

Kumulative Habilitationsschrift „Neue diagnostische Verfahren und Entwicklungen in der
Implantatallergie“

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

Direktor Prof. Dr. Lars French

Habilitationsschrift zum Thema:

**„Neue diagnostische Verfahren und Entwicklungen in der
Implantatallergie“**

vorgelegt von Dr. rer. biol. hum. Burkhard Summer

(2019)



Einleitung

Themistokles Gluck scheiterte zwar mit seiner visionären Idee, künstliche Kniegelenke aus Elfenbein für seine verzweifelten Patienten einzusetzen [1]. Aber schon im 20. Jahrhundert wurde die Endoprothetik als eine der bahnbrechenden Prozeduren zum Erhalt von Lebensqualität angesehen [2]. In Entsprechung zu der immer häufiger werdenden Anwendung von Metallimplantaten am Menschen ergibt sich nicht nur eine wiedereinsetzende Besserung der Lebensqualität sondern auch die Frage nach bestmöglichem Umgang mit möglichen Komplikationen. So lagen bereits 2011 die Zahlen eingesetzter Knieendoprothesen bzw. Hüftendoprothesen in den USA bei 465.034 und 702.415 bzw. in Deutschland bei 232.120 und 168.486 – und etwa 9% davon waren komplikationsbedingte Revisionsoperationen [3]. Aseptische Lockerung aber auch periimplantärer Infekt gehören zu den Hauptursachen für Prothesenversagen [4]. Über die Jahrzehnte wurden Materialeigenschaften aus technischer Sicht verbessert und speziell Metallionenfreisetzung und Abriebpartikel berücksichtigt [5, 6]. Daß auch der Organismus auf das Fremdmaterial „Metallimplantat“ reagiert wurde anhand periimplantärer Makrophagen-dominiertes Gewebereaktionen beschrieben [7]. Schon ab den 70er Jahren erschienen Publikationen, die über individuelle Überempfindlichkeit im Sinne von Allergie bei Metallimplantat-Komplikationen berichteten [8, 9]. Das verwundert nicht, da zu den Legierungsmetallen bekannte Allergieauslöser wie Nickel, Chrom und Kobalt gehören – wie auch im Knochenzement enthaltene Acrylate oder Additiva (z.B. Antibiotika). Zu den klinischen Bildern gehörten unter anderem aseptische Lockerung, Schmerzen, rezidivierende Ergüsse und auch lokale / disseminierte Ekzeme [10, 11]. Willert et al. waren lange angefeindet worden wegen der als „Hypersensitivity“ eingestuften Beobachtung von speziellen eher Lymphozyten-betonten periimplantären Gewebereaktionen bei „direkt gekoppelten“, gelockerten Metall-Metall-Hüftendoprothesen [12]. Der Blick „auf den Menschen und die Reaktion des Organismus“ wurde auch angestoßen, als hohe Versagensraten und Ausbildung von lokalen „Pseudotumoren“ in Antwort auf hohe Metallabriebraten bei einem bestimmten Metall-Metall-Hüftendoprothesenmodell beobachtet wurden [13, 14]. Registerdaten ließen dies erkennen und es tauchte z.B. auch im australischen Register die Versagensursache „Metal sensitivity“ auf [4]. Die Veröffentlichungen zum Thema „Metallimplantatallergie“ als einem Teilaspekt der Komplikationsforschung nehmen zu. Münch et al. konnten 2015 bei einem „Überlappen“ des Dänischen Kontaktallergie-Registers und des Endoprothesenregisters zeigen, daß bei Revisionspatienten speziell bei multiplen Revisionen immer häufiger Metall-Allergie zu finden war [15]. Sie wiesen allerdings auch darauf hin, daß gefundene Allergie nicht 100 % mit Versagensursache gleichzusetzen ist. So sind Ansätze zur Materialoptimierung ebenso wie ein besseres Erkennen von Komplikationsursachen angesichts der z.B. in den USA um etwa 13% jährlich zunehmenden Endoprothetikzahlen [16] eine große Herausforderung. Das Habilitationsprojekt konzentriert sich auf den Themenbereich Metallimplantatallergie. Im Folgenden sind die gestellten Fragen im Rahmen des Habilitationsprojektes aufgeführt sowie die dazu erfolgten Untersuchungen und daraus resultierenden eigenen Publikationen als Erst- bzw. Letztautor.

Frage 1: Wie können zukünftige Materialentwicklungen in der Endoprothetik in Bezug auf das allergene Potential getestet werden?

Hierzu wurde eine Studie konzipiert und durchgeführt, bei der die Metallionenfreisetzung aus Metallprüfkörpern (Metallplättchen aus Kobaltchrommolybdänlegierung (CoCrMo) sowie aus Edelstahl) untersucht wurde. Nun wurde einerseits gefragt, welches Ausmaß an in-vitro Metallionenfreisetzung stattfindet, wenn die CoCrMo-Scheibchen und Edelstahlscheibchen über zwei Tage in destilliertem Wasser, künstlichem Schweiß oder Zellkulturmedium aufbewahrt werden. Es zeigte sich, dass eine geringe Nickelfreisetzung aus Edelstahl erfolgte ($0,3 - 0,46 \mu\text{g}/\text{cm}^2/2$ Tagen) und ähnlich ausgeprägt auch aus Kobaltchrommolybdänscheiben. Andererseits ergab sich, dass speziell bei künstlichem Schweiß (herangezogen in Analogie zur Testvorgabe für die EU Direktive zur Nickelfreisetzung) reichlich Kobaltfreisetzung (bis $18,4 \mu\text{g}/\text{cm}^2/2$ Tage) aus den CoCrMo-Scheiben erkennbar war.

Eluent	Metallfreisetzung aus Edelstahl ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/2$ Tage)			Metallfreisetzung aus CoCrMo- Legierung ($\mu\text{g}/\text{cm}^2/2$ Tage)		
	Ni	Co	Cr	Ni	Co	Cr
Kulturmedium	$0,35 \pm 0,12$	n.d. ± 0	$0,06 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,07$	$13,20 \pm 0,14$	$1,10 \pm 0,01$
H ₂ O dist.	$0,46 \pm 0,03$	n.d. ± 0	$0,24 \pm 0,05$	n.d. ± 0	$16,90 \pm 0,54$	$0,52 \pm 0,02$
Künstlicher Schweiß	$0,30 \pm 0,04$	n.d. ± 0	$0,38 \pm 0,02$	n.d. ± 0	$18,94 \pm 0,75$	$1,36 \pm 0,11$

Tab. 1: Metallionenfreisetzung aus Edelstahl und CoCrMo-Plättchen in 3 verschiedenen Elutionsmedien (Zellkulturmedium, destilliertes Wasser, künstlicher Schweiß) über 2 Tage (entnommen aus [17]).

Parallel wurde auch ein klinisches Modell zur Wertung dieser Metallfreisetzung am Menschen etabliert und zwar die Testung mit entsprechenden Legierungsscheibchen am Rücken im Sinne des Epikutantests mit zweitägiger Applikation. Bei Patienten mit entsprechender Metallallergie konnte auf diese Weise gezeigt werden, dass 5 der 52 untersuchten Patienten eine mit der Metallallergie zusammenhängende Ekzemreaktion auf CoCrMo-Scheibchen aufwiesen, und diese 5 Patienten alle Kobaltallergiker waren. Zusätzlich wiesen 3 Patienten auch eine Nickel und Chromallergie auf (Abb. 1). Keine der Kontrollpersonen ohne Metallallergie hatte auf die unterschiedlichen Metallscheibchen reagiert.

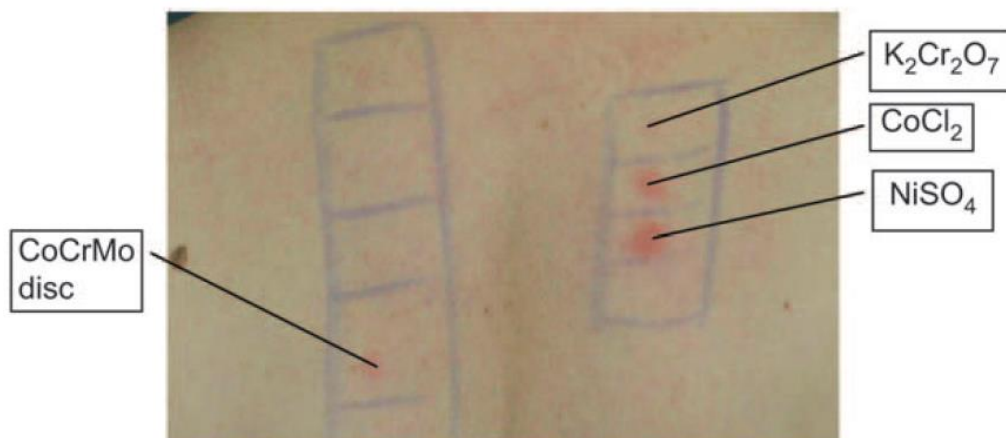


Abb. 1: Ekzemreaktion eines Patienten im Epikutantest auf Nickel (NiSO₄), Chrom (K₂Cr₂O₇), Kobalt (CoCl₂) sowie das CoCrMo-Plättchen (entnommen aus [17]).

Diese Versuche wurden 2007 publiziert in dem Artikel "Patch test reactivity to a cobalt-chromium-molybdenum alloy and stainless steel in metal-allergic patients in correlation to the metal ion release" [17].

In einem Folgeprojekt wurde hinterfragt, ob eine Oberflächenbeschichtung der Materialplättchen bei der Epikutantestung an entsprechenden metallallergischen Patienten eine Hautreaktion verhindern könnte – und zwar wegen fehlender bzw. deutlich reduzierter Metallionenfreisetzung. Es wurden 31 Patienten mit und 30 Patienten ohne Metallallergie gegenüber unbeschichteten/beschichteten Metallprüfkörpern aus Edelstahl und Kobaltchrommolybdän im Epikutantest geprüft und parallel dazu an die Voruntersuchung anknüpfend über Atomabsorptionsspektrometrie freigesetztes Nickel, Kobalt und Chrom in Abhängigkeit der Titanitrid/Zirkonitridoberflächenbeschichtung gemessen (Tab. 2). Es zeigte sich nicht nur die signifikante Reduktion der Metallionenfreisetzung sondern auch der entsprechende klinische Nutzen, da zwar 6 von den 31 metallallergischen Patienten auf unbeschichtete Testmaterialien-, aber keiner auf die beschichteten Plättchen reagiert hatte. Parallel waren in dieser Veröffentlichung auch Patienten beschrieben, bei denen im Rahmen einer Knieendoprothetik oberflächenbeschichtete Revisionsknieendoprothesen eingesetzt worden waren und bei vorab gesehener Metallallergie eine entsprechende Beschwerdefreiheit erreicht worden war. Diese Ergebnisse wurden 2016 publiziert [18].

Eluent	Nickel-Freisetzung (µg/cm ² /5d)			Kobalt-Freisetzung (µg/cm ² /5d)			Chrom-Freisetzung (µg/cm ² /5d)		
	Unbesch.	TiN	ZrN	Unbesch.	TiN	ZrN	Unbesch.	TiN	ZrN
Kulturmedium	1,46 ± 0,21	0,41 ± 0,04	0,34 ± 0,13	n.d.	n.d.	n.d.	0,65 ± 0,26	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,07
H ₂ O dist	3,28 ± 0,70	1,06 ± 0,03	1,03 ± 0,35	0,04 ± 0,08	n.d.	0,14 ± 0,26	0,08 ± 0,03	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,02
Künstl. Schweiss	2,35 ± 0,65	0,67 ± 0,02	0,69 ± 0,02	0,02 ± 0,16	n.d.	n.d.	1,22 ± 0,17	0,41 ± 0,01	0,41 ± 0,06

Tab. 2: Metallionenfreisetzung aus Edelstahl-Plättchen (unbeschichtet, bzw. mit TiN oder ZrN beschichtet) in 3 verschiedenen Elutionsmedien (Zellkulturmedium, destilliertes Wasser, künstlicher Schweiss) über 5 Tage (entnommen aus [18]).

In Anknüpfung daran wurde in Kooperation mit Biotribologie-Experten gezeigt, dass eine Multilayer-Beschichtung von CoCrMo-Knieendoprothetik zu einer signifikanten Reduktion von Abriebpartikeln und auch von Metallionenfreisetzung führte [19].

In Weiterentwicklung zu diesem Fragenkomplex wurden in einem Kooperationsprojekt klinische Parameter und auch Zytokinanalytik im peripheren Blut im Vergleich zwischen Patienten mit Standard-Kobaltchrommolybdän- versus oberflächenbeschichteter Endoprothetik durchgeführt. Diese kürzlich publizierte Arbeit zeigte, dass nicht nur die guten 5-Jahres-Überlebensraten der beschichteten Endoprothesen gleich den Überlebensraten der unbeschichteten Endoprothesen waren (98%) sondern auch im Blut der Patienten mit beschichteten Endoprothesen signifikant weniger proentzündliche Zytokine – speziell Interleukin 8 – zu messen waren. Dieser Unterschied war hoch signifikant (37 pg/ml versus 1,1 pg/ml) [20].

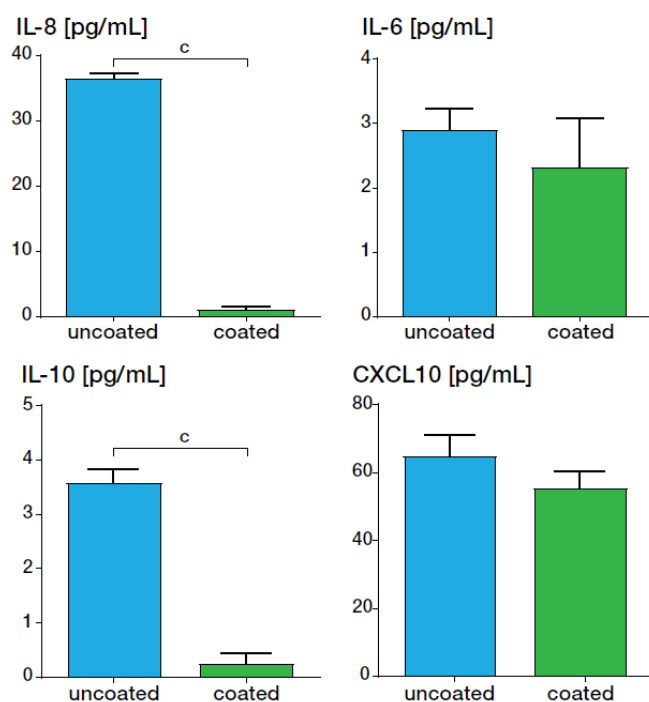


Abb. 2: Zytokingehalt im Serum bei Patienten mit beschichteter bzw. unbeschichteter Endoprothese 5 Jahre nach Operation. Die Bestimmung erfolgte mittels „Cytometric bead array“ (c: $p < 0,001$; entnommen aus [20])

Frage 2: Gibt es erhöhte Metallallergie- bzw. Knochenzement-allergieraten bei Patienten mit komplikationsbehafteten Endoprothesen im Vergleich zu gesunden Implantatträgern?

Es wurde bereits 2009 eine Datenanalyse zu Patienten aus der Implantatallergiesprechstunde an der Dermatologischen Klinik veröffentlicht. Dabei zeigte sich, dass meistens Komplikationen mit Osteosynthese und Gelenkersatz zur Ambulanzvorstellung geführt hatten und Hauptprobleme Schmerzen und Schwellung waren. Bei knapp 30% dieser Patienten wurde eine Metallallergie gefunden und bei knapp 25% eine Allergie gegenüber potentiellen Knochenzementkomponenten [21].

Basierend auf dieser ersten Untersuchung wurde die Frage gestellt, ob Patienten mit Verdacht auf Implantatallergie im Vergleich zu beschwerdefreien Endoprothesenträgern unterschiedliche Epikutantestreaktions-Häufigkeiten hätten und andere Reaktionsmuster im sogenannten Lymphozytentransformationstest (LTT) aufweisen würden. Es zeigte sich, dass bei einer konsekutiven Patientenreihe mit Implantatkomplikationen häufiger zusätzliche Zahnmaterialunverträglichkeit, höhere Raten bezüglich Atopie (Tab. 3) und kutaner Metallunverträglichkeit zusammen mit Metallallergie (Epikutantest) auftraten. Zusätzlich zeigte sich eine erhöhte LTT-Reaktivität gegenüber Metallen, speziell Nickel. In dieser vom Bayerischen Gesundheitsministerium geförderten Studie war auch ein möglicher weiterer Trend beobachtet worden, nämlich dass nur bei Beschwerdenpatienten mit zementierter Endoprothetik auch eine Gentamicinallergie auftrat (Tab. 4). Diese Daten sind in der Veröffentlichung aus dem Jahre 2013 „Charakteristika von 200 Patienten mit Verdacht auf Implantatallergie im Vergleich zu 100 beschwerdefreien Endoprothesenträgern“ zusammengefasst [22].

Tab. 3 Angaben über eigene („selbst“) atopische Erkrankungen (Heuschnupfen, allergisches Asthma und atopisches Ekzem; teils Mehrfachnennung) sowie anamnestische Metallunverträglichkeit

	Knieendoprothetik mit Beschwerden (n=187)		Beschwerdefreie Knieendoprothetik (n=47)	
	n	%	n	%
Atopie (selbst)	44	23,5	9	19,1
Heuschnupfen	34	18,2	5	10,6
Asthma	19	20,2	5	10,6
Neurodermitis	10	5,3 ^a	0	0
Kutane Metallunverträglichkeit	48	25,7	6	12,8
Sonstige Allergien	7	4,5	6	12,8

^ap<0,05, χ^2 -Test. *Atopie* Vorliegen einer der 3 atopischen Erkrankungen; *kutane Metallunverträglichkeit* Juckreiz, Rötung, Ekzem durch Modeschmuck, Jeansknopf, Metalluhrarmband.

Tab. 3: Häufigkeit atopischer Erkrankung sowie anamnestische Metallunverträglichkeit in Patienten mit komplikationsbehafteter bzw. komplikationsloser Knieendoprothetik (entnommen aus [22]).

Tab. 5 Kontaktallergieraten gegenüber 7 Knochenzementkomponenten^a

Substanz	Knieendoprothetik mit Beschwerden (n=187)		Beschwerdefreie Knieendoprothetik (n=47)	
Knochenzementkomponenten (getestet)	n	%	n	%
Reaktion auf Knochenzementsubstanzen insgesamt	24	14,7	3	10
Gentamicinsulfat	12	7,4	0	0
Benzoylperoxid	13	8	2	6,7
Hydrochinon	1	0,6	0	0
2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)	0	0	0	0
Kupfer-(II)-Sulfat	0	0	0	0
Methylmethacrylat	1	0,6	1	3,3
N, N-Dimethyl-p-Toluidin	0	0	0	0

^aAngegeben sind die positiven Reaktionen (hier nicht unterschieden in der Reaktionsstärke). Teils mehrfache Epikutantestreaktionen/Person.

Tab. 4: Kontaktallergieraten gegenüber Knochenzementkomponenten in Patienten mit komplikationsbehafteter bzw. komplikationsloser Knieendoprothetik (entnommen aus [22]).

In einer konsekutiven Datenauswertung von Patienten der Implantatsprechstunde war das Thema Knochenzementallergierate weiter aufgegriffen worden und es zeigte sich, dass innerhalb von 250 Patienten mit komplikationsbehafteter zementierter Endoprothetik 25, d.h. 10% eine Gentamicinallergie aufwiesen. Diese erhobenen Daten zeigten ein weiteres wichtiges Charakteristikum: Viele Kontaktallergien waren nicht in der Standardepikutantestablesung nach Tag 3 sondern deutlich vermehrt, teils sogar ausschließlich bei einer Spätablesung in der Folgeweche erkennbar. So waren beispielsweise 17 der 25 gefundenen Gentamicinallergiefälle nur über diese Spätablesung aufgedeckt worden. Diese Ergebnisse sind in der Publikation „High frequency of contact allergy to implant of contact allergy to implant and bone cement components, in particular gentamicin, in cemented arthroplasty with complications: usefulness of late patch test reading“ [23] zusammengefasst.

Allergen	Konzentration (%)	Vehikel	D3 (n)	D6 (n)	Zunahme (%)
Kaliumdichromat	0,5	pet.	2	4	50
Kobaltchlorid	1,0	pet.	4	5	20
Kolophonium	20	pet.	8	10	20
Epoxidharz	1,0	pet.	6	7	14,3
Nickelsulfat	5,0	pet.	21	32	34,4
Ylang Ylang	10	pet.	3	5	40
Gentamicin	20	pet.	8	25	68

Tab. 5: Allergene mit einer Zunahme an positiven Reaktionen bei zusätzlicher Ablesung an Tag 6 im Vergleich zur Ablesung an Tag 3 (entnommen aus [23]).

Frage 3: Welche Wertigkeit haben der Epikutantest, der LTT und die Histologie in der Diagnostik einer vermuteten Implantatallergie“?

Folgende drei interdisziplinär entstandenen Projektresultate bzw. Veröffentlichungen zeigen den Nutzen einer kombinierten Analytik.

Eine erste Untersuchung an 15 Patienten mit Knieendoprothetik zeigte, dass bei Vorliegen von Beschwerden und gefundener Metallallergie (im Vergleich zu Patienten ohne entsprechende Metallallergie) bei den ebenfalls erhaltenen Revisions-Histologieproben andere Zellinfiltratmuster, nämlich lymphozytär betonte Infiltrate ohne Infekthinweis zu sehen waren und bei der molekularen Zytokinanalytik über semiquantitative RT-PCR bei den metallallergischen Patienten speziell IL-8, IFN γ und IL-2 Expression zu sehen waren (Abb. 3). Nachdem bei 9 der 10 metallallergischen Patienten auch eine prä- und postoperative Befundscoreanalyse vorlag, konnte gezeigt werden, dass durch Versorgung mit Alternativmaterial (9x oberflächenbeschichtetes Implantat, 1x Oxinium basiertes Implantat) eine signifikante Beschwerdenreduktion erreicht werden konnte [24] (Abb. 4).

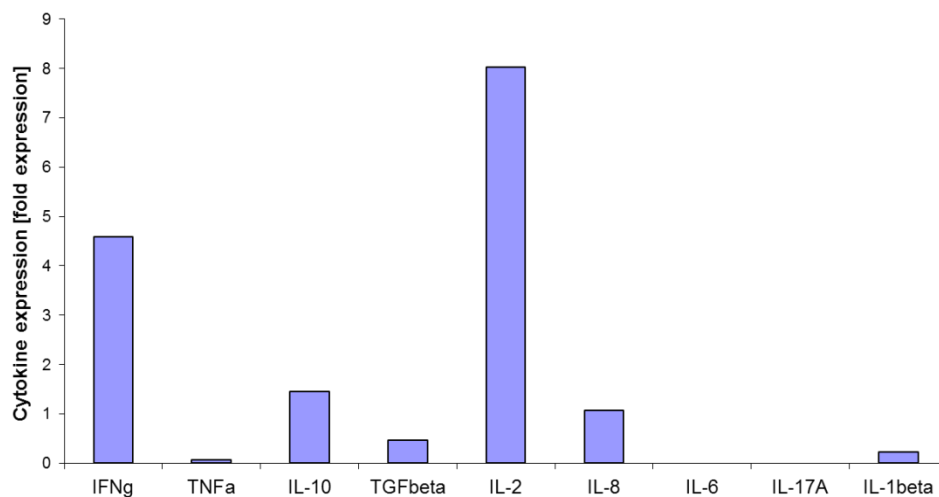
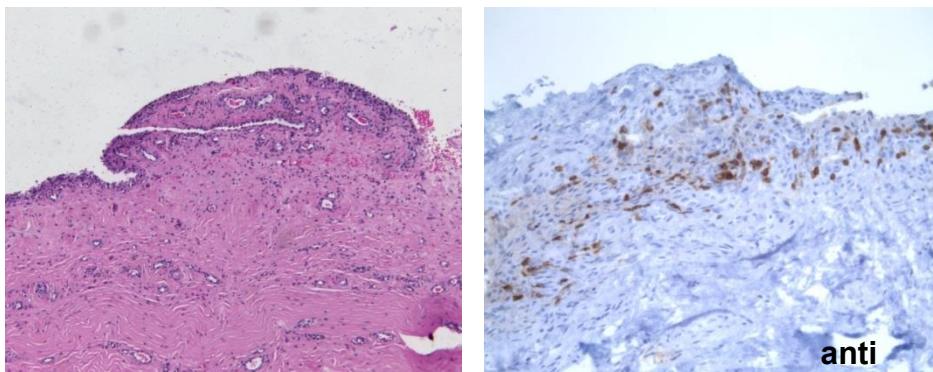


Abb. 3: Neosynovialitis mit ausgeprägter Fibrosierung (Typ 4-Reaktion vom Indifferenztyp und local disseminierten Lymphozyten (Patient mit Ni-, Co- and Cr-Allergie); Histologie und Zytokinexpression im Gewebe (entnommen aus [24]).

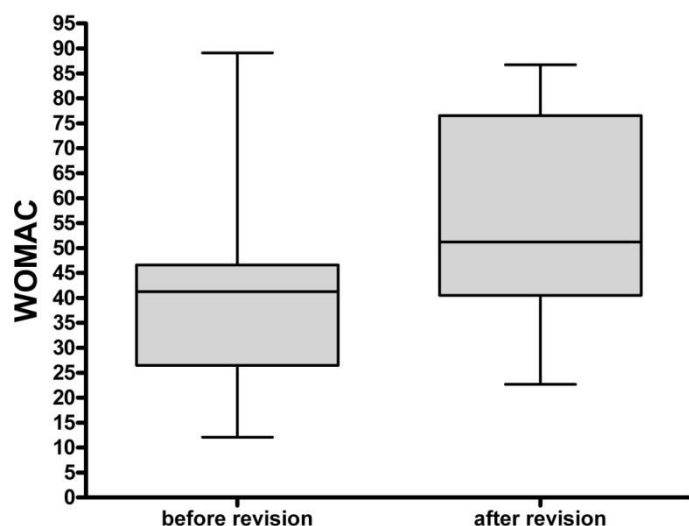


Abb. 4: Veränderung des WOMAC-Score nach Revision in 10 Metall-sensibilisierten Patienten (9x Oberflächenbeschichtetes Implantat, 1x Oxiniumbasiertes Implantat; entnommen aus [24]).

In Bezug auf kombinierte Analyseschritte wurde auch gefragt, welche Aussage über Nickelsensibilisierung im LTT und/oder Epikutantest gemacht werden kann. Anhand der 30 Patienten ohne und 38 Patienten mit kutaner Metallallergie zeigte sich einerseits, dass eine gute Korrelation zwischen Epikutantestresultat und LTT-Ergebnis in Bezug auf Nickelallergie sichtbar war – aber andererseits der selbst geäußerte Verdacht, es läge eine Nickelallergie vor nur bei etwa einem Drittel der Patienten über die genannten Methoden verifizierbar war. Nachdem Nickel-LTT-Reaktivität auch bei beschwerdefreien Endoprothesenträgern auftrat, wies diese Arbeit darauf hin, dass weitere Charakteristika zum Aufdecken einer Metallimplantatallergie zu identifizieren seien [25].

In einem Folgeprojekt wurde nun die Allergiediagnostik anhand von Epikutantest und LTT kombiniert mit der histopathologischen Untersuchung von periimplantärem bei Revision gewonnenen Gewebe, ergänzt durch molekulare Expressionsmuster bezüglich pro-entzündlicher Zytokine im Gewebe. Bei den 25 Patienten mit Knieendoprothetik-assoziierten Beschwerden fanden sich 20 Patienten mit Metallsensibilisierung (teils Epikutantest, teils LTT-Reaktivität gezeigt). Kontrollgewebeproben wurden von Revisionspatienten ohne Metallallergie sowie Osteoarthritis-Patienten vor Implantateinbringen und schließlich auch aus Epikutantestreaktionen gegenüber Metallen gewonnen. Mehrere neuartige Phänomene wurden beobachtet: So hatten viele der Beschwerdepatienten im periimplantären Gewebe einerseits häufig Fibrosierung („klinisch Arthrofibrose“), zeitgleich aber auch als eine bis dahin noch nicht beschriebene Patientenuntergruppe lymphozytäre Infiltrate im Gewebe. Bei der molekularen Analytik war wiederum häufig eine Interferon-Gamma Expression gefunden worden. Schließlich konnte auch hier über Nachverfolgung dieser Patienten gesehen werden, dass Revisionsoperationen mit beschichtetem/Oxinium-basierten Material zu deutlicher Beschwerdenbesserung führten [26].

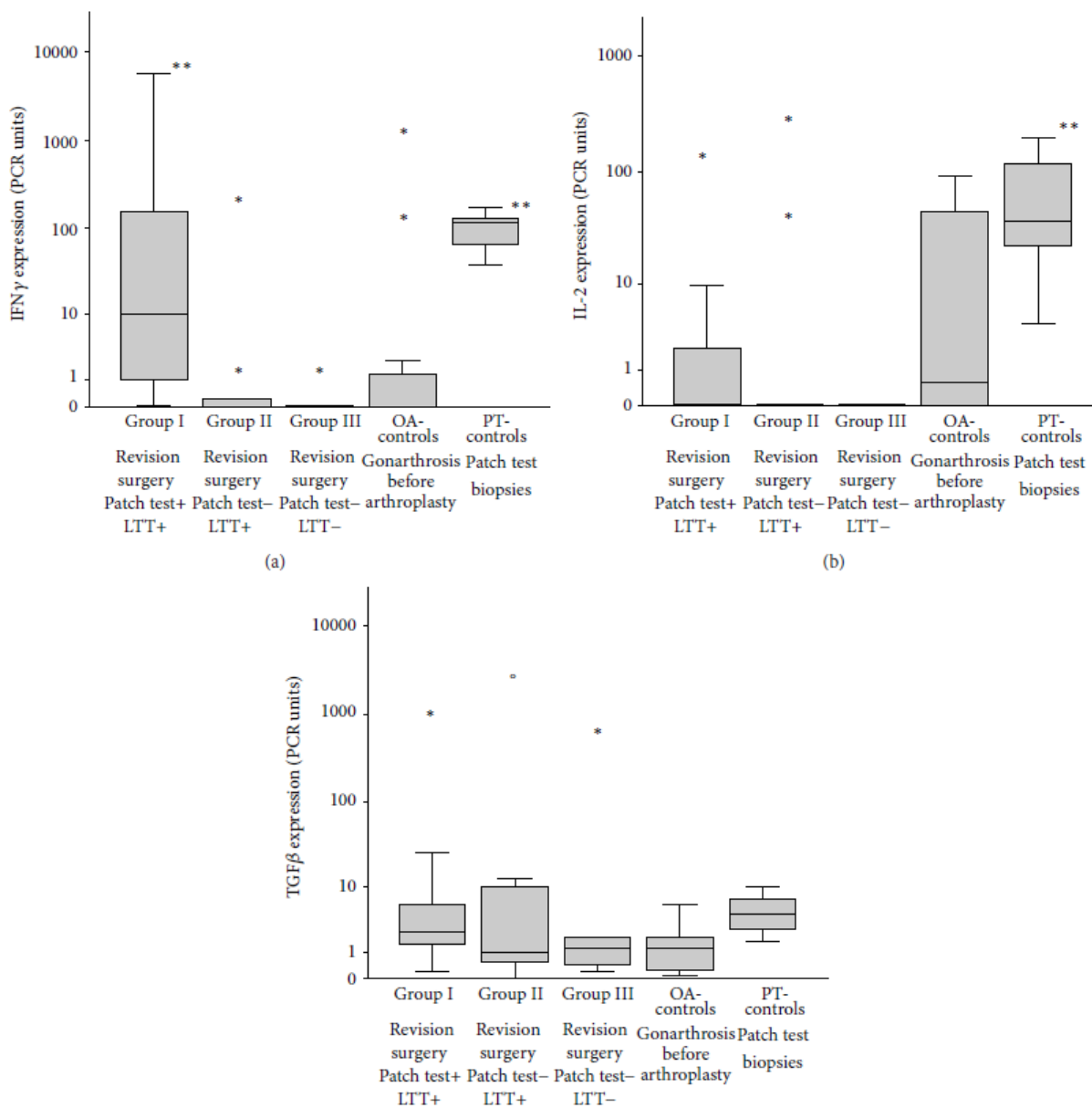


Abb. 5: Zytokinexpression (IFN γ , IL-2, TGF β) im Gewebe 5 verschiedener Patientengruppen.

Gruppe I: Patienten mit Revisionsoperation, Patch Test positiv, LTT positiv (n=11)

Gruppe II: Patienten mit Revisionsoperation, Patch test negativ, LTT positiv (n=9)

Gruppe III: Patienten mit Revisionsoperation, Patch Test negativ, LTT negativ (n=5)

OA-Kontrollen: Patienten mit Gonarthrose vor Knieendoprothese (n=12)

PT-Kontrollen: Positive Nickel Patch Test Biopsien (n=8)

Die Zytokinexpression wurde in Relation zum „Housekeeping-Gen“ EF-1 α angegeben und nach der $\Delta\Delta$ Ct-Methode ausgewertet; ** = p<0.005 (entnommen aus [26]).

Diese Ergebnisse führten direkt zu Frage 4 des Projektes.

Frage 4: Können spezielle Zytokinmuster auf Risikokonstellationen bei Implantatpatienten hinweisen?

Es hatten sich wie unter 3. beschrieben, bereits im periimplantären Gewebe Zytokinmuster im Sinne einer TH1-Lymphozytenantwort gezeigt, speziell waren dies eine IFN γ - und eine IL2-Expression.

Parallel dazu wurde der Frage nachgegangen, ob auch über aus dem peripheren Blut isolierte Lymphozyten und Monozyten (PBMC) präferentielle Lymphozytenreaktionsmuster gegenüber Metallen, speziell Nickel erkennbar würden. Bereits 2001 war anhand einer molekularen Analytik bezüglich T-Zellklonalität (also gerichteter, antigenspezifischer T-Zellvermehrung durch Stimulation) in vitro gezeigt worden, dass nickelallergische Individuen eine Lymphozyten-Antwort auf Nickel aufwiesen, die nicht zufällig, sondern oligoklonal gerichtet war. In der entsprechenden Publikation wurde darauf hingewiesen, dass neben Proliferationsanalytik (Abb. 6) auch die Analyse von T-Zellklonalität zur Diagnostik von Hypersensitivitätsreaktionen beitragen könnte (Tab. 6) [27].

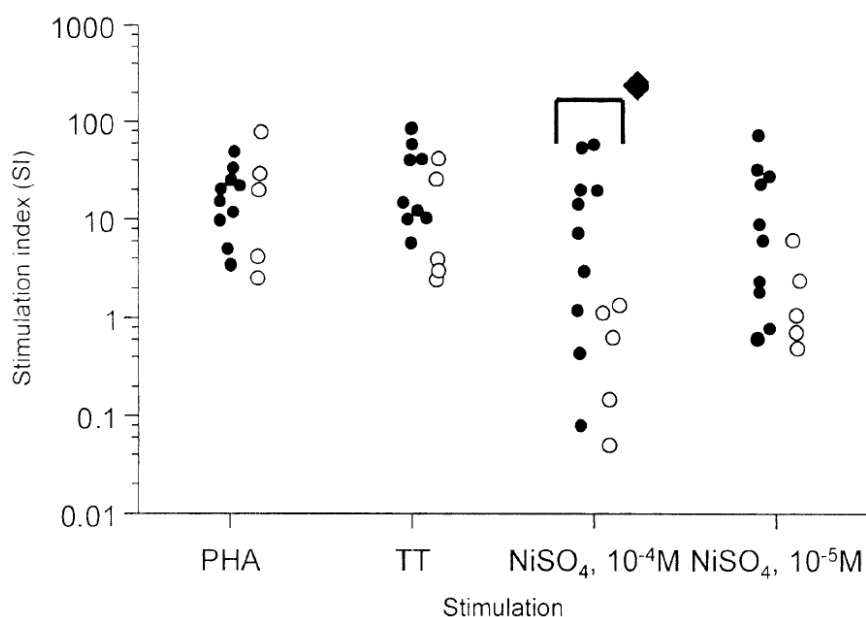


Abb. 6: Proliferationsantwort (Stimulation index) der PBMC 10 nickelallergischer (●) und 5 nichtallergischer Blutspender (○); PHA (Phytohämagglutinin), TT(Tetanus Toxoid); ♦: $p < 0.05$ (entnommen aus [27]).

Patient	Medium	PHA	TT	NiSO ₄ 10 ⁻⁴ M	NiSO ₄ 10 ⁻⁵ M	NiSO ₄ 10 ⁻⁶ M
1	-	-	V γ 11	-	-	V γ 2
2	-	-	V γ 11	V γ 10	-	-
3	-	-	V γ 11	V γ 10	V γ 10	-
4	-	-	V γ 9	V γ 9	V γ 9	-
5	-	-	V γ 11	V γ 2, V γ 11	-	V γ 10
6	V γ 9	V γ 9	V γ 9	V γ 9	V γ 9	V γ 9
7	-	-	-	V γ 10	-	V γ 11
8	-	-	V γ 11	V γ 10	V γ 10	-
9	-	-	-	-	-	-
10	-	-	V γ 9	V γ 2	V γ 2	V γ 2
11	-	-	V γ 11	-	V γ 11	V γ 11
12	-	-	V γ 9	V γ 2, V γ 9	V γ 9	V γ 9
13	-	-	V γ 9	-	-	V γ 10
14	V γ 10	V γ 2	V γ 10	V γ 2	-	V γ 11
15	-	-	-	V γ 11	V γ 10	V γ 9

Tab. 6: Präferentielle Expression von TZR γ -Familien in PBMC nickelallergischer Blutspender (Nummer 1-10) und Blutspender ohne Nickelallergie (Nummer 11-15) nach Kultur mit Medium alleine oder unter Zusatz von PHA (Phytohämagglutinin), TT (Tetanus Toxoid) oder NiSO₄ (Nickelsulfat); entnommen aus [27].

Anschließende Untersuchungen sollten zeigen, ob bei nickelallergischen Patienten mit Implantatkomplikationen möglicherweise auch anhand der In-vitro-Reaktivität ihrer Blutlymphozyten bestimmte Zytokinmuster erkennbar würden. Anhand von 15 nickelallergischen Patienten und 5 nicht allergischen Patienten konnte über den kombinierten Ansatz von Poliferationsanalytik, Messung freigesetzter Zytokine und RT-PCR gezeigt werden, dass die Patienten mit Implantat-assoziierten Beschwerden und Nickelallergie eine präferentielle IL-17-Expression nach Nickelstimulation zeigten (Abb. 7) [28].

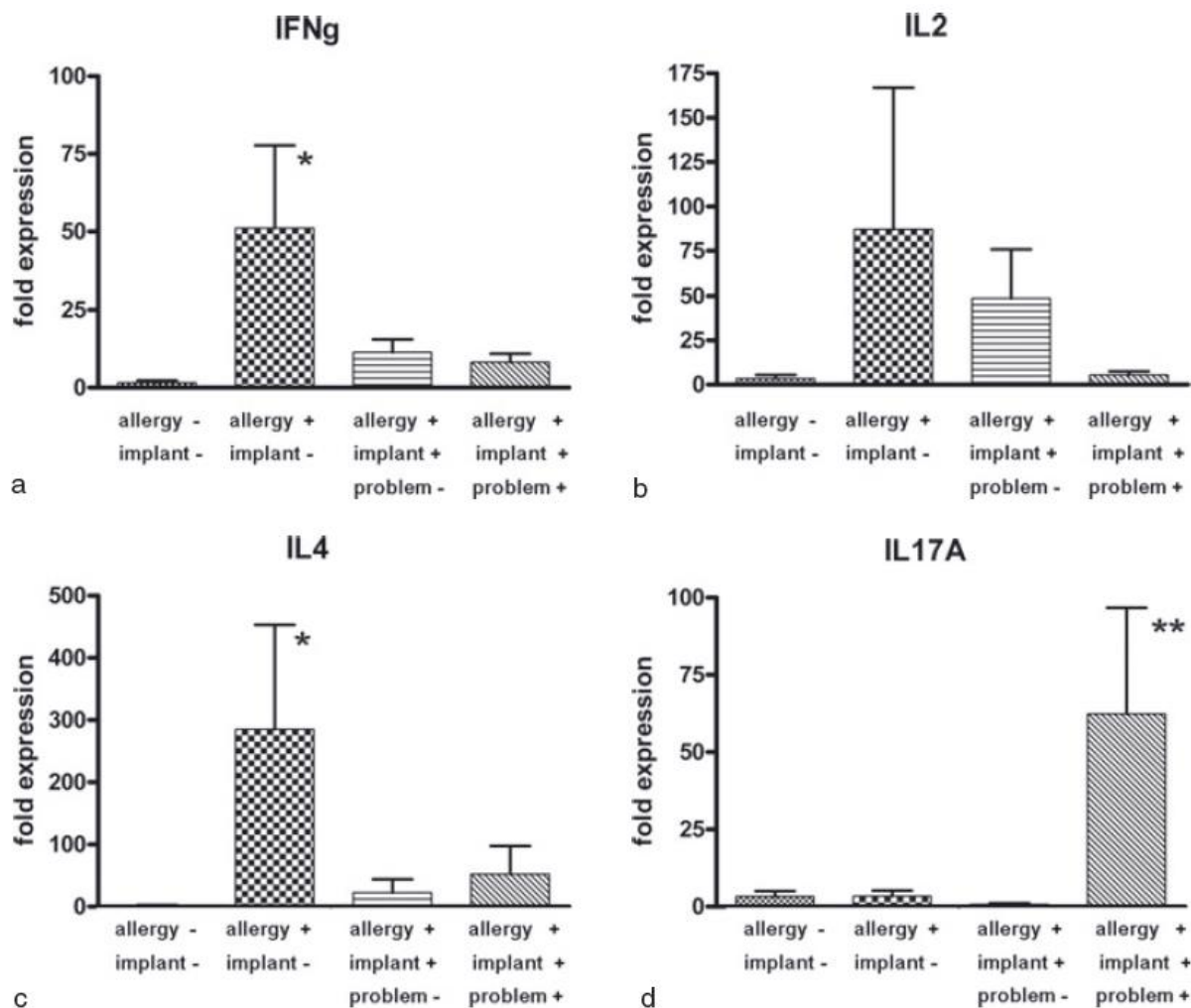


Abb. 7: Expression von (a) IFN γ , (b) IL-2, (c) IL-4 und (d) IL-17 in PBMC der vier verschiedenen Patientengruppen nach einer 6-Tage *in-vitro* stimulation mit NiSO $_4$ 10 $^{-4}$ M. Die Bestimmung erfolgte mittels Realtime-RT-PCR. Die Expression ist angegeben im Vergleich zu den unstimulierten Zellen, normalisiert auf das „House-keeping“-Gen RPL13A (*= p<0,05; **=p<0,01; entnommen aus [28]).

Frage 5: Kann der LTT als In-vitro-Test evaluiert bzw. auch erweitert werden, um den Nachweis einer möglichen Implantatallergie zu verbessern?

Anhand einer Untersuchung zu Patienten mit beschwerdefreien Titanzahnimplantaten im Vergleich zu Implantat-freien Personen wurde erstmals gezeigt, dass a) die Blutlymphozyten und Monozyten inter-individuell unterschiedliche Zytokinfreisetzung gegenüber Titanpartikeln in vitro haben, und b) beschwerdefreie Patienten hier sogar weniger IL1- β freisetzen (Tab. 7) und parallel dazu immunmodulierendes bzw. entzündungsdämpfendes IL-10 produzieren (Abb. 8). Bei dieser an insgesamt 20 Personen durchgeführten Untersuchung ergab sich damit auch ein neuer Untersuchungsaspekt, nämlich die Frage nach möglichen Toleranzmechanismen [29].

	Individuals with titanium dental implants (n=6)		Individuals without titanium dental implants (n=14)	
	Mean (pg/mL)	\pm	Mean (pg/mL)	\pm
IL-1 β	9,04	16,87	23,39	65,47
IL-6	688,33	1566,10	1909,8	4958,15
IL-10	4,18	2,98	0	0
TNF α	1,02	1,93	1,75	4,52

Tab. 7: Spontane Zytokinproduktion der PBMC der 20 Individuen. Die Zytokinfreisetzung wurde nach 6 Tagen in Mediumkultur ohne Stimulus im Überstand gemessen (entnommen aus [29]).

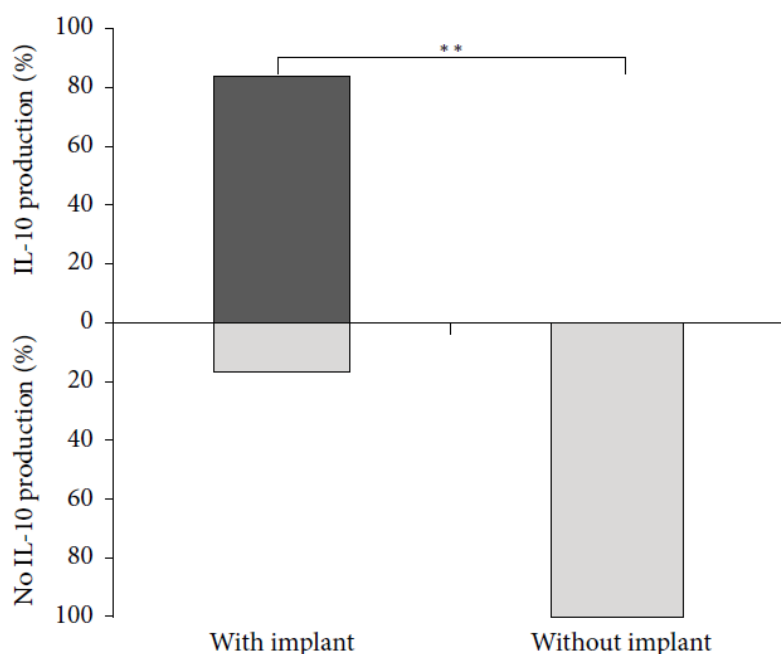


Abb. 8: Die Häufigkeit (%) der spontanen IL-10-Produktion der PBMC der Blutspender (6 mit, 14 ohne dentale Titanimplantate) im Überstand nach 6-Tageskultur mit Medium alleine (entnommen aus [29]).

Der Lymphozytentransformationstest (LTT) zur Beurteilung einer Metallsensibilisierung wurde in einem Leitthemenartikel kritisch diskutiert und es wurde auf die fehlende Standardisierung bzw. unterschiedliche Methodik der Forschungslabore hingewiesen [30].

Folgerichtig wurde an einem großen Kollektiv (50 nickelallergische versus 50 nicht allergische Personen) die Epikutantestreaktivität der LTT-Reaktivität nach Optimierung der Stimulationsbedingungen gegenübergestellt. In dieser Evaluierung konnte eine Sensitivität von 88% sowie eine Spezifität von 96% erreicht werden (Abb. 9) [31]. Ebenso zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der Höhe des Stimulationsindex im LTT und der Stärke der Epikutantest-Reaktion (Abb. 10).

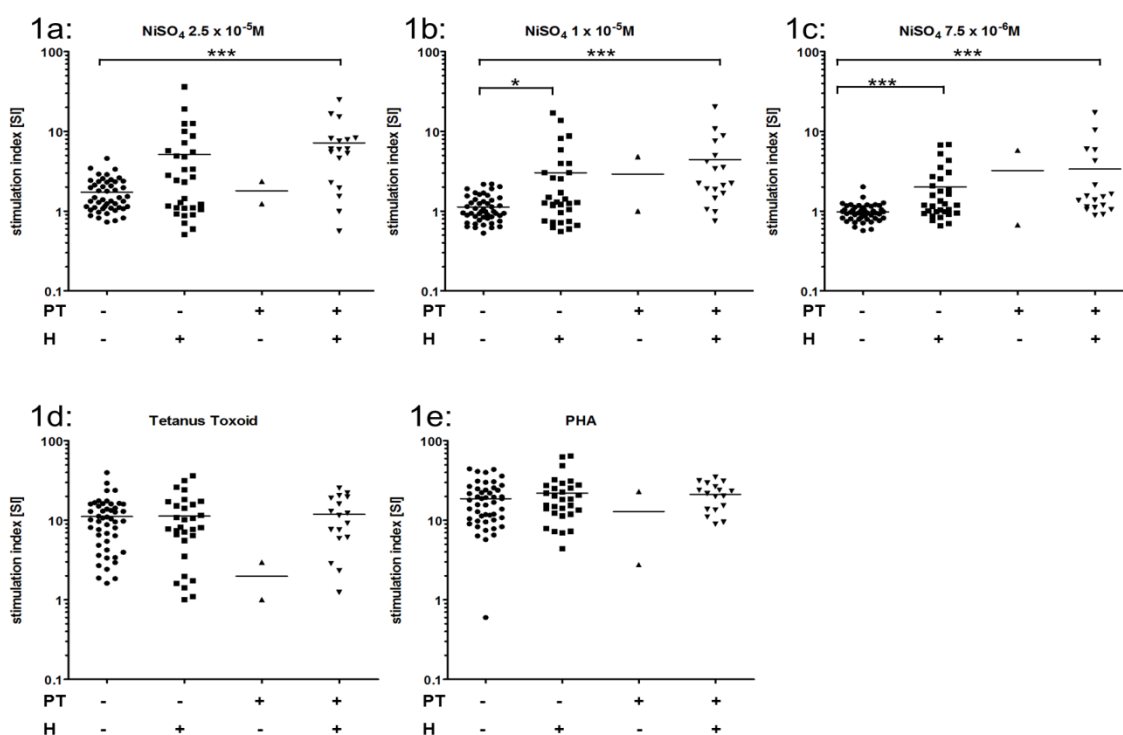


Abb. 9: Proliferationsantwort der PBMC von „Patch Test“- (PT) und/oder LTT-positiven bzw. negativen Blutspendern nach Stimulation mit NiSO₄ sowie dem Kontrollantigen Tetanus Toxoid und dem T-Zell-Mitogen PHA. ***p < 0,001; H= „History“ (d.h. Anamnese); (entnommen aus [31]).

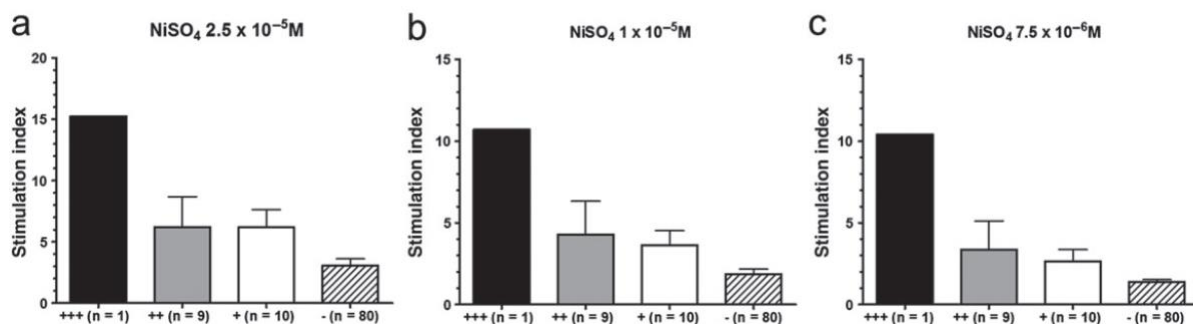


Abb. 10: Reaktivität im LTT gegenüber den 3 Nickelkonzentrationen bei Blutproben (PBMC) von „Patch Test“ positiven und „Patch Test“ negativen Blutspendern (entnommen aus [31]).

Als aktuellste Optimierungsuntersuchung wurde das Verhältnis zwischen IL-5 und IL-8 Produktion in vitro als gute Trenngröße zwischen Allergie vermittelter und unspezifischer Nickelreaktivität in vitro im Vergleich zwischen 15 Blutspendern mit positivem Nicketepikutantest und 15 nicht allergischen Patienten gezeigt (Abb. 11). Auch diese Beobachtung wurde erstmals in dieser Form veröffentlicht [32].

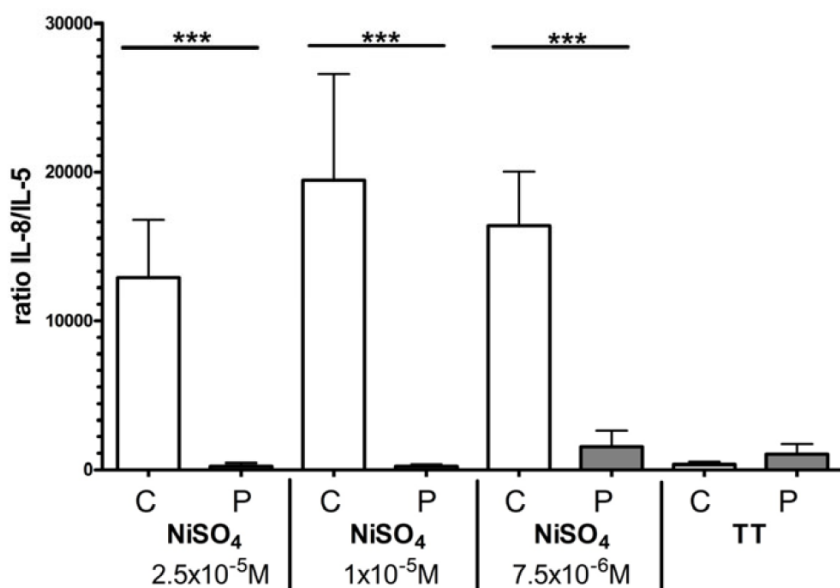


Abb. 11: IL-5/IL-8 Ratio der PBMC von 15 nichtallergischen Kontrollpersonen (C) und 15 nickelallergischen Personen (P) nach Nickel-(NiSO₄)- bzw. Tetanus Toxoid (TT)-Stimulation (***)p<0,001; entnommen aus [32]).

Zusammenfassung

Aufgrund der langjährigen, konsequenten Bearbeitung des Themenbereiches „Metallimplantatallergie“ über klinische und in-vitro-Ansätze wurden neue diagnostische Verfahren und Entwicklungen in diesem Themenbereich etabliert. Dieser Fortschritt zeigt sich auch bei dem Vergleich der Übersichtsarbeit „Allergische Reaktionen auf Metallimplantate“ von 2004 [33] mit dem ausführlichen Übersichtsartikel „Diagnosis and management of patients with allergy to metal implants“ [34]. In diesem Zeitraum ist nicht nur eine Fülle an Fallberichten zu Implantatallergie erschienen, sondern es wurden auch Algorithmen zur Abklärung beschrieben [11, 35] und Patienten mit Beschwerdefreiheit nach Wechseloperation mit „hypoallergenen“ Implantaten [36]. Auch wenn im Epikutantest gefundene Allergie gegen Implantatkomponenten nicht zu den Hauptursachen für Implantatversagen gehört [37], so darf diese – wie auch Allergie gegen Knochenzementkomponenten - nicht übersehen werden. Bei letzteren hat die Auswertung unserer großen Patientenzahlen beispielhaft die Rolle von Gentamicinallergie aufgedeckt [23]. Daß der LTT als wissenschaftlicher Ansatz zur Aufdeckung einer Spättypsensibilisierung sinnvoll ist, hat die Arbeitsgruppe um Prof. Pichler in Bern dargestellt [38]. Wir haben uns der Aufgabe gestellt, bzgl. Metallsensibilisierung – speziell Nickel - nicht nur eine LTT-Evaluierung (wie von Pacheco et al. [39]) an einem großen Patientengut durchzuführen [31], sondern auch die oben beschriebenen Zytokinprofile als Reaktionsmuster in vitro zu charakterisieren. So wurde beispielsweise das von uns schon 2010 beschriebene präferentielle IL-17-Typ Reaktionsmuster bei Implantatkomplikationen [28] kürzlich in der weiterführenden Arbeit von Hallab et al. [40] bestätigt. Die Sammlung klinischer Daten zusammen mit der Verbesserung und Etablierung neuer Testmethoden trägt wesentlich zu neuen Erkenntnissen in Bezug auf Metallimplantatverträglichkeit bei. Über ein derzeit noch laufendes Projekt wird in Zusammenarbeit mit Zentren in 6 europäischen Ländern durch Förderung der europäischen Dermatologie-Akademie („EADV“) eine noch bessere Datenlage entstehen. Dies ist umso bedeutender als Metallexposition des Körpers und Langzeiterfolg von Implantaten im Körper ständig wichtiger werden [41].

Literatur:

1. Wessinghage D. [*Themistocles Gluck. 100 years artificial joint replacement*]. Z Orthop Ihre Grenzgeb, 1991. **129**(5): p. 383-8.
2. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. *The operation of the century: total hip replacement*. Lancet, 2007. **370**(9597): p. 1508-19.
3. Wengler A, Nimptsch U, Mansky T. *Hip and knee replacement in Germany and the USA - analysis of individual inpatient data from German and US hospitals for the years 2005 to 2011*. Ärzteblatt Int, 2014. **111**(23-24): p. 9.
4. Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry A.O.A.N.J.R. *Annual Report*. 2012.

5. Hartmann A, Hannemann F, Lutzner J, Seidler A, Drexler H, Gunther KP, Schmitt J. *Metal ion concentrations in body fluids after implantation of hip replacements with metal-on-metal bearing--systematic review of clinical and epidemiological studies.* PLoS One, 2013. **8**(8): p. e70359.
6. Cooper HJ, Della Valle CJ, Berger RA, Tetreault M, Paprosky WG, Sporer SM, Jacobs JJ. *Corrosion at the head-neck taper as a cause for adverse local tissue reactions after total hip arthroplasty.* J Bone Joint Surg Am, 2012. **94**(18): p. 1655-61.
7. Krenn V, Otto M, Morawietz L, Hopf T, Jakobs M, Klauser W, Schwantes B, Gehrke T, [Histopathologic diagnostics in endoprosthetics: periprosthetic neosynovialitis, hypersensitivity reaction, and arthrofibrosis]. Orthopäde, 2009. **38**(6): p. 520-30.
8. Rostoker G, Robin J, Binet O, Blamoutier J, Paupe J, Lessana-Leibowitch M, Bedouelle J, Sonneck JM, Garrel JB, Millet P. *Dermatitis due to orthopaedic implants. A review of the literature and report of three cases.* J Bone Joint Surg Am, 1987. **69**(9): p. 1408-12.
9. Kubba R, Taylor JS, Marks KE. *Cutaneous complications of orthopedic implants. A two-year prospective study.* Arch Dermatol, 1981. **117**(9): p. 554-60.
10. Thyssen JP, Johansen JD, Menne T, Liden C, Bruze M, White, IR. *Hypersensitivity reactions from metallic implants: a future challenge that needs to be addressed.* Br J Dermatol, 2010. **162**(2): p. 235-6.
11. Schalock PC, Menne T, Johansen JD, Taylor JS, Maibach HI, Liden C, Bruze M, Thyssen JP. *Hypersensitivity reactions to metallic implants - diagnostic algorithm and suggested patch test series for clinical use.* Contact Dermatitis, 2012. **66**(1): p. 4-19.
12. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Koster G, Lohmann CH. *Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study.* J Bone Joint Surg.Am., 2005. **87**(1): p. 28-36.
13. Langton DJ, Sidaginamale RP, Joyce TJ, Natu S, Blain P, Jefferson RD, Rushton S, Nargol AV. *The clinical implications of elevated blood metal ion concentrations in asymptomatic patients with MoM hip resurfacings: a cohort study.* BMJ Open, 2013. **3**(3).
14. Kwon YM, Thomas P, **Summer B**, Pandit H, Taylor A, Beard D, Murray DW, Gill HS. *Lymphocyte proliferation responses in patients with pseudotumors following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty.* J Orthop Res, 2010. **28**(4): p. 444-50.
15. Munch HJ, Jacobsen SS, Olesen JT, Menne T, Soballe K, Johansen JD, Thyssen JP. *The association between metal allergy, total knee arthroplasty, and revision: study based on the Danish Knee Arthroplasty Register.* Acta Orthop, 2015. **86**(3): p. 378-83.
16. Kurtz SM, Lau E, Ong K, Zhao K, Kelly M, Bozic KJ. *Future young patient demand for primary and revision joint replacement: national projections from 2010 to 2030.* Clin Orthop Relat Res, 2009. **467**(10): p. 2606-12.
17. **Summer B**, Fink U, Zeller R, Rueff F, Maier S, Roider G, Thomas P. *Patch test reactivity to a cobalt-chromium-molybdenum alloy and stainless steel in metal-*

- allergic patients in correlation to the metal ion release. Contact Dermatitis, 2007. 57(1): p. 35-9.*
18. Thomas P, Weik T, Roider G, **Summer B**, Thomsen M. *Influence of Surface Coating on Metal Ion Release: Evaluation in Patients With Metal Allergy. Orthopedics, 2016. 39(3 Suppl): p. S24-30.*
 19. Puente Reyna AL, Fritz B, Schwiesau J, Schilling C, **Summer B**, Thomas P, Grupp TM. *Metal ion release barrier function and biotribological evaluation of a zirconium nitride multilayer coated knee implant under highly demanding activities wear simulation. J Biomech, 2018. 79: p. 88-96.*
 20. Thomas P, Hisgen P, Kiefer H, Schmerwitz U, Ottersbach A, Albrecht D, **Summer B**, Schinkel C. *Blood cytokine pattern and clinical outcome in knee arthroplasty patients: comparative analysis 5 years after standard versus "hypoallergenic" surface coated prosthesis implantation. Acta Orthop, 2018. 89(6): p. 646-651.*
 21. Eben R, Walk R, **Summer B**, Maier S, Thomsen M, Thomas P. *[Implant allergy register--a first report]. Orthopäde, 2009. 38(6): p. 557-562.*
 22. Thomas P, Stauner K, Schraml A, Mahler V, Banke IJ, Gollwitzer H, Burgkart R, Prodinge PM, Schneider S, Pritschet M, Mazoochian F, Schopf C, Steinmann A, **Summer B**. *[Characteristics of 200 patients with suspected implant allergy compared to 100 symptom-free arthroplasty patients]. Orthopäde, 2013. 42(8): p. 607-13.*
 23. Thomas B, Kulichova D, Wolf R, **Summer B**, Mahler V, Thomas P. *High frequency of contact allergy to implant and bone cement components, in particular gentamicin, in cemented arthroplasty with complications: usefulness of late patch test reading. Contact Dermatitis, 2015. in press.*
 24. Thomas P, von der Helm C, Schopf C, Thomsen M, Frommelt L, Schneider J, Flaig M, Krenn V, Mazoochian F, **Summer B**. *Periimplant histology and cytokine pattern in Metal-allergic Knee arthroplasty patients with improvement after revision with hypoallergenic materials. Sem Arthroplasty, 2012. 23(4): p. 268-272.*
 25. Thomas P, Ständer S, Stauner K, Schraml A, Banke IJ, Gollwitzer H, Burgkart R, Prodinge PM, Schneider S, Pritschet M, Mazoochian F, Schopf C, **Summer B**. *Arthroplasty patients and nickel sensitization: What do patch test and lymphocyte transformation test tell us. Sem Arthroplasty, 2013. 24(4): p. 261-264.*
 26. Thomas P, von der Helm C, Schopf C, Mazoochian F, Frommelt L, Gollwitzer H, Schneider J, Flaig M, Krenn V, Thomas B, **Summer B**. *Patients with intolerance reactions to total knee replacement: combined assessment of allergy diagnostics, periprosthetic histology, and peri-implant cytokine expression pattern. Biomed Res Int, 2015. 2015: p. 910156.*
 27. **Summer B**, Sander CA, Przybilla B, Thomas P. *Molecular analysis of T-cell clonality with concomitant specific T-cell proliferation in vitro in nickel-allergic individuals. Allergy, 2001. 56(8): p. 767-770.*
 28. **Summer B**, Paul C, Mazoochian F, Rau C, Thomsen M, Banke I, Gollwitzer H, Dietrich KA, Mayer-Wagner S, Ruzicka T, Thomas, P. *Nickel (Ni) allergic patients with complications to Ni containing joint replacement show preferential IL-17 type reactivity to Ni. Contact Dermatitis, 2010. 63(1): p. 15-22.*

29. Thomas P, Iglhaut G, Wollenberg A, Cadosch D, **Summer B**. *Allergy or tolerance: reduced inflammatory cytokine response and concomitant IL-10 production of lymphocytes and monocytes in symptom-free titanium dental implant patients*. Biomed Res Int, 2013. **2013**: p. 539834.
30. **Summer B**, Ständer S, Kapp F, Thomas P. *[Role of the lymphocyte transformation test in the evaluation of metal sensitization]*. Hautarzt, 2016. **67**(5): p. 380-4.
31. Ständer S, Oppel E, Thomas P, **Summer B**. *Evaluation of lymphocyte transformation tests as compared with patch tests in nickel allergy diagnosis*. Contact Dermatitis, 2017. **76**(4):228-234.
32. **Summer B**, Ständer S, Thomas P. *Cytokine patterns in vitro, in particular IL-5/IL-8 ratio, to detect patients with nickel contact allergy*. J Eur Acad Dermatol Venereol, 2018. **32**(9):1542-1548.
33. Thomas P, Maier S, **Summer B**. *Allergische Reaktionen auf Metallimplantate*. Materialwissenschaft und Werkstofftechnik, 2004. **35**(12): p. 3.
34. Thomas P, **Summer B**. *Diagnosis and management of patients with allergy to metal implants*. Expert Rev Clin Immunol, 2015. **11**(4): p. 501-9.
35. Thyssen JP, Menne T, Schalock PC, Taylor JS, Maibach HI. *Pragmatic approach to the clinical work-up of patients with putative allergic disease to metallic orthopaedic implants before and after surgery*. Br J Dermatol, 2011. **164**(3): p. 473-8.
36. Thomsen M, Rozak M, Thomas P. *Pain in a chromium-allergic patient with total knee arthroplasty: disappearance of symptoms after revision with a special surface-coated TKA--a case report*. Acta Orthop, 2011. **82**(3): p. 386-8.
37. Furrer S, Scherer Hofmeier K, Grize L, Bircher AJ. *Metal hypersensitivity in patients with orthopaedic implant complications--A retrospective clinical study*. Contact Dermatitis, 2018.
38. Pichler WJ, Tilch J. *The lymphocyte transformation test in the diagnosis of drug hypersensitivity*. Allergy, 2004. **59**(8): p. 809-20.
39. Pacheco K, Barker L, Maier L, Erb S, Sills M, Knight, V. *Development of a validated blood test for nickel sensitization*. J Allergy Clin Immunol, 2013. **132**(3): p. 767-9.
40. Hallab NJ, Jacobs JJ. *Chemokines Associated with Pathologic Responses to Orthopedic Implant Debris*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 5.
41. *From Dermatitis to Implant and Device Failure*, ed. K.J. Chen and J.P. Thyssen. 2018: Springer International Publishing.