

Aus der Klinik für Orthopädie

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Universitätsprofessor Dr. med. Rüdiger Krauspe

**Parameter des oxidativen und nitrosativen Stress als prädiktive  
Biomarker der Gonarthrose**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Laura Joseph

(2018)

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der  
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:  
Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: PD Dr. med. C. Zilkens

Zweitgutachter: Prof. Dr. med. S. Gehrman

Meiner geliebten Familie zum Dank.

Teile dieser Arbeit werden veröffentlicht:

**Franz A, Joseph L et. al:**“ The role of oxidative and nitrosative stress in the pathology of osteoarthritis: Novel candidate biomarkers for quantification of degenerative changes in the knee joint”, Orthopedic Reviews, under review

## **Zusammenfassung**

Hintergrund: Arthrose ist eine der häufigsten chronisch-degenerativen Erkrankungen, die zu Schmerzen, Bewegungseinschränkungen und bleibender Behinderung führt<sup>10</sup>. Die genauen pathophysiologischen Entstehungsmechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene sind bis heute noch nicht ausreichend verstanden, obwohl einige Risikofaktoren wie beispielsweise Alter, Übergewicht und vorausgegangene Gelenkverletzungen als gesichert gelten<sup>124-126</sup>. Zunehmend wird biochemischen Faktoren eine zentrale Rolle in der Arthrose-Entstehung zugeschrieben. Eine wichtige Rolle scheint hierbei oxidativer und nitrosativer Stress zu spielen<sup>29,55,111</sup>.

Ziel der Arbeit war die Identifikation von biologischen Substanzen, welche die degenerativen Veränderungen eines arthrotisch-veränderten Gelenkes widerspiegeln und somit als Biomarker des Gelenkschadens fungieren können. Hierfür wurde exemplarisch das Kniegelenk in den Mittelpunkt gestellt<sup>169</sup>.

Methode: Zunächst wurde eine Methode zum immunhistochemischen Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  als Parameter des oxidativen und nitrosativen Stress in der Synovialmembran entwickelt. Hiernach wurden Synovialmembranen (immunhistochemisch), Synovialflüssigkeit und Serum (jeweils mittels kompetitivem ELISA) von Patienten mit Gonarthrose ( $n=24$ ) und Patienten mit Meniskopathie ( $n=11$ ) und Kreuzbandrupturen ( $n=34$ ), die als Kontrollgruppen fungierten, auf das Vorhandensein beider Marker untersucht. Zuletzt wurden diese untereinander und mit klinisch und radiologisch erhobenen Charakteristika der Patienten (Schmerzniveau, BMI, Arthrosegrad nach Kellgren/Lawrence und Outerbridge) korreliert, um ihr Potential als nicht-invasiv gewinnbaren Biomarker der Gonarthrose zu fungieren, zu bestimmen<sup>169</sup>.

Ergebnisse: In den Synovialmembranen aller Versuchsgruppen waren 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  nachweisbar. Während sich im 3-Nitrotyrosin-Level keine signifikanten Mittelwertsunterschiede zeigten, war das 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$ -Level der Probanden mit Gonarthrose im Vergleich zu den Kontrollgruppen „Meniskopathie“ ( $p=0,04$ ) und „Kreuzbandruptur“ ( $p=0,01$ ) signifikant höher. 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  waren auch in der Synovialflüssigkeit und im Serum aller Versuchsgruppen nachweisbar, wobei sich lediglich deskriptiv ein höherer Level beider Marker in der Gruppe „Gonarthrose“ zeigte. Eine signifikante Korrelation zwischen Synovialflüssigkeit und Serum zeigte sich für keinen der Marker. Die 3-Nitrotyrosin- und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  -Level korrelierten mit dem Arthrosegrad nach Outerbridge<sup>169</sup>.

Schlussfolgerung: Oxidativer und nitrosativer Stress scheint via Inflammation in der Pathogenese der Gonarthrose eine Schlüsselrolle zu spielen. Als Oxidations-Marker konnten 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  identifiziert werden, sodass ihre Funktion als prädiktive Biomarker der Gonarthrose geprüft werden konnte. Was sie als solche qualifiziert, ist die Möglichkeit ihres validen Nachweises in leicht zugänglichem Gewebe, sowie ihre Korrelation mit etablierten diagnostischen Kriterien der

Arthrose. Ob die Marker jedoch spezifisch für die Gonarthrose sind und in welchem Gewebe die Marker bestimmt werden müssen, um eine sichere Aussage über das Maß der Gelenkschädigung treffen zu können, bleibt derzeit noch unklar und muss in Folgestudien untersucht werden. Sollten sich die Marker als Biomarker qualifizieren, so ergäben sich hieraus neue präventive, diagnostische und therapeutische Ansätze<sup>169</sup>.

## **Summary**

**Background:** Osteoarthritis (OA) has become a very common and devastating chronic disease leading to pain, mobility disability and invalidity<sup>10</sup>. Although some risk factors, like age, obesity and previous joint injury are well established, the exact pathogenesis of OA on a cellular and molecular level remains less understood<sup>124-126</sup>. Increasingly it is assumed that biochemical forces play a decisive role in the pathogenesis of OA. It appears that oxidative and nitrosative stress play an important role in it<sup>29,55,111</sup>.

**The objective** of this study was to identify biological substances, which reveal the degenerative changes of an osteoarthrotic joint and therefore could serve as a biomarker of advanced joint injury. In our study we focused on joint injury of the knee<sup>169</sup>.

**Method:** First, we developed a method for an immunohistochemical detection of 3-nitrotyrosine and 8-isoprostane  $F_{2\alpha}$  as markers of oxidative damage in the synovial membrane of the knee joint. Afterwards we analyzed the synovial membrane (via immunohistochemistry), the synovial fluid and serum (via competitive ELISA) of patients suffering from gonarthrosis ( $n=24$ ), meniscopathy ( $n=11$ ) and cruciate ligament rupture ( $n=34$ ), which functioned as a control group, on both markers. Finally, we correlated them with the patients' clinical and radiographic features (pain level, BMI, Kellgren/Lawrence and Outerbridge grading system for OA) to test their potential of serving as easily accessible biomarker of gonarthrosis<sup>169</sup>.

**Results:** 3-nitrotyrosine and 8-isoprostane  $F_{2\alpha}$  were detected in all experimental groups. While there was no difference in the mean level of 3-nitrotyrosine, the mean level of 8-isoprostane  $F_{2\alpha}$  was significantly higher in the group „gonarthrosis“ compared to the control group „meniscopathy“ ( $p=0,04$ ) and „cruciate ligament rupture“ ( $p=0,01$ ). 3-nitrotyrosine and 8-isoprostane  $F_{2\alpha}$  were both detectable in the synovial fluid and serum of all groups, but there was only a descriptive higher level of both markers in the group „gonarthrosis“. There was no significant correlation between the synovial fluid and serum for neither marker nor group. Both, 3-nitrotyrosine and 8-isoprostane  $F_{2\alpha}$  levels correlated with the radiographical Outerbridge and Kellgren/Lawrence grading system for OA<sup>169</sup>.

**Conclusion:** Oxidative and nitrosative stress, via inflammation, seems to play a key role in the pathogenesis of OA. 3-nitrotyrosine and 8-isoprostane  $F_{2\alpha}$  could be identified as markers of oxidative damage in gonarthrosis. Thus, their function as biomarkers of gonarthrosis could be tested. One feature that qualifies them for acting as biomarkers is the possibility of their valid detection in easily accessible tissue and the positive correlation with established diagnostic criteria of OA. Whether both markers are specific for gonarthrosis, and which tissue is best for testing, remains unclear and has to be examined in follow-up studies. If it is possible to qualify both markers as biomarkers of gonarthrosis they could account for new preventative, diagnostic and therapeutic treatment<sup>169</sup>.

## Abkürzungen

Abb. – Abbildung

ABC – *avidin-biotin-complex (engl.)*, Avidin-Biotin-Komplex

ACT – Autologe Chondrozytentransplantation

Ag – Antigen

Ak – Antikörper

ANOVA – *Analysis of variance (engl.)*, univariate Varianzanalyse

ATP – Adenosintriphosphat

BCA – *bicinchoninic acid (engl.)*, Bicinchoninsäure

BHT – Butylhydroxytoluol

BMI – *Body mass index* [kg/m<sup>2</sup>]

BSA – Bovines Serumalbumin

CAT – *catalase (engl.)*, Katalase

CU<sup>1+</sup> – einwertiges Kupfer

CU<sup>2+</sup> – zweiwertiges Kupfer

DAB – 3,3'-Diaminobenzidin

DU – *densitometric units (engl.)*, Densitometrische Einheiten

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay (engl.)*

Fe<sup>2+</sup> – zweiwertiges Eisen

Fe<sup>3+</sup> – dreiwertiges Eisen

GPX – Glutathionperoxidase

GSH – Glutathion (reduzierter Zustand)

GSSH – Glutathion (oxidiertes Zustand)

HCl – Salzsäure

HE – Hämatoxylin-Eosin

HO<sup>•</sup> – Hydroxylradikal

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Wasserstoffperoxid

HRP – *horseradish peroxidase (engl.)*, Meerrettichperoxidase

M – *Mean (engl.)*, arithmetischer Mittelwert

MMP – Matrix-Metalloprotease

NAD<sup>+</sup> – Nicotinamid- Adenin-Dinukleotid (oxidiertes Zustand)

NADH – Nicotinamid- Adenin-Dinukleotid (reduziertes Zustand)

NADP<sup>+</sup> – Nicotinamid- Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiertes Zustand)

NADPH – Nicotinamid- Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduziertes Zustand)

NaOH – Natriumhydroxid

NO – Stickstoffmonoxid

NO<sub>2</sub> – Stickstoffdioxid

NO<sub>2</sub><sup>+</sup> – Nitroniumion

NOS – Stickstoffmonoxid-Synthase

O<sub>2</sub> – Sauerstoff

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> – Superoxidanion

OH<sup>-</sup> – Hydroxylanion

OH<sup>•</sup> – Hydroxylradikal

ONOO<sup>-</sup> – Peroxynitritanion

PBS – *phosphate buffered saline (engl.)*, Phosphat-gepufferte Salzlösung

PFA – Paraformaldehyd

Prx – Peroxiredoxin

RNS – *reactive nitrogen species (engl.)*, Reaktive Stickstoffverbindungen

ROO<sup>•</sup> – Peroxylradikal

ROS – *reactive oxygen species (engl.)*, Reaktive Sauerstoffverbindungen

rpm – *rounds per minute (engl.)*, Umdrehungen pro Minute

SEM – *standard error of the mean (engl.)*, Standardfehler

SOD – Superoxiddismutase

TRIS – Tris-Hydroxymethylaminoethan

Trx<sub>ox</sub> – Thioredoxin (oxidierte Form)

Trx<sub>red</sub> – Thioredoxin (reduzierte Form)

TrxR – Thioredoxin-Reduktase

VAS – Visuelle Analogskala

WHO – *World Health Organization (engl.)*, Weltgesundheitsorganisation

## **Inhaltsverzeichnis**

<b><u>1. Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b><u>1.1 Anatomie und Funktion von Gelenken</u></b>	<b>1</b>
<b><u>1.2 Arthrose</u></b>	<b>2</b>
1.2.1 Definition	2
1.2.2 Epidemiologie	2
1.2.3 Ätiologie	3
1.2.4 Risikofaktoren der Arthroseentstehung und Progression	4
1.2.5 Pathophysiologie	7
1.2.6 Diagnostik	8
1.2.7 Klassifikation	9
1.2.8 Therapie und Prognose	10
<b><u>1.3 Zelluläre Redoxhomöostase</u></b>	<b>12</b>
1.3.1 Oxidativer und nitrosativer Stress	12
1.3.2 Das antioxidative System	15
1.3.3 Biomarker des oxidativen und nitrosativen Stress	18
1.3.3.1 8-Isoprostan F <sub>2α</sub>	18
1.3.3.2 3-Nitrotyrosin	18
<b><u>1.4 Oxidativer Stress und Arthroseentstehung</u></b>	<b>19</b>
<b><u>1.5 Ziele der Arbeit</u></b>	<b>21</b>
<b><u>2. Methodik</u></b>	<b>23</b>
<b><u>2.1 Studienaufbau</u></b>	<b>23</b>
<b><u>2.2 Probanden</u></b>	<b>23</b>
<b><u>2.3 Probengewinnung</u></b>	<b>25</b>
2.3.1 Blutproben	25
2.3.2 Synovialisbiopsien und Synovialflüssigkeit	25
2.3.3 Herstellung von Gefrierschnitten	26
<b><u>2.4 Quantifizierung des Entzündungsgrades der Synovialisbiopsien</u></b>	<b>26</b>
2.4.1 Synovialitis-Score nach Krenn	26
2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)	28
2.4.3 Lichtmikroskopische Auswertung	28

<b><u>2.5 Qualitativer Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in Synovialisbiopsien</u></b>	<b>29</b>
2.5.1 Immunhistochemie	29
2.5.2 Methoden zur Antigendemaskierung	29
2.5.3 Immunhistochemischer Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F <sub>2α</sub>	31
2.5.4 Densitometrie der immunhistochemischen Färbungen	33
<b><u>2.6 Quantifizierung des Proteingehalts der Synovialflüssigkeit mittels BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung</u></b>	<b>34</b>
<b><u>2.7 Quantitativer Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in der Synovialflüssigkeit und im Serum</u></b>	<b>36</b>
2.7.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	36
2.7.2 Kompetitive ELISA	37
2.7.3 Nachweis von 3-Nitrotyrosin	38
2.7.4 Nachweis von 8-Isoprostan F <sub>2α</sub>	39
<b><u>2.8 Statistische Auswertungen</u></b>	<b>40</b>
<b><u>3. Ergebnisse</u></b>	<b>41</b>
<b><u>3.1 Deskriptive Statistik</u></b>	<b>41</b>
<b><u>3.2 Korrelationen klinischer Charakteristika</u></b>	<b>42</b>
3.2.1 Subjektives Schmerzempfinden versus Schweregrad der Gelenkschädigung	42
3.2.2 Zusammenhang zwischen BMI, Schmerzempfinden und Ausmaß der Gelenkschädigung	42
3.2.3 Zusammenhang zwischen Arthroseggrad nach Kellgren/Lawrence und Outerbridge	43
3.2.4 Ausmaß der Gelenkschädigung zwischen den drei Versuchsgruppen	43
3.2.5 Ausmaß des Entzündungsgrades der Synovialisbiopsien	47
3.2.6 Zusammenhang zwischen Synovialitis, Knieschmerz, BMI und Ausmaß der Gelenkschädigung	48
<b><u>3.3 Etablierung einer Färbemethode für den immunhistochemischen Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in Synovialisbiopsien</u></b>	<b>50</b>
3.3.1 Nachweismethode für 3-Nitrotyrosin	51
3.3.2 Nachweismethode für 8-Isoprostan F <sub>2α</sub>	51
<b><u>3.4 Nachweis von Parametern des oxidativen und nitrosativen Stress in Synovialisbiopsien</u></b>	<b>52</b>
3.4.1 Nachweis von 3-Nitrotyrosin in den Synovialisbiopsien	52
3.4.2 Nachweis von 8-Isoprostan F <sub>2α</sub> in den Synovialisbiopsien	53
3.4.3 Zusammenhang zwischen 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F <sub>2α</sub> in den Synovialisbiopsien	55

3.4.4 Zusammenhang zwischen Synovialitis und 3-Nitrotyrosin bzw. 8-Isoprostan F <sub>2α</sub> in den Synovialisbiopsien	55
3.4.5 Zusammenhang zwischen Arthrosegrad nach Outerbridge und 3-Nitrotyrosin bzw. 8-Isoprostan F <sub>2α</sub> in den Synovialisbiopsien	55
<b><u>3.5 Quantitativer Nachweis von Parametern des oxidativen und nitrosativen Stress in der Synovialflüssigkeit</u></b>	<b>56</b>
3.5.1 Nachweis von 3-Nitrotyrosin in der Synovialflüssigkeit	56
3.5.2 Nachweis von 8-Isoprostan F <sub>2α</sub> in der Synovialflüssigkeit	57
<b><u>3.6 Quantitativer Nachweis von Parametern des oxidativen und nitrosativen Stress im Serum</u></b>	<b>58</b>
3.6.1 Nachweis von 3-Nitrotyrosin im Serum	58
3.6.2 Nachweis von 8-Isoprostan F <sub>2α</sub> im Serum	59
<b><u>3.7 Zusammenhänge zwischen Parametern des oxidativen und nitrosativen Stress in Serum und Synovialflüssigkeit</u></b>	<b>60</b>
<b><u>4. Diskussion</u></b>	<b>61</b>
<b><u>4.1 Klinische Charakteristika der Versuchsgruppen</u></b>	<b>61</b>
4.1.1 Probandenkollektiv	61
4.1.2 Schmerz als Marker einer Gelenkschädigung	62
4.1.3 BMI als Marker einer Gelenkschädigung	63
4.1.4 Synovialitis als Marker einer Gelenkschädigung	64
<b><u>4.2 Immunhistochemischer Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in der Synovialmembran</u></b>	<b>65</b>
<b><u>4.3 3-Nitrotyrosin als Biomarker der Gonarthrose und Gelenkschädigung</u></b>	<b>66</b>
<b><u>4.4 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> als Biomarker der Gonarthrose und Gelenkschädigung</u></b>	<b>69</b>
<b><u>4.5 Einschränkungen der Studie</u></b>	<b>74</b>
<b><u>4.6 Fazit und Ausblick</u></b>	<b>75</b>
<b><u>5. Literaturverzeichnis</u></b>	<b>77</b>
<b><u>6. Danksagung</u></b>	<b>85</b>

# **1. Einleitung**

## **1.1 Anatomie und Funktion von Gelenken**

Gelenke, als Verbindungsglieder zwischen den Knochen, ermöglichen die Bewegungen des menschlichen Körpers. Sie dienen einerseits als Auffang-, Puffer- und Verteilungsinstrument von Druckstößen und Zugkräften und andererseits zur Übertragung von Krafteinwirkungen auf andere Skeletteile.

Gelenke lassen sich in unechte (*Synarthrosen*) und echte Gelenke (*Diarthrosen*) einteilen. Während Synarthrosen die Gelenkkörper mittels Knorpel oder Bindegewebe verbinden und nur eingeschränkte Bewegungen zulassen, erlauben Diarthrosen einen großen Bewegungsradius. Dieser wird durch den Gelenkspalt, als Teil der Gelenkhöhle, ermöglicht. Die Gelenkhöhle wird durch die Gelenkkapsel begrenzt, die aus einer äußeren Bindegewebsschicht (*Membrana fibrosa*) sowie einer elastischen, gut durchbluteten Innenhaut (*Membrana synovialis*, Synovialmembran) besteht<sup>1</sup>. Aufgrund des Aufbaus der Synovialmembran, einem ein- bis zweireihigen Zellverband mit diskontinuierlicher Basalmembran und einem stark vaskularisierten *Stratum synoviale*, ist ein ungehindertes Eindringen von Noxen aus dem Blutstrom und dem umgebenden Bindegewebe in das Gelenk möglich<sup>2</sup>.

Um einen Knochenabrieb während Bewegungen zu verhindern, sind die Knochenenden der Gelenkkörper mit hyalinem Gelenkknorpel überzogen. Dieser glatte Knorpel gleicht Unregelmäßigkeiten der Knochenstruktur aus und wirkt als elastisches Polster, das Krafteinwirkungen abfedern und gleichmäßig über das Gelenk verteilen kann<sup>3,4</sup>.

Der hyaline Knorpel besteht zu 5% aus Chondrozyten und zu 95% aus der von ihnen gebildeten extrazellulären Matrix. Diese besteht aus Kollagen (Typ II), Hyaluronsäure, Proteoglykanen und Glykoproteinen. Die Proteoglykane, die vor allem aus Chondroitinsulfat und Keratansulfat gebildet werden, gehen nicht-kovalente Bindungen mit Hyaluronsäuremolekülen ein und bilden bis zu 4 µm lange Proteoglykan-Aggregate, die mit Kollagen interagieren. Aufgrund der negativen Ladungen der Seitenketten der Proteoglykane können Wasser und Ionen gebunden werden. Der hohe Wassergehalt des Knorpels kann so als biomechanischer Stoßdämpfer den mechanischen Beanspruchungen des Gelenkes entgegenwirken<sup>1</sup>.

Da der Gelenkknorpel kein Perichondrium zur Gefäßversorgung besitzt, sind die Chondrozyten auf Diffusion von Sauerstoff und Nährstoffen aus der Gelenkflüssigkeit (Synovialflüssigkeit/Synovia) und dem subchondralen Knochen angewiesen. Die Synovialflüssigkeit ist eine transparente, zähe Flüssigkeit. Sie ist ein Ultrafiltrat des Blutplasmas mit einem hohen Gehalt an Protein (22 – 30 mg/mL)<sup>5-7</sup> und Hyaluronsäure und wird von den Zellen der *Membrana synovialis*, den Synoviozyten, hergestellt<sup>1</sup>.

Ein optimaler Stoffaustausch wird während einer Bewegung des Gelenkes erzielt, da hierbei Wasser und die darin gelösten Nährstoffe besser transportiert werden. Dies wird durch eine abwechselnde Kompression und Dekompression des Knorpels, die zu einer Konvektion der Extrazellulärflüssigkeit führt, erreicht. Während der Knorpelkompression wird ungebundenes Wasser mit den darin gelösten Abbauprodukten in die Synovia gepresst und an das Blut abgegeben, reichert sich mit Nährstoffen und Sauerstoff an und wird während der Knorpeldekompression wieder zurück in die Zwischenräume der Seitenketten der Proteoglykane gezogen <sup>1</sup>.

Zusätzlich zu ihren nutritiven Aufgaben reduziert die Synovialflüssigkeit die mechanische Reibung innerhalb der Gelenkhöhle, indem sie unter Druckbelastungen einen Gleitfilm zwischen den artikulierenden Knorpeln entstehen lässt. Bei struktureller Integrität der extrazellulären Knorpelmatrix und einem intakten Stoffwechsel der Chondrozyten wird das Gelenk folglich mit dem geringsten Widerstand und der geringsten Verschleißwirkung bewegt <sup>8</sup>.

## **1.2 Arthrose**

### **1.2.1 Definition**

Die Arthrose (Synonyme u. a. Arthrosis deformans, Osteoarthrose, englisch *osteoarthritis*) ist eine heterogene Gruppe von Erkrankungen des Gelenksystems, welches aus Knorpel, subchondralem Knochen, Synovialmembran (*Synovialis*), Gelenkskapsel und periartikulärem Binde- und Stützgewebe besteht <sup>9</sup>. Die Arthrose ist durch einen progressiven Verlust des Gelenkknorpels, subchondrale Sklerose, Bildung von Osteophyten und Entzündung im synovialen Kompartiment gekennzeichnet. Diese krankhaften Veränderungen können sich im Krankheitsverlauf in Form von Schmerzen und Funktionsstörungen äußern, welche für die Betroffenen im Allgemeinen zu Immobilität, Behinderungen und Einschränkungen im Alltag und somit zu einem erheblichen Verlust an Lebensqualität führen. Vereinzelt bleibt die Arthrose jedoch auch bis ins fortgeschrittene Stadium klinisch asymptomatisch <sup>10</sup>.

### **1.2.2 Epidemiologie**

Die Arthrose gilt weltweit als häufigste Gelenkerkrankung des erwachsenen Menschen <sup>11-13</sup>. Aufgrund der enormen Krankheitslast und eines erheblichen Verlustes an Lebenszeitqualität rief die Weltgesundheitsorganisation die Jahre 2000 bis 2010 zur Knochen- und Gelenk-Dekade („Bone-and-Joint-Decade“) aus <sup>14</sup>.

Die Prävalenz der Arthrose steigt mit dem Lebensalter: So reicht die Prävalenz der schweren Gonarthrose von 1% bei Patienten zwischen 25 – 35 Jahren bis zu 30% bei Patienten im Alter von 75 Jahren <sup>15</sup>.

Frauen erkranken häufiger an Arthrose als Männer<sup>12,13,15</sup>. Das Verhältnis von betroffenen Frauen zu Männern variiert in verschiedenen Studien von 1,5:1 bis 4:1<sup>15</sup>. In Deutschland hat das Robert-Koch-Institut von 2003 – 2010 verschiedene Befragungen zum Gesundheitszustand der erwachsenen Bevölkerung im Allgemeinen und zur Arthrose-Erkrankung im Speziellen durchgeführt. Hierbei lag die Lebenszeitprävalenz der Frauen für Arthrose im Jahr 2010 bei einem Viertel, diejenige der Männer bei einem Sechstel. Im gesamten Befragungszeitraum konnte ein Anstieg der Arthrose-Prävalenz verzeichnet werden: So stieg sie bei Frauen von 22,6% auf 27,1% und bei Männern von 15,5% auf 17,9%<sup>4,16</sup>.

Die am häufigsten betroffenen Gelenke sind Knie-, Hüft-, Finger- und Wirbelgelenke<sup>17</sup>. Besondere Bedeutung haben vor allem die Gon- und Coxarthrose erlangt, da durch sie die sozioökonomischen Belastungen ebenso wie die individuelle Beeinträchtigung der Patienten erheblich sind<sup>18</sup>. In diesem Rahmen sind vor allem eine erhöhte Morbidität und Mortalität sowie chronische oder zeitweilige Invalidität zu nennen<sup>19</sup>.

Da der Anteil von alten und sehr alten Menschen in der Bevölkerung aufgrund des demografischen Wandels beständig wächst, lässt sich erwarten, dass die Arthrose auch in Zukunft eine große Belastung für den einzelnen Patienten und für die Gesellschaft darstellen wird<sup>20,21</sup>.

Um diesen Zukunftsbürden entgegenwirken zu können und die Krankheitslast jedes Einzelnen zu verringern, ist es wichtig Fortschritte im Verständnis der Arthroseentstehung zu erzielen. Eine gezielte Prävention und Entwicklung wirksamer Therapien kann nur dann verwirklicht werden, wenn die Pathogenese auch auf molekularer und zellulärer Ebene verstanden wird.

### **1.2.3 Ätiologie**

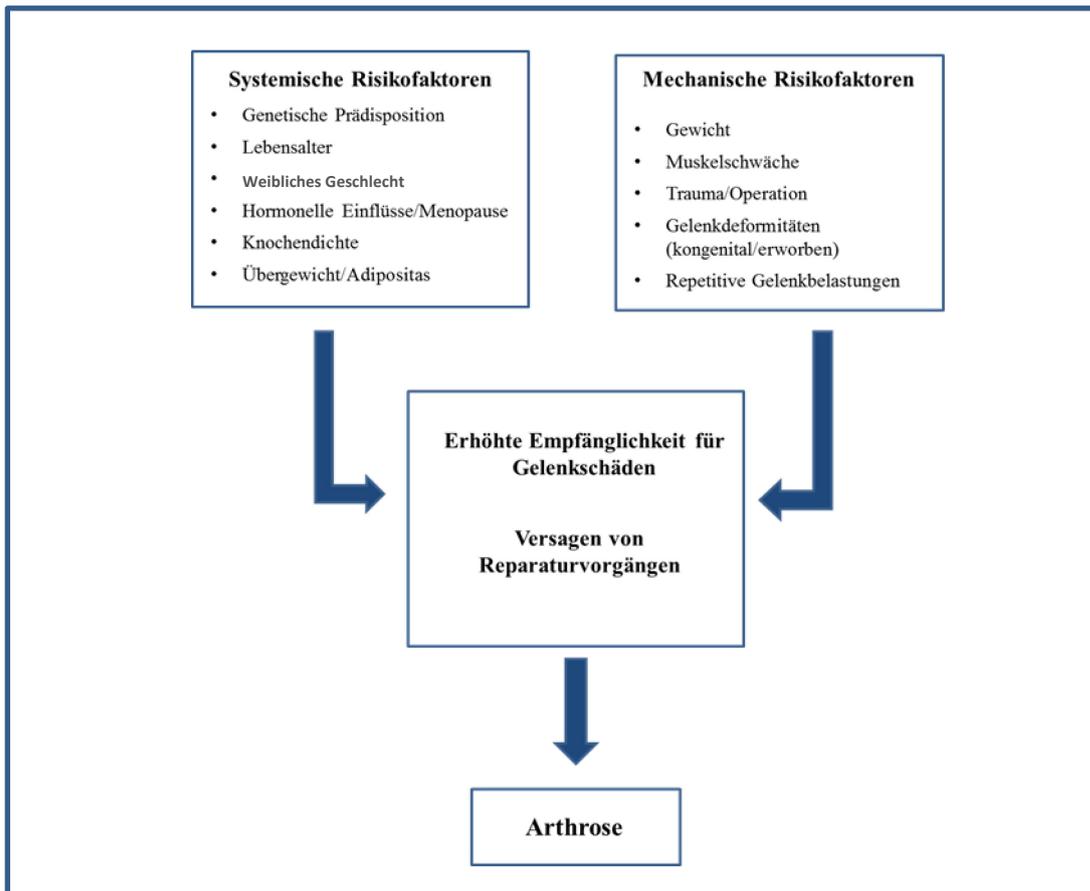
Die Arthrose kann unter ätiologischen Gesichtspunkten in zwei Kategorien unterteilt werden. Zum einen in die primäre (idiopathische) Arthrose, deren Ursache weiterhin als unbekannt gilt, zum anderen in die sekundären Arthrosen. Die Ursachen der sekundären Arthrose lassen sich in vier pathogenetische Hauptkategorien einteilen. Hier sind vor allem die metabolisch-endokrinen, anatomischen, traumatischen und inflammatorisch bedingten Veränderungen des Gelenkes zu nennen. Weitere Details zur Einteilung der sekundären Arthrose sind in Tabelle 1 dargestellt.

**Tabelle 1 Klassifikation der sekundären Arthrose** (modifiziert nach <sup>15</sup>)

Metabolisch-endokrin	<ul style="list-style-type: none"><li>• Rachitis</li><li>• Hämochromatose</li><li>• Chondrocalzinose</li><li>• Ochronose</li><li>• Akromegalie</li><li>• Hyperparathyreoidismus</li><li>• Hyperurikämie</li></ul>
Anatomisch	<ul style="list-style-type: none"><li>• Kongenitale Fehlbildungen</li><li>• Gelenkfehlstellung</li><li>• Hypermobilitätssyndrome</li></ul>
Traumatisch	<ul style="list-style-type: none"><li>• Gelenktrauma/Gelenkfraktur</li><li>• Aseptische Osteonekrosen</li><li>• Operationen (z. B. Menishektomie)</li><li>• Chronische Traumata (<i>occupational arthropathies</i>)</li></ul>
Inflammatorisch	<ul style="list-style-type: none"><li>• Septische Arthritis</li><li>• Bakterielle Arthritis</li><li>• Rheumatoide Arthritis</li></ul>

#### **1.2.4 Risikofaktoren der Arthroseentstehung und Progression**

Für die Entstehung der Arthrose werden definierte Risikofaktoren verantwortlich gemacht. Diese lassen sich in systemische und lokale biomechanische Risikofaktoren unterteilen. Eine Übersicht über das Zusammenwirken der verschiedenen Risikofaktoren bis zur Entwicklung einer Arthrose zeigt Abbildung 1.



**Abbildung 1 Zusammenhang der bisher als etabliert geltenden Risikofaktoren in der Entstehung der Arthrose (modifiziert nach <sup>15</sup>)**

Die systemischen Risikofaktoren können das Risiko für eine Gelenkschädigung durch verschiedene Prozesse erhöhen: Zum einen können sie die generelle Empfänglichkeit des Gelenks für eine Schädigung steigern, zum anderen können sie die Gelenksgewebe direkt schädigen oder die Reparaturvorgänge verhindern <sup>15</sup>.

Als wesentlicher Risikofaktor für das Auftreten der Arthrose gilt das Lebensalter, da Prävalenz und Inzidenz der radiologisch-definierten und symptomatischen Arthrose mit dem Lebensalter steigen und in der 7. Lebensdekade eine Plateauphase erreichen <sup>22-24</sup>. Die Entwicklung einer Arthrose kann jedoch nicht allein als Alterungsprozess erklärt werden, da klare Unterschiede zwischen einem „Altersgelenk“ und einem arthrotisch veränderten Gelenk bestehen. Die durch Alterung eingetretenen Gelenkveränderungen werden von Hackenbroch (1992) als eine endgradige Bewegungseinschränkung mit dezent vermindertem Gelenkspalt, Schmerzfreiheit und einem Fehlen sicherer radiologischer Arthrosezeichen definiert <sup>25</sup>. Der Zusammenhang zwischen Lebensalter und Entwicklung einer Arthrose wird daher wahrscheinlich über verschiedene andere altersabhängige Risikofaktoren

vermittelt <sup>15</sup>. Eine große Rolle spielen Übergewicht (BMI = 25,0-29,9 kg/m<sup>2</sup>) und Adipositas (BMI ≥ 30 kg/m<sup>2</sup>), die zu enormen Gelenkbelastungen führen <sup>17</sup>. Zudem sind im Alter verschiedene neuromuskuläre Schutzfunktionen gestört. Ein vermehrter Muskelabbau und eine eingeschränkte Funktion des peripheren Nervensystems, insbesondere ein eingeschränktes Sensorium, führen zu einer erhöhten Instabilität, die schließlich zu einer Fehlbelastung des Gelenkes führen kann <sup>26-28</sup>. Darüber hinaus können die verschiedenen Gewebekomponenten des Gelenks Einbußen der Reparaturmechanismen verzeichnen. Die Belastbarkeit des Knorpels nimmt im Alter ab <sup>29</sup>. Die anabole Antwort auf Wachstumshormone und Wachstumsfaktoren sinkt. Es kommt zu einem Verlust an Chondrozyten und die Knorpeldicke wird durch natürlichen Knorpelabbau dünner <sup>30</sup>.

Als weiterer systemischer Risikofaktor gilt das Geschlecht. Wie oben beschrieben, sind Frauen häufiger als Männer von Arthrose betroffen. Zudem steigt bei Frauen das Risiko eine Arthrose zu entwickeln besonders nach der Menopause an. Dies lässt einen Zusammenhang mit dem verminderten Vorhandensein des weiblichen Geschlechtshormons Östrogen vermuten <sup>15</sup>.

Lokale biomechanische Faktoren schränken die optimale Gelenkfunktion ein, sodass die Gelenke einer übermäßigen Belastung ausgesetzt sind. Dies erklärt, dass repetitive Traumata zu einer bleibenden Gelenkverletzung führen können <sup>15</sup>. Dadurch wird auch die Bedeutung von repetitiven Mikrotraumata, die bei beruflicher und sportlicher Betätigung auftreten können, als weiterer Risikofaktor deutlich. Ein vergleichbarer Mechanismus wird auch bei Fehlstellungen angenommen. Aus einer Achsendeformität resultiert eine Fehlbelastung der Gelenkoberfläche, in deren Folge die irreversible Gewebeschädigung eintritt <sup>8</sup>.

Vor allem Übergewicht und Adipositas führen zur Entstehung und Aggravierung einer vorbestehenden Arthrose <sup>31</sup>. Ein höheres Körpergewicht führt zu Knorpelabbau und zur Schädigung des ligamentären Halteapparates des Gelenks <sup>15</sup>. Zudem wird vermutet, dass metabolische Faktoren, wie zirkulierende Adipozytokine, Veränderungen des Lipidstatus, erhöhte Serumglucose und eine chronische Entzündungsreaktion, zu einer Progression der Gelenksdegeneration führen <sup>32-34</sup>.

Sowohl die systemischen als auch die biomechanischen Risikofaktoren tragen zur Initiation der Schädigung der verschiedenen Kompartimente des Gelenks bei. Sie initiieren komplexe biochemische Prozesse, welche im Folgenden sowohl Knorpel, Knochen als auch Synovia schädigen <sup>35</sup>.

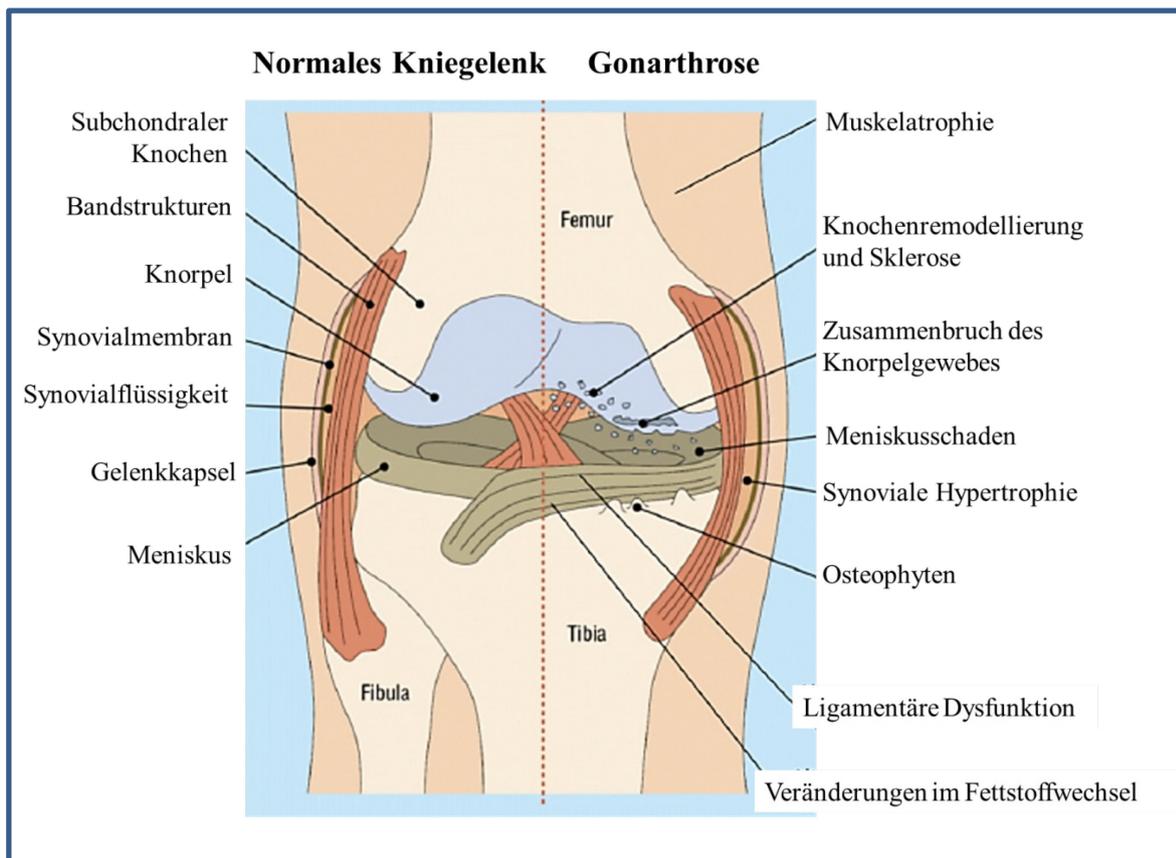
### 1.2.5 Pathophysiologie

Die Integrität eines Gelenks wird durch ein dynamisches Gleichgewicht aus Auf- und Abbau der Komponenten des Gelenkgewebes aufrechterhalten. Dieses Gleichgewicht kann sowohl durch eine zu hohe mechanische Beanspruchung eines gesunden Gelenkes, als auch durch eine physiologische Beanspruchung eines erkrankten Gelenkes gestört werden<sup>36</sup>. Gerät das Gleichgewicht aus der Balance, kann es zur Entwicklung einer Arthrose als Ausdruck des Gelenkversagens kommen<sup>37</sup>.

Anabole und katabole Vorgänge innerhalb der Chondrozyten halten das Gleichgewicht des Knorpelstoffwechsels aufrecht. Bei einer Störung innerhalb dieses Systems kommt es zum Abbau der Knorpelmatrix: Defekte der Knorpelschicht sind das Resultat<sup>8</sup>. Die Chondrozyten reagieren auf diese Defekte mit einer vermehrten Synthese von Matrixbestandteilen. Diese gewährleisten zunächst eine ungestörte Gelenkfunktion, weisen jedoch verglichen mit den ursprünglichen Matrixelementen geringere Resistenz gegenüber Gelenkbelastungen auf. Nach einem unbestimmten Zeitraum kommt es daher meist zu einer irreversiblen Schädigung des Gelenkknorpels<sup>25</sup>.

Pathomorphologisch verläuft die Schädigung des Gelenkknorpels in definierten Stadien, die jeweils auch parallel zueinander verlaufen. Zunächst kommt es zur Knorpelerweichung, später zu Knorpelrissen (Fissuren), die bis auf den subchondralen Knochen reichen können<sup>8</sup>. Durch die Fissuren entstehen Unebenheiten in der Knorpeloberfläche, die dazu führen, dass es während Gelenkbewegungen zu einem weiteren Abrieb (Abrasion) der Knorpelschicht kommt<sup>25</sup>. Folge der Abrasion ist zum einen, dass Knorpeldetritus in die Synovialflüssigkeit gelangt und hier Entzündungsreaktionen hervorrufen kann, zum anderen, dass es zu einem kompletten Verlust der Knorpelschicht kommt. Die „Knochenglatze“ als morphologisches Endstadium des Knorpelverlustes ist erreicht<sup>8</sup>. Der Knochen, der nun ungeschützt den mechanischen Einflüssen des Gelenks unterliegt, reagiert auf die einwirkenden Kräfte mit Verdichtung der subchondralen Knochenlamelle. Nach vollständigem Knorpelabrieb wirkt der Knochen sklerosiert, kann den mechanischen Belastungen aber nicht standhalten. Er wird weiter abgeschliffen und es kommt zu einer Eröffnung der Knochenmarkräume. Hier sammeln sich Knochensplinter, Knorpel- und Zelldetritus, sodass es schließlich zur Ausbildung von Geröllzysten kommt<sup>38</sup>. Um den mechanischen Kräften entgegenwirken zu können und den Auflagedruck zu reduzieren, kommt es zur Verbreiterung der knöchernen Auflagefläche und Ausbildung von Osteophyten. Morphologisch bewirkt dies eine Gelenkdeformierung und Gelenkverdickung<sup>25,39</sup>.

Eine zusammenfassende Übersicht über die Veränderungen an einem arthrotischen Kniegelenk im Vergleich zu einem gesunden Kniegelenk gibt Abbildung 2.



**Abbildung 2 Schematische Darstellung der Veränderungen eines arthrotisch veränderten Kniegelenks im Vergleich zu einem gesunden Kniegelenk (modifiziert nach <sup>10</sup>).** Die pathophysiologischen Veränderungen in der Entwicklung der Arthrose betreffen alle Gelenkkompartimente (1. Subchondraler Knochen, 2. hyaliner Knorpel, 3. Synovialmembran). Links Darstellung des gesunden Knies, rechts Darstellung der pathophysiologischen Veränderungen bei Gonarthrose.

### 1.2.6 Diagnostik

Die Arthrose kann über die klinische Präsentation, strukturelle Pathologie und die Kombination von beidem diagnostiziert und quantifiziert werden <sup>15</sup>. Als klinische Diagnosekriterien gelten die vom *American College of Rheumatology (ACR)* 1986 festgelegten Kriterien, die in Tabelle 2 exemplarisch für die Gonarthrose aufgeführt sind <sup>40</sup>.

**Tabelle 2 Klinische Diagnosekriterien des *American College of Rheumatology* (ACR) für Gonarthrose (modifiziert nach <sup>40</sup>).**

<b>Klinische Symptomatik</b>	<b>Diagnosekriterien gelten als erfüllt, wenn folgende Punkte vorhanden sind</b>
1.) Knieschmerzen an den meisten Tagen des vorherigen Monats	1,2,3,4 oder 1,2,5 oder 1,4,5
2.) Krepitus während aktiver Gelenkbewegung	
3.) Morgensteifigkeit $\leq 30$ Minuten	
4.) Alter $\geq 38$ Jahre	
5.) Durch Palpation erfasste Vergrößerung der knöchernen Anteile des Kniegelenks	
<b>Klinische Symptomatik und Radiologische Kriterien</b>	
1.) Knieschmerzen an den meisten Tagen des vorherigen Monats	1,2 oder 1,3,5,6 oder 1,4,5,6
2.) Vorhandensein von Osteophyten	
3.) Für Arthrose typische laborchemische Zusammensetzung der Synovialflüssigkeit	
4.) Alter $\geq 40$ Jahre	
5.) Morgensteifigkeit $\geq 30$ Minuten	
6.) Krepitus während aktiver Gelenkbewegung	

### 1.2.7 Klassifikation

Für den bildmorphologischen Nachweis einer Gonarthrose haben sich die radiologischen Zeichen nach Kellgren und Lawrence (1957)<sup>41</sup> etabliert. Diese beurteilen den Arthrosegrad anhand von konventionellen Röntgenaufnahmen, die standardisiert in mindestens zwei Ebenen (anterior-posterior und lateral) aufgenommen werden. Hierbei wird das Gelenk auf das Vorhandensein von Gelenkspaltverschmälerung, Osteophytenbildung, Entstehung subchondraler Sklerose, Geröllzystenbildung und Gelenkdeformität untersucht. Abhängig vom Befund kann ein Arthrosegrad von 0 - 4 erhoben werden (s. Tabelle 3).

**Tabelle 3 Röntgenmorphologische Stadieneinteilung der Gonarthrose nach Kellgren und Lawrence (modifiziert nach <sup>41</sup>).**

Grad 0	Kein Merkmal einer Gonarthrose
Grad 1	Initiale Arthrose, beginnende Osteophytenbildung

Grad 2	Osteophyten, mäßige Gelenkspaltverschmälerung, mäßige subchondrale Sklerosierung
Grad 3	Ausgeprägte Osteophytenbildung, > 50% Gelenkspaltverschmälerung, Entrundung des Condylus femoris, ausgedehnte subchondrale Sklerosierung
Grad 4	Gelenkdestruktion mit aufgehobenem Gelenkspalt, Geröllzysten, Subluxationsstellung

Zur Beschreibung und Beurteilung des pathomorphologischen Knorpelbefundes im Rahmen einer Arthroskopie hat sich die Klassifikation nach Outerbridge durchgesetzt<sup>42,43</sup>. Diese Klassifikation wurde ursprünglich zur Beurteilung des Krankheitsbildes der *Chondromalacia patellae* entwickelt, setzte sich jedoch im Laufe der Zeit auch zur Beschreibung von Knorpelschäden an anderen Gelenken des Körpers durch<sup>43</sup>. Neben dem Normalbefund (Grad 0) teilt sie Knorpelschäden in vier Schweregrade ein (s. Tabelle 4). Im Gegensatz zu konventionellen Röntgenaufnahmen und magnetresonanz-tomographischen Schnittbildaufnahmen ermöglicht die arthroskopische Untersuchung eine genauere und frühere Diagnose von Knorpelschäden<sup>44-46</sup>.

**Tabelle 4 Klassifikation von Knorpelschäden anhand arthroskopischer Bilder nach Outerbridge<sup>42</sup>**

Grad 0	Normalbefund, intakter Knorpel mit glatter weißer Oberfläche und guter Konsistenz
Grad 1	Erweichung der Oberfläche, aber glatt erhaltene Oberfläche ohne Fibrillation
Grad 2	Aufaserung der Oberfläche mit Einrissen und deutlicher Fibrillation
Grad 3	Tiefe Fissuren, Ulcera mit instabilen oder unterminierten Rändern, subchondraler Knochen ist jedoch noch nicht erreicht
Grad 4	Knorpelverlust bis auf den subchondralen Knochen

### 1.2.8 Therapie und Prognose

Da die genauen Entstehungsmechanismen der Arthrose noch nicht vollständig geklärt sind, bleibt die Arthrose bisher eine chronische Erkrankung. Diese ist bis zum jetzigen Zeitpunkt nicht heilbar<sup>25,47,48</sup>. Die Therapie verfolgt daher die Ziele klinische Symptome zu bekämpfen, die Lebensqualität der Betroffenen zu verbessern, die Beweglichkeit der Gelenke wieder herzustellen und nach Möglichkeit eine Progredienz der Erkrankung zu verhindern<sup>47</sup>.

In erster Linie wird eine konservative Therapie der klinisch relevanten Arthrose angestrebt. Hierbei kommen Allgemeinmaßnahmen wie eine Anpassung der Lebensweise, Gewichtsreduktion und Meidung belastender Noxen zur Anwendung. Physikalische und physiotherapeutische Maßnahmen sowie eine orthopädische Hilfsmittelversorgung werden unterstützend durchgeführt<sup>8,47</sup>. Um eine Schmerzlinderung zu erzielen stehen verschiedene Behandlungsansätze zur Verfügung. Zum einen

kann eine signifikante Schmerzreduktion unter manuell-therapeutischer Behandlung erzielt werden, zum anderen stehen Analgetika zur Verfügung. Bei einer entzündlich „aktivierten“ Arthrose können intraartikuläre Injektionen von Kortikosteroiden, durch ihre antiphlogistische Wirkung - Hemmung der Phospholipase A und somit Hemmung der Umwandlung der Membranphospholipide in Arachidonsäure und deren Derivate den Entzündungsmediatoren Prostaglandin E2 und Leukotriene<sup>167</sup> - die Entzündungssymptomatik lindern<sup>47</sup>.

Besteht trotz konservativer Therapie weiterhin eine klinisch relevante Arthrose, sind abhängig vom Schweregrad der Arthrose und der subjektiven Beschwerdesymptomatik operative Therapiemaßnahmen indiziert<sup>47</sup>.

Bei den operativen Therapiemaßnahmen unterscheidet man gelenkerhaltende, gelenkersetzende und gelenkeliminierende Operationsverfahren (Übersicht siehe Tabelle 5)<sup>8,25</sup>. Welche Operation durchgeführt wird, hängt unter anderem vom Ausmaß der Arthrose, dem physischen Befinden des Patienten sowie dem subjektiven Leidensdruck ab<sup>25</sup>.

**Tabelle 5 Operationsmethoden zur Arthrosetherapie (modifiziert nach<sup>4</sup>)**

<b>Gelenkerhaltene Operationen</b>	
<i>Arthroskopie</i>	Lavage (Gelenkspülung) Shaving (Knorpelglättung) Débridement
	<u><i>Knochenmarkstimulierende Techniken</i></u>
	Knochenanbohrung (Pridie-Bohrung) Mikrofrakturierung Abrasionsarthroplastik
	<u><i>Gelenkflächenwiederherstellung</i></u>
	Autologe osteochondrale Transplantation Alleinige autologe Chondrozytentransplantation Matrixgekoppelte autologe Chondrozytentransplantation
<i>Gelenknahe Umstellungsosteotomien</i>	
<b>Gelenkersetzende Operationen</b>	
<i>Endoprothetik</i>	Totalendoprothetik Teilendoprothetik Individualendoprothetik
<b>Gelenkeliminierende Operationen</b>	
<i>Arthrodesen</i>	

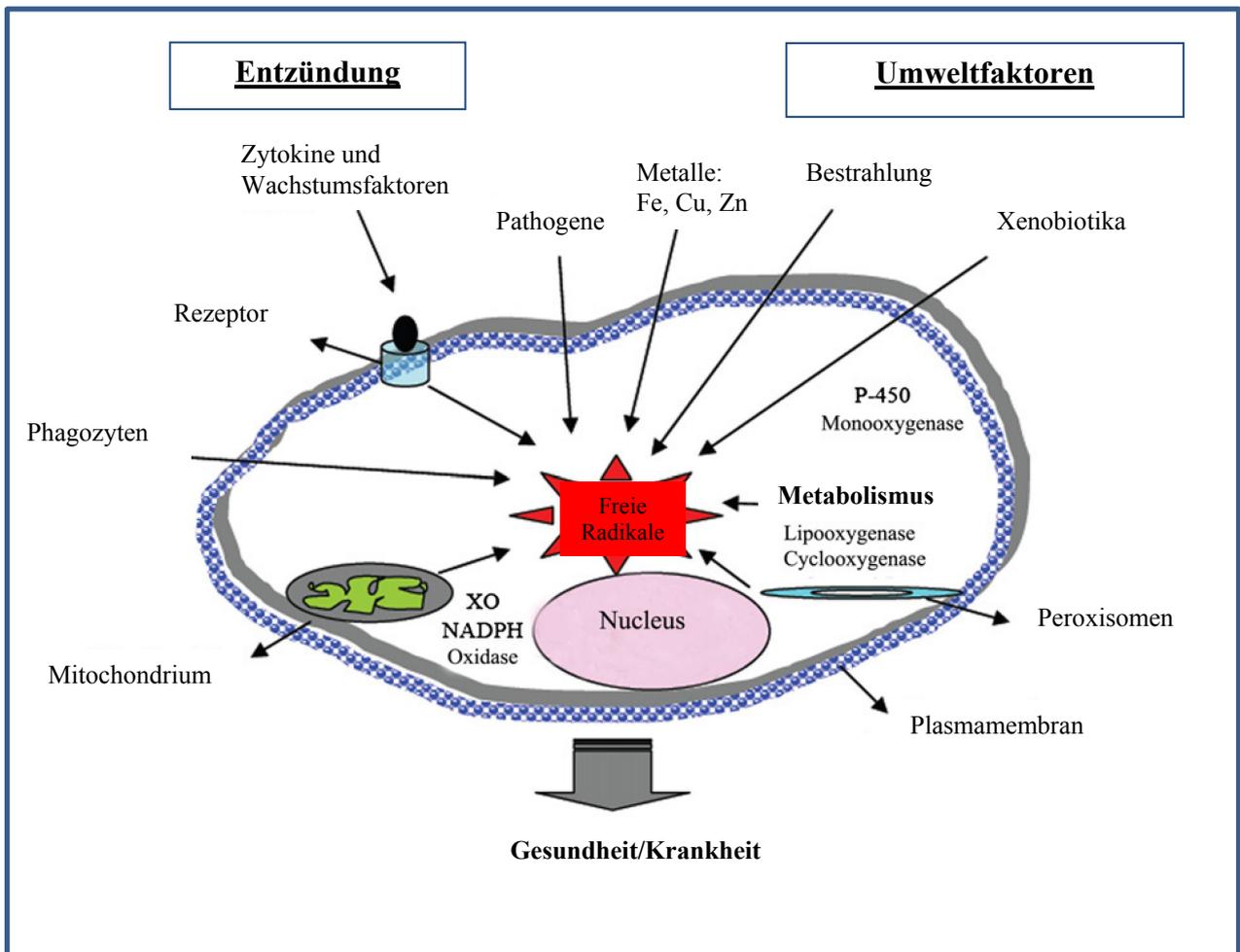
### **1.3. Zelluläre Redoxhomöostase**

#### **1.3.1 Oxidativer und nitrosativer Stress**

Die Zellen des menschlichen Organismus sind verschiedenen reaktionsfreudigen Agenzien ausgesetzt<sup>49,50</sup>. Diese lassen sich in reaktive Sauerstoffverbindungen (engl. *reactive oxygen species*, ROS), reaktive Stickstoffverbindungen (engl. *reactive nitrogen species*, RNS) und freie Radikale unterteilen<sup>49</sup>.

Freie Radikale, ROS und RNS sind Ionen oder kleine Moleküle, die ungepaarte Valenzelektronen oder eine offene Elektronenhülle besitzen<sup>51</sup>. Sie weisen eine oder mehrere nicht-gesättigte Bindungen auf. Diese Eigenschaft macht sie chemisch hoch reaktiv gegenüber anderen Substanzen oder sich selbst gegenüber. Die erhöhte Reaktionsbereitschaft weitere „freie Elektronen“ aufzunehmen oder eigene Elektronen anderen Molekülen abzugeben resultiert meist in irreversiblen Bindungen<sup>49,52,53</sup>.

Sowohl ROS als auch RNS und ihre Derivate werden während verschiedener physiologischer Vorgänge des zellulären Metabolismus produziert (s. Abbildung 3), spielen aber auch in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen, wie zum Beispiel kardiovaskulärer Erkrankungen, Artherosklerose, Arterielle Hypertonie, Diabetes mellitus und neurodegenerativer Erkrankungen (Morbus Alzheimer, Morbus Parkinson) eine entscheidende Rolle<sup>49,50</sup>. Die Reaktionsfreudigkeit der verschiedenen Verbindungen variiert erheblich<sup>54</sup>.



**Abbildung 3 Extra- und intrazelluläre Entstehung von reaktiven Sauerstoffspezies.** ROS werden während vieler physiologischer Prozesse des Intermediärstoffwechsels gebildet. Hierzu zählen unter anderem die mitochondriale Atmungskette und andere enzymatisch katalysierte Reaktionen (Cytochrom P-450-Komplex, NADPH-Oxidase, Myeloperoxidase, NO-Synthase und Xanthin-Oxidase). XO = Xanthin-Oxidase, P-450 = Cytochrom P-450), modifiziert nach <sup>55</sup>.

Abhängig von der Konzentration der verschiedenen Verbindungen wird ihre Funktion definiert: In niedrigen Konzentrationen fungieren sie als physiologische Mediatoren innerhalb zellulärer Stoffwechselwege oder Signalkaskaden und können so Einfluss auf die Genexpression nehmen. Dadurch wirken sie an der Regulation von Zellproliferation und Zelldifferenzierung bis hin zur Apoptose, dem programmierten Zelltod, mit <sup>49,56</sup>. In hohen Konzentrationen, die die antioxidativen Schutzmechanismen überschreiten, wirken sie als aggressive Reagenzien mit toxischen Effekten <sup>49,50</sup>. Sie können mit Proteinen <sup>57</sup>, Komponenten der Extrazellulärmatrix <sup>58</sup>, DNA <sup>59</sup> und Lipiden reagieren <sup>60</sup>, deren Struktur verändern oder schädigen und so zu einer Fehlfunktion oder einem Funktionsverlust führen <sup>50</sup>. Man spricht hierbei, je nach toxischem Agens, von „oxidativem oder nitrosativem Stress“ <sup>61,62</sup>.

Wichtigster Vertreter der ROS ist das Superoxidanion ( $O_2^{\cdot-}$ ). Es entsteht durch ein Sauerstoffmolekül, das ein zusätzliches Elektron aufnimmt<sup>63</sup>. Dies geschieht physiologischerweise im Rahmen des Intermediärstoffwechsels, der Schnittstelle von anabolem und katabolem Stoffwechsel. Als Teil der zellulären Energiegewinnung werden an der mitochondrialen Atmungskette Elektronen in einer Transportkette weitergegeben. 1 – 3% dieser Elektronen werden während dieses Prozesses freigesetzt und stehen der zellulären Energiegewinnung nicht mehr zur Verfügung. Diese Begleiterscheinung bezeichnet man auch als Elektronenleck (engl. *electron leak*). Dieses Elektronenleck stellt den Hauptentstehungsort des Superoxidanions dar<sup>64</sup>.

Darüber hinaus sind auch verschiedene Enzyme für die Produktion von Superoxidanionen verantwortlich. Neben der Xanthinoxidoreduktase<sup>65</sup>, die der Harnsäurebildung dient, ist die NAD(P)H-Reduktase zu nennen. Sie spielt vor allem bei entzündlichen Prozessen eine tragende Rolle, da sie in der Immunabwehr gegen infektiöse Reagenzien Superoxidanionen als Teil des sogenannten *oxidative burst* bildet<sup>66</sup>. Hierbei werden sowohl die pathogenen Agenzien als auch körpereigene Zellen und extrazelluläre Matrix geschädigt. Dies hat unter anderem eine Schädigung von Endothelzellen zur Folge, deren Permeabilität somit gesteigert wird und den Entzündungszellen eine Migration zum entzündlichen Focus ermöglicht<sup>55</sup>.

Zudem können Superoxidanionen durch „Aktivierung“ eines Sauerstoffmoleküls entstehen. Diese Aktivierung kann unter dem Einfluss von UV- oder Röntgenstrahlung erfolgen<sup>49</sup>.

Durch die Reaktion des Superoxidanions mit anderen Molekülen können auch wesentlich aggressivere Sauerstoffverbindungen entstehen. Wichtige Vertreter sind das Hydroxylradikal ( $HO^{\cdot}$ ) oder Peroxylradikal ( $ROO^{\cdot}$ )<sup>55</sup>. Das Hydroxylradikal entsteht, wenn Superoxidanionen mit freien Kupfer- oder Eisenionen reagieren. Diese freien Metallionen sind unter physiologischen Bedingungen nur in geringen Mengen vorhanden und entstehen beispielsweise beim Abbau von Ferritin<sup>55</sup>.

Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) ist ein weiterer Vertreter der ROS. Es entsteht beim Abbau von Superoxidanionen durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD), welches ein Teil des antioxidativen Systems ist<sup>67</sup>. Daneben kann Wasserstoffperoxid auch während verschiedener Superoxidanionen-unabhängigen Reaktionen in den Peroxisomen entstehen. Hier steht es in streng regulierten Konzentrationen anderen metabolischen Prozessen zur Verfügung<sup>68</sup>.

Zu den wichtigsten Vertretern der RNS gehören die Oxide des Stickstoffs, Stickstoffmonoxid (NO) und Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ). Stickstoffmonoxid, ein relativ stabiles Radikal, entsteht durch die katalytische Wirkung verschiedener Stickstoffmonoxid-Synthasen (NOS). Hierbei wird NO während der Reaktion von L-Arginin mit molekularem Sauerstoff freigesetzt und diffundiert an die Zellmembran. Es dient als Signalmolekül und Neurotransmitter und ist an verschiedenen Regulationsmechanismen beteiligt. Durch eine NO-vermittelte Relaxation glatter Muskelzellen wirkt

es beispielsweise an der Blutdrucksenkung mit<sup>51</sup>. Durch Expression einer Isoform der Stickstoffmonoxid-Synthase sind Makrophagen in der Lage NO zu produzieren. Bei anhaltender Synthese können hohe Konzentrationen von NO erreicht werden. Dieses wirkt schließlich zytostatisch und zytotoxisch und erzeugt damit einen antimikrobiellen und antitumorösen Effekt<sup>69</sup>. Verstärkt werden diese antimikrobiellen und zytotoxischen Eigenschaften des NO durch andere von Makrophagen produzierten Stoffe und Moleküle wie verschiedene Säuren, Wasserstoffperoxid und Superoxidanionen<sup>70</sup>.

Reagiert NO mit anderen kleinen Molekülen, so entstehen weitere RNS. Das hoch reaktive Peroxynitritanion (ONOO<sup>-</sup>) entsteht in einer diffusionslimitierten Reaktion aus Stickstoffmonoxid und einem Superoxidanion<sup>69,71</sup>. Es kann sowohl DNA fragmentieren als auch Lipide oxidieren<sup>72</sup>. Darüber hinaus ist es in der Lage, den intrazellulären Glutathionspiegel zu senken und kann dadurch zur Apoptoseinduktion führen<sup>73,74</sup>.

### 1.3.2 Das antioxidative System

Um sich vor oxidativen Schäden zu schützen, verfügt der menschliche Organismus über verschiedene Schutzsysteme, die in ihrer Gesamtheit „antioxidatives Schutzsystem“ genannt werden. Dieses setzt sich aus enzymatischen und nicht-enzymatischen Mechanismen zusammen, die ein Gleichgewicht von pro- und antioxidativen Reaktionen schaffen und so eine „Redoxhomöostase“ ermöglichen sollen. Diese Homöostase ist für eine normale Zell-, Gewebe- und Organfunktion essentiell<sup>49</sup>.

Antioxidantien sind chemische Verbindungen, die bereits in geringen Konzentrationen in der Lage sind, effektiv mit anderen oxidierbaren Biomolekülen zu konkurrieren und diese vor den schädlichen Folgen des ROS-Angriffs zu schützen<sup>55</sup>.

Enzymatische Antioxidantien sind im Organismus ubiquitär vorhanden. Zu den wichtigsten Vertretern gehören die verschiedenen Isoformen der Superoxiddismutase (SOD), die Glutathionperoxidase (GPX) und die Katalase (CAT)<sup>49</sup>. Darüber hinaus gehören auch die Peroxiredoxine zur Gruppe der enzymatisch wirksamen Antioxidantien. Hierbei handelt es sich um eine Gruppe thioispezifischer Enzyme, die in der Natur und in menschlichen Zellen ubiquitär vorkommen<sup>75</sup>.

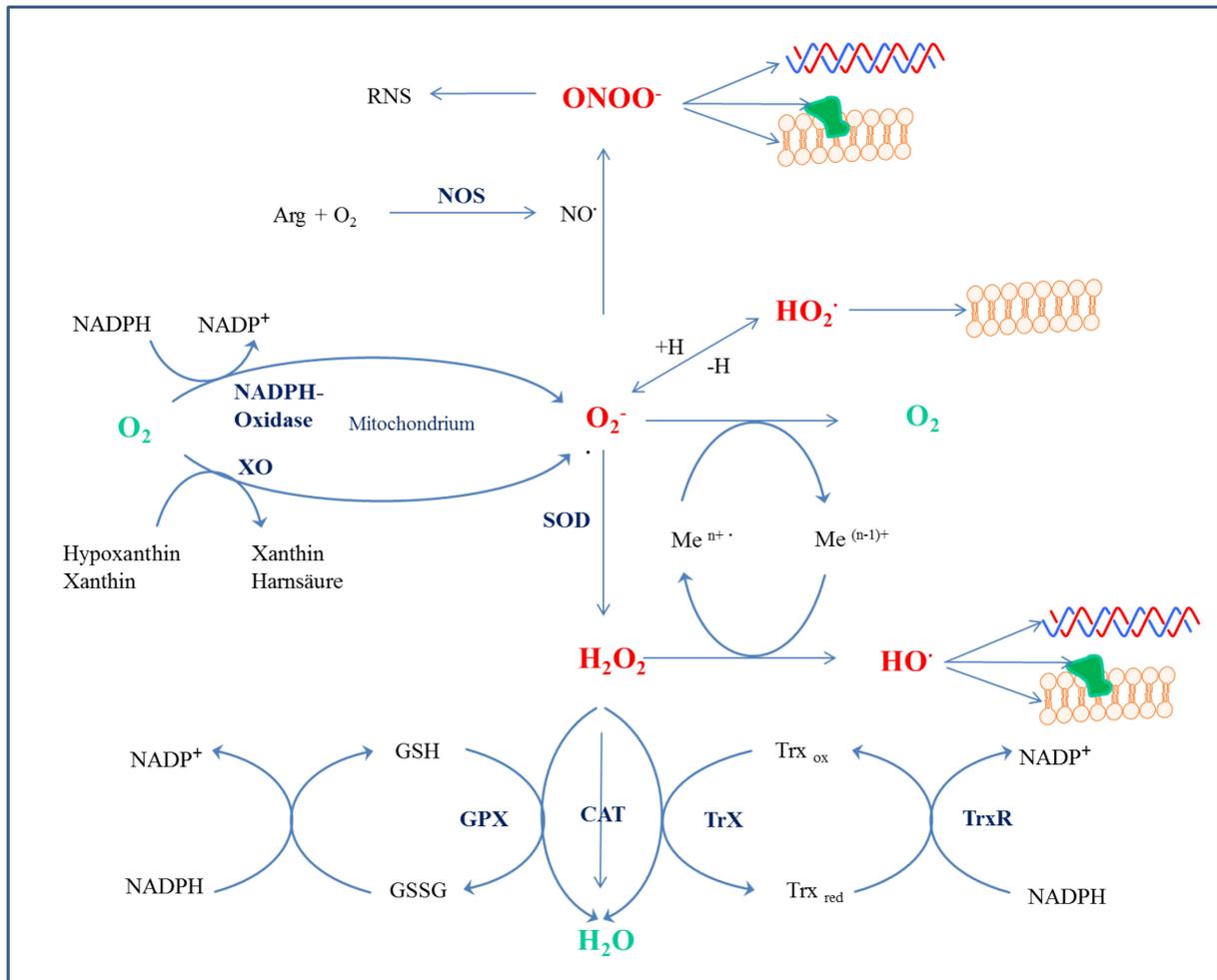
Die Superoxiddismutase katalysiert die erste Reaktion zur Eliminierung des zytotoxischen Superoxidanions. Die enzymatische Reaktion besteht in der Umwandlung des Superoxidanions in molekularen Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Anschließend wird das ebenfalls toxische Wasserstoffperoxid durch die Glutathionperoxidase oder Katalase eliminiert<sup>67,76,77</sup>.

Peroxiredoxine besitzen sowohl eine Peroxidase- als auch eine Peroxinitrit-Reduktase-Aktivität. Diese verleiht ihnen die Fähigkeit Wasserstoffperoxid, Peroxinitrit und andere schädliche organische

Hydroperoxide zu reduzieren und so zu neutralisieren<sup>78</sup>. Über eine Modulation der Zytokin-induzierten intrazellulären Wasserstoffperoxidspiegel können sie Einfluss auf die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen nehmen<sup>75</sup>

Neben den enzymatischen Antioxidantien schützen verschiedene nicht-enzymatische wasser- und fettlösliche Antioxidantien Zellmembranen und Plasmaproteine vor oxidativen Angriffen. Zu den wasserlöslichen Antioxidantien zählen das Tripeptid Glutathion, Thioredoxin, Ascorbinsäure (Vitamin C) und Harnsäure. Zu den fettlöslichen Antioxidantien zählen  $\alpha$ -Tocopherol (Vitamin E), Carotinoide und Bilirubin<sup>49,55,76</sup>. Thioredoxin und Glutathion gelten als die intrazellulären Hauptantioxidantien. Diese werden durch entsprechende Reduktasen (re-)generiert und sind in reduzierter Form für das Aufrechterhalten einer intrazellulären Redoxpufferkapazität und somit für die Redoxhomöostase verantwortlich<sup>49</sup>.

Eine Übersicht über das oxidative System und die antioxidativ wirkenden Enzyme gibt Abbildung 4<sup>79</sup>.



**Abbildung 4 Übersicht des oxidativen/nitrosativen und der antioxidativen Systems.** Hauptentstehungsorte für ROS (z. B. Superoxidanionen) sind die mitochondriale Atmungskette, NADPH- und Xanthin-Oxidase. Hauptmechanismus für die Entstehung RNS ist die Oxidation von Arginin durch die NOS. ROS und RNS spielen eine Rolle in der Pathogenese verschiedener Krankheiten. Sie wirken direkt oder indirekt durch Schädigung von Lipiden, Proteinen und Nucleinsäuren.

(ROS = Reaktive Sauerstoffverbindungen, RNS = Reaktive Stickstoffverbindungen, XO = Xanthinoxidase, CAT = Katalase, GPX = Glutathionperoxidase, TrxR = Thioredoxinreduktase,  $\text{O}_2$  = molekularer Sauerstoff,  $\text{O}_2^{\cdot -}$  = Superoxidanion,  $\text{H}_2\text{O}_2$  = Wasserstoffperoxid,  $\text{OH}^{\cdot}$  = Hydroxylradikal, Arg = Arginin, NOS = Stickstoffmonoxidsynthase,  $\text{NO}^{\cdot}$  = Stickstoffmonoxid,  $\text{Me}^{n+}$  = dreiwertiges Metallion,  $\text{Me}^{(n-1)+}$  = zweiwertiges Metallion, GSH = Glutathion (reduzierter Zustand); GSSG = Glutathion (oxidiertes Zustand); NADPH = Nicotinamid- Adenin-Dinukleotid-Phosphat (reduzierter Zustand);  $\text{NADP}^+$  = Nicotinamid- Adenin-Dinukleotid-Phosphat (oxidiertes Zustand);  $\text{HO}^{\cdot}$  = Hydroxylradikal;  $\text{ONOO}^{\cdot}$  = Peroxynitritanion, SOD = Superoxiddismutase;  $\text{Trx}_{\text{ox}}$  = Thioredoxin (oxidierte Form);  $\text{Trx}_{\text{red}}$  = Thioredoxin (reduzierte Form); TrX = Thioredoxinperoxidase; TrxR = Thioredoxin – Reduktase)

Übersteigt die Produktion von ROS/RNS die Eliminationskapazität, sei es durch Überproduktion an ROS/RNS oder durch Mangel an Antioxidantien, kommt es zu einer Dysbalance zugunsten der prooxidativen Reaktionen und somit zu oxidativem und nitrosativem Stress<sup>49,55</sup>.

### 1.3.3 Biomarker des oxidativen und nitrosativen Stress

ROS und RNS sind hochreaktive Verbindungen. Daher haben sie nur sehr kurze Halbwertszeiten, was ihre Detektion erschwert. Um den oxidativen Status einer Zelle zu bestimmen, ist man daher auf den Nachweis der stabilen Endprodukte der destruktiv veränderten Biomoleküle angewiesen<sup>80</sup>.

In den letzten Jahren haben sich verschiedene Marker-Moleküle für oxidativen und nitrosativen Stress etabliert. Im Folgenden wird auf die für die vorliegende Arbeit relevanten Biomarker genauer eingegangen.

#### 1.3.3.1 8-Isoprostan $F_{2\alpha}$

Das Hauptziel von Angriffen freier Radikale sind Lipide, die peroxidiert werden. 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  (8-Isoprostaglandin  $F_{2\alpha}$ ) gehört zu der Gruppe der Isoprostane und fungiert als Marker des oxidativen Stress<sup>81,82</sup>. Isoprostane sind Regio- und Stereoisomere der Prostaglandine<sup>83</sup>. Sie entstehen als nicht-enzymatische Spaltprodukte der Arachidonsäure (Bestandteil der Zellmembran), welche in einer durch freie Radikale katalysierten Lipid-Peroxidation oxidiert wird<sup>84,85</sup>. Nach Abspaltung von Phospholipiden der Zellmembran gelangt das entstandene 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in den Intra- und Extrazellularräum<sup>86</sup>, wobei der genaue Abspaltungsmechanismus noch nicht genau verstanden ist<sup>87</sup>.

Aufgrund seiner nichtenzymatischen Entstehung ist 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  ein idealer Marker für oxidative Schäden *in vivo*, da er ein hoch-spezifisches Produkt der Lipid-Peroxidation und somit des oxidativen Stress ist. Darüber hinaus weist es in biologischen Medien eine hohe Stabilität auf<sup>81</sup>. Zudem wird es unabhängig von der Lipidzusammensetzung der Nahrungsdiet gebildet<sup>88,89</sup>.

Oxidative Veränderungen der Arachidonsäure gelten beispielsweise bei der Pathogenese der Atherosklerose<sup>90</sup>, der Endotoxämie<sup>91</sup>, im Rahmen der Gehirn-Reperfusion nach Herz-Kreislaufstillstand<sup>92</sup> und bei verschiedenen rheumatischen Erkrankungen<sup>93</sup> als etabliert.

#### 1.3.3.2 3-Nitrotyrosin

Das Peroxinitritanion stellt den Hauptvertreter unter den RNS dar. Es ist *in vivo* im alkalischen Milieu besonders stabil, was folglich die Diffusion durch Zellmembranen und somit das Angreifen an Zielmoleküle ermöglicht<sup>69,94</sup>.

Eine zentrale Reaktion des Peroxinitritanions wird von Übergangsmetallen, einschließlich der metallischen Zentren (Kupfer/Zink) der Enzyme Superoxiddismutase und Myeloperoxidase, katalysiert<sup>69,95</sup>. Bei dieser heterozyklischen Spaltung entstehen Hydroxylanionen und Nitroniumionen

(NO<sub>2</sub><sup>+</sup>). Die Nitroniumionen greifen Phenole an, oxidieren und nitrieren diese und produzieren somit Nitrophenole<sup>69</sup>.

Die Nitrierung in Ortho-Position des Phenolrings der Aminosäure Tyrosin, als Bestandteil von beispielsweise Zellmembranproteinen, führt zur Entstehung von 3-Nitrotyrosin<sup>96,97</sup>. Dieses ist eine äußerst stabile Verbindung, die auch nach mehreren Jahren noch *in vitro* nachweisbar ist<sup>69</sup>. Daher wird 3-Nitrotyrosin als stabiles Endprodukt des nitrosativen Stress angesehen und fungiert als Biomarker desselben<sup>69,95,97</sup>.

Die Bildung von Nitrotyrosinverbindungen tritt während der Pathogenese verschiedener entzündlicher Erkrankungen des Menschen auf. So kann 3-Nitrotyrosin bei chronisch-myokardialer Dysfunktion<sup>98</sup>, respiratorischen Distress-Syndromen<sup>99,100</sup>, Asthma bronchiale<sup>101</sup>, rheumatoider Arthritis<sup>102</sup> und anderen chronisch entzündlichen Erkrankungen<sup>97,103</sup> nachgewiesen werden. Bei Patienten, die unter rheumatoider Arthritis leiden, können im Serum Nitrotyrosinwerte von bis zu 1,2 µM nachgewiesen werden, verglichen mit einer gesunden Kontrollgruppe, bei der Nitrotyrosin nicht nachweisbar ist (0 µM,  $p < 0.02$ )<sup>102</sup>.

#### **1.4 Oxidativer Stress und Arthroseentstehung**

Die morphologisch fassbaren Veränderungen des arthrotisch veränderten Gelenkes sind Ausdruck der biochemischen und molekularbiologischen Veränderungen der verschiedenen Gelenkkomponenten, deren Vorgänge noch nicht geklärt sind, für die es aber Erklärungsansätze gibt, auf die im Folgenden eingegangen wird.

Oxidativer und nitrosativer Stress wird als relevanter Faktor in der Entwicklung verschiedener degenerativer Prozesse beschrieben. So zeigen viele Studien, dass ein Zusammenhang zwischen der Einwirkung von Radikalen und vorzeitiger Zellalterung (zelluläre Seneszenz) und Apoptose besteht. Diesen zellulären Mechanismen wird auch bei der Pathogenese der Arthrose eine wichtige Rolle zugeschrieben<sup>104-107</sup>.

Obwohl der Knorpeldegeneration, in der bisherigen Forschung, die größte Aufmerksamkeit in der Pathogenese der Arthrose geschenkt wird, haben sich inzwischen auch das synoviale Kompartiment und der Knochen als zentrale Effektororgane in der Arthroseentstehung etabliert<sup>108</sup>.

Ausgangspunkt für die Pathogenese der Arthrose stellt ein Ungleichgewicht von anabolen und katabolen Stoffwechsignalen dar. Dieses wird durch verschiedene, von Chondrozyten und Synoviozyten produzierten, proinflammatorischen Zytokinen und Entzündungsmediatoren gefördert<sup>108,109</sup>. Eine besondere Rolle wird dem Interleukin-1β (IL-1β) und dem Tumornekrosefaktor-α (TNF-α) zugeschrieben. Sie verringern die Kollagen- und Aggrecansynthese und steigern den

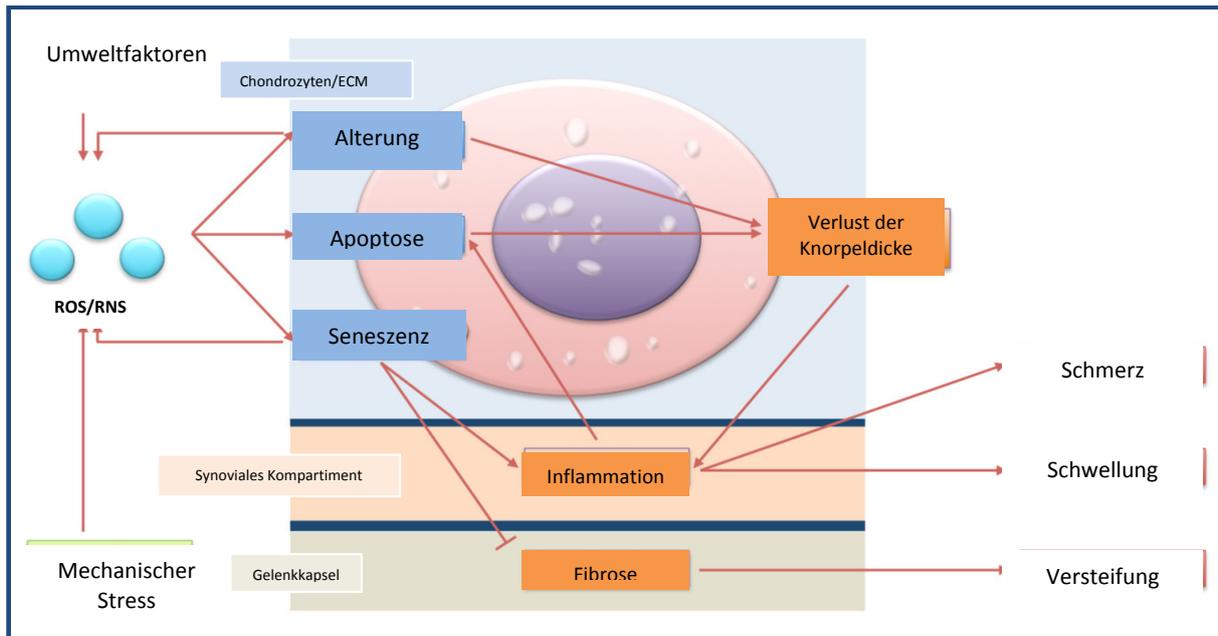
Katabolismus durch vermehrte Expression von Metalloproteasen (besonders MMP I und III). Darüber hinaus stimuliert IL-1 $\beta$  die Produktion weiterer Entzündungsmediatoren wie IL-8, IL-6, Prostaglandin-E2 und NO<sup>110</sup>.

Bei der Gelenkknorpelschädigung spielt NO mehrere wesentliche Rollen. Es fördert die Knorpeldegradation zum einen durch Hemmung der Kollagen- und Proteoglykansynthese, zum anderen durch Aktivierung der MMP. Darüber hinaus erhöht NO die Anfälligkeit für weitere oxidative Schäden<sup>55</sup>. Es führt, wie bereits beschrieben, zur Bildung von Peroxinitrit. Dieses ist in der Lage Guanin-Repeats in den Telomeren der DNA anzugreifen und führt so, als Ausdruck des oxidativen und nitrosativen Stress, zur Erosion und vorzeitigem Verlust von Telomeren<sup>111</sup>.

Verkürzte Telomere, erhöhte Spiegel des Enzyms  $\beta$ -Galaktosidase und eine verminderte ATP-Produktion, bedingt durch eine mitochondrielle Dysfunktion, sind Kennzeichen vorzeitiger zellulärer Seneszenz<sup>106</sup>. Diese Veränderungen konnten in Chondrozyten von Arthrose-Patienten nachgewiesen werden<sup>112</sup>. Darüber hinaus wird beschrieben, dass ROS die Apoptose von Chondrozyten induzieren können und andere katabole Prozesse, wie Matrixdegradation, begünstigen<sup>29,55</sup>. Diese Erkenntnisse unterstützen das Konzept, Arthrose als vorzeitige Alterung des Gelenks zu verstehen, bei der besonders die vorzeitige Knorpel- und Chondrozytenalterung eine Rolle spielen.

Diese inflammatorischen Vorgänge sind eng mit biomechanischen Prozessen verwoben. Eine veränderte Biomechanik, wie sie bei Arthrose bekannt ist, induziert und potenziert biochemische Veränderungen. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl eine statische als auch eine dynamische Knorpelbelastung zu einer vermehrten Expression verschiedener Moleküle, wie Aggrecan, Fibronectin, MMP, Aggrecanase-2 (ADAMTS-5), c-fos und c-jun führt. Folglich ähnelt die Genexpression eines stark beanspruchten Gelenkes derjenigen, welche durch IL-1 $\beta$  stimuliert wird. Zudem wird durch eine starke Gelenkbeanspruchung die NO-Produktion in den Chondrozyten und die Expression der Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) induziert. Folglich wird die NO-Produktion als Ausgangspunkt für oxidativen und nitrosativen Stress durch biochemische und biomechanische Vorgänge beeinflusst<sup>113</sup>.

Die Zusammenhänge zwischen den ROS/RNS und den degenerativen Umbauprozessen im Gelenk werden schematisch in Abbildung 5 dargestellt. Hier wird zudem der Bezug zur klinischen Manifestation der häufig lange asymptomatisch verlaufenden Arthrose hergestellt.



**Abbildung 5 Schematische Darstellung der Zusammenhänge zwischen den klinischen Symptomen der Arthrose und der oxidativen Dysbalance in Zuordnung zu den einzelnen Gelenkkompartimenten.** (ROS=reactive oxygen species, RNS= reactive nitrogen species, ECM= extracellular matrix) adaptiert nach <sup>114</sup>.

### 1.5 Ziele der Arbeit

Die Arbeitshypothese der vorliegenden Dissertation ist, dass die Konzentration von Endprodukten des oxidativen und nitrosativen Stress im synovialen Kompartiment des Gelenkes Schäden widerspiegelt, die zur Arthroseentwicklung führen.

Ziel der Arbeit ist die Identifikation von biologischen Substanzen, welche die degenerativen Veränderungen eines arthrotisch-veränderten Gelenkes widerspiegeln. In der vorliegenden Studie wird hierfür das Kniegelenk als Untersuchungsgegenstand in den Mittelpunkt gestellt. Für die klinische Anwendung am Patienten ist es von Interesse einen wenig-invasiv gewonnenen, wenig strahlenbelastenden, zeit- und kosteneffektiven Biomarker der Gonarthrose zu identifizieren. Dieser könnte eine aufwendige invasive Diagnostik ersetzen und auch bei fehlender Verfügbarkeit von Röntgenanlagen, beispielsweise in Entwicklungs- und Schwellenländern, zu einem frühzeitigen Therapiebeginn beitragen und die Belastung für den einzelnen Patienten minimieren.

Ein erster Schritt hierfür soll die Identifizierung von Gewebefaktoren in der Synovialmembran sein, welche die pathophysiologischen Mechanismen der Arthroseentwicklung widerspiegeln. Hierzu sollen Parameter des oxidativen und nitrosativen Stress als Schlüsselmarker fungieren. Sofern ein Nachweis dieser gelingt, wird in einem weiteren Schritt geprüft, ob diese histologisch nachweisbaren Moleküle auch weniger invasiven Untersuchungsverfahren zugänglich sind. Zum einen soll ermittelt werden, ob ein zuverlässiger Zusammenhang zwischen den Gewebefaktoren und den klinischen und

radiologischen Befunden besteht. Zum anderen wird zunächst die intraartikuläre Last des oxidativen und nitrosativen Stress in der Synovialflüssigkeit ermittelt. Anschließend wird diese mit dem oxidativen und nitrosativen Stress-Level des Blutserums korreliert.

Durch diese pathophysiologische Grundlagenforschung soll ein Grundstein für die Entwicklung eines Biomarker-Screening-Profiles für Arthrose gelegt werden. Dieses kann möglicherweise zukünftig dem einzelnen Patienten eine Risikoabschätzung hinsichtlich der Entwicklung einer Arthrose bereits vor der klinischen Manifestation ermöglichen.

Da vorzeitige Chondrozyten-Seneszenz sowie Apoptose und Alterungsprozesse eine Rolle in der Pathogenese der Arthrose spielen, kann die frühzeitige Erkennung dieser Prozesse helfen, die Indikation zur Durchführung von Maßnahmen zu stellen, welche das Fortschreiten der Erkrankung verlangsamen können.

## **2. Methodik**

### **2.1 Studienaufbau**

Bei dem Studiendesign handelt es sich um eine Querschnittsstudie. Zu Beginn der Studie wurde ein Ethikvotum der Ethikkommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf beantragt und uneingeschränkt bewilligt (Studennummer: 3444)<sup>169</sup>.

### **2.2 Probanden**

Das Probandenkollektiv stammte aus der Universitätsklinik für Orthopädie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Hier stellten sich die Probanden, respektive Patienten, nach Überweisung durch einen niedergelassenen Arzt, im Rahmen einer elektiven orthopädischen Sprechstunde mit dem Leitsymptom „akuter oder chronischer Kniegelenksschmerz“ vor. Nach Erhebung einer ausführlichen Anamnese und klinischen Untersuchung erfolgte eine gezielte apparative Diagnostik bzw. eine Ergänzung fehlender Befunde, so dass schließlich von jedem Patienten eine konventionelle Röntgenaufnahme des Kniegelenks in drei Ebenen vorlag. Aus der Zusammenschau aller Befunde ergab sich schließlich eine jeweilige Diagnose. Hierzu zählten die Gonarthrose, Meniskus- und Kreuzbandläsionen bei denen überall die Indikation zur arthroskopischen bzw. konventionell-offenen Operation gegeben war. Erklärte der Patient sein Einverständnis zur Operation, wurde er über die Möglichkeit zur Teilnahme an der Studie aufgeklärt und konnte einer Teilnahme schriftlich zustimmen<sup>169</sup>.

Die definitive Probandenauswahl folgte einer Reihe von Ein- bzw. Ausschlusskriterien, die untenstehend aufgelistet werden (s. Tabelle 6).

**Tabelle 6 Auswahlkriterien der Studienteilnehmer**

<b>Einschlusskriterien</b>	<b>Ausschlusskriterien</b>
Geplante Kniegelenksarthroskopie oder konventionell-offene Operation	Tumorerkrankungen
Alter 18 bis 70 Jahre	Rheumatoide Arthritis
	Einnahme von Arzneimitteln wie Corticosteroiden oder Zytostatika
	Immunsuppression
	Bekannte Schwangerschaft und Stillzeit
	Abhängigkeitserkrankungen
	Teilnahme an anderen klinischen Studien
	Diabetes mellitus

Anschließend wurden die Probanden einer der drei Versuchsgruppen zugeteilt. Dazu wurde zunächst ihr jeweiliger Arthrosegrad bzw. Schweregrad des Knorpelschadens, sowohl anhand der konventionellen Röntgenbildgebung nach der Klassifikation von Kellgren und Lawrence, als auch nach dem arthroskopischen Befund nach Outerbridge ermittelt. Anschließend wurden sie den entsprechenden Versuchsgruppen zugeteilt <sup>169</sup>.

Die erste Gruppe, die als eine Kontrollgruppe fungierte, wurde hierbei von Probanden gebildet, die sich mit dem Leitsymptom des „akuten Kniegelenksschmerzes“ präsentierten. Hierzu zählten Patienten, welche unter einem Kniegelenksschmerz litten, der weniger als sechs Monate bestand, und die vorher beschwerdefrei waren. Der bildmorphologische und intraoperativ nachgewiesene Knorpelschaden wurde nach Stoller et al. <sup>115</sup> (s. Tabelle 7) quantifiziert und musste Grad 0 oder Grad I° sein. In erster Linie umfasste diese Gruppe Patienten, deren Krankheitsbild durch Meniskuläsionen dominiert wurde <sup>169</sup>.

**Tabelle 7 Klassifikation der Meniskuläsion nach dem Befund im Kernspintomogramm nach Stoller et al.**  
115

Grad 0	Homogen niedrige Signalanhebungen
Grad I	Fokale intrameniskale Signalanhebungen
Grad II	Lineare intrameniskale Signalanhebungen, die nicht die Meniskusoberfläche erreichen und nicht mit einer arthroskopisch nachweisbaren Rissbildung einhergehen
Grad III	Lineare intrameniskale Signalanhebungen, die die Meniskusoberfläche erreichen

Die zweite Gruppe wurde von Probanden gebildet, die an einer Gonarthrose mit „chronischem Kniegelenksschmerz“ litten. Ihr bildmorphologischer und arthroskopischer Untersuchungsbefund ergab einen Knorpelschaden von  $\geq$  Grad III° in mindestens einem Kompartiment des Kniegelenks <sup>169</sup>.

Die dritte Gruppe, die als zweite Kontrollgruppe fungierte, schloss Probanden ein, welche zum Zeitpunkt der Operation definitionsgemäß ein reizfreies Kniegelenk hatten. Hierzu zählten Probanden, die sich zur elektiven Autologen Chondrozytentransplantation (ACT) oder zur elektiven Kreuzbandersatzplastik (teil- oder rupturiertes Kreuzband) vorstellten <sup>169</sup>. Diese Operation wird auf Grund eines erhöhten Risikos für Arthrofibrosebildung erst an einem Kniegelenk ohne entzündliche Veränderungen durchgeführt. Das Intervall zwischen Kreuzbandruptur und Operation erstreckt sich somit im Durchschnitt auf sechs Wochen <sup>116</sup>. Eine Reizfreiheit des betroffenen Kniegelenks wurde gegebenenfalls durch eine erste, studienunabhängige Arthroskopie mittels Débridement des Kniegelenkes und Therapie von eventuellen meniskalen Läsionen sowie der Verwendung einer

DONJOY® Orthese, welche die Kreuzbandführung ersetzt, erreicht. Erster Schritt der zweiten Operation, der Kreuzbandersatzplastik, war eine Arthroskopie, in der die studienrelevanten Proben entnommen wurden.

Vorhandene Nebenerkrankungen und Vormedikationen der Probanden wurden in einem Patientenfragebogen erfasst. Zusätzlich diente die visuelle Analogskala (Zahlenfolge von null (keine Schmerzen) bis zehn (stärkster vorstellbarer Schmerz)) der Quantifizierung subjektiver Schmerzen<sup>169</sup>.

## **2.3 Probengewinnung**

### **2.3.1 Blutproben**

Im Rahmen der präoperativen Vorbereitung wurden den Probanden venöse Blutproben entnommen. Der Zeitraum zwischen Blutentnahme und Operation lag bei maximal sieben Tagen. Es wurden jeweils zwei 5 ml Serummonovetten entnommen<sup>169</sup>.

Die Blutproben wurden im Forschungslabor der Orthopädischen Universitätsklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf weiterverarbeitet. Zunächst wurden sie für zehn Minuten bei 20°C mit 2200 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Mikro 22R, Hettich Zentrifugen, Hettich Lab Technology, Tuttingen, Deutschland) und separiert. Das Serum wurde abpipettiert und in 1,5 mL-Reaktionsgefäße abgefüllt. Zur weiteren Verwendung wurden diese bei - 80°C gelagert<sup>169</sup>.

### **2.3.2 Synovialisbiopsien und Synovialflüssigkeit**

Während der Arthroskopie oder konventionell-offenen Operation wurden sowohl Synovialflüssigkeit als auch eine Biopsie der Synovialmembran entnommen<sup>169</sup>.

Die Entnahme der Synovialflüssigkeit während der Arthroskopie erfolgte durch Instillation von isotonischer Kochsalzlösung (0,9% NaCl) durch den Arthroskopie-Zugang und Auffangen der ausgespülten Flüssigkeit in einem Sammelbehälter. Hierdurch entstand ein Auswaschpräparat des Synovialraums, dessen Verdünnungsmaß durch eine spätere Proteinquantifizierung bestimmt wurde. Jeweils 4 ml der Synovialflüssigkeit wurden in 1,5 mL-Reaktionsgefäßen bei - 80°C gelagert<sup>169</sup>.

Die Synovialisbiopsien wurden entweder in 0,9% NaCl oder in 4% Paraformaldehyd (PFA) eingelegt. Letztere wurden nach einer 20 h Fixierung in eine 18% Sucroslösung überführt und darin bei 4°C für weitere 48 h inkubiert. Dadurch wurde dem Gewebe osmotisch Wasser entzogen und eine Zerstörung des Gewebes beim Einfrieren verhindert. Danach wurden die Proben bei - 80°C eingefroren<sup>169</sup>.

Die Synovialisbiopsien, die in 0,9% NaCl überführt wurden, wurden zur Kryoprotektion in ein Einbettmedium für Gefrierschnitte (Tissue freezing medium®, Firma Jung LeicaBiosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) eingebettet und bei - 80°C gelagert.

### **2.3.3 Herstellung von Gefrierschnitten**

Vor dem eigentlichen Schneiden wurden die Biopsien mit Hilfe von 4% Polyvinylpyrrolidon (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), welches als Gefrierschutz fungiert, auf einen Objektisch aufgefroren und in den Objektischhalter des Kryotoms (Mikrotom-Kryostat CM3050S, LeicaBiosystems, Nussloch, Deutschland) eingespannt. Die Kammertemperatur betrug - 22°C, die Objekttemperatur betrug - 18°C. Anfänglich wurden Trimm-Schnitte mit einer Schnittdicke von circa 80 µm durchgeführt, um die Ausrichtung des Gewebeblockes zur Klinge zu kontrollieren und anzupassen. Nach passender Adjustierung (Messerwinkel 0°) wurden pro Biopsie 30 Schnitte mit einer Schnittdicke von 10 µm angefertigt und auf Objektträger aufgetragen <sup>169</sup>.

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung), die in Kapitel 2.4.2 näher beschrieben ist, wurden unbeschichtete Objektträger (SuperFrost Plus, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet <sup>169</sup>.

Für die immunhistochemischen Färbungen (s. Kapitel 2.5) nutzten wir Adhäsiv-Objektträger (Polylysine slides, Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), um ein Ablösen der Gewebeschnitte während der verschiedenen Waschvorgänge zu verhindern <sup>169</sup>.

Die angefertigten Schnitte trockneten 60 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Objektträger bis zur weiteren Verarbeitung bei - 80°C gelagert. Die verbliebenen Biopsien wurden ebenfalls bei - 80°C kryoasserviert, um für eventuelle Nachuntersuchungen zur Verfügung zu stehen.

## **2.4 Quantifizierung des Entzündungsgrades der Synovialisbiopsien**

### **2.4.1 Synovialitis-Score nach Krenn**

Um den Grad der Entzündungsreaktion in den Synovialisbiopsien histomorphologisch zu bestimmen, orientierten wir uns am „Synovialitis-Score nach Krenn“ <sup>117</sup>. Bei diesem „Synovialitis-Score“ handelt es sich um ein histopathologisches Graduierungsschema rheumatischer und nicht-rheumatischer Synovialitiden, welches von Krenn et al. 2004 erstmals beschrieben wurde.

Die Kompartimente, die bei einer Entzündung der Synovialmembran involviert sind, werden semiquantitativ bewertet und ausgewertet. Die synoviale Deckschicht und das synoviale Stroma

werden an konventionell gefärbten Hämatoxylin-Eosin-(HE-)-Schnittpräparaten beurteilt. Das synoviale Stroma wird sowohl nach seinen ortsständigen Zellen, den Fibrozyten, Fibroblasten und Endothelzellen, als auch nach seinen eingewanderten Zellen, den Makrophagen und Lymphozyten, beurteilt. Schließlich ergibt sich ein Summenscore, der den jeweiligen Entzündungsgrad beschreibt. Das Graduierungsschema reicht von 0 bis 3. Punktwerte für den Summenscore werden anhand von definierten Kriterien vergeben (s. Tabelle 8) <sup>117</sup>.

**Tabelle 8 Schema zur histologischen Beurteilung der drei Kompartimente bei chronischer Synovialitis;** modifiziert nach Krenn et al. <sup>117</sup>.

<b>Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht:</b>	
0 Punkte	Synoviale Deckzellschicht einlagig
1 Punkt	Synoviale Deckzellschicht 2- oder 3- lagig
2 Punkte	Synoviale Deckzellschicht 4 oder 5-lagig
3 Punkte	Synoviale Deckzellschicht mehr als 5-lagig
<b>Aktivierung des synovialen Stromas:</b>	
0 Punkte	Normale Zelldichte
1 Punkt	Gering erhöhte Zelldichte
2 Punkte	Mittelgradig erhöhte Zelldichte, vereinzelte multinukleäre Riesenzellen
3 Punkte	Hohe Zelldichte, multinukleäre Riesenzellen, ggf. Pannusgewebe und rheumatoide (Hemi-)Granulome
<b>Leukozyäre entzündliche Infiltration</b>	
0 Punkte	Kein Nachweis eines entzündlichen Infiltrats
1 Punkt	Einzelne, meist perivaskulär gelegene Lymphozyten oder Plasmazellen und kleine Lymphozytenaggregate
2 Punkte	Größere Lymphozytenaggregate
3 Punkte	Dichtes bandförmiges lymphozytäres Infiltrat oder Lymphfollikel mit Keimzentren
<b>Auswertung</b>	
Summe 0 oder 1	Endgrad 0: Keine Synovialitis
Summe 2 oder 3	Endgrad 1: Geringgradige Synovialitis
Summe 4 bis 6	Endgrad 2: Mittelgradige Synovialitis
Summe 7 bis 9	Endgrad 3: Hochgradige Synovialitis

### **2.4.2 Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung)**

Für jede Synovialisbiopsie wurden drei Schnitte, aus verschiedenen Regionen der Biopsie, ausgewählt und mittels Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Ziel der HE-Färbung war die einfache Identifizierung von Zellkernen und Zellplasma: Hämatoxylin färbt Zellkerne aufgrund der basophilen Eigenschaften blau und Eosin färbt das Zellplasma aufgrund azidophiler Eigenschaften rötlich <sup>118</sup>.

Die Gefrierschnitte wurden aufgetaut, 30 Minuten luftgetrocknet und anschließend für zwei Minuten in destilliertem Wasser getränkt. Danach wurden die Schnitte für sieben Minuten mit einer Hämalaun-Lösung nach Mayer (Mayers Hämalaunlösung, HX093785, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) gefärbt. Aufgrund des niedrigen pH-Wertes dieser Lösung erscheinen die Zellkerne zunächst rötlich-braun. Erst durch die Erhöhung des pH-Wertes, beim anschließenden zehnmütigen Waschschrift mit fließendem Leitungswasser, schlug der Farbton ins Blaue um. Nach einem weiteren einmütigen Spülvorgang mit destilliertem Wasser folgte die Zytoplasma-Färbung mit einer 1% Eosin G-Lösung (Chroma® Technology Corporation, Connecticut, USA) für zwei Minuten. Es folgte ein weiterer Spülschrift mit destilliertem Wasser. Anschließend wurden die Schnitte durch Anwendung einer aufsteigenden Alkoholreihe mit 70%, 90% und 99% Ethanol und anschließend 100% Xylol final entwässert und mit Hilfe eines Deckgläschens (engelbrecht medizin- und labortechnik GmbH, Edermünde, Deutschland) und DePEX® (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) eingedeckt und fixiert.

### **2.4.3 Lichtmikroskopische Auswertung**

Nach mehrtägigem Trocknen konnten die HE-Schnittpräparate nach dem oben beschriebenen „Synovialitis-Score nach Krenn“ lichtmikroskopisch ausgewertet werden. Hierzu verwendeten wir ein Lichtmikroskop (Axioskop 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Köln, Deutschland) und nutzten die Übersichtsvergrößerung unter Verwendung des vierfach vergrößernden Objektivs und des zehnfach vergrößernden Okulars um den Ort der am stärksten ausgeprägten histopathologischen Veränderungen ausfindig zu machen, wie es von Krenn et al <sup>117</sup> für die pathomorphologische Beurteilung gefordert wird. Für die Bewertung der leukozytären Infiltration nutzten wir das zehnfach vergrößernde Objektiv mit Verwendung des zehnfach vergrößernden Okulars. Die Verbreiterung der synovialen Deckzellschicht und die Infiltration des synovialen Stromas beurteilten wir mit Hilfe des vierzigfach vergrößernden Objektivs und des zehnfach vergrößernden Okulars.

Die weitere statistische Auswertung wird in Kapitel 2.8. beschrieben.

## **2.5 Qualitativer Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in Synovialisbiopsien**

### **2.5.1 Immunhistochemie**

Um die Endprodukte des oxidativen bzw. nitrosativen Stress in den Synovialisbiopsien nachzuweisen, stellten wir Gewebeschnitte her und färbten diese mittels immunhistochemischen Techniken. Der Nachweis von Zielantigenen in Geweben mittels Immunhistochemie beruht auf der Affinität eines Antikörpers zu einem bestimmten Epitop im Sinne einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Hierbei kommt es im Idealfall zu einer spezifischen und stabilen Bindung des Antikörpers an sein Epitop. In mehreren Schritten wird ein Detektionssystem an die Antikörper gekoppelt, welches das Vorhandensein des Antigen-Antikörper-Komplexes im Gewebe sichtbar macht <sup>118</sup>.

### **2.5.2 Methoden zur Antigendemaskierung**

Unter Antigenmaskierung versteht man, dass die determinanten Gruppen im Gewebe durch Vernetzungsreaktionen im Rahmen der Fixierungs- und Einbettungsprozesse so beeinträchtigt werden, dass sie ohne Vorbehandlung keinem histologischen Nachweisverfahren zugänglich sind <sup>118</sup>. Zur Aufhebung einer solchen Antigenmaskierung können verschiedene Vorbehandlungsprozesse (Antigendemaskierung) eingesetzt werden. Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzten werden im Folgenden genauer erläutert.

#### *Hitzevorbehandlung*

Bei der Hitzevorbehandlung kommt es durch die Einwirkung von feuchter Hitze bei pH-Werten von 2 bis 10 zu einer erhöhten Permeabilität des fixierten Gewebes. Dadurch werden die maskierten Epitope wieder freigelegt und der Bindung von Antikörpern zugänglich gemacht. Der genaue Wirkungsmechanismus der Hitzeeinwirkung ist zwar noch nicht genau bekannt, es wird jedoch angenommen, dass die Formaldehyd-induzierte Proteinmodifikation mithilfe der Hitzedemaskierung rückgeführt und remodeliert wird <sup>118</sup>. Wir testeten die Hitzewirkung, indem wir die in 4% PFA asservierten Schnitte bei 37°C für 30 und 40 Minuten in einem Wärmeschrank erhitzen.

#### *Retrieval-Lösungen*

Alternativ wird diskutiert, dass Antigene durch Kalzium-Protein-Komplexe maskiert werden, die durch geeignete demaskierende Lösungen (sogenannte Retrieval-Lösungen), wieder gelöst werden. Häufig verwendete Retrieval-Lösungen sind beispielsweise Citratpuffer pH 6, EDTA-Lösung pH 8 und Tris-EDTA pH 10 <sup>118</sup>. In der vorliegenden Arbeit versuchten wir mit Citratpuffer pH 6 eine Antigendemaskierung zu erzielen (s. Tabelle 9).

### *Andauung durch proteolytische Enzyme*

Bei diesem Ansatz der Antigendemaskierung wird angenommen, dass durch die Enzymwirkung die fixierungsbedingten Proteinvernetzungen aufgebrochen werden und die Permeabilität des Gewebes so gesteigert wird, dass die Primäantikörper wieder in der Lage sind an ihr jeweiliges Epitop zu binden <sup>118</sup>. Wir testeten zwei verschiedene Enzyme (Trypsin und Proteinase K) bei unterschiedlichen Wirkdauern (s. Tabelle 9).

### *Antigendemaskierung mittels Detergenzien*

Bei Detergenzien handelt es sich um „oberflächenaktive“ Stoffe. Sie setzen die Oberflächenspannung zwischen der hydrophilen und lipophilen Phase von Membranen herab. Membranlipide werden emulgiert und aus der Membran herausgelöst. Im Organismus führt dies zu einer Zerstörung der jeweiligen Membran. Bei der Antigendemaskierung wird die Permeabilität der quervernetzten Strukturen bzw. Membranen erhöht, sodass das Epitop seinem Antikörper wieder zugänglich wird. Als gängige Detergenzien werden beispielsweise Triton X-100 und Saponine verwendet <sup>119</sup>.

**Tabelle 9 Ansätze zur Antigendemaskierung für immunhistochemische Färbungen.** In Klammern (1-13) stehen die Nummern der Vorbehandlungsansätze, auf deren Ergebnisse in Tabelle 12 (Kapitel 3.3) eingegangen wird.

	<b>Demaskierung</b>	<b>Puffer</b>	<b>Prozedur</b>	
<b>Asservation in 4% PFA oder 0,9% NaCl</b>	Hitze	Citratpuffer pH 6	2 min 100°C	<b>(1)</b>
			20 min 90°C + 20 min RT	<b>(2)</b>
			40 min 90°C + 20 Min RT	<b>(3)</b>
	Enzyme	Trypsin-EDTA	5 min 37°C	<b>(4)</b>
			10 min 37°C	<b>(5)</b>
			20 min 37°C	<b>(6)</b>
			30 min 37°C	<b>(7)</b>
			40 min 37°C	<b>(8)</b>
			1 Tr. Proteinase K in Trispuffer pH 8	6 min RT
	Detergenzien	0,1% Saponin in PBS	15 min RT	<b>(10)</b>
			20 min 37°C	<b>(11)</b>
	Keine	0,25% Triton X-100, 5% BSA in PBS	60 min RT	<b>(12)</b>
				<b>(13)</b>

### 2.5.3 Immunhistochemischer Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan $F_{2\alpha}$

In der vorliegenden Arbeit nutzten wir die sogenannte Zwei-Schritt-indirekte Nachweismethode zur Detektion des Antigen-Antikörper-Komplexes. Hierbei bindet ein spezifischer, aber unkonjugierter Primärantikörper an das Epitop (Antigen) im Gewebe. Im nächsten Schritt wird ein gegen den Primärantikörper gerichteter biotinylierter sekundärer Antikörper zugegeben. Dieser bindet an dessen  $F_{ab}$ -Domäne und wird anschließend durch einen Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex (ABC) detektiert. Dies geschieht, indem der ABC an die Biotinreste des sekundären Antikörpers bindet. Der ABC besitzt vier Peroxidasezentren. Diese katalysieren im letzten Schritt eine Enzym-Substrat-Reaktion, bei der 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) als Peroxidasesubstrat dient und zu einem braunen Endprodukt umgesetzt wird. Die Intensität der Färbung gilt als Maß für die Zahl vorhandener Antigene<sup>120</sup>. Das Grundprinzip der Zwei-Schritt-indirekten Nachweismethode wird noch einmal vereinfachend in Abbildung 6 dargestellt.

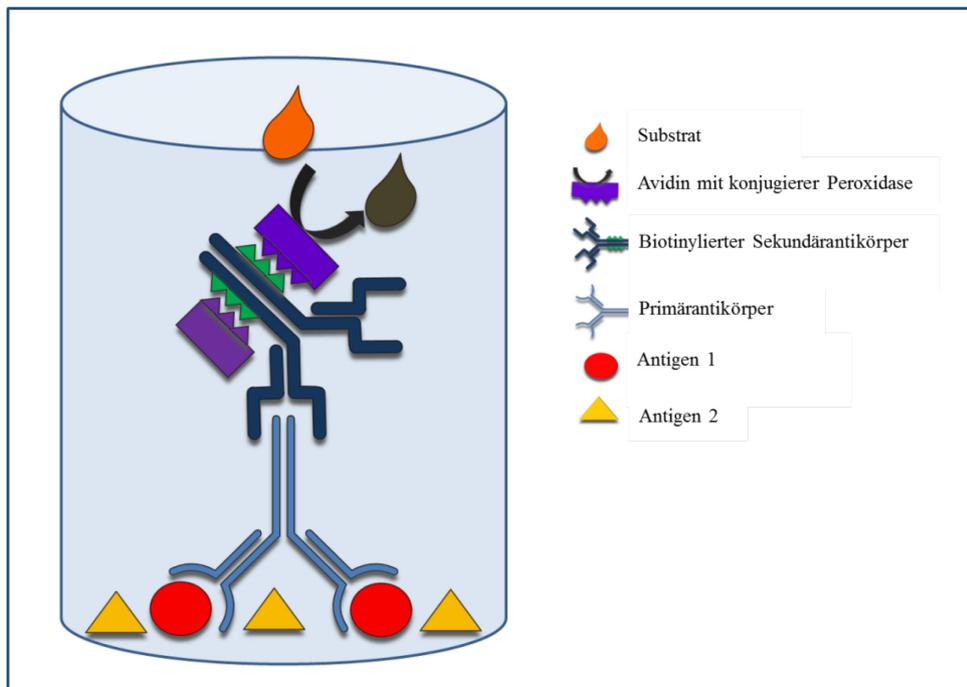


Abbildung 6 Reaktionsaufbau der immunhistochemischen Zwei-Schritt-indirekten Nachweismethode

Der Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  erfolgte an jeweils neun Gefrierschnitten pro Synovialis-Biopsie unter Verwendung eines Färbeprotokolls, welches im Folgenden detailliert beschrieben wird und in Tabelle 10 zusammenfassend dargestellt ist. Die Herstellung der Gefrierschnitte wird in Kapitel 2.3.3 erläutert.

Für jede Antikörperreihe trugen wir zunächst mit Hilfe eines Fettstiftes (Firma DakoCytomation, Hamburg, Deutschland) ein Feld für jeden verwendeten Antikörper auf den Objektträgern auf.

Zusätzlich wurde jeweils ein Feld für die immunhistochemische Negativkontrolle aufgetragen. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden ausschließlich an den markierten Feldern der Schnittpräparate vorgenommen.

Zu Beginn der Färbung wurden die Schnitte mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert<sup>169</sup>, um die endogene Peroxidaseaktivität zu blockieren. Diesem Vorgang liegt das Prinzip der Substrathemmung zugrunde. Die Blockierung der endogenen Peroxidase ist notwendig, um eine hohe Spezifität der Färbung an der später eingesetzten Meerrettichperoxidase zu erhalten. Anschließend wurden die Schnitte dreimal mit PBS gespült. Nun folgte die Inkubation mit dem Primärantikörper bei 4°C über Nacht<sup>169</sup>.

Für den Nachweis von 3-Nitrotyrosin nutzten wir als Primärantikörper den monoklonalen 3-Nitrotyrosin-(Maus)-AK der Firma Millipore<sup>169</sup>. Zur Bestimmung der geeigneten Antikörperkonzentration testeten wir unterschiedliche Verdünnungsstufen von 1:50, 1:100, 1:200, 1:250, 1:400, 1:500, 1:600, 1:800 und 1:1000 in PBSTA (PBST + 2% Rinderalbumin). Die Zugabe von Normalserum (PBSTA) dient der Blockierung einer unspezifischen Hintergrundfärbung, die durch ionische Anlagerung von Primär- und Sekundärantikörpern an stark geladene Proteine entstehen würde.

Für den Nachweis von 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> diente der polyklonale 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-(Ziegen)-AK (Firma Oxford Biomedical Research, Oxford, England) als Primärantikörper<sup>169</sup>. Dessen optimale Konzentration wurde vor dem eigentlichen Versuch ebenfalls austitriert (1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:600, 1:800 und 1:1000 in PBSTA).

Als Negativkontrolle, die der Kontrolle unspezifischer Färbungen dienen sollte, setzten wir jeweils Schnitte ein, bei denen der Primärantikörper durch IgGs derselben Spezies ersetzt wurde. Bei dem Nitrotyrosin-AK wurde ein Maus - IgG in der Verdünnung 1:1000 und bei dem 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-AK ein Ziegen - IgG in der Verdünnung 1:1000 eingesetzt. Ein Schnitt, von dem bekannt war, dass er eine starke Färbung hervorbrachte, wurde als Positivkontrolle in jeder Färbereihe mitgeführt.

Nach der nächtlichen Inkubationsphase wurde dreimal mit PBST (PBS + 1% Triton X-100) bei Raumtemperatur gespült. Dann folgte eine 45-minütige Inkubation mit dem Sekundärantikörper, der in einer Verdünnung von 1:200 in PBSTA verwendet wurde. Bei dem Sekundärantikörper handelte es sich, in Abhängigkeit des Primärantikörpers, bei dem 3-Nitrotyrosin-Antikörper um einen biotinylierten Antikörper gegen Maus, bei dem 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-Antikörper um einen gegen Ziege<sup>169</sup>.

Nach einem erneuten Spülvorgang wurden die Schnitte für 20 Minuten mit AB-Komplex (Firma BioScience GmbH, Ransbach-Baumbach, Deutschland), bestehend aus Avidin und biotinylierter Meerrettichperoxidase (zwei Tropfen pro 5 ml PBST) inkubiert. Danach wurde erneut mit PBS gespült, um ungebundene ABC auszuschwemmen und eine falsch-positive Färbung zu minimieren.

Als Peroxidasesubstrat wurde 3,3'-Diaminobenzidin (DAB) appliziert. Dieses wurde unmittelbar vor dem Färbevorgang frisch angesetzt. Die Farbentwicklung wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und nach zwei Minuten mittels zweimaligen Spülvorgangs mit PBS beendet<sup>169</sup>.

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden, wie in Kapitel 2.4.2 beschrieben, eingebettet und konserviert.

**Tabelle 10 Immunhistochemisches Färbeprotokoll**

<b>Arbeitsschritt</b>	<b>Agenzien</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Dauer</b>
Spülen	PBS		RT	1x 10 s
Blockierung	3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /PBS		RT	20 min
Spülen	PBS		RT	3x 10 s
Inkubation	1. AK/PBSTA	1:800	4°C	Über Nacht
Spülen	PBS		RT	3x 10 s
Inkubation	2. AK/PBSTA	1:200	RT	45 min
Spülen	PBS		RT	3x 10 s
Inkubation	ABC/PBST	2 Tropfen/5 ml	RT	30 min
Spülen	PBS		RT	3x 10 s
Substratzugabe	DAB		RT	2 min
Reaktionsende	PBS		RT	3x 10 s

### 2.5.4 Densitometrie der immunhistochemischen Färbungen

Zur Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate wendeten wir die Graustufendifferenzwertmethode (Densitometrie) an. Hierzu fertigten wir digitale Abbildungen der gefärbten Synovialmembranen an. Anschließend überführten wir die Abbildungen in das Bildbearbeitungs- und Bildverarbeitungsprogramm ImageJ 1.47v (Image Processing and Analysis in Java, Wayne Rasband), mit dessen Hilfe wir anschließend die Färbeintensitäten der Synoviozyten messen konnten<sup>169</sup>.

Für die Anfertigung der digitalen Abbildungen nutzten wir ein Lichtmikroskop (Axioskop 2, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Köln, Deutschland) unter Verwendung des vierzigfach vergrößernden Objektivs und des zehnfach vergrößernden Okulars. Wir wählten intakte Synoviozyten aus und fotografierten sie mittels der angeschlossenen Kamera (AxioCam MRc, Carl Zeiss Microscopy GmbH, Köln, Deutschland), welche die jeweiligen Fotos zur digitalen Aufarbeitung an einen angeschlossenen Computer weiterleitet. Die eingehenden Fotos wurden unter Verwendung des Bildbearbeitungsprogramms AxioVision (Carl Zeiss Microscopy GmbH, Köln, Deutschland) unkomprimiert gespeichert, so dass sie dann zur manuellen Ausmessung verwendet werden konnten.

Bei der Auswertung wurde die Färbeintensität von jeweils drei Synoviozyten pro Schnittpräparat (pro Proband wurden drei repräsentative Gewebeschnitte untersucht) gemessen. Hierzu wurde jede Zelle und der Hintergrund jeder Zelle einzeln markiert und ausgemessen <sup>169</sup>.

Das Bildbearbeitungsprogramm ImageJ ordnet jedem Abbildungspunkt (Pixel) eine Graustufe von 0 (entspricht der Stufe „schwarz“) bis 255 (entspricht der Stufe „weiß“) zu. Wird hingegen eine Fläche – in unserem Fall ein Synoviozyt – markiert, so wird der arithmetische Mittelwert der Graustufen der einzelnen Pixel der Fläche errechnet und ausgegeben <sup>169</sup>.

Aus der Differenz der Färbung der Synoviozyten und der Hintergrundfärbung errechneten wir die Absolutfärbung der Synoviozyten. Diese gilt als Maß für die Anzahl der Antigen-Antikörper-Komplexe und somit als semiquantitatives Maß für die von uns untersuchten Antigene (d. h. 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2a}$ ). Aus den gemessenen Dichtewerten ermittelten wir als Maß für die Stärke der Expression des jeweiligen Antigens den arithmetischen Mittelwert <sup>169</sup>.

Zur weiteren statistischen Auswertung siehe Kapitel 2.8.

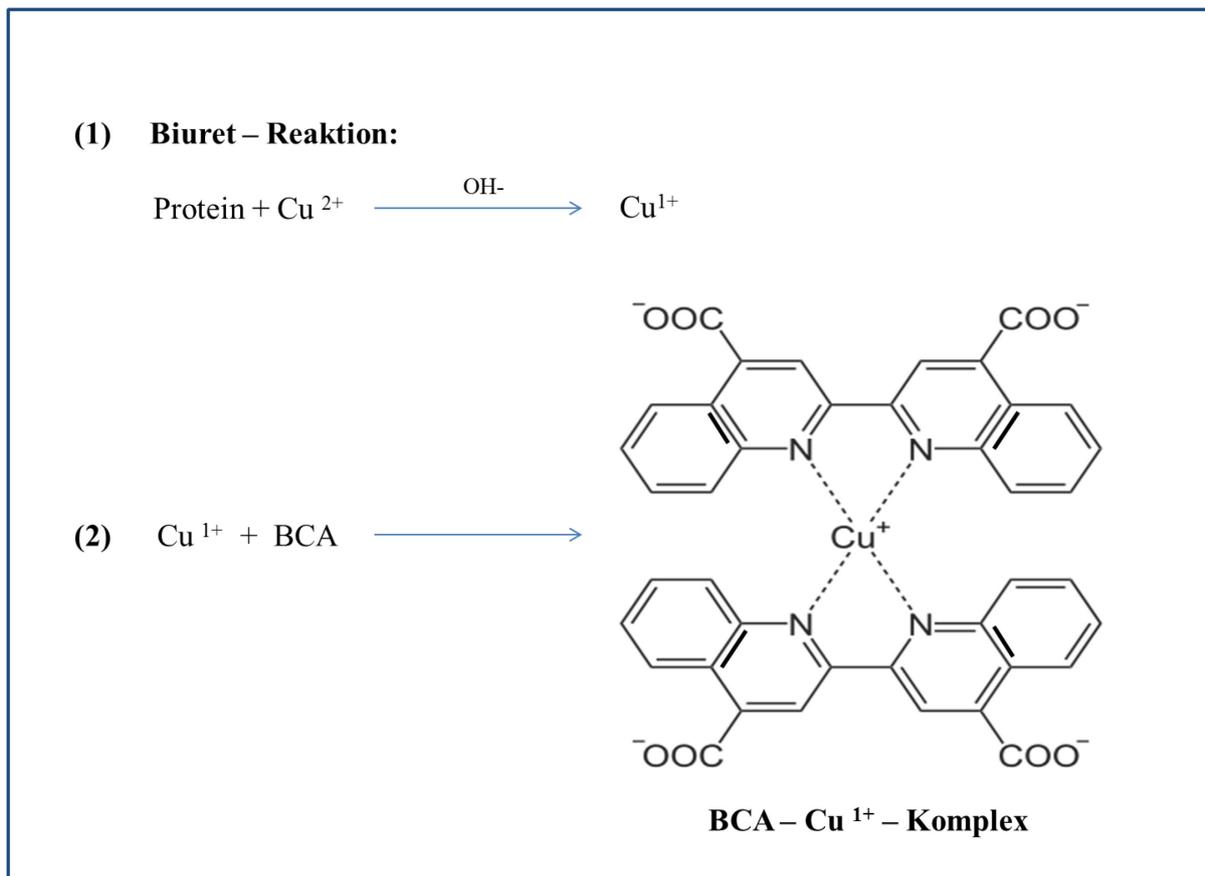
## **2.6 Quantifizierung des Proteingehalts der Synovialflüssigkeit mittels BCA-Proteinkonzentrationsbestimmung**

Der Proteingehalt der bei  $-80^{\circ}\text{C}$  kryokonservierten Synovialflüssigkeiten wurde mit Hilfe des *Bicinchoninic Acid Protein Assay* (BCA; Micro BCA™ Protein Assay Kit, Pierce/Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts) bestimmt <sup>169</sup>.

Das Prinzip der Proteinquantifizierung mittels BCA wurde erstmals von Smith et al beschrieben <sup>121</sup> und beruht auf der Biuret-Reaktion. Hierbei handelt es sich um eine chemische Nachweisreaktion von Peptidbindungen, die in alkalischer Lösung einen Komplex mit zweiwertigem Kupfer ( $\text{Cu}^{2+}$ ) eingehen und dieses zu einwertigem Kupfer ( $\text{Cu}^{1+}$ ) reduzieren. Dieses reagiert in alkalischer Lösung mit Bicinchoninsäure unter Ausbildung eines violett farbigen Komplexes (s. Abbildung 7). Der gebildete Farbkomplex ist stabil, verhält sich proportional der Proteinkonzentration und wird durch eine photokolorimetrische Bestimmung bei einer Wellenlänge von 560 nm quantifiziert.

Das BCA-Kit verwendeten wir gemäß den Herstellerangaben. Zunächst wurden die Proben auf Raumtemperatur gebracht, für zehn Sekunden mit Hilfe eines Vortexmischers (L46, LABINCO, Mumbai, Indien) gemischt und anschließend für zehn Minuten bei  $4^{\circ}\text{C}$  und 14000 rpm zentrifugiert. Abweichend von den Herstellerangaben legten wir jeweils 150  $\mu\text{l}$  der Standardlösung in eine 96-well Platte vor. Die Standardlösung bestand aus bovinem Serumalbumin (BSA) in den Konzentrationen 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25 und 3,125  $\mu\text{g/ml}$ . Die Proben verdünnten wir 1:1, 1:10, 1:100 und 1:1000 und pipettierten jeweils 150  $\mu\text{l}$  in die Wells. Als Verdünnungsreagenz nutzten wir phosphatgepufferte

Salzlösung (PBS) mit einem pH-Wert von 7,4 (gibco®, life technologies™, Bochum, Deutschland). Anschließend setzten wir jeweils 150 µl des *Working Reagent* bestehend aus 25:24:1 *Working Reagent* „MA“, *Working Reagent* „MB“ und *Working Reagent* „MC“ (Kupferlösung) zu. Es folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C auf einem Thermomixer (Thermomixer comfort, eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) mit 150 rpm. Die Extinktion wurde mittels eines Photospektrometers (Multimode Plate Reader, Victor™ X3, Perkin Elmer, Velbert, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 560 nm ermittelt.



**Abbildung 7 Proteinbestimmung mittels BCA-Assay.** Bildung eines violetten Farbkomplexes aus der Reaktion von Bicinchoninsäure (BCA) mit einwertigem Kupfer, welches zuvor durch die Biuret-Reaktion generiert wurde (modifiziert nach Smith et al. <sup>121</sup>).

Den Proteingehalt der Proben errechneten wir anhand der BSA-Referenzkurve. Hierzu wurde *GraphPad PRISM Version 5* (GraphPad Software Inc.) benutzt.

Da es sich bei den gewonnen Synovialflüssigkeiten, aufgrund der Abnahmetechnik, um Auswaschpräparate des Synovialraums mit jeweils unterschiedlichem Verdünnungsmaß handelte, wurde der jeweilige Verdünnungsfaktor ( $x$ ) annähernd aus dem in der Literatur angegebenen

Proteingehalt der Synovialflüssigkeit (30 g/L)<sup>5-7</sup> und dem Proteingehalt, der im BCA-Assay ermittelt wurde, wie folgt, berechnet:

$$(1) \quad x = \frac{30 \text{ g/L}}{\text{BCA g/L}}$$

Für die später durchgeführten ELISA-Nachweise der Parameter des oxidativen und nitrosativen Stress (s. Kapitel 2.7.) in der Synovialflüssigkeit galt folglich:

$$(2) \quad x = \frac{[\text{ELISA}] \times 30 \text{ g/L}}{\text{BCA g/L}}$$

## **2.7. Quantitativer Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in der Synovialflüssigkeit und im Serum**

### **2.7.1 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

Das generelle Prinzip aller Immunoassays basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der Antikörper bindet spezifisch an ein Epitop des nachzuweisenden Antigens. Dabei dient beim ELISA ein Enzym als Marker für die Antigen-Antikörper-Komplexe. Im Rahmen einer Enzym-Substrat-Reaktion wird ein zugesetztes Substrat umgesetzt. Dieses Substrat wird gemeinsam mit einem löslichen Chromogen angeboten, welches anfänglich farblos ist. Wird das Substrat umgesetzt, so wird gleichzeitig das Chromogen zu einer intensiv gefärbten, photospektrometrisch auswertbaren Form umgewandelt. Anhand dieser Farbveränderung kann die Antigenkonzentration durch Vergleich mit einer Standardlösung, die das nachzuweisende Antigen in vordefinierten Konzentrationen enthält, bestimmt werden. Eine weitere Besonderheit des ELISA ist, dass eine Komponente, Antikörper oder Antigen, an einer festen Phase adsorbiert wird. Dies ermöglicht allein durch Waschvorgänge freies Antigen von gebundenem Antigen abzutrennen, sodass keine weiteren Trennmethode verwendet werden müssen<sup>122</sup>.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten ELISA handelt es sich um sogenannte kompetitive ELISA, auf deren Nachweismethode im Folgenden eingegangen wird.

## 2.7.2 Kompetitive ELISA

Kompetitive ELISA (s. Abbildung 8) beruhen auf der Konkurrenz zweier Antigenpopulationen um die gleichen freien Bindungsstellen einer Antikörperpopulation in einem definierten Lösungsvolumen. Dabei besteht eine der Antigenpopulationen aus Enzym-markierten Antigenen. Die andere Antigenpopulation setzt sich aus den gleichen, jedoch unmarkierten Antigenen zusammen. Bei diesen Antigenen handelt es sich um jene, die man in den Proben nachweisen möchte. Die beiden Antigenpopulationen werden von monoklonalen Antikörpern, die auf der Festphase der ELISA-Platte gebunden sind, in Konkurrenz zueinander gebunden. Werden sowohl die Antikörperkonzentration als auch die Konzentration des markierten Antigens und das Flüssigkeitsvolumen in allen Ansätzen konstant gehalten, kann die Menge an unmarkiertem Antigen in der Lösung bestimmt werden. Je mehr unmarkiertes Antigen in der Probe vorhanden ist, desto weniger markiertes Antigen kann an die Antikörper binden. Demnach fällt das Signal, welches bei einer Reaktion von gebundenem, markiertem Antigen mit seinem Substrat entstehen würde, geringer aus. Die Menge des nachzuweisenden Antigens verhält sich also umgekehrt proportional zum Substrat-(Farb)-Umsatz <sup>122</sup>.

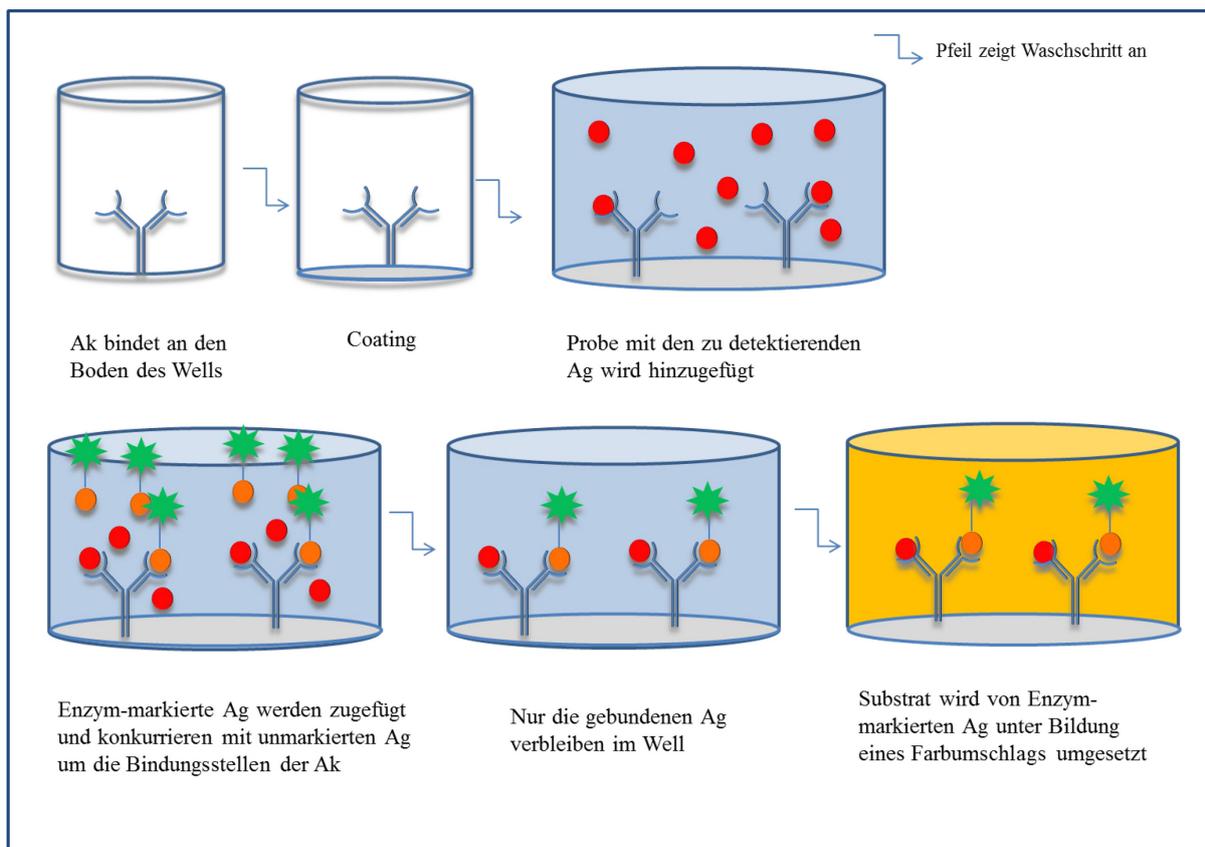


Abbildung 8 Funktionsprinzip des Kompetitiven ELISA (Ak = Antikörper, Ag =Antigen)

### 2.7.3 Nachweis von 3-Nitrotyrosin

Zur Konzentrationsbestimmung der 3-Nitrotyrosin-Moleküle sowohl im Serum als auch in der Synovialflüssigkeit der Probanden verwendeten wir ein ELISA-Kit der Firma Cell Biolabs, Inc, San Diego, USA (OxiSelect™, Nitrotyrosine ELISA Kit) gemäß den Herstellerangaben. Hierbei handelt es sich um einen kompetitiven ELISA <sup>169</sup>.

Der ELISA wies einen Messbereich von 10 nM bis 8000 nM auf. Die Nachweisgrenze lag bei 1,95 nM. Je *well* wurden immer 100 µl pipettiert; es wurden Doppelstimmungen durchgeführt. Als Referenzstandard wurde 3-Nitrotyrosin mit den Konzentrationen 8000, 2000, 500, 125, 31,25, 7,81, 1,95 und 0 nM verwendet. Die Proben wurden jeweils in den Verdünnungen 1:1, 1:10; 1:100 und 1:1000 angesetzt.

Zunächst wurden sowohl jeweils die Proben als auch die nitrierten bovinen Serumalbumin (BSA) – Standards auf der mit anti-3-Nitrotyrosin Antikörper vorbeschichteten 96-*well*-Platte inkubiert. Hiernach wurden sowohl die 3-Nitrotyrosin-Standards, als auch die Proben mit einem markiertem 3-Nitrotyrosin-Antigen vermischt. Bei dem markierenden Enzym handelte es sich um eine Meerrettich-Peroxidase (HRP). Nun konkurrierten die unmarkierten 3-Nitrotyrosin-Moleküle aus den Proben mit den HRP-markierten 3-Nitrotyrosin-Molekülen um die Bindungsstellen der Festphase-gebundenen Antikörper. Nach kurzzeitiger Inkubation wurde ein Substrat der HRP, ein Chromogen, zugesetzt.

Als Resultat der folgenden Enzym-Substrat-Reaktion entstand ein blaues Farbprodukt. Dieses wurde nach Abstoppen der Färbereaktion mit Schwefelsäure gelb. Die Farbentwicklung wurde photospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert.

Das Chromogen verhielt sich proportional zu der Menge an gebundenem HRP-markiertem 3-Nitrotyrosin und umgekehrt proportional zum 3-Nitrotyrosin-Gehalt in der jeweiligen Probe oder der Standardlösung. Die 3-Nitrotyrosin-Konzentration der Proben wurde nun ermittelt, indem sie mit der Standardkurve verglichen wurde, die sich aus der Standardreihe ergab.

Die Daten der photospektrometrischen Messungen übertrugen wir in *GraphPad PRISM Version 5* (GraphPad Software Inc.). Hier standen sie uns für die weitere statistische Auswertung und graphische Darstellung zur Verfügung. Den 3-Nitrotyrosin-Gehalt der Proben errechneten wir anhand der jeweiligen Referenzkurve <sup>169</sup>.

#### 2.7.4 Nachweis von 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>

Für den Nachweis von 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in den Serum- und Synovialflüssigkeits-Proben verwendeten wir einen kompetitiven ELISA der Firma Cell Biolabs, Inc., San Diego, USA. (OxiSelect™ 8-iso-Prostaglandin F<sub>2α</sub> ELISA Kit) gemäß den Herstellerangaben<sup>169</sup>.

Der ELISA wies einen Messbereich von 49 pg/mL bis 200,000 pg/mL auf. Je *well* wurden immer 100 µl pipettiert; es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Als Referenzstandard wurde 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> mit den Konzentrationen 200.000, 50.000, 12.500, 3.125, 781, 195, 49 und 0 pg/mL verwendet. Die Proben wurden jeweils in den Verdünnungen 1:1, 1:10; 1:100 und 1:1000 angesetzt.

Um sowohl freie als auch veresterte Formen des Isoprostans nachweisen zu können, musste zunächst eine Hydrolyse der Lipoprotein- und Phospholipid-gebundenen Form des 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> durchgeführt werden. Hierfür wurden die Proben mit 2 N NaOH bei 45°C für 2 Stunden inkubiert. Hiernach erfolgte eine Neutralisation mit 10 N HCl. Der jeweilige pH-Wert der Probe sollte 6 – 8 betragen. War dies nicht der Fall, so wurde eine pH-Adjustierung mit NaOH durchgeführt.

Der anti-8-Isoprostan-Antikörper wurde zunächst in einer vorbeschichteten 96-*well*-Platte inkubiert. Nach einem Waschvorgang mit PBS, wurden sowohl eine 8-Isoprostan-Standardlösung, als auch die Proben mit einem markiertem 8-Isoprostan-Antigen vermischt. Bei dem markierenden Enzym handelte es sich um eine Meerrettich-Peroxidase (HRP). Anschließend wurde dieses Lösungsgemisch simultan in die 96-*well*-Platte pipettiert. Nun konkurrierten die unmarkierten 8-Isoprostan-Moleküle aus den Proben mit den HRP-markierten 8-Isoprostan-Molekülen um die Bindungsstellen der Festphase-gebundenen Antikörper. Nach kurzzeitiger Inkubation und einem erneuten Spülvorgang wurde ein Substrat der HRP, ein Chromogen, zugesetzt. Die HRP-Aktivität resultierte schließlich in einem Farbumschlag. Dieser wurde photospektrometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm detektiert.

Das Chromogen verhielt sich proportional zu der Menge an gebundenem HRP-markiertem 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> und umgekehrt proportional zum 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-Gehalt in der jeweiligen Probe oder der Standardlösung. Die 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-Konzentration der Proben wurde nun ermittelt, indem sie mit der Standardkurve verglichen wurde, die sich aus der Standardreihe ergab.

Die Daten der photospektrometrischen Messungen übertrugen wir in *GraphPad PRISM Version 5* (GraphPad Software Inc.). Hier standen sie uns für die weitere statistische Auswertung und graphische Darstellung zur Verfügung. Den 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-Gehalt der Proben errechneten wir anhand der jeweiligen Referenzkurve<sup>169</sup>.

## **2.8 Statistische Auswertung**

Alle Daten wurden mit dem Programm *Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, IBM) 17.0* für Windows (2008) analysiert <sup>169</sup>.

Häufigkeitsverteilungen wurden mit dem  $\chi^2$ -Test analysiert. Zusammenhänge zwischen kontinuierlichen Variablen wurden mittels Pearsons-Produkt-Moment-Korrelation untersucht <sup>169</sup>.

Mittelwerte (*Mean*) und Standardfehler (*Standard Error of Mean*) werden als  $M \pm SEM$  berichtet <sup>169</sup>.

Mittelwertsunterschiede zwischen zwei Gruppen wurden mit Hilfe des *t*-Tests für unabhängige Stichproben inferenzstatistisch abgesichert. Mittelwertsunterschiede zwischen mehr als zwei Gruppen wurden mit Hilfe der univariaten Varianzanalyse (*Analysis of Variance (engl.), ANOVA*) analysiert. Um im Falle einer signifikanten Varianzanalyse zu ermitteln, welche Gruppen sich voneinander unterscheiden, wurde der Tukey-Test als *post hoc*-Signifikanztest verwendet <sup>169</sup>.

Gerichtete Hypothesen wurden mit einseitigen Tests untersucht, ungerichtete mit zweiseitigen Tests <sup>169</sup>.

Bei allen verwendeten parametrischen Tests wurden die jeweiligen Voraussetzungen (z. B. Normalverteilung, Populationsgröße mit  $n > 30$ , Intervallskalierung der Daten) mit den entsprechenden Tests (z. B. Kolmogorov-Smirnov-Test, Levene-Test) geprüft. In den hier berichteten Analysen waren die Voraussetzungen entweder erfüllt, oder nur geringfügig verletzt, sodass nicht auf non-parametrische Tests ausgewichen werden musste, da sich die hier verwendeten parametrischen Tests als sehr robust gegenüber Voraussetzungsverletzungen erwiesen haben <sup>123, 169</sup>.

Bei allen Tests wurden Ergebnisse mit dem Wahrscheinlichkeitswert (*p-value*)  $p < 0,05$  als signifikant erachtet. Bei  $p < 0,01$  wurden die Ergebnisse als hochsignifikant gewertet <sup>169</sup>.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1 Deskriptive Statistik**

Tabelle 11 zeigt die demographischen Daten der Probanden der einzelnen Versuchsgruppen<sup>169</sup>. Die Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant in der Verteilung von Geschlecht, Größe, Gewicht, BMI, Nikotinkonsum und subjektivem Schmerzempfinden. Lediglich der Altersdurchschnitt und die Komorbidität mit arterieller Hypertonie war in der Gruppe „reizloses Kniegelenk“ signifikant niedriger als in den Gruppen „Gonarthrose“ und „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,032$ ).

Da nicht alle Proben in allen Versuchen zur Anwendung kamen, wird in der jeweiligen Ergebnispräsentation auf das entsprechend verwendete Probandenkollektiv eingegangen.

**Tabelle 11 Demographische Charakteristika der einzelnen Versuchsgruppen.** Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardfehler. [BMI = body mass index; VAS = visuelle Analogskala (0= kein Schmerz bis 10 = stärkster Schmerz); \* = post-hoc Analyse: „Gonarthrose/akuter Knieschmerz“ > „Reizloses Knie“]<sup>169</sup>

	"Gonarthrose"	"Akuter Knieschmerz"	"Reizloses Knie"	<i>p</i> -Wert
Anzahl	24	11	34	
Alter [Jahre]	48,58 ± 2,94	52,91 ± 5,01	29,74 ± ,79	$p < 0,001^*$
Geschlecht [w/m in %]	41,7 / 58,3	36,4 / 63,6	58,8 / 41,2	$p = 0,282$
Größe [cm]	171,80 ± 2,06	172,89 ± 2,81	172,46 ± 1,65	$p = 0,945$
Gewicht [kg]	84,25 ± 3,87	78,89 ± 5,80	85,11 ± 3,73	$p = 0,679$
BMI [kg/m <sup>2</sup> ]	28,42 ± 1,07	26,22 ± 1,39	28,50 ± 1,03	$p = 0,477$
Schmerz [VAS]	2,1 ± 0,28	1,44 ± 0,29	2,07 ± 0,19	$p = 0,352$
Arterielle Hypertonie [nein/ja in %]	70 / 30	70 / 30	100 / 0	$p = 0,032^*$
Nikotin [nein/ja in %]	95 / 5	80 / 20	89,3 / 10,7	$p = 0,444$

## **3.2 Korrelationen klinischer Charakteristika**

### **3.2.1 Subjektives Schmerzempfinden versus Schweregrad der Gelenkschädigung**

Der Zusammenhang zwischen subjektivem Schmerzempfinden (gemessen anhand der visuellen Analogskala) und dem Arthrosegrad nach Kellgren-Lawrence in den verschiedenen Kompartimenten des Kniegelenks (mediales, laterales und femoropatellares Kompartiment) wurde mittels Pearson-Korrelation untersucht:

Weder für das mediale ( $r = -0,039$ ,  $p = 0,77$ , zweiseitig) noch für das laterale Kompartiment ( $r = 0,063$ ,  $p = 0,65$ , zweiseitig) war die Korrelation signifikant. Lediglich im femoropatellaren Kompartiment zeigte sich eine deskriptive Korrelation ( $r = 0,202$ ,  $p = 0,14$ , zweiseitig), die das Signifikanzniveau aber verfehlte<sup>169</sup>.

Untersucht man den Zusammenhang zwischen subjektivem Schmerzempfinden und dem Arthrosegrad nach Outerbridge, so konnte in keinem der Kompartimente (mediales Kompartiment:  $r = 0,066$ ,  $p = 0,63$ , zweiseitig; laterales Kompartiment:  $r = -0,170$ ,  $p = 0,20$ , zweiseitig, femoropatellares Kompartiment:  $r = 0,083$ ,  $p = 0,53$ , zweiseitig) eine signifikante Korrelation gefunden werden.

Für die Untergruppe „akuter Kniegelenkschmerz“ bestehend aus Meniskuläsionen ( $n = 9$ ) ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen Schmerzempfinden und Schweregrad der Läsion des Außenmeniskus ( $r = 0,478$ ,  $p = 0,19$ , zweiseitig), jedoch eine signifikante Korrelation zwischen Schmerzen und Schweregrad der Innenmeniskusläsion ( $r = -0,756$ ,  $p = 0,02$ , zweiseitig). Die Korrelation war jedoch unerwartet gerichtet<sup>169</sup>.

Für die Untergruppe „reizloses Knie“, bestehend aus Kreuzbandrupturen und Patienten mit autologer Chondrozytentransplantation ergab sich auch keine signifikante Korrelation zwischen Schmerzgrad und Gelenkschädigung (bzw. Schädigungsgrad des Kreuzbandes (Teilruptur/Ruptur) ( $r = 0,03$ ,  $p = 0,82$ , zweiseitig).

### **3.2.2 Zusammenhang zwischen BMI, Schmerzempfinden und Ausmaß der Gelenkschädigung**

Zwischen BMI und subjektivem Schmerzempfinden konnte für die gesamte Studienpopulation keine signifikante Korrelation gefunden werden ( $r = 0,108$ ,  $p = 0,422$ , zweiseitig).

Der Zusammenhang zwischen BMI und dem Arthrosegrad nach Kellgren-Lawrence bzw. Outerbridge in den verschiedenen Kompartimenten des Kniegelenks (mediales, laterales und femoropatellares Kompartiment) wurde mittels Pearson-Korrelation untersucht.

Hinsichtlich BMI und Arthrosegrad nach Kellgren-Lawrence zeigte sich sowohl für das mediale ( $r = 0,315$ ,  $p < 0,01$ , einseitig) als auch für das laterale ( $r = 0,267$ ,  $p = 0,03$ , einseitig) und femoropatellare Kompartiment ( $r = 0,48$ ,  $p < 0,001$ , einseitig) eine signifikante Korrelation<sup>169</sup>.

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen Arthrosegrad nach Outerbridge, so ergab sich lediglich für das femoropatellare Kompartiment eine signifikante Korrelation ( $r=0,303$ ,  $p=0,01$ , einseitig). Das mediale ( $r=0,202$ ,  $p=0,07$ , einseitig) und laterale Kompartiment ( $r=-0,138$ ,  $p=0,15$ , einseitig) zeigten keine signifikante Korrelation.

Für die Untergruppe „akuter Kniegelenkschmerz“ ergab sich kein signifikanter Zusammenhang zwischen BMI und Meniskopathie des Innenmeniskus ( $r=0,087$ ,  $p=0,83$ , zweiseitig) oder Außenmeniskus ( $r=-0,183$ ,  $p=0,64$ , zweiseitig)<sup>169</sup>.

Auch zwischen BMI und Schweregrad einer Kreuzbandruptur (Teilruptur versus Ruptur), vertreten in der Gruppe „reizloses Knie“, ergab sich keine signifikante Korrelation ( $r=0,240$ ,  $p=0,07$ , zweiseitig).

### **3.2.3 Zusammenhang zwischen Arthrosegrad nach Kellgren/Lawrence und Outerbridge**

Der Zusammenhang zwischen dem röntgenmorphologischen Arthrosegrad nach Kellgren-Lawrence und dem arthroskopisch ermittelten Arthrosegrad nach Outerbridge in den verschiedenen Kompartimenten des Kniegelenks (mediales, laterales und femoropatellares Kompartiment) wurde mittels Pearson-Korrelation untersucht:

Es zeigte sich sowohl für das mediale Kompartiment ( $r=0,58$ ,  $p<0,001$ , einseitig), als auch für das laterale ( $r=0,43$ ,  $p<0,001$ , einseitig) und femoropatellare Kompartiment ( $r=0,53$ ,  $p<0,001$ , einseitig) eine hochsignifikante Korrelation.

### **3.2.4 Ausmaß der Gelenkschädigung zwischen den drei Versuchsgruppen**

Die Mittelwertsunterschiede zwischen den drei Versuchsgruppen wurden mit Hilfe einer einfaktoriellen between-subjects ANOVA analysiert. Die Ergebnisse werden im Folgenden ausführlich beschrieben und vereinfachend in Tabelle 12 dargestellt. Die entsprechenden Tukey *post hoc* Analysen werden in Tabelle 13 dargestellt.

**Tabelle 12 Ausmaß der Gelenkschädigung zwischen den Versuchsgruppen**

<b>Mittelwertsvergleich nach Kellgren-Lawrence</b>					
Kompartiment		Gonarthrose	Akuter Knieschmerz	Reizloses Kniegelenk	<i>p</i> -Wert
Medial	<i>n</i>	18	10	29	0,001
	M	1,56	0,8	0,48	
	SEM	0,28	0,25	0,13	
Lateral	<i>n</i>	18	10	29	< 0,001
	M	1,28	0,1	0,34	
	SEM	0,25	0,1	0,1	
Femoropatellar	<i>n</i>	18	10	29	< 0,001
	M	1,56	0,1	0,52	
	SEM	0,31	0,1	0,14	
<b>Mittelwertsvergleich nach Outerbridge</b>					
Medial	<i>n</i>	24	11	34	< 0,001
	M	2,5	1,64	0,88	
	SEM	0,31	0,36	0,26	
Lateral	<i>n</i>	24	11	34	0,003
	M	1,88	1,18	0,59	
	SEM	0,29	0,3	0,25	
Femoropatellar	<i>n</i>	24	11	34	0,001
	M	2,71	1	1,56	
	SEM	0,27	0,23	0,27	

**Tabelle 13** Tukey post hoc Analyse der Mittelwertsvergleiche, dargestellt sind die entsprechenden  $p$ -Werte, signifikante Werte sind mit \* gekennzeichnet

Gruppenvergleiche	Kellgren-Lawrence			Outerbridge		
	Kompartiment					
	medial	lateral	femoro- patellar	medial	lateral	femoro- patellar
Gonarthrose vs. Akuter Knieschmerz	0,091	< 0,001*	< 0,001*	0,24	0,35	0,004*
Gonarthrose vs. Reizloses Kniegelenk	0,001*	< 0,001*	0,001*	< 0,001*	0,002*	0,008*
Akuter Knieschmerz vs. Reizloses Kniegelenk	0,6	0,64	0,43	0,3	0,43	0,49

Eine einfaktorielle between-subjects ANOVA zeigte signifikante Mittelwertsunterschiede in den Kellgren-Lawrence-Arthrosegraden im medialen Kompartiment zwischen den drei Versuchsgruppen „Gonarthrose“ ( $n=18$ ,  $M=1,56$ ;  $SEM=0,28$ ), „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $n=10$ ,  $M=0,80$ ,  $SEM=0,25$ ) und „reizloses Knie“ ( $n=29$ ,  $M=0,48$ ,  $SEM=0,13$ ) ( $F(2,54)=8,018$ ,  $p=0,001$ ).

Tukey *post hoc* Tests zeigten, dass sich die Arthrosegruppe signifikant von der Gruppe „reizloses Kniegelenk“ unterschied ( $p=0,001$ ), jedoch nicht signifikant von der Gruppe „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $p=0,091$ ). Die Gruppen „akuter Kniegelenkschmerz“ und „reizloses Knie“ unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,6$ ).

Auch für das laterale Kompartiment zeigten sich signifikante Mittelwertsunterschiede ( $F(2,54)=11,76$ ,  $p=<0,001$ ) zwischen den Versuchsgruppen (Gonarthrose ( $n=18$ ,  $M=1,28$ ,  $SEM=0,25$ ), „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $n=10$ ,  $M=0,10$ ,  $SEM=0,10$ ) und „reizloses Knie“ ( $n=29$ ,  $M=0,34$ ,  $SEM=0,10$ ) für die Arthrosegrade nach Kellgren-Lawrence.

Der Tukey *post hoc* Test zeigte, dass sich die Arthrosegruppe sowohl signifikant von der Gruppe „reizloses Kniegelenk“ ( $p<0,001$ ) als auch von der Gruppe „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $p<0,001$ ) unterschied. Die Gruppen „akuter Kniegelenkschmerz“ und „reizloses Knie“ unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,64$ ).

In den Arthrosegraden nach Kellgren-Lawrence zeigten sich für das femoropatellare Kompartiment ähnliche Ergebnisse. So waren die Mittelwertsunterschiede in den einzelnen Versuchsgruppen „Gonarthrose“ ( $n=18$ ,  $M=1,56$ ,  $SEM=0,31$ ), „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $n=10$ ,  $M=0,10$ ,  $SEM=0,10$ ) und „reizloses Knie“ ( $n=29$ ,  $M=0,52$ ,  $SEM=0,14$ ) signifikant ( $F(2,54)=10,57$ ,  $p<0,001$ ).

Auch hier ergab der *post hoc* Test, dass sich die Arthrosegruppe sowohl signifikant von der Gruppe „reizloses Kniegelenk“ ( $p=0,001$ ) als auch von der Gruppe „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $p<0,001$ ) unterschied. Die Gruppen „akuter Kniegelenkschmerz“ und „reizloses Knie“ unterschieden sich hingegen nicht signifikant voneinander ( $p=0,43$ ).

Betrachtet man die Mittelwertsunterschiede in den Arthrosegraden nach Outerbridge im medialen Kompartiment zwischen den drei Versuchsgruppen „Gonarthrose“ ( $n=24$ ,  $M=2,50$ ;  $SEM=0,31$ ), „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $n=11$ ,  $M=1,64$ ,  $SEM=0,36$ ) und „reizloses Knie“ ( $n=34$ ,  $M=0,88$ ,  $SEM=0,26$ ), so fällt eine einfaktorielle between-subjects ANOVA erneut signifikant aus ( $F(2,66)=8,69$ ,  $p<0,001$ ).

Tukey *post hoc* Tests zeigten, dass sich die Arthrosegruppe signifikant von der Gruppe „reizloses Kniegelenk“ unterschied ( $p<0,001$ ), jedoch nur deskriptiv von der Gruppe „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $p=0,24$ ). Die Gruppen „akuter Kniegelenkschmerz“ und „reizloses Knie“ unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,30$ ).

Untersucht man die Mittelwertsunterschiede für das laterale Kompartiment nach Outerbridge, so ergaben sich erneut signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen „Gonarthrose“ ( $n=24$ ,  $M=1,88$ ,  $SEM=0,29$ ), „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $n=11$ ,  $M=1,18$ ,  $SEM=0,3$ ) und „reizloses Knie“ ( $n=34$ ,  $M=0,59$ ,  $SEM=0,25$ ) ( $F(2,66)=6,18$ ,  $p=0,003$ ).

Die *post hoc* Analyse zeigt, dass sich die Gruppe „Arthrose“ signifikant von der Kontrollgruppe „reizloses Knie“ ( $p=0,002$ ) unterschied, nicht jedoch von der Gruppe „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $p=0,35$ ). Die Gruppe „akuter Kniegelenkschmerz“ unterschied sich nicht signifikant von der Gruppe „reizloses Knie“ ( $p=0,43$ ).

Hinsichtlich des femoropatellaren Kompartiments nach Outerbridge ergaben sich erneut signifikante ( $F(2,66)=7,27$ ,  $p=0,001$ ) Mittelwertsunterschiede zwischen den drei Gruppen („Gonarthrose“ ( $n=24$ ,  $M=2,71$ ,  $SEM=0,27$ ), „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $n=11$ ,  $M=1,0$ ,  $SEM=0,23$ ) und „reizloses Knie“ ( $n=34$ ,  $M=1,56$ ,  $SEM=0,27$ )).

Die Gruppe „Arthrose“ unterschied sich sowohl signifikant von der Gruppe „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $p=0,004$ ) als auch von der Gruppe „reizloses Knie“ ( $p=0,008$ ). Letztere unterschieden sich nicht signifikant voneinander ( $p=0,49$ ).

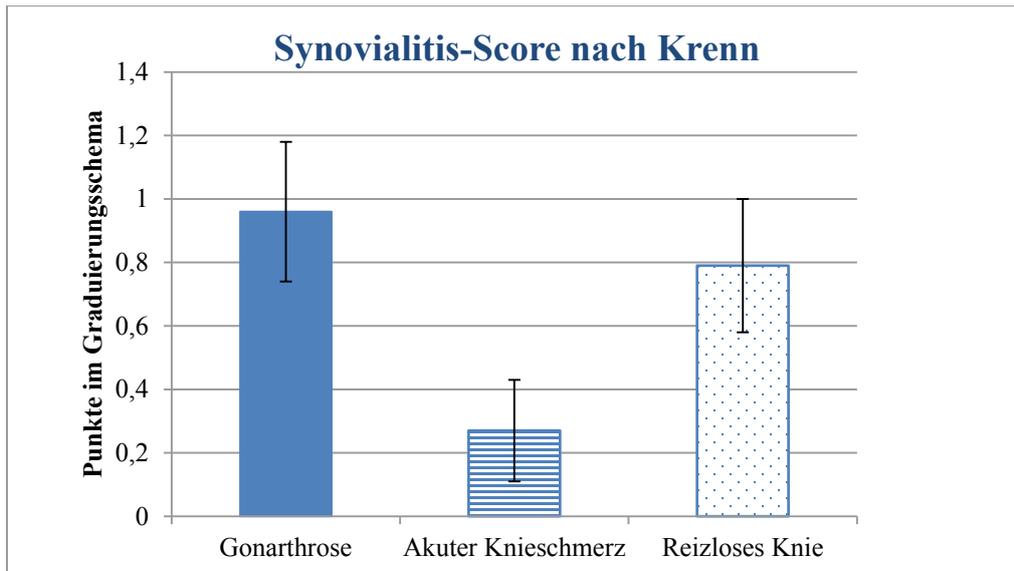
Untersucht man die drei Versuchsgruppen auf eine Meniskopathie des Außenmeniskus (Klassifikation nach Stoller), so zeigten sich hochsignifikante Mittelwertsunterschiede („Gonarthrose“ ( $n=24$ ,  $M=0,13$ ,  $SEM=0,07$ ), „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $n=11$ ,  $M=0,45$ ,  $SEM=0,16$ ) und „reizloses Knie“ ( $n=34$ ,  $M=0,00$ ,  $SEM=0,00$ ) zwischen den Gruppen ( $F(2,66)=10,61$ ,  $p<0,001$ ). So unterschied sich die Gruppe „akuter Kniegelenkschmerz“ signifikant von der Gruppe „Arthrose“ ( $p=0,006$ ) und von der Gruppe „reizloses Knie“ ( $p<0,001$ ). Die Gruppen „Arthrose“ und „reizloses Knie“ unterschieden sich nicht voneinander ( $p=0,23$ ).

Fokussiert man sich auf eine Meniskopathie des Innenmeniskus (Klassifikation nach Stoller), so zeigen sich ähnlich signifikante Ergebnisse der Mittelwertsvergleiche ( $F(2,66)=244,29$ ,  $p<0,001$ ) zwischen den Versuchsgruppen („Gonarthrose“ ( $n=24$ ,  $M=0,50$ ,  $SEM=0,10$ ), „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $n=11$ ,  $M=0,73$ ,  $SEM=0,14$ ) und „reizloses Knie“ ( $n=34$ ,  $M=0,00$ ,  $SEM=0,00$ ).

*Post hoc* Tests zeigten, dass sich die Gruppe „reizloses Knie“ jeweils hochsignifikant von den Gruppen „Gonarthrose“ ( $p<0,001$ ) und „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $p<0,001$ ) unterschied. Zwischen den letzteren Gruppen bestand jedoch kein signifikanter Unterschied ( $p=0,19$ ).

### **3.2.5 Ausmaß des Entzündungsgrades der Synovialisbiopsien**

Eine einfaktorielle between-subjects ANOVA zeigte keine signifikanten Mittelwertsunterschiede hinsichtlich einer Synovialitis (quantifiziert mittels Synovialitis-Score nach Krenn) zwischen den drei Versuchsgruppen „Gonarthrose“ ( $n=15$ ,  $M=0,96$ ;  $SEM=0,22$ ), „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $n=5$ ,  $M=0,27$ ,  $SEM=0,16$ ) und „reizloses Knie“ ( $n=18$ ,  $M=0,79$ ,  $SEM=0,21$ ) ( $F(2,35)=1,31$ ,  $p=0,28$ ). Dies entsprach keiner Synovialitis bzw. einer allenfalls geringgradigen Synovialitis<sup>169</sup>. Die Mittelwerte mit ihren jeweiligen Standardfehlern sind zur Veranschaulichung in Diagramm 1 dargestellt.



**Diagramm 1** Dargestellt sind die Mittelwerte der jeweils vorhandenen Synovialitis nach dem Histopathologischen Graduierungsschema nach Krenn<sup>117</sup> in den drei Versuchsgruppen „Gonarthrose“, „akuter Kniegelenkschmerz“ und „reizloses Knie“. Die Fehlerindikatoren zeigen die jeweiligen Standardfehler an. Endgrad 0: keine Synovialitis, Endgrad 0-1: geringgradige Synovialitis, Endgrad 1-2: mittelgradige Synovialitis.

### 3.2.6 Zusammenhang zwischen Synovialitis, Knieschmerz, BMI und Ausmaß der Gelenkschädigung

Der Zusammenhang zwischen Synovialitis, subjektivem Schmerzempfinden (gemessen anhand der visuellen Analogskala), Body mass index (BMI) und der Gelenkschädigung (Arthroseggrad nach Kellgren-Lawrence und Outerbridge; sowie Meniskopathie nach Stoller) in den verschiedenen Kompartimenten des Kniegelenks (mediales, laterales und femoropatellares Kompartiment) wurde mittels Pearson-Korrelation untersucht:

Es ergab sich keine signifikante Korrelation zwischen Synovialitis und subjektivem Schmerzempfinden ( $r=-0,057$ ,  $p=0,39$ , einseitig)<sup>169</sup>.

Zwischen Synovialits-Grad und BMI bestand eine deskriptive Korrelation, die das Signifikanzniveau jedoch knapp verfehlte ( $r=0,357$ ,  $p=0,06$ , einseitig)<sup>169</sup>.

Betrachtet man den Zusammenhang zwischen Synovialitis und Arthroseggrad nach Kellgren-Lawrence, so war die Korrelation weder für das mediale ( $r=0,147$ ,  $p=0,24$ , einseitig) noch für das laterale ( $r=0,054$ ,  $p=0,40$ , einseitig) oder für das femoropatellare Kompartiment ( $r=0,35$ ,  $p=0,43$ , einseitig) signifikant<sup>169</sup>.

Untersucht man den Zusammenhang zwischen Synovialitis und dem Arthrosegrad nach Outerbridge, so konnte für das mediale ( $r=0,246$ ,  $p=0,07$ , einseitig) und femoropatellare Kompartiment ( $r=0,225$ ,  $p=0,09$ , einseitig) eine deskriptive Korrelation gefunden werden, die das Signifikanzniveau jedoch knapp verfehlte. Für das laterale Kompartiment konnte keine signifikante Korrelation gefunden werden ( $r=-0,101$ ,  $p=0,27$ , einseitig).

Hinsichtlich Synovialitis und Meniskopathie nach Stoller ergab sich weder für eine laterale Meniskopathie ( $r=-0,224$ ,  $p=0,18$ , zweiseitig), noch für eine mediale Meniskopathie ( $r=-0,144$ ,  $p=0,40$ , zweiseitig) eine signifikante Korrelation.

### **3.3 Etablierung einer Färbemethode für den immunhistochemischen Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in Synovialisbiopsien**

Zunächst musste zur Darstellung der gewünschten Antigene, 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> eine möglichst sensitive und spezifische Färbemethode entwickelt werden. Die zentrale Fragestellung lag hierbei insbesondere darin, eine zuverlässige und reproduzierbare Färbung der Antigene in der Synovialmembran zu erzielen. Es kristallisierten sich zwei kritische Punkte heraus: Einerseits die Etablierung einer geeigneten Vorbehandlung der Proben, um möglichst valide Ergebnisse zu erhalten, andererseits die Wahl einer geeigneten Antikörperkonzentration.

Während der lichtmikroskopischen Kontrollen des Färbevorgangs stellte sich heraus, dass es zu keiner Färbung, weder mit dem 3-Nitrotyrosin-Antikörper, noch mit dem 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> -Antikörper, bei den Synovialisbiopsien, die mit 4% Paraformaldehyd (PFA) vorbehandelt waren, kam.

Daraus folgerten wir, dass es, durch die Einbettung der Synovialisbiopsien in 4% PFA, zu einer Antigenmaskierung gekommen sein musste.

Um eine geeignete Vorbehandlung zur Antigendemaskierung zu finden, wurden verschiedene Ansätze angelegt (s. Kapitel 2.5.2, Tab. 9) Die Ergebnisse der Antigendemaskierung sind in Tabelle 12 dargestellt.

**Tabelle 14 Ergebnisse der Antigendemaskierung**

Asservation	Vorbehandlungsansatz*												
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	(12)	(13)
4% PFA	-	-	-	-	-	(+)	(+)	(+)	-	-	-	-	-
0,9% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+

\*Die Nummerierung der Vorbehandlungsansätze entspricht denen aus Tabelle 9. (Abkürzungen: -: keine Färbung, (+): unsicher positive Färbung, +: positive Färbung)

Trotz Hitzevorbehandlung, Retrieval-Lösung, enzymatischer Andauung und Anwendung von Detergenzien konnte die Antigendemaskierung von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>, die durch die Konservierung der Synovialisbiopsien mittels 4% PFA entstand, nicht aufgebrochen werden. Nachuntersuchungen ergaben, dass bereits nach 20 minütiger Einbettung in 4% PFA keine Färbung mehr möglich war.

### **3.3.1 Nachweismethode für 3-Nitrotyrosin**

Immunhistochemisch sicher reproduzierbar anfärbbar waren nur die unfixierten, in 0,9% NaCl-Lösung eingelegten, und in Einbettmedium (Tissue freezing medium<sup>®</sup>, Fa. Jung, Leica-Microsystems Nussloch GmbH) kryokonservierten Synovialisbiopsien. Diese konnten sowohl mit als auch ohne eine anschließende Vorbehandlung nach dem Färbeprotokoll (s. Kapitel 2.5.3, Tab. 10) erfolgreich gefärbt werden.

Der optimale Verdünnungsfaktor des 3-Nitrotyrosin-Primärantikörpers lag bei 1:800.

### **3.3.2 Nachweismethode für 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>**

Um 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in Synovialisbiopsien nachweisen zu können, müssen ebenfalls unfixierte, in 0,9% NaCl-Lösung eingelegte, und in Einbettmedium (Tissue freezing medium<sup>®</sup>, Fa. Jung, Leica-Microsystems Nussloch GmbH) kryokonservierte Synovialisbiopsien verwendet werden. Bei dem verwendeten Primärantikörper lag der optimale Verdünnungsfaktor bei 1:800.

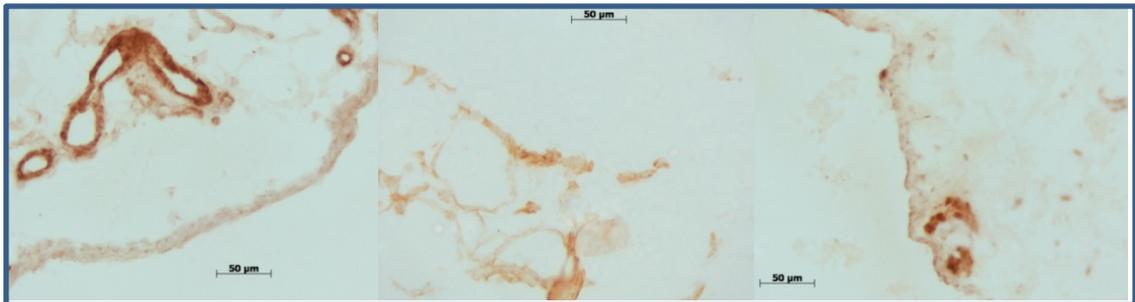
### **3.4 Nachweis von Parametern des oxidativen und nitrosativen Stress in Synovialisbiopsien**

Nach Asservierung neuer Proben, die entsprechend der von uns als geeignet erachteten Methodik gelagert worden sind, konnten wir schließlich von  $n=12$  Patienten Synovialmembranen immunhistochemisch mit den genannten Antikörpern untersuchen.

#### **3.4.1 Nachweis von 3-Nitrotyrosin in den Synovialisbiopsien**

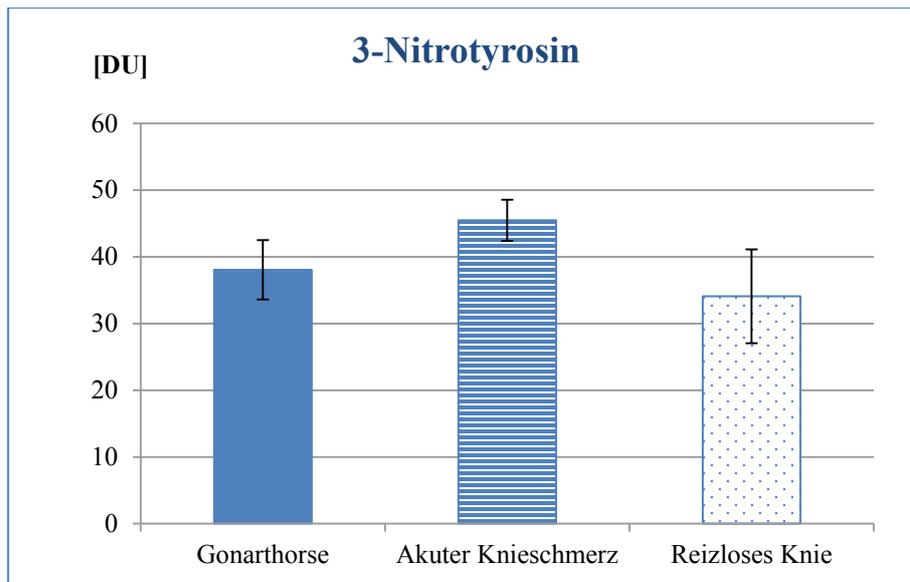
Da es Hinweise dafür gibt, dass reaktive Stickstoffspezies eine tragende Rolle in der Pathogenese der Arthrose spielen, sollte untersucht werden, ob diese in der Synovialmembran bzw. in den Synoviozyten von Arthrosepatienten im Gegensatz zu Patienten mit „akutem Kniegelenksschmerz“ einerseits und Patienten mit „reizlosem Kniegelenk“ andererseits, vermehrt nachweisbar sind.

Das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung mit dem 3-Nitrotyrosin-Antikörper ist in der Abbildung 9 demonstriert. Dargestellt wird jeweils ein Ausschnitt aus der Synovialmembran, der für die jeweilige Probandengruppe repräsentativ ist.



**Abbildung 9 Immunhistochemischer Nachweis von 3-Nitrotyrosin in Synoviozyten der Synovialmembran des Kniegelenks – Vergleich zwischen dem Befund bei „reizlosem Kniegelenk“ (links), „akutem Kniegelenksschmerz“ (Mitte) und Gonarthrose (rechts).**

Die arithmetischen Mittelwerte der absoluten Synoviozytenfärbung durch den 3-Nitrotyrosin-Antikörper sind im Diagramm 2 dargestellt.



**Diagramm 2 Vergleich der immunhistochemischen Färbung von Synoviozyten mit 3-Nitrotyrosin-Antikörpern bei Probanden mit „Gonarthrose“, „akutem Kniegelenksschmerz“ und „reizlosem Kniegelenk“.** Dargestellt sind die Mittelwerte der 3-Nitrotyrosin-Konzentration, gemessen in DU (*densitometric units*). Die Fehlerindikatoren zeigen die jeweiligen Standardfehler an.

Das Vorhandensein von 3-Nitrotyrosin in den Synoviozyten der Synovialmembran in der Gruppe „Gonarthrose“ ( $n=4$ ,  $M=38,07$ ,  $SEM=4,45$ ) unterschied sich im Mittel im  $t$ -Test nicht signifikant von der Gruppe „akuter Kniegelenksschmerz“ ( $n=3$ ,  $M=45,48$ ,  $SEM=3,08$ ,  $t(5)=-1,23$ ,  $p=0,13$ , einseitig) oder der Gruppe „reizloses Kniegelenk“ ( $n=5$ ,  $M=34,09$ ,  $SEM=7,03$ ;  $t(7)=0,52$ ,  $p=0,31$ , einseitig) <sup>169</sup>.

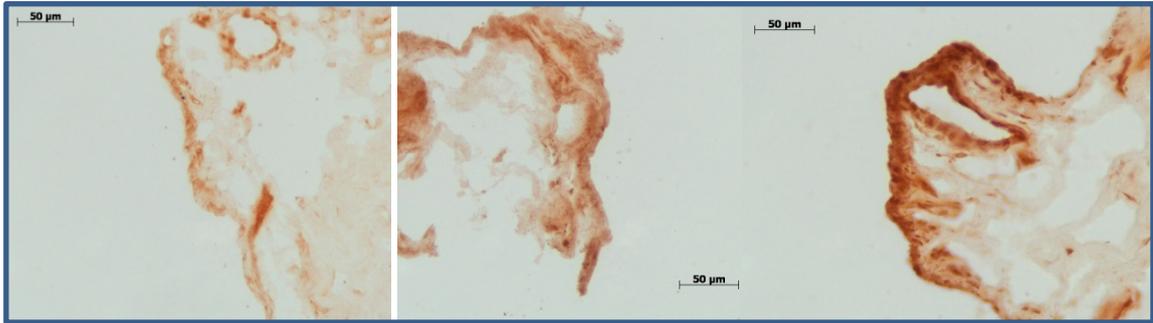
Auch zwischen den Mittelwerten der Gruppen „akuter Kniegelenksschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“ konnte kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ( $t(6)=1,41$ ,  $p=0,11$ , einseitig).

### 3.4.2 Nachweis von 8-Isoprostan $F_{2\alpha}$ in den Synovialisbiopsien

Da auch reaktiven Sauerstoffspezies eine tragende Rolle in der Pathogenese der Arthrose zugeschrieben werden, untersuchten wir, ob diese in der Synovialmembran bzw. in den Synoviozyten von Arthrosepatienten im Gegensatz zu Patienten mit „akutem Kniegelenksschmerz“ und Patienten mit „reizlosem Kniegelenk“ vermehrt nachweisbar sind.

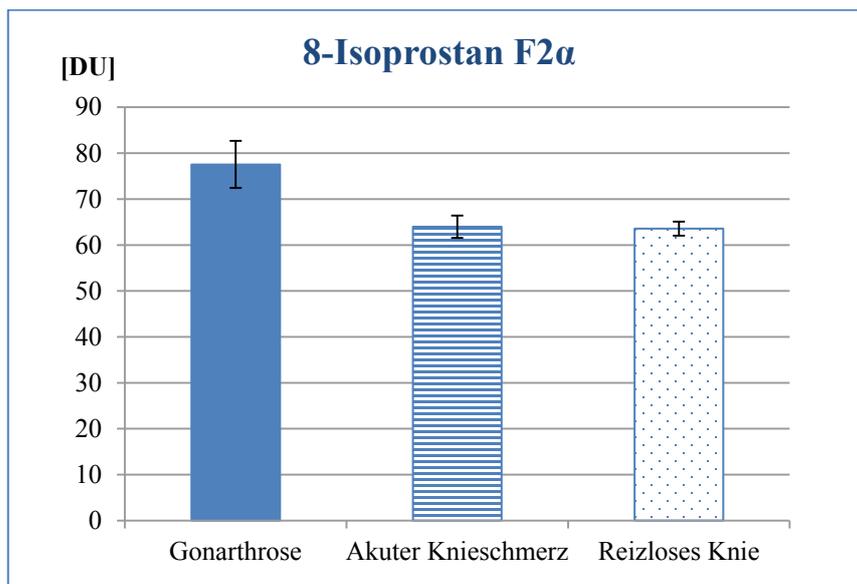
Das Ergebnis der immunhistochemischen Färbung mit dem 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  -Antikörper ist in der Abbildung 10 demonstriert. Es wird deutlich, dass 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  insbesondere in der

Synovialen Deckzellschicht darstellbar ist. Dargestellt wird jeweils ein Ausschnitt aus der Synovialmembran, der für die jeweilige Probandengruppe repräsentativ ist.



**Abbildung 10 Immunhistochemischer Nachweis von 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in Synoviozyten der Synovialmembran des Kniegelenks – Vergleich zwischen dem Befund bei „reizlosem Kniegelenk“ (links), „akutem Kniegelenksschmerz“ (Mitte) und „Gonarthrose“ (rechts).**

Die arithmetischen Mittelwerte der absoluten Synoviozytenfärbung durch den 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$ -Antikörper sind im Diagramm 3 mit ihren jeweiligen Standardfehlern dargestellt.



**Diagramm 3 Vergleich der immunhistochemischen Färbung von Synoviozyten mit 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$ -Antikörper bei Probanden mit „Gonarthrose“, „akutem Kniegelenksschmerz“ und „reizlosem Kniegelenk“.** Dargestellt sind die Mittelwerte der 3-Nitrotyrosin-Konzentration, gemessen in DU (*densitometric units*). Die Fehlerindikatoren zeigen die jeweiligen Standardfehler an.

In den Synoviozyten der Synovialmembran der Gruppe „Gonarthrose“ ( $n=4$ ,  $M=77,54$ ,  $SEM=5,13$ ) war 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  im Vergleich zur Kontrollgruppe „reizloses Kniegelenk“ ( $n=5$ ,  $M=63,57$ ,  $SEM=1,54$ ) signifikant vermehrt nachweisbar ( $t(7)=2,96$ ,  $p=0,01$ , einseitig) <sup>169</sup>.

Auch zwischen den Gruppen „Gonarthrose“ und „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $n=3$ ,  $M=63,99$ ,  $SEM= 2,43$ ) zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Isoprostan-Gehalt ( $t(5)=2,12$ ,  $p=0,04$ , einseitig). 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  war erneut in der Gruppe „Gonarthrose“ höher nachweisbar <sup>169</sup>.

In den Gruppen „akuter Kniegelenkschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“ konnte im Mittelwertsvergleich kein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ( $t(6)=0,17$ ,  $p=0,44$ , einseitig).

### **3.4.3 Zusammenhang zwischen 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan $F_{2\alpha}$ in den Synovialisbiopsien**

Ob ein Zusammenhang zwischen dem Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in den Synovialisbiopsien besteht, wurde mittels Pearson-Korrelation untersucht. Hierbei zeigte sich jedoch keine signifikante Korrelation ( $r=0,201$ ,  $p=0,57$ , zweiseitig).

### **3.4.4 Zusammenhang zwischen Synovialitis und 3-Nitrotyrosin bzw. 8-Isoprostan $F_{2\alpha}$ in den Synovialisbiopsien**

Der Zusammenhang zwischen Synovialitis und Nachweis von 3-Nitrotyrosin bzw. 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in den Synovialisbiopsien wurde mittels Pearson-Korrelation untersucht.

Hierbei zeigte sich keine relevante Korrelation zwischen Synovialitis und Nachweis von 3-Nitrotyrosin ( $r=0,223$ ,  $p=0,27$ , einseitig).

Zwischen Synovialitis und Nachweis von 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in den Biopsien zeigte sich eine hochsignifikante Korrelation ( $r=0,728$ ,  $p=0,009$ , einseitig).

### **3.4.5 Zusammenhang zwischen Arthroseggrad nach Outerbridge und 3-Nitrotyrosin bzw. 8-Isoprostan $F_{2\alpha}$ in den Synovialisbiopsien**

Der Zusammenhang zwischen Arthroseggrad nach Outerbridge und dem Level von 3-Nitrotyrosin bzw. 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in den Synovialisbiopsien wurde mittels Pearson-Korrelation untersucht.

Hierbei zeigte sich eine relevante Korrelation zwischen dem 3-Nitrotyrosin Level in der Synovialmembran und dem Arthroseggrad nach Outerbridge für das mediale Kompartiment

( $r=0,949$ ,  $p=0,026$ , einseitig). Eine Korrelation zum lateralen ( $r=0,211$ ,  $p=0,4$ , einseitig) und femoropatellaren Kompartiment ( $r=1,05$ ,  $p=0,45$ , einseitig) zeigte sich nicht.

Zwischen dem 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  Level in den Biopsien und dem Arthrosegrad nach Outerbridge zeigte sich für das laterale Kompartiment eine signifikante Korrelation ( $r=0,623$ ,  $p=0,027$ , einseitig). Für das mediale ( $r=0,443$ ,  $p=0,1$ , einseitig) und femoropatellare Kompartiment ( $r=0,219$ ,  $p=0,27$ , einseitig) zeigte sich kein signifikanter Zusammenhang.

### **3.5 Quantitativer Nachweis von Parametern des oxidativen und nitrosativen Stress in der Synovialflüssigkeit**

#### **3.5.1 Nachweis von 3-Nitrotyrosin in der Synovialflüssigkeit**

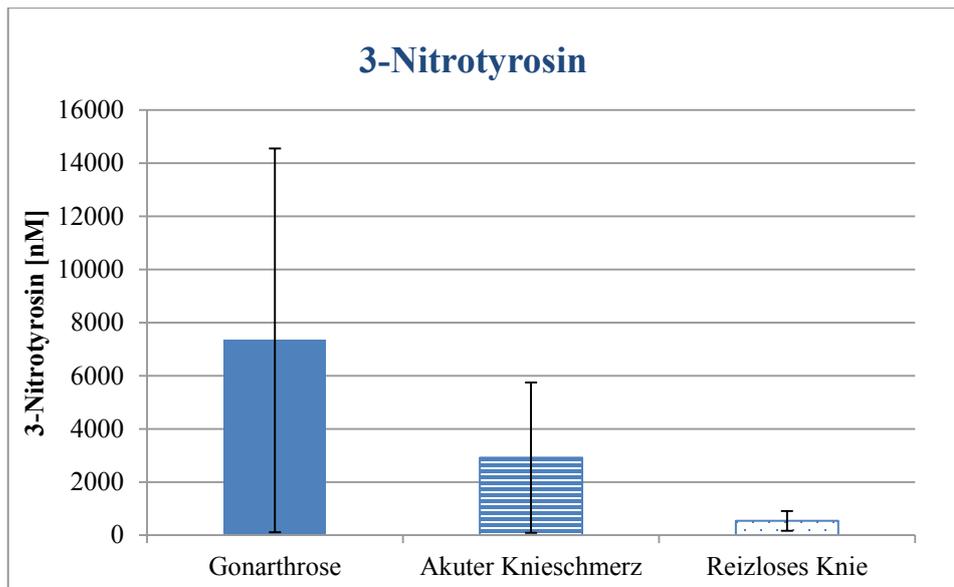
Von  $n=45$  Synovialflüssigkeit-Proben des ELISA zum Nachweis von 3-Nitrotyrosin lagen  $n=13$  Proben im messbaren Bereich des Testverfahrens und somit auswertbar <sup>169</sup>.

In den verschiedenen Versuchsgruppen „Gonarthrose“ ( $n=3$ ,  $M=7332,23$  nM,  $SEM=5895,39$ ), „akuter Knieschmerz“ ( $n=4$ ,  $M=2915,15$  nM,  $SEM=2451,85$ ) und der Kontrollgruppe „reizloses Kniegelenk“ ( $n=6$ ,  $M=539,07$  nM,  $SEM=340,39$ ) ließ sich im Mittelwertvergleich mittels  $t$ -Test kein signifikanter Unterschied im 3-Nitrotyrosin-Gehalt in den Synovialflüssigkeiten nachweisen <sup>169</sup>.

Es zeigte sich jedoch die Tendenz, dass in der Gruppe „Gonarthrose“ 3-Nitrotyrosin im Vergleich zur Kontrollgruppe „reizloses Knie“ vermehrt nachweisbar war ( $t(7)=1,43$ ,  $p=0,10$ , einseitig). Eine gewisse Tendenz des vermehrten Nachweises von 3-Nitrotyrosin in der Gruppe „akuter Knieschmerz“ zur Kontrolle ließ sich ebenfalls erkennen ( $t(8)=1,04$ ,  $p=0,16$ , einseitig).

Auch zwischen den Gruppen „Gonarthrose“ und „akuter Kniegelenkschmerz“ wurde das Signifikanzniveau nicht erreicht ( $t(5)=0,64$ ,  $p=0,28$ , einseitig).

Im folgenden Diagramm 4 werden die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen mit ihrem jeweiligen Standardfehler angegeben.



**Diagramm 4 Mittelwertvergleich 3-Nitrotyrosin-Gehalts [nM] in der Synovialflüssigkeit in den Probandenkollektiven „Gonarthrose“, „akuter Kniegelenksschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“.** Die Fehlerindikatoren stehen für den jeweiligen Standardfehler.

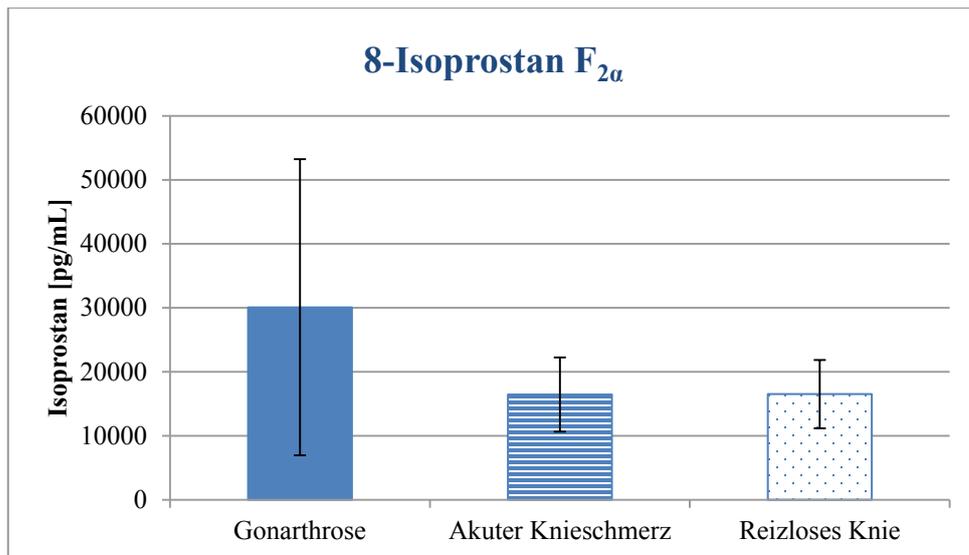
### 3.5.2 Nachweis von 8-Isoprostan $F_{2\alpha}$ in der Synovialflüssigkeit

Von  $n=42$  Proben des ELISA zum Nachweis von 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  waren  $n=29$  Proben im messbaren Bereich des Testverfahrens und somit auswertbar <sup>169</sup>.

In den verschiedenen Versuchsgruppen „Gonarthrose“ ( $n=9$ ,  $M=30094,22$  pg/mL,  $SEM=2334,35$ ), „akuter Knieschmerz“ ( $n=5$ ,  $M=16450,29$  pg/mL,  $SEM=5806,01$ ) und der Kontrollgruppe „reizloses Kniegelenk“ ( $n=15$ ,  $M=16522,13$  pg/mL,  $SEM=5342,21$ ) ließ sich kein signifikanter Unterschied im 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$ -Gehalt nachweisen ( $t(12)=0,43$ ,  $p=0,34$ , einseitig bzw.  $t(22)=0,71$ ,  $p=0,24$ , einseitig) <sup>169</sup>.

Es zeigte sich jedoch die Tendenz, dass in der Gruppe „Gonarthrose“ Isoprostan im Vergleich zur Kontrollgruppe „reizloses Knie“ vermehrt nachweisbar war. Eine relevante Tendenz des vermehrten Nachweises von Isoprostan in der Gruppe „akuter Knieschmerz“ zur Kontrolle ließ sich nicht erkennen ( $t(18)=-0,01$ ,  $p=0,50$ , einseitig).

Im folgenden Diagramm 5 werden die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen mit ihrer jeweiligen Standardabweichung angegeben.



**Diagramm 5 Mittelwertvergleich 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-Gehalt [pg/mL] in der Synovialflüssigkeit in den Probandenkollektiven „Gonarthrose“, „akuter Kniegelenksschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“.** Die Fehlerindikatoren stehen für den jeweiligen Standardfehler.

### 3.6 Quantitativer Nachweis von Parametern des oxidativen und nitrosativen Stress im Serum

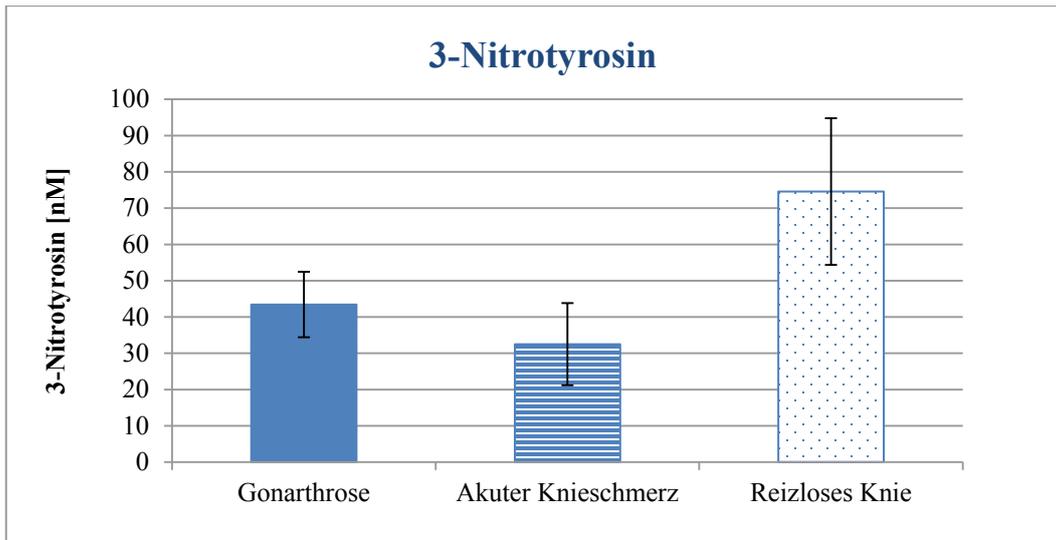
#### 3.6.1 Nachweis von 3-Nitrotyrosin im Serum

Von  $n=54$  Serumproben des ELISA zum Nachweis von 3-Nitrotyrosin waren  $n=37$  Proben im messbaren Bereich des Testverfahrens und somit auswertbar <sup>169</sup>.

In den verschiedenen Versuchsgruppen „Gonarthrose“ ( $n=14$ ,  $M=43,45$  nM,  $SEM=9,01$  nM), „akuter Knieschmerz“ ( $n=7$ ,  $M=32,50$  nM,  $SEM=11,34$  nM) und der Kontrollgruppe „reizloses Kniegelenk“ ( $n=16$ ,  $M=74,56$  nM,  $SEM=20,233$  nM) ließ sich kein signifikanter Unterschied im 3-Nitrotyrosin-Gehalt nachweisen ( $t(19)=0,73$ ,  $p=0,24$ , einseitig, bzw.  $t(28)=-1,30$ ,  $p=0,10$ , einseitig) <sup>169</sup>.

Auch zwischen den Gruppen „akuter Knieschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“ zeigte sich kein signifikanter Unterschied ( $t(21)=-1,28$ ,  $p=0,10$ , einseitig) <sup>169</sup>.

Im folgenden Diagramm 6 werden die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen mit ihrem jeweiligen Standardfehler angegeben.



**Diagramm 6 Mittelwertsvergleich 3-Nitrotyrosin-Gehalts [nM] im Serum in den Probandenkollektiven „Gonarthrose“, „akuter Kniegelenksschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“.** Die Fehlerindikatoren stehen für den jeweiligen Standardfehler.

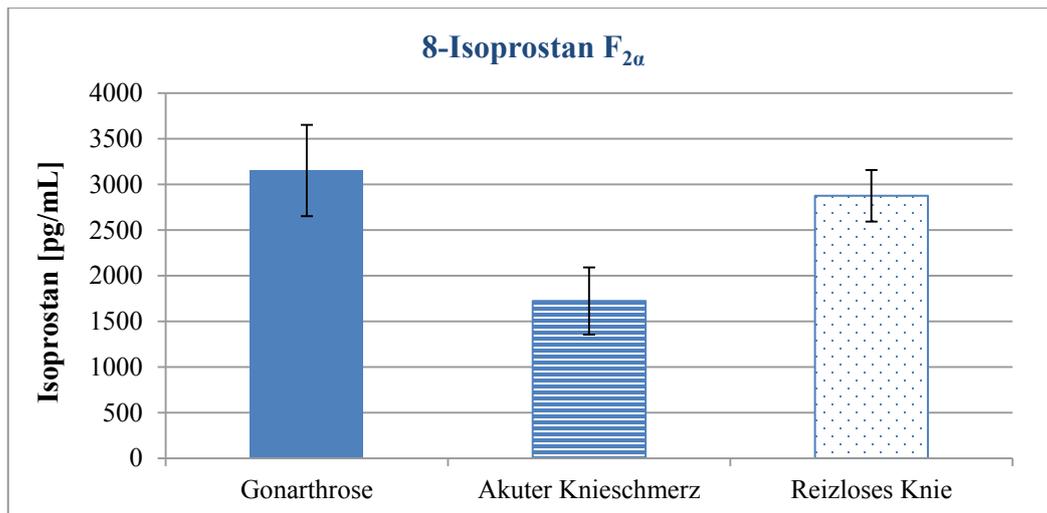
### 3.6.2 Nachweis von 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> im Serum

Von  $n=48$  Proben des ELISA zum Nachweis von 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> lagen  $n=48$  Proben im messbaren Bereich des Testverfahrens und waren somit auswertbar <sup>169</sup>.

Der Serum-Gehalt von 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in der Gruppe „Gonarthrose“ ( $n=16$ ,  $M=3152,30$  pg/mL,  $SEM=500,40$  pg/mL) war im Vergleich zu den Gruppen „akuter Knieschmerz“ ( $n=5$ ,  $M=1723,04$  pg/mL,  $SEM=367,46$  pg/mL) und „reizloses Kniegelenk“ ( $n=27$ ,  $M=2875,44$  pg/mL,  $SEM=281,99$  pg/mL) erhöht. Dieser Unterschied war jedoch nicht signifikant ( $t(19)=1,54$ ,  $p=0,07$ , einseitig bzw.  $t(41)=0,52$ ,  $p=0,30$ , einseitig) <sup>169</sup>.

Auch zwischen den beiden Gruppen „akuter Knieschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“ wurde das Signifikanzniveau knapp verfehlt ( $t(30)=-1,69$ ,  $p=0,05$ , einseitig) <sup>169</sup>.

Im folgenden Diagramm 7 werden die Mittelwerte der einzelnen Versuchsgruppen mit ihrem jeweiligen Standardfehler angegeben.



**Diagramm 7 Mittelwertsvergleich des 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-Gehalts [pg/mL] im Serum in den Probandenkollektiven „Gonarthrose“, „akuter Kniegelenksschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“.** Die Fehlerindikatoren stehen für den jeweiligen Standardfehler.

### **3.7 Zusammenhänge zwischen Parametern des oxidativen und nitrosativen Stress in Serum und Synovialflüssigkeit**

Der Zusammenhang zwischen Nachweis von 3-Nitrotyrosin in Synovialflüssigkeit und Serum ( $n=11$ ) wurde mittels Pearson-Korrelation untersucht. Hierbei zeigte sich jedoch keine signifikante Korrelation ( $r=-0,212$ ,  $p=0,53$ , zweiseitig).

Auch zwischen dem Nachweis von 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in Synovialflüssigkeit und Serum ( $n=25$ ) ergab sich keine signifikante Korrelation ( $r=-0,128$ ,  $p=0,54$ , zweiseitig).

## **4. Diskussion**

Arthrose ist eine der häufigsten chronisch degenerativen Erkrankungen, die zu Schmerzen, Bewegungseinschränkungen und bleibender Behinderung führt<sup>10</sup>. Die genauen pathophysiologischen Entstehungsmechanismen auf molekularer und zellulärer Ebene sind bis heute noch nicht ausreichend verstanden, obwohl einige Risikofaktoren wie beispielsweise Alter, Übergewicht und vorausgegangene Gelenkverletzungen als gesichert gelten<sup>124-126</sup>. Zunehmend wird biochemischen Faktoren eine zentrale Rolle in der Arthrose-Entstehung zugeschrieben. Eine wichtige Rolle scheint hierbei oxidativer und nitrosativer Stress zu spielen<sup>29,55,111</sup>.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Identifikation von biologischen Substanzen, welche die degenerativen Veränderungen eines arthrotisch veränderten Gelenkes widerspiegeln und somit als Biomarker des Gelenkschadens fungieren könnten. Hierfür wurde exemplarisch das Kniegelenk in den Mittelpunkt gestellt<sup>169</sup>.

Um die Nützlichkeit von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  als Biomarker der Arthrose und des Schweregrades von Gelenkverletzungen zu evaluieren, wurde der Gehalt beider Parameter in der Synovialmembran, Synovialflüssigkeit und Serum von Patienten mit „Gonarthrose“, „akutem Kniegelenksschmerz“ und „reizlosem Kniegelenk“ bestimmt<sup>169</sup>.

In einem ersten Schritt wurde das Gewebe hinsichtlich des Entzündungsgrades beurteilt und schließlich immunhistochemisch auf die genannten Marker untersucht<sup>169</sup>.

In einem weiteren Schritt wurde die intraartikuläre Last des oxidativen und nitrosativen Stress in der Synovialflüssigkeit und die systemische im Serum ermittelt. Anschließend wurden diese miteinander korreliert<sup>169</sup>.

Im Folgenden werden die Untersuchungsergebnisse im Einzelnen diskutiert.

### **4.1 Klinische Charakteristika der Versuchsgruppen**

#### **4.1.1 Probandenkollektiv**

Die Probanden der drei untersuchten Versuchsgruppen „Gonarthrose“, „akuter Kniegelenksschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“ unterschieden sich nicht signifikant hinsichtlich der Verteilung ihrer demographischen Daten (Geschlecht, Größe, Gewicht, BMI, Nikotinkonsum und subjektivem Schmerzempfinden), so dass diesbezüglich in den durchgeführten Versuchen keine Verfälschung der Ergebnisse durch „Selektionsfehler“ in der

Auswahl des Probandenkollektivs zu erwarten war. Lediglich der Altersdurchschnitt und die Komorbidität mit arterieller Hypertonie waren in der Gruppe „reizloses Kniegelenk“ (die sich aus Probanden zusammensetzte, die sich einer Kreuzbandplastik oder Autologer Chondrozytentransplantation unterzogen) signifikant niedriger als in den Gruppen „Gonarthrose“ und „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $p < 0,001$  bzw.  $p = 0,032$ ), was mit der Pathogenese der jeweiligen Erkrankung erklärbar ist.

So ereignen sich Kreuzbandrupturen gehäuft im jüngeren Erwachsenenalter mit einem Gipfel in der Altersgruppe der 15 bis 25-Jährigen<sup>127,128</sup>. Auch autologe Chondrozytentransplantationen (ACT) werden noch vornehmlich bei jüngeren Patienten durchgeführt, obwohl der Einsatz des Verfahrens beim älteren Patienten inzwischen kontrovers diskutiert werden kann. Da das Knorpelschädigungsmuster einen wichtigen Indikationsparameter darstellt und bei älteren Patienten häufig limitierende degenerative Gelenkveränderungen vorliegen, existieren zwar nur wenige Patienten über dem 50. Lebensjahr, die sich für eine ACT eignen<sup>3,129</sup>. Jedoch zeigen mehrere Studien, dass das Verfahren auch bei älteren Patienten grundsätzlich wirksam ist und somit ein höheres Alter prinzipiell keine Kontraindikation zur ACT darstellt<sup>129,168</sup>.

Auch die arterielle Hypertonie ist eine Erkrankung, die im höheren Lebensalter auftritt<sup>130</sup>, und somit im jüngeren Patientenkollektiv signifikant seltener vorkommt. Dass kein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Altersdurchschnitts und der arteriellen Hypertonie in den Gruppen „Gonarthrose“ und „akuter Kniegelenkschmerz“ bestand, liegt am ehesten daran, dass in letzterer Gruppe nicht zwischen Läsionen des medialen und lateralen Meniskus unterschieden wurde. So sind Läsionen des medialen Meniskus (aufgrund der anatomischen Verhältnisse, bei denen dieser das geringste Bewegungsausmaß besitzt) eher chronisch-degenerativer Genese, also eher eine Erkrankung des höheren Lebensalters, wohingegen Läsionen des lateralen Meniskus häufiger mit akuten Kniegelenksverletzungen, insbesondere mit Bandläsionen des Kniegelenks, assoziiert sind und somit eher bei jüngeren Patienten vorkommen<sup>131-133</sup>.

#### **4.1.2 Schmerz als Marker einer Gelenkschädigung**

Zwischen subjektivem Schmerzempfinden und jeweiligem Schweregrad der Gelenkschädigung zeigte sich, wie erwartet, in keiner der Versuchsgruppen eine signifikante Korrelation<sup>169</sup>. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen sowohl Tornbjerg et al, die den Zusammenhang zwischen Schmerz und struktureller Gelenkpathologie bei Patienten mit Meniskopathie<sup>134</sup> untersuchten, als auch Dieppe et al, die keinen Zusammenhang zwischen Schmerzniveau und Arthrosegrad fanden<sup>135, 169</sup>.

In unserer Studie kommt hinzu, dass durch eine „Restriction of Range“<sup>136</sup> durch die Auswahlkriterien der jeweiligen Studienpopulation keine höhere Korrelation erzielbar war, weil in der Gruppe der Gonarthrose nur Patienten mit fortgeschrittenem Krankheitsbild eingeschlossen wurden.

Einzig ein Zusammenhang zwischen Schmerzausprägung und Läsion des Innenmeniskus war hochsignifikant, jedoch unerwartet gerichtet. So gaben Probanden mit nur geringfügiger Läsion des Innenmeniskus an unter deutlich ausgeprägteren Schmerzen zu leiden, als Patienten mit höhergradigen Läsionen des Meniskus. Wie dieses Phänomen zustande kommt, bleibt unklar. Denkbar ist, dass eine höhergradige, eher chronisch-degenerativ fortschreitende Meniskusläsion, die über einen längeren Zeitraum besteht, zu einer Adaption an das Schmerzniveau mit entsprechender Anpassung der Belastung an die Beschwerdesymptomatik verbunden ist. Zudem kann die Lokalisation und die Richtung der Läsion möglicherweise Einfluss auf das Schmerzempfinden nehmen. Ob diese Einschätzung zur Klärung der beobachteten Ergebnisse zutrifft, war jedoch nicht Gegenstand unserer Untersuchung muss in weiteren Studien geklärt werden.

Insgesamt lässt sich jedoch schlussfolgern, dass das Schmerzempfinden für sich genommen, nicht als Marker einer Gelenkschädigung fungieren kann.

#### **4.1.3 BMI als Marker einer Gelenkschädigung**

Ein signifikanter Zusammenhang zwischen BMI und subjektivem Schmerzempfinden bestand im untersuchten Probandenkollektiv nicht, sodass auch eine mögliche Kombination beider Parameter (BMI und Schmerzempfinden) nicht als Marker für eine mögliche Gelenkschädigung fungieren kann.

Zwischen BMI und Läsionen der Menisken und Kreuzbänder zeigte sich ebenfalls keine signifikante Korrelation. Dies deckt sich jedoch mit unseren Erwartungen, basierend auf der Kenntnis, dass diese Läsionen vornehmlich traumatischer Genese sind und häufig kombiniert auftreten: So stellen Rotationstraumata und Hyperextensions- bzw. Hyperflexionstraumata typische Verletzungsmechanismen dar<sup>131-133</sup>, während der Stellenwert des BMI als Risikofaktor dieser Läsionen noch nicht abschließend geklärt ist<sup>137</sup> und aus unserer Sicht aufgrund fehlender Korrelation eher geringfügig sein sollte.

Wie weiter oben bereits beschrieben gilt Übergewicht als gesicherter Risikofaktor der Arthrose, auch wenn der genaue pathogenetische Mechanismus hierbei noch nicht vollständig verstanden ist<sup>125,126</sup>. Hierzu bestand in unserem Probandenkollektiv ein signifikanter Zusammenhang

zwischen BMI und Arthrosegrad nach Kellgren-Lawrence (in allen Kniegelenkskompartimenten) und Outerbridge (im femoropatellaren Kompartiment) <sup>169</sup>. Ob proinflammatorisch wirksame metabolische Faktoren letztlich eine Schlüsselrolle in der Arthroseentstehung spielen, ist noch nicht vollständig geklärt <sup>126</sup>. Unsere Ergebnisse stützen diese Hypothese insofern, dass sich zumindest eine deskriptive Korrelation zwischen BMI und der Ausprägung der Synovialitis (gemessen im Synovialitis-Score nach Krenn) zeigte <sup>169</sup>.

#### **4.1.4 Synovialitis als Marker einer Gelenkschädigung**

Wie erwartet zeigte sich in unserer Studie kein signifikanter Zusammenhang zwischen Synovialitis und Meniskopathie oder Kreuzbandruptur, was auf den Pathomechanismus zurückzuführen ist, der eher traumatischer als entzündlicher Genese ist und auf den bereits in Kapitel 4.1.3 eingegangen wird.

Eine Korrelation zwischen Synovialitis und Arthrosegrad (sowohl nach Kellgren-Lawrence als auch Outerbridge) bestand statistisch nicht. Ob dies tatsächlich auf eine fehlende Kausalität zurückzuführen ist, kann aus unserer Studie nicht hergeleitet werden. Die fehlende Korrelation lässt sich jedoch damit in Einklang bringen, dass entzündliche Veränderungen alleine nicht zur Arthroseentstehung führen <sup>126</sup>. Vielmehr führt wahrscheinlich ein Zusammenspiel aus mechanischen Faktoren und oxidativer/antioxidativer Imbalance via Inflammation zu Krankheitssymptomen, wie dies beispielsweise auch von Suantawee et al. postuliert wird <sup>138</sup>. Letzteres wird auch durch unsere Studie gestützt, in der sich eine hochsignifikante Korrelation zwischen Synovialitis und 8-Isoprostan F2 $\alpha$ , als Ausdruck der Lipidperoxidation und damit direktem Marker oxidativen Stress, trotz kleinem Probandenkollektiv ( $n=12$  von initial  $n=69$ ), herauskristallisierte. Warum keine signifikante Korrelation zum 3-Nitrotyrosin-Gehalt nachweisbar war, bleibt diskussionswürdig. Zum einen spielt sicherlich die kleine Stichprobenzahl mit folglich geringer statistischer Power eine Rolle. Zum anderen kann es daran liegen, dass NO sowohl in gesundem als auch entzündlich verändertem Synovialgewebe eine physiologische Rolle in der Kontrolle der Vasomotorik, u.a. zur Blutdruckregulation spielt <sup>139</sup> und somit 3-Nitrotyrosin nicht nur in entzündetem sondern auch in gesundem Gewebe nachweisbar ist <sup>140</sup>.

Folglich kann der Grad der Synovialitis alleine auch nicht als Marker der Gelenkschädigung im Allgemeinen oder der Gonarthrose im Speziellen fungieren.

## **4.2 Immunhistochemischer Nachweis von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> in der Synovialmembran**

Wie in Kapitel 3.3 bereits erläutert wurde, musste zur Darstellung der gewünschten Antigene in der Synovialmembran, 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>, eine möglichst sensitive und spezifische Färbemethode entwickelt werden. Diese sollte jeweils eine zuverlässige und reproduzierbare Färbung der Antigene gewährleisten.

Es kristallisierten sich zwei kritische Punkte heraus: Einerseits die Etablierung einer geeigneten Vorbehandlung der Proben, andererseits die Wahl einer geeigneten Primär-Antikörperkonzentration.

Anders als bei Suantawee et al.<sup>138</sup>, die die gewonnenen Synovialmembranen vor der immunhistochemischen Färbung für 24 Stunden in 10% neutral-gepuffertes, wässrige Formaldehydlösung (einer 4% PFA-Lösung entsprechend) einlegten, in Paraffin einbetteten und danach ohne weitere Vorbehandlung (Antigendemaskierung) immunhistochemisch untersuchen konnten, gelang dies in unseren Versuchsreihen anhand der für 24 Stunden in 4% PFA eingelegten Proben nicht. Trotz verschiedener Ansätze zur Antigendemaskierung (s. Kapitel 2.5.2, Tab. 9) gelang uns keine zuverlässige und reproduzierbare Färbung.

In Folgeversuchen kristallisierte sich heraus, dass die Dauer der Einbettung in 4% PFA eine große Rolle spielte, sodass bereits nach 20-minütiger Fixierung keine Färbung mehr möglich war.

Von uns als zuverlässig und reproduzierbar immunhistochemisch färbbar erachtet waren jedoch die unfixierten, in 0,9% NaCl-Lösung eingelegten, und in Einbettmedium kryokonservierten Synovialisbiopsien.

Ähnliche Vorbehandlungsansätze benutzten auch Sandhu et al.<sup>141</sup>. Sie untersuchten zum einen Synovialisbiopsien, die unbehandelt in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -100°C gelagert wurden, zum anderen Synovialisbiopsien, die sie wie bei Suantawee et al. für 24 Stunden in 10% neutral-gepufferte, wässrige Formaldehydlösung einlegten und in Paraffin einbetteten. Welche Methode zu einer sicher-reproduzierbaren Färbung führte, bleibt letztlich unklar, da die Ergebnisse jeweils zusammengefasst dargestellt wurden.

In Folgeversuchen ist es aus unserer Sicht daher nötig, erneut die Vorbehandlungsmethoden zu vergleichen. Ein besonderer Fokus sollte hierbei auf der Dauer einer Fixierung mit Formaldehyd/Paraformaldehyd zum Erreichen einer validen Färbung liegen. Zudem sollte die von uns gewählte Färbungsmethode erneut an einem größeren Probenkollektiv getestet werden. Hierbei sollte zusätzlich ein besonderes Augenmerk auf die optimale Lagerungstemperatur (bei

uns - 80°C, bei Sandhu et al beispielsweise - 100°C) der Biopsien, sowie die Temperatur der Proben während des Fixierungsprozesses und während der jeweiligen immunhistochemischen Färbeschritte gelegt werden.

Der optimale Verdünnungsfaktor der eingesetzten Primär-Antikörper (3-Nitrotyrosin- bzw. 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-AK) lag in unseren Versuchsreihen bei 1:800. Mangels detaillierter Nachweisprotokolle der oben genannten Studien war hierbei kein weiterer Vergleich möglich. Angesichts der Vielzahl gewerblich erhältlicher Primär-Antikörper gegen die genannten Antigene ist jedoch eine Pauschalisierung des optimalen Verdünnungsfaktors nur schwer möglich. Der von uns als optimal erachtete Verdünnungsfaktor kann daher sicherlich nur als Richtwert für äquivalente Antikörper eingesetzt werden. Im Einzelfall sollten ggf. weitere Verdünnungsstufen getestet werden.

#### **4.3 3-Nitrotyrosin als Biomarker der Gonarthrose und Gelenkschädigung**

Um die Rolle nitrosativen Stresses in der Pathogenese der Gonarthrose zu untersuchen, wurde das Untersuchungsmaterial auf das Vorhandensein von 3-Nitrotyrosin untersucht. Da wir annahmen, dass sich lokale Schäden der Synovialmembran auch in der Synovialflüssigkeit widerspiegeln, postulierten wir, dass 3-Nitrotyrosin auch in der Synovialflüssigkeit arthrotischer Gelenke nachweisbar sein würde. Da Komponenten der Synovialflüssigkeit via lymphatisches System und durch Knorpelkompression und -dekompression in den systemischen Blutkreislauf gelangen<sup>1</sup>, würde unserer Vorstellung nach dieses auch im Serum nachweisbar sein, was es schließlich als Biomarker der Gonarthrose qualifizieren würde.

Bereits Sandhu et al.<sup>141</sup> konnten zeigen, dass sowohl in Synovialisbiopsien von Patienten mit chronischer Polyarthrititis und Patienten mit Arthrose Nitrotyrosin-haltige Proteine nachweisbar sind. Diese Ergebnisse decken sich mit denen unserer Arbeit. In den Synovialisbiopsien aller drei untersuchten Versuchsgruppen „Gonarthrose“, „akuter Kniegelenksschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“ konnte 3-Nitrotyrosin nachgewiesen werden, wobei sich zwischen den Gruppen kein signifikanter Unterschied fand<sup>169</sup>.

In der Studie von Sandhu et al.<sup>141</sup> war der Nitrotyrosin-Gehalt, ebenfalls mittels Grauwertdifferenzmethode bestimmt, in den Synovialisbiopsien der Arthrosegruppe deutlich geringer ausgeprägt als in der verwendeten Vergleichsgruppe „Rheumatoide Arthritis“, was insbesondere am wesentlich geringeren Entzündungsgrad in den Biopsien dieser Gruppe lag. Eine Kontrollgruppe bestehend aus einem gesunden Probandenkollektiv stand ihnen nicht zur

Verfügung. Auch Suantawee et al.<sup>138</sup> konnten Nitrotyrosin in den Synovialisbiopsien arthrotischer Kniegelenke, insbesondere in den synovialen Deckzellen nachweisen. Wie in unserer Studie fungierten Patienten mit (vorderer) Kreuzbandruptur als Kontrollgruppe. Ob Nitrotyrosin auch in der Kontrollgruppe nachweisbar war, wird von ihnen nicht erwähnt, sodass ein direkter Vergleich zu unserem Studiendesign nicht weiter möglich war.

Dass es in den von uns verwendeten Versuchsgruppen keinen signifikanten Unterschied im Nitrotyrosin-Gehalt gab, liegt wahrscheinlich daran, dass im Gewebe aller Versuchsgruppen eine entzündliche (Rest-)Aktivität nachweisbar war. Dies wurde durch die Quantifizierung des Entzündungsgrades (Synovialitis-Score nach Krenn<sup>117</sup>) gestützt. Hierbei zeigte sich im Gesamtmittel eine allenfalls geringgradige Synovialitis, ohne dass es hierbei signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen gab. Folglich eignet sich die Gruppe „reizloses Knie“, die vor allem aus Patienten, die eine Kreuzbandruptur erlitten und sich einer elektiven Kreuzbandplastik unterzogen, nicht als Äquivalent einer Kontrollgruppe bestehend aus gesunden Probanden.

Dies wird auch von Misko et al.<sup>142</sup> gestützt, die sowohl in der Synovialflüssigkeit, als auch im Blutplasma von Patienten mit Arthrose, Meniskusläsionen und (vorderen) Kreuzbandrupturen hoch-signifikant erhöhte Nitrotyrosin-Werte im Vergleich zu einem gesunden Probandenkollektiv nachweisen konnten.

In der vorliegenden Arbeit ließen sich in der Synovialflüssigkeit aller Versuchsgruppen erhöhte Nitrotyrosin-Werte nachweisen. Auch wenn es zwischen den verwendeten Versuchsgruppen keinen signifikanten Unterschied gab, so zeigte sich eine deskriptive Tendenz dahin gehend, dass in der „Arthrosegruppe“ erhöhte Nitrotyrosin-Werte im Vergleich zu den Gruppen „akuter Knieschmerz“ und „reizloses Kniegelenk“ nachweisbar waren. Der höhere Nitrotyrosin-Gehalt in der Arthrose-Gruppe ist möglicherweise schließlich Ausdruck dessen, dass Arthrose als „Endstadium und Maximum eines Gelenkschadens“ gewertet werden kann<sup>169</sup>.

Unterstützt wird diese These auch von vorausgehenden Studien, unter anderem von Karan et al., die zeigen konnten, dass der Nitrotyrosin-Gehalt in der Synovialflüssigkeit sowohl positiv mit dem Schweregrad der Arthrose (nach Kellgren-Lawrence)<sup>146</sup> als auch mit der Krankheitsaktivität<sup>147</sup> korreliert. Auch wenn sich in unserer Studie kein Zusammenhang zwischen Synovialitis als Ausdruck von Krankheitsaktivität im Sinne einer aktivierten Gonarthrose zeigte, fanden wir jedoch einen signifikanten Zusammenhang zwischen Schweregrad der Arthrose (nach Outerbridge und via entsprechende Korrelation auch zum Arthrosegrad nach Kellgren-Lawrence) und dem Vorhandensein von 3-Nitrotyrosin im Synovialgewebe. Dies qualifiziert 3-Nitrotyrosin zusätzlich als potentiellen Biomarker der Gonarthrose.

Insgesamt sind die Ergebnisse des Nitrotyrosin-Gehalts in der Synovialflüssigkeit unserer Arbeit jedoch nur als Annäherungswerte des tatsächlichen Nitrotyrosin-Gehaltes zu verstehen. Dies liegt daran, dass auf Grund der Probengewinnung mittels arthroskopischer Lavage die Proben nur in großer Verdünnung erhältlich waren. Der Verdünnungsfaktor konnte daher nur rechnerisch aus den ermittelten Protein-Konzentrationen im BCA-Assay und dem üblicherweise in der Literatur angegebenen Protein-Gehalt extrapoliert werden. Zudem lagen viele Proben aufgrund der hohen Vorverdünnung unterhalb der Nachweisgrenze, sodass nur wenige ( $n=17$  von initial  $n=69$ ) auswertbar waren<sup>169</sup>. In Folgeversuchen ist es daher ratsam Synovialflüssigkeit mittels direkter Gelenkpunktion, wie dies auch bei Kaur<sup>148</sup> und Misko et al.<sup>142</sup> durchgeführt wurde, zu asservieren.

Betrachtet man nun den 3-Nitrotyrosin-Gehalt im Serum, so zeigt sich, dass sich in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu Misko et al.<sup>142</sup>, nur ein geringer Nitrotyrosin-Gehalt (max. 52 nM) im Serum der Arthrosegruppe nachweisen ließ. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Kaur und Halliwell<sup>148</sup>. Sie konnten erhöhte Nitrotyrosinwerte in Serum und Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider Arthritis (mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) im  $\mu\text{M}$ -Bereich nachweisen. Im Vergleich hierzu war dies bei Patienten mit Arthrose, genauso wie bei einem gesunden Probandenkollektiv nicht nachweisbar.

Die Diskrepanz der vorliegenden Ergebnisse lässt unterschiedliche Rückschlüsse zu. Ursächlich sind unter anderem die in den Studien verwendeten Nachweisverfahren, die jeweils unterschiedliche Nachweisgrenzen hatten. So lag diese beispielsweise bei Kaur und Halliwell<sup>148</sup> bei 0,2  $\mu\text{M}$ , in unserer Arbeit bei 1,95 nM. Bei einem in unserer Arbeit gemessenen maximalen Nitrotyrosin-Gehalt von 52 nM wäre dies bei Kaur et al nicht nachweisbar gewesen. Zudem erschwert auch das unterschiedliche Probandenkollektiv eine Vergleichbarkeit<sup>169</sup>.

Verschiedene Studien zeigten, dass sowohl im Plasma als auch in der Synovialflüssigkeit von Arthrose-Patienten ein signifikant höherer 3-Nitrotyrosin-Gehalt im Vergleich zu gesunden Probanden nachweisbar war<sup>138,146,149</sup>. Hierbei lag der Nitrotyrosin-Gehalt im  $\mu\text{M}$ -Bereich.

Bezüglich einer Korrelation zwischen dem 3-Nitrotyrosin-Gehalt im Plasma/Serum und Synovialflüssigkeit arthrotisch veränderter Kniegelenke ergaben sich in verschiedenen Studien diskrepante Ergebnisse. In einigen Studien zeigte sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen Plasma- und Synovialflüssigkeitsgehalt, ohne dass es einen signifikanten Unterschied im jeweiligen Nitrotyrosin-Gehalt gab. Eine deskriptive Tendenz bestand jedoch dahingehend, dass in der Synovialflüssigkeit insgesamt ein niedrigerer 3-Nitrotyrosin-Gehalt als im Plasma/Serum vorhanden war<sup>138,146,169</sup>.

Im Gegensatz hierzu waren die Serum-Konzentrationen in unserer Arbeit, genauso wie in anderen Studien, deutlich niedriger als die entsprechenden Konzentrationen in der Synovialflüssigkeit<sup>150</sup>. Letzteres impliziert, dass die Synthese von Stickstoffoxiden im Synovium von degenerativ und entzündlich veränderten Gelenken stattfindet, was unter anderem durch das Vorhandensein NO-generierender Zellen, wie z. B. Endothelzellen, polymorphkerniger Leukozyten und Makrophagen in entzündlich veränderten Geweben erklärlich ist<sup>150</sup>. Dies könnte u.a. durch eine erhöhte Expression der induzierbaren NO-Synthase im Synovium erklärt werden<sup>138,151</sup>. Dass 3-Nitrotyrosin im Serum in geringerer Konzentration nachweisbar war, kann schließlich daran liegen, dass dieses aus der Synovialflüssigkeit zum einen via lymphatischem System und zum anderen durch Knorpelkompression und –dekompression so lange in den systemischen Blutkreislauf gelangt, bis ein Gleichgewichtszustand zwischen Synovium und Blut erreicht ist<sup>1</sup>.

Eine signifikante Korrelation zwischen 3-Nitrotyrosin in Serum und Synovialflüssigkeit zeigte sich in unserer Arbeit jedoch anders als beispielsweise Suantawee und Karan et al. nicht<sup>138,146</sup>. Dies liegt zum einen sicherlich an oben genannter Verdünnung der Synovialflüssigkeiten, die dazu führte, dass der jeweilige Proteingehalt der Probe nur annähernd errechnet werden konnte. Zum anderen kann es daran liegen, dass für eine Korrelation nur eine geringe Anzahl ( $n=11$  von initial  $n=69$ ) verwertbarer Proben zur Verfügung stand. Daher war die Power ohnehin eher gering, sodass eine größere Stichprobengröße vonnöten gewesen wäre, um eine signifikante Korrelation zu erreichen. Zusätzlich spielen endogene antioxidative Schutzsysteme, die ubiquitär unterschiedlich stark exprimiert werden, zusätzlich eine Rolle, sodass ein Zusammenhang zwischen lokaler intraartikulärer und systemischer oxidativer Schädigung nicht zwangsläufig besteht<sup>49,75</sup>. In Folgestudien sollte dies genauer untersucht werden, da dies schließlich die Nützlichkeit von 3-Nitrotyrosin als Biomarker der Gonarthrose unterstützen kann.

#### **4.4 8-Isoprostan $F_{2\alpha}$ als Biomarker der Gonarthrose und Gelenkschädigung**

Um den Stellenwert freier Radikale und reaktiver Sauerstoffspezies in der Pathogenese der Gonarthrose zu untersuchen, wurde das Probenmaterial auf das Vorhandensein von 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  untersucht. Dieses fungiert aufgrund seiner nichtenzymatischen Entstehung als Produkt der durch freie Radikale induzierten Lipid-Peroxidation als Marker für oxidative Schäden *in vivo*<sup>81</sup>.

Zunächst fokussierten wir uns auf die Synovialmembran, die in unserer Studie, aufgrund ihrer intraartikulären Lage entzündliche und oxidative Schäden des Gelenkes direkt widerspiegeln sollte. Wir konnten zeigen, dass die mittlere 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$ -Konzentration in den

Synoviozyten der Synovialmembran der Probanden mit Gonarthrose im Vergleich zu den von uns gewählten Kontrollgruppen „akuter Kniegelenkschmerz“ ( $p=0,04$ ) und „reizloses Kniegelenk“ ( $p=0,01$ ) signifikant höher war, obwohl es auch in diesen Gruppen zu einem gewissen Grad nachweisbar war, was bei einem völlig gesunden Knie nicht der Fall sein sollte<sup>152, 169</sup>.

Daraus zogen wir zweierlei Schlüsse: Erstens, dass unsere Kontrollgruppen nicht mit gesunden Kontrollen gleichzusetzen sind, was sich auch darin widerspiegelt, dass auch in diesen Gruppen im Mittel eine entzündliche Restaktivität (gemessen im Synovialitis-Score nach Krenn<sup>117</sup>) nachweisbar war. Zweitens, dass oxidativer Stress unter anderem zu einer Schädigung der Synovialmembran führt, somit die Integrität des Gelenkes zerstört und schließlich die Pathogenese von Arthrose als Ausdruck der Gelenkdestruktion begünstigt<sup>169</sup>.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Grigolo et al.<sup>152</sup>, die zeigen konnten, dass in Synoviozyten von Arthrosepatienten eine signifikant höhere Lipidperoxidation (gemessen als Malonaldehyd- und 4-Hydroxynonenal-Konzentration) als in denen von Patienten mit rheumatoider Arthritis oder gesunder Versuchspersonen nachweisbar war. Darüber hinaus konnte von ihnen gezeigt werden, dass die Lipidperoxidation als Ausdruck oxidativen Stresses auch unabhängig von einer NO-Produktion, als Ausdruck nitrosativen Stresses gesteigert war. Dies deckt sich auch mit unseren Ergebnissen, in denen wir keinen signifikanten Zusammenhang zwischen dem Nachweis von 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  und 3-Nitrotyrosin in der Synovialmembran nachweisen konnten<sup>169</sup>.

Aus unseren Ergebnissen lässt sich ableiten, dass oxidative Schäden in der Pathogenese der Arthrose durch entzündliche Prozesse der Synovialmembran vermittelt werden, da sich ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen Ausprägung der Synovialitis und dem Nachweis von 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in den Synovialisbiopsien ergab. Dies stützt derzeit bestehende pathogenetische Modelle, die der Synovialmembran als Effektororgan in der Arthroseentstehung, neben dem Knorpel- und Knochengewebe, eine zunehmend wichtige Rolle zuschreiben<sup>108,153, 169</sup>.

Ein Indiz dafür, dass die Synovialitis alleine jedoch nicht für die oxidativen und nitrosativen Schäden in der Pathogenese der Arthrose verantwortlich gemacht werden kann, lässt sich zum einen daraus herleiten, dass es keinen signifikanten Unterschied im Ausmaß der Synovialitis zwischen den drei Versuchsgruppen gab, jedoch nicht alle Versuchsgruppen gleichermaßen oxidative Schäden aufwiesen. Zum anderen unterstützt die Arbeit von Grigolo et al. diese Hypothese, da, obwohl die rheumatoide Arthritis pathogenetisch durch eine Synovialitis gekennzeichnet ist<sup>2,130</sup>, bei Patienten mit rheumatoider Arthritis nur geringere oxidative Schäden nachweisbar waren als bei Patienten mit Arthrose<sup>169</sup>.

Zudem war kein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Grad der Synovialitis und dem Nachweis reaktiver Stickstoffspezies (gemessen als 3-Nitrotyrosin-Gehalt) in den Synovialmembranen vorhanden. Die Synoviozyten allein sind demnach nicht die Quelle der ROS und RNS.

Dies widerspricht den geläufigen Krankheitsmodellen keinesfalls, die jeweils ein Zusammenspiel der verschiedenen Gewebe der Gelenkkompartimente (Synovia, Knorpel und Knochen) für die Integrität des Gelenkes verantwortlich machen<sup>108,153</sup>. Unter anderem zeigten beispielsweise Shah et al., dass auch im Knorpelgewebe arthrotischer Gelenke im Vergleich zu gesunden eine deutlich höhere Lipidperoxidation nachweisbar ist<sup>154</sup>.

Unter der Vorstellung, dass sich lokale Schäden der Synovialmembran auch in der Synovialflüssigkeit widerspiegeln, postulierten wir, dass 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  als Marker der oxidativen Schäden auch in der Synovialflüssigkeit nachweisbar sein würde. Da Komponenten der Synovialflüssigkeit via lymphatisches System und durch Knorpelkompression und Knorpeldekompensation in den systemischen Blutkreislauf gelangen, würde unserer Vorstellung nach 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  auch im Serum nachweisbar sein, was es schließlich als Biomarker der Gonarthrose qualifizieren kann<sup>169</sup>.

Es zeigte sich, dass 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in unserer Studie in allen Versuchsgruppen sowohl in der Synovialflüssigkeit als auch im Serum nachweisbar war, ohne dass es jedoch signifikante Mittelwertsunterschiede gab. Im Vergleich zeigte sich lediglich eine deskriptiv höhere 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$ -Konzentration in der Gruppe „Gonarthrose“, was möglicherweise auf die geringe Stichprobengröße zurückzuführen ist<sup>169</sup>.

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen auch Basu et al.<sup>155</sup>. Ihnen gelang der Nachweis von 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in der Synovialflüssigkeit und im Serum von Patienten mit Gonarthrose und Patienten mit rheumatoider Arthritis. Hierbei war 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in der Synovialflüssigkeit der Gruppe Gonarthrose signifikant höher nachweisbar als bei den Patienten mit rheumatoider Arthritis. Im Serum dagegen zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen, wobei die Isoprostan-Konzentration jedoch signifikant höher war, als im Serum gesunder Versuchspersonen.

Schlussfolgernd weisen die Ergebnisse darauf hin, dass eine durch freie Radikale katalysierte nicht-enzymatische Oxidation der Arachidonsäure in der Pathogenese verschiedener chronischer Gelenkerkrankungen (Arthrose und rheumatoide Arthritis) und akuter Gelenkläsionen (Meniskus- und Kreuzbandruptur) eine Rolle spielt. Ob dies tatsächlich der Fall ist und welchen Stellenwert diese in den verschiedenen Krankheitsentitäten einnimmt, bleibt zum jetzigen Zeitpunkt noch ungeklärt und muss in Folgestudien weiter untersucht werden.

So zeigte sich in unserer Studie, genauso wie bei Basu <sup>155</sup>, Ames <sup>156</sup> und Abou-Raya et al. <sup>157</sup>, dass es eine große Variation im 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-Level (pg/mL - µg/mL) sowohl bei Patienten als auch Gesunden (in Synovialflüssigkeit und Serum) gab <sup>169</sup>.

Dies kann erklären, warum es in anderen Studien zu widersprüchlichen Ergebnissen bezüglich des 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-Levels in Serum und Synovialflüssigkeit und seiner jeweiligen Signifikanz bei Patienten mit Arthrose, rheumatoider Arthritis und Gesunden kam <sup>158-160, 169</sup>.

Es sollte jedoch nicht außer Acht gelassen werden, dass die großen Variationen der 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-Level auch durch unterschiedliche Nachweismethoden mit jeweils unterschiedlicher Sensitivität und Spezifität und unterschiedliche Probandenkollektive zustande kommen können. So erhielten die Probanden von Basu et al. beispielsweise im Gegensatz zu unserer Studie alle im Vorfeld der Studie eine Medikation mit nicht-steroidalen Entzündungshemmern (NSAID) oder *Disease-modifying anti-rheumatic drugs* (DMARD). Hierbei wird der Prostaglandin-Level im jeweiligen Untersuchungsmaterial gesenkt und die Bildung freier Radikale unterdrückt <sup>161, 169</sup>.

Zusätzlich zu der großen Variation der 8-Isoprostan F<sub>2α</sub> Level in Synovialflüssigkeit und Serum, die die Funktion als Biomarker der Arthrose im Speziellen und der Gelenkschädigung im Allgemeinen erschwert, konnte weder in unserer Studie, noch in Vergleichsstudien ein sicherer Zusammenhang zwischen dem 8-Isoprostan F<sub>2α</sub>-Level in Synovialflüssigkeit und Serum nachgewiesen werden <sup>155,158, 169</sup>.

Eine Erklärung dafür ist in den kleinen Probandenkollektiven dieser Studien zu finden. Die hieraus resultierende niedrige statistische Power erschwerte das Erreichen eines statistischen Signifikanzniveaus erheblich. Zum anderen spielt in unserer Studie sicherlich die bereits genannte Verdünnung der Synovialflüssigkeit eine Rolle, die eine Korrelation erschwert. Wahrscheinlich spielt diese Verdünnung jedoch nur eine untergeordnete Rolle. So konnten beispielsweise Basu et al., die die Synovialflüssigkeit via direkter Gelenkpunktion und damit unverdünnt gewannen, ebenfalls keine Korrelation nachweisen <sup>155</sup>. Ein weiterer Grund liegt wahrscheinlich darin, dass nicht zwangsläufig ein Zusammenhang zwischen lokaler und systemischer oxidativer Schädigung besteht. Dies kann dadurch erklärt werden, dass jedes Gewebe über ein unterschiedliches Maß endogener antioxidativer Mechanismen verfügt und somit nicht gleichermaßen empfänglich für oxidative Schäden ist <sup>75,160,162</sup>. Um dies beurteilen zu können, muss in weiteren Studien nicht nur der jeweilige oxidative Schaden, sondern zeitgleich auch die antioxidative Kapazität gemessen und schließlich korreliert werden. Zusätzlich müssen weitere Quellen oxidativen Stresses ausgeschlossen werden, die Einfluss auf das systemische Stresslevel beeinflussen können.

Da in unserer Studie jedoch ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$ -Level in den Synovialisbiopsien und dem Arthrosegrad nach Outerbridge nachgewiesen werden konnte und dieser auch hochsignifikant mit dem Arthrosegrad nach Kellgren-Lawrence korrelierte, sollte unserer Meinung nach die Qualifikation von 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  als Biomarker der Gonarthrose in weiteren Studien evaluiert werden.

Zusammenfassend konnte durch den signifikant höheren 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$ -Gehalt im synovialen Gewebe gezeigt werden, dass oxidativer Stress eine wichtige Rolle in der Pathogenese der Gonarthrose spielt. Inwieweit sich diese oxidativen Schäden auch in der Synovialflüssigkeit und im Serum reflektieren, konnte aufgrund der großen Variation 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$ -Level beim Gesunden und Kranken und aufgrund einer kleinen Stichprobenzahl mit unserer Studie nicht geklärt werden. Aus unserer Sicht bedeutet dies, dass die Funktion von 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  derzeit als Biomarker der Gonarthrose noch nicht abschließend bewertet werden kann und Folgeversuche dies reevaluieren sollten.

Festgehalten werden sollte jedoch, dass die Möglichkeit 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  in leicht zugänglichen Körperflüssigkeiten zu untersuchen ein weiteres Studium der Lipidperoxidation als Ausdruck oxidativer Schäden ermöglicht und somit ggf. auch ihrer Kontrolle bzw. Behandlung durch Arzneimittel ermöglichen kann.

#### **4.5 Einschränkungen der Studie**

Insgesamt stützt die vorliegende Arbeit die aktuelle Diskussion über die Rolle der oxidativen/antioxidativen Imbalance in der Pathogenese der Gonarthrose und liefert Hinweise dafür, dass reaktive Sauerstoff- und Stickstoffspezies eine wichtige Rolle in der Gelenkschädigung und somit der Pathogenese der Gonarthrose einzunehmen scheinen.

Welche Rolle die individuellen endogenen antioxidativen Schutzmechanismen in der Pathogenese der Gonarthrose einnehmen, welchen Regulationsmechanismen diese unterliegen und inwiefern diese in der Pathogenese gestört sind, wurde in unserer Studie nicht untersucht und bedarf weiterer Studien, um ggf. neue präventive, diagnostische und therapeutische Ansätze zu entwickeln. Desweiteren muss in Vergleichsstudien erforscht werden, ob bzw. ab welchem Level die untersuchten Marker spezifisch für die Gonarthrose sind.

Darüber hinaus weist unsere Studie einige andere Einschränkungen auf: Wie bereits erläutert sind die Ergebnisse des 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  Gehalts in der Synovialflüssigkeit nur als Annäherungswerte des jeweils tatsächlichen Gehalts zu verstehen. Dies liegt daran, dass auf Grund der Probengewinnung mittels arthroskopischer Lavage die Proben nur in großer Verdünnung erhältlich waren. Der Verdünnungsfaktor konnte somit nur rechnerisch aus den ermittelten Protein-Konzentrationen im BCA-Assay und dem üblicherweise in der Literatur angegebenen Protein-Gehalt extrapoliert werden. In Folgeversuchen wäre es daher ratsam Synovialflüssigkeit mittels direkter Gelenkpunktion oder zu Beginn einer Arthroskopie, vor Instillation von Flüssigkeit, zu asservieren.

Zudem standen aus ethischen Gründen keine Proben völlig gesunder Probanden als Kontrollgruppe zur Verfügung. Die von uns verwendeten Kontrollgruppen „Meniskopathie“ und „Kreuzbandruptur“ erwiesen sich nur eingeschränkt als geeignet, sodass die erzielten Signifikanzniveaus kritisch gewertet werden müssen.

Da die Studie als Single-center Studie mit einem relativ kleinen Probanden- und Probenkollektiv durchgeführt wurde, sollten unsere Daten in einer größeren prospektiven Multi-center Studie mit jeweils randomisiert ausgewählten Probanden und Proben validiert werden.

#### **4.6 Fazit und Ausblick**

Zusammenfassend stützt unsere Studie die Hypothese, dass oxidativer und nitrosativer Stress in der Pathogenese der Gonarthrose, genauso wie es bei anderen chronisch-degenerativen Erkrankungen, wie beispielsweise Diabetes mellitus<sup>163</sup>, Morbus Alzheimer<sup>164,165</sup> oder kardiovaskulären Erkrankungen<sup>166</sup>, bekannt ist, eine Schlüsselrolle spielt. Hierbei wird ein Großteil oxidativ wirkender Agentien wahrscheinlich durch eine Inflammation des synovialen Gewebes generiert und kann so zu Krankheitssymptomen und Knorpeldegeneration führen<sup>169</sup>.

Als Marker dieser oxidativen und nitrosativen Schäden konnten 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  im Synovialen Gewebe (Synovialmembran, Synovialflüssigkeit) und Blut von Patienten mit akuter und chronisch degenerativer Gelenkverletzung identifiziert und nachgewiesen werden, sodass ihre Funktion als potentielle Biomarker des Gelenkschadens im Allgemeinen und der Arthrose im Speziellen geprüft werden konnte<sup>169</sup>.

Hierbei kristallisierte sich heraus, dass sich 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  als potentielle Biomarker der Gonarthrose eignen könnten: Zum einen gelang jeweils ein sicherer Nachweis beider Marker in den untersuchten Proben. Zum anderen ließ sich ein signifikanter Zusammenhang zwischen den Markern und bisher etablierten diagnostischen Kriterien der Arthrose (nämlich Arthrosegrad nach Outerbridge und via entsprechende Korrelation zu Kellgren-Lawrence) nachweisen<sup>169</sup>.

Was derzeit noch nicht geklärt werden konnte, da beide Marker auch zu einem bestimmten Maß in den Versuchsgruppen akuter Gelenkschädigung (Meniskopathie/Kreuzbandruptur) nachweisbar waren, ist, ob beide Marker erst ab einem bestimmten Konzentrationslevel oder zu einem bestimmten Zeitpunkt nach Trauma spezifisch für arthrotische Veränderungen des Gelenkes sind. Zudem bleibt der Zusammenhang zwischen oxidativer lokaler intraartikulärer und systemischer Schädigung, der durch endogene antioxidative Mechanismen beeinflusst werden könnte, unbearbeitet.

Diese Fragen sollten in Folgeversuchen mittels größerer Probandenzahl, optimierten Untersuchungsbedingungen (Proben via Punktion entnehmen, etc.) und eventuell gesunden Kontrollen durchgeführt werden, bevor eine endgültige Entscheidung über die Qualifikation von 3-Nitrotyrosin und 8-Isoprostan  $F_{2\alpha}$  gefällt werden kann<sup>169</sup>.

Sollte diese Qualifikation gelingen und für die Gonarthrose spezifisch sein, so ergäben sich hieraus präventive, diagnostische und therapeutische Konsequenzen: Zukünftig könnte in der Diagnostik der Gonarthrose möglicherweise auf eine apparative und operative Diagnostik zugunsten einer einfachen Blutabnahme verzichtet werden. Dies würde dem Patienten mögliche Nebenwirkungen und Komplikationen der bisher etablierten Untersuchungen ersparen und

lange Warte- und Untersuchungszeiten und damit einhergehende psychische Belastungen bis zur Diagnosefindung reduzieren. Zudem könnte eine flächendeckende Diagnostik auch in Abwesenheit einer apparativen Röntgendiagnostik, beispielsweise in Entwicklungsländern, ermöglicht werden. Zusätzlich wäre sicherlich auch aus ökonomischer Sicht eine große Kostenersparnis möglich.

Auch in Prävention und Therapie ergäben sich neue Ansätze. So wäre beispielsweise eine Stärkung bzw. Wiederherstellung der oxidativen/antioxidativen Balance durch den Einsatz antioxidativer Substanzen denkbar, sodass die Pathogenese der Gonarthrose modifiziert werden könnte. Durch ein entsprechendes Biomarkerscreening könnte der therapeutische Erfolg quantitativ bestimmt und ggf. optimiert werden. Alternativ könnte ein Biomarkerscreening als Methode zur individuellen Risikoabschätzung bezüglich der Entwicklung einer Arthrose für den einzelnen Patienten bereits vor der klinischen Manifestation etabliert werden, was ggf. schon in der Frühphase der Pathogenese der Gonarthrose therapeutische Möglichkeiten eröffnen könnte. Dies ist derzeit jedoch noch Zukunftsvision und bedarf weiterer Untersuchungen.

## 5. Literaturverzeichnis

1. Mayerhofer, A., Junqueira, Luiz Carlos Uchôa & Carneiro, J. *Histologie. Mit 17 Tabellen*. 6th ed. (Springer, Berlin [u.a.], 2005).
2. Knöb, P. *et al.* Das differenzialdiagnostische Spektrum der Synovialitis. *Z. Rheumatol.* 67, 8–16 (2008).
3. Aigner, T. & Söder, S. Histopathologische Begutachtung der Gelenkdegeneration. *Pathologe* 27, 431–438 (2006).
4. Robert Koch-Institut (RKI). Arthrose. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 54.
5. Knox, P., Levick, J.R. & McDonald, J.N. Synovial fluid--its mass, macromolecular content and pressure in major limb joints of the rabbit. *Quarterly journal of experimental physiology (Cambridge, England)* 73, 33–45 (1988).
6. Balazs, E.A., Watson, D., Duff, I.F. & Roseman, S. Hyaluronic acid in synovial fluid. I. Molecular parameters of hyaluronic acid in normal and arthritis human fluids. *Arthritis and rheumatism* 10, 357–376 (1967).
7. Temple-Wong, M.M. *et al.* Hyaluronan concentration and size distribution in human knee synovial fluid: variations with age and cartilage degeneration. *Arthritis research & therapy* 18, 18 (2016).
8. Wirth, C.J. *Orthopädie und orthopädische Chirurgie* (Thieme, Stuttgart, New York, 2002-).
9. Henrotin, Y., Kurz, B. & Aigner, T. Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes?1. *Osteoarthritis and Cartilage* 13, 643–654 (2005).
10. Hunter, D.J. Osteoarthritis. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 25, 801–814 (2011).
11. Felson, D.T. Osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 16, 499–512 (1990).
12. World Health Organization (WHO). The burden of musculoskeletal conditions at the start of the new millennium. Report of a WHO Scientific Group Geneva. *WHO Technical Report Series* (2003).
13. Woolf, A.D. & Pfleger, B. Burden of major musculoskeletal conditions. *Bull World Health Organ* 81, 646–656 (2003).
14. Delmas, P.D. & Anderson, M. Launch of the bone and joint decade 2000-2010. *Osteoporos Int* 11, 95–97 (2000).
15. Arden, N. & Nevitt, M.C. Osteoarthritis: Epidemiology. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 20, 3–25 (2006).
16. *Daten und Fakten: Ergebnisse der Studie "Gesundheit in Deutschland aktuell 2010"* (Robert-Koch-Inst, Berlin, 2012).
17. Newman, A.B. *et al.* Strength and Muscle Quality in a Well-Functioning Cohort of Older Adults: The Health, Aging and Body Composition Study. *Journal of the American Geriatrics Society* 51, 323–330 (2003).
18. Guccione, A.A. *et al.* The effects of specific medical conditions on the functional limitations of elders in the Framingham Study. *Am J Public Health* 84, 351–358 (1994).
19. Reginster, J.Y. & Khaltsev, N.G. Introduction and WHO perspective on the global burden of musculoskeletal conditions. *Rheumatology (Oxford)* 41 Supp 1, 1–2 (2002).
20. Population Division of the Department of Economic and Social Affairs of the United Nations Secretariat. *World population ageing, 1950-2050* (United Nations, New York, 2002).
21. Center for Disease Control and Prevention. From the Centers for Disease Control and Prevention. Prevalence of self-reported arthritis or chronic joint symptoms among adults--United States, 2001. *JAMA* 288, 3103–3104 (2002).
22. Felson, D.T. *et al.* The incidence and natural history of knee osteoarthritis in the elderly, the framingham osteoarthritis study. *Arthritis & Rheumatism* 38, 1500–1505 (1995).
23. Felson, D.T. *et al.* The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. the framingham osteoarthritis study. *Arthritis & Rheumatism* 30, 914–918 (1987).
24. Lawrence, J.S., Bremner, J.M. & Bier, F. Osteo-arthrosis. Prevalence in the population and relationship between symptoms and x-ray changes. *Ann Rheum Dis* 25, 1–24 (1966).

25. Hackenbroch, M.H. *Arthrosen. Basiswissen zu Klinik, Diagnostik und Therapie ; 44 Tabellen* (Thieme, Stuttgart [u.a.], 2002).
26. Hurley, M.V. The role of muscle weakness in the pathogenesis of osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 25, 283-98, vi (1999).
27. Sharma, L. Proprioceptive impairment in knee osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 25, 299-314, vi (1999).
28. Sharma, L. *et al.* Laxity in healthy and osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* 42, 861–870 (1999).
29. Loeser, R.F. Molecular Mechanisms of Cartilage Destruction: Mechanics, Inflammatory Mediators, and Aging Collide. *Arthritis Rheum* 54, 1357–1360 (2006).
30. Loeser, R.F. & Shakoor, N. Aging or osteoarthritis: which is the problem? *Rheum Dis Clin North Am* 29, 653–673 (2003).
31. Cooper, C. *et al.* Risk factors for the incidence and progression of radiographic knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 43, 995–1000 (2000).
32. Hart, D.J., Doyle, D.V. & Spector, T.D. Association between metabolic factors and knee osteoarthritis in women: the Chingford Study. *J Rheumatol* 22, 1118–1123 (1995).
33. Spector, T.D. *et al.* Low-level increases in serum C-reactive protein are present in early osteoarthritis of the knee and predict progressive disease. *Arthritis Rheum* 40, 723–727 (1997).
34. Sowers, M. *et al.* C-reactive protein as a biomarker of emergent osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 10, 595–601 (2002).
35. Krasnokutsky, S., Attur, M., Palmer, G., Samuels, J. & Abramson, S.B. Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage* 16, S1–S3 (2008).
36. Eyre, D.R. Collagens and Cartilage Matrix Homeostasis. *Clinical Orthopaedics and Related Research* 427, S118 (2004).
37. Nuki, G. Osteoarthritis - A problem of joint failure. *Zeitschrift für Rheumatologie* 58, 142–147 (1999).
38. Fassbender, H.G. Strukturelle Grundlagen und Pathomechanismen von Arthritis und Arthrose. *Dtsch. Med. Wochenschr.* 105, 864–867 (1980).
39. Niethard, F.U. & Pfeil, J. *Orthopädie. 48 Tabellen ; [mit CD-ROM Klinisch-orthopädische Untersuchung]*. 5th ed. (Thieme, Stuttgart, 2005).
40. Altman, R. *et al.* The American College of Rheumatology criteria for the classification and reporting of osteoarthritis of the hip. *Arthritis Rheum.* 34, 505–514 (1991).
41. Kellgren, J.H. & Lawrence, J.S. Radiological assessment of osteoarthrosis. *Ann. Rheum. Dis.* 16, 494–502 (1957).
42. Outerbridge, R.E. The etiology of chondromalacia patellae. *The Journal of bone and joint surgery. British volume* 43-B, 752–757 (1961).
43. Cameron, M.L., Briggs, K.K. & Steadman, J.R. Reproducibility and reliability of the outerbridge classification for grading chondral lesions of the knee arthroscopically. *The American journal of sports medicine* 31, 83–86 (2003).
44. Brandt, K.D., Fife, R.S., Braunstein, E.M. & Katz, B. Radiographic grading of the severity of knee osteoarthritis: relation of the Kellgren and Lawrence grade to a grade based on joint space narrowing, and correlation with arthroscopic evidence of articular cartilage degeneration. *Arthritis Rheum* 34, 1381–1386 (1991).
45. Fife, R.S. *et al.* Relationship between arthroscopic evidence of cartilage damage and radiographic evidence of joint space narrowing in early osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 34, 377–382 (1991).
46. Lysholm, J., Hamberg, P. & Gillquist, J. The correlation between osteoarthrosis as seen on radiographs and on arthroscopy. *Arthroscopy* 3, 161–165 (1987).
47. Michael, J.W.-P., Schlüter-Brust, K.U. & Eysel, P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee. *Dtsch Arztebl Int* 107, 152–162 (2010).
48. Felson, D.T. & Zhang, Y. An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum.* 41, 1343–1355 (1998).
49. Droge, W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47–95 (2002).

50. Valko, M. *et al.* Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44–84 (2007).
51. Bergendi, L., Beneš, L., Ďuračková, Z. & Ferenčík, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sciences* 65, 1865–1874 (1999).
52. Bruice, P.Y., Lazar, T. & Reiser, O. *Organische Chemie. Studieren kompakt.* 5th ed. (Pearson Studium, München, 2011).
53. Zeeck, A. *Chemie für Mediziner.* 4th ed. (Urban & Fischer, München [u.a.], 2000).
54. Halliwell, B. & Gutteridge, J.M. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186, 1–85 (1990).
55. Afonso, V., Champy, R., Mitrovic, D., Collin, P. & Lomri, A. Reactive oxygen species and superoxide dismutases: Role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74, 324–329 (2007).
56. Haddad, J.J. Antioxidant and prooxidant mechanisms in the regulation of redox(y)-sensitive transcription factors. *Cellular Signalling* 14, 879–897 (2002).
57. Davies, K.J. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. *J. Biol. Chem.* 262, 9895–9901 (1987).
58. Tiku, M.L., Gupta, S. & Deshmukh, D.R. Aggrecan degradation in chondrocytes is mediated by reactive oxygen species and protected by antioxidants. *Free Radic Res* 30, 395–405 (1999).
59. Wiseman, H. & Halliwell, B. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: role in inflammatory disease and progression to cancer. *Biochem J* 313 ( Pt 1), 17–29 (1996).
60. Bruckdorfer, K.R. Lipid oxidation products and vascular function. *Free Radic Res* 28, 573–581 (1998).
61. Kovacic, P. & Jacintho, J.D. Reproductive toxins: pervasive theme of oxidative stress and electron transfer. *Curr Med Chem* 8, 863–892 (2001).
62. Ridnour, L.A. *et al.* The chemistry of nitrosative stress induced by nitric oxide and reactive nitrogen oxide species. Putting perspective on stressful biological situations. *Biol Chem* 385, 1–10 (2004).
63. Miller, D.M., Buettner, G.R. & Aust, S.D. Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 8, 95–108 (1990).
64. Cadenas, E. & Sies, H. The lag phase. *Free Radic Res* 28, 601–609 (1998).
65. Vorbach, C., Harrison, R. & Capecchi, M.R. Xanthine oxidoreductase is central to the evolution and function of the innate immune system. *Trends Immunol* 24, 512–517 (2003).
66. Decoursey, T.E. & Ligeti, E. Regulation and termination of NADPH oxidase activity. *Cell Mol Life Sci* 62, 2173–2193 (2005).
67. Johnson, F. & Giulivi, C. Superoxide dismutases and their impact upon human health. *Molecular Aspects of Medicine* 26, 340–352 (2005).
68. Valko, M., Izakovic, M., Mazur, M., Rhodes, C.J. & Telser, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol. Cell. Biochem.* 266, 37–56 (2004).
69. Beckman, J.S. & Koppenol, W.H. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271, C1424–37 (1996).
70. MacMicking, J., Xie, Q.W. & Nathan, C. Nitric oxide and macrophage function. *Annu Rev Immunol* 15, 323–350 (1997).
71. Pryor, W.A. & Squadrito, G.L. The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide. *Am J Physiol* 268, L699–722 (1995).
72. Carr, A.C., McCall, M.R. & Frei, B. Oxidation of LDL by myeloperoxidase and reactive nitrogen species: reaction pathways and antioxidant protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20, 1716–1723 (2000).
73. Bauer, G. Reactive oxygen and nitrogen species: efficient, selective, and interactive signals during intercellular induction of apoptosis. *Anticancer Res* 20, 4115–4139 (2000).
74. Zucker, B., Hanusch, J. & Bauer, G. Glutathione depletion in fibroblasts is the basis for apoptosis-induction by endogenous reactive oxygen species. *Cell Death Differ* 4, 388–395 (1997).
75. Wood, Z.A., Schröder, E., Robin Harris, J. & Poole, L.B. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 32–40 (2003).

76. P.C. Heinrich, M. Müller & L. Graeve eds. *Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie* (Springer, Berlin, Heidelberg, 2014).
77. McCord, J.M. & Edeas, M.A. SOD, oxidative stress and human pathologies: a brief history and a future vision. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 59, 139–142 (2005).
78. Manta, B. *et al.* The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 484, 146–154 (2009).
79. Haklar, U. *et al.* Oxygen radicals and nitric oxide levels in chondral or meniscal lesions or both. *Clin Orthop Relat Res*, 135–142 (2002).
80. Pryor, W.A. Oxidative stress status: OSS, BOSS, and “wild bill” donovan. *Free Radical Biology and Medicine* 27, 1135–1136 (1999).
81. Dalle-Donne, I. Biomarkers of Oxidative Damage in Human Disease. *Clinical Chemistry* 52, 601–623 (2006).
82. Basu, S. Isoprostanes: novel bioactive products of lipid peroxidation. *Free radical research* 38, 105–122 (2004).
83. Morrow, J.D. *et al.* A series of prostaglandin F<sub>2</sub>-like compounds are produced in vivo in humans by a non-cyclooxygenase, free radical-catalyzed mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 9383–9387 (1990).
84. Roberts, L Jackson 2nd & Morrow, J.D. Products of the isoprostane pathway: unique bioactive compounds and markers of lipid peroxidation. *Cell Mol Life Sci* 59, 808–820 (2002).
85. Basu, S. Bioactive eicosanoids: Role of prostaglandin F<sub>2</sub> $\alpha$  and F<sub>2</sub>-isoprostanes in inflammation and oxidative stress related pathology. *Mol Cells* 30, 383–391 (2010).
86. Awad, J.A., Morrow, J.D., Takahashi, K. & Roberts, L Jackson 2nd. Identification of non-cyclooxygenase-derived prostanoid (F<sub>2</sub>-isoprostane) metabolites in human urine and plasma. *J Biol Chem* 268, 4161–4169 (1993).
87. Mezzetti, A., Cipollone, F. & Cucurullo, F. Oxidative stress and cardiovascular complications in diabetes: isoprostanes as new markers on an old paradigm. *Cardiovasc Res* 47, 475–488 (2000).
88. Lawson, J.A., Rokach, J. & Fitzgerald, G.A. Isoprostanes: Formation, Analysis and Use As Indices of Lipid Peroxidation in Vivo. *Journal of Biological Chemistry* 274, 24441–24444 (1999).
89. Rokach, J. *et al.* The isoprostanes: a perspective. *Prostaglandins* 54, 823–851 (1997).
90. Mehrabi, M.R. *et al.* Enhanced accumulation of the isoprostane, 8-epi-PGF<sub>2</sub>  $\alpha$ , in human aortic and pulmonary valves of patients with coronary heart disease. *Histology and histopathology* 17, 1053–1059 (2002).
91. Basu, S. & Eriksson, M. Lipid peroxidation induced by an early inflammatory response in endotoxaemia. *Acta anaesthesiologica Scandinavica* 44, 17–23 (2000).
92. Grieb, P. *et al.* Changes in oxidative stress in the rat brain during post-cardiac arrest reperfusion, and the effect of treatment with the free radical scavenger idebenone. *Resuscitation* 39, 107–113 (1998).
93. Taysi, S., Polat, F., Gul, M., Sari, R.A. & Bakan, E. Lipid peroxidation, some extracellular antioxidants, and antioxidant enzymes in serum of patients with rheumatoid arthritis. *Rheumatology international* 21, 200–204 (2002).
94. Bohle, D.S., Hansert, B., Paulson, S.C. & Smith, B.D. Biomimetic Synthesis of the Putative Cytotoxin Peroxynitrite, ONOO-, and Its Characterization as a Tetramethylammonium Salt. *J. Am. Chem. Soc.* 116, 7423–7424 (1994).
95. Radi, R. Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4003–4008 (2004).
96. Beckmann, J.S. *et al.* Extensive nitration of protein tyrosines in human atherosclerosis detected by immunohistochemistry. *Biol Chem Hoppe Seyler* 375, 81–88 (1994).
97. Ahsan, H. 3-Nitrotyrosine: A biomarker of nitrogen free radical species modified proteins in systemic autoimmunogenic conditions. *Human Immunology* 74, 1392–1399 (2013).
98. Kooy, N.W. *et al.* Extensive tyrosine nitration in human myocardial inflammation: evidence for the presence of peroxynitrite. *Crit Care Med* 25, 812–819 (1997).

99. Kooy, N.W., Royall, J.A., Ye, Y.Z., Kelly, D.R. & Beckman, J.S. Evidence for in vivo peroxynitrite production in human acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 151, 1250–1254 (1995).
100. Sittipunt, C. *et al.* Nitric oxide and nitrotyrosine in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med* 163, 503–510 (2001).
101. Chang, L.-Y. & Crapo, J.D. Inhibition of airway inflammation and hyperreactivity by an antioxidant mimetic. *Free Radic Biol Med* 33, 379–386 (2002).
102. Kaur, H. & Halliwell, B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Letters* 350, 9–12 (1994).
103. Singer, I.I. *et al.* Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine in colonic epithelium in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 111, 871–885 (1996).
104. Greenwald, R.A. Oxygen radicals, inflammation, and arthritis: pathophysiological considerations and implications for treatment. *Semin Arthritis Rheum* 20, 219–240 (1991).
105. Martin, J.A., Brown, T., Heiner, A. & Buckwalter, J.A. Post-traumatic osteoarthritis: the role of accelerated chondrocyte senescence. *Biorheology* 41, 479–491 (2004).
106. Martin, J.A., Brown, T.D., Heiner, A.D. & Buckwalter, J.A. Chondrocyte senescence, joint loading and osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*, S96-103 (2004).
107. Henrotin, Y.E., Bruckner, P. & Pujol, J.-P.L. The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11, 747–755 (2003).
108. Krasnokutsky, S., Samuels, J. & Abramson, S.B. Osteoarthritis in 2007. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 65, 222–228 (2007).
109. Pelletier, J.P., Martel-Pelletier, J. & Abramson, S.B. Osteoarthritis, an inflammatory disease: potential implication for the selection of new therapeutic targets. *Arthritis Rheum* 44, 1237–1247 (2001).
110. Fernandes, J.C., Martel-Pelletier, J. & Pelletier, J.-P. The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39, 237–246 (2002).
111. Yudoh, K. *et al.* Potential involvement of oxidative stress in cartilage senescence and development of osteoarthritis: oxidative stress induces chondrocyte telomere instability and downregulation of chondrocyte function. *Arthritis Res Ther* 7, R380-91 (2005).
112. Kuhn, K., D'Lima, D.D., Hashimoto, S. & Lotz, M. Cell death in cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 12, 1–16 (2004).
113. Fermor, B. *et al.* The effects of static and intermittent compression on nitric oxide production in articular cartilage explants. *J Orthop Res* 19, 729–737 (2001).
114. Ziskoven, C. *et al.* Oxidative stress in secondary osteoarthritis: from cartilage destruction to clinical presentation? *Orthop Rev (Pavia)* 2, e23 (2010).
115. Stoller, D.W., Martin, C., Crues, J.V., Kaplan, L. & Mink, J.H. Meniscal tears: pathologic correlation with MR imaging. *Radiology* 163, 731–735 (1987).
116. DeHaven, K.E., Cosgarea, A.J. & Sebastianelli, W.J. Arthrofibrosis of the knee following ligament surgery. *Instr Course Lect* 52, 369–381 (2003).
117. Krenn, V., Morawietz, L., Burmester, G.-R. & Häupl, T. Synovialitis-Score: Histopathologisches Graduierungsschema rheumatischer und nicht-rheumatischer Synovialitiden. *Z. Rheumatol.* 64, 334–342 (2005).
118. Lang, G. *Histotechnik. Praxislehrbuch für die Biomedizinische Analytik*. 2nd ed. (Springer, Vienna, 2013).
119. Bhairi, S.M. *Detergents. A guide to the properties and uses of detergents in biological systems* (Calbiochem-Novabiochem, [S.I.], 1997).
120. Noll, S., Höfler, H. & Schaub-Kuhnen, S. *Praxis der Immunhistochemie*. 1st ed. (Urban & Fischer, München [u.a.], 2000).
121. Smith, P.K. *et al.* Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150, 76–85 (1985).
122. Luttmann, W., Bratke, K., Küpper, M. & Myrtek, D. *Der Experimentator: Immunologie*. 3rd ed. (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 2009).
123. Bortz, J. *Statistik für Sozialwissenschaftler. Mit 247 Tabellen*. 5th ed. (Springer, Berlin [u.a.], 1999).

124. Shane Anderson, A. & Loeser, R.F. Why is osteoarthritis an age-related disease? *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 24, 15–26 (2010).
125. Felson, D.T. & Chaisson, C.E. Understanding the relationship between body weight and osteoarthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 11, 671–681 (1997).
126. Issa, R.I. & Griffin, T.M. Pathobiology of obesity and osteoarthritis: integrating biomechanics and inflammation. *Pathobiology of aging & age related diseases* 2 (2012).
127. Petersen, W. & Roeske, M. *Das vordere Kreuzband. Grundlagen und aktuelle Praxis der operativen Therapie ; mit 29 Tabellen* (Dt. Ärzte-Verl., Köln, 2009).
128. Griffin, L.Y. *et al.* Noncontact anterior cruciate ligament injuries: risk factors and prevention strategies. *The Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons* 8, 141–150 (2000).
129. Niemeyer, P. *et al.* Stellenwert der autologen Chondrozytentransplantation (ACT) in der Behandlung von Knorpelschäden des Kniegelenks - Empfehlungen der AG Klinische Geweberegeneration der DGOU. *Z Orthop Unfall* 151, 38–47 (2013).
130. D.L. Kasper, A.S. Fauci, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson & J. Loscalzo eds. *Harrison's principles of internal medicine* (McGraw Hill Education, New York, 2015).
131. Biemer, E. & Hipp, E.G. *Orthopädie und Traumatologie. 40 Tabellen* (Thieme, Stuttgart [u.a.], 2003).
132. Anderson, M.J., Browning, William M 3rd, Urband, C.E., Kluczynski, M.A. & Bisson, L.J. A Systematic Summary of Systematic Reviews on the Topic of the Anterior Cruciate Ligament. *Orthopaedic journal of sports medicine* 4, 2325967116634074 (2016).
133. Doherty, D.B. & Lowe, W.R. Meniscal Root Tears: Identification and Repair. *American journal of orthopedics (Belle Mead, N.J.)* 45, 183–187 (2016).
134. Tornbjerg, S.M. *et al.* Structural pathology is not related to patient-reported pain and function in patients undergoing meniscal surgery. *British journal of sports medicine* (2016).
135. Dieppe, P.A. & Lohmander, L.S. Pathogenesis and management of pain in osteoarthritis. *Lancet (London, England)* 365, 965–973 (2005).
136. Wiseman, S. The effect of restriction of range upon correlation coefficients. *British Journal of Educational Psychology* 37, 248–252 (1967).
137. Barrett, G.R. *et al.* Body Mass Index as an Indicator of Associated Intra-articular Injuries in Patients With Anterior Cruciate Ligament Tears. *Journal of surgical orthopaedic advances* 24, 159–163 (2015).
138. Suantawee, T. *et al.* Upregulation of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine expression in primary knee osteoarthritis. *Journal of the Medical Association of Thailand = Chotmaihet thangphaet* 98 Suppl 1, S91-7 (2015).
139. Bergendi, L., Benes, L., Durackova, Z. & Ferencik, M. Chemistry, physiology and pathology of free radicals. *Life Sci* 65, 1865–1874 (1999).
140. Mapp, P.I. *et al.* Localization of 3-nitrotyrosine to rheumatoid and normal synovium. *Arthritis and rheumatism* 44, 1534–1539 (2001).
141. Sandhu, J.K., Robertson, S., Birnboim, H.C. & Goldstein, R. Distribution of protein nitrotyrosine in synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *The Journal of rheumatology* 30, 1173–1181 (2003).
142. Misko, T.P. *et al.* Characterization of nitrotyrosine as a biomarker for arthritis and joint injury. *Osteoarthritis and Cartilage* 21, 151–156 (2013).
143. Lohmander, L.S., Englund, P.M., Dahl, L.L. & Roos, E.M. The long-term consequence of anterior cruciate ligament and meniscus injuries: osteoarthritis. *The American journal of sports medicine* 35, 1756–1769 (2007).
144. Gillquist, J. & Messner, K. Anterior cruciate ligament reconstruction and the long-term incidence of gonarthrosis. *Sports medicine (Auckland, N.Z.)* 27, 143–156 (1999).
145. Suter, L.G. *et al.* Projecting Lifetime Risk of Symptomatic Knee Osteoarthritis and Total Knee Replacement in Individuals Sustaining a Complete Anterior Cruciate Ligament Tear in Early Adulthood. *Arthritis care & research* (2016).
146. Karan, A. *et al.* Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clinical Rheumatology* 22, 397–399 (2003).

147. Khan, F. & Siddiqui, A.A. Prevalence of anti-3-nitrotyrosine antibodies in the joint synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis, osteoarthritis and systemic lupus erythematosus. *Clinica Chimica Acta* 370, 100–107 (2006).
148. Kaur, H. & Halliwell, B. Evidence for nitric oxide-mediated oxidative damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients. *FEBS Lett* 350, 9–12 (1994).
149. Ersoy, Y. *et al.* Serum nitrate and nitrite levels in patients with rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and osteoarthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases* 61, 76–78 (2002).
150. Farrell, A.J., Blake, D.R., Palmer, R.M. & Moncada, S. Increased concentrations of nitrite in synovial fluid and serum samples suggest increased nitric oxide synthesis in rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases* 51, 1219–1222 (1992).
151. Nemirovskiy, O.V. *et al.* Plasma 3-nitrotyrosine is a biomarker in animal models of arthritis: Pharmacological dissection of iNOS' role in disease. *Nitric oxide : biology and chemistry / official journal of the Nitric Oxide Society* 20, 150–156 (2009).
152. Grigolo, B., Roseti, L., Fiorini, M. & Facchini, A. Enhanced lipid peroxidation in synoviocytes from patients with osteoarthritis. *The Journal of rheumatology* 30, 345–347 (2003).
153. Samuels, J., Krasnokutsky, S. & Abramson, S.B. Osteoarthritis: a tale of three tissues. *Bulletin of the NYU hospital for joint diseases* 66, 244–250 (2008).
154. Shah, R., Raska, K., JR & Tiku, M.L. The presence of molecular markers of in vivo lipid peroxidation in osteoarthritic cartilage: a pathogenic role in osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* 52, 2799–2807 (2005).
155. Basu, S. Raised levels of F2-isoprostanes and prostaglandin F2alpha in different rheumatic diseases. *Annals of the Rheumatic Diseases* 60, 627–631 (2001).
156. Ames, P.R., Alves, J., Murat, I., Isenberg, D.A. & Nourooz-Zadeh, J. Oxidative stress in systemic lupus erythematosus and allied conditions with vascular involvement. *Rheumatology (Oxford, England)* 38, 529–534 (1999).
157. Abou-Raya, A., El-Hallous, D. & Fayed, H. 8-Isoprostaglandin F2 alpha: a potential index of lipid peroxidation in systemic lupus erythematosus. *Clinical and investigative medicine. Medecine clinique et experimentale* 27, 306–311 (2004).
158. Chaturvedi, V., Handa, R., Rao, D.N. & Wali, J.P. Estimation & significance of serum & synovial fluid malondialdehyde levels in rheumatoid arthritis. *The Indian journal of medical research* 109, 170–174 (1999).
159. Ostalowska, A. *et al.* Lipid peroxidation and antioxidant enzymes in synovial fluid of patients with primary and secondary osteoarthritis of the knee joint. *Osteoarthritis and Cartilage* 14, 139–145 (2006).
160. Sarban, S., Kocyigit, A., Yazar, M. & Isikan, U.E. Plasma total antioxidant capacity, lipid peroxidation, and erythrocyte antioxidant enzyme activities in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Clinical Biochemistry* 38, 981–986 (2005).
161. Halliwell, B., Evans, P.J., Kaur, H. & Chirico, S. Drug derived radicals: mediators of the side effects of anti-inflammatory drugs? *Annals of the Rheumatic Diseases* 51, 1261–1263 (1992).
162. Dröge. Free Radicals in the Physiological Control of cell function.
163. Maritim, A.C., Sanders, R.A. & Watkins, J B 3rd. Diabetes, oxidative stress, and antioxidants: a review. *Journal of biochemical and molecular toxicology* 17, 24–38 (2003).
164. Sutherland, G.T., Chami, B., Youssef, P. & Witting, P.K. Oxidative stress in Alzheimer's disease: Primary villain or physiological by-product? *Redox report : communications in free radical research* 18, 134–141 (2013).
165. Schrag, M. *et al.* Oxidative stress in blood in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment: a meta-analysis. *Neurobiology of disease* 59, 100–110 (2013).
166. El Assar, M., Angulo, J. & Rodriguez-Manas, L. Oxidative stress and vascular inflammation in aging. *Free radical biology & medicine* 65, 380–401 (2013).
167. Fauci, A.S., Dale, D.C. & Balow, J.E. Glucocorticosteroid therapy: mechanisms of action and clinical considerations. *Annals of internal medicine* 84, 304–315 (1976).

168. Rosenberger, R.E., Gomoll, A.H., Bryant, T. & Minas, T. Repair of large chondral defects of the knee with autologous chondrocyte implantation in patients 45 years or older. *The American journal of sports medicine* **36**, 2336–2344 (2008).
169. Franz, A. & Joseph, L. *et. al.* The role of oxidative and nitrosative stress in the pathology of osteoarthritis: Novel candidate biomarkers for quantification of degenerative changes in the knee joint. *Orthopedic Reviews*, under review

## **6. Danksagung**

Ich danke allen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein herzlicher Dank gilt Herrn PD Dr. med. C. Zilkens, der die Betreuung meiner Arbeit mit viel Engagement übernommen hat.

Insbesondere danke ich auch Frau Dr. rer. nat. J. Fröbel und Frau S. Lensing-Höhn für die freundschaftliche Aufnahme im Orthopädischen Forschungslabor sowie für ihre gute fachliche Anleitung und viele Hilfestellungen und Anregungen während des experimentellen Teils der Arbeit.

Bei der Deutschen Arthrosehilfe e.V. bedanke ich mich für die großzügige finanzielle Unterstützung im Rahmen des Projektes „Die Bedeutung der parakrinen Signaltransduktion durch Zytokine und freie oxidative und nitrosative Spezies in der Pathophysiologie der Arthrose am Kniegelenk“ (07/2015).

Herrn Dr. med. Dr. rer. nat. M. Ostapczuk danke ich für die große Hilfe bei der Datenanalyse, für seine kritischen Anmerkungen und Verbesserungsvorschläge sowie seine Motivation zur Fertigstellung der Arbeit. Auch Herrn Dr. med. C. Mayer sei an dieser Stelle für seine sorgfältige Korrekturlektüre dieser Arbeit gedankt.

Ein besonderer Dank gilt meinem Ehemann Patrick und meinen Eltern und Geschwistern, die mir stets mit Liebe begegnen, mich in allen Lebenslagen unterstützten und mir ein wunderbares Leben schenken.