

**Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München**

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. T. Ruzicka

**Charakteristika von Allergiediagnostik und histologisch-
molekularer Analyse des periimplantären Gewebes bei
Patienten mit Knieendoprothesenunverträglichkeit**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanmedizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christine Anna Maria von der Helm

aus

München

Jahr

2015

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Thomas

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Müller
Priv. Doz. Dr. med. Robert Stahl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. rer. hum. biol. B. Summer

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard HICKEL

Tag der mündlichen Prüfung: 03.12.2015

1	Einleitung	6
1.1	Allergiedefinition	6
1.2	Allergisches Kontaktekzem	7
1.2.1	Morphologie des allergischen Kontaktekzems.....	7
1.2.2	Histologie des allergisches Kontaktekzems.....	7
1.2.3	Diagnostik des allergischen Kontaktekzems.....	8
1.2.4	Immunmechanismen des allergischen Kontaktekzems	9
1.2.5	Epidemiologie des allergischen Kontaktekzems auf Nickel.....	13
1.3	Implantatunverträglichkeit und Metallallergien	15
1.3.1	Knieendoprothesen-Materialien.....	15
1.3.2	Komplikationen bei Knieendoprothesen.....	16
1.3.3	Histologische Veränderung bei Implantatversagen	17
1.3.4	Morphologie der Periimplantatmembran.....	19
2	Zielsetzung	23
3	Material und Methoden.....	25
3.1	Untersuchungsmaterial und Patienten im Überblick	25
3.2	Patienten und Versuchsablauf.....	25
3.2.1	Allgemeine Patientencharakteristika	26
3.2.2	Versuchsablauf im Überblick.....	27
3.3	Fragebogen WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index)	28
3.4	Fragebogen zur Metallverträglichkeit	29
3.5	Allergologische Diagnostik der Patientenkollektive	29
3.5.1	Epikutantest (ECT)	30
3.5.2	Lymphozytentransformationstest (LTT)	30
3.6	Histologische Untersuchung.....	32
3.7	Zytokinanalyse.....	34
3.7.1	Übersicht	34
3.7.2	RNA-Isolierung	35
3.7.3	Konzentrationsbestimmung der RNA.....	36
3.7.4	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	36

3.7.5	Quantitative PCR (qPCR)	37
3.7.6	Relative Quantifizierung.....	38
3.8	Statistische Auswertung	41
4	Ergebnisse	42
4.1	Fragebogen-Ergebnisse	42
4.1.1	Beschwerdebild der Patientengruppen und des Kontrollkollektivs	42
4.1.2	WOMAC-Ergebnisse	43
4.2	Bakteriologische Untersuchung.....	51
4.3	Histologische Untersuchung.....	51
4.4	Zytokinexpressionswerte der Studienkollektive.....	55
4.4.1	Übersicht	55
4.4.2	Zytokinwerte nach Studienkollektiven getrennt	57
4.4.3	Vergleich der Studienkollektive.....	60
4.5	Gegenüberstellung Histologie und Zytokinprofile und ausgewählte Fallbeispiele.....	66
4.5.1	Übersicht	66
4.5.2	CD3-Infiltrat und Zytokinexpression.....	70
4.5.3	Fallbeispiele CD3-Infiltrat und Zytokinexpression.....	73
5	Diskussion	76
5.1	Diskussion der Methoden.....	77
5.2	Diskussion der Ergebnisse	79
5.2.1	Histologische Untersuchung der Studienkollektive.....	79
5.2.2	Vergleich der Zytokinexpressionsraten der Studienkollektive	82
5.2.3	Auswirkung einer Revisionsoperation mit hypoallergenem Material auf das Patientenempfinden	87
5.3	Ausblick.....	87
6	Zusammenfassung	89
7	Anhang	91
7.1	Ausgewählte Zytokine und deren Funktion bei Kontaktallergien	91
7.2	Fragebogen „WOMAC-Score“ und „Metallverträglichkeit“	93
7.3	Verwendete Materialien der Zytokinanalyse	98

Inhaltsverzeichnis

7.4	Histologische Färbemethoden.....	100
7.5	Abkürzungsverzeichnis	102
8	Literaturverzeichnis.....	103
9	Danksagung.....	109

1 Einleitung

Der Begriff Allergie ist weitverbreitet und wird laienhaft teils für Unverträglichkeiten jeglicher Art verwendet. So werden Komplikationen nach Implantation von Endoprothesen oft von Patienten als „Allergie“ bezeichnet. Doch gibt es wirklich eine Allergie auf Endoprothesenmaterialien?

1.1 *Allergiedefinition*

„Wir brauchen ein neues, allgemeines, nicht präjudizierendes Wort für die Zustandsänderung, die der Organismus durch die Bekanntschaft mit irgendeinem organischen, lebenden oder leblosen Gifte erfährt. Der Geimpfte verhält sich [...] anders, als ein Individuum, welches mit dem betreffenden Agens noch nicht in Berührung gekommen ist; er ist deswegen noch weit entfernt, unempfindlich zu sein. Alles was wir von ihm sagen können, ist, dass seine Reaktionsfähigkeit geändert ist. Für diesen allgemeinen Begriff der veränderten Reaktionsfähigkeit schlage ich den Ausdruck Allergie vor.“[1]

Mit diesen Worten führte Clemens Peter Freiherr von Pirquet 1906 den Begriff Allergie in die medizinische Fachwelt ein.

Das Wort Allergie setzt sich aus dem griechischen Worten „allos“ für fremd und „ergon“ für Reaktion zusammen. „Allergie“ sollte die veränderte Reaktion eines Organismus beschreiben, der mit einem bestimmten Stoff bereits in Berührung gekommen war. In diesem Sinne verstand Pirquet den Begriff „allos“ als „die Abweichung von der ursprünglichen Verfassung, von dem Verhalten des Normalen“[1]. Er wollte mit seinem neu geschaffenen Begriff verständlich machen, dass der Organismus bei der Abwehr eines Stoffes durch seine eigene Tätigkeit das klinische und das pathologische Erscheinungsbild mitbestimmt und daher selbst aktiv das Krankheitsgeschehen bestimmt.

Heute beschreibt der Begriff Allergie krankmachende Überempfindlichkeitsreaktionen, die durch eine Immunantwort gegen Allergene ausgelöst werden. Im Laufe der Zeit erkannte man, dass den unter dem Begriff Allergie subsumierten Krankheitsbildern mehrere verschiedene immunologische Mechanismen zugrunde liegen. Eine Klassifikation in vier verschiedenen Allergietypen, die heute noch gültig ist, wurde von Coombs und Gell 1963

begründet [2]. Die Klassifizierung teilt die Typen nach ihrer Pathogenese ein. Die ersten drei Typen werden humoral durch Antikörper vermittelt, der vierte Typ, sog. Spättyp, über Zellen (T-Zellen und Makrophagen). Ein typisches Beispiel einer Typ 4-Reaktion oder Spättyp-Reaktion ist das allergische Kontaktekzem.

1.2 **Allergisches Kontaktekzem**

1.2.1 **Morphologie des allergischen Kontaktekzems**

„Das allergische Kontaktekzem entsteht durch eine Typ-IV-Reaktion gegen exogen auf die Haut auftreffende Substanzen. Sie manifestiert sich bei episodischer Exposition als akute Dermatitis, bei wiederholter oder dauernder Exposition als chronisches allergisches Kontaktekzem.“[3]

Die akute Ekzemreaktion, etwa 48h nach Einwirkung eines Allergens, beginnt als helles Erythem, welches eine eher matte Oberfläche (infolge des intraepidermalen Ödems) besitzt. Dieses Ödem kann bis zur Bläschenbildung gehen. Bei kurzer Exposition gegenüber der Noxe erfolgt nach wenigen Tagen die Abheilung.

Bei einer andauernden oder wiederholten Exposition gegenüber der Noxe entwickelt sich ein chronisches Kontaktekzem. Es zeigt sich eine entzündliche Hautverdickung mit Vergrößerung der Hautfelderung (Lichenifikation) und führt infolge der reaktiven Epidermisverdickung zu einer Hyperkeratose. Es finden sich zugleich Rötungen, Bläschen, Erosionen, Krusten und Schuppen an der entzündlich geröteten Haut. Typisch für die allergische Kontaktdermatitis sind makulöse oder papulöse Streuherde in der Umgebung [3-4].

1.2.2 **Histologie des allergisches Kontaktekzems**

In der Lichtmikroskopie zeigen sich in der HE-Färbung folgende Charakteristika des akuten allergischen Kontaktekzems: Es findet sich das Bild einer epidermalen Spongiose. Dieser Begriff beschreibt die „schwammartige“ Erweiterung der epithelialen Interzellulärräume durch ein in diesem Fall entzündungsbedingtes Ödem. Es bilden sich kleine intraepidermale Vesiculae, die meist nur durch dünne Septen voneinander getrennt sind und in die lymphozytäre Zellen eingewandert sind. Neben dieser Zelleinwanderung (Exozytose) in den interzellulären Raum findet sich eine akantothische Epidermis (verbreitertes Stratum

spinosum). Charakteristisch sind auch perivaskuläre Infiltrate aus Lymphozyten, vereinzelt auch neutrophile und eosinophile Granulozyten [4-5].

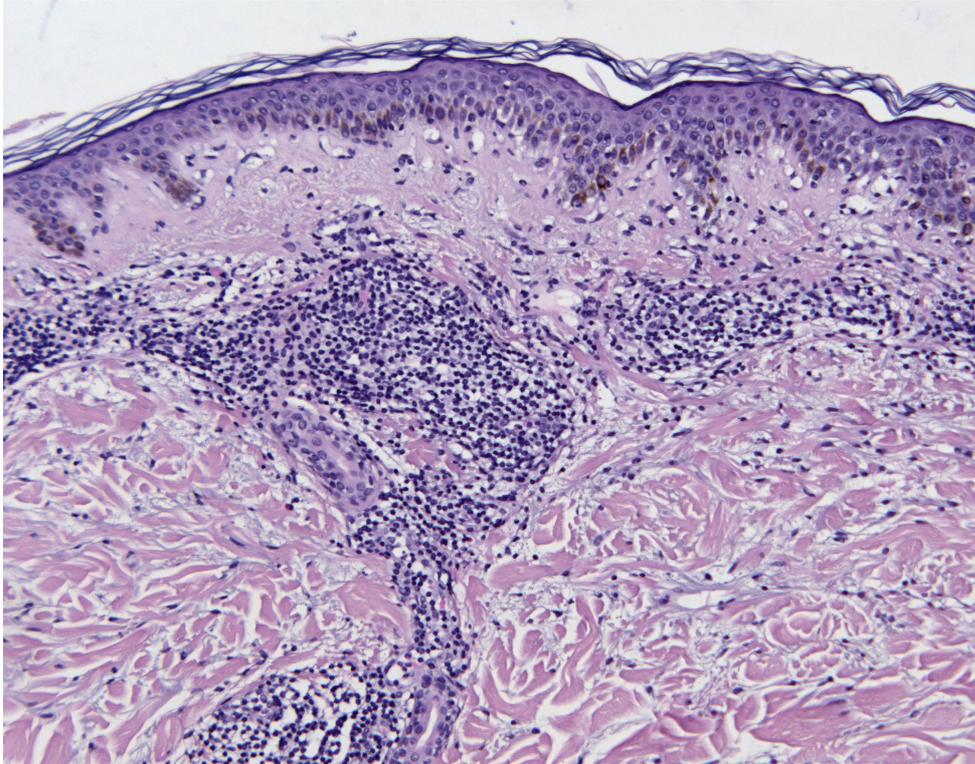


Abbildung 1-1 : Ekzemreaktion (positive Reaktion im Epikutantest auf Nickelsulfat (HE--Färbung, 20x))

1.2.3 Diagnostik des allergischen Kontaktekzems

Im Vordergrund stehen neben der Anamnese des Patienten das oben beschriebene klinische Erscheinungsbild und eine Testung der in Frage kommenden Allergene im Rahmen eines Epikutantestes. Dieser ist in Kapitel 3.5.1 näher beschrieben. Durch das Aufbringen der Testsubstanzen auf die Haut wird bei entsprechender allergischer Disposition eine akute allergische Kontaktdermatitis hervorgerufen. Der Epikutantest ist Standard in der Allergiediagnostik. Ein weiterer eher wissenschaftlicher Ansatz zur Beurteilung einer Antigensensibilisierung stellt der sogenannte Lymphozytentransformationstest dar. In diesem kann eine lymphozytäre Spätsensibilisierung der Testperson auf zum Beispiel Nickel festgestellt werden. Hierzu werden aus peripherem Blut gewonnene Lymphozyten mit Nickelsalzen stimuliert und ein eventuell verstärktes Proliferationsverhalten festgestellt. Eine nähere Beschreibung dieses Testes befindet sich in Kapitel 3.5.2.

1.2.4 Immunmechanismen des allergischen Kontaktekzems

Zur Zeit wird von einer genetischen Prädisposition für die Bereitschaft der Haut, bei Kontakt mit gewissen Substanzen - sogenannten Allergenen - im Sinne einer Typ-IV-Reaktion zu antworten, ausgegangen; eine Assoziation mit einem bestimmten HLA-Typ konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden [3-4].

Bei Allergenen handelt sich meist um niedermolekulare Substanzen (Molekulargewicht 5-70 kD). Wie stark ein Kontaktallergen sensibilisieren kann, ist unterschiedlich. Es hängt unter anderem von der Konzentration, der irritativen Potenz und der Einwirkungsdauer auf der Haut ab. Die chemische Struktur lässt hingegen keine eindeutigen Aussagen über die Sensibilisierungspotenz zu. Sogenannte starke „sensitizer“, die nur in sehr begrenzter Anzahl in der Umwelt vorkommen, werden daher von schwachen „sensitizer“, die tausendfach in unserer Umwelt vorkommen, unterschieden [6-7].

Allergene sind zumeist Haptene, das heißt sie können nur in Bindung an ein Trägerprotein zu einem Vollantigen werden und somit eine Immunantwort auslösen. Trägerproteine können z.B. Serumalbumin und epidermale Proteine sein. Die Bindung findet zumeist über eine kovalente Bindung zwischen Hapten und spezifischen Aminosäuren (meist Cystein) des Trägerproteins statt [8]. Bei Metallallergenen (z.B. Nickel, Kobalt oder Chrom) werden jedoch nicht-kovalente Protein-Metall-Chelate gebildet [9]. Des Weiteren wird derzeit eine nicht-kovalente Hapten-major histocompatibility complex-Interaktion diskutiert [10].

Die Pathogenese des allergischen Kontaktekzems verläuft in zwei Stadien:

Prozess der Sensibilisierung (afferente Phase der allergischen Ekzemreaktion)

Bei Erstkontakt des Organismus mit dem Hapten wird das Hapten nach dem Eindringen in die Haut an ein Trägerprotein gebunden (s.o.) und eine inflammatorische Reaktion ausgelöst. Aus Keratinozyten werden Entzündungsmediatoren ausgeschüttet (u.a. IL1 β , TNF α , Histamin) [11]. Daraufhin folgt eine Rekrutierung von Monozyten aus dem Blut an die betroffene Hautstelle. Diese CCR2+ Monozyten differenzieren zu dendritischen Zellen [12-13]. Neben diesen eingewanderten dendritischen Zellen befinden sich weitere dendritische Zellen in der Epidermis (Langerhans-Zellen) und Dermis (dermale dendritische Zellen) [11].

Gerade diesen wird heutzutage eine wichtige Rolle in der Entstehung der allergischen Kontaktdermatitis zugewiesen [14-17]. Dendritische Zellen besitzen an ihrer Oberfläche den *major histocompatibility complex* (MHC) der Klassen I und II [18]. An diese werden die Hapten-Proteinkomplexe (Allergene) prozessiert. Diese Allergene, welche an den MHC-Komplex gebunden sind, werden T-Lymphozyten mit entsprechender Spezifität ihres T-Zell-Rezeptors nach Wanderung der dendritischen Zelle zum regionären Lymphknoten in der parakortikalen Zonen präsentiert. Es kommt zur Differenzierung und Aktivierung von Hapten-spezifischen CD8+- und CD4+-Zellen. Diese Differenzierung ist hauptsächlich abhängig von dem Zytokinmilieu, welches bei der Interaktion zwischen T-Zelle und dendritischer Zelle vorherrscht [11]. So differenzieren CD4+ beziehungsweise CD8+Zellen unter Einfluss von IFN γ zu Typ 1-Zellen (Th1 bzw. Tc1-Zellen) [19-20], unter Einfluss von IL6 und TGF β zu Typ 17-Zellen (Th17 bzw. Tc17) [21-24], zu Typ 2-Zellen (Th2 bzw. Tc2) unter IL4 Einfluss [19-20] und CD4+-Zellen zu Treg (regulatorische T-Zellen) unter dem Einfluss von TGF β [25]:

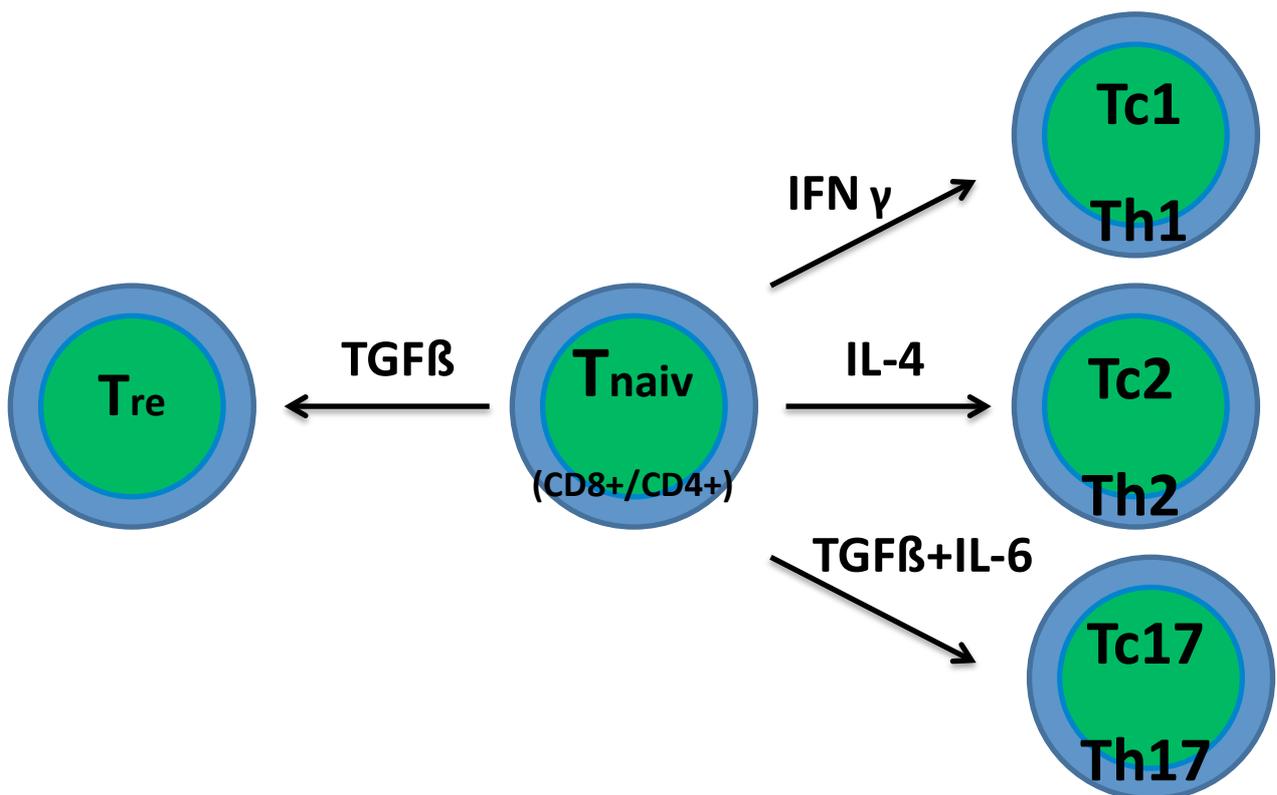


Abbildung 1-2 Differenzierung T-Lymphozyt (in Anlehnung an [26])

Auslösung des allergischen Kontaktekzems durch Reexposition (efferente Phase)

Bei erneutem Kontakt der Haut mit dem Hapten kommt es nach etwa 48 bis 72 h zum Auftreten einer akuten Ekzemreaktion. Die T-Zellen, denen in der afferenten Phase bereits das Allergen präsentiert wurde, können bei einer Reexposition ins Gewebe austreten und nach Antigenpräsentation zu Proliferation und Zytokinausschüttung führen [11]. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass CD8⁺-Zellen primär Effektorzellen und CD4⁺-Zellen primär regulatorische Zellen in der Pathogenese des allergischen Kontaktekzems darstellen [27-31]. So zeigten MHC-I-defiziente knock-out-Mäuse, welche unfähig für Interaktion mit CD8⁺-T-Zellen sind, keine Kontaktsensibilisierung bei kutanem Auftragen von DNFB (2,4-dinitro-1-Fluorobenzol), einem hochpotenten Kontaktallergen. Umgekehrt wurde bei MHC-II-defizienten knock-out-Mäusen, welche unfähig zu einer Interaktion mit CD4⁺-Zellen sind, eine verstärkte Kontaktsensibilisierung auf DNFB festgestellt. Studien geben Hinweise darauf, dass die Pathogenese des Nickel-induzierten allergischen Kontaktekzems beim Mensch der der Maus ähnelt [32].

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Anzahl der infiltrierenden CD8⁺-Zellen mit einer Erhöhung der IFN γ -Menge und mit der Apoptose der Keratinozyten im Gewebe positiv korreliert [27]. Auch CD4⁺-Zellen können unterstützend zu CD8⁺-Zellen Keratinozyten in Apoptose bringen [33], allerdings nur nach MHC II-Induktion durch IFN γ . Daher ist es möglich, dass die CD4⁺ Zellen erst nach Ausschüttung der CD8⁺-Zytokine mit der zytotoxischen Aktivität der CD8⁺-Zellen kooperieren [34].

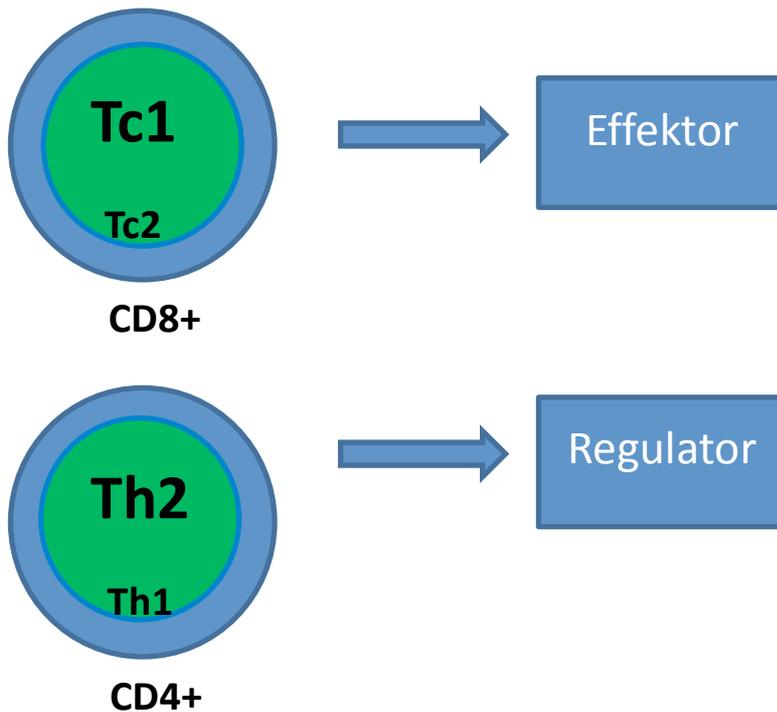


Abbildung 1-3 Effektorische und regulatorische Zellen der Kontaktsensibilisierung (in Anlehnung an [32])

Darüber hinaus konnte die Differenzierung einiger T-Zellen zu Typ17-Zellen festgestellt werden mit entsprechender IL17- Expression [35-36]. Auch in vivo zeigten sich bei allergischen Patienten IL17-produzierende T-Zell-Klone [37]. Diese waren größtenteils CD4+-Zellen, etwa 1% war CD8+ [38]. Es zeigte sich bei Neutralisierung des IL-17 durch Antikörper ebenso wie bei IL17-defizienten knockout-Mäusen eine verminderte kontaktallergische Reaktion [36, 39].

So zeigt sich, dass die CD8+-Zell-vermittelte Zytotoxizität (insb. Tc1) gegenüber den Hapten-beladenen Keratinozyten wesentlich bei der Pathogenese der kontaktallergischen Reaktion ist, die CD4+-Th1 und Th17-Zellen scheinen eher in die Amplifikation der allergischen Reaktion involviert zu sein [37, 40].

Regulation der Kontaktsensibilisierung

Das Zytokin IL10 hat durch die Inhibition der Produktion proinflammatorischer Zytokine (wie IFN γ oder TNF α) und folgend die Inhibition der Aktivität der T-Zellen einen wichtigen regulatorischen Effekt auf das Allergiegesehen. So zeigten Mäuse nach intradermaler Gabe von IL10 eine verminderte allergische Kontaktdermatitis [41], während IL-10 defiziente

knockout-Mäuse eine verstärkte Reaktion zeigten [42]. IL10 und IL4 sind klassische Th2-Zytokine, was zu der Vermutung führt, dass CD4+-Zellen an ihrer Produktion und somit der Regulation der Kontaktallergie beteiligt sind. So zeigten -wie bereits oben erwähnt- CD4+inkompetente MHCII-knockout-Mäuse eine verstärkte kontaktallergische Reaktion. Interessanterweise zeigte jedoch nur IL10, nicht aber IL4 diese regulatorische Wirkung, obwohl Th2-Zellen IL10 als auch IL4 produzieren [43], was vermuten lässt, dass noch ein weiterer CD4+ Zelltyp für die IL10 Produktion verantwortlich ist.

So könnten CD4+CD25+-Zellen, sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg) für die IL10-Produktion verantwortlich sein. Es wurde gezeigt, dass Treg ihre immunregulatorische Wirkung nicht im direkten Zell-Zell-Kontakt, sondern über die Ausschüttung von IL10 vermitteln [44]. Insbesondere der Subtyp Treg Typ 1 (Tr1) zeigte eine besonders hohe IL10-Produktion in kontaktallergischer Haut [45].

Im Anhang findet sich eine zusammenfassende Tabelle mit ausgewählten Zytokinen und ihrer Rolle bei der allergischen Kontaktallergie.

1.2.5 Epidemiologie des allergischen Kontaktekzems auf Nickel

Das allergische Kontaktekzem ist die Hauptursache von Berufsunfähigkeit durch Hauterkrankungen. Gerade Metalle, wie Nickel, Kobalt und Chrom sind bekannt als Allergene, die bei Hautkontakt zu einem Kontaktekzem führen können. Der häufige Einsatz von Nickel nicht nur in Münzen, wie der nach seinem Metall benannten Nickel als 5 Cent Münze in den USA, sondern vor allem im Modeschmuck und vielen Alltagsgegenständen erklärt, dass relativ oft eine Kontaktallergie gegenüber Nickel in der Allgemeinbevölkerung gefunden wird.

In der Allgemeinbevölkerung finden sich Kontaktallergieraten gegenüber Nickel von 13,1% (Frauen 20,4%, Männer 5,8%), gegenüber Kobalt von 2,4% (Frauen 3,4%, Männer 1,4%) und gegenüber Chrom von 1,1% (Frauen 1,5%, Männer 0,7%) [46]. Bei Patienten von dermatologischen Kliniken sind diese Raten aufgrund der nicht zu vermeidenden Selektion noch höher, wie Überblicksdaten des IVDK (Informationsverbund Dermatologischer Kliniken) an von 2001 bis 2004 getesteten Personen zeigen [47].

Bei Untersuchungen von Menné et al. im Jahre 1987 [48] konnte eine Abhängigkeit der Nickelsensibilisierungsrate von der Expositionsmenge festgestellt werden. Bei Legierungen, die mehr als $0,5 \mu\text{g Nickel/cm}^2/\text{Woche}$ an die Haut abgeben, ist die Sensibilisierungsrate deutlich höher im Gegensatz zu Legierungen, die weniger als diese Menge freisetzen. Es folgte 1994 eine von der EU verordnete Nickel-Direktive (EN1811), welche mit ihrer Überarbeitung von 2011 für Gebrauchsgegenstände mit längerem Hautkontakt eine Nickelfreisetzung auf weniger als $0,5 \mu\text{g Nickel/cm}^2/\text{Woche}$, für „Stäbe, die in durchstochene Ohren oder andere durchstochene Körperteile eingeführt werden“ sogar nur $0,2 \mu\text{g/cm}^2/\text{Woche}$ vorschreibt [49].

1.3 **Implantatunverträglichkeit und Metallallergien**

In Deutschland werden jährlich gemäß den statistischen Daten der im BVMed (Bundesverband Medizintechnologie e.V.) vertretenen Unternehmen rund 400000 Endoprothesen implantiert [50]. Im Jahr 2010 wurden dabei etwa 210000 künstliche Hüftgelenke und 165000 künstliche Kniegelenke implantiert. Die Anfänge der Knieendoprothetik reichen ans Ende des 19. Jahrhunderts. So implantierte Themistokles Gluck (1853-1941) mehreren Patienten Gelenkersatz aus Elfenbein, welche jedoch aufgrund der nachfolgenden Infektionen am Patienten versagten. Die moderne Endoprothetik begann mit der ersten erfolgreichen Implantation 1951 durch B. Walldius [51]. Seitdem sind große Fortschritte in der Endoprothetik erzielt worden, um qualitativ hochwertige Endoprothesen dem Patienten anbieten zu können, welche in Funktion und Material höchsten Ansprüchen genügen.

1.3.1 **Knieendoprothesen-Materialien**

Die Femur- und Tibiakomponenten eines Knieimplantats bestehen in der Regel aus CoCr-Legierungen. Diese CoCr-Legierung besteht aus 64% Kobalt, 28% Chrom, 6% Molybdän und ca. 0,5% Nickel. Die Tibiakomponente und bei einem Hersteller auch die Femurkomponente können aber auch bereits aus einer Titanlegierung bestehen. Titan-Legierungen bestehen zumeist aus 87 % Titan und entweder 6 % Aluminium plus 4% Vanadium, oder 6 % Aluminium und 7 % Niob [52].

Weiterhin sind Zirkonium-Legierungen für Knieendoprothesen erhältlich. Sie bestehen aus 97,5% Zirkonium und 2,5% Niob und werden auch unter dem Namen OXINIUM® vertrieben.

Die Inlays (Meniskenersatz) sind in der Regel aus *UHMWPE* (Ultra hochmolekulares Polyethylen) hergestellt. Die Werkstoffe werden in der internationalen Norm ISO 5832-5834 beschrieben. Die verwendeten Knochenzemente enthalten mögliche Allergene wie Polymermethacrylate, Additiva (z.B. Benzoylperoxid) und Antibiotika wie Gentamicin, welche als Verursacher einer Immunantwort zur Zeit kontrovers diskutiert werden [53].

1.3.2 Komplikationen bei Knieendoprothesen

Bis 20% der Patienten mit Knieendoprothesen haben Beschwerden, woraus eine jährliche Revisionsrate von etwa 10% resultiert [54]. Grundsätzlich sind verschiedene Ätiologien für ein Versagen von Knieendoprothesen bekannt. Man unterscheidet zwischen septischen und nicht-septischen Ursachen:

Zum einen gibt es septische Lockerungen kurze Zeit nach Implantation mit einem floriden infektiösen Krankheitsbild („high-grade infection“) zum anderen bei minimaler bakterieller Kontamination und speziellem Keimspektrum eine latente sogenannte „low-grade infection“. Das Keimspektrum bilden insbesondere „small colony variants“ von Staphylokokken, die erst nach einigen Wochen Bebrütung Kolonien bilden [55-56].

Bei den nicht-septischen Ursachen wird im Rahmen einer „adverse reaction“ auch eine Allergie gegen die Implantatwerkstoffe als möglicher Auslöser diskutiert. So wurde schon in den 1960er-Jahren beschrieben, dass es zu krankmachenden Überempfindlichkeitsreaktionen gegenüber Metallen nicht nur bei Kontakt an der Hautoberfläche sondern auch im Körper eines Patienten kommen kann [57]. Lokale Ekzeme, rezidivierende Rötungen und Schwellungen wurden nach Osteosynthesen im Extremitätenbereich beobachtet [58-62], über Ekzeme bei Hüft- und Knieendoprothesen existieren nur wenige Fallberichte [63]. Später wurden neben den im Vordergrund stehenden Metallen wie Nickel, Kobalt, Chrom auch von Titan-Unverträglichkeitsreaktionen im Sinne einer Implantatallergie berichtet [64-67]. Dass Allergien auf Implantatwerkstoffe - neben den erwähnten Hautveränderungen- auch Endoprothesenlockerungen bewirken können, wurde in Kasuistiken sowohl für Metallallergien [68-70] als auch für Kontaktallergien gegen potentielle Knochenzementkomponenten beschrieben [70-72].

Inwieweit die Pathogenese einer Metallallergie am Gelenk sich mit der an der Haut vergleichen lässt, ist bisher unklar. Ebenso fehlen eindeutige histopathologische Korrelate für hypererge Typ-4- Reaktionen an Endoprothesen [55].

1.3.3 Histologische Veränderung bei Implantatversagen

Bei Implantatversagen lassen sich, abhängig von ihrer Ätiologie, histologische Veränderungen der periprothetischen Membran und der Neosynovialis feststellen. Als periprothetische Membran wird eine saumartige Gewebeschicht bezeichnet, welche sich in der Interfaceregion zwischen Knochen und Prothese bzw. Knochen und Zement ausbildet. Sie ist daher nur bei einem Prothesenwechsel für Probeentnahmen zugänglich. Die Neosynovialis bildet sich um die Endoprothetik als Begrenzung des neuen Gelenkraumes und besitzt keinen Kontakt zum Knochen. Sie ist daher leichter zugänglich.

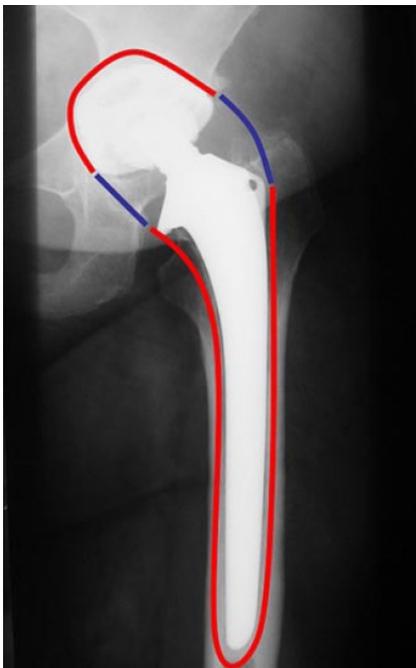


Abbildung 1-4 Hüftendoprothetik im a.p.-Röntgen: schematische Darstellung der periprothetischen Membran (rot) und der Neosynovia (blau) aus [55]

Anhand der Morphologie von periprothetischer Membran/Neosynovialis können nach einer Klassifikation nach Morawietz et al. [73] – unter maßgeblicher Mitwirkung von Herrn Prof. Krenn- vier verschiedene Typen unterschieden werden, welche Rückschlüsse auf die Ätiologie der Lockerung zulassen.

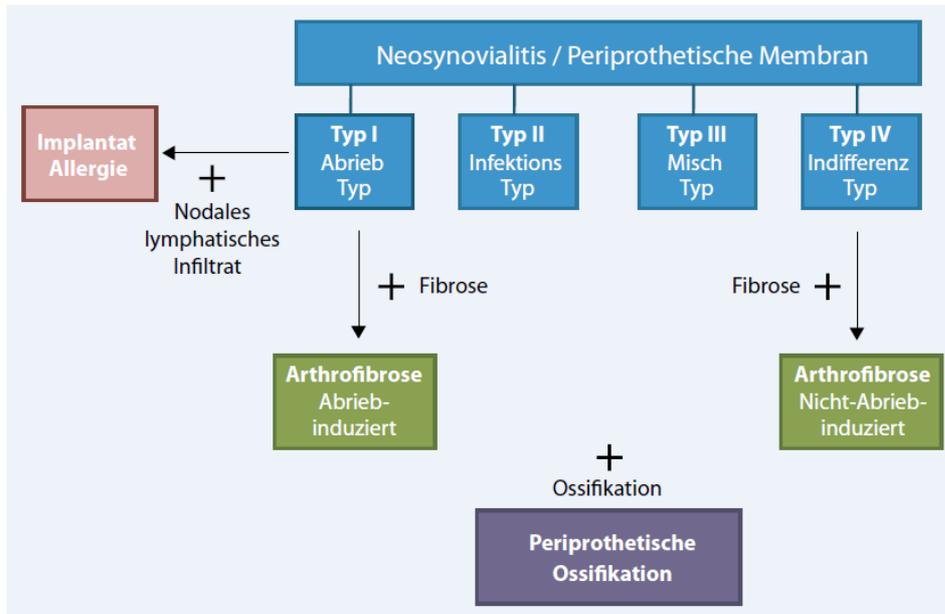


Abbildung 1-5 Pathologie des Perimplantatgewebes aus [55]

Die Standzeiten von Endoprothesen haben zwar deutlich zugenommen, allerdings bleibt die Lebensdauer einer Endoprothese weiterhin begrenzt. Anhand der Beurteilung des Gewebebildes im Implantatlager revidierter Endoprothesen konnten Morawietz und Krenn die unten beschriebene Klassifikation für vier wesentliche Reaktionsmuster im Falle eines Endoprothesenversagens erstellen. Da wir dankenswerterweise über die Kooperation mit Herrn Professor Krenn eine wesentliche histomorphologische Beurteilungshilfe bekamen, wollen wir im Folgenden diese Klassifikation aus seiner Veröffentlichung zitieren.

1.3.4 Morphologie der Periimplantatmembran

Periprothetische Membran vom abriebinduzierten Typ (Typ I):

„Histologisch imponiert ein mehrheitlich aus Makrophagen und multinukleären Riesenzellen bestehendes Infiltrat. Kleinere Partikel von etwa $2 \mu\text{m}^2$ können in Makrophagen gefunden werden, während sich größere PE-Partikel ab etwa $5 \mu\text{m}^2$ eher in multinukleären Riesenzellen finden. Diese beiden Zellformen nehmen zusammen mehr als 20% der Fläche der Membran ein. Vereinzelt sind Lymphozyten nachweisbar. Der höchste Anteil bzw. die größte Flächendichte von Makrophagen oder multinukleären Riesenzellen findet sich oft an der Oberfläche der periprothetischen Membran.“ Zitat aus [55]

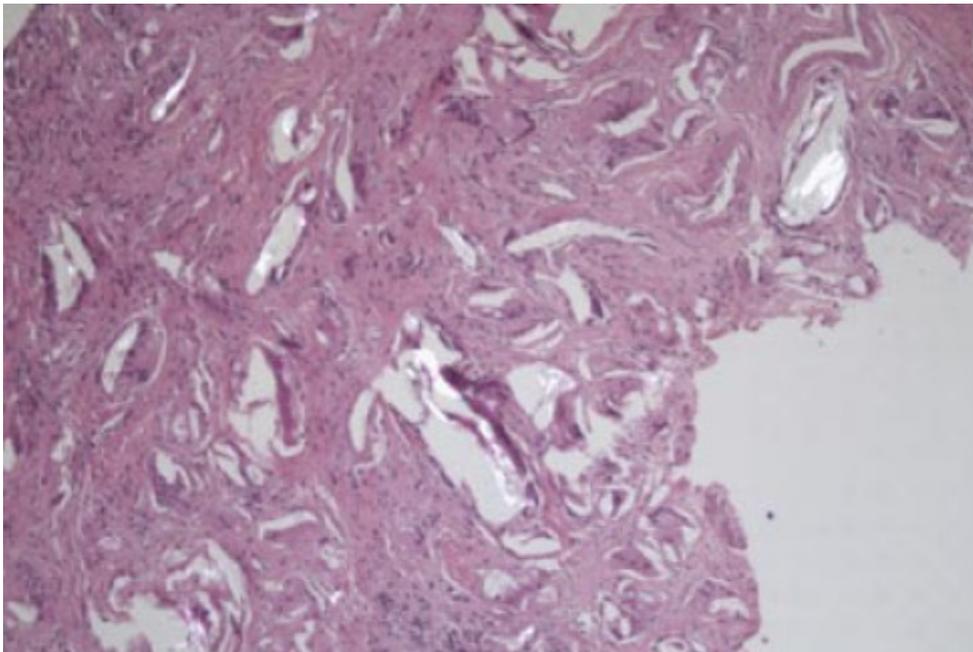


Abbildung 1-6 Typ I-Membran mit Fremdkörperriesenzellen (HE, Vergrößerung 80:1) aus [55]

Periprothetische Membran vom infektiösen Typ (Typ II):

„Hierbei kann zwischen einer Minimalinfektion („low-grade-infection“) und einer ausgeprägten, z. T. abszedierenden oder phlegmonösen Entzündungsform unterschieden werden. Das Bild der „low-grade-infection“ zeichnet sich durch eine chronisch granulierende Entzündung mit aktivierten Fibroblasten, Gefäßproliferaten, chronischem Ödem und einem entzündlichen Infiltrat aus neutrophilen Granulozyten und oft auch Plasmazellen in Nachbarschaft von kleinen Lymphozytenaggregaten aus. Multinukleäre Riesenzellen und Makrophagen sind nur vereinzelt nachweisbar.“

Zitat aus [55]

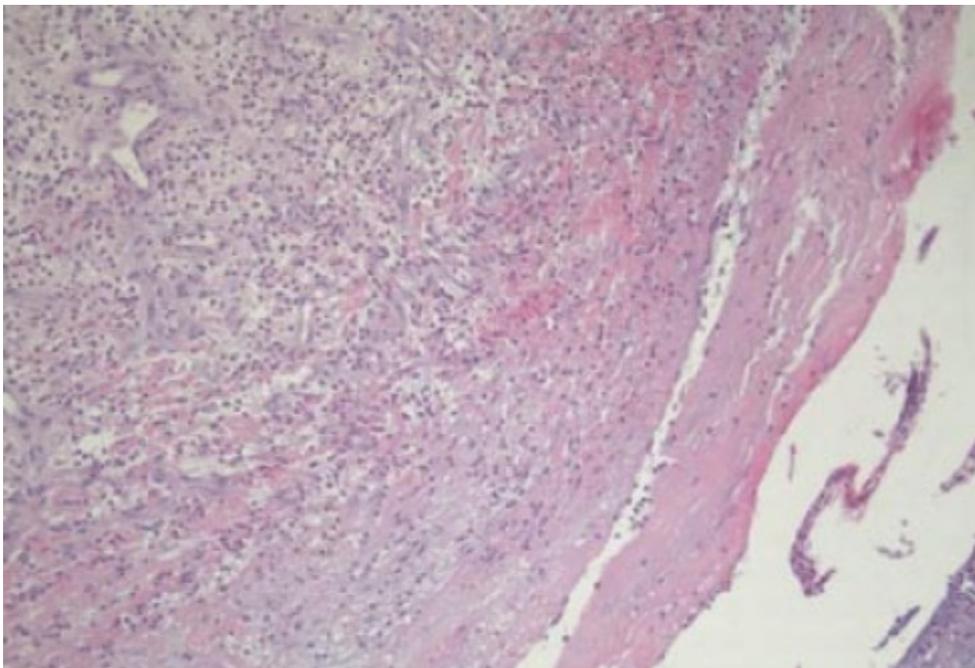


Abbildung 1-7 Typ II-Membran: Granulationsgewebe Kapillarproliferate (HE, Vergrößerung 80:1) aus [55]

Periprotetische Membran vom abriebinduzierten und infektiösen Typ

(Mischtyp, Typ III):

„Das histologische Bild stellt eine Kombination der unter Typ I und Typ II beschriebenen histologischen Veränderungen dar. In derselben Membran finden sich sowohl Areale, in denen eine abriebinduzierte Fremdkörperreaktion dominiert als auch ein granulozytenreiches Granulationsgewebe, wobei beide Veränderungen etwa den gleichen Flächenanteil einnehmen.“ Zitat aus [55]

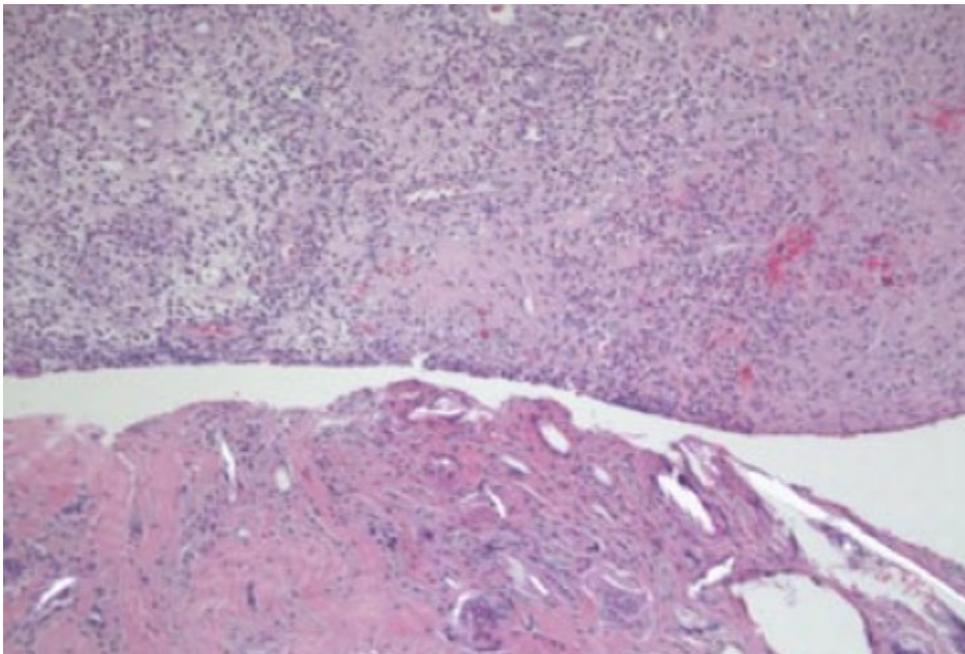


Abbildung 1-8 Typ III-Membran: Mischtyp aus Abrieb und Infektionstyp (HE, Vergrößerung 80:1) aus [55]

Periprothetische Membran vom indifferenten Typ (nicht-abriebinduziert, nicht-infektiös, Typ IV):

„Histologisch stellt sich eine aus zellarmem, kollagenfaserreichen Bindegewebe bestehende Membran dar, deren Oberfläche zumeist von einem zarten Fibrinraum mit Fibroblasten und Makrophagen synovialisähnlich begrenzt ist. Neutrophile Granulozyten kommen nur vereinzelt im Bereich der Fibrinauflagerungen vor. Im konventionellen HE-Präparat und auch polarisationsoptisch lassen sich nur sehr wenige Fremdmaterialablagerungen erkennen. Insbesondere findet sich keine Fremdkörperreaktion. Riesenzellen und Makrophagen nehmen weniger als 20% der Schnittfläche ein.“ Zitat aus [55]

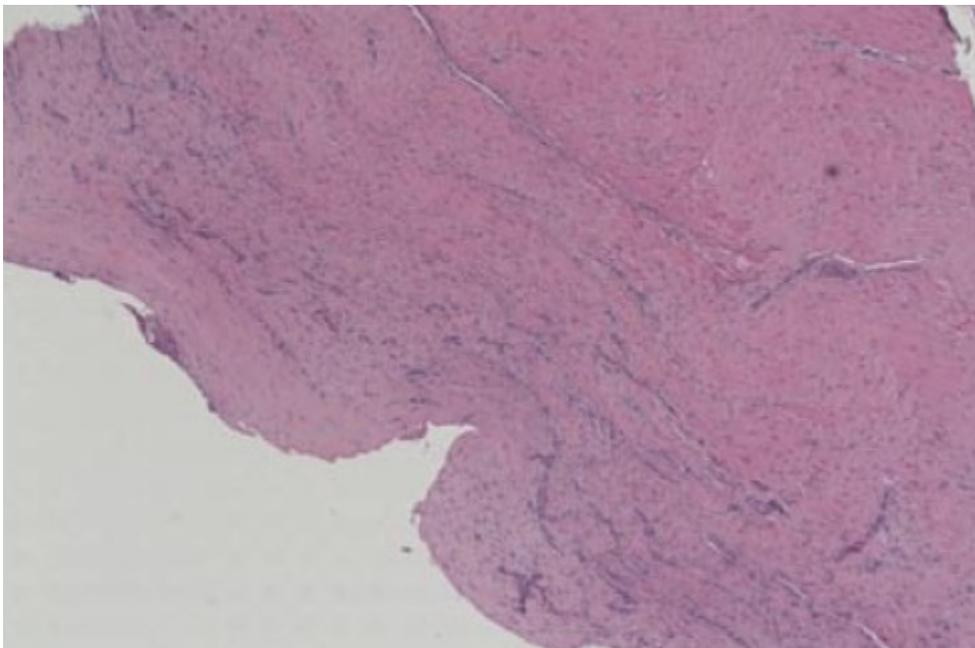


Abbildung 1-9 Typ IV-Membran: Faserreiches Bindegewebe, kein Abrieb, keine Infektion (HE, Vergrößerung 80:1) aus [55]

2 Zielsetzung

Bei beschwerdebehafteter Endoprothetik - speziell Knieendoprothetik - können nicht immer „klassische“ Ursachen wie Fehlpositionierung, mechanische Problematik oder Infekt gefunden werden. Da eine Metallimplantatallergie in seltenen Fällen vorliegen könnte, soll die folgende Arbeit einige der vielen hierzu noch offenen Fragen klären helfen:

- Können bei beschwerdebehafteten Knieendoprothesenträgern mit im Hauttest gefundener Metallallergie und/oder im Lymphozytentransformationstest gefundener Metallsensibilisierung bestimmte Charakteristika im periimplantären Gewebe gefunden werden?
- Lassen sich diese Charakteristika bei aseptischem Prothesenwechsel über
 - Histomorphologie/Zellinfiltrat und/oder
 - über Zytokinmuster beschreiben?
- Unterscheiden sich die Zytokinmuster von Proben aus periimplantärem Gewebe von Patienten mit Implantatversagen und kutaner Metallallergie von Gewebeproben von Patienten mit Implantatversagen ohne kutane Metallallergie, aber positiver Reaktion im Lymphozytentransformationstest? Ist eine Differenzierung aufgrund der unterschiedlichen Testverfahren möglich?
- Wie unterscheiden sich Zytokinmuster von Proben aus periimplantärem Gewebe von Patienten mit Implantatversagen und Metallallergie/Sensibilisierung von Hautgewebeproben aus Nickelkontaktdermatitis-Arealen (Epikutantestreaktionen)? Inwieweit finden sich Übereinstimmungen mit den periimplantären Geweben?
- Welche Zytokinexpression ist im Kniegewebe bei Gonarthrose-Patienten vor Implantation einer Endoprothese messbar? Wie unterscheidet sich diese Zytokinexpression von der Zytokinexpression der Patienten mit Implantatversagen und Metallallergie/Sensibilisierung?

- Welche Korrelation besteht zwischen Beschwerden, Allergiediagnostik, Histologie und spezifischen Zytokinmustern?
- Wie haben sich die subjektiven Beschwerden der Patienten nach einer Revisionsoperation verändert, wenn Materialien eingebaut wurden, auf die die Patienten keine kutane Allergie aufweisen? In wie weit konnten diese Patienten von einer erneuten Operation profitieren?

3 Material und Methoden

3.1 *Untersuchungsmaterial und Patienten im Überblick*

Um potentielle Charakteristika bei Verdacht auf Implantatallergie zu erkennen, wurden Gewebeproben periimplantär bei Knieendoprothesenträgern mit Komplikationen, bei Gonarthrosepatienten vor Endoprotheseneinsatz sowie aus Metall-Epikutantestfeldern bei metallallergischen Patienten entnommen. Eine Zusammenschau von allergologischen Parametern, Histomorphologie und molekularer Zytokinexpressions-Analyse im Gewebe sollte im Vergleich der Patientenkollektive Unterschiede erkennen lassen. Die verwendeten Materialien sind im Anhang wiedergegeben. Im Folgenden werden die Arbeitsschritte beschrieben.

3.2 *Patienten und Versuchsablauf*

Insgesamt wurden Gewebeproben von 40 Personen in dieser Studie nach deren Einwilligung einbezogen und verarbeitet. Vor Studienbeginn wurde der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU das Studienprotokoll vorgelegt und von dieser genehmigt.

Als Einschlusskriterien galten für alle Personen: Alter ≥ 18 Jahre, Mündigkeit und unterzeichnete Einverständniserklärung.

Weiterhin wurde gemäß den unter 3.2.1 beschriebenen Gruppenkriterien

- beschwerdebehaftete Knieendoprothetik mit Implantatallergieverdacht
 - Gonarthrosepatienten vor Endoprothetik
 - Patienten mit Metallallergie („Epikutantest-Reaktion (ECT)“) ohne Knieendoprothetik
- die ergänzende Auswahl getroffen. Für die beschwerdebehafteten Knieendoprothetikträger galt, dass bei diesen bereits über die betreuenden Orthopäden eine Revisionsoperation vorgesehen war und im Rahmen der Beschwerdeabklärung eine Allergiediagnostik erfolgt war. Es musste mindestens eine der Beschwerden wie Schmerzen, rezidivierende Ergüsse und/oder Bewegungseinschränkung vorliegen.

3.2.1 Allgemeine Patientencharakteristika

Die Gewebeproben wurden aus vier verschiedenen Kollektiven erhalten:

- a. 11 Personen mit beschwerdebehafteter Knieendoprothetik und im Epikutantest (ECT) positiver Reaktion gegenüber den Metallen Nickel und/oder Kobalt (**Patientenkollektiv I**).

Im Epikutantest positiv auf Nickel zeigten sich 10 der 11 Patienten, 6 zeigten auf Kobalt und 2 der 11 zeigten auf Chrom eine positive Reaktion.

Bei 5 Patienten wurde zusätzlich ein Lymphozytentransformationstest (LTT) durchgeführt, dieser zeigte durchwegs positive Reaktion auf Nickel.

- b. 9 Personen mit beschwerdebehafteter Knieendoprothetik, negativem ECT aber positivem LTT gegenüber Nickel (**Patientenkollektiv II**).

Hier zeigten alle 9 Patienten positive Reaktionen auf Nickel, ein Patient zusätzlich auch auf Kobalt.

- c. 12 Personen mit Gonarthrose vor Endoprothetik (**Kontrollkollektiv**)

- d. 6 Personen mit Metallallergie ohne Endoprothetik (**ECT+ Kollektiv**), 2 Personen ohne Metallallergie ohne Endoprothetik (**ECT- Kollektiv**)

Bei a+b+c erfolgte die Gewebeprobe im Kniegelenk, bei d erfolgte die Gewebeentnahme aus dem Metall-reaktiven ECT-Areal. Zusätzlich wurde bei zwei Personen je eine Gewebeprobe aus einem nicht-reaktiven ECT-Feld genommen. Die Metall-LTT-Reaktion wurde bei einem SI ≥ 2 als positiv gewertet (siehe 3.5.2).

Die Überblicksdaten der Patienten- und Kontrollkollektive sind in der folgenden Tabelle aufgeführt:

Tabelle-3-1 Zusammenfassung der Studienkollektive

	Geschlecht	Alter in Jahren	Lokalisation der Gewebeentnahme	Implantatliegedauer in Monaten
Patientenkollektiv I (Revisionsoperation bei ECT+)	7m 4w	Ø 59,0 (37-75)	Knie	Ø25,7 (6-30)
Patientenkollektiv II (Revisionsoperation)	7m 2w	Ø 64,2 (53-71)	Knie	Ø28,0 (12-60)

bei ECT- und LTT +)				
Kontrollkollektiv (Gonarthrose vor Implantation)	1m 11w	69,2 (52-89)	Knie	entfällt
ECT-Kollektiv (ECT+ Stanzen)	1m 5w	64,25	Rücken	entfällt
(ECT- Stanzen)	1m 1w	(53-75)	Rücken	entfällt

∅ = Mittelwert

3.2.2 Versuchsablauf im Überblick

▪ Patienten mit Knieendoprothetikrevision (20 Patienten)

Bei den Revisionsoperationen wurden je 6 Gewebeproben erhalten:

- 2 periimplantäre Proben in Formalin (1x histologisches Labor der Dermatologischen Klinik, LMU München; 1x versendet an den Gewebepathologen Prof. Krenn, Trier¹)
- 2 periimplantäre Proben in Bakteriologie-Transportmedium („BBL Port-A-Cul Tubes“) (2x Bakteriologie Dr. Frommelt, Hamburg)
- 1 periimplantäre und 1 implantatferne (subkutanes Gewebe, als patienteneigene Kontrolle) Probe in RNA-konservierendem Material („rna-later“) (2x allergologisches Labor der Dermatologischen Klinik, LMU München)

Bei drei Patienten lagen aus logistischen Gründen nur die Gewebeproben in Formalin und „rna-later“ vor, die an die Dermatologische Klinik München verschickt worden waren.

Von jedem der 20 Patienten waren außerdem ein Beschwerden-beschreibender Fragebogen (deutsche Version des WOMAC siehe 3.3) sowie ein allergologischer Fragebogen (siehe 3.4) ausgefüllt worden.

▪ Kontrollpatienten (20 Patienten)

Bei 12 Gonarthrosepatienten wurden im Rahmen der primären Endoprothetik jeweils 4 Gewebeproben erhalten:

- 2 Proben aus Kniegelenk in Formalin (1x histologisches Labor der Dermatologischen Klinik, LMU München; 1x versendet an den Gewebepathologen Prof. Krenn, Trier²)

¹ Diesen Gewebeproben lag ein Einsendeschein bei, der den betreuenden Orthopäden ermöglichte, eine rasche histologische Beurteilung ohne studienbedingte Verschlüsselung zu erhalten

- 1 kniegelenksnahe und 1 kniegelenksferne Probe (subkutanes Gewebe, als patienteneigene Kontrolle) in RNA-konservierendem Material („rna-later“) (2x allergologisches Labor der Dermatologischen Klinik, LMU München)

Bei 6 Patienten, die eine Epikutantestung erhalten haben, wurden insgesamt sechs Stenzen aus positiven Nickel-ECT-Testfeldern und eine Stanze aus einem positiven Kobalt-ECT-Testfeld entnommen (somit insgesamt 7 ECT+-Stanzproben). Weiterhin wurden bei zwei Patienten Stenzen aus nicht-reaktiven Nickel-ECT-Testfeldern entnommen. Aus den biopsierten Testfeldern wurden erhalten:

- jeweils 1 Gewebeprobe in Formalin (histologisches Labor der Dermatologischen Klinik, LMU München)
- 1 Gewebeprobe in RNA-konservierendem Material („rna-later“) (allergologisches Labor der Dermatologischen Klinik, LMU München)

Da in einer vorab begonnenen Dissertationsarbeit (C. Schopf) in unserem Implantatallergie-Team in Zusammenarbeit mit den orthopädischen Kollegen der LMU München periimplantäre Knie-Gewebeproben von a) Patienten ohne Metallallergie-Nachweis und b) Patienten mit Kniegelenksinfektionen in konventioneller Histologie und molekularbiologisch untersucht wurden, waren diese beiden Kontrollansätze in der aktuellen Arbeit nicht aufgenommen worden.

Bei allen teilnehmenden Studienpatienten wurde ein Fragebogen zu Metallunverträglichkeiten (s.u.) sowie die deutsche Version des WOMAC zur Objektivierung der Kniegelenksbeschwerden verwendet.

3.3 Fragebogen WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index)

Dieser Score gibt Aufschluss über die Dimensionen Schmerz, Funktion, Steifigkeit und Bewegungsspielraum bei Kniegelenksproblemen. Aus diesem Fragebogen, welcher vom

² Diesen Gewebeproben lag ein Einsendeschein bei, der den betreuenden Orthopäden ermöglichte, eine rasche histologische Beurteilung ohne studienbedingte Verschlüsselung zu erhalten

Patienten selbst auszufüllen war, ließen sich individuelle Score-Werte berechnen. Er umfasst vier Abschnitte mit insgesamt 33 Fragen. Der erste Teil besteht aus fünf Fragen zu Bewegungsumfang und Schwellungen des Knies. Der zweite Teil umfasst zwei Fragen zur Steifigkeit des Knies, der dritte Teil umfasst neun Fragen zum Thema Schmerzen. Der vierte Teil handelt umfasst 17 Fragen zur körperlichen Tätigkeit im Alltag.

Sowohl die Patientenkollektive wie auch die Patienten des Gonarthrose-Kollektives erhielten diesen Fragebogen zu Beginn der Studie. Die Teilnehmer der Patientenkollektive wurden mindestens sechs Monate nach erfolgter Revision erneut gebeten, diesen Fragebogen auszufüllen. Für die vorliegende Studie wurde eine deutsche Version des WOMAC verwendet [74]. Der Fragebogen befindet sich im Anhang (s. 7.2).

3.4 Fragebogen zur Metallverträglichkeit

In diesem Fragebogen wurden neben Vorerkrankungen wie Bluthochdruck, Diabetes oder rheumatologische Erkrankungen Fragen zur Metallverträglichkeit und allergischen Erkrankungen gestellt. Der Fragenteil „Metallimplantate“ umfasst Fragen zu aktuell implantierten Metallprothesen, aktuellen und früheren Beschwerden mit Metallimplantaten sowie Fragen nach künstlichen Zahnmaterialien mit gegebenenfalls Beschwerden. Der Fragenteil „allergische Erkrankungen“ umfasst Fragen nach Atopie-Neigung des Patienten (Asthma bronchiale, Rhinitis allergica, atopisches Ekzem), sowie anamnestisch Ekzeme nach Metallkontakt. Abschließend wird nach atopischen Erkrankungen in der Familie gefragt. Der Fragebogen befindet sich im Anhang (s. 7.2).

3.5 Allergologische Diagnostik der Patientenkollektive

Die 20 Patienten der unter 3.2.1 beschriebenen Patientenkollektive I und II waren als Personen mit „Verdacht auf Implantatallergie“ eingestuft worden, da a) ihr betreuender Orthopäde keine gängige Beschwerdeursache (wie Fehlstellung, Komponentenversagen, Infektnachweis) gefunden hatte und b) in der daraufhin erfolgten allergologischen Abklärung an der Dermatologischen Klinik der LMU, München, der Epikutantest und/oder der Lymphozytentransformationstest eine Metallsensibilisierung gezeigt hatte. Im Folgenden werden beide Testverfahren kurz erläutert:

3.5.1 Epikutantest (ECT)

Der Epikutantest stellt derzeit den Goldstandard in der Diagnostik der kutanen Kontaktallergie dar. Für die vorliegende Arbeit wurde dieser Test in der Allergologie-Ambulanz an der Klinik für Dermatologie und Allergologie der LMU gemäß den Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Allergie- und klinische Immunologie (DGAKI) zur Durchführung des Epikutantests mit Kontaktallergenen durchgeführt und nach folgender Tabelle bewertet [75]:

Tabelle 3-2 Bewertungskriterien Epikutantest

Symbol	Morphe	Bedeutung
-	keine Reaktion	Negativ
?	schwaches Erythem, kein Infiltrat	Fraglich
+	gleichmäßiges Erythem, Infiltrat, evtl. diskrete Papeln	einfach positive allergische Reaktion
++	deutliches Erythem, Infiltrat, Papeln, Vesikel	zweifach positive allergische Reaktion
+++	starkes Erythem, Infiltrat, konfluierende Vesikel	dreifach positive allergische Reaktion
ir	verschiedene Veränderungen. (Seifeneffekt, Vesikel, Blase, Nekrose)	Irritativ
nt		in einem Testblock enthaltenes, aber nicht getestetes Allergen

Im Rahmen der Testungen wurde eine mindestens einfach positive allergische Reaktion als Allergie gewertet.

Am Patientenkollektiv wurden folgende Substanzen getestet: DKG Standardreihe 1, Ergänzung 401, Ergänzung 406 Implantatmetalle, Ergänzung 407 Knochenzemente. Diese Testreihen enthalten unter anderem die Substanzen Nickel (II)-sulfat 6*H₂O, Kaliumdichromat, Kobalt (II)-chlorid, Titan(IV)-oxid, Molybdän(V)-chlorid, Vanadium-pentoxid, Mangan-chlorid, Benzoylperoxid, Gentamicinsulfat.

3.5.2 Lymphozytentransformationstest (LTT)

Durch spezifischen Antigenkontakt werden T-Lymphozyten aktiviert und zur Proliferation angeregt. Diese Proliferationsantwort wird im Lymphozytentransformationstest untersucht

und gilt als Parameter für eine T-Zell-Reaktion bei spezifischem Antigenkontakt. Die Zellen werden zusammen mit dem entsprechenden Stimulus für 72-96 Stunden im Brutschrank kultiviert. In der Schlussphase der Kultur wird dem Kulturmedium radioaktiv markiertes Thymidin (^3H) zugesetzt, welches in den folgenden 16-24 Stunden Zellkultur ebenfalls im Rahmen der Zellteilungen in die neusynthetisierte DNA eingebaut wird. Im Anschluss wird die Radioaktivität der Zellen mittels eines β -Zählers gemessen. Je höher die Zellproliferation unter Zugabe des jeweiligen Stimulus ausfällt, umso größer ist die gemessene Radioaktivität aufgrund der gesteigerten DNA-Replikation. Diese Testung wurde bei den Patientenkollektiven I und II freundlicherweise durch das Team der Implantatallergologie-Sprechstunde der Dermatologischen Klinik der LMU, München durchgeführt.

3.6 *Histologische Untersuchung*

Die histologische Befundung der Gewebeproben wurde in Kooperation mit dem Zentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik Trier und der Histopathologie der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München parallel durchgeführt. Von jeder Gewebeprobe wurde eine klassische HE-Färbung als Standardfärbung angefertigt. Hierbei färbt der Farbstoff Hämalaun die sauren Bestandteile einer Zelle wie DNA und Ribosomen blau, der Farbstoff Eosin die basischen Strukturen wie Proteine des Zytoplasmas sowie Kollagen rot. Weiterhin wurden immunhistochemische Färbungen zur Charakterisierung von T- und B-Zellen sowie für Granulozyten, Monozyten und Makrophagen mit Antikörpern gegen CD3, CD15, CD20 und CD68 durchgeführt. CD3 ist ein dem T-Zell-Rezeptor assoziiertes Membranprotein und gilt als spezifischer Marker für T-Zellen aller Reifungsstufen. CD15 ist als Ligand für Selektine ein Marker für Granulozyten sowie Hodgkin-Zellen, CD20 als Membranprotein von B-Zellen ein B-Zell-Marker. CD68 (KP1) ist Bestandteil zytoplasmatischer Granula und gilt als Marker für Makrophagen und Granulozyten. (Dako, Specification Sheet, AntiHuman CD3/15/20/68).

Die Schnitte und Färbungen wurden freundlicherweise vom histopathologischen Labor der Dermatologischen Klinik, LMU München, sowie dem Zentrum für Histologie, Zytologie und Molekulare Diagnostik in Trier übernommen. Informationen zu den einzelnen Färbungen befinden sich im Anhang (s. 7.4)

Im Verlauf wurden bei drei Treffen alle histologischen Präparate der Patienten- und Kontrollkollektive, welche nach Trier und nach München geschickt worden waren, nochmals gemeinsam mit Prof. Krenn³ begutachtet und so einheitliche Bewertungskriterien für Patienten mit Implantatallergieverdacht in Anlehnung an Krenn et al. [55, 73, 76] und Willert et al. [77] mit freundlicher Unterstützung von Prof. Krenn entwickelt:

³ Prof. Krenn, PD M. Flaig, Dr. J. Schneider, Fr. v.d.Helm, Prof. P. Thomas, Anmerkung: Hr. Prof. Krenn ist inzwischen Referenzpathologe der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie und Orthopädische Chirurgie (DGOOC)

Tabelle 3-3 Bewertungskriterien CD3-Infiltrat

CD3 Infiltrat			
<i>qualitativ</i>		<i>quantitativ</i>	
diffus (keine perivaskulär gehäuften CD3-Lymphozyten)			<i>Lymphozyten, diffus (x40)</i>
		keine	0-1
		wenige	2-30
		viele	>30
Perivaskulär mikronodal (<50 perivaskuläre CD3-Lymphozyten (x20))			<i>Perivaskuläre Infiltrate (x4)</i>
		keine	0
Perivaskulär makronodal (>50 perivaskuläre CD3-Lymphozyten (x20))		wenige	1-2
		viele	3-6
		sehr viele	>6

Tabelle 3-4 Bewertungskriterien CD15/CD20/CD68-Infiltrat

CD15/CD20/CD68-Infiltrat	
-	keine
+	vorhanden
++	gehäuft vorhanden

Anmerkung: Bei CD15-Infiltrat wurde weiterhin auf den von Prof. Krenn vorgeschlagenen „Infekt-Score“ zurückgegriffen (ab 23 Granulozyten in 10 HPF (high-power-field) ist die Diagnose septisches Implantatversagen histologisch zu stellen) [78]

Tabelle 3-5 Bewertungskriterien Arthrofibrose [76]

Arthrofibrose	
Grad I	geringgradig
Grad II	mittelgradig mit nodalem Aspekt
Grad III	hochgradig

Tabelle 3-6 Klassifikation der periimplantären Membran [55] (siehe auch 1.3.4)

Klassifikation der periimplantären Membran	
Typ I	abriebinduzierter Typ (v.a. aus Makrophagen bestehendes Infiltrat, größere PE-Partikel)
Typ II	infektiöser Typ (entzündliches Infiltrat aus neutrophilen Granulozyten, Ödem)
Typ III	Mischtyp (Kombination aus Typ I und II)
Typ IV	Indifferenztyp (zellarmes, kollagenfaserreiches Bindegewebe, nur vereinzelt neutrophile Granulozyten)

3.7 Zytokinanalyse

3.7.1 Übersicht

Das Ziel der molekularbiologischen Untersuchung besteht in der Analyse des Genexpressionsprofils verschiedener inflammatorischer Zytokine (IL1 β , IL2, IL6, IL8, IL10, IL17, IFN γ , TNF α , TGF β) in den Gewebeproben. Es wird der qualitative Nachweis und die Quantifizierung der m-RNA-Kopien der oben genannten Gene durchgeführt. Dadurch werden Informationen über die transkriptionelle Regulation der Zellen generiert, die einen Hinweis auf die Immunantwort der Zellen liefern.

Die nachfolgenden Abschnitte beziehen sich inhaltlich auf die Produktinformationen der in 7.2 genannten Hersteller, insbesondere der Firma Roche.

Ablauf:

Zunächst wurde RNA aus dem Gewebe isoliert (siehe 3.7.2) und ermittelt, ob und wie viel Gesamt-RNA in einer Probe vorhanden ist (siehe 3.7.3) . Anschließend wurde die RNA in cDNA im Rahmen einer „reversen Transkription“ umgewandelt (siehe 3.7.4). Im Anschluss konnte die cDNA zum quantitativen und qualitativen Nachweis der Zielgene in die quantitative Polymerasekettenreaktion (qPCR) eingesetzt werden (siehe 3.7.5). Zur

Amplifizierung der oben genannten Gene wurden synthetisch hergestellte Oligonukleotide, sogenannte Primer verwendet (Primer siehe 7.3.1), welche spezifisch für das jeweilige Gen sind. Der qualitative Nachweis der jeweiligen cDNA wurde über eine Schmelzkurvenanalyse erbracht. Die Amplifikationsprodukte der qPCR schmelzen rasch bei einer produktspezifischen und somit Primer-spezifischen Temperatur. Es können spezifische (Schmelzpunkt: nur bei der Primer-spezifischen Temperatur) von unspezifischen (Schmelzpunkt: zu anderen Temperaturen) Produkten getrennt werden. Die Quantifizierung der cDNA erfolgte unter Einbeziehung von Referenzgenen (siehe 3.7.6) mit Hilfe der $\Delta\Delta C_t$ - Methode. Sie ermöglicht Rückschlüsse, wieviel cDNA eines bestimmten Genes in einer Probe im Vergleich zu einer anderen enthalten ist, und erlaubt somit einen Rückschluss auf die ursprüngliche mRNA-Menge.

3.7.2 RNA-Isolierung

3.7.2.1 Stabilisierung der Proben-RNA

Die Gewebeproben wurden nach der Gewinnung zur Vermeidung eines RNA-Abbaus sofort in einem RNA-Stabilisationsmedium (RNA-Later, Fa. Qiagen) aufgenommen und nach dem Postversand schnellstmöglich bei -80°C eingelagert. Die Stabilität der RNA kann durch diese Behandlung gewährleistet werden [79].

3.7.2.2 Isolierung der Gesamt-RNA aus stabilisierten Proben

Die bei -80°C tiefgefrorenen Proben wurden bei Raumtemperatur aufgetaut und mit Hilfe eines Skalpell zerkleinert. Die zerkleinerten Proben wurden in jeweils 1 ml wassergesättigtes Phenol gegeben und mit Stahlkugeln (Durchmesser 1,4mm, Fa. Qiagen) beschickt. Durch zweimaliges Rütteln für 20 Sekunden (Frequenz 6000/s) wurden die Proben lysiert. Nach 5 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben mit je $200\mu\text{l}$ Chloroform überschichtet und gründlich gemischt. Nach weiteren 10 Minuten Inkubation bei Raumtemperatur wurde bei $12000g$ 5 Minuten zentrifugiert. Durch diesen Arbeitsschritt wurden die Nucleinsäuren in eine obere, wässrige Phase extrahiert, während Proteine, Lipide und das zugegebene Phenol in einer unteren, Phenol/ Chloroform-Phase anfielen. Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß mit $500\mu\text{l}$ Isopropanol überführt, nach Schwenken der Proben für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend

10min bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, anschließend wurden den Proben 1ml 75% Ethanol zugesetzt und 10 Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Es setzte sich ein Pellet mit RNA am Boden des Probengefäßes ab, der Überstand wurde abgezogen und der Arbeitsschritt wiederholt. Im Folgenden wurde das Pellet bei 36°C für 5 Minuten getrocknet und in 30µl RNAase freiem Wasser gelöst.

3.7.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur photometrischen Bestimmung von Konzentration der extrahierten RNA wurden je 5 µl der RNA-Lösung mit 95 µl Aqua bidest verdünnt und in einer sterilen Uvette gegen RNAase freiem Wasser als Leerwert gemessen. Die Methode beruht auf der Proportionalität von Konzentration und Extinktion einer Lösung (Lambert-Beer'schen Gesetz).

Es wurde die optische Dichte (OD) der jeweiligen Probe bei einer Wellenlänge $\lambda = 260 \text{ nm}$ und $\lambda = 280 \text{ nm}$ ermittelt. Die Probenkonzentration errechnete sich wie folgt:

$C_{[\text{RNA}]} (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \text{OD}_{(260 \text{ nm})} \times 40 \mu\text{g}/\text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$. Dabei entspricht die optische Dichte von 1 einer RNA Konzentration von 40µg/ml. Zusätzlich wurde zur Bestimmung der Reinheit der RNA-Probe das Verhältnis $\text{OD} (\lambda = 260 \text{ nm}) / \text{OD} (\lambda = 280 \text{ nm})$ ermittelt. Dieser Quotient ist ein Maß für Verunreinigungen durch Proteine und genomische DNA und durfte nicht kleiner als 1,8 sein.

3.7.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um die geringe Menge RNA, welche aus der Biopsie gewonnen wurde, auf die Anwesenheit von Genkopien der gesuchten Zytokine zu testen, mussten die zu der RNA komplementäre DNA-Stränge „revers“ transkribiert und in einer PCR-Reaktion amplifiziert werden. Dazu wurde der 1st cDNA Synthesis KIT for RT-PCR (AMV) der Firma Roche verwendet. Es wurde je Probe 2 µg Gesamt-RNA für die cDNA-Transkription verwendet.

Zunächst wurde ein DNA Verdau durchgeführt um etwaige verunreinigende DNA zu eliminieren und ein RNA-Inhibitor (Fa. Roche) zugesetzt um mögliche RNAasen zu inhibieren. In 2 µg Gesamt-RNA wurden 2 µl DNAase und 1 µl RNAase Inhibitor gegeben. Die Proben wurden im Thermocycler (Fa. Biometra, TGradient) 30min bei 37°C und nach Zugabe von 3µl EDTA (25mM) nochmals für 10min bei 65° C inkubiert. Anschließend wurde zur konzentrierenden Aufreinigung der RNA eine Ethanol-fällung durchgeführt. Nach der

Ethanol-fällung wurde die RNA in 12µl RNase freiem Wasser aufgenommen und mit 1µl oligo-p-(dT)18 Primer (Endkonzentration 2,5 µM) gemischt. Anschließend wurde je

- 4µl Transkriptor RT Reaction Buffer (Endkonzentration 1x)

- 0.5µl Protector RNase Inhibitor (20U)

- 2µl Deoxynucleotide Mix (1mM jedes)

- 0.5µl Transkriptor Reverse Transcriptase (10U) hinzugegeben, mit der Pipette gemischt und kurz abzentrifugiert. Im Anschluss erfolgte die cDNA-Synthese im Thermocycler (Fa. Biometra, TGradient) bei 30min bei 55°C, 5min bei 85°C.

3.7.5 Quantitative PCR (qPCR)

3.7.5.1 Überblick

Um ein Genexpressionsprofil der Biopsie-RNA erstellen zu können, musste die Kopienzahl der gesuchten mRNA-Sequenzen relativ quantifiziert werden. Diese quantitative Analyse der Zytokinexpression erfolgte mittels quantitativer PCR im LightCycler® (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland). Diese quantitative PCR (q-PCR) bietet im Gegensatz zur Standard-PCR zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung während des PCR-Amplifikationszykluses. Möglich wird die Quantifizierung der doppelsträngigen DNA durch Fluoreszenz-Messungen. Als Farbstoff für die Fluoreszenz-Messung wurde SYBR® Green I (Fa. Roche) benutzt. Dieser Cyanin-Farbstoff bindet während der Amplifikation ausschließlich an die doppelsträngige-DNA und fluoresziert im gebunden Zustand nach Anregung durch Licht. Durch eine Fluoreszenzbestimmung nach jedem PCR-Zyklus kann die jeweilige Menge an doppelsträngigen DNA-PCR-Produkten gemessen werden. Durch Aneinanderreihung der Fluoreszenzwerte der einzelnen Zyklen bildet sich eine Kurve mit typischerweise sigmoiden Verlauf. Bei den ersten Amplifikationen ist der Gehalt an PCR-Produkten und somit die Fluoreszenz noch sehr gering, die Kurve zeigt keine Steigung. Nach Eintritt in den detektierbaren Bereich - bei maximaler PCR-Effizienz- kommt es in jedem Zyklus zu einer Verdopplung der PCR-Produkte und somit zu einem exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz. Genau an diesem Übergang kann der sogenannte Crossing-Point (Ct-Wert) bestimmt werden, an dem die detektierte Fluoreszenz exponentiell anzusteigen beginnt. Diese Ct-

Werte stellen die Basis der Berechnungen der relativen Genexpression in den entsprechenden Proben dar.

3.7.5.2 Protokoll

Für die quantitative PCR wurde das „FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I“-Kit der Firma Roche verwendet. Dieses Kit enthält eine speziell für den LightCycler geeignete FastStart Taq DNA-Polymerase sowie den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green I. Bei Raumtemperatur ist ihre Polymeraseaktivität inaktiv. Erst durch einen Inkubationsschritt über 10min bei 95°C wird sie aktiviert (sog. „Hot start“-Technik). Eine Amplifikation unspezifischer Primerbindungen bei niedrigen Temperaturen wird somit weitgehend verhindert.

Der Inkubationsansatz:

- 5µl H₂O
- 0,5µl spezifischer Primer-Mix (10pmol jeder Primer)
- 2µl Master-Mix (5x konzentriert)

Anschließend wurde der Mix in eine Kapillare pipettiert und 2,5µl des cDNA-Templates (1:10 verdünnt) zugegeben. Die Kapillaren wurden nach einer Zentrifugation bei 2500rpm für 15sec in das LightCycler-Karussell überführt und die PCR wurde gestartet. Zunächst erfolgte die Denaturierung bei 95°C über 10 Minuten, daraufhin 45-50 Zyklen für jeweils 10 Sekunden zur Amplifikation der DNA-Produkte bei primerspezifischer Temperatur und im Anschluss daran die Schmelzkurvenanalyse. (Die verwendeten Primer s. 7.3.1).

3.7.6 Relative Quantifizierung

3.7.6.1 Auswertung Schmelzkurvenanalyse

Für die relative Quantifizierung der PCR-Produkte muss zunächst die Spezifität der Produkte überprüft werden. Hierzu wurde eine Schmelzkurvenanalyse verwendet.

Die PCR-Produkte wurden dabei einem Temperaturgradienten ausgesetzt und das Fluoreszenz-Signal erhoben. Abhängig von der Sequenz und der Länge der Nukleinsäuren zerfällt das doppelsträngige PCR-Produkt bei einer bestimmten Temperatur, der Schmelztemperatur, in seine zwei Einzelstränge, infolge dessen der SYBR-Green-Farbstoff seine Assoziation zur DNA verändert und es zu einer sofortigen Abnahme des Fluoreszenz-Signales kommt. Es wurde geprüft, ob der Schmelzpunkt des Produktes mit dem durch

Etablierungsversuche bestimmten Schmelzpunkt übereinstimmt. Somit können unspezifische Produkte, wie zusammengelagerte Primer, in den Proben festgestellt werden.

3.7.6.2 Referenzgen (Housekeeping gene)

Es wurde der Elongation factor 1 α (EF1- α) als „housekeeping gene“ verwendet. Dieser Faktor, der in der Elongationsphase der Zellteilung vorkommt, wird in allen menschlichen Geweben und Zelltypen gleichmäßig exprimiert und eignet sich daher als Referenzgen („housekeeping gene“)

3.7.6.3 Bestimmung der relativen Expression

Die Bestimmung der relativen Expression der zu untersuchenden Gene wurde mit Hilfe der $\Delta\Delta Ct$ -Methode [80] s.u. vorgenommen.

In der vorliegenden Arbeit wurden von jedem Patienten implantatnahe und implantatferne Proben verwendet. Die untersuchten Gene wurden als Targetgene („gene of interest“) und als Referenzgene („housekeeping gene“ zur Normalisierung der Expressionsrate der Targetgene) verwendet. Die Quantifizierung erfolgt über die Berechnung der Expressionsrate des Zielgenes in einer implantatnahen Probe im Vergleich zur Expressionsrate des gleichen Targetgens in der korrespondierenden implantatfernen Probe anhand der aus der qPCR ermittelten Ct-Werte (siehe 3.7.5). Dabei wurden die Expressionsraten der beiden korrespondierenden implantatnahen und -fernen Proben im Vergleich wiederum zu den Expressionsraten der Referenzgene der entsprechenden Proben normalisiert. Die Effizienz des jeweiligen Primers wurde anhand von Standardgeraden ermittelt.

Die Berechnung der normalisierten, relativen Expression eines Zielgenes einer implantatnahen Probe im Vergleich zu der korrespondierenden implantatfernen Probe erfolgt mit folgender Formel:

$$\text{Relative Expressionsrate} = E_T^{TargC - CpTargS} \times E_{RefCp}^{RefS - CpRefC}$$

E_T : Effizienz des jeweiligen Primer

TargC := Ct-Werte des Targetgenes der implantatfernen Probe

TargS := Ct-Werte des Targetgenes der implantatnahen Probe

RefC := Ct-Werte des Referenzgenes der implantatfernen Probe

RefS := Ct-Werte des Referenzgenes der implantatnahen Probe

Eine relative Expressionsrate von 2 bedeutet somit, dass in der implantatnahen Probe doppelt so viele Kopien an mRNA des Targetgenes vorliegen wie in der implantatfernen Probe unter Einbeziehung einer Normalisierung durch das Referenzgen. Eine relative Expressionsrate von 0,5 bedeutet, dass in der implantatnahen Probe halb so viele Kopien an mRNA des Genes vorliegen wie in der implantatfernen Probe.

Für die Berechnung der relativen Expressionsrate der Zytokine der Gewebeproben aus ECT-Stanzen wurde als „Fernwert“ jeweils der Mittelwert der Ct-Werte der zwei ECT-negativen Stanzen verwendet.

3.8 *Statistische Auswertung*

Statistische Auswertung WOMAC-Scores

Es wurde der Kolmogoroff-Smirnov-Test zur Überprüfung auf Normalverteilung des Gesamtscores und der Subscores durchgeführt, es lag in allen Fällen kein signifikanter Unterschied zur Normalverteilung vor, die Ergebnisse werden daher als normalverteilt angenommen. Zur Testung auf Unterschiede konnte daher der t-Test angewandt werden.

Statistische Auswertung Zytokinexpressionsraten

Die Messergebnisse liegen einerseits metrisch als relative Expressionsrate vor, andererseits auch nominal als erhöhte Expression (Expressionsrate > 1) beziehungsweise nicht erhöhte Expression (Expressionsrate ≤ 1).

Es wurde der Kolmogoroff-Smirnov-Test zur Überprüfung auf Normalverteilung der metrischen und nominalen Zytokinmessergebnisse durchgeführt, es lag in allen Fällen ein signifikanter Unterschied zur Normalverteilung vor, die Ergebnisse sind daher nicht normalverteilt.

Zur Testung auf Unterschiede zwischen metrischen Zytokinexpressionsraten wurden der Mann-Whitney-U-Test (für zwei unabhängige Proben, nicht normalverteilt, Rangzahlen), sowie des weiteren zum Nachweis von Korrelationen zwischen zwei Zytokinexpressionsraten der Korrelationskoeffizient bestimmt.

Zur Testung auf Unterschiede zwischen der nominalen Expression (erhöht/nicht erhöht), die nicht von Extremwerten beeinflusst wird, wurde der Chi-Quadrat-Test angewendet.

4 Ergebnisse

4.1 Fragebogen-Ergebnisse

Aus der Fragebogen-gestützten Anamnese „Fragebogen zur Metallverträglichkeit“ (siehe Anhang) werden die Angaben zu den Beschwerden wiedergegeben. Der WOMAC-Fragebogen wird im Folgenden als Gesamt-Score und nach einzelnen Kriterien angegeben. Zusätzlich erfolgt die Gegenüberstellung von präoperativen und postoperativen Angaben.

4.1.1 Beschwerdebild der Patientengruppen und des Kontrollkollektivs

Bei Knie-Endoprothesen tragenden Patienten wurden die in den folgenden Tabellen aufgeführten Beschwerden erhoben, teils erfolgten Mehrfachnennungen:

Tabelle 4-1 Beschwerdebild der 11 Patienten mit ECT+ (Patientenkollektiv I)

Beschwerden	Anzahl	%
Schmerz	10	90,9
Schwellung	8	72,2
Rötung	2	18,2
Ekzem	1	9,1
Erguss	5	45,5
Reduzierte Beweglichkeit	5	45,5
Verdacht auf Lockerung	1	9,1

Tabelle 4-2 Beschwerdebild der 9 Patienten mit ECT- und LTT+ (Patientenkollektiv II)

Beschwerden	Anzahl	%
Schmerz	8	88,4
Schwellung	7	77,8
Rötung	1	11,1
Ekzem	1	11,1
Erguss	4	44,4
Reduzierte Beweglichkeit	6	66,7
Verdacht auf Lockerung	1	11,1

Tabelle 4-3 Beschwerdebild der 12 Patienten mit Gonarthrose vor Endoprothetik (Kontrollkollektiv)

Beschwerden	Anzahl	%
Schmerz	11	91,6
Schwellung	9	75
Rötung	1	8,3
Ekzem	0	0
Erguss	2	16,6
Reduzierte Beweglichkeit	10	83,3

4.1.2 WOMAC-Ergebnisse

Die WOMAC-Fragebögen der Patienten- und des Kontrollkollektives wurden jeweils vor der Probeentnahme erhoben, beim Patientenkollektiv auch nochmals mindestens drei Monate nach der Revisionsoperation bzw. Arthroskopie. Von den insgesamt 20 Knie-TEP-Patienten der Patientenkollektive konnten 19 Fragebogen ausgewertet werden, ein Fragebogen wurde leider nur unzureichend ausgefüllt und konnte daher nicht ausgewertet werden. Von den insgesamt zwölf „Knie-Kontrollpatienten“ (vor der erstmaligen Endoprothetik) konnten alle zwölf Fragebögen ausgewertet werden. Da die WOMAC-Werte normalverteilt sind, wurden die Signifikanzen mit Hilfe des t-Testes ermittelt.

4.1.2.1 Vergleich der präoperativen WOMAC-Werte von Patientenkollektiven und Kontrollkollektiv

Tabelle 4-4 Gesamt-WOMAC-Score in den beiden Patientenkollektiven und dem Kontrollkollektiv (Patienten vor erstmaliger Knie-Endoprothetik)

PRÄ-OP	N	Min	Max	Median	Mittelwert	Standardabweichung
Patientenkollektiv I	11	21,8	68,2	40,9	39,9	12,7
Patientenkollektiv II	8	12,1	89,1	34,1	39,1	23,5
Kontrollkollektiv	12	21,8	95,3	50,9	48,9	22,6

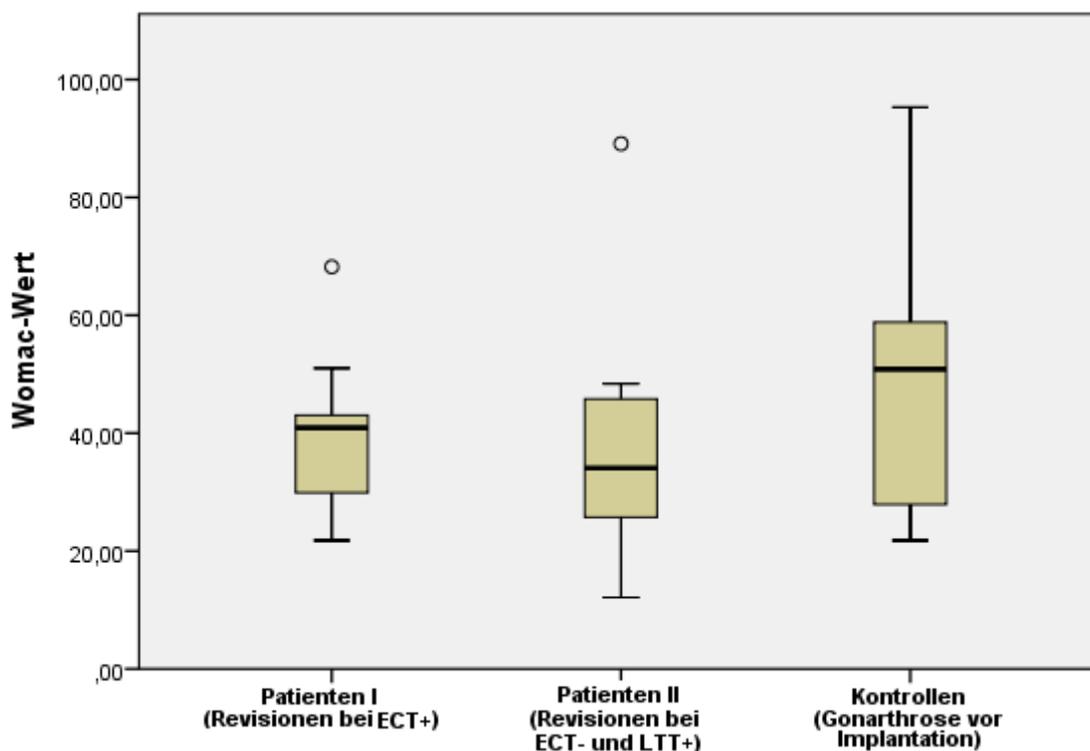


Abbildung 4-1 Vergleich der WOMAC-Werte präoperativ der Kollektive

Der Unterschied zwischen den Patienten- und Kontroll-Kollektivwerten ist nicht signifikant ($p=0,285/0,359$). Auch die Werte der einzelnen Teilbereiche des Fragebogens zeigten im Vergleich Patientenkollektive mit Kontrollkollektiv keine signifikanten Unterschiede.

4.1.2.2 Vergleich der prä- und postoperativen WOMAC-Werte der Patientenkollektive

Im Patientenkollektiv I erhielten zwei Personen einen Wechsel auf eine Kobalt-Chrom-Endoprothese und vier Personen eine Prothese mit einem hypoallergenen Material (3x Titan-Beschichtung, 1x OXINIUM®-Beschichtung), zwei Patienten schlussendlich lediglich eine Arthroskopie. Von drei Patienten gab es keine Rückmeldung (diese Patienten waren entweder unbekannt verzogen oder wollten keine weiteren Angaben mitteilen).

Im Patientenkollektiv II erhielt ein Patient eine Arthroskopie, ein Patient einen Wechsel auf eine Kobalt-Chrom-Endoprothese und fünf eine Prothese mit einem hypoallergenen Material (4x Titan-Beschichtung, 1x OXINIUM®-Beschichtung). Von zwei Patienten gab es keine Rückmeldung, (diese Patienten waren entweder unbekannt verzogen oder wollten keine weiteren Angaben mitteilen).

Im Folgenden werden die prä- und post-operativen Ergebnisse der Patienten mit Wechsel auf ein hypoallergenes Endoprothesenmaterial verglichen. Die Auswertung erfolgt deskriptiv, eine statistische Auswertung ist aufgrund der sehr kleinen Patientenzahl nicht möglich.

Gesamtscore-Ergebnis:

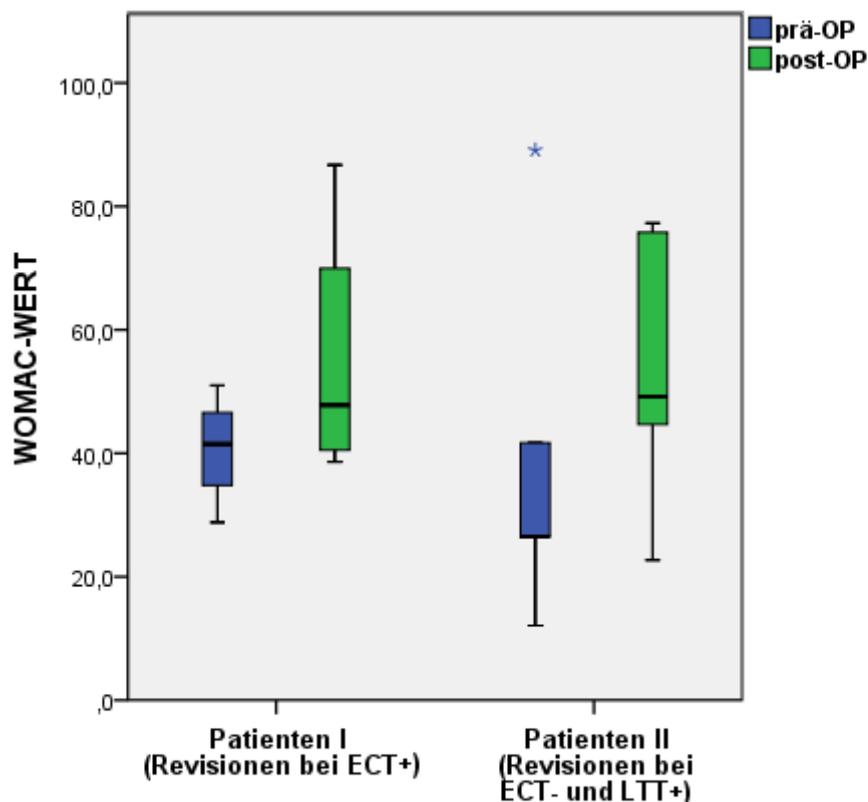


Abbildung 4-2 Erfolg der Revisionsoperation auf den „Gesamt-WOMAC-Score“

Tabelle 4-5 Tabelle Veränderung „Gesamt-WOMAC-Score“ bei Patienten mit Wechsel auf hypoallergenes Material prä- zu postoperativ

GESAMTSKORE	Patientenkollektiv I	Patientenkollektiv II
Verbesserung	2	4
kein Unterschied	2	0
Verschlechterung	0	1

Im Patientenkollektiv I zeigen zwei Patienten eine Verbesserung ihrer Gesamt-WOMAC-Scores (Verbesserung bedeutet einen Anstieg des Scorewertes um mindestens 10%), zwei zeigten keine Veränderung ihrer Gesamt-WOMAC-Scores (kein Unterschied bedeutet, dass der post-Op-Wert um weniger als 10% um den prä-Op-Wert variiert). Die 25%, 50% und 75%

Quartile zeigen jeweils postoperativ einen höheren Wert als präoperativ auf. Im Patientenkollektiv II zeigen vier Patienten eine Verbesserung und ein Patient eine Verschlechterung des postoperativen-Wertes gegenüber dem präoperativen Wert (Verschlechterung bedeutet einen Abfall des Score-Wertes um mindestens 10%). Dieser Patient hatte im präoperativen-Wert einen sehr hohen Wert (89,1), der im postoperativen-Wert auf 75,8 gesunken ist; dieser Patient hat sich in allen Teilscores leicht verschlechtert, zeigt bei seinen postoperativen-Ergebnissen im Kollektivvergleich jedoch immer noch hohe Werte. Bei diesem Patienten lagen rezidivieren Ergüsse und eine Prothesenlockerung vor, wobei die subjektiven Beschwerden des Patienten eher gering waren.

Tendenziell geht es beiden Patientenkollektiven somit nach der Revisionsoperation eher besser.

Um besser die Veränderung der Patientenkollektive aufgrund der Revisionsoperation einschätzen zu können, wurden auch die einzelnen Abschnitte des WOMAC-Fragebogens (Teilscores) ausgewertet:

Teilscore Beweglichkeit:

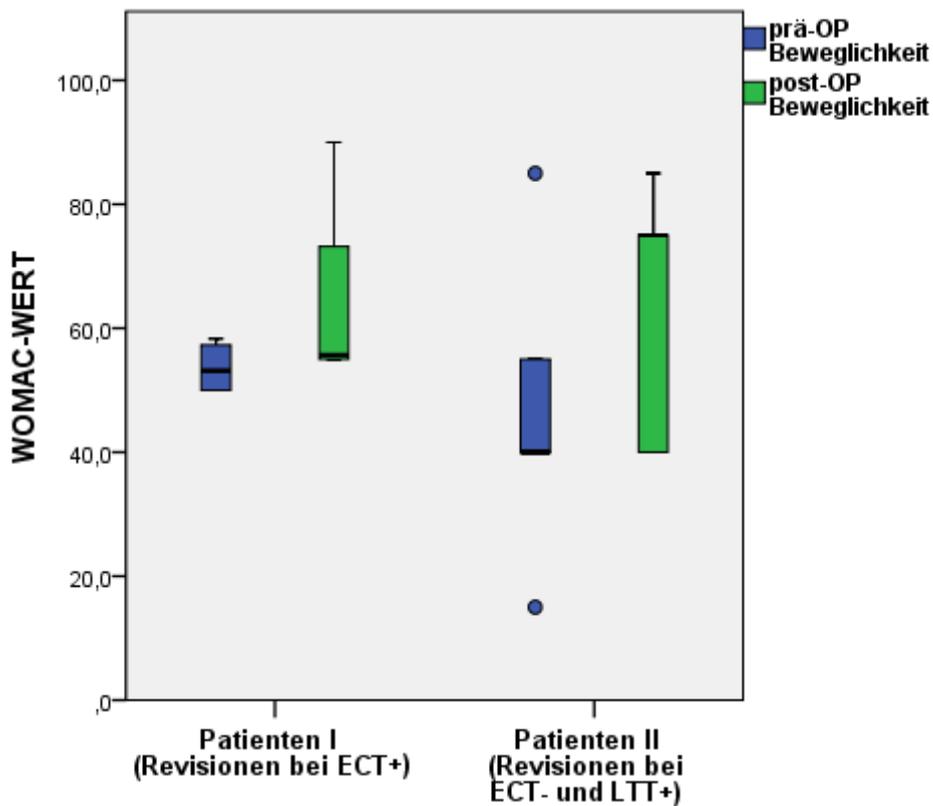


Abbildung 4-3 Vergleich „Beweglichkeit“ im WOMAC-Score prä- zu postoperativ

Tabelle 4-6 Veränderung „Beweglichkeit“ im WOMAC-Score prä- zu postoperativ

BEWEGLICHKEIT	Patientenkollektiv I	Patientenkollektiv II
Verbesserung	2	3
kein Unterschied	2	1
Verschlechterung	0	1

Der Teilscore Beweglichkeit des Patienten zeigt ein ähnliches Ergebnis wie der der Gesamt-Score: Im Patientenkollektiv I zeigen zwei Patienten eine Verbesserung, zwei keinen Unterschied, im Patientenkollektiv II zeigen drei Patienten eine Verbesserung, einer keinen Unterschied und ein Patient eine Verschlechterung. Der Patient, welcher sich verschlechtert hat, hatte den bereits erwähnten schon sehr hohen präoperativen Wert.

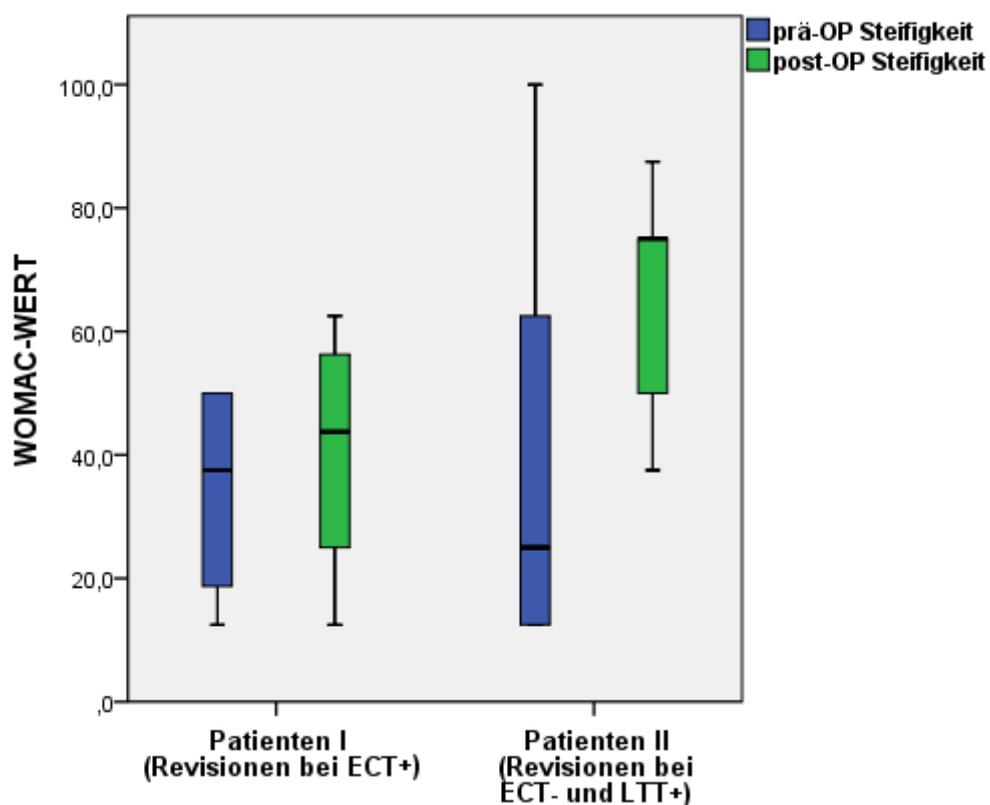
Teilscore Steifigkeit:

Abbildung 4-4 Vergleich „Steifigkeit“ im WOMAC-Score prä- zu postoperativ

Tabelle 4-7 Veränderung „Steifigkeit“ im WOMAC-Score prä- zu postoperativ

STEIFIGKEIT	Patientenkollektiv I	Patientenkollektiv II
Verbesserung	1	4
kein Unterschied	2	0
Verschlechterung	1	1

Im Teilscore Steifigkeit zeigen sich Unterschiede in den Patientenkollektiven: Im Patientenkollektiv I zeigen sich kaum Unterschiede im prä- und postoperativen-Vergleich (Median 37,5 vs. 43,9). Nur ein Patient hat sich verbessern können, zwei bleiben unverändert, einer verschlechtert sich.

Im Patientenkollektiv II zeigen vier Patienten eine Verbesserung, einer eine Verschlechterung, dieser Patient wurde bereits in beiden vorhergehenden Graphiken erläutert.

Teilscore Schmerz:

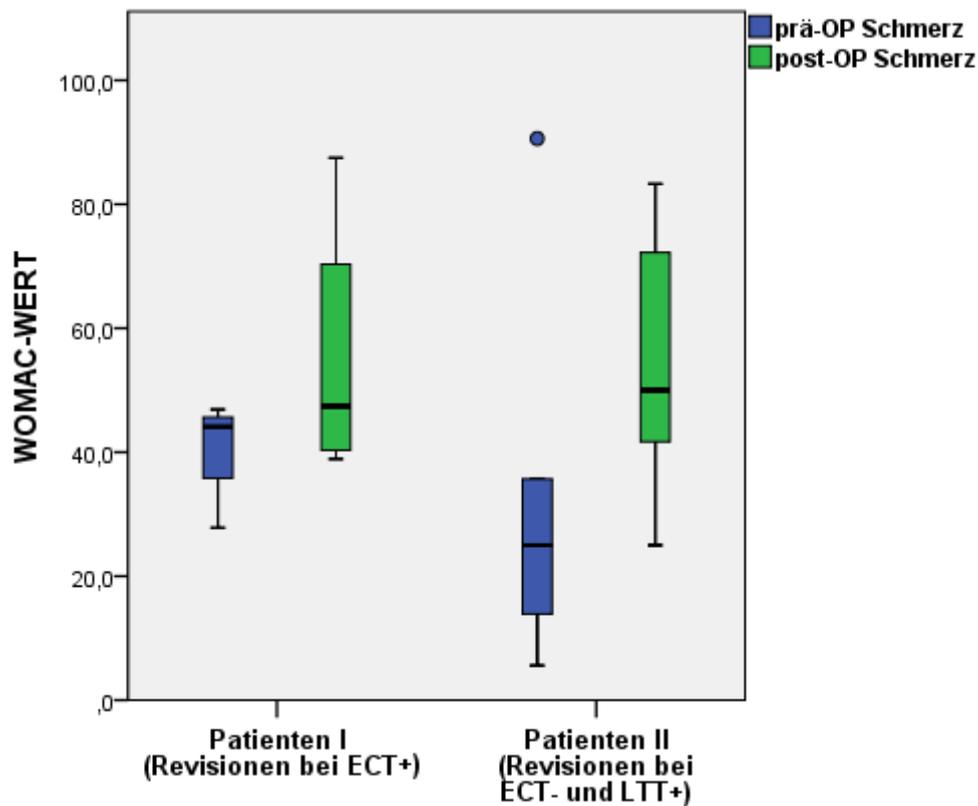


Abbildung 4-5 Vergleich Schmerzen im WOMAC-Score prä- zu postoperativ

Tabelle 4-8 Veränderung Schmerzen im WOMAC-Score prä- zu postoperativ

SCHMERZ	Patientenkollektiv I	Patientenkollektiv II
Verbesserung	3	4
kein Unterschied	1	1
Verschlechterung	0	0

In beiden Patientenkollektiven zeigt sich eine Verbesserung der Schmerzsymptomatik der Patienten. In diesem Teilscore zeigt nur jeweils ein Patient je Patientenkollektiv keine Veränderung, die verbleibenden sieben Patienten zeigen eine Verbesserung der Schmerzsymptomatik. Die 25%, 50% und 75%-Quartile sind in beiden Kollektiven im postoperativen zum präoperativen-Wert erhöht.

Teilscore Aktivität

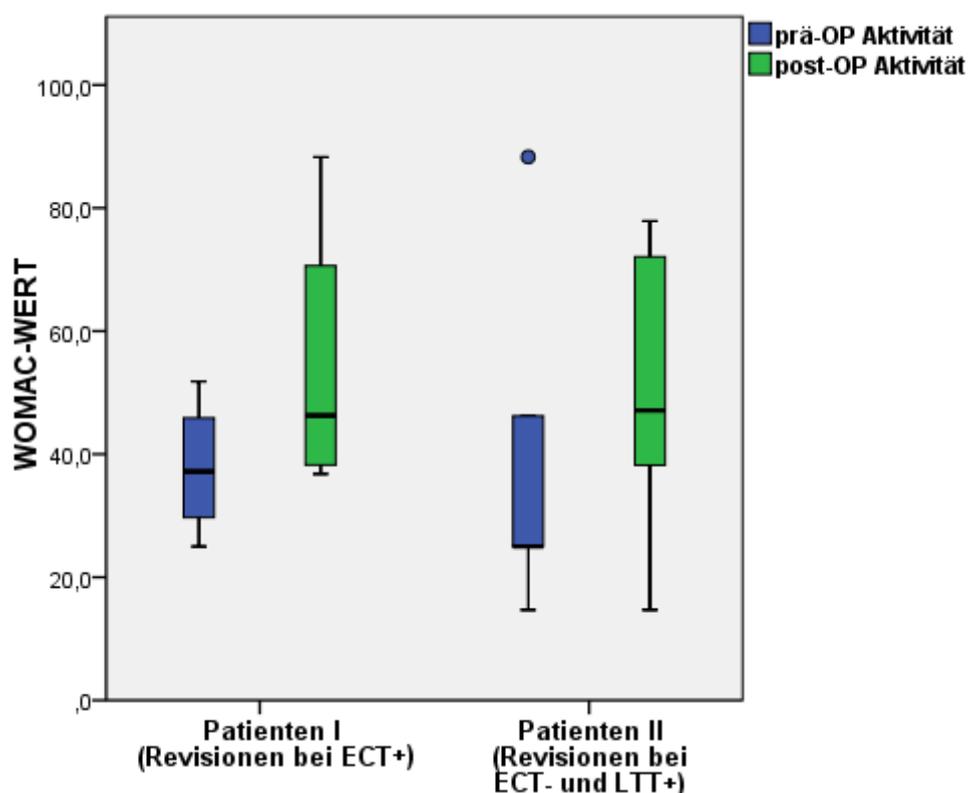


Abbildung 4-6 Vergleich Aktivität im WOMAC-Score prä- zu postoperativ

Tabelle 4-9 Veränderung Aktivität im WOMAC-Score prä- zu postoperativ

AKTIVITÄT	Patientenkollektiv I	Patientenkollektiv II
Verbesserung	3	2
kein Unterschied	1	1
Verschlechterung	0	2

Im Teilscore Aktivität zeigen im Patientenkollektiv I 3 Patienten eine Verbesserung, einer keinen Unterschied, im Patientenkollektiv II zeigen 2 eine Verbesserung, einer keinen Unterschied und 2 Patienten eine Verschlechterung. Im Patientenkollektiv I ist der Median beinahe unverändert (37,2 zu 38,25), die 75% Quartile steigt jedoch. Im Patientenkollektiv II sind alle Quartile erhöht.

Zusammenfassend lässt sich feststellen (mit Einschränkung der kleinen Fallzahl), dass ein Großteil der Patienten in beiden Patientenkollektiven von der Revisionsoperation im subjektiven Empfinden (WOMAC-Fragebogen) profitiert hat. Insbesondere im Teilscore

Schmerzen, der für die Patienten wahrscheinlich der wichtigste Parameter ist, hat sich kein Patient verschlechtert. Über 75% haben in der Schmerzsymptomatik von der Revisionsoperation profitiert.

Ein Patient im Patientenkollektiv II zeigte sehr hohe präoperative-Werte, was auf kaum subjektive Beschwerden mit dem Implantat hinweist, bei diesem Patienten machten rezidivierende Ergüsse und eine Implantatlockerung eine Revisionsoperation notwendig. Postoperativ zeigt dieser Patient, wie bereits oben erwähnt, in mehreren Teilscores schlechtere Werte als zuvor, aber im Vergleich zu den anderen Studienpatienten immer noch recht hohe Werte, also weiterhin eine subjektive Zufriedenheit.

4.2 Bakteriologische Untersuchung

Die bakteriologische Untersuchung erfolgte freundlicherweise durch Dr. Frommelt in Kooperation mit Labor Dr. Fenner und der Endo-Klinik in Hamburg. Es wurden jeweils zwei bis drei Gewebeproben in sterilen BBL Port-A-Cul Tubes nach Hamburg verschickt. Die Proben wurden dort 14 Tage bebrütet um ein mögliches Keimwachstum festzustellen. Alle Patientenproben zeigten nach 14-tägiger Bebrütung kein Bakterienwachstum.

4.3 Histologische Untersuchung

Es lagen vor: Proben von periimplantärem Gewebe (Kniegelenk) (Kollektiv I und II) der 20 Patienten mit einliegender Endoprothese; Gewebeproben von 12 Personen aus arthrotischem Gelenk (Kontrollkollektiv), entnommen zum Zeitpunkt der erstmaligen Endoprothesen-Implantation; von 8 Personen aus Epikutantestfeldern (6 Patienten mit je einer „Nickel-Stanze“, von einer Patientin wurde weiterhin eine „Kobalt-Stanze“ genommen, 2 Patienten mit je einer Stanze aus einem reaktionslosen Nickel-Epikutantestfeld). Die Beurteilung der Gewebeproben aus den Kniegelenken erfolgte anhand eines Beurteilungsschemas, das in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Krenn entwickelt wurde (siehe auch 3.6). Die Bewertungskriterien wurden für die hier gezeigten Auflistungen übernommen. In den folgenden vier Tabellen sind die Befunde zu den Kollektiven aufgeführt:

Patientenkollektiv I

Tabelle 4-10 Histologische Untersuchung Patientenkollektiv I

(ECT=Epikutantest, LTT= Lymphozytentransformationstest, Ni= Nickel, Ko= Kobalt, Cr= Chrom, Ge= Gentamycin, Be= Benzoylperoxid, CD3= T-Zell-Marker, KP1= Monozyten-/Makrophagenmarker, CD20= B-Zell-Marker, CD15= Granulozytenmarker, n.d.= nicht durchgeführt)

Pat.Nr.	Alter, Geschlecht	ECT-Reaktion	LTT- Reaktion	CD3-Infiltrat		KP1	CD20	CD15	histologische Beurteilung
				qualitativ	quantitativ				
10	37, m	Ni,Ko,Cr	n.d	mikronodal perivaskulär	+	++	-	-	Typ4
8	51, w	Ni	Ni,	mikronodal perivaskulär	++	+	-	-	Typ4
15	59, w	Ni	n.d.	mikronodal perivaskulär	++	++	+	-	Typ4
9	74, m	Ni,Ko	n.d.	makronodal perivaskulär	+++	++	-	-	Typ4
3	51, m	Ko	n.d.	diffus	-	+	-	-	Typ4
18	58, w	Ni	Ni	diffus	-	-	-	-	Typ1 (Nekrose)
7	75, m	Ni	Ni	diffus	+	++	-	-	Typ4
1	63, m	Ni,Ko,Ge,Be	Ni	diffus	+	++	+	+	Typ4
16	57, m	Ni,Ko	Ni	diffus	+	+	-	-	Typ4
17	68, m	Ni,Ko,Cr	n.d.	diffus	+	+	-	-	Typ4
19	56, w	Ni	n.d.	diffus	+	++	-	-	Typ1

Der Großteil der Proben (neun Proben) zeigt histologisch einen Indifferenztyp (Typ 4), nur zwei einen abriebinduzierten Typ (Typ1).

Patientenkollektiv II

Tabelle 4-11 Histologische Untersuchung Patientenkollektiv II mit Zytokinprofil

Nr.	Alter, Geschlecht	ECT- Reaktion	LTT- Reaktion	CD3-Infiltrat		KP1	CD20	CD15	histologische Beurteilung
				qualitativ	quantitativ				
11	61, m	neg	Ni	diffus	-	+	-	-	Typ4
12	65, w	neg	Ni	diffus	-	++	-	-	Typ1
14	66, m	neg	Ni,Ko	diffus	-	++	-	-	Typ4
2	71, m	neg	Ni	diffus	+	++	+	-	Typ1

Ergebnisse

Nr.	Alter, Geschlecht	ECT- Reaktion	LTT- Reaktion	CD3-Infiltrat		KP1	CD20	CD15	histologische Beurteilung
				qualitativ	quantitativ				
4	66, m	neg	Ni	diffus	+	+	-	-	Typ4
5	64, m	neg	Ni	diffus	+	+	-	-	Typ4
6	53 m	neg	Ni	diffus	+	++	-	-	Typ4
13	69, m	neg	Ni	diffus	+	-	-	-	Typ4
20	63, w	neg	Ni	diffus	+	++	-	+	Typ1

Es zeigen sechs Proben den histologischen Indifferenztyp (Typ 4), drei einen abriebinduzierten Typ (Typ1). Insgesamt fällt also bei den 20 Patienten (Kollektiv I und II) mit Verdacht auf Implantatallergie auf, dass 15 (= 75%) den histologischen Indifferenztyp zeigen; d.h. ein kollagenfaserreiches Bild ohne wesentliche Fremdkörperreaktionen – durchaus aber in Gegenwart von T-Zellen und Makrophagen.

Kontrollkollektiv

Tabelle 4-12 Histologische Untersuchung Kontrollkollektiv mit Zytokinprofil

Nr.	Alter, Geschlecht	CD3-Infiltrat		KP1	CD20	CD15	Beurteilung
		qualitativ	quantitativ				
1	66, w	mikronodal perivaskulär	+	-	++	-	Osteoarthrose
7	89, w	mikronodal perivaskulär	+	+	+	-	Osteoarthrose
2	71, w	mikronodal perivaskulär	++	+	++	-	Osteoarthrose
4	69, w	makronodal perivaskulär	++	+	++	-	Osteoarthrose
8	84, w	diffus	-	+	-	-	Osteoarthrose
10	69, w	diffus	-	+	-	-	Osteoarthrose
3	52, w	diffus	+	+	+	-	Osteoarthrose
5	63, w	diffus	+	+	+	-	Osteoarthrose
6	65, w	diffus	+	+	+	-	Osteoarthrose
9	69, w	diffus	+	-	+	-	Osteoarthrose
11	66, w	diffus	+	+	+	-	Osteoarthrose
12	67, m	diffus	+	+	+	-	Osteoarthrose

Alle Proben des Kontrollkollektives zeigen das histologische Bild einer Osteoarthritis.

T- und B-Lymphozyten sowie Makrophagen sind meist erkennbar, aber keine CD15+-Granulozyten. Wie im Patientenkollektiv I zeigen im Kontrollkollektiv drei Präparate ein mikronodal perivaskuläres CD3-Infiltratsmuster, eines ein makronodales perivaskuläres Infiltratsmuster, die restlichen Präparate ein diffuses CD3-Infiltratsmuster.

ECT-Kollektiv

Tabelle 4-13 Histologische Untersuchung ECT-Kollektiv mit Zytokinprofil

KA= Kontaktallergische Dermatitis

Nr.	Alter, Geschlecht	ECT- Reaktion	KP1	CD20	CD15	CD3	Beurteilung
1	62, w	Ni	n.d.	+	-	++	KA
2	66, w	Ni	+	+	-	++	KA
3	73, w	Ni	n.d.	+	-	++	KA
4	identisch mit 3.	Ko	n.d.	+	-	++	KA
5	58, w	Ni	+	+	-	++	KA
6	55, m	Ni	+	+	-	++	KA
7	50, w	Ni	n.d.	+	-	+	KA
8	72,w	keine	unauffällige Epidermis und Dermis				
9	60, m	keine	unauffällige Epidermis und Dermis				

In der Biopsie aus kontaktallergischen Epikutantestreaktionen war ein entsprechendes T-Zellinfiltrat erkennbar, Granulozyten (CD15+) fanden sich nicht.

Da sich in den meisten der periimplantären Gewebeproben sowohl im Patientenkollektiv I und II wie auch den Gonarthrosepatienten vor Implantation und der ECT-Biopsien T-/B-Zellinfiltrate zeigten, fragten wir nach möglichen funktionellen Unterschieden. Dementsprechend sind im nächsten Abschnitt die Zytokinexpressionswerte der Gewebeproben aufgeführt.

4.4 Zytokinexpressionswerte der Studienkollektive

Die Zytokinexpressionsraten der Studienkollektive (s. 3.7.6.3) werden im Folgenden zunächst in der Übersicht, dann nach Studienkollektiven getrennt gezeigt und anschließend die Expressionsraten der Studienkollektive verglichen:

4.4.1 Übersicht

Tabelle 4-14 Übersicht Zytokinexpression

	Gruppe	N	Minimum	Maximum	25. Perzentile	50. Perzentile(Median)	75. Perzentile
IFN γ	Patientenkollektiv I	11	0	5737,2	0,8	10,1	320,3
	Patientenkollektiv II	9	0	237,0	0	0	0,9
	Kontrollkollektiv	12	0	1284,0	0	0	1,9
	ECT+	7	38,5	175,7	56,7	117,4	135,0
TNF α	Patientenkollektiv I	11	0	288,1	0	1,7	9,8
	Patientenkollektiv II	9	0	32728,9	0,5	3,0	16,3
	Kontrollkollektiv	12	0	666,1	0	0,7	162,9
	ECT+	7	0,8	19,9	2,6	5,5	10,5
IL-10	Patientenkollektiv I	11	0	21,7	0	1,0	5,2
	Patientenkollektiv II	9	0,1	1,58E+8	0,1	2,1	31,8
	Kontrollkollektiv	12	0	30,1	0,1	0,2	3,4
	ECT+	7	0,4	38,7	0,6	1,0	4,5
TGFB β	Patientenkollektiv I	11	0,2	1006,8	1,3	2,4	8,7
	Patientenkollektiv II	9	0	2627,7	0,5	1,0	11,4
	Kontrollkollektiv	12	0,1	5,9	0,2	1,2	2,0
	ECT+	7	1,6	9,8	1,9	4,4	8,7
IL-2	Patientenkollektiv I	11	0	140,4	0	0	2,4
	Patientenkollektiv II	9	0	2,75E+6	0	0	19,6
	Kontrollkollektiv	12	0	469,4	0	0,6	48,7
	ECT+	7	4,0	196,5	20,3	37,5	173,6

Ergebnisse

	Gruppe	N	Minimum	Maximum	25. Perzentile	50. Perzentile(Median)	75. Perzentile
IL-6	Patientenkollektiv I	11	0	206,9	0	2,0	13,7
	Patientenkollektiv II	9	0	6872,3	2,0	6,1	23,9
	Kontrollkollektiv	12	0	1665,5	0	0,4	2,1
	ECT+	7	1,3	20,7	2,5	5,1	14,9
IL-8	Patientenkollektiv I	11	0	2124,6	2,1	5,9	173,0
	Patientenkollektiv II	9	0	48567,9	0,1	0,5	199,6
	Kontrollkollektiv	12	0	62500,1	0	0,6	7,8
	ECT+	7	0,9	493,7	1,8	5,2	24,7
IL-17	Patientenkollektiv I	11	0	5279,3	0	1,8	35,9
	Patientenkollektiv II	9	0	14322,8	0	0,9	76,2
	Kontrollkollektiv	12	0	9747,2	0,1	0,8	32,0
	ECT+	7	0	22,8	0	0,2	11,8
IL-18	Patientenkollektiv I	11	0	227,3	0,4	1,5	26,6
	Patientenkollektiv II	9	0	47922,8	0,5	1,7	12,7
	Kontrollkollektiv	12	0,1	60,3	0,6	1,1	2,3
	ECT+	7	0,3	10,2	1,1	1,3	1,6

Im Folgenden werden diese Daten innerhalb der einzelnen Studienkollektive genauer beschrieben.

4.4.2 Zytokinwerte nach Studienkollektiven getrennt

Die nachfolgenden Tabellen sind Übersichten über die Zytokinexpression der Studienkollektive. Für jeden Patienten ist die relative Expressionsrate der untersuchten Zytokine als erhöht (+) (relative Expressionsrate > 1) oder nicht erhöht (∅) beschrieben:

▪ Zytokinwerte Patientenkollektiv I

Tabelle 4-15 Übersicht über Zytokinexpression der Patientenproben

Probennr.	IFN γ	TNF α	IL10	TGF β	IL2	IL6	IL8	IL17	IL1 β
1	+	+	∅	+	∅	+	+	∅	+
3	+	+	∅	+	∅	+	+	∅	∅
7	∅	∅	∅	+	∅	∅	+	∅	+
8	+	+	+	+	∅	+	∅	+	+
9	+	∅	+	+	∅	∅	+	+	+
10	+	∅	∅	∅	+	∅	+	∅	∅
15	+	+	+	+	+	+	+	+	+
16	∅	∅	+	+	∅	+	+	+	+
17	∅	+	∅	+	+	+	+	+	∅
18	+	+	+	+	+	+	+	+	+
19	+	+	∅	+	∅	+	∅	∅	∅
erhöht in %	72,7	63,6	45,4	90,9	36,4	72,7	81,8	54,5	63,6

+ bedeutet erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate >1)

∅ bedeutet keine erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate \leq 1)

Es zeigt sich insbesondere eine deutliche Expression von IFN γ bei 72,2%, sowie von TGF β (90,9%), IL6 (72,2%) und IL8 (81,8%).

▪ Zytokinwerte Patientenkollektiv II

Tabelle 4-16 Übersicht über Zytokinexpression der Patientenproben

Probennr.	IFN γ	TNF α	IL10	TGF β	IL2	IL6	IL8	IL17	IL1 β
2	∅	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	∅
4	∅	+	+	+	∅	+	∅	+	+
5	∅	+	+	+	∅	+	+	+	+

Ergebnisse

Probennr.	IFN γ	TNF α	IL10	TGF β	IL2	IL6	IL8	IL17	IL1 β
6	∅	+	∅	+	∅	+	∅	∅	+
11	∅	∅	+	∅	∅	+	∅	∅	∅
12	∅	+	+	+	+	+	∅	∅	+
13	+	∅	∅	∅	∅	+	∅	+	+
14	∅	+	+	∅	∅	∅	+	+	+
20	+	∅	∅	∅	+	+	+	∅	∅
erhöht in %	22,2	55,6	55,6	44,4	22,2	88,9	44,4	44,4	66,7

+ bedeutet erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate >1)

∅ bedeutet keine erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate ≤1)

Es zeigt sich kaum eine Expression von IFN γ (nur 22,2 %), auch TGF β und IL 8 sind mit jeweils 44,4% seltener exprimiert als im Patientenkollektiv I. Eine deutliche Expression von IL6 (88,9%) fällt auf.

▪ Zytokinwerte Kontrollkollektiv Gonarthrose

Tabelle 4-17 Übersicht über Zytokinexpression der Kontrollproben

Probennr.	IFN γ	TNF α	IL10	TGF β	IL2	IL6	IL8	IL17	IL1 β
1	+	+	∅	+	∅	∅	+	+	∅
2	∅	+	∅	+	∅	∅	+	∅	+
3	∅	∅	+	+	∅	∅	∅	∅	∅
4	∅	+	+	+	∅	∅	+	+	+
5	+	+	∅	+	+	∅	+	+	∅
6	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	∅	+
7	+	+	∅	∅	+	+	∅	+	+
8	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	∅	∅
9	∅	∅	+	+	∅	∅	∅	+	+
10	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
11	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
12	∅	∅	+	∅	+	+	∅	∅	+
erhöht in %	25	41,7	41,7	50	41,7	33,3	33,3	41,7	50

+ bedeutet erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate >1)

∅ bedeutet keine erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate ≤1)

In diesem Kontrollkollektiv der Patienten mit Gonarthrose zeigt sich interessanterweise ein insgesamt heterogenes Bild an Expressionraten. Ein Teil der Patienten zeigt Erhöhungen von IL2 und IL6, der andere Teil eher von TGFβ und IL8.

▪ **Zytokinwerte ECT-Kollektiv**

Tabelle 4-18 Übersicht über Zytokinexpression der ECT-Stanzproben

Probennr	IFNγ	TNFα	IL10	TGFβ	IL2	IL6	IL8	IL17	IL1β
1	+	+	∅	+	+	+	+	∅	+
2	+	+	∅	+	+	+	+	+	+
3	+	+	∅	+	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	+	+	∅	+
5	+	+	+	+	+	+	+	∅	+
6	+	∅	∅	+	+	+	∅	∅	∅
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+
erhöht in %	100	85,7	42,9	100	100	100	85,7	42,9	85,7

+ bedeutet erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate >1)

∅ bedeutet keine erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate ≤1)

Dieses Kollektiv zeigt ein homogenes Zytokinexpressionsmuster bei dem insbesondere IL2 und IFNγ und TGFβ durchgängig erhöht sind.

▪ **Zusammenfassung Zytokinwerte nach Studienkollektiven getrennt**

Wie in Tabelle 4-19 gezeigt, waren bei den kontaktallergischen Epikutantestproben die typischen TH1-Zytokine IFNγ und IL2 erhöht. Es fällt weiterhin auf, dass speziell im Patientenkollektiv I häufig eine Expression von IFNγ auftrat.

Tabelle 4-19 Prozentuale Verteilung der erhöhten Zytokinwerte

erhöht in %	IFNγ	TNFα	IL10	TGFβ	IL2	IL6	IL8	IL17	IL1β	Im Durchschnitt erhöht
Patientenkollektiv I	72,7	63,6	45,4	90,9	36,4	72,7	81,8	54,5	63,6	64,6
Patientenkollektiv II	22,2	55,6	55,6	44,4	22,2	88,9	44,4	44,4	66,7	49,4
Kontrollkollektiv	25	41,7	41,7	50	41,7	33,3	33,3	41,7	50	39,8
ECT-Kollektiv	100	85,7	42,9	100	100	100	85,7	42,9	85,7	82,5

4.4.3 Vergleich der Studienkollektive

Einen statistischen Vergleich der Zytokinexpressionsraten in den Studienkollektiven zeigt das folgende Kapitel:

4.4.3.1 Vergleich Zytokinwerte der Studienkollektive

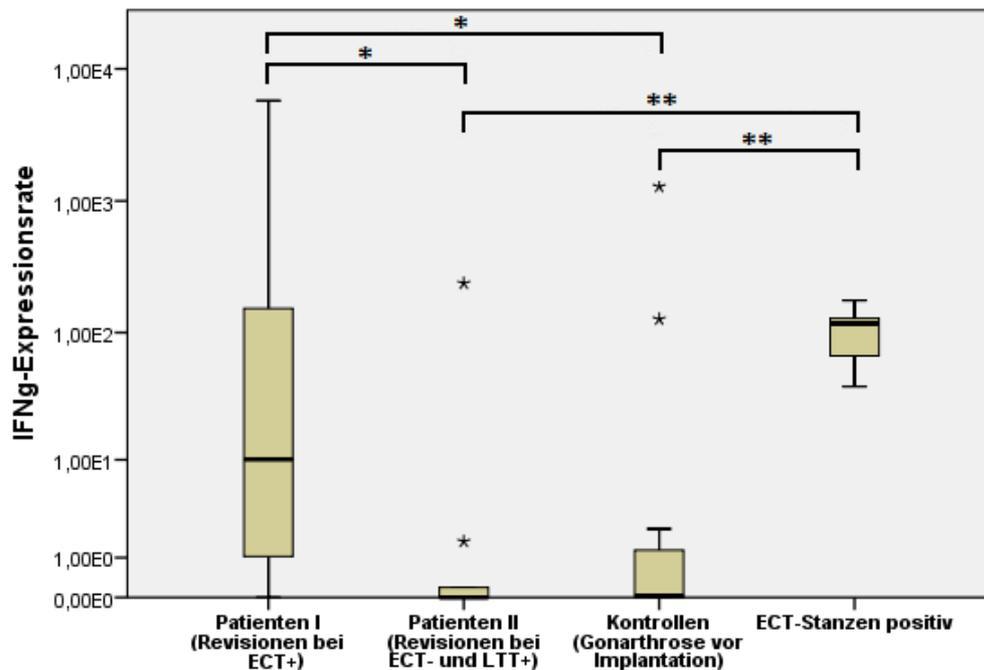


Abbildung 4-7 Vergleich der IFN γ -Expressionsraten (* = p < 0,05, ** = p < 0,01)

Folgende Unterschiede in der IFN γ -Expression in den Studienkollektiven zeigten sich signifikant: Patientenkollektiv I mit Patientenkollektiv II (p=0,012), Patientenkollektiv I mit Kontrollkollektiv (p=0,027), Patientenkollektiv II mit „ECT-Stanzen-Kollektiv“ (p=0,008) und das Kontrollkollektiv mit „ECT-Stanzen-Kollektiv“ (p=0,01).

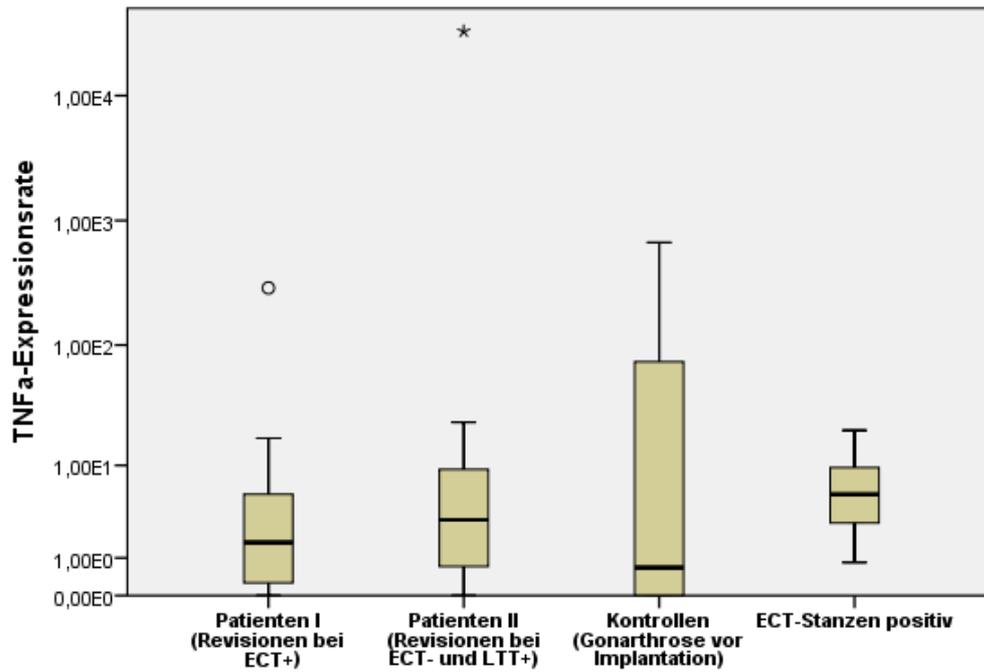


Abbildung 4-8 Vergleich der TNFα-Expressionsraten

Die Unterschiede zwischen den TNFα-Expressionsraten der Studienkollektive zeigten sich nicht signifikant.

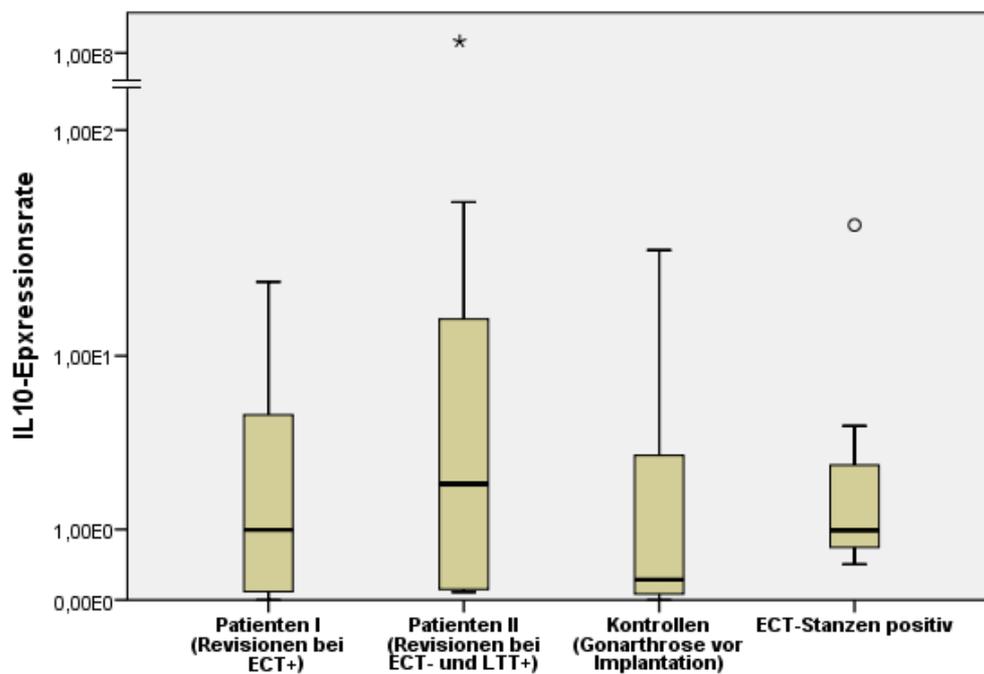


Abbildung 4-9 Vergleich der IL10-Expressionsraten

Die Unterschiede zwischen den IL10-Expressionsraten der Studienkollektive zeigten sich nicht signifikant.

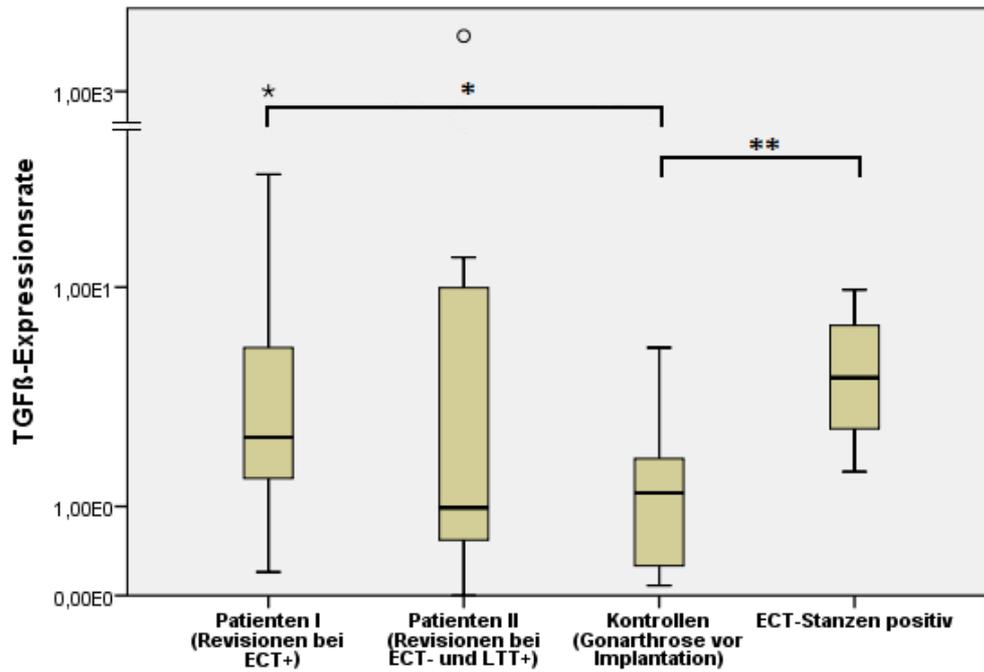


Abbildung 4-10 Vergleich der TGFβ-Expressionsraten

Folgende Unterschiede zwischen den TGFβ-Expressionsraten waren signifikant: Patientenkollektiv I mit Kontrollkollektiv ($p=0,036$) und Kontrollkollektiv mit ECT-Stanzen-Kollektiv ($p=0,007$).

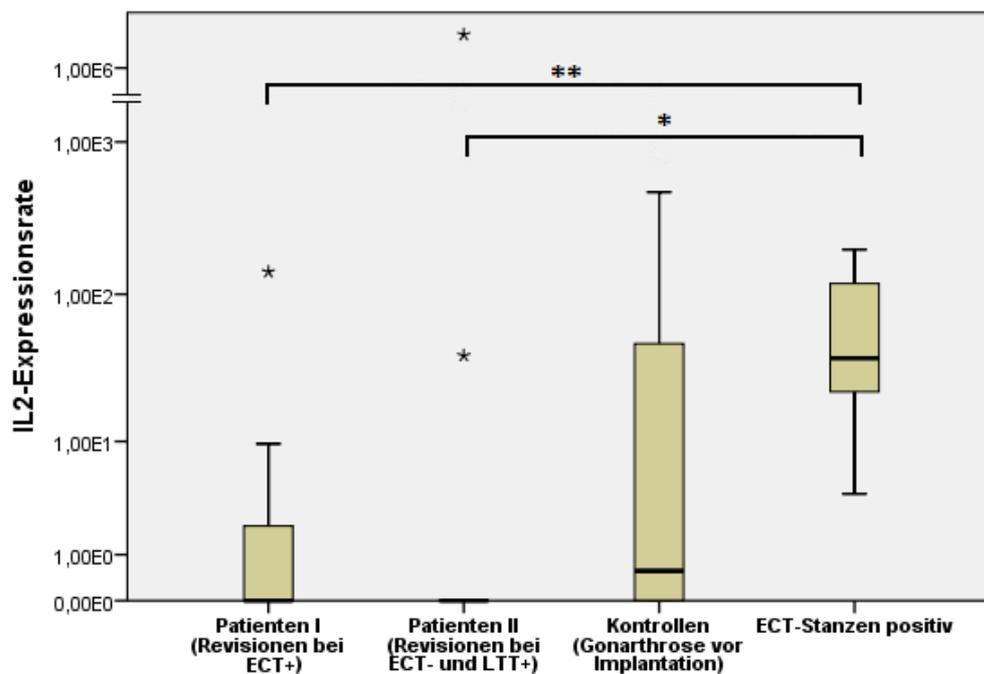


Abbildung 4-11 Vergleich der IL2-Expressionsraten

Folgende Unterschiede zwischen der IL2-Expressionsrate zeigen sich signifikant: Patientenkollektiv I mit ECT-Stanzen-Kollektiv ($p=0,002$) und Patientenkollektiv II mit ECT-Stanzen-Kollektiv ($p=0,023$).

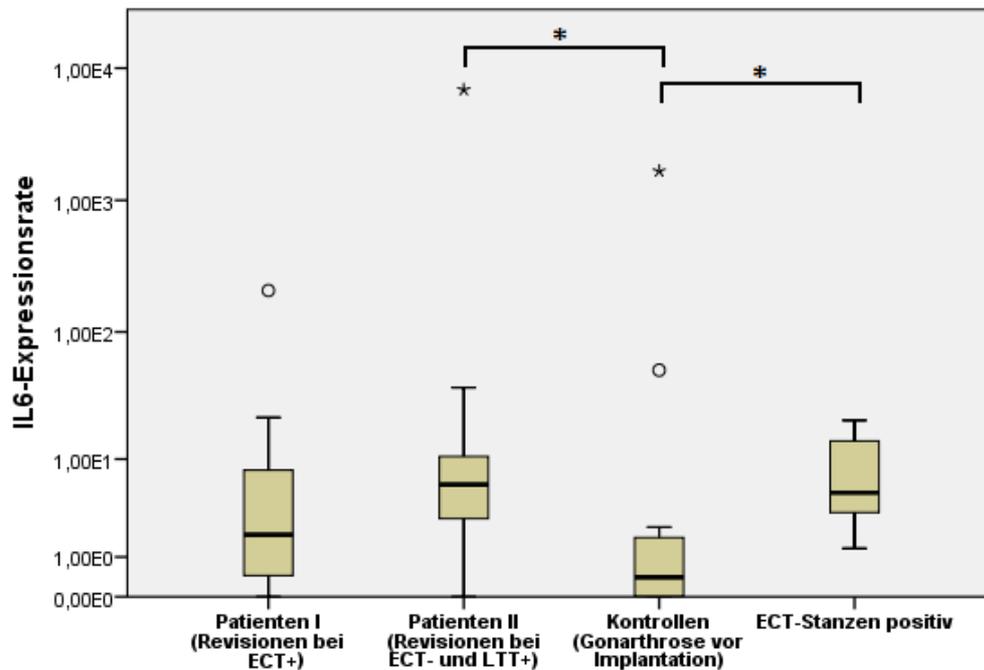


Abbildung 4-12 Vergleich der IL6-Expressionsraten

Als signifikant ergaben sich folgende Unterschiede zwischen der IL6-Expressionsrate: Patientenkollektiv II mit Kontrollkollektiv ($p=0,05$) und Kontrollkollektiv mit ECT-Stanzen-Kollektiv ($p=0,028$). Somit war bei Gonarthrosepatienten vor Endoprothetik eine eher geringe IL6-Expression zu sehen.

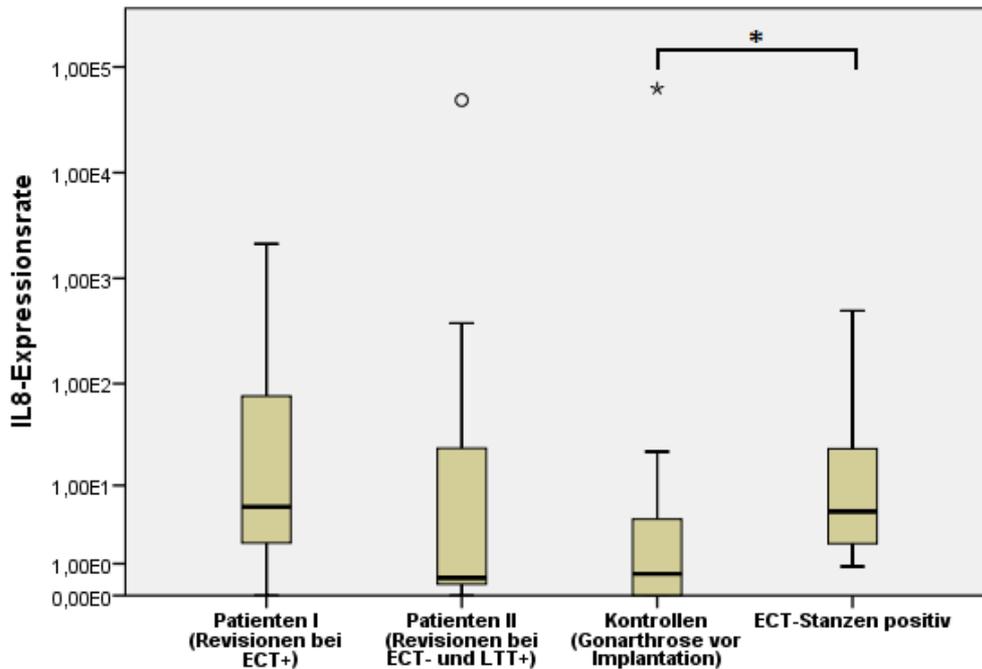


Abbildung 4-13 Vergleich der IL8-Expressionsraten

Der Unterschied zwischen der IL8-Expressionsrate von Kontrollgewebe und ECT-positiven Proben zeigte sich signifikant ($p=0,027$).

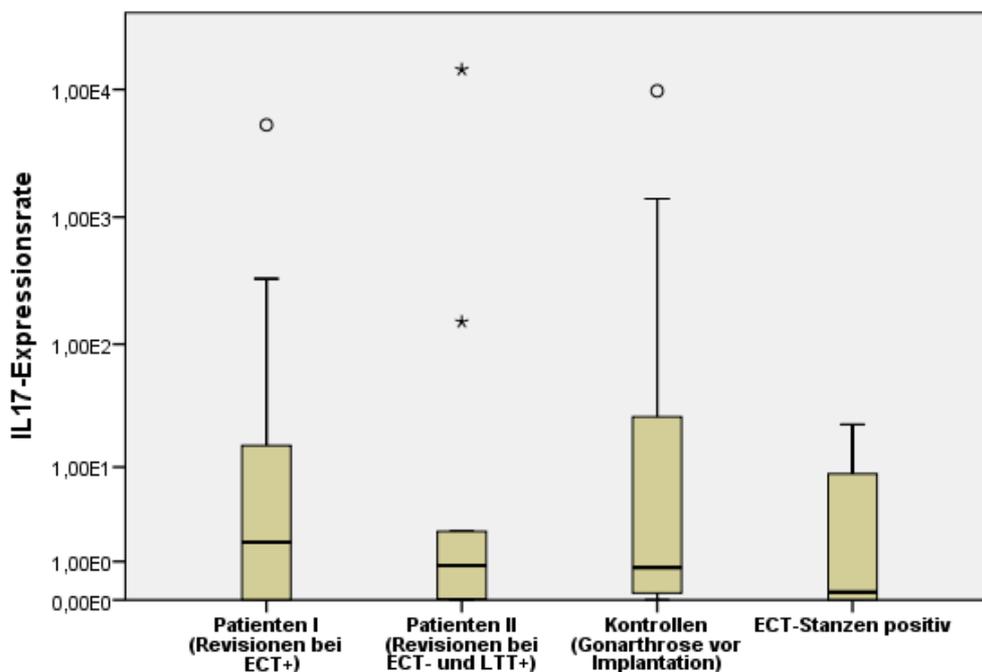


Abbildung 4-14 Vergleich der IL17-Expressionsraten

Die Unterschiede zwischen den IL17-Expressionsraten der Studienkollektive zeigten sich nicht signifikant, wobei allerdings eine teils deutliche interindividuelle Schwankung auftrat.

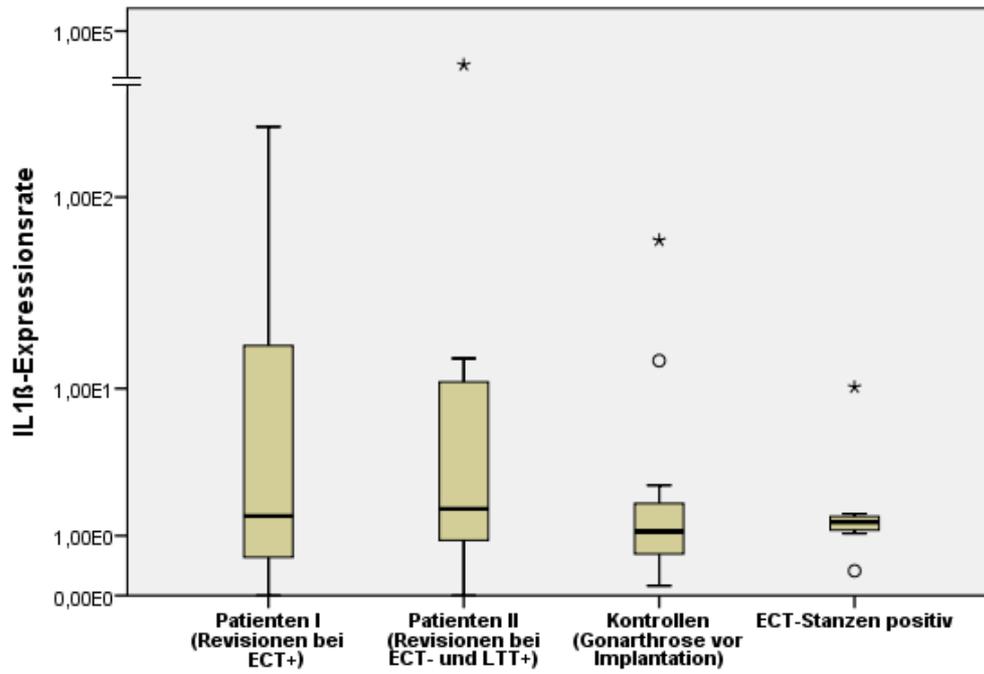


Abbildung 4-15 Vergleich der IL1β-Expressionsraten

Der Vergleich der IL1β-Expressionsraten der Studienkollektive ergab keine signifikanten Unterschiede.

4.5 Gegenüberstellung Histologie und Zytokinprofile und ausgewählte Fallbeispiele

4.5.1 Übersicht

Im Folgenden werden die Zytokinexpressionsraten der Patienten mit ihrer histologischen Befundung verglichen. Die Bewertungskriterien sind in den Kapiteln 3.6 und 4.4.2:

Patientenkollektiv I

4-20 Histologische Untersuchung Patientenkollektiv I mit Zytokinprofil

Nr	CD3-Infiltrat		KP 1	CD2 0	CD1 5	Typ	IFN γ	TNF α	IL1 0	TGF β	IL 2	IL 6	IL 8	IL1 7	IL1 β
	qualitativ	quantitativ													
10	mikronodal perivaskulär	+	++	-	-	Typ4	+	∅	∅	∅	+	∅	+	∅	∅
8	mikronodal perivaskulär	++	+	-	-	Typ4	+	+	+	+	∅	+	∅	+	+
15	mikronodal perivaskulär	++	++	+	-	Typ4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	makronodal perivaskulär	+++	++	-	-	Typ4	+	∅	+	+	∅	∅	+	+	+
3	diffus	-	+	-	-	Typ4	+	+	∅	+	∅	+	+	∅	∅
18	diffus	-	-	-	-	Typ1 (Nekrose)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	diffus	+	++	-	-	Typ4	∅	∅	∅	+	∅	∅	+	∅	+
1	diffus	+	++	+	+	Typ4	+	+	∅	+	∅	+	+	∅	+
16	diffus	+	+	-	-	Typ4	∅	∅	+	+	∅	+	+	+	+
17	diffus	+	+	-	-	Typ4	∅	+	∅	+	+	+	+	+	∅
19	diffus	+	++	-	-	Typ1	+	+	∅	+	∅	+	∅	∅	∅

Es zeigen 9 Proben den histologischen Indifferenztyp (Typ 4), 2 einen abriebinduzierten Typ (Typ1).

Alle Proben, bei denen das CD3-Infiltrat als perivaskulär nodal eingestuft wurde, zeigten molekularbiologisch eine IFN γ -Zytokinexpression >1, bei den als diffus eingestuften Proben 57%. Die TNF α -Zytokinexpression ist bei 50% der als perivaskulär nodal eingestuften Präparate, bei 71% der als diffus eingeschätzten Präparate erhöht. Es war in dieser Patientengruppe überraschend häufig ein mit „Fibrosierung“ einhergehendes Gewebemuster gezeigt worden und es fanden sich – in Erweiterung zu den vorab publizierten Veröffentlichungen auch bei diesem TypIV-Gewebemuster lymphozytäre Infiltrate. Hinzu kommt die häufige IFN γ -Expression.

Patientenkollektiv II

4-21 Histologische Untersuchung Patientenkollektiv II mit Zytokinprofil

Nr	CD3-Infiltrat		KP 1	CD2 0	CD1 5	Typ	IFN γ	TNF α	IL1 0	TGF β	IL 2	IL 6	IL 8	IL1 7	IL1 β
	qualitati v	quantitati v													
11	diffus	-	+	-	-	Typ 4	∅	∅	+	∅	∅	+	∅	∅	∅
12	diffus	-	++	-	-	Typ	∅	+	+	+	+	+	∅	∅	+
14	diffus	-	++	-	-	Typ 4	∅	+	+	∅	∅	∅	+	+	+
2	diffus	+	++	+	-	Typ	∅	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	∅
4	diffus	+	+	-	-	Typ 4	∅	+	+	+	∅	+	∅	+	+
5	diffus	+	+	-	-	Typ 4	∅	+	+	+	∅	+	+	+	+
6	diffus	+	++	-	-	Typ 4	∅	+	∅	+	∅	+	∅	∅	+
13	diffus	+	-	-	-	Typ 4	+	∅	∅	∅	∅	+	∅	+	+
20	diffus	+	++	-	+	Typ 1	+	∅	∅	∅	+	+	+	∅	∅

Es zeigen 6 Proben den histologischen Indifferenztyp (Typ 4), 3 einen abriebinduzierten Typ (Typ1).

Im Patientenkollektiv II wurde in keinem Präparat das potentielle CD3-Infiltrat als perivaskuläres Infiltrat eingestuft. Die IFN γ -Expression >1 fand sich bei 22%, die TNF α -Expression >1 bei 56% der Fälle.

Kontrollkollektiv

4-22 Histologische Untersuchung Kontrollkollektiv mit Zytokinprofil

Nr	CD3-Infiltrat		KP 1	CD2 0	CD1 5	Ty p	IFN γ	TNF α	IL1 0	TGF β	IL 2	IL 6	IL 8	IL1 7	IL1 β
	qualitativ	quantitati v													
1	mikronodal perivaskulä r	+	-	++	-	OA	+	+	∅	+	∅	∅	+	+	∅
7	mikronodal perivaskulä r	+	+	+	-	OA	+	+	∅	∅	+	+	∅	+	+
2	mikronodal perivaskulä r	++	+	++	-	OA	∅	+	∅	+	∅	∅	+	∅	+
4	makronoda l perivaskulä r	++	+	++	-	OA	∅	+	+	+	∅	∅	+	+	+
8	diffus	-	+	-	-	OA	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	∅	∅
10	diffus	-	+	-	-	OA	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
3	diffus	+	+	+	-	OA	∅	∅	+	+	∅	∅	∅	∅	∅
5	diffus	+	+	+	-	OA	+	+	∅	+	+	∅	+	+	∅
6	diffus	+	+	+	-	OA	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	∅	+
9	diffus	+	-	+	-	OA	∅	∅	+	+	∅	∅	∅	+	+
11	diffus	+	+	+	-	OA	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
12	diffus	+	+	+	-	OA	∅	∅	+	∅	+	+	∅	∅	+

OA=Osteoarthrose

Alle Proben des Kontrollkollektives zeigen das histologische Bild einer Osteoarthritis. Wie im Patientenkollektiv I zeigen im Kontrollkollektiv drei Präparate ein mikronodal perivaskuläres

CD3-Infiltratsmuster, eines ein makronodales perivaskuläres Infiltratsmuster, die restlichen Präparate ein diffuses CD3-Infiltratsmuster. Von den nodalen perivaskulären Präparaten zeigten 50% eine IFN γ -Expressionsrate >1 , von den diffusen 12,5%. Alle als perivaskulär nodal eingestuftten Präparate zeigen eine erhöhte TNF α -Expression auf, bei den als diffus eingestuftten Präparaten nur 12,5%.

4.5.2 CD3-Infiltrat und Zytokinexpression

Zur statistischen Auswertung wurden - um größere Kollektive zu erhalten - das mikronodal und das makronodal perivaskuläre Infiltrat als nodales perivaskuläres Infiltrat zusammengefasst.

Es sind nur Abbildungen mit statistischer Relevanz aufgeführt:

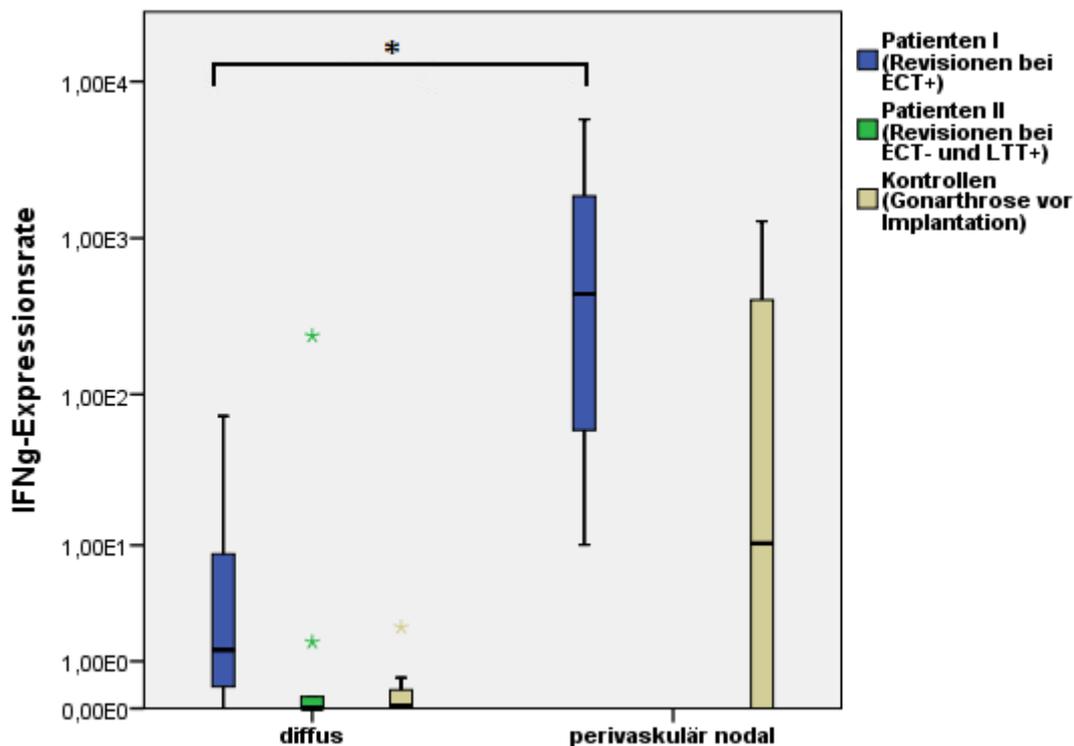


Abbildung 4-16 IFN γ -Expressionsrate und CD3-Profil

Es war insgesamt die erhöhte IFN γ -Expression speziell bei Patienten des Kollektiv I aufgefallen. Wir fragten daher, ob Unterschiede bestünden von „diffusem“ oder „nodal-perivaskulärem“ Infiltrat in Bezug auf die IFN γ -Expressionsrate.

Die IFN γ -Expression im Patientenkollektiv I zeigt sich bei den als diffuses CD3-Infiltrat bewerteten Proben signifikant geringer als bei den mit perivaskulär nodal bewerteten Proben (Median 1,36 vs. 461,7; $p=0,023$), während sich im Kontrollkollektiv dieser Unterschied als nicht signifikant ($p=0,47$) zeigt. Auch zeigten alle perivaskulären nodalen Infiltrate im Patientenkollektiv I eine mindestens 10,1-fache Expression im Gegensatz zu den nodalen Infiltraten im Kontrollkollektiv (Minimum 0).

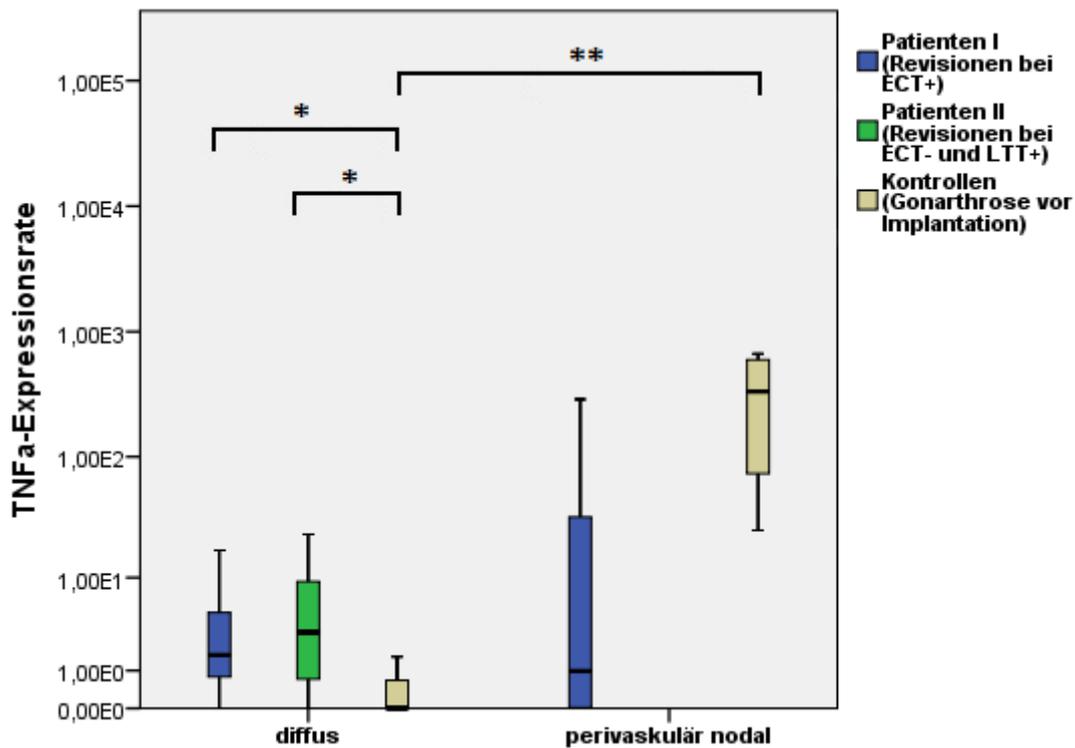


Abbildung 4-17 TNFα-Expressionsrate und CD3-Profil

Die TNFα-Expressionsraten der Patientenkollktive unterscheiden sich beim diffusen CD3-Infiltratsmuster signifikant vom Kontrollkollktiv ($p=0,02$ bzw. $0,016$). Die TNFα-Expressionsrate des Kontrollkollktivs ist weiterhin signifikant geringer bei diffusum Infiltratsmuster im Gegensatz zum perivaskulär nodalen Infiltratsmuster ($p=0,005$). Im Patientenkollktiv I gibt es kaum einen Unterschied zwischen perivaskulärem und diffusum Infiltratsmuster hinsichtlich der TNFα-Expression (Median $1,66$ vs. $1,44$).

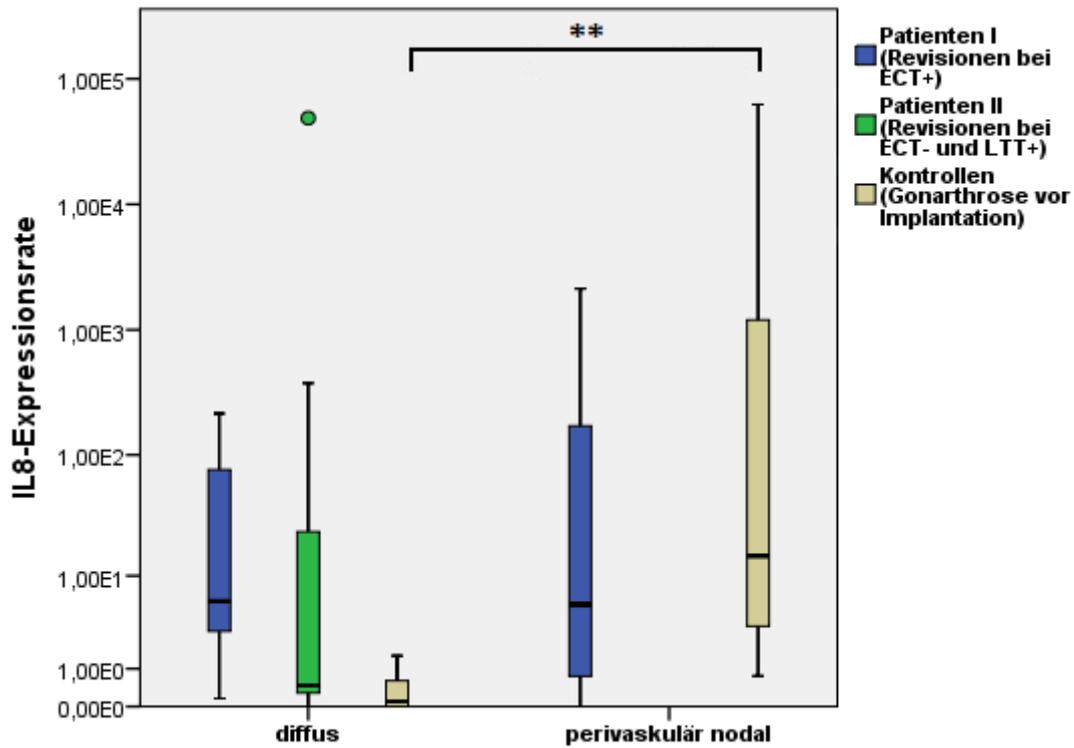


Abbildung 4-18 IL8-Expressionsrate und CD3-Profil

Die IL8-Expressionsrate des Kontrollkollektives ist signifikant geringer bei diffusem Infiltratsmuster im Gegensatz zum perivaskulär nodalen Infiltratsmuster ($p=0,01$). Im Patientenkollektiv I gibt es kaum einen Unterschied zwischen perivaskulärem und diffusem Infiltratsmuster hinsichtlich der $TNF\alpha$ -Expression (Median 5,9 vs. 7,47).

4.5.3 Fallbeispiele CD3-Infiltrat und Zytokinexpression

Im Folgenden werden beispielhaft drei Patienten aus den Studienkollektiven I und II beschrieben.

Erster Beispielpatient (Probennummer 20):

Patientenkollektiv II, 63 Jahre, weiblich, Knieendoprothese links, Scorpio®, Fa. Stryker Orthopaedics

Beschwerden: Schmerzen bei Belastung

Allergiediagnostik: ECT negativ, LTT Nickel positiv, LTT Kobalt und Chrom negativ

Histologie: Diffuses CD-3-Infiltrat

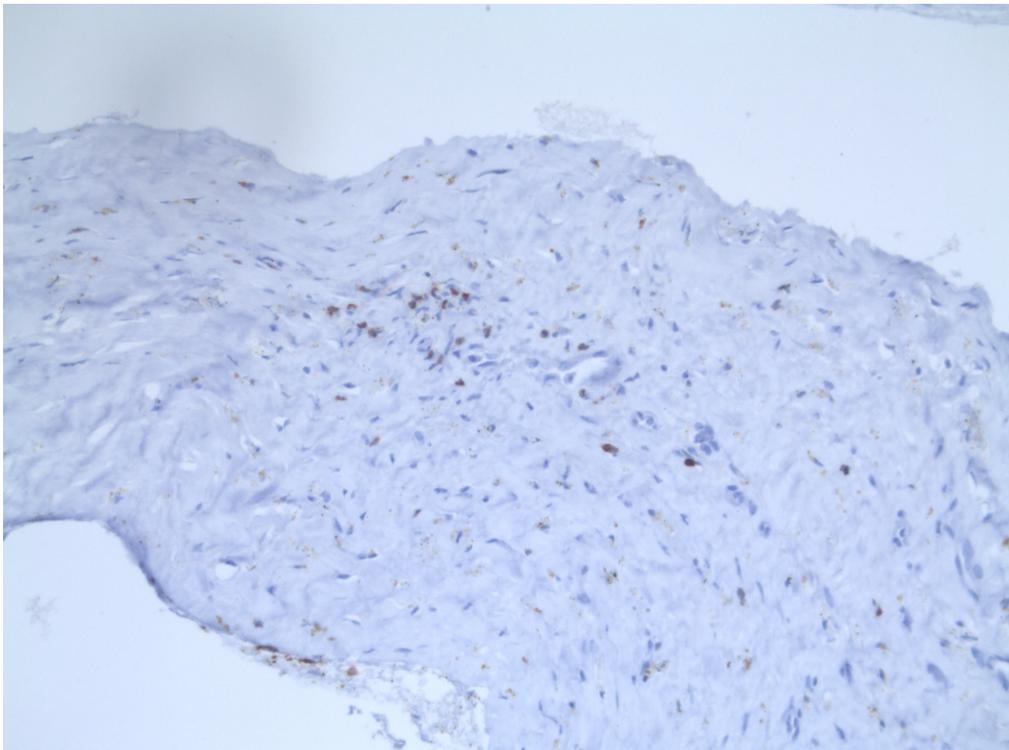


Abbildung 4-19 Probennummer 20 als Beispiel für diffuses CD3-Infiltrat (CD3-Färbung, x40)

Zytokinprofil dieses Patienten:

Tabelle 4-23 Zytokinprofil Probennr. 20 (Patientenkollektiv II)

	IFN γ	TNF α	IL10	TGF β	IL2	IL6	IL8	IL17	IL1 β
	+	∅	∅	∅	+	+	+	∅	∅
rel. Expressionsrate	1,65	0,87	0,11	0,54	39,1	6,06	23,7	0,06	0,06

+ bedeutet erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate >1)

∅ bedeutet keine erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate ≤1)

Zweiter Beispielpatient (Probennummer 10):

Patientenkollektiv I, 37 Jahre, männlich, Knieendoprothese rechts, LCS®-TEP Fa. Depuy

Beschwerden: Schmerzen in Ruhe wie bei Bewegung, Schwellung des Kniegelenkes, keine Rötung, keine Hautveränderungen

Allergiediagnostik: ECT Nickel, Kobalt und Chrom positiv, LTT war wegen des bereits positiven ECT-Ergebnisses nicht durchgeführt worden.

Histologie: mikronodales perivaskuläres Infiltrat

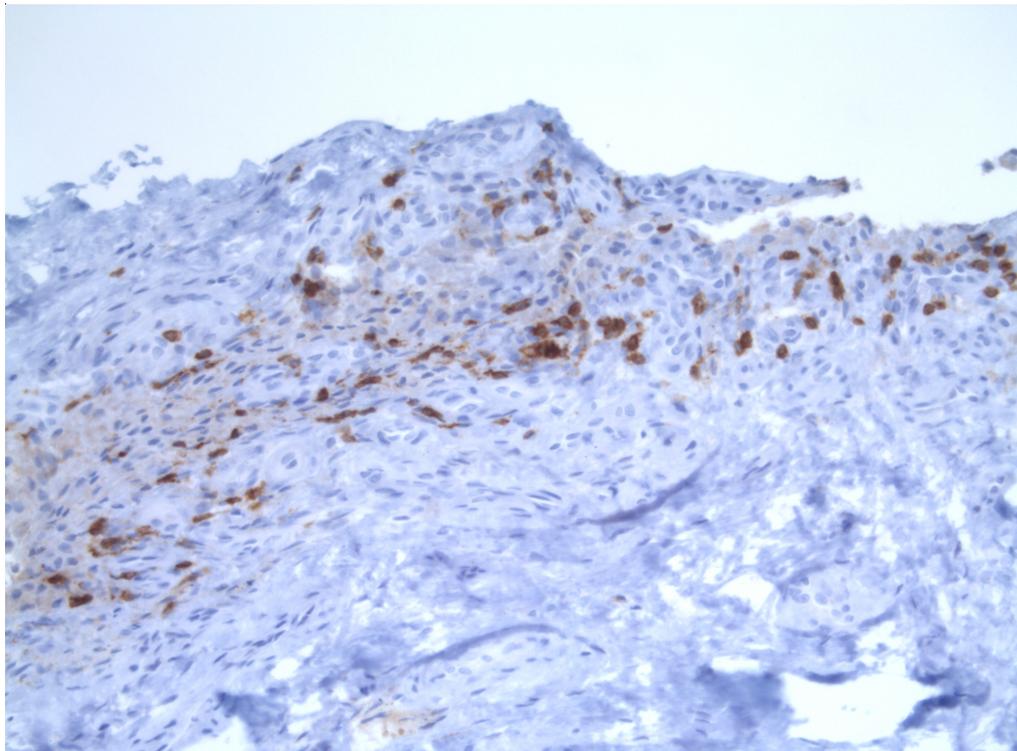


Abbildung 4-20 Probennummer 10 als Beispiel für ein mikronodales perivaskuläres Infiltrat (CD3-Färbung, x40)

Zytokinprofil dieses Patienten:

Tabelle 4-24 Zytokinprofil Probennr. 10 (Patientenkollektiv I)

	IFN γ	TNF α	IL10	TGF β	IL2	IL6	IL8	IL17	IL1 β
	+	∅	∅	∅	+	∅	+	∅	∅
rel. Expressionsrate	320,3	0,02	0,33	0,20	140,0	0,0	2120	0,0	0,06

+ bedeutet erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate >1)

∅ bedeutet keine erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate ≤1)

Dritter Beispielspatient (Probennummer 9):

Patientenkollektiv I, 56 Jahre, männlich, Knieendoprothese links, Endo-Modell®, Fa. Link Orthopaedics

Beschwerden: Schmerzen in Ruhe wie bei Bewegung, rez. Schwelllungen

Allergiediagnostik: ECT Nickel positiv, LTT war wegen des bereits positiven ECT-Ergebnisses nicht durchgeführt worden.

Histologie: Makronodales perivaskuläres Infiltrat:

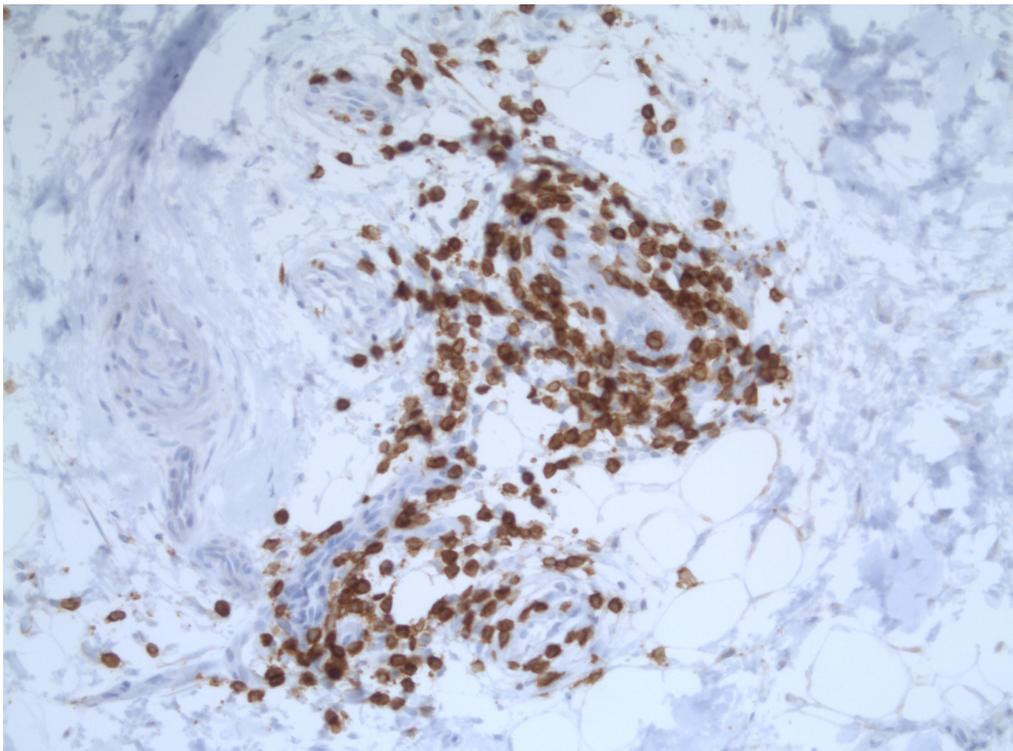


Abbildung 4-21 Probennummer 9 als Beispiel für ein makronodales perivaskuläres Infiltrat (CD3-Färbung, x40)

Zytokinprofil dieses Patienten:

Tabelle 4-25 Zytokinprofil Probennr. 9 (Patientenkollektiv I)

	IFN γ	TNF α	IL10	TGF β	IL2	IL6	IL8	IL17	IL1 β
	+	∅	+	+	∅	∅	+	+	+
rel. Expressionsrate	5737	0,0	21,7	3,87	0,0	0,0	12,9	5280	26,6

+ bedeutet erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate >1)

∅ bedeutet keine erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate ≤1)

5 Diskussion

Seit vielen Jahren wird über die Möglichkeit eines Endoprothesenversagens aufgrund einer Allergie gegenüber den Implantatmetallen spekuliert. So gibt es Fallberichte, welche metallallergische Patienten mit Hautveränderungen (z.B. Ekzeme, Erytheme) oder Gelenkbeschwerden (Schmerzen und Schwellungen) an den jeweiligen Gelenken nach Endoprothesenimplantation aufzeigen, welche zudem von einer Revisionsoperation mit einem hypoallergenen Werkstoff profitieren (s. 1.3). Weiterhin ist bei aseptischer Prothesenlockerung in einigen Fällen eine auffällige Lymphozytenaggregation in der histologischen Gewebeuntersuchung gefunden worden. Als Ursache hierfür wird die Möglichkeit einer Typ-4-Allergie auf das Metallimplantat angegeben [77, 81].

Im australischen Endoprothesenregister taucht 2012 erstmals auch „metal sensitivity“ als Revisionsgrund bei Endoprothesen auf [82].

Natürlich ist „metal sensitivity“ nicht mit Metallallergie und eine nachgewiesene Allergie nicht mit „Ursache für Implantatversagen“ gleichzusetzen. Es hat aber in den vergangenen Jahren dazu geführt, dass auch die Gewebereaktionen um Gelenkimplantate differenzierter betrachtet wurden. Zuletzt wurde von Prof. Krenn ein sogenannter Partikelalgorithmus beschrieben, in dem sich unterschiedliche periimplantäre Reaktionen abhängig von Partikelform,-größe und –zusammensetzung abzeichnen [83].

Weiterhin existieren jedoch keine Studien, welche gezielt von Metallallergikern mit Endoprothesen-assoziierten Beschwerden Gewebeproben histologisch sowie molekularbiologisch (auf das vorherrschende Zytokinprofil) untersuchten.

Der integrierende Blick auf Patientenanamnese, allergologische Befunde und Reaktionen im periimplantären Gewebe war daher Ziel dieser Arbeit. Unseres Wissens gibt es bisher keine Publikation, die diese Aspekte unter Einbeziehung von molekularer Gewebeanalyse beschreibt.

5.1 *Diskussion der Methoden*

In dieser Arbeit erfolgte die Zytokinanalyse aus Gewebeproben mit Hilfe einer real-time-PCR. Es wurden daher nicht direkt die Zytokin-Proteine gemessen, sondern die im Gewebe vorhandenen mRNA-Kopien der jeweiligen Zytokine. Die Menge der Zytokin-RNA-Kopien der gelenksnahen Proben oder der Hautstanzen wurde mit der einer korrespondierenden Kontrolle, z.B. gelenksfernen Probe (subkutanes Fettgewebe) ins Verhältnis gesetzt, sodass eine relative Zytokinexpressionsrate aufgezeigt werden konnte. Diese gibt an, um wie viel die jeweilige Zytokinexpression gelenksnah höher oder niedriger als im gelenksfernen Gewebe ist. Somit kann nicht nur aufgezeigt werden, dass das jeweilige Zytokin im Gelenkgewebe exprimiert ist, sondern auch ob diese Zytokinexpression eine Erhöhung gegenüber dem „Basis-Gewebewert“ des Probanden darstellt.

Natürlich können verschiedene Faktoren das Analyseergebnis beeinflussen: Das Zytokinexpressionsmuster in der Referenzprobe („je weniger dort exprimiert ist, umso höher erscheint der Epressionswert im periimplantären Gewebe“), sowie die subjektive Auswahl des Gewebeentnahmeortes durch den Operateur. Aufgrund des Patientenkollektives, welches sich aus ganz Deutschland rekrutierte, war es nicht möglich, die Operationen von einem einzigen Operateur vornehmen zu lassen.

Wir haben den Ansatz der Homogenisierung und Komplettanalyse der Gewebeprobe für die molekulare Aufarbeitung gewählt. Studien, welche sich ebenfalls mit der Zytokinexpression aus Gelenkgewebe befassen, verwenden meist die immunhistochemische Analyse eines Gewebeschnittes [84-85]. Dieser Gewebeschnitt bildet jedoch nur einen geringen Teil der Gewebeprobe ab und stellt somit nicht das Zytokinprofil der gesamten Gewebeprobe dar, im Gegensatz zur der von uns verwendeten Methode.

Noch häufiger verwenden Studien eine Zytokinmessung in der Gelenkflüssigkeit [86-89] und nicht im periimplantären gelenksnahen Gewebe. Die am häufigsten angewandte Methode hierfür ist die Zytokinmessung mittels des ELISA („enzyme-linked immunoassay“), welche die Zytokinkonzentration z.B. in pg/ml angibt. Um eine Bewertung dieser Messwerte zu ermöglichen, wird meist noch die Zytokinkonzentration im peripheren Blut mitbestimmt. Diese Konzentration ist jedoch stark von Immunreaktionen, die nicht mit der

Gelenkproblematik zusammenhängen, wie z.B. einem Infekt der oberen Atemwege, abhängig und kann daher nur schwer für eine individuelle Aussage des Zytokinniveaus des Patienten herangezogen werden. Weiterhin messen diese beiden Methoden den Zytokinspiegel, nicht aber wie in der von uns verwendeten Methode die mRNA der Zytokine. So wird nicht die aktuelle Zytokinexpression im Gewebe, sondern die Akkumulation der Zytokine gemessen.

Andererseits bedeutet eine erhöhte mRNA-Expression eines Zytokines nicht zwangsläufig, dass das jeweilige Zytokin auch freigesetzt wird.

Die histologische Untersuchung in dieser Arbeit wurde von zwei getrennt voneinander untersuchenden Histologen befundet. Dies waren wie bereits in 3.6 beschrieben die Histopathologen der Dermatologischen Klinik, LMU München sowie der Referenzpathologie der Allergearbeitsgruppe der Deutschen Gesellschaft für Orthopädie, Prof. Krenn in Trier. Um eine möglichst aussagekräftige histologische Befundung zu erhalten, wurden von jedem Patienten zwei zueinander benachbart gelegene gelenksnahe Gewebeproben entnommen, jeweils eine den beiden kooperierenden Histologen geschickt, von diesen zunächst getrennt befundet und anschließend die Proben gemeinsam diskutiert. Hierzu fanden Treffen in Trier und München statt. Dementsprechend sollte auch die kombinierte Wertung von jeweils zwei Proben des betroffenen Patienten die Aussagekraft erhöhen. Unseres Wissens verwenden andere Arbeitsgruppen zumeist nur eine histologische Gewebeprobe.

Parallel zur histologischen Beurteilung sollte auch die zunächst durchgeführte mikrobiologische Gewebeanalyse den Ausschluss einer Infektion noch sicherer ermöglichen. Bezüglich des histopathologischen Infektausschlusses war neben einer HE-Färbung auch eine CD15-Immunfärbung erfolgt. Der aus der Arbeitsgruppe um Prof. Krenn vorgeschlagene „Infekt-Score“ (siehe auch 3.6) war zur Beurteilung verwendet worden. Dieser Score ist zwischenzeitlich auch in die internationale Konsens-Klassifikation zum periprothetischen Infekt eingeflossen [90].

5.2 **Diskussion der Ergebnisse**

Untersucht wurden Gewebeproben von verschiedenen Patientenkollektiven: Knieendoprothesenträger mit Beschwerden und nachgewiesener Metallallergie im Epikutantest (Patientenkollektiv I), Knieendoprothesenträger mit Beschwerden und nachgewiesener Metallsensibilisierung im Lymphozytentransformationstest ohne kutane Metallallergie (Patientenkollektiv II), weiterhin Gonarthrosepatienten ohne Implantat (Kontrollkollektiv) und Gewebeproben aus positiven Nickel-Epikutantestfeldern (ECT-Kollektiv).

5.2.1 **Histologische Untersuchung der Studienkollektive**

Morphologie periimplantärer Gewebereaktionen

Bei der histologischen Untersuchung des periimplantären Gewebes sind Reaktionsmuster in einer Konsensusklassifikation mit ihrer Überarbeitung beschrieben [91]. Dort sind die Konstellationen „Infekt“, „partikel-bedingte Fremdkörperreaktion“, „Fibrosierung“ sowie „lymphozytär dominierte Entzündung“ identifizierbar. Speziell für die Konstellation „Infekt“ wurden auch Granulozytengrenzwerte bei der Zusammenschau mehrerer „high power“-Felder in der Mikroskopie definiert. Bei der internationalen Konsensus-Konferenz in Philadelphia (2013) wurden die Definition und die Diagnostikschritte des Endoprotheseninfektes festgelegt [92]. Leider gibt es noch keine klaren Kriterien für eine periimplantäre (Allergie-bedingte) Überempfindlichkeitsreaktion. Allerdings werden von verschiedenen Autoren mögliche Charakteristika genannt.

Mögliche Charakteristika von Überempfindlichkeitsreaktionen

Für eine kutane allergische Ekzemreaktion („Spättyp-Reaktion“) sind histologische Charakteristika wie „Spongiose“ der Epidermis, lymphohistiozytäre Infiltrate und Gegenwart von eosinophilen Granulozyten typisch [4]. Die Pathomorphologie einer möglichen Überempfindlichkeitsreaktion (Typ-4-Allergie) im periimplantärem Gewebe wird kontrovers diskutiert [93]. Es fehlen große epidemiologische Untersuchungen. Daher kann nur anhand kleiner Fallzahlen von Revisionsgeweben bei Metall-Metall-Hüftendoprothetik in Zusammenhang mit gefundener Metallallergie ein mögliches „Allergiegesehen“

beschrieben werden. So wurden lymphohistiozytäre Infiltrate mit Prothesenlockerung und weitgehendem Fehlen einer Riesenzell-Fremdkörperantwort von Willert et al. [77] als Hinweis auf lokale Überempfindlichkeitsreaktionen gewertet. Es zeigten sich in dieser Untersuchung von Revisionsgeweben von Metall-Metall-Hüft-Endoprothesen, wie auch in einer Untersuchung von Witzleb et al. von 2007 [93] eine deutliche diffuse wie perivaskuläre lymphozytäre Infiltration, welche mit dem von Willert et al. 2001 eingeführten Begriff „aseptic lymphocytic vasculitis-associated lesion (ALVAL)“ bzw. dem Begriff „lymphocyte-dominated immunological answer (LYDIA)“ beschrieben wurde. Es ist anzumerken, dass zu diesem Zeitpunkt nur bei Metall-Metall-Hüftendoprothesen lymphozytäre Infiltrate beschrieben waren, nicht bei Metall-Polyethylenpaarungen. Von Momarus et al. wurden allerdings 2011 [94] T-lymphozytäre Infiltrate als „häufiges“ Phänomen im periimplantären Gewebe von aseptisch gelockerter Metall-Polyethylen-gepaarter Endoprothetik beschrieben. Für Krenn et al. [55] besteht die Möglichkeit einer „Hypersensitivitätsreaktion“ bei einem Gewebereaktionsmuster vom „Abrieb-induzierten Typ“ (Typ 1), bei welchem eine zusätzliche lymphozytäre Infiltration besteht [55, 77]. Insbesondere ein exzessives lymphozytäres Infiltrat lässt an eine Überempfindlichkeitsreaktion denken. Die genaue Bedeutung der Infiltratsmuster in Hinblick auf eine Überempfindlichkeitsreaktion ist aber noch nicht geklärt [55, 93].

Die histologische Untersuchung der Proben dieser Arbeit – das heißt bei den Proben aus dem Kniegelenk - erfolgte nach den Kriterien der Konsensusklassifikation nach Krenn et al. (s. 1.3.4) [73, 91].

Es zeigte sich bei der histologischen Untersuchung in beiden Studienkollektiven mehrheitlich die Klassifizierung als zellarmer, fibrosierungsbetonter „Indifferenztyp“ (Typ 4) nach der Konsensusklassifikation von Krenn et al.. So sind im Patientenkollektiv I 9 von 11 Proben als „Indifferenztyp“ (Typ 4) klassifiziert, die verbleibenden 2 als „Abrieb-induzierter Typ“(Typ 1), im Patientenkollektiv II 6 von 9 Proben als Typ 4, die verbleibenden 3 als Typ 1. In der Studie zur Konsensusklassifikation [73], in welcher Gewebe von 268 insuffizienten Hüft- und Knieendoprothesen untersucht wurde, waren jedoch 51% vom Abrieb-induzierten Typ (Typ 1), 20% von infektiösen Typ (Typ 2), 5% Mischtyp (Typ 3) und nur 18% Indifferenztyp (Typ 4). Unsere Untersuchungen beziehen sich auf Knieendoprothetik. Es bleibt sehr auffällig, dass die beschwerdenbehafteten Patienten (mit nachgewiesener Metallsensibilisierung) bei der

Bewertung ihrer periimplantären Gewebeproben vorrangig Indifferenztyp-Muster zeigten, d.h. vornehmlich eine Fibrosierungsreaktion. Diese Beobachtung wurde bisher nicht beschrieben. Ebenfalls überraschend war die – wie weiter unten diskutiert - häufige Anwesenheit von T-Lymphozyten in den Präparaten. Das von Krenn et al. vorab untersuchte Kollektiv setzte sich zu 81% aus Hüftendoprothesen und nur zu 19% aus Knieendoprothesen zusammen. Davies et al. konnte bei einer Untersuchung von aseptischen Hüftlockerungen (Metall-Metall-Paarungen) bei der Hälfte der Präparate Makrophagen mit Abriebpartikeln feststellen, nicht jedoch bei Metall-Polyethylen-Paarungen [81]. Die Häufung der „Abrieb-induzierten-Reaktionsmuster“ in der Studie von Krenn und Morawietz [73] könnte daher aufgrund der vielen Metall-Metall-Hüftpaarungen bedingt sein. Studien, in welchen die Verteilung der Typen gemäß der Konsensusklassifizierung speziell bei Knieendoprothesen gezeigt wurde, gibt es unseres Wissens im Moment nicht. Aus den Daten unserer Studienkollektive lässt sich jedoch ableiten, dass auch bei histologischer Einordnung als Typ-4/Indifferenzmuster mit vornehmlicher Fibrosierung auf einen möglichen Sonderfall, nämlich die zusätzliche Gegenwart von lymphozytären Infiltraten geachtet werden muss. Die Beobachtung dieser Arbeit ist nicht nur kürzlich publiziert worden [95], sondern auch in der neuen, revidierten Konsensusklassifikation miteingeflossen [91].

In der oben erwähnten Studie von Davies et al. wurde neben der Häufung von Makrophagen mit Abriebpartikeln auch eine perivaskuläre Lymphozyteninfiltration bei 17 der 25 Metall-Metall-Hüftendoprothesen festgestellt. In einer weiteren oben bereits erwähnten Studie mit 19 Patienten mit insuffizienten Metall-Metall-Hüftendoprothesen wurde von Willert et al. bei allen Präparaten perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate gefunden [77] und diese mit einer möglichen Typ 4-Allergie in Verbindung gebracht. Bei den untersuchten Patienten wurden allerdings keine kutanen Allergietestungen durchgeführt.

Es stellt sich die Frage, welche funktionelle Bedeutung diese lymphozytären Infiltrate im Kontext mit Abriebpartikeln haben - und ob in manchen Fällen eine Interpretation als „Allergie“ möglich ist, sowie ob bei einem Fehlen von periimplantären nodalen lymphozytären Infiltraten eine „Allergie“ auf das Implantat ausgeschlossen werden kann.

In unserer Studie zeigten sowohl Endoprothesenpatienten mit kutaner Metallallergie lymphozytäre Infiltrate am Gelenk wie auch Patienten mit Gonarthrose. Bei den Gonarthrosepatienten kann das lymphozytäre Infiltrat jedoch weder von Abriebpartikeln

allgemein noch von einer allergischen Immunreaktion ausgelöst worden sein, da die Patienten bei Probeentnahme noch kein Implantat bzw. dessen Abrieb hatten. Hier gibt die zusätzlich durchgeführte Analyse der Zytokinexpression weitere Informationen: Die Gonarthrosepatienten mit perivaskulärem nodalen lymphozytären Infiltrat zeigten in der Zytokinmessung eine signifikant höhere TNF α -Expression und damit eher Hinweise auf eine Arthrose-assoziierte Entzündung. Weiterhin zeigten alle Gonarthrosepatienten mit nodalen lymphozytären Infiltraten auch deutliche CD20-Färbungen, d.h. Gegenwart von B-Lymphozyten. Auch im diffusen lymphozytären Infiltrat dieses Kollektives sind beinahe immer B-Lymphozyten vorhanden.

Anders jedoch im Patientenkollektiv I (Patienten mit beschwerdebehafteter Endoprothetik und ECT+): CD20-positive B-Lymphozyten kommen im diffusen wie im nodalen lymphozytären Infiltrat jeweils nur in einem Präparat vor.

5.2.2 Vergleich der Zytokinexpressionsraten der Studienkollektive

Wir fragten, ob die Analyse der Gewebeexpressionsmuster ausgewählter Zytokine zu einer besseren Charakterisierung bzw. Deutung der gefundenen Gewebereaktionsmuster beitragen könnte. Als typische Gewebereaktion einer Spättypallergie diente uns Biopsiematerial aus Nickel-Epikutantestreaktionen, in denen eine Hochregulation von IFN γ und IL2 als Hinweis auf Th1-Antwort klar erkennbar waren.

▪ IFN γ -Expression

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass es signifikante Unterschiede in der Zytokinexpression zwischen den einzelnen Studienkollektiven gibt.

Insbesondere die IFN γ -Expressionsrate war im Patientenkollektiv I und im Epikutantestfeld-Kollektiv (ECT-Kollektiv) zu 72,2% bzw. 100% erhöht (Expressionsrate > 1), im Patientenkollektiv II und im Kontrollkollektiv (Gonarthrose-Kollektiv) jedoch nur bei 22,2% bzw. 25%. Weiterhin zeigen das Patientenkollektiv I und das ECT-Kollektiv höhere Expressionsraten (Median 10,1 bzw. 117,4) gegenüber dem Patientenkollektiv II und dem Kontrollkollektiv (beide im Median 0). Diese Unterschiede der Studienkollektive zeigten sich signifikant (Signifikanzwerte von p=0,008 bis p=0,027).

Das Zytokin IFN γ wird vorwiegend von CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ Th1 bzw. Tc1-Zellen gebildet [19-20] und stellt ein Zytokin des Typ1 (Th1, Tc1)-Musters dar. Dieses Typ-1 Muster wird klassischerweise im Rahmen einer kontaktallergischen Reaktion gesehen [27, 96]. Dementsprechend zeigt sich eine starke Erhöhung der IFN γ -Expression in unserem ECT-Kollektiv. Interessanterweise zeigt jedoch auch das Patientenkollektiv I (ECT +) eine starke IFN γ -Expressionsrate auf, jedoch nicht das Patientenkollektiv II (ECT -, LTT +) und das Kontrollkollektiv (Gonarthrosepatienten). Das könnte bedeuten, dass im Patientenkollektiv I, wie im Epikutantestfeld-Kollektiv eine lymphozytäre Immunreaktion des Th1/Tc1-Musters stattfindet, die weder bei einer Gonarthrose (Kontrollkollektiv) noch beim Patientenkollektiv mit Prothesenversagen auftritt, welches zwar eine Metallsensibilisierung der peripheren Lymphozyten (LTT +), nicht jedoch eine „Metallallergie“ an der Haut aufweist (Patientenkollektiv II). So konnte in einer Studie von Baldwin et al. zur aseptischen Lockerung von Knieendoprothesen [97] keine IFN γ -Expression in den untersuchten Geweben festgestellt werden. Auch konnten weitere Studien kaum T-Zellen, insbesondere keine aktivierten T-Zellen (abgeleitet durch das Fehlen von IL2-Rezeptoren der T-Zellen) und kein IFN γ im periimplantärem Gewebe von aseptischen Hüftlockerungen zeigen [98-99]. Eine andere Studie weist maximal 5% aller Zellen im periimplantären Gewebe als IFN γ -positive T-Zellen aus [85].

Eine Untersuchung von Goodmann et al. fand bei der immunhistochemischen Untersuchung von aseptischen Hüftlockerungen ebenfalls nur sehr wenig IFN γ im periimplantären Gewebe und weiterhin keinen Unterschied der IFN γ -Menge in osteolytischem gegenüber nicht-osteolytischem Gewebe [100]. Eine Zytokinanalyse von Loria et al. ergab in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Gonarthrose wie bei aseptischen Knieendoprothesenlockerungen nur äußerst geringe IFN γ -Mengen [86]. Eine weitere Studie [101] ergab signifikant niedrigere IFN γ -Mengen in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit Osteoarthrose als bei Patienten mit einer rheumatoiden Arthritis. Bei letzterer liegt ja ähnlich wie bei der allergischen Kontaktdermatitis eine Th1-betonte Entzündung vor [102].

Somit ist die von uns gesehene periimplantäre IFN γ -Erhöhung im Patientenkollektiv I gegenüber dem Patientenkollektiv II und dem Kontrollkollektiv nicht allein aufgrund einer „unspezifischen“ Entzündungsreaktion (ähnlich einer Gonarthrose [86, 101]) erklärbar,

sondern könnte in Zusammenhang mit der gefundenen Metallallergie der Patienten stehen. Es findet sich in der Literatur ein Fallbericht eines Patienten mit Metallallergie und Osteosynthesenversagen, welcher ebenfalls eine deutliche IFN γ -Expressionserhöhung im periimplantärem Gewebe aufzeigt [61]. Jämesen und Mitarbeiter berichteten kürzlich, dass sie zwar vereinzelt periimplantäre T-Lymphozyten bei aseptischen Hüft-Endoprothesenlockerungen zeigen konnten – aber bei Makrophagen-dominierte Fremdkörperreaktion keine nennenswerte IFN γ - oder IL4-Expression im Gewebe sahen [103].

▪ IL2-Expression

Ebenfalls zeigten die Expressionraten des Zytokin IL2 signifikante Unterschiede zwischen den Studienkollektiven. So war IL2 im ECT-Kollektiv zu 100% erhöht exprimiert, in den anderen Kollektiven jedoch nur zwischen 22,2 und 41,7% erhöht. Auch im Median der IL2-Zytokinexpressionsrate zeigte das ECT-Kollektiv einen deutlich gegenüber den anderen Studienkollektiven erhöhten Wert (37,5 gegenüber 0 (Patientenkollektiv I und II) bzw 0,6 (Kontrollkollektiv). Die Unterschiede zwischen den Patientenkollektiven und dem ECT-Kollektiv zeigten sich als signifikant ($p=0,007$ bzw. $0,036$).

IL2 gehört wie IFN γ zu den sog. Typ 1-Zytokinen und wird bei T-Zell-Aktivierung und Proliferation gefunden. Im Epikutantestfeld ist dementsprechend eine hohe IL2-Expression Ausdruck der aktuellen T-Zellaktivierung und Proliferation (hier unter Nickel-Exposition). Die Patientenkollektive sowie das Kontrollkollektiv (Gonarthrosepatienten) haben niedrigere IL2-Expressionsraten gegenüber dem ECT-Kollektiv. Bei den Patientenkollektiven zeigen sich diese Unterschiede als signifikant.

Bei einer Zytokinmessung von Loria et al. [86] wurden bei Patienten mit Gonarthrose sowie bei aseptischer Prothesenlockerung nur geringe Mengen von IL2 in der Synovialflüssigkeit gefunden. In der bereits oben erwähnten Studie von Baldwin et al. [97] konnte kein IL2 im periimplantären Gewebe von Knie-TEP-Revisionen mittels RT-PCR nachgewiesen werden. In einer immunhistochemischen Untersuchung von Arora et al. [85] konnte im periimplantären Gewebe von gelockerten Hüftprothesen nur bei etwa 3% der Zellen IL2-Expression nachgewiesen werden. Dies könnte auf eine nur geringe T-Zellproliferation-/aktivierung hinweisen. Dazu passt auch das bereits erwähnte Fehlen von aktivierten T-Zellen im

periimplantären Gewebe aseptischer Endoprothesenlockerungen [98-99]. Jedoch weist auch unser Patientenkollektiv I kaum eine IL2-Expression auf, jedoch eine starke IFN γ -Expressionsrate. Die Studie von Lalor und Revell [104] kann hier eine Interpretation erleichtern. Die Autoren führten eine immunhistochemische Gewebeuntersuchung bei Patienten durch, welche sich einer Hüftrevision aufgrund aseptischer Lockerung unterzogen ebenso wie bei Patienten mit rheumatoider Arthritis. Sie fanden in beiden Patientenkollektiven den IL2-Rezeptor nur äußerst selten exprimiert, obwohl die rheumatoide Arthritis als lymphozytär-vermittelte Krankheit gilt [102]. Somit kann aufgrund eines „Fehlens“ von IL2 vermutlich nicht auf eine fehlende T-Zellaktivität geschlossen werden. Die Autoren spekulieren, dass IL2 insbesondere zu Beginn und eventuell nicht im Verlauf einer T-Lymphozytenaktivierung erhöht ist.

Das könnte die signifikant niedrigere IL2-Expressionsrate im Patientenkollektiv I gegenüber dem Epikutantestfeld-Kollektiv erklären. Die ECT-Stanzen waren standardisiert 3-5 Tage nach Kontakt der Haut mit Nickel/Kobalt entnommen, die periimplantären Proben jedoch Monate bis Jahre nach Erstkontakt mit der Metallendoprothese.

▪ **TGF β -Expression**

Die TGF β -Expressionsrate ist im Patientenkollektiv I und im ECT-Kollektiv signifikant höher gegenüber dem Kontrollkollektiv (Gonarthrose-Patienten). TGF β ist ein anti-inflammatorisches und anaboles Zytokin, welches von verschiedenen Zellen, insb. Makrophagen aber auch Fibroblasten ausgeschüttet wird. Es ist entscheidend an der Generierung von CD4 $^{+}$ -CD25 $^{+}$ -Regulatorischen-T-Zellen beteiligt (s. S. 12) sowie bei der Fibroblastenproliferation und der Anlockung von Leukozyten in die Synovia. Eine Inhibition von TGF β , sei es durch die Blockade der TGF β II-Rezeptoren oder durch die Überexpression des potenten TGF β Inhibitors LAP, lösten im Mausmodell eine deutliche Zunahme von Knorpelschaden und Proteoglykanverlust aus [105-106]. So konnte auch durch die Injektion von TGF β im Tiermodell ein vermehrtes Knorpelwachstum bei Chondrozyten beobachtet werden [107]. Eine Verminderung von TGF β konnte bei zwei Studien im Blut von Patienten mit Osteoarthrose gegenüber Patienten mit aseptischem Implantatversagen festgestellt werden, jedoch war der Unterschied nur in einer Studie signifikant [108-109]. So ist die

Verminderung des TGF β -Gehaltes bei unserem Kontrollkollektiv (Gonarthrosepatienten) gegenüber den anderen Studienkollektiven erklärbar.

Die signifikante Erhöhung im ECT-Kollektiv könnte weiterhin eine gegenregulatorische Antwort (s.S.12) hinsichtlich des allergischen Geschehens darstellen. Da neben IL6 auch TGF β eine Rolle bei periprothetischer Fibrosierung spielen könnte (siehe auch [110]), hatten wir dessen Expression im den Gewebeproben untersucht. Wegen hoher interindividueller Unterschiede ist hier aber keine globale Aussage möglich.

▪ IL6-Expression

Die IL6-Expresssionsrate ist im Patientenkollektiv II und im ECT-Kollektiv signifikant höher gegenüber dem Kontrollkollektiv (Gonarthrosepatienten).

Dem Zytokin IL6, hauptsächlich von Makrophagen und Fibroblasten gebildet, wird eine Schlüsselrolle in der Differenzierung von Osteoklasten und in der Knochenresorption zugesprochen [111-113]. In einer Studie von Konttinen et al. [114], in welcher immunhistochemisch Gewebe von aseptischen Hüftendoprothesenlockerungen gegenüber Gewebe von Coxarthrosepatienten untersucht wurde, zeigten sich signifikant mehr IL6-enthaltende Zellen im aseptischen Lockerungsgewebe gegenüber dem Coxarthrose-Gewebe. Die Autoren diskutieren in diesem Zusammenhang, dass IL6 im Rahmen der Knochenresorption entscheidend bei der Pathogenese des aseptischen Prothesenversagens ist. Diese Reaktion geht offenbar über die rein inflammatorische Immunantwort, welche auch bei der Osteoarthrose vorhanden ist, hinaus. Denn eine inflammatorische Immunantwort sei auch bei der Osteoarthrose vorhanden, jedoch stehe bei dieser Erkrankung die Knochenresorption nicht im Vordergrund, womit sich die signifikant geringere Anzahl an IL6 exprimierender Zellen erklären ließe [114]. Die Autoren konnten zwar in einer Untersuchung von Gelenksflüssigkeit im Gegensatz zu den untersuchten Gewebeproben keinen signifikanten Unterschied in der IL6-Produktion zwischen aseptischer Lockerung und Coxarthrose finden, in anderen Studien konnten jedoch signifikant größere Mengen von IL6 bei der Untersuchung von Synovialflüssigkeit bei aseptischem Implantatversagen gegenüber Osteoarthrose (Hüfte oder Knie) gefunden werden [86-87, 89].

Weiterhin wird IL6 im Rahmen einer allergischen Kontaktdermatitis in Gewebeproben erhöht gefunden [115]. Dementsprechend lässt sich die IL6-Expression bei aseptischer Implantatlockerung (Patientenkollektiv II) wie auch im ECT-Kollektiv nachvollziehen. Zumindest sehen wir die IL6-Expression in unseren Gewebeproben nicht in Zusammenhang mit einer möglichen Infektion, da diese über molekulare Untersuchungen und histologische Analyse ausgeschlossen werden konnte.

5.2.3 Auswirkung einer Revisionsoperation mit hypoallergenem Material auf das Patientenempfinden

Die Auswirkung einer Revisionsoperation mit einem Wechsel auf „hypoallergenes Implantatmaterial“ wurde unseres Wissens bis jetzt nur in Fallberichten publiziert [116-117]. Deshalb wurde unsere Patientengruppe mindestens drei Monate nach Revision nochmals nach ihrem subjektiven Empfinden anhand des WOMAC-Fragebogens beurteilt. Keiner der vier Patienten des Patientenkollektives I mit einem Wechsel auf hypoallergenes Endoprothesenmaterial hat sich durch die Revisionsoperation verschlechtert, jedoch nur zwei deutlich verbessert. Auch im Patientenkollektiv II profitierten die Patienten von der Wechseloperation, nur ein Patient verschlechterte sich im WOMAC-Fragebogen. Dieser Patient hatte wie bereits besprochen (s. 4.1.2.2) sehr hohe Ausgangswerte.

Natürlich ist aufgrund der kleinen Fallzahl die Aussagekraft unserer Nachuntersuchung eingeschränkt.

Zusammenfassend lässt sich aber sagen, dass beide Patientenkollektive von der Revisionsoperation profitiert haben. Mit Ausnahme des Patienten mit überdurchschnittlich guten präoperativen WOMAC-Werten ist dies im Score-Vergleich erkennbar. Welchen Einfluß hier „hypoallergene“ Implantate haben, lässt sich aber erst bei größeren Fallzahlen und entsprechenden Kontrollen beurteilen.

5.3 Ausblick

Mit der zunehmenden Alterung unserer Gesellschaft wird die Verwendung von orthopädischen Implantaten noch weiter zunehmen, ebenso wie die Rate an Komplikations-behafteten Implantaten. Auch wenn eine Metallallergie als Komplikationsauslöser selten ist,

wird man ihr angesichts der steigenden Revisionszahlen häufiger begegnen. Nachverfolgungen von Patienten mit Wechsel auf „hypoallergene“ Endoprothesen werden deren Nutzen und Langzeiterfolge zeigen müssen. Auch eine genauere histologische Beschreibung der periimplantären Gewebereaktionen – beispielsweise in Abhängigkeit von Materialkomponenten und Partikeleigenschaften - sowie deren funktionelle Bedeutung ist zu erwarten.

6 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, periimplantäre Gewebereaktionen bei Patienten mit problembehafteter Kniegelenkprothese und Verdacht einer Implantatallergie zu untersuchen. Die Untersuchung wurde mikrobiologisch, histologisch sowie molekularbiologisch mittels Zytokinanalyse durchgeführt.

Der Verdacht einer Implantatallergie wurde aufgrund des Beschwerdebildes der Patienten mit komplikationsbehafteter Knieendoprothese - in Abwesenheit von mechanischen Ursachen sowie ohne Infekt - bei Vorliegen eines positiven Epikutantests auf Metalle (Kollektiv I) oder eines positiven Lymphozytentransformationstests auf Metalle (Kollektiv II) formuliert. Als Vergleich dienten Gewebeproben aus einer definierten kutanen Metall-Allergiereaktion (Nickel-Epikutantestfeld) sowie Gewebeproben von Kniegelenken einer Serie von Gonarthrosepatienten, bei denen noch keine Endoprothetik vorlag.

Die histologische Beurteilung in Zusammenarbeit der Histopathologie der Dermatologischen Klinik, LMU München und Herrn. Prof. Krenn, Gelenkpathologie in Trier hatte Folgendes ergeben:

- Patienten mit Gonarthrose (Gewebeproben wurden direkt vor Implantation einer Primärendoprothetik entnommen) hatten im Durchschnitt eine Arthrose-assoziierte „low grade Synovialitis“ gezeigt mit vereinzelt, teils gruppiert gelagerten T-Lymphozyten und Makrophagen.
- Die Epikutantestreaktionen auf Nickel wiesen dichte teils perivaskulär akzentuierte Lymphozyteninfiltrate (vorwiegend CD 3+), vereinzelt eosinophile Granulozyten und Spongiose (interzelluläres Ödem) in der Epidermis auf.
- Bei den Revisionspatienten mit Implantatallergieverdacht (sowohl Kollektiv I mit Metall-positivem Epikutantest, als auch Kollektiv II mit nur Metall-positivem Lymphozytentransformationstest) hatte sich unerwartet häufig (15/20) eine Neosynovialis mit mehr oder weniger starker Fibrosierung ergeben. Hier waren zusätzlich – im Gegensatz zu dem vorab publizierten Fibrosierungstyp - meist lymphozytäre Infiltrate (oft nur mäßig ausgeprägt) teils diffus, teils perivaskulär

gesehen worden. Histologische Abrieb-/Fremdkörperreaktionsmuster zeigten nur 5 der 20 untersuchten Proben.

Es wäre gemäß früheren Publikationen generell bei aseptischen Revisionspräparaten meist ein „Fremdkörperreaktionsbild“ zu erwarten gewesen. Auffällig war hier aber das deutliche Überwiegen eines „Indifferenz-/Fibrosierungsmusters“ (Typ4 nach Krenn et al. [73]) – mit zusätzlichen lymphozytären Infiltraten.

In der molekularen Analytik zeigte sich speziell im Kollektiv der Patienten mit Implantatallergieverdacht und positivem Epikutantest analog zu den Epikutantestfeldern eine signifikant höhere Expression von IFN γ als bei Patienten mit Implantatallergieverdacht und negativem Epikutantest wie auch bei Patienten mit Gonarthrose. Dies erleichtert die Interpretation als Spättyp-Überempfindlichkeit bei diesem Patientenkollektiv. Dieser Unterschied war histologisch nicht zu differenzieren.

Weiterhin ergab sich, dass die Patienten mit Implantatallergieverdacht überwiegend von einem Wechsel auf eine „hypoallergene Prothese“ (meist Titan-Beschichtung) profitierten.

So liegt unseres Wissens erstmals eine Untersuchung vor, die den Metallallergie-Nachweis in Zusammenschau mit dem klinischem Beschwerdebild, der histologisch-molekularen Analytik sowie dem klinischen Verlauf nach Umstellung auf hypoallergenes Material bewertet. Die Erkenntnisse sollen zur besseren Diagnostik bei Verdacht auf „Implantatallergie“ beitragen.

7 Anhang

7.1 Ausgewählte Zytokine und deren Funktion bei Kontaktallergien

Tabelle 7-1 Zytokincharakteristika nach [118]

Zytokin	Produzent	Funktion in der allergischen Kontaktallergie
IL1 β	Makrophagen, Monozyten, T-Zellen, antigenpräsentierende Zellen	Synthese von Akute-Phase-Protein, u.a. Migration und Reifung von Antigenpräsentierenden Zellen und Induktion von TNF α -Produktion von Keratinozyten
IL2	Th1-Zellen, Tc1-Zellen, NK-Zellen	Steigerung der Zytotoxizität CD8+-Zellen und NK-Zellen, Proliferation T-Zellen
IL6	Monozyten, Makrophagen, Th2-Zellen	Inflammatorisches Zytokin, welches u.a die Akut-Phase-Protein-Synthese und die T-Zell-Proliferation im Lymphknoten steigert, notwendig zur Differenzierung von Typ17-Zellen
IL8	Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen, Fibroblasten	T-Zell-Chemotaxis, induziert von TNF α
IL10	Th2-Zellen, Treg	Immunsupprimerender Effekt über Verminderung der T-Zell- und Makrophagenfunktion
IL17	Th17, Tc17, Makrophagen, Monozyten, NK-Zellen	Co-Stimulation für T-Zellen, Induktion von Zytokinproduktion verschiedener Zellreihen (u.a. Fibroblasten, Endothelium, Makrophagen)
IFN γ	Th1-Zellen, Tc1-Zellen	proinflammatorisches Zytokin, Differenzierung naiver T-Zellen zu Typ1-Zellen, Makrophagenaktivierung
TNF α	Makrophagen, Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen, Keratinozyten	proinflammatorisches Zytokin, Aktivierung T-Zellen und NK-Zellen, Migration und Reifung von Antigenpräsentierenden Zellen

Anhang

TGF β	T-Zellen, Makrophagen, Monozyten	Involviert in die Immunregulation, Verminderung der IL1-Rezeptor- Expression, Suppression T-Zellen und Makrophagen
-------------	-------------------------------------	---

7.2 Fragebogen „WOMAC-Score“ und „Metallverträglichkeit“

Orthopädischer Fragebogen (WOMAC-Score)

Symptome: Diese Fragen beziehen sich auf die Symptome in ihrem Kniegelenk in der letzten Woche.

S1 Hatten Sie ein geschwollenes Knie?

- nie kaum manchmal oft immer

S2 Spüren Sie ein Reiben, hören Sie ein Klicken oder ein anderes Geräusch, wenn Sie ihr Knie bewegen?

- nie kaum manchmal oft immer

S3 Bleibt ihr Knie während einer Bewegung hängen oder blockiert es?

- nie kaum manchmal oft immer

S4 Können Sie ihr Knie vollständig strecken?

- nie kaum manchmal oft immer

S5 Können Sie ihr Knie vollständig abwinkeln bzw. beugen?

- nie kaum manchmal oft immer

Steifigkeit: Die folgenden Fragen beziehen sich auf die Steifigkeit (nicht Schmerzen) in ihrem Kniegelenk. Steifigkeit ist ein Gefühl von Einschränkung oder Langsamkeit in der Beweglichkeit, wenn Sie ihre Gelenke bewegen. Bitte geben Sie für jede Frage die Stärke der Steifigkeit an, die sie in der letzten Woche verspürt haben.

S6 Wie stark ist die Steifigkeit gerade nach dem Erwachen am Morgen?

- keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

S7 Wie stark ist Ihre Steifigkeit nach Sitzen, Liegen oder Ausruhen im späteren Verlauf des Tages?

- keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

Schmerz:

P1 Wie oft verspüren Sie Knieschmerzen?

- niemals monatlich wöchentlich täglich immer

Die folgenden Fragen beziehen sich auf die Stärke der Schmerzen, die Sie in ihrem Kniegelenk haben. Bitte geben Sie für jede Frage die Stärke der Schmerzen an, die Sie bei den folgenden Tätigkeiten in der letzten Woche verspürt haben.

P2 Drehen auf dem Knie

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

P3 das Knie vollständig strecken

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

P4 das Knie vollständig beugen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

P5 Gehen auf ebenen Boden

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

P6 Treppen hinauf- oder hinuntersteigen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

P7 nachts im Bett

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

P8 Sitzen oder Liegen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

P9 Stehen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

Fragen zur körperlichen Tätigkeit: Die folgenden Fragen beziehen sich auf ihre körperliche Tätigkeit. Damit ist die Fähigkeit gemeint, sich im Alltag zu bewegen und sich um sich selbst zu kümmern. Bitte geben Sie für jede der folgenden Tätigkeiten den Schwierigkeitsgrad an, den Sie in der letzten Woche wegen Beschwerden in ihrem Kniegelenk gespürt haben.

A1 Treppen hinuntersteigen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A2 Treppen hinaufsteigen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A3 Aufstehen vom Sitzen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A4 Stehen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A5 sich zu Boden bücken

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A6 Gehen auf ebenen Boden

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

Anhang

A7 Einsteigen ins Auto / Aussteigen aus dem Auto

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A8 Einkaufen gehen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A9 Socken / Strümpfe anziehen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A10 vom Bett aufstehen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A11 Socken / Strümpfe ausziehen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A12 im Bett liegen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A13 ins Bad / aus dem Bad steigen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A14 Sitzen

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A15 Sich auf die Toilette setzen / Aufstehen von der Toilette

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A16 anstrengende Hausarbeiten

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

A17 leichte Hausarbeiten

keine leicht mittelmäßig stark sehr stark

WOMAC = **W**estern **O**ntario and **M**cMaster Universities

FRAGEBOGEN ZU METALLVERTRÄGLICHKEIT

I. Eigene Vorgeschichte

1. Allgemeines

- Rauch(t)en Sie Zigaretten? Nein Ja (jetzt) Ja (früher)
- Nehmen Sie Medikamente ein? Nein Ja, und zwar:
 - 1. _____ Seit wann? _____
 - 2. _____ Seit wann? _____
 - 3. _____ Seit wann? _____

2. Vorerkrankungen

- Haben Sie anderweitige Erkrankungen? Nein Ja, und zwar:
 - Hoher Blutdruck Sonstige _____
 - Sonstige Herz-Kreislaufferkrankungen _____
 - Diabetes _____
 - Rheuma _____
 - Osteoporose _____

3. Metallimplantate

- Hatten Sie **früher** schon einmal Beschwerden in Zusammenhang mit einem Metallimplantat?
 Nein Ja und zwar: _____
- Wann wurde das Metallimplantat entfernt? Datum: _____. _____. _____
- Haben Sie **derzeit** ein Metallimplantat? Nein Ja, und zwar:
 - Hüftprothese Knieprothese Osteosynthesematerial Sonstiges _____
 - Datum: _____
 - Körperseite: rechts links
 - Material: Stahl Kobalt/Chrom Titan Sonstiges _____
 - Hersteller / Typ: _____
 - Zementiert? Nein Ja, und zwar mit _____ (Name des Zements)
- Haben Sie heute Beschwerden im Zusammenhang mit dem Metallimplantat?
 Nein Ja, und zwar:

Anhang

- Schmerzen Schwellung Rötung Ekzem
- Erguss Lockerung Bewegungseinschränkung
- Sonstige _____

4. Zahnmaterialien

- Haben Sie künstliche Zahnmaterialien? Nein Ja, welche?

Art: Prothese Zahnimplantat Krone/Brücke Sonstiges

Material: Kunststoff Keramik Metall Titan Sonstiges

Beschwerden: keine

Schmerzen Brennen Rötung offene Stellen im Mund

Zahnfleischartzündung Zahnfleischverdickung

Sonstiges _____

5. Allergische Erkrankungen

- Sind folgende Erkrankungen bei Ihnen aufgetreten?

Heuschnupfen Nein Ja

Asthma Nein Ja

Neurodermitis Nein Ja

Hautausschlag, durch

- Metallkontakt an der Haut Nein Ja

in Form von: Juckreiz Ekzeme Rötung Sonstiges _____

durch: Schmuck Uhrarmband Jeansknopf Sonstiges _____

- Andere Substanzen Nein Ja,

in Form von: Juckreiz Ekzeme/Ausschlag Rötung Sonstiges _____

durch: Medikamente Nahrungsmittel Sonstiges _____

- Welche allergischen Erkrankungen wurden bei Ihnen von ärztlicher Seite festgestellt?

Heuschnupfen Neurodermitis allergisches Asthma Medikamentenallergie Kontaktallergie

Metallallergie auf: Nickel Kobalt Chrom Sonstiges _____

- Haben Sie einen Allergiepass? Nein Ja

II. Familienvorgeschichte (Eltern, Geschwister, Kinder)

Sind folgende Erkrankungen in Ihrer Familie aufgetreten?

- Heuschnupfen Nein weiß nicht Ja, bei Mutter Vater Geschwister Kinder
- Neurodermitis Nein weiß nicht Ja, bei Mutter Vater Geschwister Kinder
- Asthma Nein weiß nicht Ja, bei Mutter Vater Geschwister Kinder

7.3 Verwendete Materialien der Zytokinanalyse

7.3.1 PCR

Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit	Roche
LightCycler Fast Start Plus DNA Master SYBR Green I Kit	Roche
EF-1 α (house-keeping gene)	MWG-Biotech
IFN γ -Primer (human)	MWG-Biotech
IL2-Primer (human)	MWG-Biotech
IL6-Primer (human)	MWG-Biotech
IL8-Primer (human)	MWG-Biotech
IL10-Primer (human)	MWG-Biotech
IL17-Primer (human)	MWG-Biotech
TNF α -Primer (human)	MWG-Biotech
IL1 β -Primer (human)	MWG-Biotech
TGF β 1-Primer (human)	MWG-Biotech

7.3.2 RNA-Isolierung

Chloroform CHCl ₃	Sigma
Glykogen	Sigma
Isopropanol C ₃ H ₈ O	Sigma
peqGOLD TriFast™	PEQLAB Biotechnologie GmbH

7.3.3 Weitere Reagenzien/Verbrauchsmaterialien

Aqua ad iniectabilia	Braun
DEPC H ₂ O	Sigma
EDTA	Sigma
Essigsäure (96%)	Merck
Ethanol absolute	Merck
Ethanol 75%	Merck

Anhang

Natriumacetat	Sigma
0,2ml ThermoTube™ PCR Tubes	PEQLAB Biotechnologie GmbH
0,5ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf
1,5ml Safe-Lock Tubes	Eppendorf
epT.I.P.S. Standard 0,5-10 µl	Eppendorf
epT.I.P.S. Standard 2-200 µl	Eppendorf
epT.I.P.S. Standard 50-1000 µl	Eppendorf
Glaskapillaren	Roche
UVette® 220-1600 nm	Eppendorf

7.3.4 Geräte

Abzug	Köttermann
Analysenwaage ABS 80-4	Kern
BioPhotometer	Eppendorf
Elektronische Präzisionswaage	Kern
Flockeneisbereiter SPR 80	NordCap
Gefrierschrank (-80°C)	GLF
Gefrierschrank (-20°C)	Miele
Kühlblock	Roche
Kühlschrank mit Gefriereinheit	Bosch
Lichtmikroskop	Zeiss
LightCycler 3.5	Roche
Pipettensatz (0.5-1000µl)	Gilson
TGradient Thermocycler	Biometra
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge 5415 R	Eppendorf
Vortex	Bender + Hobein AG

7.4 Histologische Färbemethoden

Tabelle 7-2 Färbeprotokoll HE-Färbung nach Dermatohistologisches Labor, Dermatologische Klinik, LMU

	Reagenz	Zeit
1	Xylol	3 Min
2	Xylol	3 Min
3	Xylol	3 Min
4	Abs. Alkohol	3 Min
5	Abs. Alkohol	3 Min
6	96% Alkohol	3 Min
7	96% Alkohol	3 Min
8	70% Alkohol	3 Min
9	70% Alkohol	3 Min
10	Aqua dest.	3 Min
11	Hämatoxilin n. Harris	10 Min
12	H ₂ O	4 Min
13	HCL-Alkohol	1 sec
14	H ₂ O	5 Min
15	Bläuen-Reagenz (Shandon)	1 Min
16	H ₂ O	1 Min
17	Eosin-Gemisch	3 sec
18	Aqua dest.	15 sec
19	70% Alkohol	2 Min
20	96% Alkohol	2 Min
21	Abs. Alkohol	2 Min
22	Abs. Alkohol	2 Min
23	Xylol	2 Min
24	Xylol	2 Min

Tabelle 7-3 Immunhistochemischer Nachweis mit monoklonalen Antikörper gegen CD3, CD15, CD20, CD68 mit Autostainer TechMate 500 Plus, Firma DAKOCytomation

1	Entparaffinierung mit EZ-DeWax (Firma BioGenex), 2x 5 Min entparaffinieren
2	Gut wässern mit Leitungswasser
3	Vorbehandlung der Schnitte je nach Primär-Antikörper zur Demaskierung von Antigenen: z.B. Rabbit Anti-Mycobacterium bovis, Firma DAKOCytomation, Verdünnung 1:4500,

Anhang

	Vorbehandlung der Schnitte mit Protease Typ XXIV, Firma SIGMA, 10 Min bei Raumtemperatur andauern
4	Schnitte in Tris-HCL pH 7,6 spülen
5	Schnitte mit Primär-Antikörper beschichten und 25 Min bei Raumtemperatur inkubieren
6	Schnitte in Tris-HCL pH 7,6 spülen
7	Detektion der gebundenen Primär-Antikörper mit dem DAKO ChemMate Detektionskit
7-1	Biotinylierter Sekundär-Antikörper gegen Maus- und Kaninchen-Immunglobuline, Inkubation der Schnitte für 5 Min bei Raumtemperatur
7-2	Schnitte in Tris-HCL pH 7,6 spülen
7-3	Streptavidin/alkalische Phosphatase, Streptavidin konjugiert mit alkalischer Phosphatase in Pufferlösung, Inkubation der Schnitte für 5 Min bei Raumtemperatur
7-4	Schnitte in Tris-HCL pH 7,6 spülen
7-5	Chromogen-Substrat wird aus den vier Komponenten AP-Substrat, Chromogen 1,2,3 vorbereitet und 10 Min bei Raumtemperatur inkubiert
8	Schnitte in Aqua dest. spülen
9	Gegenfärben in Hämalun nach Mayer 30 sec und Bäumen in Leitungswasser 5 Min
10	Schnitte in wässrigem Eindeckmedium Kaiser's Glycerin-Gelatine eindecken

7.5 **Abkürzungsverzeichnis**

AK	Antikörper
Be	Benzoylperoxid
CCR2	Chemokine Receptor Type 2
CD	Cluster of differentiation
cDNA	complementary Desoxyribonukleinsäure
Cr	Kaliumdichromat
ECT	Epikutantest
Ge	Gentamycin
HE	Hämtoxylin-Eosin
HLA	Human Leukocyte Antigen
HPF	high power field
IFN γ	Interferon gamma
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
KA	Kontaktallergische Dermatitis
kD	kiloDalton
Ko	Kobalt (II)-chlorid
KP1	Anti-CD68-Antikörper, Klon KP1
LTT	Lymphozytentransformationstest
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
n.d.	nicht durchgeführt
Ni	Nickel (II)-sulfat
RT-PCR	reverse Transkriptase Polymerase-Ketten-Reaktion
SI	Stimulationsindex
Tc-Zellen	zytotoxische T-Zellen
Th-Zellen	T-Helfer-Zellen
Treg	regulatorische T-Zellen
TGF β	Transforming Growth Factor beta
TNF α	Tumor Nekrosis Faktor alpha
WOMAC	Western Ontario and Mc Master osteoarthritis index

8 Literaturverzeichnis

1. Huber, B., [100 years of allergy: Clemens von Pirquet--his concept of allergy and his basic understanding of the disease: 2: The Pirquet concept of allergy]. *Wien Klin Wochenschr*, 2006. **118**(23-24): p. 718-27.
2. Gell, P.G.H.e., *Clinical aspects of immunology; edited by P. G. H. Gell and R. R. A. Coombs*, ed. R.R.A. Coombs. 1963, Oxford, Edinburgh: Blackwell Scientific.
3. Fritsch, P., *Dermatologie, Venerologie Grundlagen, Klinik, Atlas ; mit 268 Tabellen. 2.*, [vollst. überarb.] Aufl. ed. 2004, Berlin [u.a.]: Springer. XIII, 1101 S. : zahlr. Ill., graph. Darst.
4. Braun-Falco, O., *Dermatologie und Venerologie. 6. Aufl.*, ed. 2012, Heidelberg: Springer. XVI, 2061 S.
5. Grevers, G., *Taschenatlas Allergologie. 2. ed.* 2008: Thieme. 268 S.
6. Belsito, D.V., *The diagnostic evaluation, treatment, and prevention of allergic contact dermatitis in the new millennium.* *J Allergy Clin Immunol*, 2000. **105**(3): p. 409-20.
7. Blauvelt, A., S.T. Hwang, and M.C. Udey, *11. Allergic and immunologic diseases of the skin.* *J Allergy Clin Immunol*, 2003. **111**(2 Suppl): p. S560-70.
8. Divkovic, M., et al., *Hapten-protein binding: from theory to practical application in the in vitro prediction of skin sensitization.* *Contact Dermatitis*, 2005. **53**(4): p. 189-200.
9. Zhang, Y. and D.E. Wilcox, *Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin.* *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 2002. **7**(3): p. 327-37.
10. Pichler, W.J., et al., *Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept.* *Allergol Int*, 2006. **55**(1): p. 17-25.
11. Vocanson, M., et al., *Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis.* *Allergy*, 2009. **64**(12): p. 1699-714.
12. Le Borgne, M., et al., *Dendritic cells rapidly recruited into epithelial tissues via CCR6/CCL20 are responsible for CD8+ T cell crosspriming in vivo.* *Immunity*, 2006. **24**(2): p. 191-201.
13. Villadangos, J.A., *Hold on, the monocytes are coming!* *Immunity*, 2007. **26**(4): p. 390-2.
14. Bursch, L.S., et al., *Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells.* *J Exp Med*, 2007. **204**(13): p. 3147-56.
15. Fukunaga, A., et al., *Dermal dendritic cells, and not Langerhans cells, play an essential role in inducing an immune response.* *J Immunol*, 2008. **180**(5): p. 3057-64.
16. Poulin, L.F., et al., *The dermis contains langerin+ dendritic cells that develop and function independently of epidermal Langerhans cells.* *J Exp Med*, 2007. **204**(13): p. 3119-31.
17. Wang, L., et al., *Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions.* *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 4722-7.
18. Weltzien, H.U., et al., *T cell immune responses to haptens. Structural models for allergic and autoimmune reactions.* *Toxicology*, 1996. **107**(2): p. 141-51.
19. Sad, S., R. Marcotte, and T.R. Mosmann, *Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines.* *Immunity*, 1995. **2**(3): p. 271-9.
20. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.* *Annu Rev Immunol*, 1989. **7**: p. 145-73.
21. Huber, M., et al., *A Th17-like developmental process leads to CD8(+) Tc17 cells with reduced cytotoxic activity.* *Eur J Immunol*, 2009. **39**(7): p. 1716-25.
22. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage.* *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
23. Veldhoen, M., et al., *TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells.* *Immunity*, 2006. **24**(2): p. 179-89.
24. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells.* *Nature*, 2006. **441**(7090): p. 235-8.

25. Yamagiwa, S., et al., *A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7282-9.
26. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
27. Akiba, H., et al., *Skin inflammation during contact hypersensitivity is mediated by early recruitment of CD8+ T cytotoxic 1 cells inducing keratinocyte apoptosis*. J Immunol, 2002. **168**(6): p. 3079-87.
28. Vocanson, M., et al., *CD8+ T cells are effector cells of contact dermatitis to common skin allergens in mice*. J Invest Dermatol, 2006. **126**(4): p. 815-20.
29. Martin, S., et al., *Peptide immunization indicates that CD8+ T cells are the dominant effector cells in trinitrophenyl-specific contact hypersensitivity*. J Invest Dermatol, 2000. **115**(2): p. 260-6.
30. Lopez, C.B., et al., *CD8+ T cells are the effectors of the contact dermatitis induced by urushiol in mice and are regulated by CD4+ T cells*. Int Arch Allergy Immunol, 1998. **117**(3): p. 194-201.
31. Bouloc, A., A. Cavani, and S.I. Katz, *Contact hypersensitivity in MHC class II-deficient mice depends on CD8 T lymphocytes primed by immunostimulating Langerhans cells*. J Invest Dermatol, 1998. **111**(1): p. 44-9.
32. Cavani, A., et al., *Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis*. Trends Immunol, 2001. **22**(3): p. 118-20.
33. Okazaki, F., et al., *Initial recruitment of interferon-gamma-producing CD8+ effector cells, followed by infiltration of CD4+ cells in 2,4,6-trinitro-1-chlorobenzene (TNCB)-induced murine contact hypersensitivity reactions*. J Dermatol, 2002. **29**(11): p. 699-708.
34. Traidl, C., et al., *Disparate cytotoxic activity of nickel-specific CD8+ and CD4+ T cell subsets against keratinocytes*. J Immunol, 2000. **165**(6): p. 3058-64.
35. Larsen, J.M., et al., *IL-23 and T(H)17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **123**(2): p. 486-92.
36. He, D., et al., *CD8+ IL-17-producing T cells are important in effector functions for the elicitation of contact hypersensitivity responses*. J Immunol, 2006. **177**(10): p. 6852-8.
37. Albanesi, C., A. Cavani, and G. Girolomoni, *IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha*. J Immunol, 1999. **162**(1): p. 494-502.
38. Pennino, D., et al., *IL-17 amplifies human contact hypersensitivity by licensing hapten nonspecific Th1 cells to kill autologous keratinocytes*. J Immunol, 2010. **184**(9): p. 4880-8.
39. Nakae, S., et al., *Antigen-specific T cell sensitization is impaired in IL-17-deficient mice, causing suppression of allergic cellular and humoral responses*. Immunity, 2002. **17**(3): p. 375-87.
40. Albanesi, C., et al., *A cytokine-to-chemokine axis between T lymphocytes and keratinocytes can favor Th1 cell accumulation in chronic inflammatory skin diseases*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(4): p. 617-23.
41. Kondo, S., R.C. McKenzie, and D.N. Sauder, *Interleukin-10 inhibits the elicitation phase of allergic contact hypersensitivity*. J Invest Dermatol, 1994. **103**(6): p. 811-4.
42. Maguire, H.C., Jr., K.A. Ketcha, and E.C. Lattime, *Neutralizing anti-IL-10 antibody upregulates the induction and elicitation of contact hypersensitivity*. J Interferon Cytokine Res, 1997. **17**(12): p. 763-8.
43. Berg, D.J., et al., *Interleukin 10 but not interleukin 4 is a natural suppressant of cutaneous inflammatory responses*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 99-108.
44. Ring, S., et al., *CD4+ CD25+ regulatory T cells suppress contact hypersensitivity reactions by blocking influx of effector T cells into inflamed tissue*. Eur J Immunol, 2006. **36**(11): p. 2981-92.

45. Cavani, A., et al., *Human CD4+ T lymphocytes with remarkable regulatory functions on dendritic cells and nickel-specific Th1 immune responses*. J Invest Dermatol, 2000. **114**(2): p. 295-302.
46. Schafer, T., et al., [*Allergies in adults*]. Gesundheitswesen, 2005. **67 Suppl 1**: p. S187-92.
47. Worm, M., et al., [*Patch testing with the DKG standard series 2001-2004. Results from the IVDK*]. Hautarzt, 2005. **56**(12): p. 1114-24.
48. Menne, T., et al., *Patch test reactivity to nickel alloys*. Contact Dermatitis, 1987. **16**(5): p. 255-9.
49. *European Parliament and Council Directive 94/27/EEC*. Official Journal of the European Communities, 1994. **L188**: p. 1-2.
50. Medizintechnologie, B.M.I.-u.S., 2011.
51. Rütt, A., *Geschichte der Orthopädie im deutschen Sprachraum*. 1993, Stuttgart: Enke. 112 S. : zahlr. Ill.
52. Thomas, P. and M. Thomsen, [*Implant allergies*]. Hautarzt, 2010. **61**(3): p. 255-62; quiz 263-4.
53. Thomas, P., et al., [*Allergy to bone cement components*]. Orthopade, 2008. **37**(2): p. 117-20.
54. Sharkey, P.F., et al., *Insall Award paper. Why are total knee arthroplasties failing today?* Clin Orthop Relat Res, 2002(404): p. 7-13.
55. Krenn, V., et al., [*Histopathologic diagnostics in endoprosthetics: periprosthetic neosynovialitis, hypersensitivity reaction, and arthrofibrosis*]. Orthopade, 2009. **38**(6): p. 520-30.
56. Pandey, R., E. Drakoulakis, and N.A. Athanasou, *An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues*. J Clin Pathol, 1999. **52**(2): p. 118-23.
57. Fousereau, J. and P. Laugier, *Allergic eczemas from metallic foreign bodies*. Trans St Johns Hosp Dermatol Soc, 1966. **52**(2): p. 220-5.
58. Kubba, R., J.S. Taylor, and K.E. Marks, *Cutaneous complications of orthopedic implants. A two-year prospective study*. Arch Dermatol, 1981. **117**(9): p. 554-60.
59. Kanerva, L. and L. Forstrom, *Allergic nickel and chromate hand dermatitis induced by orthopaedic metal implant*. Contact Dermatitis, 2001. **44**(2): p. 103-4.
60. Cramers, M. and U. Lucht, *Metal sensitivity in patients treated for tibial fractures with plates of stainless steel*. Acta Orthop Scand, 1977. **48**(3): p. 245-9.
61. Thomas, P., et al., *Intolerance of osteosynthesis material: evidence of dichromate contact allergy with concomitant oligoclonal T-cell infiltrate and TH1-type cytokine expression in the peri-implantar tissue*. Allergy, 2000. **55**(10): p. 969-72.
62. Thomas, P., et al., *Osteosynthesis associated contact dermatitis with unusual perpetuation of hyperreactivity in a nickel allergic patient*. Contact Dermatitis, 2006. **54**(4): p. 222-5.
63. Merritt, K. and J.J. Rodrigo, *Immune response to synthetic materials. Sensitization of patients receiving orthopaedic implants*. Clin Orthop Relat Res, 1996(326): p. 71-9.
64. Schuh, A., et al., [*Allergic potential of titanium implants*]. Orthopade, 2005. **34**(4): p. 327-8, 330-3.
65. Thomas, P., et al., *Hypersensitivity to titanium osteosynthesis with impaired fracture healing, eczema, and T-cell hyperresponsiveness in vitro: case report and review of the literature*. Contact Dermatitis, 2006. **55**(4): p. 199-202.
66. Lator, P.A., et al., *Sensitivity to titanium. A cause of implant failure?* J Bone Joint Surg Br, 1991. **73**(1): p. 25-8.
67. Yamauchi, R., A. Morita, and T. Tsuji, *Pacemaker dermatitis from titanium*. Contact Dermatitis, 2000. **42**(1): p. 52-3.
68. Christiansen, K., K. Holmes, and P.J. Zilko, *Metal sensitivity causing loosened joint prostheses*. Ann Rheum Dis, 1980. **39**(5): p. 476-80.
69. Goodman, S.B., *Does the immune system play a role in loosening and osteolysis of total joint replacements?* J Long Term Eff Med Implants, 1996. **6**(2): p. 91-101.

70. Schuh, A., et al., [*Bilateral localized osteolysis after cemented total hip replacement*]. Orthopade, 2004. **33**(6): p. 727-32.
71. Haddad, F.S., et al., *Hypersensitivity in aseptic loosening of total hip replacements. The role of constituents of bone cement*. J Bone Joint Surg Br, 1996. **78**(4): p. 546-9.
72. Richter-Hintz, D., et al., [*Sensitivity to constituents of bone cement in a patient with joint prosthesis*]. Hautarzt, 2004. **55**(10): p. 987-9.
73. Morawietz, L., et al., *Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane*. J Clin Pathol, 2006. **59**(6): p. 591-7.
74. Stucki, G., et al., [*Evaluation of a German version of WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities) Arthritis Index*]. Z Rheumatol, 1996. **55**(1): p. 40-9.
75. Schnuch, A., et al., [*Performing patch testing with contact allergens*]. J Dtsch Dermatol Ges, 2008. **6**(9): p. 770-5.
76. Krenn V, B.I., Kriegsman J et al, *Rheumapathologie/Gelenkpathologie und Infektionsdiagnostik*. Lehrserie IAP, Bonn, 2008. **IAP-Script Nr. 169**.
77. Willert, H.G., et al., *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.
78. Morawietz, L., et al., *Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening*. Histopathology, 2009. **54**(7): p. 847-53.
79. Mutter, G.L., et al., *Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays*. BMC Genomics, 2004. **5**: p. 88.
80. Livak KJ, S.T., *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DeltaDelta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
81. Davies, A.P., et al., *An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissues around contemporary metal-on-metal joint replacements*. J Bone Joint Surg Am, 2005. **87**(1): p. 18-27.
82. *Australian Orthopaedic Association National Joint Replacement Registry. Anual Report 2012*.
83. Krenn , V., et al., *Histopathological particale algorithm. Particle identification in the synovia and the SLIM*. Z Rheumatol, 2014. **73**(7): p. 639-49.
84. Stea, S., et al., *Cytokines and osteolysis around total hip prostheses*. Cytokine, 2000. **12**(10): p. 1575-9.
85. Arora, A., et al., *The role of the TH1 and TH2 immune responses in loosening and osteolysis of cemented total hip replacements*. J Biomed Mater Res A, 2003. **64**(4): p. 693-7.
86. Loria, M.P., et al., *Role of cytokines in gonarthrosis and knee prosthesis aseptic loosening*. J Orthop Sci, 2004. **9**(3): p. 274-9.
87. Clarke, S.A., et al., *Correlation of synovial fluid cytokine levels with histological and clinical parameters of primary and revision total hip and total knee replacements*. Acta Orthop Scand, 2001. **72**(5): p. 491-8.
88. Sypniewska, G., K. Lis, and P.J. Bilinski, *Bone turnover markers and cytokines in joint fluid: analyses in 10 patients with loose hip prosthesis and 39 with coxarthrosis*. Acta Orthop Scand, 2002. **73**(5): p. 518-22.
89. Beraudi, A., et al., *Assessment of five interleukins in human synovial fluid as possible markers for aseptic loosening of hip arthroplasty*. Artif Organs, 2009. **33**(7): p. 538-43.
90. Zmistowski, B., et al., *Diagnosis of periprosthetic joint infection*. J Orthop Res, 2014. **32 Suppl 1**: p. S98-107.
91. Krenn, V., et al., *Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology*. Pathol Res Pract, 2014. **210**(12): p. 779-86.
92. Parvizi, J., T. Gehrke, and A.F. Chen, *Proceedings of the International Consensus on Periprosthetic Joint Infection*. Bone Joint J, 2013. **95-B**(11): p. 1450-2.

93. Witzleb, W.C., et al., *Neo-capsule tissue reactions in metal-on-metal hip arthroplasty*. Acta Orthop, 2007. **78**(2): p. 211-20.
94. von Domarus, C., et al., *Necrobiosis and T-lymphocyte infiltration in retrieved aseptically loosened metal-on-polyethylene arthroplasties*. Acta Orthop, 2011. **82**(5): p. 596-601.
95. Thomas, P., et al., *Patients with Intolerance Reactions to Total Knee Replacement: Combined Assessment of Allergy Diagnostics, Periprosthetic Histology, and Peri-implant Cytokine Expression Pattern*. BioMed Research International, 2014. **2014**, Article ID **910156**.
96. Wang, B., et al., *CD4+ Th1 and CD8+ type 1 cytotoxic T cells both play a crucial role in the full development of contact hypersensitivity*. J Immunol, 2000. **165**(12): p. 6783-90.
97. Baldwin, L., et al., *A study of tissue interface membranes from revision accord knee arthroplasty: the role of T lymphocytes*. Biomaterials, 2002. **23**(14): p. 3007-14.
98. Li, T.F., et al., *No lymphokines in T-cells around loosened hip prostheses*. Acta Orthop Scand, 2001. **72**(3): p. 241-7.
99. Santavirta, S., et al., *Immunopathological response to loose cementless acetabular components*. J Bone Joint Surg Br, 1991. **73**(1): p. 38-42.
100. Goodman, S.B., et al., *Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements*. J Bone Joint Surg Br, 1998. **80**(3): p. 531-9.
101. Ishii, H., et al., *Characterization of infiltrating T cells and Th1/Th2-type cytokines in the synovium of patients with osteoarthritis*. Osteoarthritis Cartilage, 2002. **10**(4): p. 277-81.
102. Janossy, G., et al., *Rheumatoid arthritis: a disease of T-lymphocyte/macrophage immunoregulation*. Lancet, 1981. **2**(8251): p. 839-42.
103. Jansen, E., et al., *Characterization of macrophage polarizing cytokines in the aseptic loosening of total hip replacements*. J Orthop Res, 2014. **32**(9): p. 1241-6.
104. Lator, P.A. and P.A. Revell, *T-lymphocytes and titanium aluminium vanadium (TiAlV) alloy: Evidence for immunological events associated with debris deposition*. Clinical Materials, 1993. **12**(1): p. 57-62.
105. Scharstuhl, A., et al., *Inhibition of endogenous TGF-beta during experimental osteoarthritis prevents osteophyte formation and impairs cartilage repair*. J Immunol, 2002. **169**(1): p. 507-14.
106. Scharstuhl, A., et al., *Reduction of osteophyte formation and synovial thickening by adenoviral overexpression of transforming growth factor beta/bone morphogenetic protein inhibitors during experimental osteoarthritis*. Arthritis Rheum, 2003. **48**(12): p. 3442-51.
107. Tanaka, H., et al., *Efficiency of magnetic liposomal transforming growth factor-beta 1 in the repair of articular cartilage defects in a rabbit model*. J Biomed Mater Res A, 2005. **73**(3): p. 255-63.
108. Pap, G., et al., *Elevated plasma levels of transforming growth factor beta 1 in patients with aseptic loosening of total hip arthroplasties*. Scand J Rheumatol, 1999. **28**(6): p. 383-4.
109. Cenni, E., et al., *Plasma levels of platelet-derived growth factor BB and transforming growth factor in patients with failed hip prostheses*. Acta Orthop, 2005. **76**(1): p. 61-6.
110. Remst, D.F., et al., *Gene expression analysis of murine and human osteoarthritis synovium reveals elevation of transforming growth factor beta-responsive genes in osteoarthritis-related fibrosis*. Arthritis Rheumatol, 2014. **66**(3): p. 647-56.
111. Motomura, T., et al., *Increased interleukin-6 production in mouse osteoblastic MC3T3-E1 cells expressing activating mutant of the stimulatory G protein*. J Bone Miner Res, 1998. **13**(7): p. 1084-91.
112. Kwan Tat, S., et al., *IL-6, RANKL, TNF-alpha/IL-1: interrelations in bone resorption pathophysiology*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(1): p. 49-60.
113. Neale, S.D., et al., *Macrophage colony-stimulating factor and interleukin-6 release by periprosthetic cells stimulates osteoclast formation and bone resorption*. J Orthop Res, 1999. **17**(5): p. 686-94.

114. Konttinen, Y.T., et al., *Interleukin-6 in aseptic loosening of total hip replacement prostheses*. Clin Exp Rheumatol, 2002. **20**(4): p. 485-90.
115. Holliday, M.R., et al., *Selective stimulation of cutaneous interleukin 6 expression by skin allergens*. J Appl Toxicol, 1996. **16**(1): p. 65-70.
116. Bergschmidt, P., R. Bader, and W. Mittelmeier, *Metal hypersensitivity in total knee arthroplasty: Revision surgery using a ceramic femoral component - A case report*. Knee, 2011.
117. Dietrich, K.A., et al., *Intolerance reactions to knee arthroplasty in patients with nickel/cobalt allergy and disappearance of symptoms after revision surgery with titanium-based endoprotheses*. J Dtsch Dermatol Ges, 2009. **7**(5): p. 410-3.
118. Gober, M.D. and A.A. Gaspari, *Allergic contact dermatitis*. Curr Dir Autoimmun, 2008. **10**: p. 1-26.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. T. Ruzicka danke ich für die Erlaubnis, meine Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen zu können.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. P. Thomas für die Bereitstellung des Themas und die gute Betreuung sowie Herrn Prof. V. Krenn aus Trier für die umfangreiche Unterstützung bei der histologischen Analyse der Proben.

Mein herzlichster Dank geht an Herrn Dr. B. Summer sowie Herrn R. Pohl aus der Implantatallergie-Arbeitsgruppe für die unermüdliche Unterstützung bei Planung, Durchführung und Auswertung der Arbeit.

Schließlich möchte ich von ganzen Herzen meiner Familie danken. Mit viel Liebe und Geduld haben meine Eltern mich stets unterstützt, meine Ziele zu verfolgen. Ohne sie wäre das Medizinstudium und diese Dissertation für mich nicht denkbar gewesen.

Danke Ulrich, dass du für mich da warst und bist.

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Thomas, P., von der Helm, C., Schopf, C., Mazoochian, Frommelt, 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 Research International, vol. 2015, Article ID 910156, 9 pages, 2015.

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): 268-272

Preisverleihung im Rahmen der Frühjahrstagung (2012) der amerikanischen Fachgesellschaft für Orthopädie, BIOLOX® Clinical Award 2012: „*Periimplant histology and cytokine pattern in metal allergic knee arthroplasty patients with improvement after revision with hypoallergenic materials*“

Eidesstattliche Versicherung

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Charakteristika von Allergiediagnostik und histologisch-molekularer Analyse des periimplantären Gewebes bei Patienten mit Knieendoprothesenunverträglichkeit

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand