

Biochem Biophys Res Commun. 2003; 301(1):212-7.

Fukui N, Purple CR, Sandell LJ:

Cell biology of osteoarthritis: the chondrocyte's response to injury.

Curr Rheumatol Rep. 2001; 3(6):496-505.

Goldring MB:

The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models.

Connect Tissue Res. 1999; 40(1):1-11.

Goldring MB:

The role of the chondrocyte in osteoarthritis.

Arthritis Rheum. 2000; 43(9):1916-26.

Goldring MB, Berenbaum F:

The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide.

Clin Orthop Relat Res. 2004; (427 Suppl):37-46.

Goldring SR, Goldring MB:

The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis.

Clin Orthop Relat Res. 2004; (427 Suppl):S27-36.

Goldring MB, Goldring SR:

Osteoarthritis.

J Cell Physiol. 2007; 213(3):626-34.

Goldring MB, Krane SM:

Modulation by recombinant interleukin 1 of synthesis of types I and III collagens and associated procollagen mRNA levels in cultured human cells.

J Biol Chem. 1987; 262(34):16724-9.

Gomez DE, Alonso DF, Yoshiji H, Thorgeirsson UP:

Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions.

Eur J Cell Biol. 1997; 74(2):111-22.

Gravallese EM, Darling JM, Ladd AL, Katz JN, Glimcher LH:

In situ hybridization studies of stromelysin and collagenase messenger RNA expression in rheumatoid synovium.

Arthritis Rheum. 1991; 34(9):1076-84.

Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB:

The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair.

Clin Orthop Relat Res. 2004; (423):17-26.

Hamilton JA:

GM-CSF in inflammation and autoimmunity.

Trends Immunol. 2002; 23(8):403-8.

Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, Walsh DA:
Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis.
Arthritis Rheum. 2003; 48(8):2173-7.

Hedbom E, Häuselmann HJ:
Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation.
Cell Mol Life Sci. 2002; 59(1):45-53.

Hembry RM, Bagga MR, Reynolds JJ, Hamblen DL:
Immunolocalisation studies on six matrix metalloproteinases and their inhibitors, TIMP-1 and TIMP-2, in synovia from patients with osteo- and rheumatoid arthritis.
Ann Rheum Dis. 1995; 54(1):25-32.

Herrmann JL, Blanchard H, Brunengo P, Lagrange PH:
TNF alpha, IL-1 beta and IL-6 plasma levels in neutropenic patients after onset of fever and correlation with the C-reactive protein (CRP) kinetic values.
Infection. 1994; 22(5):309-15.

Holzheimer RG, Steinmetz W:
Local and systemic concentrations of pro- and anti-inflammatory cytokines in human wounds.
Eur J Med Res. 2000; 5(8):347-55.

Hooiveld M, Roosendaal G, Wenting M, van den Berg M, Bijlsma J, Lafeber F:
Short-term exposure of cartilage to blood results in chondrocyte apoptosis.
Am J Pathol. 2003; 162(3):943-51.

Hulejová H, Baresová V, Klézl Z, Polanská M, Adam M, Senolt L:
Increased level of cytokines and matrix metalloproteinases in osteoarthritic subchondral bone.
Cytokine. 2007; 38(3):151-6.

Hunter DJ, Felson DT:
Osteoarthritis.
BMJ. 2006; 332(7542):639-42.

- Inoue H, Takamori M, Nagata N, Nishikawa T, Oda H, Yamamoto S, Koshihara Y:
An investigation of cell proliferation and soluble mediators induced by interleukin 1beta in human synovial fibroblasts: comparative response in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.
Inflamm Res. 2001; 50(2):65-72.
- Irie K, Uchiyama E, Iwaso H:
Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee.
Knee. 2003; 10(1):93-6.
- Kageyama Y, Miyamoto S, Ozeki T, Hiyohsi M, Suzuki M, Nagano A:
Levels of rheumatoid factor isotypes, metalloproteinase-3 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in synovial fluid from various arthritides.
Clin Rheumatol. 2000; 19(1):14-20.
- Kellgren JH, Lawrence JS:
Radiological assessment of osteo-arthritis.
Ann Rheum Dis. 1957; 16(4):494-502.
- Kannus P, Järvinen M:
Posttraumatic anterior cruciate ligament insufficiency as a cause of osteoarthritis in a knee joint.
Clin Rheumatol. 1989; 8(2):251-60.
- Kerin A, Patwari P, Kuettner K, Cole A, Grodzinsky A:
Molecular basis of osteoarthritis: biomechanical aspects.
Cell Mol Life Sci. 2002; 59(1):27-35.
- Keyszer G, Redlich A, Häupl T, Zacher J, Sparmann M, Enghüm U, Gay S, Burmester GR:
Differential expression of cathepsins B and L compared with matrix metalloproteinases and their respective inhibitors in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: a parallel investigation by semi-quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction and immunohistochemistry.
Arthritis Rheum. 1998; 41(8):1378-87.
- Kurz B, Lemke AK, Fay J, Pufe T, Grodzinsky AJ, Schünke M:
Pathomechanisms of cartilage destruction by mechanical injury.
Ann Anat. 2005; 187(5-6):473-85.

Konttinen YT, Ainola M, Valleala H, Ma J, Ida H, Mandelin J, Kinne RW, Santavirta S, Sorsa T, López-Otín C, Takagi M:

Analysis of 16 different matrix metalloproteinases (MMP-1 to MMP-20) in the synovial membrane: different profiles in trauma and rheumatoid arthritis.

Ann Rheum Dis. 1999; 58(11):691-7.

Lee JH, Fitzgerald JB, Dimicco MA, Grodzinsky AJ:

Mechanical injury of cartilage explants causes specific time-dependent changes in chondrocyte gene expression.

Arthritis Rheum. 2005; 52(8):2386-95.

Lin CW, Phillips SL, Brinckerhoff CE, Georgescu HI, Bandara G, Evans CH:

Induction of collagenase mRNA in lapine articular chondrocytes by synovial factors and interleukin-1.

Arch Biochem Biophys. 1988; 264(1):351-4.

Loetscher H, Pan YC, Lahm HW, Gentz R, Brockhaus M, Tabuchi H, Lesslauer W:

Molecular cloning and expression of the human 55 kd tumor necrosis factor receptor.

Cell. 1990; 61(2):351-9.

Lohmander LS, Ionescu M, Jugessur H, Poole AR:

Changes in joint cartilage aggrecan after knee injury and in osteoarthritis.

Arthritis Rheum. 1999; 42(3):534-44.

Lohmander LS, Hoerrner LA, Lark MW:

Metalloproteinases, tissue inhibitor, and proteoglycan fragments in knee synovial fluid in human osteoarthritis.

Arthritis Rheum. 1993; 36(2):181-9.

Lohmander LS, Ostenberg A, Englund M, Roos H:

High prevalence of knee osteoarthritis, pain, and functional limitations in female soccer players twelve years after anterior cruciate ligament injury.

Arthritis Rheum. 2004; 50(10):3145-52.

Lohmander LS, Saxne T, Heinegård DK:

Release of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) into joint fluid after knee injury and in osteoarthritis.

Ann Rheum Dis. 1994; 53(1):8-13.

Lotz M:

The role of nitric oxide in articular cartilage damage.

Rheum Dis Clin North Am. 1999; 25(2):269-82.

Lotz M, Hashimoto S, Kühn K:

Mechanisms of chondrocyte apoptosis.

Osteoarthritis Cartilage. 1999; 7(4):389-91.

Loughlin J:

Genetic epidemiology of primary osteoarthritis.

Curr Opin Rheumatol. 2001; 13(2):111-6.

Mahmoud RK, El-Ansary AK, El-Eishi HH, Kamal HM, El-Saeed NH:

Matrix metalloproteinases MMP-3 and MMP-1 levels in sera and synovial fluids in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

Ital J Biochem. 2005; 54(3-4):248-57.

Maletius W, Messner K:

Eighteen- to twenty-four-year follow-up after complete rupture of the anterior cruciate ligament.

Am J Sports Med. 1999; 27(6):711-7.

March CJ, Mosley B, Larsen A, Cerretti DP, Braedt G, Price V, Gillis S, Henney CS, Kronheim SR, Grabstein K:

Cloning, sequence and expression of two distinct human interleukin-1 complementary DNAs.

Nature. 1985; 315(6021):641-7.

Marks PH, Donaldson ML:

Inflammatory cytokine profiles associated with chondral damage in the anterior cruciate ligament-deficient knee.

Arthroscopy. 2005; 21(11):1342-7.

Martel-Pelletier J, McCollum R, Fujimoto N, Obata K, Cloutier JM, Pelletier JP:

Excess of metalloproteases over tissue inhibitor of metalloprotease may contribute to cartilage degradation in osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

Lab Invest. 1994; 70(6):807-15.

Martin JA, Brown T, Heiner A, Buckwalter JA:

Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence.

Biorheology. 2004; 41(3-4):479-91.

McCarthy GM, Westfall PR, Masuda I, Christopherson PA, Cheung HS, Mitchell PG:

Basic calcium phosphate crystals activate human osteoarthritic synovial fibroblasts and induce matrix metalloproteinase-13 (collagenase-3) in adult porcine articular chondrocytes.

Ann Rheum Dis. 2001; 60(4):399-406.

Mehraban F, Lark MW, Ahmed FN, Xu F, Moskowitz RW:

Increased secretion and activity of matrix metalloproteinase-3 in synovial tissues and chondrocytes from experimental osteoarthritis.

Osteoarthritis Cartilage. 1998; 6(4):286-94.

Melchiorri C, Meliconi R, Frizziero L, Silvestri T, Pulsatelli L, Mazzetti I, Borzì RM, Ugucioni M, Facchini A:

Enhanced and coordinated in vivo expression of inflammatory cytokines and nitric oxide synthase by chondrocytes from patients with osteoarthritis.

Arthritis Rheum. 1998; 41(12):2165-74.

Middleton J, Manthey A, Tyler J:

Insulin-like growth factor (IGF) receptor, IGF-I, interleukin-1 beta (IL-1 beta), and IL-6 mRNA expression in osteoarthritic and normal human cartilage.

J Histochem Cytochem. 1996; 44(2):133-41.

Moore AR, Appelboom A, Kawabata K, Da Silva JA, D'Cruz D, Gowland G, Willoughby DA:

Destruction of articular cartilage by alpha 2 macroglobulin elastase complexes: role in rheumatoid arthritis.

Ann Rheum Dis. 1999; 58(2):109-13.

Moos V, Fickert S, Müller B, Weber U, Sieper J:

Immunohistological analysis of cytokine expression in human osteoarthritic and healthy cartilage.

J Rheumatol. 1999; 26(4):870-9.

Murphy G, Knäuper V, Atkinson S, Butler G, English W, Hutton M, Stracke J, Clark I:

Matrix metalloproteinases in arthritic disease.

Arthritis Res. 2002; 4 Suppl 3:S39-49. Review.

Murphy G, Nagase H:

Reappraising metalloproteinases in rheumatoid arthritis and osteoarthritis: destruction or repair?

Nat Clin Pract Rheumatol. 2008; 4(3):128-35.

Myers SL, Brandt KD, Ehlich JW, Braunstein EM, Shelbourne KD, Heck DA, Kalasinski LA:

Synovial inflammation in patients with early osteoarthritis of the knee.

J Rheumatol. 1990; 17(12):1662-9.

Nagase H, Okada Y:

Proteinases and matrix degradation. In: Kelley WN, Harris ED, Ruddy S, Sledge CB, eds. Textbook of rheumatology. Philadelphia:

WB Saunders, 1998; 323-41.

Nagase H, Woessner JF Jr:

Matrix metalloproteinases.

J Biol Chem. 1999; 274(31):21491-4.

Oliveria SA, Felson DT, Reed JI, Cirillo PA, Walker AM:

Incidence of symptomatic hand, hip, and knee osteoarthritis among patients in a health maintenance organization.

Arthritis Rheum. 1995; 38(8):1134-41.

Okada Y, Shinmei M, Tanaka O, Naka K, Kimura A, Nakanishi I, Bayliss MT, Iwata K, Nagase H:

Localization of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) in osteoarthritic cartilage and synovium.

Lab Invest. 1992; 66(6):680-90.

Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Abramson SB:

Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets.

Arthritis Rheum. 2001; 44(6):1237-47.

Perl M, Gebhard F, Knöferl MW, Bachem M, Gross HJ, Kinzl L, Strecker W:

The pattern of preformed cytokines in tissues frequently affected by blunt trauma.

Shock. 2003; 19(4):299-304.

Pickvance EA, Oegema TR Jr, Thompson RC Jr:

Immunolocalization of selected cytokines and proteases in canine articular cartilage after transarticular loading.

J Orthop Res. 1993; 11(3):313-23.

Posthumus MD, Limburg PC, Westra J, van Leeuwen MA, van Rijswijk MH:

Serum matrix metalloproteinase 3 levels in comparison to C-reactive protein in periods with and without progression of radiological damage in patients with early rheumatoid arthritis.

Clin Exp Rheumatol. 2003; 21(4):465-72.

Rhaney K, Lamb DW:

The cysts of osteoarthritis of the hip; a radiological and pathological study.

J Bone Joint Surg Br. 1955; 37 B(4):663-75.

Roos H, Dahlberg L, Hoerrner LA, Lark MW, Thonar EJ, Shinmei M, Lindqvist U, Lohmander LS:

Markers of cartilage matrix metabolism in human joint fluid and serum: the effect of exercise.

Osteoarthritis Cartilage. 1995; 3(1):7-14.

Rosengren S, Firestein GS, Boyle DL:

Measurement of inflammatory biomarkers in synovial tissue extracts by enzyme-linked immunosorbent assay.

Clin Diagn Lab Immunol. 2003; 10(6):1002-10.

Sandell LJ, Aigner T:

Articular cartilage and changes in arthritis. An introduction: cell biology of osteoarthritis.

Arthritis Res. 2001; 3(2):107-13.

Sadouk MB, Pelletier JP, Tardif G, Kiansa K, Cloutier JM, Martel-Pelletier J:

Human synovial fibroblasts coexpress IL-1 receptor type I and type II mRNA. The increased level of the IL-1 receptor in osteoarthritic cells is related to an increased level of the type I receptor.

Lab Invest. 1995; 73(3):347-55.

Schall TJ, Lewis M, Koller KJ, Lee A, Rice GC, Wong GH, Gatanaga T, Granger GA, Lentz R, Raab H:

Molecular cloning and expression of a receptor for human tumor necrosis factor.

Cell. 1990; 61(2):361-70.

Schlaak JF, Pfers I, Meyer Zum Büschenfelde KH, Märker-Hermann E:

Different cytokine profiles in the synovial fluid of patients with osteoarthritis, rheumatoid arthritis and seronegative spondylarthropathies.

Clin Exp Rheumatol. 1996; 14(2):155-62.

Sherman MF, Warren RF, Marshall JL, Savatsky GJ:

A clinical and radiographical analysis of 127 anterior cruciate insufficient knees.

Clin Orthop Relat Res. 1988; 227:229-37.

Shibakawa A, Aoki H, Masuko-Hongo K, Kato T, Tanaka M, Nishioka K, Nakamura H:

Presence of pannus-like tissue on osteoarthritic cartilage and its histological character.

Osteoarthritis Cartilage. 2003; 11(2):133-40.

Simopoulou T, Malizos KN, Iliopoulos D, Stefanou N, Papatheodorou L, Ioannou M, Tsezou A:

Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism.

Osteoarthritis Cartilage. 2007; 15(8):872-83.

Slack J, McMahan CJ, Waugh S, Schooley K, Spriggs MK, Sims JE, Dower SK:

Independent binding of interleukin-1 alpha and interleukin-1 beta to type I and type II interleukin-1 receptors.

J Biol Chem. 1993; 268(4):2513-2

Smith RL, Allison AC, Schurman DJ:

Induction of articular cartilage degradation by recombinant interleukin 1 alpha and 1 beta.

Connect Tissue Res. 1989; 18(4):307-16.

Smith MD, Triantafillou S, Parker A, Youssef PP, Coleman M:

Synovial membrane inflammation and cytokine production in patients with early osteoarthritis.

J Rheumatol. 1997; 24(2):365-71.

Sowers M, Jannausch M, Stein E, Jamadar D, Hochberg M, Lachance L:

C-reactive protein as a biomarker of emergent osteoarthritis.

Osteoarthritis Cartilage. 2002; 10(8):595-601.

Spector TD, Hart DJ, Nandra D, Doyle DV, Mackillop N, Gallimore JR, Pepys MB:

Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease.

Arthritis Rheum. 1997; 40(4):723-7.

Stephenson ML, Goldring MB, Birkhead JR, Krane SM, Rahmsdorf HJ, Angel P:

Stimulation of procollagenase synthesis parallels increases in cellular procollagenase mRNA in human articular chondrocytes exposed to recombinant interleukin 1 beta or phorbol ester.

Biochem Biophys Res Commun. 1987; 144(2):583-90.

Stürmer T, Brenner H, Koenig W, Günther KP:

Severity and extent of osteoarthritis and low grade systemic inflammation as assessed by high sensitivity C reactive protein.

Ann Rheum Dis. 2004; 63(2):200-5.

Stürmer T, Günther KP, Brenner H;

Obesity, overweight and patterns of osteoarthritis: the Ulm Osteoarthritis Study.

J Clin Epidemiol. 2000; 53(3):307-13.

Tchetverikov I, Lohmander LS, Verzijl N, Huizinga TW, TeKoppele JM, Hanemaaijer R, De-Groot J:

MMP protein and activity levels in synovial fluid from patients with joint injury, inflammatory arthritis, and osteoarthritis.

Ann Rheum Dis. 2005; 64(5):694-8.

Tchetverikov I, Roday HK, Van El B, Kiers GH, Verzijl N, TeKoppele JM, Huizinga TW, De-Groot J, Hanemaaijer R:

MMP profile in paired serum and synovial fluid samples of patients with rheumatoid arthritis.

Ann Rheum Dis. 2004; 63(7):881-3.

Tolboom TC, Pieterman E, van der Laan WH, Toes RE, Huidekoper AL, Nelissen RG, Breedveld FC, Huizinga TW:

Invasive properties of fibroblast-like synoviocytes: correlation with growth characteristics and expression of MMP-1, MMP-3, and MMP-10.

Ann Rheum Dis. 2002; 61(11):975-80.

Towle CA, Hung HH, Bonassar LJ, Treadwell BV, Mangham DC:

Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis.

Osteoarthritis Cartilage. 1997; 5(5):293-300.

Tsuruha J, Masuko-Hongo K, Kato T, Sakata M, Nakamura H, Nishioka K:

Implication of cartilage intermediate layer protein in cartilage destruction in subsets of patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis.

Arthritis Rheum. 2001; 44(4):838-45.

Väättäinen U, Lohmander LS, Thonar E, Hongisto T, Agren U, Rönkkö S, Jaroma H, Kosma VM, Tammi M, Kiviranta I:

Markers of cartilage and synovial metabolism in joint fluid and serum of patients with chondromalacia of the patella.

Osteoarthritis Cartilage. 1998; 6(2):115-24.

Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, Spector TD:

Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee.

Arthritis Rheum. 2007; 56(1):137-46.

Van den Berg WB:

Uncoupling of inflammatory and destructive mechanisms in arthritis.

Semin Arthritis Rheum. 2001; 30(5 Suppl 2):7-16.

Van den Berg WB:

Lessons from animal models of arthritis.

Curr Rheumatol Rep. 2002; 4(3):232-9.

Van den Berg WB, Bresnihan B:

Pathogenesis of joint damage in rheumatoid arthritis: evidence of a dominant role for interleukin-I.

Baillieres Best Pract Res Clin Rheumatol. 1999; 13(4):577-97.

von Porat A, Roos EM, Roos H:

High prevalence of osteoarthritis 14 years after an anterior cruciate ligament tear in male soccer players: a study of radiographic and patient relevant outcomes.

Ann Rheum Dis. 2004; 63(3):269-73.

Walakovits LA, Moore VL, Bhardwaj N, Gallick GS, Lark MW:

Detection of stromelysin and collagenase in synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and posttraumatic knee injury.

Arthritis Rheum. 1992; 35(1):35-42.

Wernicke D, Seyfert C, Hinzmann B, Gromnica-Ihle E:

Cloning of collagenase 3 from the synovial membrane and its expression in rheumatoid arthritis and osteoarthritis.

J Rheumatol. 1996; 23(4):590-5.

Westacott CI, Atkins RM, Dieppe PA, Elson CJ:

Tumor necrosis factor-alpha receptor expression on chondrocytes isolated from human articular cartilage.

J Rheumatol. 1994; 21(9):1710-5.

Wood DD, Ihrie EJ, Dinarello CA, Cohen PL:

Isolation of an interleukin-1-like factor from human joint effusions.

Arthritis Rheum. 1983; 26(8):975-83.

Yoshihara Y, Nakamura H, Obata K, Yamada H, Hayakawa T, Fujikawa K, Okada Y:

Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis or osteoarthritis.

Ann Rheum Dis. 2000; 59(6):455-61.

Yuan GH, Masuko-Hongo K, Sakata M, Tsuruha J, Onuma H, Nakamura H, Aoki H, Kato T, Nishioka K:

The role of C-C chemokines and their receptors in osteoarthritis.

Arthritis Rheum. 2001; 44(5):1056-70.

Zafarullah M, Pelletier JP, Cloutier JM, Martel-Pelletier J:

Elevated metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase mRNA in human osteoarthritic synovia.

J Rheumatol. 1993; 20(4):693-7.

Zwerina J, Redlich K, Polzer K, Joosten L, Krönke G, Distler J, Hess A, Pundt N, Pap T, Hoffmann O, Gasser J, Scheinecker C, Smolen JS, van den Berg W, Schett G:

TNF-induced structural joint damage is mediated by IL-1.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2007; 104(28):11742-7.

8. Abkürzungsverzeichnis

BMI	Body Mass Index
BMP	Bone Morphogenetic Protein
CA-MMP	Cysteine Array Matrix Metalloproteinase
CD	Cluster of Differentiation
COMP	Cartilage Oligomeric Matrix Protein
cDNA	complementary DNA
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierende Faktor
COX	Cyclooxygenase
CRP	C-reaktives Protein
DNA	Desoxyribonucleinsäure
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
ECM	extrazelluläre Matrix
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
IL	Interleukin
IL-1ra	Interleukin-1-Rezeptorantagonist
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
IGF	Insulin-like Growth Faktor-I
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
KOOS	Knee Injury and Osteoarthritis Outcome Score
KV	Kniegelenkverletzungen
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
MMP	Matrixmetalloproteasen
PGE	Prostaglandin
mPGES	mikrosomale PGE Synthase
mRNA	Messenger-RNA

MT-MMP	membranständige Matrixmetalloproteasen
NO	Stickoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
OA	Osteoarthrose
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGE	Prostaglandin E
rpm	Rotationen pro Minute
RT PCR	Realtime Polymerase Kettenreaktion
RNase	Ribonukleasen
RNA	Ribonukleinsäure
SD	Standardabweichung
sPLA2	lösliche Phospholipase A2
TEP	totale Endoprothese
TGF	Transforming Growth Factor
TIMP	Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase
TNF	Tumornekrosefaktor
TNF-CE	Tumornekrosefaktor Converting Enzym
TNFR	Tumor nekrose faktor Rezeptor
VKB	vorderes Kreuzband
WOMAC	Western Ontario and Mac Master Universities Osteoarthritis Index

Auf eine Auflistung von international anerkannten Abkürzungen von Maßeinheiten, sowie im deutschen Sprachgebrauch allgemein üblichen Abkürzungen wurde hier verzichtet.

9. LEBENSLAUF

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Carsten Perka, stellvertretender Direktor der Klinik für Orthopädie des Centrums für Muskuloskeletale Chirurgie und des Bereichs der Medizin der Humboldt Universität zu Berlin, für die Überlassung des Themas, für die kritischen Hinweise und Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Zu Dank bin ich Herrn Dr. med. Christian Dynybil, für seine umfangreiche Betreuung, Unterstützung, Organisation und wertvoller Hilfe in der Durchführung, Auswertung und Zusammenfassung der Arbeit verpflichtet.

Für die fachlichen Ratschläge und technischen Hilfestellungen im Bereich der Analytik und der Fertigstellung des Manuskriptes, danke ich Frau Dr. rer. nat. Ulrike Lehnigk.

Mein Dank gilt ebenso Herrn Prof. Dr. med. Hans Guski und Herrn Dr. med. Johannes Godt für die Durchsicht der Arbeit und der konstruktiven Verbesserungsvorschläge.

Den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Julius-Wolff-Institutes, insbesondere Frau Norma Schulz, danke ich dafür, dass sie mich stets motiviert und geduldig unterstützt haben.

Abschließend möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester Katharina für die Unterstützung während des Studiums und bei der Anfertigung dieser Arbeit danken.

Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.

11. ANHANG

Erklärung

Ich, Georgi Wassilew, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Genexpression von proinflammatorischen Zytokinen und Matrix Metalloproteinasen in der Synovialmembran“ selbst verfasst und keine anderen, als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Georgi Wassilew

„KOOS“ KNIEFRAGEBOGEN

Datum: ____/____/____ Geburtsdatum: ____/____/____

Patienten Nr: _____

ANLEITUNG:

Dieser Fragebogen dient dazu uns Ihre Kniebeschwerden zu verdeutlichen. Die dadurch gewonnenen Informationen und Erkenntnisse werden uns helfen, Ihre Kniebeschwerden besser zu erkennen und auch einschätzen zu können.

- 1) Beantworten Sie bitte jede Frage und kreuzen Sie das dazugehörige Kästchen an.
- 2) Bitte nur ein Kästchen pro Frage ankreuzen.
- 3) Wenn Sie unsicher sind, wie Sie die Frage beantworten sollen, wählen Sie die Antwort aus, die Ihnen am zutreffensten erscheint.

Symptome

Diese Fragen beziehen sich auf Beschwerden ihres Kniegelenkes **in der vergangenen Woche**

S1. Haben Sie Schwellungen an ihrem Knie?

niemals selten manchmal oft immer

S2. Fühlen Sie manchmal ein Mahlen, hören Sie manchmal ein Klicken oder ein Geräusch, wenn Sie ihr Knie bewegen?

niemals selten manchmal oft immer

S3. Bleibt ihr Knie manchmal hängen oder blockiert es, wenn Sie es bewegen?

niemals selten manchmal oft immer

S4. Können Sie ihr Knie ganz ausstrecken?

niemals selten manchmal oft immer

S5. Können Sie ihr Knie ganz beugen?

niemals selten manchmal oft immer

Steifigkeit

Die nachfolgenden Fragen betreffen die Steifigkeit Ihres Kniegelenkes während der letzten Woche. Unter Steifigkeit versteht man ein Gefühl der Einschränkung oder Verlangsamung der Fähigkeit ihr Kniegelenk zu bewegen. Für jede der nachfolgenden Aktivitäten sollen Sie das Ausmaß der Schwierigkeiten angeben, welche Sie durch ihr Kniegelenk innerhalb der letzten Woche erfahren haben.

S6. Wie stark ist ihre KniestEIFigkeit morgens direkt nach dem Aufstehen?

keine schwach mäßig stark sehr stark

S7. Wie stark beurteilen Sie ihre Kniesteifigkeit nach dem Sie saßen, lagen oder sich ausruhten im **Verlauf des Tages**?

keine schwach mäßig stark sehr stark

Schmerzen

P1. Wie oft schmerzt ihr Knie?

niemals monatlich wöchentlich täglich immer

Wie ausgeprägt waren ihre Schmerzen in der **vergangenen Woche**, als Sie z.B.:

P2. Sich im Knie drehen?

keine schwach mäßig stark sehr stark

P3. Ihr Knie ganz ausstrecken?

keine schwach mäßig stark sehr stark

P4. Ihr Knie ganz beugen?

keine schwach mäßig stark sehr stark

P5. Auf ebenem Boden gehen?

keine schwach mäßig stark sehr stark

P6. Treppen herauf- oder heruntergehen?

keine schwach mäßig stark sehr stark

P7. Nachts im Bett liegen?

keine schwach mäßig stark sehr stark

P8. Auf der Couch saßen oder lagen?

keine schwach mäßig stark sehr stark

P9. Aufrecht stehen?

keine schwach mäßig stark sehr stark

Aktivitäten des täglichen Lebens

Die nachfolgenden Fragen beziehen sich auf Ihre körperliche Leistungsfähigkeit. Hierunter verstehen wir ihre Fähigkeit, sich selbständig zu bewegen bzw. sich selbst zu versorgen. Für jede der nachfolgenden Aktivitäten sollen Sie das Ausmaß der Schwierigkeiten angeben, welche Sie durch Ihr Kniegelenk innerhalb der letzten Woche erfahren haben.

Welche Schwierigkeiten hatten Sie in der **letzten Woche**, als Sie z.B.:

A1. Treppen herunterstiegen?

keine wenig einige große sehr große

A2. Treppen hinaufstiegen?

keine wenig einige große sehr große

A3. Vom Sitzen aufstanden?

keine wenig einige große sehr große

Welche Schwierigkeiten hatten Sie in der **letzten Woche**, als Sie z.B.:

A4. Standen?

keine wenig einige große sehr große

A5. Sich bückten, um z.B. etwas vom Boden aufzuheben?

keine wenig einige große sehr große

A6. Auf ebenem Boden gingen?

keine wenig einige große sehr große

A7. In das Auto ein- oder ausstiegen?

keine wenig einige große sehr große

A8. Einkaufen gingen?

keine wenig einige große sehr große

A9. Strümpfe/Socken anzogen?

keine wenig einige große sehr große

A10. Vom Bett aufstanden?

keine wenig einige große sehr große

A11. Strümpfe/Socken auszogen?

keine wenig einige große sehr große

A12. Im Bett lagen und sich drehen, ohne das Knie dabei zu beugen?

keine wenig einige große sehr große

A13. In oder aus der Badewanne stiegen?

keine wenig einige große sehr große

A14. Saßen?

keine wenig einige große sehr große

A15. Sich auf die Toilette setzten oder aufstanden?

keine wenig einige große sehr große

A16. Schwere Hausarbeit verrichteten (putzen, Garten umgraben, ...)?

keine wenig einige große sehr große

A17. Leichte Hausarbeit verrichteten (Staub wischen, kochen, ...)?

keine wenig einige große sehr große

Sport und Freizeit

Die nachfolgenden Fragen beziehen sich auf Ihre körperliche Belastbarkeit im Rahmen sportlicher Aktivitäten. Für jede der nachfolgenden Aktivitäten sollen Sie das Ausmaß der Schwierigkeiten angeben, welche Sie durch Ihr Kniegelenk innerhalb der letzten Woche erfahren haben.

Hatten Sie Schwierigkeiten **letzte Woche**, als Sie z.B.:

SP1. In die Hocke gingen?

keine wenig einige große sehr große

SP2. Rannten?

keine wenig einige große sehr große

SP3. Hüpfen?

keine wenig einige große sehr große

SP4. Sich auf ihrem kranken Knie umdrehen?

keine wenig einige große sehr große

SP5. Sich hinknieten?

keine wenig einige große sehr große

Beeinflussung der Lebensqualität durch das betroffene Knie

Q1. Wie oft spüren Sie ihr erkranktes Knie?

nie monatlich wöchentlich täglich immer

Q2. Haben Sie ihre Lebensweise verändert, uml ihrem Knie schadende Tätigkeiten zu ersparen?

nicht wenig etwas stark vollständig

Q3. Wie sehr leiden Sie darunter, daß ihr Knie nicht stabil ist?

gar nicht wenig einiges schlimm sehr schlimm

Q4. Wie würden Sie die Schwierigkeiten bewerten, die Sie durch die Kniebeschwerden haben?

keine wenig etwas große sehr große

Wir danken Ihnen für die Beantwortung der Fragen.

WOMAC INDEX

Schmerzen

Denken Sie an die Schmerzen, die Sie während der letzten 48 Stunden in Ihrer betroffenen Hüfte hatten.

Wie stark sind Ihre Schmerzen...

	keine Schmerzen	wenig Schmerzen	mittlere Schmerzen	starke Schmerzen	extreme Schmerzen
beim Gehen auf ebenem Boden?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
beim Treppensteigen (hinauf oder hinunter)?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
während Sie nachts im Bett lagen, d.h. Schmerzen, die Ihren Schlaf beeinträchtigen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
beim Sitzen oder Liegen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
beim aufrechten Stehen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Steifigkeit

Denken Sie an die Steifigkeit (nicht Schmerzen), die Sie während der letzten 48 Stunden in Ihrer betroffenen Hüfte hatten! Gelenksteifigkeit macht sich normalerweise als Verringerung der Beweglichkeit der Gelenke bemerkbar.

Wie stark ist Ihre Gelenksteifigkeit...

	keine Steifigkeit	wenig Steifigkeit	mittlere Steifigkeit	starke Steifigkeit	extreme Steifigkeit
nach dem ersten Aufwachen am Morgen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
später am Tag, nachdem Sie für eine Weile gesessen, gelegen oder sich ausgeruht hatten?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>

Schwierigkeiten beim Verrichten von Alltagstätigkeiten

Denken Sie an die Schwierigkeiten, die Sie während der letzten 48 Stunden bei der Verrichtung folgender körperlicher Alltagstätigkeiten in Ihrem betroffenen Knie hatten! Gemeint ist damit die Fähigkeit, sich frei zu bewegen und sich zu versorgen.

Welche Schwierigkeiten hatten Sie...

	keine Schwierigkeiten	wenig Schwierigkeiten	mittlere Schwierigkeiten	starke Schwierigkeiten	extreme Schwierigkeiten
Treppen herabzusteigen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Treppen hinaufzusteigen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
aus dem Sitzen aufzustehen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
zu stehen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
sich herunterzubeugen, um etwas aufzuheben?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
auf ebenem Boden zu gehen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
in das Auto oder in den Bus einzusteigen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Einkaufen zu gehen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Socken oder Strumpfhosen anzuziehen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
aus dem Bett zu steigen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
Socken oder Strumpfhosen auszuziehen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
im Bett zu liegen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
in die Badewanne zu steigen, sich darin hinzusetzen oder aus der Badewanne zu kommen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
lange zu sitzen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
sich auf die Toilette zu setzen oder davon aufzustehen?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
schwere Haushaltstätigkeiten zu verrichten?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>
leichte Haushaltstätigkeiten zu verrichten?	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>	<input type="radio"/>