

Aus der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Lars E. French

**Knieendoprothetik und Metallunverträglichkeit: Bewertung anhand von  
klinischen Parametern, Allergietestung und molekularbiologischer Analyse  
von periimplantärem Gewebe**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Christoph Schopf

aus

Rosenheim

2019

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Thomas

Mitberichterstatter: PD Dr. Julia Tietze  
Prof. Dr. Andreas Fottner

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

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

Tag der mündlichen Prüfung: 27.06.2019

# Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung
  - 1.1. Einführung
  - 1.2. Allergietypen
  - 1.3. Das allergische Kontaktekzem
    - 1.3.1 Morphologie des allergischen Kontaktekzems
    - 1.3.2 Histologie des allergischen Kontaktekzems
    - 1.3.3 Diagnostik des allergischen Kontaktekzems
    - 1.3.4 Immunmechanismen des allergischen Kontaktekzems
  - 1.4. Metallallergie und Implantatunverträglichkeit
    - 1.4.1 Metalle als häufige Spättypallergie-Auslöser
  - 1.5. Metallimplantate
    - 1.5.1 Häufigkeit der Implantation von Knie- und Hüftendoprothesen
    - 1.5.2 Implantatmaterialien
    - 1.5.3 Problematik post implantationem
  - 1.6. Histologie bei Implantatversagen
2. Zielsetzung
3. Material und Methoden
  - 3.1. Patientenkollektiv
    - 3.1.1. Patientienrekrutierung
    - 3.1.2. Patientencharakteristika
  - 3.2. Fragebogen zur Metallverträglichkeit
  - 3.3. Allergiediagnostik
    - 3.3.1. Epicutantest (ECT)
    - 3.3.2. Lymphozytentransformationstest (LTT)
  - 3.4. Histomorphologie
  - 3.5. Zytokinanalyse
    - 3.5.1. Übersicht
    - 3.5.2. Isolierung der RNA
      - 3.5.2.1. Proben-RNA-Stabilisierung
      - 3.5.2.2. Gesamt-RNA-Isolierung aus stabilisierten Proben
    - 3.5.3. RNA-Konzentrationsbestimmung
    - 3.5.4. Reverse Transkription (cDNA-Synthese)
    - 3.5.5. Quantitative PCR (qPCR)
      - 3.5.5.1. Überblick
      - 3.5.5.2. Protokoll
    - 3.5.6. Relative Quantifizierung
      - 3.5.6.1. Auswertung der Schmelzkurvenanalyse
      - 3.5.6.2. Houskeeping gene (Referenzgen)
      - 3.5.6.3. Bestimmung der relativen Expression
  - 3.6. Statistische Auswertung
    - 3.6.1. Auswertung der Merkmalsausprägungen im Fragebogen
    - 3.6.2. Auswertung der Ergebnisse des Lymphozytentransformationstest (LTT)
    - 3.6.3. Auswertung der Zytokinexpressionsraten
4. Ergebnisse
  - 4.1. Ergebnisse der Fragebögen

- 4.1.1. Beschwerden
- 4.1.2. Weitere anamnestisch erhobene Charakteristika
- 4.2. Mikrobiologische Ergebnisse
- 4.3. Allergiediagnostikerggebnisse
  - 4.3.1. Reaktionen auf Metalle im Epikutantest
  - 4.3.2. Reaktionen auf Knochenzementkomponenten im Epikutantest
  - 4.3.3. Reaktionen im Lymphozytentransformationstest (LTT)
  - 4.3.4. Verhältnis zwischen Reaktionen auf Nickel im ECT und LTT
- 4.4. Histomorphologie
  - 4.4.1. Überblick
  - 4.4.2. Patientenkollektiv I
  - 4.4.3. Patientenkollektiv II
  - 4.4.4. Kontrollkollektiv
- 4.5. Auswertung der Zytokinexpression
  - 4.5.1. Übersicht
  - 4.5.2. Zytokinwerte getrennt nach Studienkollektiven
    - 4.5.2.1. Zytokinwerte getrennt nach Studienkollektiven
    - 4.5.2.2. Zytokinwerte des Patientenkollektiv I
    - 4.5.2.3. Zytokinwerte des Patientenkollektiv II
    - 4.5.2.4. Zytokinwerte des Kontrollkollektivs
    - 4.5.2.5. Zusammenfassung der Zytokinwerte nach Studienkollektiven
  - 4.5.3. Vergleichende Gegenüberstellung der Studienkollektive
    - 4.5.3.1. Vergleichende Gegenüberstellung der Zytokinwerte in den einzelnen Studienkollektiven
- 4.6. Gegenüberstellender Vergleich von Histomorphologie und Zytokinprofilen
  - 4.6.1. Übersicht
  - 4.6.2. Patientenkollektiv I
  - 4.6.3. Patientenkollektiv II
  - 4.6.4. Kontrollkollektiv
- 5. Diskussion
  - 5.1. Methodendiskussion
    - 5.1.1. Epikutantest
    - 5.1.2. Lymphozytentransformationstest
    - 5.1.3. Histomorphologische Untersuchung
    - 5.1.4. Zytokinanalyse
  - 5.2. Diskussion der Ergebnisse
    - 5.2.1. Vergleichende Gegenüberstellung der Zytokinexpressionsraten der einzelnen Studienkollektive
      - 5.2.1.1. TNF $\alpha$ -Expression
      - 5.2.1.2. IL-6-Expression
      - 5.2.1.3. IL-1 $\beta$ -Expression
      - 5.2.1.4. IL-10-Expression
      - 5.2.1.5. OPG- und RANKL-Expression
      - 5.2.1.6. CCL2-Expression
      - 5.2.1.7. OPN-Expression
    - 5.2.2. Histomorphologische Gegenüberstellung der Patientenkollektive
  - 5.3. Ausblick
- 6. Zusammenfassung

7. Anhang
  - 7.1. Auswahl von relevanten Zytokinen bei Materialunverträglichkeit
  - 7.2. Patientenfragebogen
  - 7.3. ECT-Ableseprotokolle
  - 7.4. Methoden zur histologischen Färbung
  - 7.5. Verbrauchsmaterialien zur Zytokinanalyse
8. Danksagung
9. Literaturverzeichnis

# **1. Einleitung**

## **1.1 Einführung**

In unserer heutigen Gesellschaft werden die Menschen dank des medizinischen Fortschritts stetig älter. Zugleich nehmen aber degenerative Erkrankungen unseres Bewegungsapparates zu. Nicht zu vergessen sind darüber hinaus Frakturen, welche auf dem Boden einer vorbestehenden Minderung des Kalksalzgehalts des Skeletts auftreten. In Deutschland war im Jahr 2015 die Diagnose „Arthrose“ in ca. 400.000 Fällen bei Patienten, die aus einer stationären Behandlung entlassen wurden, kodiert worden [1]. Zum gleichen Zeitpunkt stellt die Arthrose den häufigsten Grund dar, weswegen Gelenkendoprothesen implantiert werden müssen. Beim weiblichen Geschlecht begründet die Arthrose nach der Spontangeburt die meisten stationären Aufenthalte. Der Bedarf an Endoprothesen wird stetig steigen. Normalerweise bringt Endoprothetik Lebensqualität zurück und das implantierte Material wird gut vertragen. Die klassischen und ausführlich bekannten Komplikationen wie Endoprotheseninfekt oder mechanische Komplikationen aufgrund in falscher Lage implantierter Prothesenkomponenten sind seit Jahren gut untersucht. Das Problem der Implantatunverträglichkeit, möglicherweise im Sinne einer Spättyp-Allergie (Typ-IV-Sensibilisierung), ist im Wesentlichen noch nicht ausreichend beleuchtet. Unter dem Gesichtspunkt der steigenden Zahl an Patienten, welche unter Arthrose leiden und zukünftig eines Gelenkersatzes bedürfen oder auch bei Komplikationen revidiert werden müssen, sollte man dieses Problem ernst nehmen und weiter untersuchen. Darüber hinaus könnte es hilfreich sein, von der Implantatunverträglichkeit bedrohte Patienten frühzeitig zu identifizieren, um so das Risiko von Endoprothesenrevisionen zu senken.

## **1.2 Allergietypen**

Coombs und Gell teilten die allergischen Reaktionen in den 60er Jahren in noch heute gültige vier verschiedene Typen ein [2]:

### **Soforttypreaktion (Typ I)**

Diese Reaktion beruht auf einer Interaktion von überwiegend löslichen Proteinen, die als Allergene wirken, und IgE-Antikörpern, welche auf der Oberfläche von Mastzellen oder Basophilen gebunden sind und bei Allergenkontakt die rezeptorgebundenen IgE-Antikörper

vernetzen. Dies führt zu einer Freisetzung von Substanzen wie Histamin oder TNF, sowie zur Bildung von Leukotrienen/Prostaglandinen und proallergischen Zytokinen wie IL-4 oder IL-5. Beispiele für diesen rasch einsetzenden Allergietyp sind allergische Rhinitis, Urtikaria oder der anaphylaktische Schock.

### **Zytotoxische Reaktionen (Typ II)**

Die Typ-II-Reaktion wird über IgG-Antikörper vermittelt, die auf der Zelloberfläche mit Antigenen interagieren. Antigene können etwa Zellkomponenten wie Rhesus-D-Antigen oder Teile der Basalmembran darstellen. Gleichwohl ist es auch möglich, dass körperfremde Stoffe wie beispielsweise an Erythrozyten gebundene Arzneistoffe eine entsprechende Reaktion herbeiführen. Komplement- und Phagozytenmechanismen vermitteln dabei die zellschädigende Reaktion. Zusätzlich kann es zur Störung der Signalübertragung kommen, wobei hier IgG-Antikörper gegen bestimmte Oberflächenrezeptoren gerichtet sein müssen. Paradebeispiele für diese Art der Reaktion sind Rhesus-D oder durch Arzneistoffe induzierte Hämolysen.

### **Immunkomplexreaktionen (Typ III)**

Auch bei dieser Reaktion stehen die IgG-Antikörper im Mittelpunkt des Geschehens. Bei der Typ-III-Reaktion sind sie allerdings gegen lösliche Antigene gerichtet. Durch die Bindung der IgG-Antikörper an die löslichen Antigene bilden sie Immunkomplexe, welche entweder lokal oder systemisch eine Granulozyten-/Monozytenaktivierung herbeiführen, die wiederum Gefäß- und/oder Gewebeschäden zur Folge haben können. Klinische Beispiele wären etwa eine durch Komponenten von Bakterien induzierte Endokarditis oder eine Alveolitis aufgrund der eingeatmeten Antigene.

### **Spättypreaktion (Typ IV)**

Hier sind es antigenspezifische T-Lymphozyten, die die Immunreaktion vermitteln. Die Stimulation zur Sensibilisierung erfolgt durch antigenpräsentierende dendritische Zellen, Monozyten oder Makrophagen. Im Anschluss an einen erneuten Antigenkontakt setzen die T-Lymphozyten proinflammatorische Zytokine frei. Resultat ist eine lokale Infiltration von weiteren T-Zellen und anderen Effektorzellen wie eosinophile Granulozyten. Die Reaktion benötigt oft mehrere Tage bis zum klinisch erkennbaren „Problem“. Mögliche Allergene sind

zum Beispiel Metallionen oder andere niedermolekulare Substanzen, welche die Möglichkeit der Bindung an körpereigene Proteine besitzen, um so zum Vollantigen zu werden. Ein entsprechendes klinisches Symptom ist das kontaktallergische Ekzem. Ein anderes Beispiel wäre die Tuberkulinreaktion mit ihren pseudolymphomartig, gruppiert stehenden Papeln.

## **1.3 Das allergische Kontaktekzem**

### **1.3.1 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 als akute Dermatitis, bei wiederholter oder dauernder Exposition als chronisches Kontaktekzem.“*[3, 132]

Ein Erythem stellt den Anfang der akuten Ekzemreaktion dar, die ca. 48 Stunden nach der Allergeneinwirkung beginnt. Die matte Oberfläche der geröteten Haut ist bedingt durch das intraepidermale Ödem. Das Ödem kann bei seiner größten Ausprägung bis zur Bildung von Bläschen führen. Nach einmaliger Exposition gegenüber dem Allergen dauert es in der Regel nur wenige Tage bis zum Abheilen. Findet jedoch eine dauerhafte oder wiederholte Exposition statt, so führt dies zu einem chronischen Kontaktekzem. Hierbei ist eine entzündliche Hautverdickung zu sehen, wobei die Hautfölderung massiv vergrößert erscheint. Dies wird Lichenifikation genannt. Die reaktive Epidermisverdickung führt zur Hyperkeratose. Gleichzeitig sind Rötungen, Bläschen, Erosionen, Krusten und Schuppen zu sehen. Makulopapulöse Streuherde in der Umgebung sind typisch für die allergisch getriggerte Kontaktdermatitis [4].

### **1.3.2 Histologie des allergischen Kontaktekzems**

Untenstehende Charakteristika sind klassischerweise in der H.E.-Färbung unter dem Lichtmikroskop zu sehen: Als Spongiose der Epidermis wird eine Erweiterung der Zellzwischenräume beschrieben, die diese schwammartig erscheinen lässt. Bedingt ist das durch ein Ödem als Folge der Inflammation. Hierbei bilden sich kleine, intraepidermal gelegene Bläschen, welche meistens nur durch dünne Septen voneinander getrennt sind. Zumeist sind hier ebenfalls lymphozytäre Zellen eingewandert. Weiterhin findet sich ein verbreitertes Stratum spinosum im Sinne einer akanthotischen Epidermis. Zusätzlich sind häufig perivesikuläre Infiltrate aus Lymphozyten zu finden, vereinzelt zeigen sich auch neutrophile und/oder eosinophile Granulozyten [2, 4].



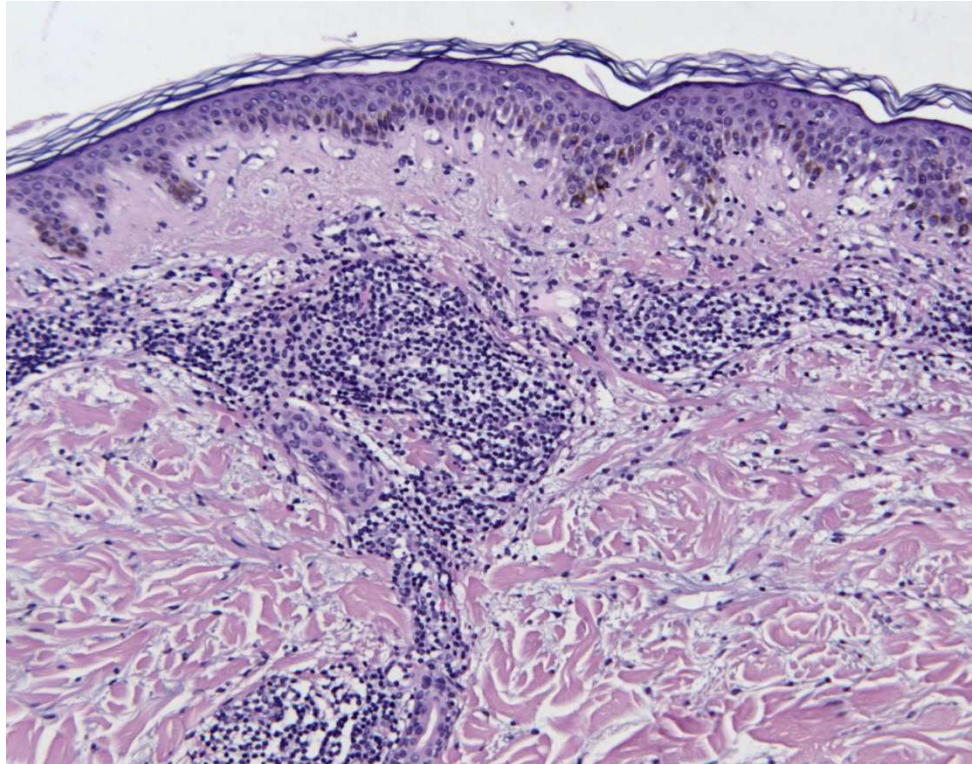


Abbildung 1-1 Ekzemreaktion (positive Reaktion im Epikutantest auf Nickelsulfat (H.E.-Färbung, 20x))

### 1.3.3 Diagnostik des allergischen Kontaktekzems

Für eine zielführende allergologische Diagnostik ist eine ausführliche Anamnese essentiell. Wichtig ist der Aufschluss über das Beschwerdebild, die Exposition sowie die beschwerdeauslösende Situation. Bei der körperlichen Untersuchung gilt es nach möglichen allergisch bedingten Haut- und Schleimhautbefunden Ausschau zu halten. Im Anschluss folgen Allergietests, wobei Hauttests nur nach Ausschluss möglicher Kontraindikationen, wie beispielsweise eine bestehende Schwangerschaft, durchgeführt werden können.

In der Allergietestung wird zwischen In-vivo- und In-vitro-Tests unterschieden. Für die Typ-IV-Reaktion stellt der Epikutantest (ECT) die gängige In-vivo-Methode dar. Dabei erfolgt die standardisierte Applikation von möglichen Allergenen für 48h am Patientenrücken.

In-vitro-Methoden stellen hingegen die IgE-Bestimmung oder der Lymphzytentransformationstest (LTT) dar. Bei letzterem noch eher wissenschaftlichen Test wird die T-lymphozytäre Sensibilisierung vom verzögerten Typ gegen bestimmte Allergene gemessen. Problematisch ist bei allen In-vitro-Testungen die methodische Anfälligkeit, zudem muss die klinische Relevanz der Testergebnisse immer kritisch hinterfragt werden [2, 5, 6].

### **1.3.4 Immunmechanismen des allergischen Kontaktekzems**

Derzeit geht man davon aus, dass eine mögliche genetische Prädisposition für die Bereitschaft der Haut, auf gewisse Allergene mit einer Typ-IV-Reaktion zu antworten, vorliegt. Eine entsprechende Verbindung z.B. mit entsprechenden humanen Leukozytenantigen-Typen (HLA) wurde wissenschaftlich allerdings noch nicht belegt [3, 4, 132].

Allergene stellen meistens niedermolekulare Substanzen dar (Molekulargewicht 5-70 kD). Die Sensibilisierungspotenz ist von Allergen zu Allergen unterschiedlich. Wichtige Faktoren sind die Einwirkungsdauer, die Konzentration und die irritative Potenz. Die alleinige chemische Struktur lässt hingegen keinen Rückschluss auf die Sensibilisierungspotenz zu [7, 8].

Meistens sind diese Substanzen so genannte Haptene. Haptene müssen mit einem Trägerprotein eine Bindung eingehen, um so zum Vollantigen zu werden und dann eine Immunantwort auslösen zu können. Trägerproteine können beispielsweise epidermale Proteine oder Serumalbumin sein. Die Bindung ist in den meisten Fällen kovalent. Hier binden spezifische Aminosäuren (v.a. Cystein) der Trägerproteine an das Hapten [9, 132]. Im Falle der Metallallergene (Chrom, Kobalt oder Nickel) bilden sich nicht kovalente Protein-Metall-Chelate [10]. Darüber hinaus sind nicht-kovalente Hapten-major histocompatibility complex-Interaktionen Gegenstand weitreichender Diskussionen [11].

Bei der Pathogenese des allergischen Kontaktekzems können zwei Stadien voneinander unterschieden werden:

#### **Sensibilisierung (afferente Phase der allergischen Ekzemreaktion)**

Bei einem ersten Kontakt wird das Hapten nach der Penetration der Haut an ein entsprechendes Trägerprotein gebunden, hierauf folgt die inflammatorische Reaktion. Es folgt die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren aus den Keratinozyten (u.a. IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , etc.) [12]. Dies hat zur Folge, dass Monozyten eine Rekrutierung durchlaufen, um dann aus dem peripheren Blut zur betroffenen Stelle in der Haut auszuwandern. Aus diesen CCR2+ Monozyten werden dendritische Zellen [13, 14, 132]. In unmittelbarer Nachbarschaft an diese eingewanderten dendritischen Zellen können andere Zellen der gleichen Linie gefunden werden. In der Epidermis werden diese Langerhans-Zellen und in der Dermis dermale dendritische Zellen genannt [12, 132]. Eben diesen ortsansässigen dendritischen Zellen in Epidermis und Dermis wird eine Schlüsselrolle in der Entstehungskaskade der allergisch

bedingten Dermatitis zugesprochen [15-18, 132]. Der major histocompatibility complex (MHC) der Klassen I und II befindet sich an der Oberfläche der dendritischen Zellen [19, 132]. Dies ist der Ort der Hapten-Proteinkomplex-Prozessierung. An den MHC-Komplex gebundene Allergene werden den T-Lymphozyten, welche einen passenden Zell-Rezeptor besitzen, präsentiert, nachdem die dendritische Zelle zum regionären Lymphknoten in die paracorticale Zone gewandert ist. Nun folgt die Differenzierung und Aktivierung von Hapten-spezifischen CD8<sup>+</sup>- und CD4<sup>+</sup>-Zellen. Dem vorherrschenden Zytokinmilieu der Interaktion von dendritischen mit T-Zellen wird eine große Bedeutung zugesprochen [12, 132]. Entsprechend differenzieren CD4<sup>+</sup>- bzw. CD8<sup>+</sup>-Zellen unter der Einwirkung von IFN $\gamma$  zu Typ 1-Zellen (Th1 bzw. Tc1-Zellen) [20, 21], wohingegen die IL-6- und TGF $\beta$ -Einwirkung die Differenzierung von Typ 17-Zellen (Th17 bzw. Tc17) fördert [22-25]. Gleichermaßen entstehen Typ 2-Zellen (Th2 bzw. Tc2), wenn IL-4 einwirkt [20, 21], [26]:

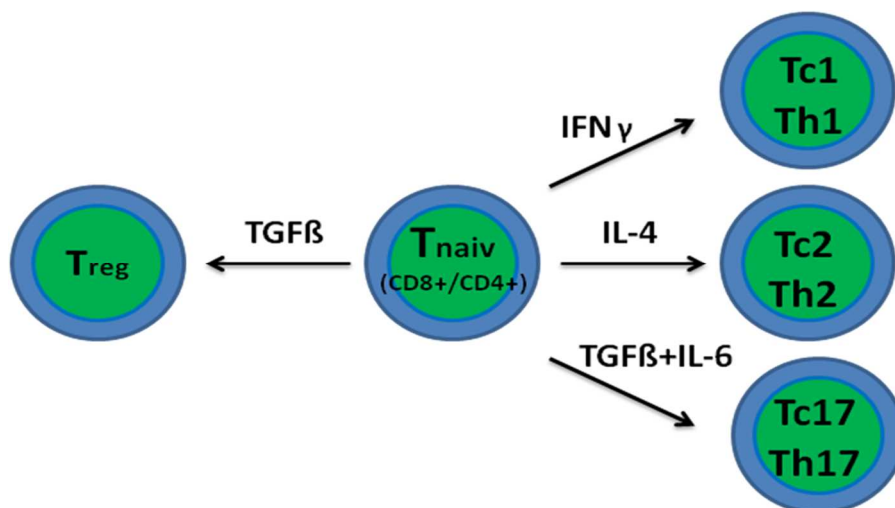


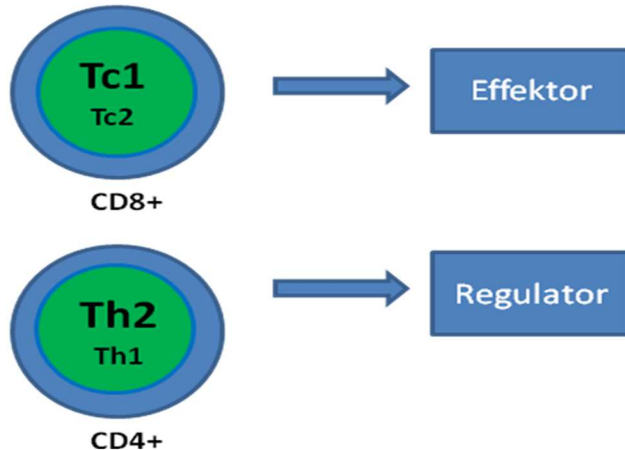
Abbildung 1-2 Mögliche Differenzierung der T-Lymphozyten [27]

### Auslösung des allergischen Kontaktekzems durch Reexposition (efferente Phase)

Zum Auftreten der akuten kutanen Ekzemreaktion kommt es ca. 48 – 72h nach erneutem Kontakt mit dem Hapten auf der Haut. Bei einer Reexposition können T-Zellen nach Allergenpräsentation während der afferenten Phase ins Gewebe auswandern. Folglich können sie proliferieren und spezielle Zytokine ausschütten, nachdem das Antigen erneut präsentiert wurde [12, 132]. Nach Stimulation schütten differenzierte T-Zellen vermehrt Typ 1-Zytokine aus, vornehmlich IFN $\gamma$ , welches die Immunreaktion verstärkt. In Mausmodellen wurde bisher nachgewiesen, dass in der Entstehung der allergisch bedingten Kontaktdermatitis CD4<sup>+</sup>-Zellen

regulatorische Zellen darstellen, während CD8+-Zellen vornehmlich Effektorzellen sind [28-32]. Beispielsweise zeigten MHC-I-defiziente knock-out-Mäuse keine Kontaktsensibilisierung beim kutanen Auftragen eines hochpotenten Kontaktallergens (DNFB 2,4-dinitro-1-Flourobenzol), weil sie für die Interaktion mit CD8+-Zellen unfähig sind. Hingegen stellte man bei MHC-II-defizienten knock-out-Mäusen eine deutlich verstärkte Kontaktsensibilisierung auf DNFB fest, da sie zu keiner Interaktion mit CD4+-Zellen befähigt sind. Aus guten Studien ergibt sich eine Ähnlichkeit in der Entstehung der durch Nickel hervorgerufenen Kontaktdermatitis beim Menschen [33, 132]. Allerdings ist nur beim Menschen auch eine direkte T-Zell-Rezeptor-Bindung möglich.

Des Weiteren konnten Akiba et al. zeigen, dass die Erhöhung der produzierten IFN $\gamma$ -Menge, welche von infiltrierenden CD8+-Zellen ausgeschüttet wird, und die Apoptose der Keratinozyten positiv korreliert [32]. Zudem besitzen auch CD4+-Zellen bei Keratinozyten die Fähigkeit Apoptose einzuleiten, hingegen lediglich durch IFN $\gamma$ -vermittelte MHC-II-Induktion [34]. Eine Kooperation zwischen CD4+- und zytotoxischen CD8+-Zellen gelingt erst dann, wenn CD8+-Zellen ihre Zytokine ausgeschüttet haben [35].



**Abbildung 1-3 Effektor- und Regulatorzellen der-kontaktvermittelten Sensibilisierung**

Weiters konnte die Ausreifung gewisser T-Zellen zu Typ17-Zellen beobachtet werden, wobei diese vermehrt IL-17-exprimierten [36, 37, 132]. Selbst bei allergischen Patienten ließen sich IL-17-exprimierende T-Zell-Klone nachweisen [38]. Zumeist waren diese Zellen CD4+, wobei ca. 1% CD8+-Zellen darstellten [39]. Neutralisiert man IL-17 mit entsprechenden Antikörpern, so zeigt sich eine verminderte kontaktallergische Reaktion. Bei knock-out-Mäusen mit IL-17-Defizienz war dies auch der Fall [36, 40].

Augenscheinlich sind Th17- und CD4+-Th1-Zellen für die Erweiterung der allergischen Antwort zuständig, wohingegen die Pathogenese der kontaktallergischen Reaktion auf der CD8+-Zell-vermittelten Zytotoxizität (besonders Tc1, siehe Abb. 1-3) gegen die Hapten beladenen Keratinozyten der Haut beruht [38, 41, 132].

### **Regulation der Kontaktsensibilisierung**

Dem Zytokin IL-10 wird ein wichtiger regulatorischer Effekt auf das allergische Geschehen zugesprochen. IL-10 inhibiert die Aktivität der T-Zellen, indem es die Ausschüttung von inflammationsfördernden Botenstoffen (TNF $\alpha$  und IFN $\gamma$ ) hemmt. Bei Mäusen ließ sich nach intradermaler Applikation von IL-10 eine geringere Ausprägung des allergischen Kontaktekzems nachweisen [42], während knock-out-Mäuse mit IL-10-Defizienz verstärkt reagierten [43, 132]. IL-10 und IL-4 stellen klassischerweise Th2-Zytokine dar. Dies lässt die Vermutung zu, dass der CD4+-Zelltyp über die Ausschüttung der Th2-Zytokine das allergische Kontaktekzem reguliert. Interessant ist aber, dass lediglich IL-10, jedoch nicht IL-4 eine regulatorische Wirkung zeigt. Obwohl Th2-Zellen sowohl IL-4 als auch IL-10 exprimieren [44, 132], lässt sich vermuten, dass zusätzlich ein anderer CD4+-Zelltyp im Stande ist, IL-10 zu produzieren.

Möglicherweise sind es CD4+CD25+-Zellen, welche als regulatorische T-Zellen (Treg) interagieren und dabei IL-10 ausschütten. Ring et al. konnte schon vor Jahren zeigen, dass Treg ihre immunmodulatorische Wirkung über die Ausschüttung von IL-10 vermitteln. Der direkte Zell-Zell-Kontakt bleibt diesbezüglich außen vor [45, 132]. Eine besonders hohe IL-10-Produktion wurde beim Treg Typ1-Subtyp (Tr1) in kontaktallergischer Haut nachgewiesen [46].

Tabelle 7-1 gibt einen Überblick über ausgewählte Zytokine und ihre Rolle im Rahmen der Kontaktallergie.

## **1.4 Metallallergie und Implantatunverträglichkeit**

### **1.4.1 Metalle als häufige Spättypallergie-Auslöser**

Die klassische Manifestation einer Spättypallergie stellt das allergische Kontaktekzem dar. Zu den typischen Auslösern zählen eine Reihe bekannter Metalle, die nicht selten als Implantatwerkstoffe verwendet werden. Entsprechende Sensibilisierungen gegen Metalle lassen sich mit dem Epikutantest (ECT) nachweisen. Eines der häufigsten und zugleich

potentesten Allergene ist Nickel. Weitere, jedoch seltenere Auslöser für kontaktallergische Reaktionen sind Kobalt und Chrom. Alle drei eben erwähnten Metalle sind in der Epikutanteststandardreihe inkludiert [47]. Nicht in die Standardreihe aufgenommen wurden andere Metalle wie Molybdän, Mangan, Vanadium oder Titan. Grund dafür ist, dass man einerseits diese nur sehr selten als Kontaktallergieauslöser vermutet und andererseits standardisierte Epikutantestsubstanzen hierzu fehlen [48].

### **Nickel (Ni)**

Nickel ist ein silberfarbenes Metall. Nickelsalze sind wasserlöslich, wobei Nickel beispielsweise in oxidierter Form wasserunlöslich ist. Nickel wird von uns Menschen sowohl mit der Nahrung als auch mit dem Trinkwasser aufgenommen. Anreicherungen sind in der Nahrungskette nicht bekannt, ebenso unbekannt ist eine kumulativ toxische Wirkung bei Menschen oder Tieren. Allerdings gibt es eine Nickelvergiftung, jedoch ist diese schier immer auf Nickelcarbonyl zurückzuführen [49]. Eine renale Nicketelimination aus dem menschlichen Körper geht schnell von statten [50].

In Form von metallischen, atemwegsgängigen Oxiden, Stäuben, Sulfiden oder Carbonaten stellt Nickel ein bekanntes Karzinogen dar [51]. Der Kontakt zu metallischen, nickelhaltigen Festkörpern zieht nach bisherigen Erkenntnissen kein erhöhtes Malignomrisiko nach sich [49]. Nickel ist zweifelsohne das Metall mit dem höchsten Sensibilisierungspotential. In der Allgemeinbevölkerung konnten große Studien (KORA oder MONICA) Nickelsensibilisierungsraten von 13,1% bzw. 9,9% nachweisen. Im Laufe der Jahre konnte bei Patienten, die an Ekzemen litten, eine mittlere Nickelkontaktallergie-Rate zwischen 12,3% und 17,2% ermittelt werden (Informationsverbund dermatologischer Kliniken, IVDK) [47, 52-55]. Häufig werden Sensibilisierungen durch das Tragen metallischer „Gebrauchsgegenstände“ wie Modeschmuck und den damit verbundenen Kontakt auf der Haut verursacht. Das erklärt unter anderem, wieso besonders weibliche Patientinnen unter 50 mit 27,8% bis 30,3% betroffen sind [47]. Gerade wegen dieser enorm hohen Sensibilisierungsraten wurde eine europäische Nickelverordnung etabliert, die bei längerem Hautkontakt mit Gebrauchsgegenständen eine maximale Freisetzung von  $<0,5\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{Woche}$  vorschreibt [56].

## **Chrom (Cr)**

Chrom folgt als Element meistens seiner trivalenten und damit stabilsten Form. Im menschlichen Körper wird es beispielsweise für den Insulinmetabolismus benötigt. In seiner hexavalenten Form, die ein starkes Oxidans darstellt, ist Chrom ein potentes und gut bekanntes Karzinogen. Auf die Haut hat es eine irritative Wirkung und kann so auch allergen wirken. Auch trivalentes Chrom hat eine Sensibilisierungspotenz, die aber ungleich schwächer ist [57]. Da Chrom länger als Nickel oder Kobalt im menschlichen Organismus verweilt, besteht eine höhere Chance der Chromakkumulation [50, 58]. Industriell verwendet man Chrom zum Beispiel als Korrosionsschutz, zum Gerben von Leder oder zum Imprägnieren von Holz [51]. Die bereits oben genannten epidemiologischen Studien KORA oder MONICA wiesen Chromsensibilisierungsraten von 0,8% bis 1,1% in der Allgemeinbevölkerung auf. Bei Ekzempatienten wurden hingegen Sensibilisierungsraten zwischen 3,9% und 5,3% (IVDK) beschrieben [47, 52-55].

## **Kobalt (Co)**

Das Element Kobalt liegt vorwiegend 2- oder 3-wertig vor. Es ist in Cobalamin (Vitamin B12) enthalten und ist somit als essentiell anzusehen [59]. In der Nuklearmedizin und Strahlentherapie findet es Anwendung in Form von radioaktiven Isotopen [60]. Die Kobaltelimination aus dem menschlichen Körper geschieht renal [61]. Daraus lässt sich jedoch auch ableiten, dass es beim Nierenversagen zur Akkumulation kommen kann, was dann eine Zytotoxizität nach sich zieht [62]. Darüber hinaus ist Kobalt ein bekanntes Kontaktallergen. Die Kobaltkontaktsensibilisierungsrate liegt in der Allgemeinbevölkerung zwischen 1,5% und 2,4%, bei Ekzempatienten liegt sie gemäß IVDK sogar zwischen 4,6% und 7,1% [47, 52-55].

## **1.5 Metallimplantate**

### **1.5.1 Häufigkeit der Implantation von Knie- und Hüftendoprothesen**

Mehr als 125.000 Knie- und 145.000 Hüftendoprothesen werden jährlich in Deutschland implantiert. Die Anzahl der jährlich endoprothetisch ersetzten Gelenke wird weltweit auf 1,5 Mio. geschätzt [63-65]. Unter optimalen Bedingungen wie etwa OP-Erfahrung des Operateurs, OP-Technik und moderne Implantatsysteme können 10-Jahresraten der Implantatstandzeit von >90% erreicht werden [66]. Laut der Stellungnahme des schwedischen Hüftprothesenregisters aus dem Jahr 2005 besitzen nach 10 Jahren noch 92,7% aller Patienten

ihre erste Hüfttotalendoprothese [67]. Drees et al. konnten 2007 in ihren Untersuchungen belegen, dass sich nach 15 Jahren mehr als 10% der Patienten einer Revisions-OP unterziehen mussten [68].

### **1.5.2 Implantatmaterialien**

Während für die Frakturversorgung meist Implantate aus Titan oder Edelstahl verwendet werden [64], basieren die Implantatwerkstoffe für Endoprothesen meist auf Kobaltlegierungen. Laut Norm ISO 5832 enthalten diese [69]:

- 18-30 Gew.% Chrom
- 30-69 Gew.% Kobalt
- 0-10,5 Gew.% Molybdän
- <1 Gew.% Nickel
- 0-16 Gew.% Wolfram
- <0,75-8 Gew.% Eisen
- <1-3,5 Gew.% Titan
- <0,15-2,5 Gew.% Mangan

Kobaltbasislegierungen sind durch ihre hervorragende Verschleißbeständigkeit für die Endoprothetik prädestiniert. Hingegen haben sie bei temporären Osteosynthesen gegenüber Titan- oder rostfreiem Stahl-basierten Legierungen keinen Vorteil. Mit 10-35 Gew.% haben manche Osteosynthesematerialien einen immensen Nickelanteil. Ein Nickelgehalt von bis zu 3,0 Gew.% muss nicht erwähnt werden [69]. Im Gegensatz zu Gebrauchsgegenständen unterliegen nickelhaltige Implantate nicht der Nickeldirektive [64].

Meistens bestehen Titanlegierungen aus Titan-Aluminium-Niob, Titan-Aluminium-Vanadium oder reinem Titan [70]. Gemeinsam ist ihnen ein Titananteil von Minimum 87 Gew.%. Entweder kommen sie als  $\alpha$ - oder  $\beta$ -Legierung vor. Mögliche Begleitmaterialien sind 6 Gew.% Aluminium und 7 Gew.% Niob oder 4 Gew.% Vanadium. Zusätzlich gibt es weitere Legierungen mit Molybdän (12-15 Gew.%), Zirkon (6 Gew.%) oder Eisen (2 Gew.%) [64]. Selbst in Titanwerkstoffen diverser Hersteller waren geringe Nickelanteile von 0,012-0,034 Gew.% nachzuweisen. Gemäß Schuh et al. ist Jodititan mit einem Nickelanteil von 0,002 Gew.% praktisch nickelfrei [70]. Allen Titanlegierungen ist jedoch der vermehrte Abrieb gegenüber Kobaltbasislegierungen gemeinsam. Um den Abrieb und möglicher Korrosion zuvorzukommen beziehungsweise beide Vorgänge so niedrig wie möglich zu halten, finden



Oberflächenbeschichtungen bei der Herstellung von Endoprothesenmaterialien zunehmend Einzug [50, 71]. Sollte es jedoch zum Abplatzen der Oberflächenbeschichtung kommen, so resultiert dies durch die Härte der freien Partikel in einem gesteigerten Abrieb des Endoprothesenmaterials [64].

Bekannt ist auch, dass metallische Abriebpartikel zu aseptischen Prothesenlockerungen führen können. Darüber hinaus werden Nickel-, Kobalt- und Chrom-haltige Abriebpartikel in vitro zytotoxische Eigenschaften zugesprochen [50, 72]. Durch die Beobachtung sogenannter „Pseudotumore“ bei Metall-Metall-Gleitpaarungen in der Hüftendoprothetik wurde die Diskussion über toxische Effekte neu entfacht [73-75].

### **1.5.3 Problematik post implantationem**

Eine der am meisten gefürchteten Komplikationen nach Implantation einer Endoprothese ist das Implantatversagen. Es gibt eine Vielzahl an Ursachen, die zum Implantatversagen führen können. Hierzu zählen beispielsweise Infekte, Luxationen oder periimplantäre Frakturen. Bereits 2002 wurde in einer Übersichtsarbeit von Sharkey et al. auf die Abrieb induzierte Implantatlockerung als häufigster Grund für Revisionsoperationen hingewiesen [76]. Weitere Arbeitsgruppen schlossen sich dieser Annahme an [64, 66-68, 77, 78]. Daten aus dem schwedischen Hüftendoprothesenregister belegen ebenso, dass der aseptische Implantatverlust mit 74,9% aller Lockerungen das häufigste Problem darstellt. Weitere Ursachen, weswegen es zu Revisionseingriffen kommt, sind die septische Lockerung mit 7,2% sowie die Luxation mit 7,3%. Ferner stellen periimplantäre Frakturen (5,7%), technisches Implantatversagen (2,6%), Implantatbruch (1,5%), Schmerzen (0,3%) oder sonstige Ursachen Indikationen für Wechseleingriffe dar [67]. Anderweitige Studien bezifferten den Anteil der aseptischen Lockerungen als Ursache eines Revisionseingriffes mit ca. 33-50% [77] bzw. 44% [66].

Die meisten Autoren sehen die aseptische Lockerung als Folge der Reaktion auf verschleißbedingte Abriebpartikel [68, 79, 80]. Vorwiegend werden Makrophagen-induzierte Fremdkörperreaktionen mit den für den Implantatverlust ursächlichen Osteolysen in Verbindung gebracht. So werden in der periimplantären Membran (Interface) entsprechend häufig große Mengen an Polyethylen- oder Metallabriebpartikel gefunden. Metallpartikel oder -ionen können sich zusätzlich im menschlichen Organismus verteilen [50, 62, 81]. Verschiedenste Autoren beschrieben bei manchen Patienten die periimplantären

lymphozytären Infiltrate als Hinweis auf eine spezifische Antwort des Immunsystems [82, 83]. Viele Autoren beschrieben eine „Metallsensibilisierung“ bei komplikationsbehafteter Endoprothetik [64, 83-88], andere wiederum schrieben diesem Befund keine wesentliche Signifikanz zu [64, 89, 90].

## 1.6 Histologie bei Implantatversagen

Veränderungen der periimplantären Membran sowie der Neosynovialis hängen vom Auslösemechanismus ab. Als periimplantäre Membran (Synonyme: periprothetische Membran, Interface) bezeichnet man eine saumartige Gewebsschicht zwischen Knochen und Prothesenimplantat beziehungsweise Knochen und Zement. Untersuchungen der periimplantären Membran können demnach lediglich beim Prothesenwechsel durchgeführt werden, weil nur dabei Proben entnommen werden können. Im Gegensatz dazu liegt die Neosynovialis der Endoprothese auf und kleidet die Gelenkkapsel innen aus. Speziell in der Hüftendoprothetik ist man mittlerweile davon abgekommen, die Kapsel in ihrer Kontinuität nach Abschluss der Endoprothesenimplantation wieder zu rekonstruieren. Die Neosynovialis ist bei einer Arthroskopie meist leicht zugänglich.

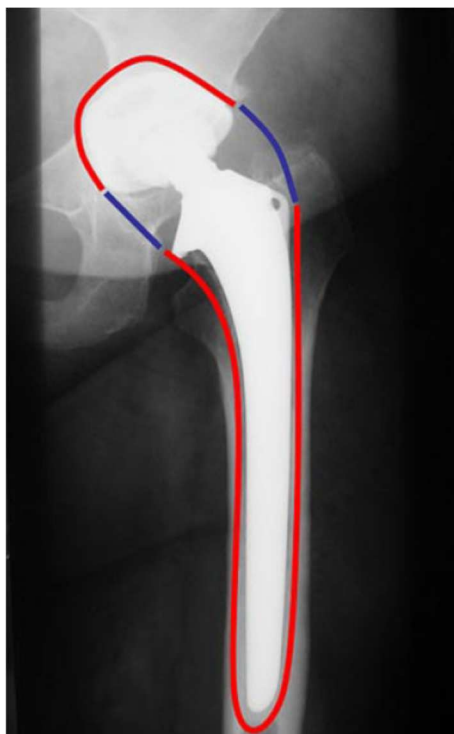


Abbildung 1-4 A.p.-Röntgenbild nach H-TEP-Implantation: schematische Darstellung der periimplantären Membran (rot) und der Neosynovialis (blau) aus [91]

Die Arbeitsgruppe um Morawietz et al. stellte anhand der Histomorphologie der periprothetischen Membran beziehungsweise Neosynovialis eine Klassifikation auf, welche vier Typen umfasst [92]. Diese Klassifikation lässt Rückschlüsse zu, wie es zum Implantatversagen gekommen ist.

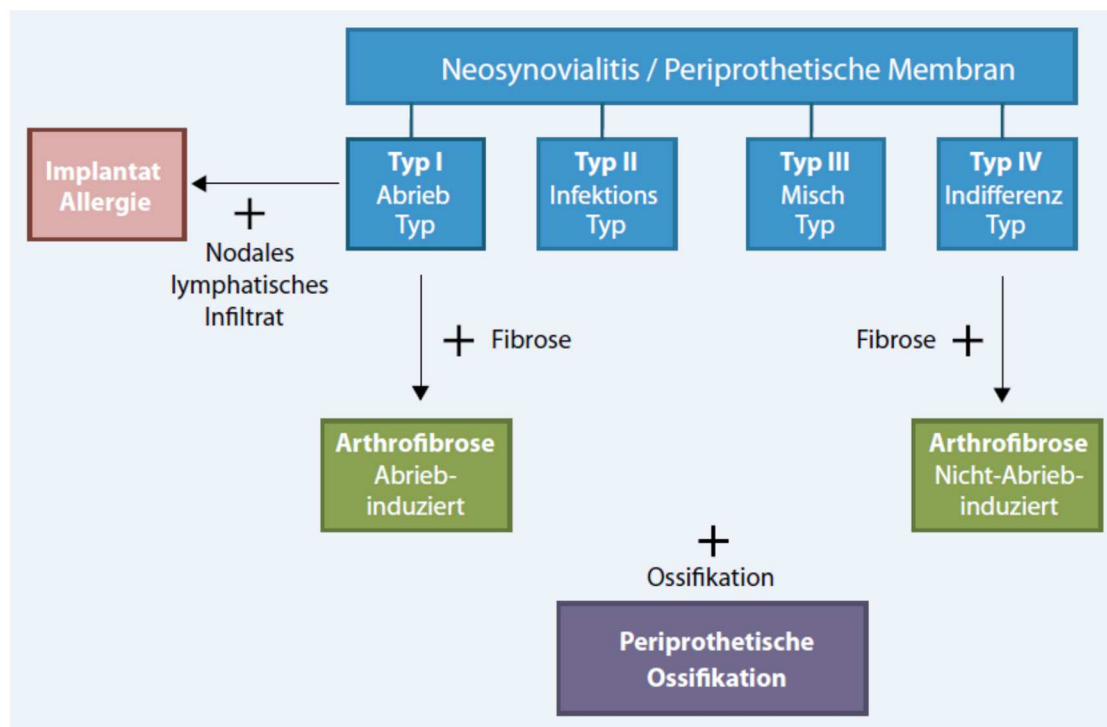


Abbildung 1-5 Typeneinteilung der periimplantären Membran/Neosynovialis [91]

Trotz der zunehmenden Standzeiten in der Endoprothetik bleiben diese begrenzt. Morawietz et al. gelang es anhand der Histomorphologie diverser periimplantärer Membranen, welche bei Revisionseingriffen gewonnen wurden, eine Klassifikation für vier Reaktionsmuster zu erstellen, die Rückschlüsse auf die Ursache der Implantatlockerung zulassen. In der weiteren Folge wird eine Übersicht über die verschiedenen Typen gegeben:

### Periimplantäre Membran vom abriebinduzierten Typ (Typ I)

*„Histologisch imponiert ein mehrheitlich aus Makrophagen und multinukleären Riesenzellen bestehendes Infiltrat. Kleinere Partikel von etwa 2  $\mu\text{m}$  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 [91, 132].

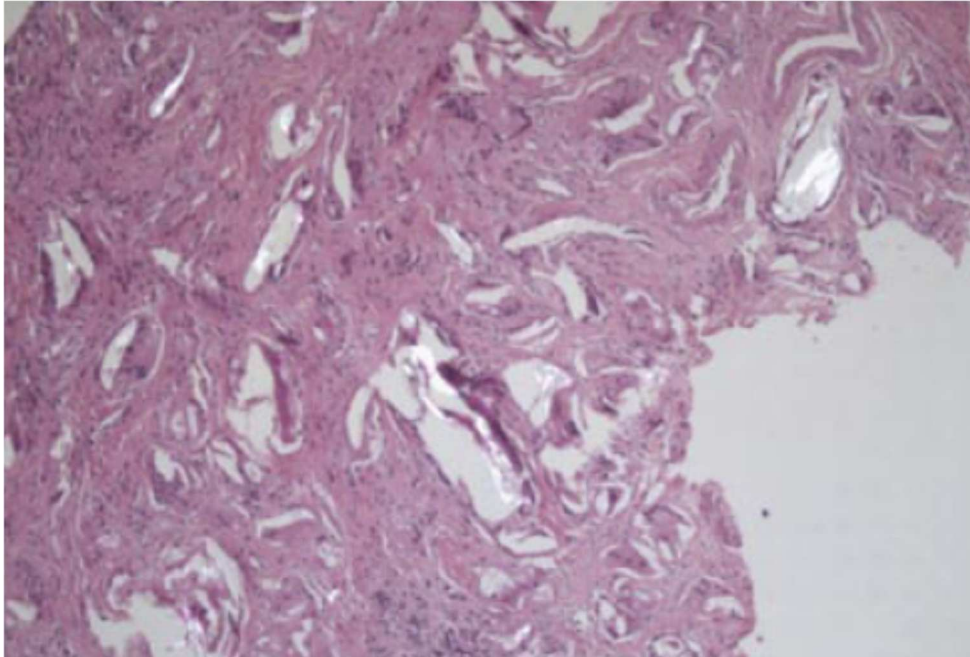
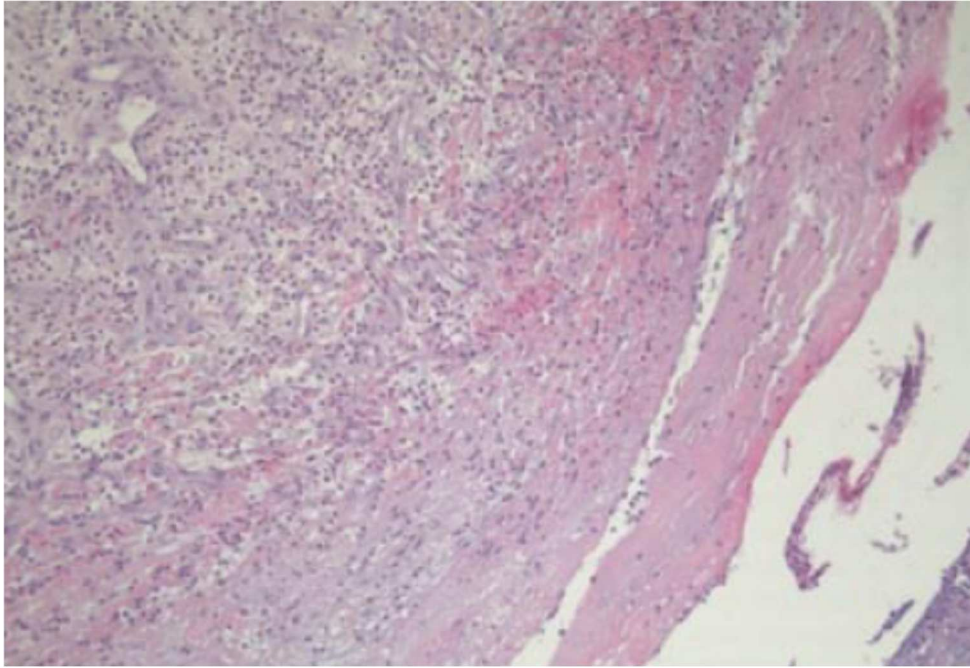


Abbildung 1-6 Typ I-Membran mit Fremdkörperriesenzellen (HE, Vergrößerung 80:1) aus [91]

### **Periimplantäre 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 [91, 132].



**Abbildung 1-7 Typ II-Membran: Granulationsgewebe und Kapillarproliferate (HE, Vergrößerung 80:1) aus [91]**

### **Periimplantäre 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 [91, 132]

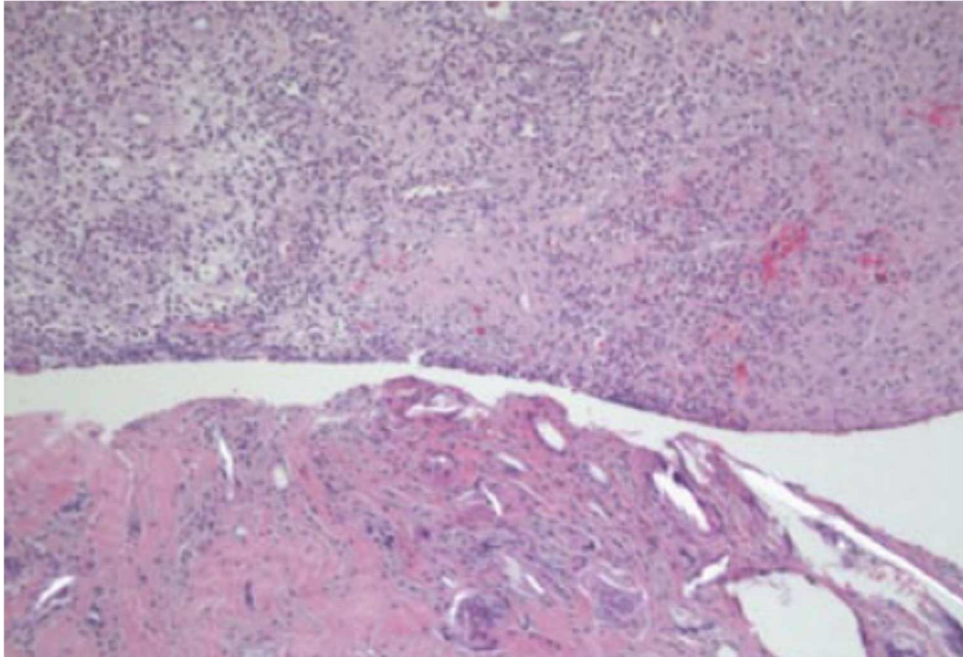


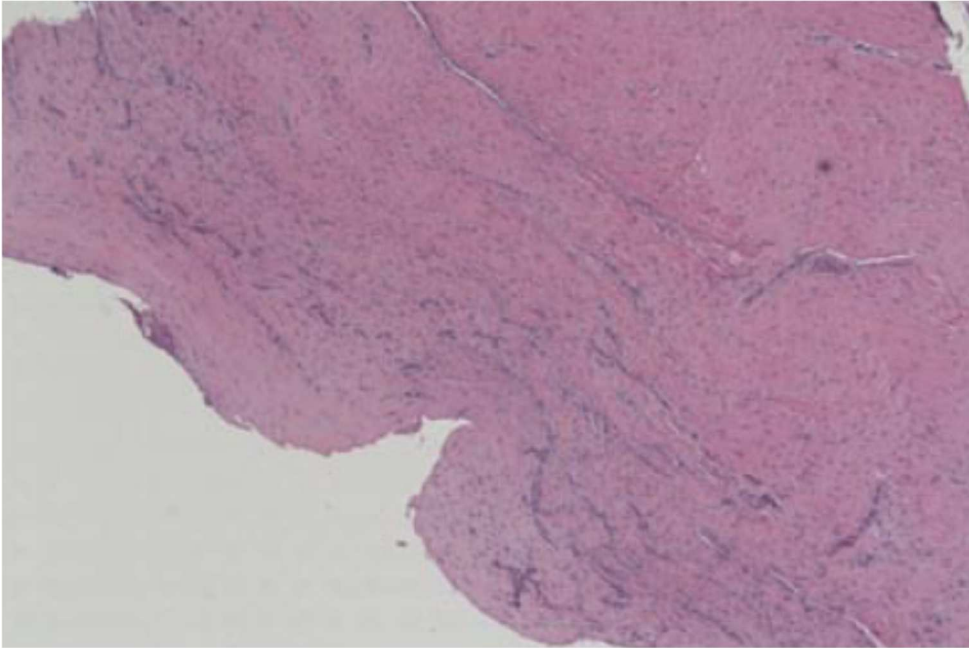
Abbildung 1-8 Typ III-Membran: Mischtyp aus Abrieb- und Infektionstyp (HE, Vergrößerung 80:1) aus [91]

#### **Periimplantäre 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 [91, 132].

Zwischenzeitlich hat diese Typeneinteilung Erweiterungen erfahren. So beispielsweise eine „Untervariante“ von Typ IV, bei der eine Überempfindlichkeit als Auslöser wegen eines zusätzlichen T-Zell-Infiltrats als „Allergie-Hinweis“ vermutet wird.





**Abbildung 1-9 Typ IV-Membran: Lediglich faserreiches Bindegewebe (HE, Vergrößerung 80:1) aus [91]**

## **2. Zielsetzung**

Ziel dieser Arbeit soll die Bearbeitung einiger offener Fragen in puncto möglicher Implantatunverträglichkeit sein, da angenommen wird, dass dies eine folgenschwere Ursache der Endoprothesenlockerung ist. Nachfolgend soll auf folgende Fragen näher eingegangen werden:

- Findet man gewisse Charakteristika bei beschwerdebehafteten Patienten mit Endoprothesen und bestätigter Metallsensibilisierung (Epikutantest (ECT) und/oder Lymphzytentransformationstest (LTT)) auch im periimplantären Gewebe?
- Können diese Charakteristika bei septischen wie aseptischen Revisionsoperationen über die Histomorphologie und/oder das Zytokinmuster beschrieben werden?
- Gibt es einen Unterschied der Zytokinmuster in den periimplantären Gewebeproben zwischen Patienten mit kutaner Metallallergie und Implantatversagen sowie Patienten mit Implantatversagen ohne kutaner Metallallergie, jedoch mit septischer Prothesenlockerung?
- Gibt es einen Zusammenhang zwischen Beschwerden, Allergiediagnostik, Histomorphologie und Zytokinexpression?



### **3. Material und Methoden**

#### **3.1 Patientenkollektiv**

##### **3.1.1 Patientenrekrutierung**

In den Jahren 2009 bis 2011 wurden an zwei verschiedenen Standorten Patienten rekrutiert, bei denen eine Implantatlockerung eingetreten war. Die Patienten waren entweder in der Endoprothesensprechstunde in der Orthopädie im Klinikum der Ludwig-Maximilians-Universität München am Campus Großhadern (Klinikdirektor: Herr Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson) oder im Zentrum für Endoprothetik und Gelenkchirurgie an der Chirurgischen Klinik Dr. Rinecker (jetzt Chirurgische Klinik München Süd; damaliger Leiter: Herr Dr. med. Peter Gruner) vorstellig geworden.

Die Studie wurde durch die Ethikkommission der medizinischen Fakultät der LMU genehmigt. Alle Patienten waren zum Zeitpunkt der Rekrutierung für das Forschungsvorhaben 18 Jahre alt oder älter. Keiner der Patienten war rechtlich betreut. Vor dem Einschluss in die Studie wurde von allen Patienten nach vorheriger ausführlicher Aufklärung eine schriftliche Einverständniserklärung eingeholt. Zugleich hatten alle Probanden die Möglichkeit diese jederzeit zu widerrufen.

Neben der üblichen orthopädischen wurde zudem fragebogengestützt eine allergologische Anamnese erhoben. Des Weiteren wurde bei jedem Patienten ein ECT und LTT durchgeführt. Bei den entsprechenden Knie-TEP-Revisionsoperationen wurden Proben aus der periimplantären Membran zur weiteren histomorphologischen und molekularbiologischen Aufarbeitung gewonnen.

##### **3.1.2 Patientencharakteristika**

Allen Patienten gemeinsam war eine beschwerdebehaftete Knie-TEP (Kobalt-Chrom-Molybdän basiert), welche gelockert war und gewechselt werden musste. Insgesamt wurden drei Kollektive unterschieden:

- a. Elf Personen mit aseptischer Lockerung und positiver Reaktion im Lymphozytentransformationstest (LTT) und/oder im Epicutantest (ECT) gegenüber den Metallen Chrom, Kobalt und/oder Nickel (Patientenkollektiv I)
- b. Sieben Personen mit septischer Lockerung (Patientenkollektiv II)

- c. Fünf Personen ohne Reaktion im ECT und LTT mit aseptischer Lockerung (Kontrollkollektiv)

	Geschlecht	Alter in Jahren	Implantatlagedauer in Monaten
<b>Patientenkollektiv I (Revisionsoperation bei ECT+ und/oder LTT+)</b>	2m 9w	ø64,0 (46-80)	ø33,1 (1-120)
<b>Patientenkollektiv II (Revisionsoperation bei septischer Lockerung)</b>	3m 4w	ø71,4 (63-78)	ø30,1 (4-84)
<b>Kontrollkollektiv (aseptische Lockerung bei ECT- und LTT-)</b>	1m 4w	ø66,6 (55-75)	ø21 (3-53)

Tabelle 3-1 Zusammenfassung der Studienkollektive

### 3.2 Präoperativer Fragebogen zur Metallverträglichkeit

Neben den üblichen Vorerkrankungen erfasst dieser Fragebogen entsprechende Fragen zur Metallverträglichkeit und etwaigen Allergien. Patienten mit Erkrankungen des rheumatoiden Formenkreises wurden wegen der notwendigen immunsuppressiven Therapie nicht in das Forschungsvorhaben mit eingeschlossen. In der Rubrik „Metallimplantate“ werden Fragen zur aktuell implantierten Knieprothese, zu aktuellen und früheren Beschwerden in Bezug auf Metallimplantate sowie zu Zahnimplantaten mit eventuellen Beschwerden gestellt. Anhand der Fragen im Teil „allergische Erkrankungen“ wird nach der Atopie-Neigung (Rhinitis allergica, atopisches Ekzem, Asthma bronchiale) der einzelnen Personen gefragt. Ebenfalls wird erfragt, ob Patienten an Ekzemen nach Metallkontakt leiden. Abschließend werden Fragen zur Atopie in der Familienanamnese gestellt.

Im Anhang ist der entsprechende Fragebogen einzusehen (siehe Kapitel 7.2).

### 3.3 Allergiediagnostik

#### 3.3.1 Epicutantest (ECT)

Der Epicutantest ist als Goldstandard in der Diagnostik von kutanen Kontaktallergien zu bezeichnen. Er wird unter standardisierten Bedingungen als Provokationstest auf der Haut durchgeführt und dient zur Beurteilung einer Ekzemreaktion bei Spättypallergien (Typ IV). Vor dem Testbeginn ist sicher zu stellen, dass die Haut frei von entzündlichen Veränderungen ist. Medikamente (Immunsuppressiva oder Immunmodulatoren) können ebenso wie ekzematöse Hautveränderungen oder vermehrte UV-Bestrahlung das Testergebnis verfälschen. Dabei werden die Testsubstanzen in kleinen Mengen in Finn Chambers gegeben und im Anschluss auf der Haut am Rücken oder am dorsalen Oberarm mit Pflastern fixiert. Nach 48 Stunden werden sämtliche Pflaster und Finn Chambers entfernt. Direkt nach der Entfernung wird eine 48 Stunden Ablesung vorgenommen. Die Ablesung wird nach 72 und 144 Stunden wiederholt. Für die in die Untersuchung eingeschlossenen Patienten wurden sämtliche ECTs in der Allergologischen Ambulanz in der Klinik für Dermatologie und Allergologie der LMU oder durch den Konsildienst für Dermatologie und Allergologie im Universitätsklinikum Großhadern abgelesen. Der Ablesung wurden die Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Allergie- und klinische Immunologie (DGAKI) zur Durchführung des Epicutantests zugrunde gelegt. Abgelesen wurden die ECTs nur von erfahrenen Ärzten. Bewertet wurde entsprechend nachstehender Tabelle [93, 132]:

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 (Seiteneffekt, Vesikel, Blase, Nekrose)	Irritativ
Nt		in einem Testblock enthaltenes, aber nicht getestetes Allergen

Tabelle 3-2 Epikutantestbewertungskriterien

Als Allergie wurden mindestens einfach positive allergische Reaktionen gewertet. Getestet wurde mit unten stehenden Substanzen:

- a. T.R.U.E.-Test Panel 1 und 2 (SmartPractice, Phoenix, Arizona 85008); bei den Testungen wurde ein besonderes Augenmerk auf folgende, metallhaltige Substanzen in den T.R.U.E.-Test Panels gelegt:
  - Nickelsulfat
  - Kaliumdichromat
  - Kobaltchlorid
- b. Knochenzementreihe (HAL Allergie GmbH, Poststr. 5-6, D-40213 Düsseldorf)
  - 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA) 1%
  - Kupfer (II)-sulfat  $5 \cdot H_2O$  1%
  - Benzoylperoxid 1%
  - Gentamicinsulfat 20%
  - Hydrochinon 1%
  - N,N-Dimethyl-p-toluidin 2%
  - Methylmethacrylat 2%

Die Vorlagen für die Ableseprotokolle sind im Anhang einzusehen (siehe Kapitel 7.3).

### **3.3.2 Lymphozytentransformationstest (LTT)**

Mit dem LTT lässt sich eine Sensibilisierung der mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) gegenüber Antigenen, speziell Nickel, gut nachweisen. Die Zellen werden aus heparinisierendem Vollblut über eine Dichtegradientenzentrifugation abgetrennt. Die Zellen sammeln sich dabei in einer Interphase und können gut abgenommen werden. Nach mehreren Waschschriften werden jeweils 200.000 Zellen in jede Vertiefung einer 96well-Zellkulturplatte pipettiert und dann mit Nickel, Kobalt oder Chrom in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. Als antigenspezifische Kontrolle dient Tetanus Toxoid (TT), gegen das praktisch jeder durch frühere Impfungen antigenspezifische T-Zellen im peripheren Blut hat. Als weitere Positivkontrolle dient der Pan-T-Zell-Stimulator Phytohämagglutinin (PHA), der die Zellen maximal proliferieren lässt. Nach fünf Tagen Stimulation wird radioaktiv markiertes  $^3H$ -Thymidin zur Kultur gegeben. Aktivierte und proliferierende T-Zellen bauen diese Base in neu synthetisierte DNA ein. Nach 18 Stunden werden die Zellen eingefroren, lysiert und die Radioaktivität gemessen. Der Stimulationsindex (SI) errechnet sich als

Verhältnis der gemessenen Radioaktivität (in counts per minute: cpm) in der Kontrollkultur (nur mit Medium) geteilt durch die gemessene Radioaktivität in der stimulierten Zellkultur. Im Zuge der Auswertung wurden Stimulationsindices (SI)  $\geq 3$  als positiv (vorliegende Metallsensibilisierung) gewertet.

### **3.4 Histomorphologie**

Sämtliche Gewebeproben der periimplantären Membran wurden durch die Histopathologie in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU befundet. Hier gilt ein ganz besonderer Dank an die Herren PD Dr. med. M. Flaig und Dr. med. J. Schneider. Zunächst wurde von jeder einzelnen Gewebeprobe eine HE-Färbung im klassischen Sinne als Standardfärbung angefertigt. Dabei färbt Hämalaun die sauren Zellbestandteile (DNA und Ribosomen) blau, Eosin führt hingegen zu einer Rotfärbung der basischen Strukturen (Zytoplasmaproteine und Kollagen). Ebenfalls wurde immunhistochemisch gefärbt, um folgende Zellreihen unterscheiden zu können: Zur Darstellung von T-Zellen in sämtlichen Stufen der Ausreifung wurden Antikörper gegen CD3 verwendet, da CD3 ein Zellmembran assoziiertes Protein ist und als T-Zellrezeptor fungiert. CD15 ist ein Indikator für Granulozyten und Hodgkin-Zellen, gleichzeitig ist es ein Selektin-spezifischer Bindungspartner. Für die Darstellung von B-Lymphozyten fanden Antikörper gegen CD20 Verwendung, weil CD20 ein spezifisches Protein in der Membran dieser Zellreihe ist. Granulozyten und Makrophagen charakterisieren sich dadurch, dass sie CD68+-zytoplasmatische Granula aufweisen (KP1 = CD68-spezifischer Antikörper) [132].

Weitere Informationen die einzelnen Färbungen betreffend sind im Anhang einzusehen (siehe Kapitel 7.4).

Allen histomorphologischen Befunden gemeinsam ist eine einheitliche Bewertung entsprechend für Patienten mit Verdacht auf Implantatunverträglichkeit, die Anlehnung an die Klassifikation nach Krenn et al. [91, 94] und Willert et al. [95] ist allen Befunden gemeinsam:

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

Tabelle 3-3 Bewertungskriterien CD3-Infiltrat

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

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

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

Tabelle 3-5 Bewertungskriterien der Arthrofibrose [94]

Klassifikation der periimplantären Membran	
Typ I	abriebinduzierter Typ
Typ II	infektiöser Typ
Typ III	Mischtyp
Typ IV	Indifferenztyp

Tabelle 3-6 Einteilung der periimplantären Membran [91]

## **3.5 Zytokinanalyse**

### **3.5.1 Übersicht**

Durch diese Untersuchung sollte eine umfangreiche Analyse des Genexpressionsprofils in den einzelnen Gewebeproben erfolgen. Spezieller Fokus wurde auf folgende Zytokine gelegt:

- RPL13a
- TNF $\alpha$
- IFN $\gamma$
- IL-1 $\beta$
- IL-2
- IL-6
- IL-8
- IL-10
- IL-17
- TGF $\beta$
- Osteoprotegerin (OPG)
- RANKL
- CCL2
- CCL3
- Osteopontin (OPN)
- Prostaglandinsynthase-2 (PTGS2)

Es wurde der qualitative Nachweis sowie die Quantifizierung der m-RNA-Kopien der oben aufgeführten Gene erbracht. Hierdurch erhält man durch die Information über die transkriptionelle Regulation der Zellen in der periimplantären Membran einen Rückschluss auf die Immunantwort.

Nachfolgende Kapitel sind inhaltlich an die Produktinformationen der Firma Roche gebunden.

### **3.5.2 Isolierung der RNA**

#### **3.5.2.1 Proben-RNA-Stabilisierung**

Direkt im Anschluss an die Gewebeentnahme während der entsprechenden Revisionsoperationen wurde zur Abwendung eines Abbaus der RNA die Probe in ein RNA-Stabilisationsmedium (RNA-Later, Fa. Qiagen) gegeben. Im Anschluss folgte die

schnellstmögliche Lagerung bei  $-80^{\circ}\text{C}$ . Anhand des eben genannten Mediums wurde die Stabilität der RNA gewährleistet [96].

### **3.5.2.2 Gesamt-RNA-Isolierung aus stabilisierten Proben**

Als erster Schritt ist das Auftauen der gefrorenen Proben bei Raumtemperatur zu nennen. Im Anschluss wurden die Gewebstücke mittels eines lanzettenförmigen Skalpells in kleinstmögliche Stücke zertrennt [132]. Sodann wurden die Gewebeproben in je 1ml  $\text{H}_2\text{O}$ -gesättigtem Phenol mit Keramikugeln zerkleinert. Die Lyse der Proben geschah durch zwei Zerkleinerungsvorgänge (Frequenz 6000/s) von je 20 Sekunden Dauer. Nach fünfminütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde jede Probe mit 200 $\mu\text{l}$  Chloroform vorsichtig überschichtet und ausreichend gemischt. Anschließend wurden die Proben abermals bei Raumtemperatur für zehn Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt wurde eine Zentrifugation (12000rpm) der Proben für 5 Minuten vorgenommen. Ziel dieses Arbeitsschrittes ist die Extraktion der Nukleinsäuren in eine wässrige Phase, die sich ganz oben befindet. Gleichzeitig werden Lipide, Proteine sowie additives Phenol in der unterschichtigen Chloroform-/Phenol-Phase gesammelt [132]. Nach Vorbereitung weiterer Caps mit 500 $\mu\text{l}$  Isopropanol wurden die wässrigen Phasen jeweils in ein neu vorbereitetes Cap gegeben, geschwenkt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach abermaliger Zentrifugation bei 12000rpm für zehn Minuten wurde der anfallende Überstand abgesaugt und jeder Probe 1ml 75%iger Ethanol beigemischt. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt (12000rpm für zehn Minuten) setzte sich eine RNA-Pellet am Boden des Caps ab. Der letzte Arbeitsschritt wurde nach Abziehen des Überstandes wiederholt. Anschließend wurde das überbleibende Pellet für fünf Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Letztlich folgt das Lösen in 30 $\mu\text{l}$  RNase freiem Wasser [132].

### **3.5.3 RNA-Konzentrationsbestimmung**

Um die Konzentration der extrahierten RNA photometrisch bestimmen zu können, wurden jeweils 5 $\mu\text{l}$  RNA-Lösung mit 95 $\mu\text{l}$  bi-destilliertem Wasser verdünnt. Sodann wurde jede Probe in einer sterilen UVette<sup>®</sup> (Fa. Eppendorf) gegen RNase freies Wasser gemessen, wobei letzteres als Leerwert diente. Das Bouguer-Lambert-Beer-Gesetz stellt die Basis der Methode dar. Das Gesetz beschreibt, dass sich Konzentration und Extinktion proportional verhalten. Die optische Dichte (OD) der jeweiligen Probe wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 260\text{nm}$  und  $\lambda = 280\text{nm}$  gemessen. Dabei errechnete sich die Probenkonzentration folgendermaßen:



$$C_{[RNA]}(\mu\text{g}/\mu\text{l}) = OD_{(260\text{nm})} \times 40\mu\text{g}/\text{ml} \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Die optische Dichte von 1 entspricht dabei einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Zur Bestimmung der Reinheit des RNA-Samples wurde darüber hinaus das Verhältnis  $OD(\lambda = 260\text{nm}) / OD(\lambda = 280\text{nm})$  ermittelt. Dieses Verhältnis stellt nämlich ein Maß für die Verunreinigung durch genomische DNA und Proteine dar. Ein Quotient  $< 1,8$  wurde nicht akzeptiert [132].

### **3.5.4 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)**

Zur Testung der geringen RNA-Menge auf das Vorhandensein von Genkopien der interessanten Zytokine im gewonnenen periimplantären Gewebe mussten die zu der RNA komplementären DNA-Stränge zunächst eine reverse Transkription durchlaufen. Mittels PCR erfolgte im nächsten Schritt die Amplifikation. Hierzu fand der 1st cDNA Synthesis KIT for RT-PCR (AMV) (Fa. Roche) Anwendung. Für die cDNA-Transkription fanden pro Sample 2 $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA Verwendung.

Um jegliche verunreinigende DNA eliminieren zu können, wurde ein DNA-Verdau durchgeführt. Zur Inhibition etwaiger RNasen folgte der Zusatz von RNA-Inhibitor (Fa. Roche). Pro 2 $\mu\text{g}$  Gesamt-RNA wurden 1 $\mu\text{l}$  RNase-Inhibitor plus 2 $\mu\text{l}$  DNase zugefügt. Im Anschluss wurden die Proben für 30 Minuten bei einer Temperatur von 37°C inkubiert. Der nächste Inkubationsschritt (Dauer 10min) folgte, nachdem 3 $\mu\text{l}$  EDTA (25mM) hinzu pipettiert wurden, bei einer Temperatur von 65°C im Thermocycler (Fa. Biometra, TGradient). Zur konzentrierenden Aufreinigung der RNA führte man abschließend eine Ethanol-fällung durch. Daran anschließend folgte die Aufnahme der RNA in 12 $\mu\text{l}$  RNase freies Wasser, ehe dann mit 1 $\mu\text{l}$  oligo-p-(dT)18 Primer (Endkonzentration 2,5 $\mu\text{M}$ ) gemischt wurde. In einem nächsten Schritt wurden folgende Komponenten mit der Pipette vorsichtig gemischt und kurz abzentrifugiert:

- 4 $\mu\text{l}$  Transkriptor RT Reaction Buffer (Endkonzentration 1x)
- 0,5 $\mu\text{l}$  Protector RNase Inhibitor (20U)
- 2 $\mu\text{l}$  Deoxynucleotide Mix (1mM)
- 0,5 $\mu\text{l}$  Transkriptor Reverse Transcriptase (10U).

Die cDNA-Synthese erfolgte daran folgend für 30 Minuten im Thermocycler (Fa. Biometra, TGradient) bei 55°C und für 5 Minuten bei 85°C [132].

### **3.5.5 Quantitative PCR (qPCR)**

#### **3.5.5.1 Überblick**

Zur Erstellung eines Genexpressionsprofils der Biopsat-RNA quantifizierte man die Kopienzahl der gesuchten mRNA-Sequenzen relativ. Zu dieser quantitativen Analyse der Zytokinexpression nutzten wir die semi-quantitative PCR im LightCycler® (Fa. Roche, Mannheim, Deutschland). Im Gegensatz zur Standard-PCR bietet die qPCR die Möglichkeit zu quantifizieren. Durch Fluoreszenz-Messungen ist die Quantifizierung der doppelsträngigen DNA möglich. Für die Fluoreszenz-Messung wurde der Farbstoff SYBR® Green I (Fa. Roche) verwendet. Während der Amplifikation bindet dieser Cyanin-Farbstoff lediglich an die Doppelstrang-DNA, im gebundenen Zustand und durch die Licht induzierte Anregung fluoresziert SYBR® Green I. Nach jedem einzelnen PCR-Zyklus gelingt durch die Fluoreszenzbestimmung eine Messung, durch welche die PCR-Produktmenge an doppelsträngiger DNA angegeben werden kann. Werden die Fluoreszenzmessungen aus den einzelnen Zyklen aneinandergereiht, ergibt sich daraus eine sigmoide Kurve. Anfangs zeigt sich nach den ersten Amplifikationsschritten noch ein geringer Gehalt an PCR-Produkten, in der Folge ist auch das Ausmaß der Fluoreszenz ebenso gering. Eine Steigung lässt sich in dieser Kurve noch nicht detektieren. Ab dem Zeitpunkt der Detektion, was bei bestmöglicher Effizienz der PCR erreicht wird, lässt jeder weitere Zyklus eine Verdopplung der PCR-Produkte zu. Das hat zur Folge, dass die Fluoreszenz exponentiell ansteigt und somit gelingt die Bestimmung des Crossing-Point (Ct-Wert). Die ermittelten Ct-Werte bilden die Grundlage der Berechnungen der jeweiligen relativen Genexpression in der entsprechenden Probe [132].

#### **3.5.5.2 Protokoll**

Für die quantitative PCR fand das „FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green I“-Kit (Fa. Roche) Verwendung. Dieses Kit arbeitet mit der für den LightCycler kompatiblen FastStart Taq DNA-Polymerase und dem SYBR Green I als Fluoreszenzfarbstoff. Die Polymerase ist bei Raumtemperatur inaktiv. Deswegen ist ein erster Inkubationsschritt über zehn Minuten bei 95°C notwendig, um die Polymerase zu aktivieren („hot start“-Technik). Diese Technik unterbindet weitestgehend das Amplifizieren von etwaigen Primerbindungen, die sich bei niedrigeren Temperaturen unspezifisch bilden können. Der Inkubationssatz enthält folgende Komponenten:

- 5µl Wasser

- 0,5µl spezifischen Primer-Mix (10pmol pro Primer)
- 2µl Master-Mix (fünffach konzentriert)

Nach dem Pipettierschritt werden 2,5µl des cDNA-Templates (1:10 Verdünnung) hinzugefügt. Daran anschließend werden die Kapillaren durch einen Verschluss abgedichtet.

Anschließend an einen ersten Zentrifugationsschritt bei 2500rpm für 15 Sekunden müssen die Kapillaren in das LightCycler-Karussell eingesetzt werden, um die PCR starten zu können. Auf die Denaturierung (95°C für zehn Minuten) folgen 45-55 Zyklen mit je 10 Sekunden primerspezifischem Annealing, 10 Sekunden Elongation bei 72°C sowie der erneuten Denaturierung für 5 Sekunden bei 95°C. In einem nächsten Schritt können die Schmelzkurven analysiert werden. Eine Auflistung der verwendeten Primer findet sich im Anhang (siehe Kapitel 7.5) [132].

### **3.5.6 Relative Quantifizierung**

#### **3.5.6.1 Auswertung der Schmelzkurvenanalyse**

Um eine relative Quantifizierung der PCR-Produkte durchführen zu können, wird eine Überprüfung der PCR-Produktspezifität benötigt. Als Basis dient hierzu eine Analyse der Schmelzkurven. Dabei werden die PCR-Produkte einem Temperaturgradienten ausgesetzt. Zeitgleich erfolgt die Erhebung des Fluoreszenz-Signals. Von der Länge der Nukleinsäuren und ihrer Sequenz abhängig zerfällt das doppelsträngige PCR-Produkt bei einer spezifischen Temperatur, welche als Schmelztemperatur bezeichnet wird. Durch das Vorliegen der beiden Einzelstränge verändert sich nach dem Zerfall die Assoziation des Fluoreszenzfarbstoffs zur DNA. In der weiteren Folge nimmt das Fluoreszenzsignal ab. Durch Überprüfung des Schmelzpunktes, ob eine Übereinstimmung des Schmelzpunktes des Produkts mit dem im Etablierungsversuch bestimmten vorliegt, können Proben mit unspezifischen Produkten wie beispielsweise zusammengelagerte Primer detektiert werden [132].

#### **3.5.6.2 Housekeeping gene (Referenzgen)**

Als „Housekeeper“ wurde der Elongation factor 1 (EF1- $\alpha$ ) verwendet. EF1- $\alpha$  wird in sämtlichen menschlichen Zellen gleichmäßig in der Elongationsphase des Zellzyklus exprimiert. Diesbezüglich eignet sich gerade dieses Gen hervorragend als Referenzgen [132].

### 3.5.6.3 Bestimmung der relativen Expression

Um das in Bezug auf die interessanten Gene bestimmen zu können, wurde die  $\Delta C_t$ - Methode (Livak and Schmittgen, 2001) angewendet. In dieser Arbeit wurden von jedem Probanden eine implantatnahe und -ferne Probe entnommen und dieser Untersuchung zugeführt. Die untersuchten Gene wurden zum Einen als Targetgene („gene of interest“) und zum Anderen als Referenzgene („housekeeping gene“) verwendet. Der „Housekeeper“ dient zur Normalisierung der Expressionsrate der Targetgene. Um eine Quantifizierung vornehmen zu können, müssen die Expressionsraten des Zielgens in einer implantatnahen und -fernen Gewebeprobe desselben Probanden verglichen werden. Dazu werden die Ct-Werte (siehe Kapitel 3.5.5) verwendet. Hierbei war eine Normalisierung der Expressionsraten der beiden korrespondierenden implantatnahen und -fernen Gewebeproben im Vergleich zu den Expressionsraten des Referenzgens („housekeeping gene“) in denselben Proben desselben Probanden notwendig. Die Ermittlung der jeweiligen Primer-Effizienz gelang durch die Zuhilfenahme der jeweiligen Standardgeraden.

Zur Berechnung der relativen, normalisierten Expression eines Zielgens der implantatnahen Gewebeprobe vergleichend zur entsprechenden implantatfernen wurde in dieser Arbeit untenstehende Formel angewandt:

Gleichung I:

$$\text{Relative Expressionsrate} = E_T^{C_p^{\text{TargC}} - C_p^{\text{TargS}}} \times E_{\text{Ref}}^{C_p^{\text{RefS}} - C_p^{\text{RefC}}}$$

$E_T$  := Effizienz des jeweiligen Primer

$\text{TargC}$  := Ct-Werte des Targetgenes der implantatfernen Probe

$\text{TargS}$  := Ct-Werte des Targetgenes der implantatnahen Probe

$\text{RefC}$  := Ct-Werte des Referenzgenes der implantatfernen Probe

$\text{RefS}$  := Ct-Werte des Referenzgenes der implantatnahen Probe

Ergibt sich demnach für die relative Expressionsrate ein Wert von 2, so bedeutet dies, dass in der implantatnahen Gewebeprobe zweimal so viele Kopien an mRNA des Targetgens vorliegen wie in der implantatfernen Probe desselben Probanden unter Einbeziehung der Normalisierung durch das „housekeeping gene“. Ergab sich hingegen eine relative

Expressionsrate von 0,5, so heißt das, dass in der implantatnahen Gewebeprobe lediglich halb so viele Kopien an mRNA des Targetgens im Gegensatz zur Anzahl der Kopien in der implantatfernen Sample vorlagen [132].

### **3.6 Statistische Auswertung**

#### **3.6.1 Auswertung der Merkmalsausprägungen (Fragebogen)**

Diesbezüglich wurden Einzelwerte aufgelistet beziehungsweise Säulengraphiken angefertigt, die eine Darstellung der relativen Häufigkeiten der untersuchten Merkmalsausprägungen zulassen.

#### **3.6.2 Auswertung der Ergebnisse des Lymphozytentransformationstest (LTT)**

Bei der Zusammenfassung der Daten (Proliferationsausmaß der stimulierten T-Lymphozyten) werden Mittelwerte angegeben und diese in entsprechenden Säulengraphiken dargestellt.

#### **3.6.3 Auswertung der Zytokinexpressionsraten**

Die Zytokinexpressionsraten liegen in zweierlei Form vor. Zum Einen liegen sie metrisch als relative Expressionsrate, zum Anderen nominal als erhöhte (Expressionsrate  $> 1$ ) oder nicht erhöhte Expression (Expressionsrate  $\leq 1$ ) vor [132]. Ausgewertet wurde mittels Mann-Whitney-U-Test, da keine Normalverteilung vorlag.

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Fragebögen

#### 4.1.1 Beschwerden

Entsprechend der fragebogenbasierten Anamnese werden im folgenden Abschnitt die Beschwerden in den einzelnen zu untersuchenden Gruppen angegeben (Tabelle 4-1). Es erfolgte die Einteilung der Beschwerden in insgesamt 6 Kategorien. Die Kategorien stellten sich wie folgt zusammen: Schmerz, Schwellung, Rötung, Ekzem, Erguss und Bewegungseinschränkung. Alle 23 Patienten füllten einen entsprechend gestalteten Anamnesebogen aus. Eine Mehrfachnennung pro Patient war möglich. Allen Kollektiven ist gemeinsam, dass Schmerzen am häufigsten angegeben wurden. Ein durchaus beträchtlicher Anteil an Patienten in allen 3 Kollektiven klagte zudem über eine Schwellneigung und Bewegungseinschränkung. Eine interessante Feststellung ist, dass im Patientenkollektiv I keine Ekzeme auftraten. Auffällig ist darüber hinaus, dass im Patientenkollektiv II unter der Annahme einer septischen Lockerung keine Rötungen auftraten.

Beschwerden	Patientenkollektiv I		Patientenkollektiv II		Kontrollkollektiv	
	n	%	n	%	n	%
Schmerz	10/11	90,9	6/7	85,7	5/5	100
Schwellung	8/11	72,2	4/7	57,1	3/5	60
Rötung	1/11	9,1	0/7	0	1/5	20
Ekzem	0/11	0	0/7	0	0/5	0
Erguss	2/11	18,2	2/7	28,6	1/5	20
Bewegungseinschränkung	5/11	45,5	3/7	42,9	4/5	80

Tabelle 4-1 Beschwerden der 23 Patienten (Mehrfachnennungen möglich)

#### 4.1.2 Weitere anamnestisch erhobene Charakteristika

	Patientenkollektiv I	Patientenkollektiv II	Kontrollkollektiv
Raucherstatus	3/11	0/7	0/5
Zahnimplantatprobleme	0/11	0/7	0/5
bekannte Atopie	3/11	0/7	0/5

Tabelle 4-2 Weitere Anamnesecharakteristika

In Patientenkollektiv I fanden sich 3 Raucher. Besonders auffallend ist in dieser Auswertung, dass alle Patienten zwar Zahnimplantate tragen, jedoch kein einziger Patient diesbezüglich Beschwerden angab. Unter Atopie fassten wir insgesamt 3 Krankheitsbilder zusammen: das allergische Asthma bronchiale, das atopische Ekzem (Neurodermitis) und die allergische Rhinokonjunktivitis. Im Patientenkollektiv I hatten 3 von 11 Patienten ein oder mehrere atopische Krankheitsbilder (Tabelle 4-2).

## 4.2 Mikrobiologische Ergebnisse

Bei allen Patienten wurde präoperativ eine Punktion des betroffenen Kniegelenkes durchgeführt. Des Weiteren wurde bei jedem einzelnen Patienten intraoperativ ein Surveillance-Abstrich genommen. Die mikrobiologische Bebrütung und letzten Endes auch Befundung wurde in der Klinik abgeschlossen, in welcher der Patient auch operiert wurde. Allen Befunden ist gemeinsam, dass eine 14-tägige Bebrütung stattgefunden hatte. Die unten stehende Tabelle gibt Aufschluss über das nachgewiesene Erregerspektrum. Eine Häufung von bestimmten Keimen konnte nicht beobachtet werden. Anzumerken ist, dass eine Patientin bei hochfieberhaftem Infekt und Knieempyem operiert werden musste, allerdings gelang bei dieser Patientin kein Keimnachweis. Trotzdem wurde die Patientin dem Patientenkollektiv II zugeordnet. Bei allen anderen Patienten dieser Forschungsarbeit konnte auch nach 2-wöchiger Bebrütung kein positives mikrobiologisches Ergebnis festgestellt werden.

Patient und Alter in Jahren	Erreger präoperativ	Erreger postoperativ
B., G. 63	-	Massilia timonae
B., K. 71	Bacillus species	-
K., C. 66	Micrococcus sp., Koagulase-negative Staphylokokken	-
S., A. 75	Propionibacterium acnes	-
M., F. 78	Staphylococcus epidermidis, Acinetobacter baumannii	-
P., A. 76	Staphylococcus aureus	-
E., F. 71	-	-

Tabelle 4-3 Erregerspektrum im Patientenkollektiv II

## 4.3 Allergiediagnostikergebnisse

### 4.3.1 Reaktionen auf Metalle im Epikutantest

Bezogen auf die titanfreien Knieimplantate der Patienten erfolgte die Testung mit 3 Metallsubstanzen:

- Nickelsulfat
- Kaliumdichromat
- Kobaltchlorid

Bei jedem der 23 Patienten, welche in die vorliegende Arbeit eingeschlossen wurden, lag ein aktueller Epikutantest vor. Fragliche oder irritative Ergebnisse wurden nicht als Nachweis einer Sensibilisierung gewertet. Im Patientenkollektiv I konnten 3 positive Reaktionen auf Nickelsulfat und 2 positive Reaktionen auf Kobaltchlorid beobachtet werden. Eine Reaktion auf Kaliumdichromat blieb gänzlich aus. Einen entsprechenden Überblick gibt die Tabelle 4-4. Im Patientenkollektiv II, welches lediglich Patienten mit einer septischen Prothesenlockerung einschließt, wurden 2 positive Reaktionen auf Nickelsulfat diagnostiziert. Bei den Testungen auf Kaliumdichromat und Kobaltchlorid blieben im Patientenkollektiv II alle Testfelder negativ (vgl. Tabelle 4-5). Im Kontrollkollektiv konnte keine einzige positive Reaktion im Epikutantest verzeichnet werden, aus diesem Grund wurde auf eine tabellarische Ansicht verzichtet.

	<b>positive Reaktion</b>	<b>negative/fragliche/irritative Reaktion</b>	<b>Verhältnis positiver Reaktion/Gesamtzahl in Prozent</b>
<b>Nickelsulfat</b>	3	8	3/11 (27%)
<b>Kaliumdichromat</b>	0	11	0/11 (0%)
<b>Kobaltchlorid</b>	2	9	2/11 (18%)
<b>Summe der Metallreaktion</b>	5	28	5/33 (15%)
<b>Anzahl der Patienten</b>	8	15	8/23 (35%)

Tabelle 4-4 Reaktionen auf Metalle im ECT Patientenkollektiv I



	positive Reaktion	negative/fragliche/irritative Reaktion	Verhältnis positiver Reaktion/Gesamtzahl in Prozent
Nickelsulfat	2	5	2/7 (29%)
Kaliumdichromat	0	7	0/7 (0%)
Kobaltchlorid	0	7	0/7 (0%)
Summe der Metallreaktion	2	19	2/21 (10%)
Anzahl der Patienten	2	5	2/7 (29%)

Tabelle 4-5 Reaktionen auf Metalle im ECT Patientenkollektiv II

#### 4.3.2 Reaktionen auf Knochenzementkomponenten im Epikutantest

Mit der Knochenzementreihe wurden folgende Substanzen epikutan getestet:

- 2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)
- Kupfer (II)-sulfat 5\*H<sub>2</sub>O
- Benzoylperoxid
- Gentamicinsulfat
- Hydrochinon
- N,N-Dimethyl-p-toluidin
- Methylmethacrylat

Von den insgesamt 23 Patienten konnten 5 Patienten ausgemacht werden, welche eine zementfreie Knie-TEP implantiert hatten. Bei diesen Patienten verzichteten wir aus Gründen der möglichen Sensibilisierung und ja nicht bestehender Exposition gegenüber „potentiellen Knochenzementallergenen“ vor geplanter Revisions-OP auf eine Testung mit der Knochenzementreihe. Bei den übrigen 18 Patienten wurde die Primärprothese zementiert. Bei diesen 18 Patienten testeten wir aktuell mit den oben aufgeführten Komponenten. Lediglich bei 2 Patienten konnte eine Sensibilisierung entdeckt werden. Beide Patienten finden sich im Patientenkollektiv II und bei beiden war nur das Testfeld für Gentamicinsulfat positiv. Da bei beiden Patienten in der mikrobiologischen Untersuchung ein Keim isoliert werden konnte, wurde eine septische Lockerung angenommen. Die Tabelle 4-6 schlüsselt die Reaktionen genau auf. Im Patientenkollektiv I sowie im Kontrollkollektiv waren keine Patienten, welche auf den Epikutantest mit der Knochenzementreihe positiv reagiert hatten.

	positive Reaktion	negative/fragliche/irritative Reaktion	Verhältnis positiver Reaktion/Gesamtzahl in Prozent
2-Hydroxymethylmethacrylat (HEMA)	0	7	0/7 (0%)
Kupfer (II)-sulfat 5*H <sub>2</sub> O	0	7	0/7 (0%)
Benzoylperoxid	0	7	0/7 (0%)
Gentamicinsulfat	2	5	2/7 (29%)
Hydrochinon	0	7	0/7 (0%)
N,N-Dimethyl-p-toluidin	0	7	0/7 (0%)
Methylmethacrylat	0	7	0/7 (0%)
Summe der Reaktion	2	47	2/49 (4%)
Anzahl der Patienten	2	5	2/7 (29%)

Tabelle 4-6 Reaktionen auf Knochenzementkomponenten im ECT Patientenkollektiv II

### 4.3.3 Reaktionen im Lymphozytentransformationstest (LTT)

Unten stehende Substanzen wurden zur Metallstimulation im LTT verwendet. Die Testsubstanzen entsprechen weitestgehend den Metalltestsubstanzen, welche im ECT Verwendung fanden:

- Kobalt: CoCl<sub>3</sub> (10<sup>-6</sup>M; 10<sup>-5</sup>M; 10<sup>-4</sup>M)
- Nickel: NiSO<sub>4</sub> (7,5x10<sup>-6</sup>M; 10<sup>-5</sup>M; 2,5x10<sup>-5</sup>M)
- Chrom: CrCl<sub>3</sub> (10<sup>-4</sup>M; 10<sup>-3</sup> M; 5x10<sup>-3</sup>M)

zu allen 23 Patienten liegen aktuelle LTT-Ergebnisse vor (Tabelle 4-7, Abb. 4-1). Erstaunlich ist, dass sich lediglich auf Nickel positive Reaktionen zeigten. Erwartungsgemäß zeigten im Patientenkollektiv I 10 von 11 Patienten eine positive Reaktion. Bei der Patientin, welche keine LTT-Reaktion auf Nickel bot, war der Epikutantest auf Nickel stark positiv. Wenn man das Patientenkollektiv II beobachtet, fällt auf, dass auch hier ein beträchtlicher Anteil der Patienten (5 von 7) gegen Nickel sensibilisiert ist. Im Kontrollkollektiv konnte keine einzige positive Reaktion gemessen werden.

	Patientenkollektiv I	Patientenkollektiv II	Kontrollkollektiv
	LTT positiv	LTT positiv	LTT positiv
Nickel	10/11	5/7	0/5
Kobalt	0/11	0/7	0/5
Chrom	0/11	0/7	0/5

Tabelle 4-7 Reaktionen im LTT in den jeweiligen Patientenkollektiven

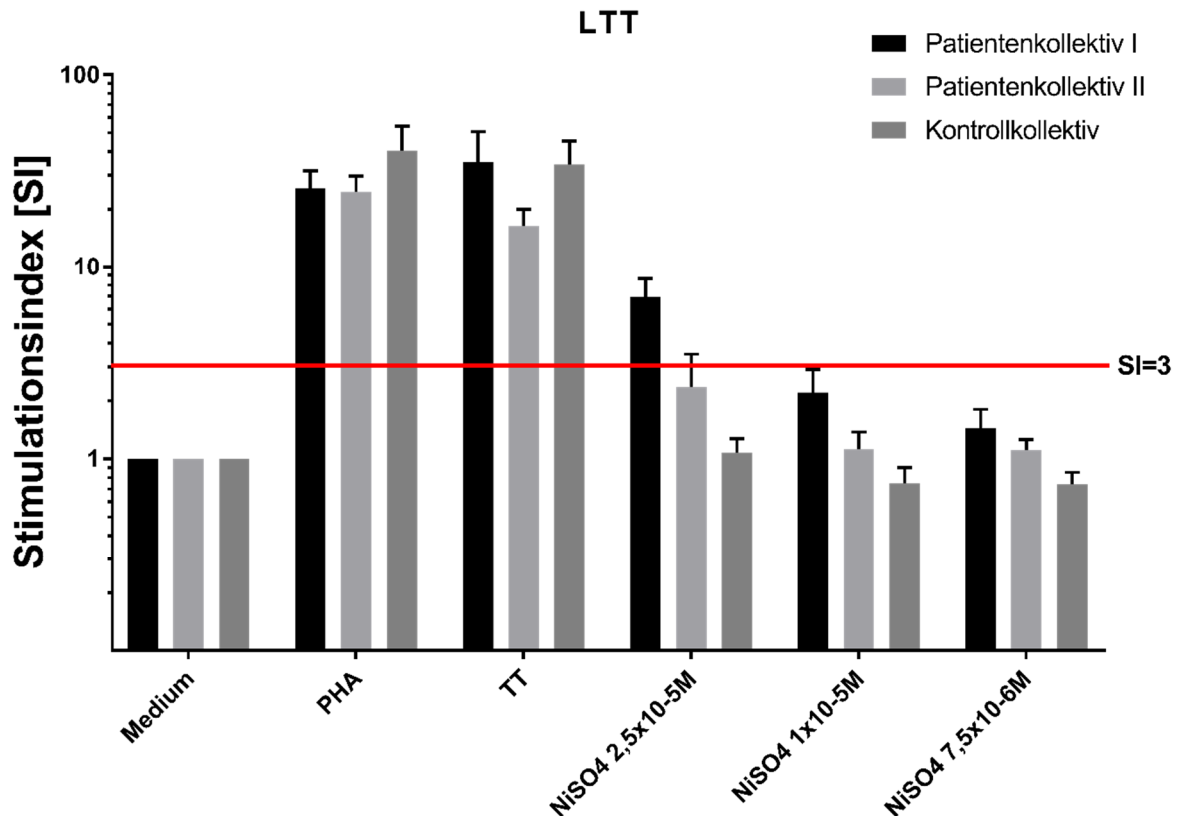


Abbildung 4-1 Gegenüberstellung der LTT-Ergebnisse bei Stimulation mit unterschiedlichen Nickelkonzentrationen in allen Patientenkollektiven. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SD; bei  $SI \geq 3$  (Schwelle rot markiert) gelten die Reaktionen als positiv.

#### 4.3.4 Verhältnis zwischen Reaktionen auf Nickel im ECT und LTT

Gegenüber Nickel ergaben sich mit Abstand die meisten Reaktionen im ECT und LTT. Daher wurde nach Übereinstimmungen in beiden Testverfahren gefragt. Im Patientenkollektiv I konnten 2 Patienten gefunden werden, bei denen sowohl ECT und LTT positiv waren. Im Patientenkollektiv II waren es ebenfalls 2 Patienten, die in beiden Testverfahren positiv auf Nickel reagierten (Tabelle 4-8).

	Patientenkollektiv I		Patientenkollektiv II	
	n	%	n	%
Positive Reaktionen im ECT	3/11	28%	2/7	29%
Positive Reaktionen im LTT	10/11	91%	5/7	71%
Positive Reaktionen im ECT und LTT	2/11	18%	2/7	29%

Tabelle 4-8 Übereinstimmung zwischen Reaktionen auf Nickel im ECT und LTT im Patientenkollektiv I und II

## 4.4 Histomorphologie

### 4.4.1 Überblick

Insgesamt lagen von 21 Patienten histologische Schnitte von periimplantärem Gewebe vor. Die Gewebeproben wurden alle während der nötig gewordenen Knie-TEP-Revisionsoperationen gewonnen. Beurteilt wurden die Proben mittels eines gängigen Schemas, welches durch Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Krenn festgelegt werden konnte. Die folgenden Abschnitte geben Aufschlüsse über die Befunde in den einzelnen Kollektiven.

### 4.4.2 Patientenkollektiv I

Pat.Nr.	Alter, Geschlecht	ECT-Reaktion	LTT-Reaktion	CD3-Infiltrat		KP1	CD20	CD15	histologische Beurteilung
				qualitativ	quantitativ				
421/06	71, w	Co	Ni	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
457/06	68, w	Co	Ni	makronodal perivaskulär	++	++	+	-	Typ I
IAR 16	59, w	Ni	Ni	-	-	-	-	-	Typ IV
IAR 18	74, w	-	Ni	-	-	-	-	-	Typ IV
IAR 27	67, w	Ni	-	diffus	+	+	-	-	Typ IV
IAR 1	58, w	-	Ni	-	-	-	-	-	nicht repräsentativ
IAR 4	52, m	-	Ni	-	-	-	-	-	Typ IV
IAR 10	66, w	-	Ni	diffus	-	+	-	-	Typ IV
IAR 24	80, w	-	Ni	-	-	-	-	-	Typ I
IAR 28	63, w	-	Ni	-	-	-	-	-	Typ IV
IAR 32	46, m	-	Ni	-	-	-	-	-	Typ IV

Tabelle 4-9 Histomorphologische Ergebnisse im Patientenkollektiv I (Ni = Nickel, Co = Kobalt, n.d. = nicht durchgeführt)

Bei zwei Patienten konnte unter dem Mikroskop eine periimplantäre Membran vom abriebinduzierten Typ (Typ I) diagnostiziert werden. Die meisten Proben ergaben jedoch den Nachweis eines histologischen Indifferenztyps, entsprechend zeigten sieben Patienten eine periimplantäre Membran vom Typ IV. In einem Fall konnte perioperativ nicht genügend repräsentatives Gewebe gewonnen werden, von einer anderen Patientin wurde auf deren Wunsch keine histomorphologische Begutachtung angestellt. Ein T-Zellinfiltrat (über CD3-Färbung charakterisiert) fand sich bei 3/11 Proben; Hinweise auf Infekt über CD15<sup>+</sup>-Zellen (= Granulozyten) zeigten sich nicht. Makrophagen (KP1-AK gefärbt) waren nur teilweise nachweisbar.

#### 4.4.3 Patientenkollektiv II

Pat.Nr.	Alter, Geschlecht	ECT- Reaktion	LTT- Reaktion	CD3-Infiltrat		KP1	CD20	CD15	histologische Beurteilung
				qualitativ	quantitativ				
849/08	63, w	Ni	Ni	diffus	-	+	-	-	Typ IV
487/06	71, m	Ge	Ni	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
786/08	66, w	-	-	mikronodal perivaskulär	+	+	+	+	Typ I
IAR 22	75, m	-	Ni	-	-	-	-	-	Typ IV
IAR 25	78, w	Ni, Ge	Ni	-	-	-	-	-	Typ IV
IAR 5	76, m	-	-	makronodal perivaskulär	++	++	++	++	Typ II
IAR 29	71, w	-	Ni	diffus	+	+	+	-	Typ IV

**Tabelle 4-10 Histomorphologische Ergebnisse im Patientenkollektiv II (Ni = Nickel, Ge = Gentamicin, n.d. = nicht durchgeführt)**

Es konnte jeweils ein Patient mit Nachweis eines abriebinduzierten Typs (Typ I) und eines infektiösen Typs diagnostiziert werden. Vier Proben wurden als Indifferenztyp (Typ IV) klassifiziert. Eine Probe konnte wegen mangelnder Fixierung nicht bewertet werden. Das Kollektiv II – von der Klinik und wegen Keimnachweis als Patienten mit septischer Lockerung eingestuft – hatte gemäß Tabelle 4-10 nicht immer ein entsprechendes histologisches Bild. Teils waren auch Kontaktallergien bei den Patienten gefunden worden.

#### 4.4.4 Kontrollkollektiv

Pat.Nr.	Alter, Geschlecht	ECT- Reaktion	LTT- Reaktion	CD3-Infiltrat		KP1	CD20	CD15	histologische Beurteilung
				qualitativ	quantitativ				
785/08	55, w	-	-	-	-	-	-	-	nicht repräsentativ
IAR 6	60, w	-	-	diffus	+	-	-	-	nicht repräsentativ
IAR 17	75, m	-	-	mikronodal perivaskulär	+	+	+	-	Typ IV
IAR 23	74, w	-	-	-	-	-	-	-	Typ IV
IAR 33	69, w	-	-	diffus	-	++	-	-	Typ I

Tabelle 4-11 Histomorphologische Ergebnisse im Kontrollkollektiv

Bei zwei Patienten im Kontrollkollektiv konnte keine histologische Einteilung, welche einem der vier Typen nach Prof. Krenn entsprechen würde, gemacht werden. Vielmehr handelte es sich hierbei bei beiden Patienten um eine fibrinoide Nekrose. Bei den drei verbleibenden Proben wurden zwei als Indifferenztyp (Typ IV) und eine als abriebinduzierter Typ (Typ I) klassifiziert. Insgesamt war histologisch kein Infektnachweis bei auch fehlenden CD15<sup>+</sup> Neutrophilen gesehen worden. Es fand sich nur bei 2/5 Proben ein geringes T-Zell-Infiltrat über die anti-CD3-Färbung.

#### 4.5 Auswertung der Zytokinexpression

Zuerst folgt eine Übersicht über die Zytokinexpressionsraten der Studienkollektive. Daran anschließend erfolgt ein Vergleich der einzelnen Studienkollektive.

##### 4.5.1 Übersicht

Nachfolgende Tabelle stellt eine Übersicht der relativen Zytokinexpressionsraten der Studienkollektive dar.

	Gruppe	N	Minimum	Maximum	25. Perzentile	50. Perzentile (Median)	75. Perzentile
TNF $\alpha$	Patientenkollektiv I	1 1	0	541,19	0	0,51	78,79
	Patientenkollektiv II	7	0	770,69	0,52	3,39	35,02
	Kontrollkollektiv	5	0	5,10	0	0,08	3,07
IFN $\gamma$	Patientenkollektiv I	1 1	0	104,69	0	0	0,36
	Patientenkollektiv II	7	0	1,36	0	0	0,66
	Kontrollkollektiv	5	0	1,72	0	0	0,86
IL-17	Patientenkollektiv I	1 1	0	4269,94	0	0	160,9
	Patientenkollektiv II	7	0	9,71	0	0	4,63
	Kontrollkollektiv	5	0	36,76	0	0,11	29,08
IL-2	Patientenkollektiv I	1 1	0	0,48	0	0	0
	Patientenkollektiv II	7	0	0,32	0	0	0
	Kontrollkollektiv	5	0	0	0	0	0
IL-6	Patientenkollektiv I	1 1	0	59,3	0	0,01	0,42
	Patientenkollektiv II	7	0	21,56	0	0,8	21,26
	Kontrollkollektiv	5	0	1,6	0	0,1	0,58
IL-8	Patientenkollektiv I	1 1	0	82,14	0	0,36	3,07
	Patientenkollektiv II	7	0	181,02	0	0,24	20,53
	Kontrollkollektiv	5	0	1,73	0	0	0,86
IL-1 $\beta$	Patientenkollektiv I	1 1	0	501,46	0	0,97	30,7
	Patientenkollektiv II	7	0	192,67	0	0	1,97
	Kontrollkollektiv	5	0	8,11	0	0,04	5,71
IL-10	Patientenkollektiv I	1 1	0	5480,15	0	0,2	324,03
	Patientenkollektiv II	7	0	49,18	0	2,55	17,51
	Kontrollkollektiv	5	0	0,03	0	0	0,01

	Gruppe	N	Minimum	Maximum	25. Perzentile	50. Perzentile (Median)	75. Perzentile
TGFB	Patientenkollektiv I	1 1	0	643,59	0,49	2,22	41,93
	Patientenkollektiv II	7	0	43,11	0,21	2,85	11,55
	Kontrollkollektiv	5	0	5,82	0,11	1,25	3,7
OPG	Patientenkollektiv I	1 1	0	1746,2	0	0,53	4,86
	Patientenkollektiv II	7	0	221,32	0	1,04	198,09
	Kontrollkollektiv	5	0	3,97	0	0	2,21
RANKL	Patientenkollektiv I	1 1	0	10369,08	0	0,52	149,09
	Patientenkollektiv II	7	0	67,65	0	2,03	13,93
	Kontrollkollektiv	5	0	0,76	0	0	0,38
CCL3	Patientenkollektiv I	1 1	0	855,13	0	0,52	83,29
	Patientenkollektiv II	7	0	12,3	0	0,77	7,67
	Kontrollkollektiv	5	0	3,29	0	0	1,65
CCL2	Patientenkollektiv I	1 1	0	552,56	0,15	1,02	1,85
	Patientenkollektiv II	7	0	11,16	0	1,16	9,71
	Kontrollkollektiv	5	0	6,92	0	0,02	3,85
OPN	Patientenkollektiv I	1 1	0	249	0	1,53	57,28
	Patientenkollektiv II	7	0	17,15	0	0,24	2,83
	Kontrollkollektiv	5	0	79,89	0	0	45,88
PTGS2	Patientenkollektiv I	1 1	0	2210,26	0	0	0,52
	Patientenkollektiv II	7	0	4,17	0	0	0,19
	Kontrollkollektiv	5	0	1,21	0	0	0,89

Tabelle 4-12 Übersicht Zytokinexpression



#### 4.5.2 Zytokinwerte getrennt nach Studienkollektiven

Für jeden einzelnen Patienten wurde die relative Expressionsrate des jeweiligen Zytokins beschrieben. Hierbei wurde in erhöht (relative Expressionsrate >1) oder nicht erhöht unterschieden.

##### 4.5.2.1 Zytokinwerte des Patientenkollektiv I

Proben- nr.	TNF α	IFNγ	IL-17	IL-2	IL-6	IL-8	IL-1β	IL-10	TGFβ	OPG	RANKL	CCL3	CCL2	OPN	PTGS2
421/06	+	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	+	+	+	+	+	+	∅
457/06	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+
IAR 16	+	∅	+	∅	∅	+	∅	∅	+	+	∅	∅	∅	+	∅
IAR 18	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+	+	∅	+	+	∅	∅
IAR 27	+	∅	∅	∅	∅	+	+	+	+	+	+	∅	+	+	+
IAR 1	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	+	∅
IAR 4	∅	∅	+	∅	∅	∅	+	+	∅	∅	∅	+	+	+	∅
IAR 10	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	+	∅	+	+	∅
IAR 24	+	+	+	∅	+	+	+	+	+	∅	+	+	+	∅	+
IAR 28	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	+	∅	∅	∅	∅
IAR 32	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
erhöht in %	45%	9%	36%	0%	9%	36%	27%	45%	64%	36%	45%	36%	55%	55%	27%

Tabelle 4-13 Übersicht der Zytokinexpressionen in den Patientenproben; + bedeutet erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate >1); ∅ bedeutet keine erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate ≤1)

##### 4.5.2.2 Zytokinwerte des Patientenkollektiv II

Proben- nr.	TNF α	IFNγ	IL-17	IL-2	IL-6	IL-8	IL-1β	IL-10	TGFβ	OPG	RANKL	CCL3	CCL2	OPN	PTGS2
849/08	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+	+	+	∅	∅	∅	∅
487/06	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	+	∅	∅
786/08	+	∅	∅	∅	∅	+	∅	+	+	+	+	+	+	+	+
IAR 22	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	+	+	∅	∅	+	∅	∅
IAR 25	+	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 5	+	+	+	∅	+	+	+	+	+	∅	∅	+	+	+	∅
IAR 29	+	∅	+	∅	∅	∅	∅	+	+	∅	+	+	∅	∅	∅
erhöht in %	71%	14%	29%	0%	29%	29%	29%	71%	71%	57%	57%	43%	57%	29%	14%

Tabelle 4-14 Übersicht der Zytokinexpressionen in den Patientenproben; + bedeutet erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate >1); ∅ bedeutet keine erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate ≤1)

#### 4.5.2.3 Zytokinwerte des Kontrollkollektivs

Proben- nr.	TNF α	IFN $\gamma$	IL-17	IL-2	IL-6	IL-8	IL-1 $\beta$	IL-10	TGF $\beta$	OPG	RANKL	CCL3	CCL2	OPN	PTGS2
785/08	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 6	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 17	+	+	∅	∅	+	∅	+	∅	+	∅	∅	∅	+	+	+
IAR 23	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 33	+	∅	+	∅	∅	+	+	∅	+	+	∅	+	∅	+	∅
erhöht in %	40%	20%	40%	0%	20%	20%	40%	0%	60%	20%	0%	20%	20%	40%	20%

**Tabelle 4-15 Übersicht der Zytokinexpressionen in den Patientenproben; + bedeutet erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate >1); ∅ bedeutet keine erhöhte Expressionsrate (Expressionsrate ≤1)**

Insgesamt ergibt sich ein heterogenes Verteilungsmuster. Selten sind IFN $\gamma$  und IL-6 erhöht; häufiger IL-10, TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , RANKL und OPG. Eine IL-2-Erhöhung fehlt in allen drei Gruppen, im Kontrollkollektiv sind auch IL-10 und RANKL nicht erhöht.

#### 4.5.2.4 Zusammenfassung der Zytokinwerte nach Studienkollektiven

Im folgenden Abschnitt wird eine Zusammenfassung über die prozentuale Verteilung der erhöhten Zytokinwerte in den einzelnen Studienkollektiven gegeben.

erhöht in %	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL-17	IL-2	IL-6	IL-8	IL-1 $\beta$	IL-10	Im Durchschnitt erhöht
Patientenkollektiv I	45	9	36	0	9	36	27	45	26
Patientenkollektiv II	71	14	29	0	29	29	29	71	34
Kontrollkollektiv	40	20	40	0	20	20	40	0	18

**Tabelle 4-16a Prozentuale Verteilung der erhöhten Zytokinwerte (Expressionsrate >1)**

erhöht in %	TGF $\beta$	OPG	RANKL	CCL3	CCL2	OPN	PTGS2	Im Durchschnitt erhöht
Patientenkollektiv I	64	36	45	36	55	55	27	45
Patientenkollektiv II	71	57	57	43	57	29	14	47
Kontrollkollektiv	60	20	0	20	20	40	20	26

**Tabelle 4-16b Prozentuale Verteilung der erhöhten Zytokinwerte (Expressionsrate >1)**

Im Kontrollkollektiv sind im Vergleich mit den anderen beiden Gruppen IL-10 und RANKL nicht erhöht exprimiert. Andererseits sind im Patientenkollektiv II die Expressionsraten für TNF $\alpha$ , TGF $\beta$  und IL-10 am höchsten.

### 4.5.3 Vergleichende Gegenüberstellung der Studienkollektive

Das folgende Kapitel gibt einen statistischen Vergleich der Expressionsraten in den einzelnen Studienkollektiven.

#### 4.5.3.1 Vergleichende Gegenüberstellung der Zytokinwerte in den einzelnen Studienkollektiven

Aufgrund der nicht vorhandenen Normalverteilung der Zytokinwerte in den einzelnen Kollektiven wurde zur statistischen Auswertung der Zytokinwerte im Kollektivvergleich der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Zwar ergeben sich insgesamt keine signifikanten Unterschiede, es zeigen sich aber folgende Trends:

Im Patientenkollektiv II sind TNF $\alpha$  und IL-10 am deutlichsten erhöht. Im Patientenkollektiv I fällt die überwiegende OPN-Erhöhung auf.

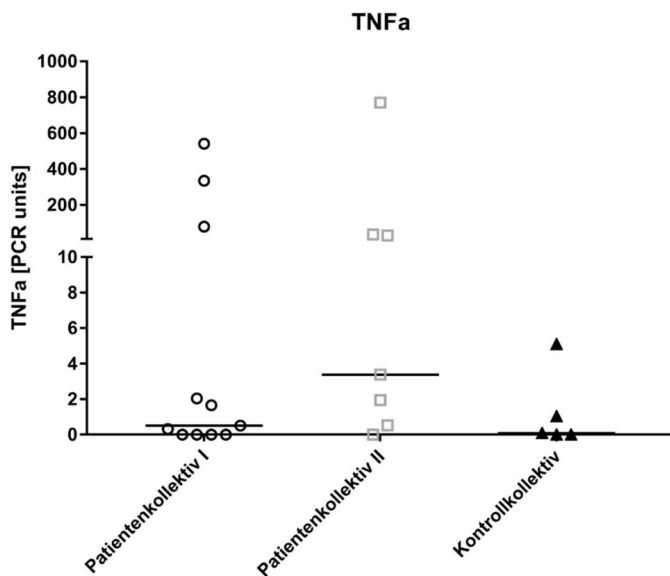


Abbildung 4-2 Vergleich der TNF $\alpha$ -Expressionsraten

Zwischen den Studienkollektiven ergaben sich keine signifikanten Unterschiede in den Expressionsraten von TNF $\alpha$ . Wie oben erwähnt ist allerdings die relative TNF $\alpha$ -Erhöhung im Patientenkollektiv II erkennbar.

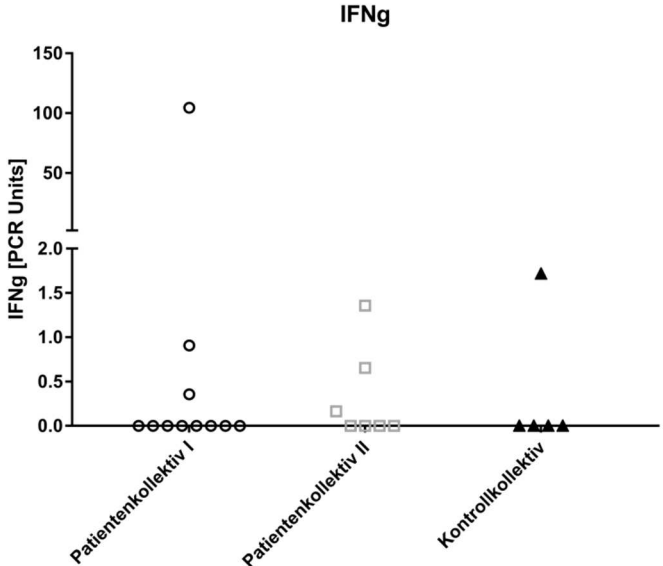


Abbildung 4-3 Vergleich der IFN $\gamma$ -Expressionsraten

Die IFN $\gamma$ -Expressionsraten der Studienkollektive zeigten keinen signifikanten Unterschied.

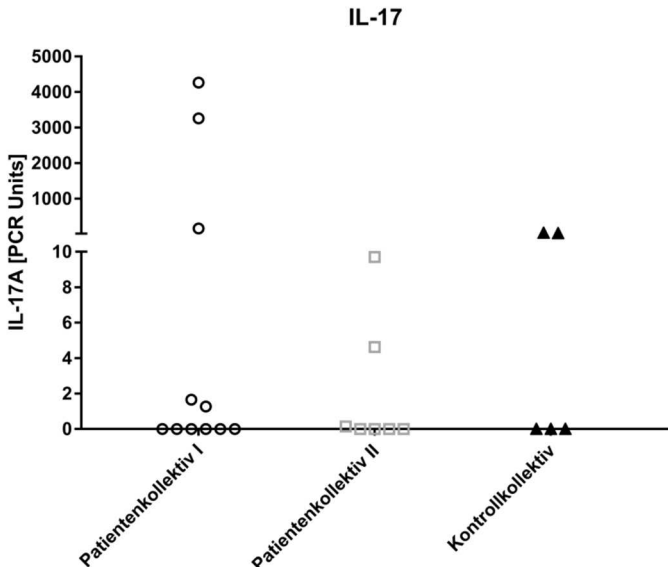


Abbildung 4-4 Vergleich der IL-17-Expressionsraten

Beim Vergleich der IL-17-Expressionsraten konnte keine Signifikanz beobachtet werden.

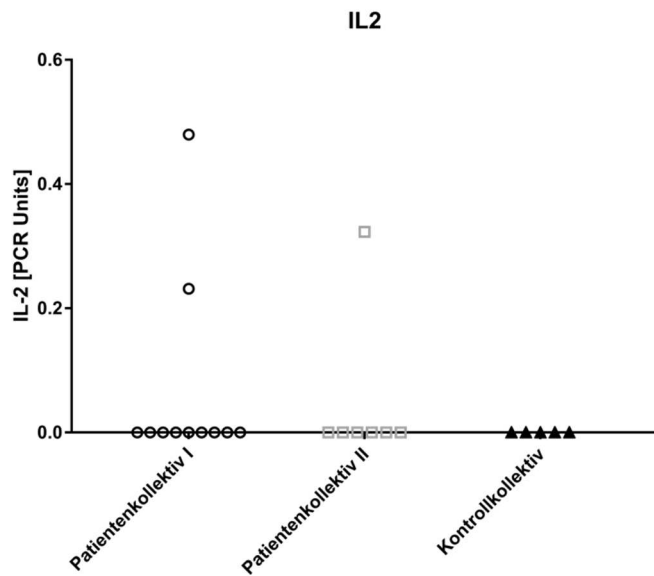


Abbildung 4-5 Vergleich der IL-2-Expressionsraten

Wenn man die IL-2-Expressionsraten der einzelnen Patientenkollektive vergleicht, ergibt sich in den Unterschieden keine Signifikanz.

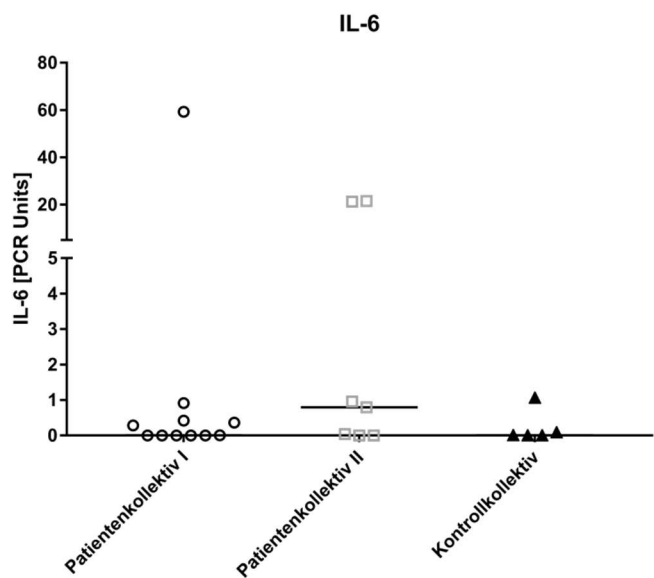


Abbildung 4-6 Vergleich der IL-6-Expressionsraten

Beim Vergleich der IL-6-Expression der einzelnen Kollektive erschienen keine signifikanten Unterschiede.

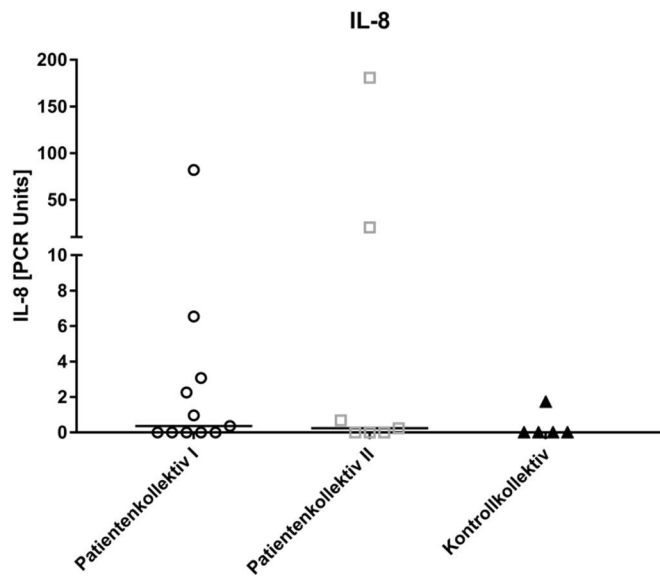


Abbildung 4-7 Vergleich der IL-8-Expressionsraten

Die Unterschiede bezüglich der IL-8-Expressionsraten zeigten keine signifikanten Unterschiede.

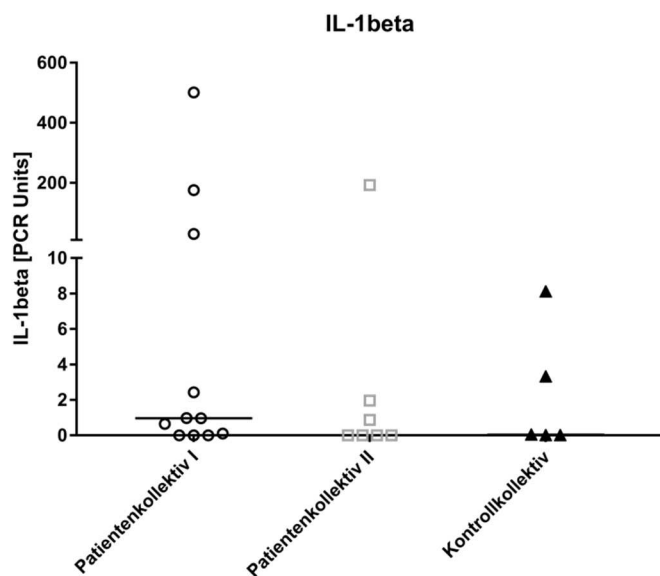


Abbildung 4-8 Vergleich der IL-1 $\beta$ -Expressionsraten

Bezugnehmend auf die Expressionsraten von IL-1 $\beta$  wurde zwischen den Kollektiven keine Signifikanz der Unterschiede erkannt.

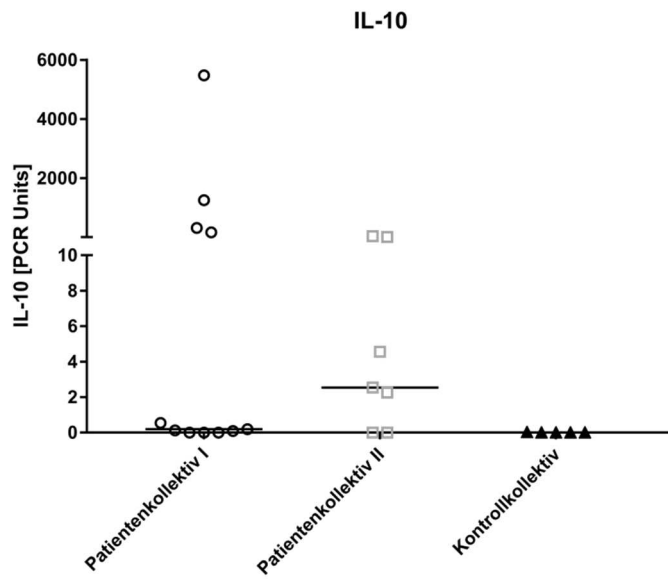


Abbildung 4-9 Vergleich der IL-10-Expressionsraten

Vergleicht man die Expressionsraten von IL-10 der Patientenkollektive, so ergeben sich keine signifikanten Unterschiede.

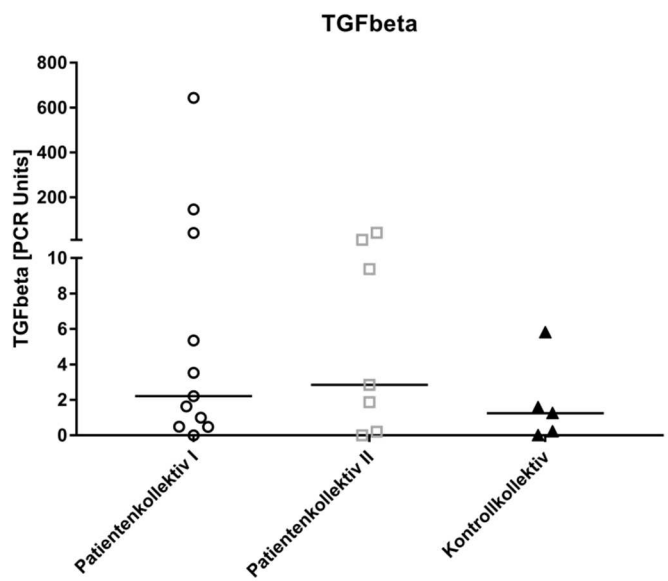


Abbildung 4-10 Vergleich der TGFβ-Expressionsraten

Die Unterschiede der Expressionsraten von TGFβ sind nicht signifikant.

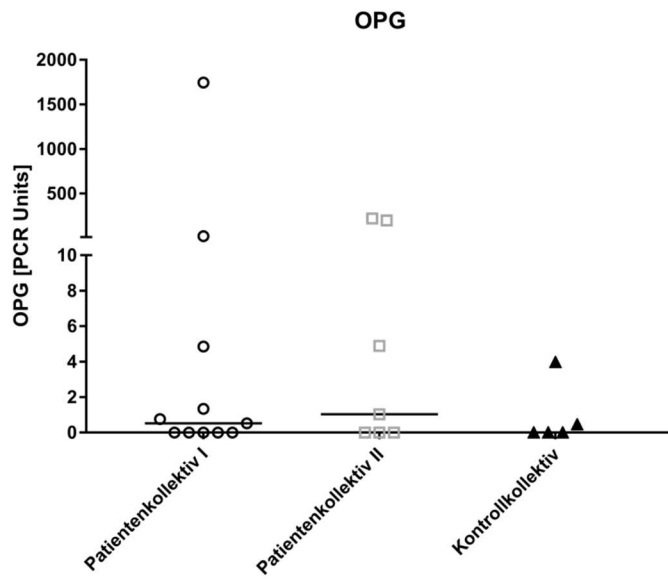


Abbildung 4-11 Vergleich der OPG-Expressionsraten

Auch bei den Expressionsraten von OPG zeigt der Vergleich der Studienkollektive keine signifikanten Unterschiede.

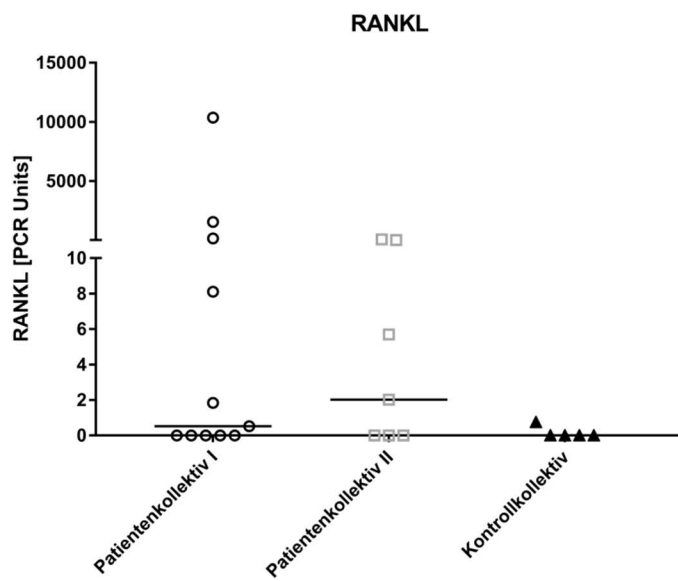


Abbildung 4-12 Vergleich der RANKL-Expressionsraten

Die Unterschiede in den RANKL-Expressionsraten sind nicht signifikant.



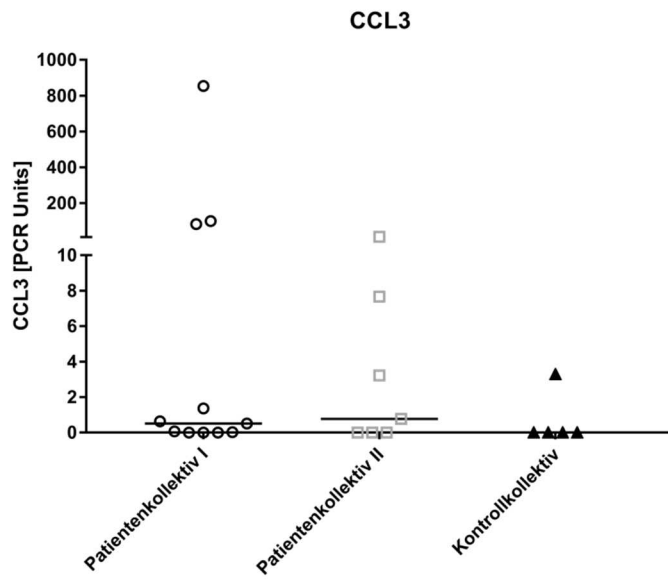


Abbildung 4-13 Vergleich der CCL3-Expressionsraten

Kein signifikanter Unterschied ergibt sich bei der Beobachtung der CCL3-Expressionsraten.

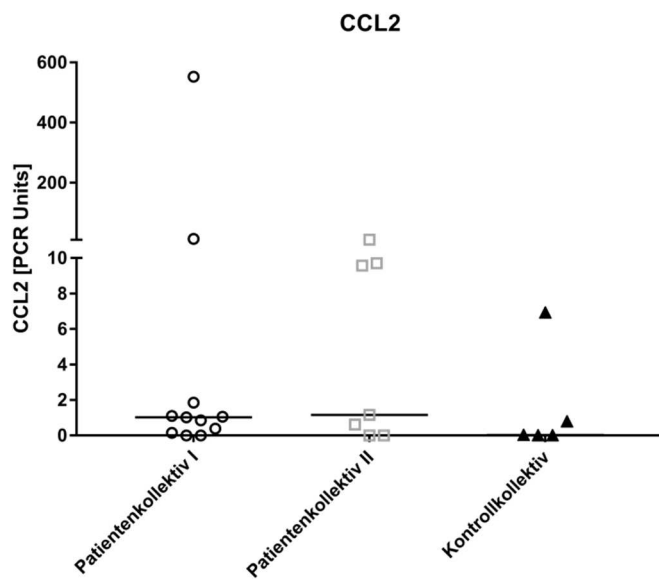


Abbildung 4-14 Vergleich der CCL2-Expressionsraten

Die Unterschiede der CCL2-Expressionsraten erweisen sich nicht als signifikant.

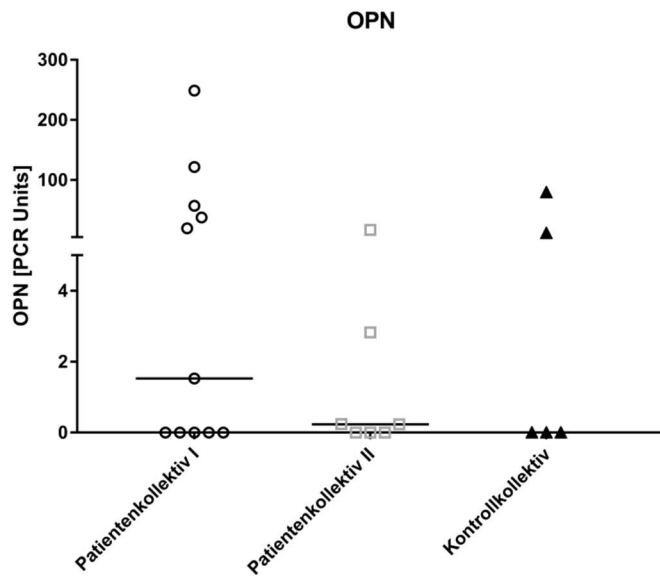


Abbildung 4-15 Vergleich der OPN-Expressionsraten

Keine signifikanten Unterschiede wurden beim Vergleich der OPN-Expressionsraten beobachtet. Allerdings ist im Patientenkollektiv I OPN häufiger vermehrt exprimiert.

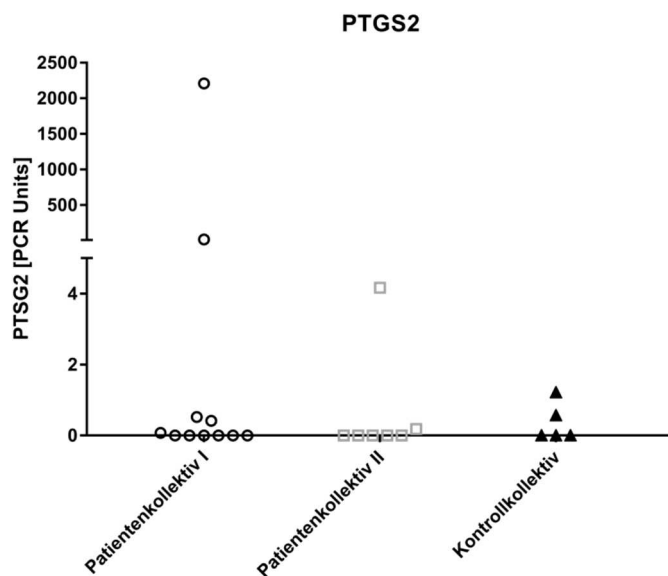


Abbildung 4-16 Vergleich der PTGS2-Expressionsraten

Keine Signifikanz erbrachten die Unterschiede zwischen den Kollektiven beim Vergleich der PTGS2-Expressionsraten.

## 4.6 Gegenüberstellender Vergleich von Histomorphologie und Zytokinprofilen

### 4.6.1 Übersicht

Dieses Kapitel stellt einen Vergleich zwischen Expressionsraten der Zytokine und der entsprechenden histomorphologischen Befundung der Patientenkollektive dar. Natürlich lassen sich aufgrund der kleinen Fallzahlen nur Trends erkennen. So fiel im Patientenkollektiv I auf, dass häufig ein „zellarmer, fibrosierungsbetonter“ Indifferenztyp auftrat. Im Patientenkollektiv II – mit septischer Lockerung – fand sich dennoch „nur“ bei einem Patienten eine histologische Beurteilung mit „Infektyp“ (Typ II nach Krenn).

### 4.6.2 Patientenkollektiv I

Pat.Nr.	CD3-Infiltrat		KP1	CD20	CD15	Typ	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL-17	IL-2	IL-6	IL-8	IL-1 $\beta$
	qualitativ	quantitativ											
421/06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	+	∅	+	∅	∅	∅	∅
457/06	makronodal perivaskulär	++	++	+	-	Typ I	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 16	diffus	-	-	-	-	Typ IV	+	∅	+	∅	∅	+	∅
IAR 18	diffus	-	-	-	-	Typ IV	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 27	diffus	+	+	-	-	Typ IV	+	∅	∅	∅	∅	+	+
IAR 1	diffus	-	-	-	-	n. r.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 4	diffus	-	-	-	-	Typ IV	∅	∅	+	∅	∅	∅	+
IAR 10	diffus	-	+	-	-	Typ IV	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅
IAR 24	diffus	-	-	-	-	Typ I	+	+	+	∅	+	+	+
IAR 28	diffus	-	-	-	-	Typ IV	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 32	diffus	-	-	-	-	Typ IV	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

Tabelle 4-22a Histomorphologie und Zytokinmuster Patientenkollektiv I; n.d. = nicht durchgeführt; n.r. nicht repräsentativ

Sieben Proben wurden als Indifferenztyp (Typ IV) klassifiziert, wohingegen lediglich zwei Proben einem abriebinduzierten Typ entsprachen (Typ I). Bis auf eine Probe zeigten alle ein diffuses Infiltrat. Bei einer Probe konnte ein makronodal perivaskuläres Infiltrat festgestellt werden. Auffällig ist, dass keine einzige Probe eine IL-2-Expression aufwies. Zudem gab es nur

eine Probe, die eine IFN $\gamma$ - und IL-6-Expression zeigte. Anzufügen ist, dass genau diese Probe in der Histomorphologie einen abriebinduzierten Typ aufwies. Darüber hinaus ist in der Tabelle 4-22a zu erkennen, dass bei vier Gewebeproben keine erhöhte Zytokinexpression gemessen werden konnte.

Pat.Nr.	CD3-Infiltrat		KP1	CD 20	CD 15	Typ	IL-10	TGF $\beta$	OPG	RANKL	CCL3	CCL2	OPN	PTGS2
	qualitativ	quantitativ												
421/06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	∅	+	+	+	+	+	+	∅
457/06	makronodal perivaskulär	++	++	+	-	Typ I	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+
IAR 16	diffus	-	-	-	-	Typ IV	∅	+	+	∅	∅	∅	+	∅
IAR 18	diffus	-	-	-	-	Typ IV	+	+	+	∅	+	+	∅	∅
IAR 27	diffus	+	+	-	-	Typ IV	+	+	+	+	∅	+	+	+
IAR 1	diffus	-	-	-	-	n. r.	∅	+	∅	∅	∅	∅	+	∅
IAR 4	diffus	-	-	-	-	Typ IV	+	∅	∅	∅	+	+	+	∅
IAR 10	diffus	-	+	-	-	Typ IV	∅	∅	∅	+	∅	+	+	∅
IAR 24	diffus	-	-	-	-	Typ I	+	+	∅	+	+	+	∅	+
IAR 28	diffus	-	-	-	-	Typ IV	+	+	∅	+	∅	∅	∅	∅
IAR 32	diffus	-	-	-	-	Typ IV	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅

**Tabelle 4-22b Histomorphologie und Zytokinmuster Patientenkollektiv I; n.d. = nicht durchgeführt; n.r. nicht repräsentativ**

Insgesamt gesehen zeigt die Probe IAR 32 keine einzige erhöhte Zytokinexpressionsrate. Die Gewebeprobe, welche eine makronodal perivaskuläre Infiltration zeigte, hatte nur eine erhöhte Expressionsrate für PTGS2.

### 4.6.3 Patientenkollektiv II

Pat.Nr.	CD3-Infiltrat		KP1	CD20	CD15	Typ	TNF $\alpha$	IFN $\gamma$	IL-17	IL-2	IL-6	IL-8	IL-1 $\beta$	
	qualitativ	quantitativ												
487/06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅	∅
849/08	diffus	-	+	-	-	Typ IV	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 22	diffus	-	-	-	-	Typ IV	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 25	diffus	-	-	-	-	Typ IV	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	+
IAR 29	diffus	+	+	+	-	Typ IV	+	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 5	makronodal perivaskulär	++	++	++	++	Typ II	+	+	+	∅	+	+	+	+
786/08	mikronodal perivaskulär	+	+	+	+	Typ I	+	∅	∅	∅	∅	∅	+	∅

**Tabelle 4-23a Histomorphologie und Zytokinmuster Patientenkollektiv II; n.d. = nicht durchgeführt**

Im Patientenkollektiv II, welches gänzlich Patienten mit einer nachgewiesenen septischen Lockerung darstellt, konnte lediglich eine periimplantäre Membran vom infektiösen Typ (Typ II) festgestellt werden. Vier Studienpatienten zeigten unter dem Mikroskop eine periimplantäre Membran vom Indifferenztyp (Typ IV). Die vier Patienten, die ein diffuses Infiltrat bei der feingeweblichen Untersuchung boten, hatten sämtlich keinen Nachweis von erhöhten Expressionsraten von IFN $\gamma$ , IL-2, IL-6 und IL-8. Die Proben, welche ein perivaskuläres Infiltrat aufwiesen, zeigten ohne Ausnahme erhöhte Expressionsraten für TNF $\alpha$  und IL-8.

Pat.Nr.	CD3-Infiltrat		KP1	CD 20	CD 15	Typ	IL-10	TGF β	OPG	RANKL	CCL3	CCL2	OPN	PTGS2
	qualitativ	quantitativ												
487/06	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	∅	∅	+	+	∅	+	∅	∅
849/08	diffus	-	+	-	-	Typ IV	+	+	+	+	∅	∅	∅	∅
IAR 22	diffus	-	-	-	-	Typ IV	+	+	+	∅	∅	+	∅	∅
IAR 25	diffus	-	-	-	-	Typ IV	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 29	diffus	+	+	+	-	Typ IV	+	+	∅	+	+	∅	∅	∅
IAR 5	makronodal perivaskulär	++	++	++	++	Typ II	+	+	∅	∅	+	+	+	∅
786/08	mikronodal perivaskulär	+	+	+	+	Typ I	+	+	+	+	+	+	+	+

**Tabelle 4-23b Histomorphologie und Zytokinmuster Patientenkollektiv II; n.d. = nicht durchgeführt**

Die Proben derselben vier Patienten, die qualitativ gesehen ein diffuses Infiltrat aufwiesen, hatten alle keine erhöhten Expressionsraten für OPN und PTGS2. In der Tabelle 4-23b ist zudem zu erkennen, dass alle Proben mit perivaskulären Infiltraten erhöhte Zytokinexpressionsraten für IL-10, TGFβ, CCL3, CCL2 und OPN aufweisen.

#### 4.6.4 Kontrollkollektiv

Pat.Nr.	CD3-Infiltrat		KP1	CD20	CD15	Typ	TNFα	IFNγ	IL-17	IL-2	IL-6	IL-8	IL-1β
	qualitativ	quantitativ											
785/08	diffus	-	-	-	-	n.r.	∅	∅	+	∅	∅	∅	∅
IAR 6	diffus	+	-	-	-	n.r.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 23	diffus	-	-	-	-	Typ IV	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 33	diffus	-	++	-	-	Typ I	+	∅	+	∅	∅	+	+
IAR 17	mikronodal perivaskulär	+	+	+	-	Typ IV	+	+	∅	∅	+	∅	+

**Tabelle 4-24a Histomorphologie und Zytokinmuster Kontrollkollektiv; n.r. = nicht repräsentativ**

Im Kontrollkollektiv waren insgesamt zwei Proben dabei, die bezüglich ihres Typs nicht eingeordnet werden konnten. Anderweitig fand sich in einer Probe ein abriebinduzierter Typ (Typ I). Zwei Proben offenbarten einen Indifferenztyp (Typ IV). Wenn man sich die Zytokinexpressionsrate genauer ansieht, fällt auf, dass sämtliche Proben mit einem diffusen Infiltrat weder IFNγ, IL-2 noch IL-6 vermehrt exprimieren.

Pat.Nr.	CD3-Infiltrat		KP 1	CD2 0	CD1 5	Typ	IL-10	TGF β	OPG	RANKL	CCL 3	CCL 2	OPN	PTGS2	
	qualitativ	quantitativ													
785/08	diffus	-	-	-	-	n.r.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 6	diffus	+	-	-	-	n.r.	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 23	diffus	-	-	-	-	Typ IV	∅	+	∅	∅	∅	∅	∅	∅	∅
IAR 33	diffus	-	++	-	-	Typ I	∅	+	+	∅	+	∅	+	∅	∅
IAR 17	mikronodal perivaskulär	+	+	+	-	Typ IV	∅	+	∅	∅	∅	+	+	+	+

**Tabelle 4-24b Histomorphologie und Zytokinmuster Kontrollkollektiv; n.r. = nicht repräsentativ**

In der Tabelle 4-24 b wird deutlich, dass vor allem für die Zytokine CCL2 und PTGS2 im Vergleich zu der einen Probe, welche ein mikronodal perivaskuläres Infiltrationsmuster zeigt, keine erhöhte Expressionsrate vorliegt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass a) drei Gruppen von Patienten gebildet wurden [1.) ECT und/oder LTT positiv, 2.) ECT/LTT negativ aber Hinweis für periimplantären Infekt, 3.) aseptische Lockerung ohne Allergienachweis] und b) sich zwar unterschiedliche Zytokinexpressionsmuster, jedoch ohne klare Gruppenzugehörigkeit zeigten. Auch die Histomorphologietypen waren nicht klar zuordenbar. Allerdings haben sich am häufigsten Proben mit „Indifferenztyp IV bzw. Fibrosierung und nur geringem Infiltrat“ ergeben.

## **5. Diskussion**

Seit mehreren Jahren wird diskutiert, ob möglicherweise eine Metallallergie eine erhöhte Rate von Endoprothesenversagen hervorruft. In den letzten Jahren häuften sich Fallberichte, in denen Patienten, welche eine bekannte Metallsensibilisierung hatten, Hautveränderungen (Erytheme und Ekzeme) oder Beschwerden in den entsprechenden Gelenken (Schwellung, Erguss und Schmerzen) nach Implantation einer Endoprothese aufwiesen. Wurden diese beschwerdebehafteten Patienten einer Revisionsoperation zugeführt und „hypoallergene“ Implantate (z.B. oberflächenbeschichtet/Keramik-basiert) eingebracht, so profitierte ein Großteil dieser Patienten [97, 98]. Darüber hinaus wurde in mehreren Fällen von aseptischen Prothesenlockerungen in der histomorphologischen Untersuchung eine eindruckliche Aggregation von Lymphozyten beschrieben. Eine mögliche Ursache für diese eben genannten Erscheinungen könnte eine Typ-IV-Allergie auf das entsprechende Metall sein, welches in der Legierung des Gelenkimplantates vorhanden ist [83, 95].

Zum Zeitpunkt der Planung und Durchführung der hier genannten Untersuchungen gab es wenige Veröffentlichungen, welche sich vor allem mit dem Zytokinprofil und der Histomorphologie bei aseptisch gelockerten Endoprothesen beschäftigten. Bei diesen Arbeiten wurde allerdings die allergologische Anamnese außen vor gelassen. Zum anderen fanden sich Forschungsarbeiten, die lediglich den allergologischen Aspekt, also die Epikutantestung und den Lymphozytentransformationstest, untersuchten. Der histomorphologische Aspekt der periimplantären Membran bleibt hier unbeachtet. Aus eben genanntem leitet sich ab, dass die hier verfasste Arbeit einen Versuch darstellt, allergologische Gesichtspunkte mit denen der Histomorphologie und etwaiger Zytokinprofile im Gewebe zu vergleichen. Ziel ist es, die Frage nach einer möglichen Metallunverträglichkeit als Ursache für die aseptische Endoprothesenlockerung näher zu charakterisieren.

### **5.1 Methodendiskussion**

#### **5.1.1 Epikutantest**

Die Epikutantestung wurde bei allen Patienten zumindest mit der Standardreihe, welche Testfelder für Nickel, Chrom und Kobalt enthält, durchgeführt. Bei den Patienten, bei denen mittels Endoprothesenpass gesichert werden konnte, dass auch eine Zementierung des jeweiligen Implantates vorgenommen wurde, testeten wir darüber hinaus auch mit der Knochenzementreihe. Diese wurde über Substanzen der „Zahntechnikerreihe“ (u.a.



Acrylatkomponenten und Additiva) etabliert. Die Testung sowie die Ablesung geschahen nach bestehenden Leitlinien der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft (DDG) und der Deutschen Gesellschaft für Allergie und klinische Immunologie (DGAKI) zur Durchführung des Epikutantests [93, 132]. Die Ablesung erfolgte ausschließlich durch die Kolleginnen und Kollegen der Dermatologie, welche alle ausnahmslos den Facharztstandard erfüllten. Somit wurde versucht, der schwierigen Unterscheidung zwischen positivem, also gesicherter Typ-IV-Allergie, und fraglichem beziehungsweise irritativem Testergebnis Rechnung zu tragen. Erst einige Jahre nach Entstehen der hier vorgelegten Arbeit wurde zur Erhöhung der Sensitivität eine zusätzliche Spätablesung eingeführt [99].

### **5.1.2 Lymphozytentransformationstest**

Der Epikutantest stellt unweigerlich den diagnostischen Standard zum Nachweis einer kutanen Typ-IV-Sensibilisierung dar. Ständer et al. konnten allerdings zeigen, dass der LTT nach entsprechender Optimierung zumindest bei Nickelallergie eine wertvolle Ergänzung bei der Diagnostik einer Metallsensibilisierung ist [6]. Diese Veröffentlichung untersuchte allerdings implantatfreie Personen. Von elf Patienten des Patientenkollektiv I war lediglich eine Patientin im Epikutantest auf Nickel negativ getestet worden. Unter Zuhilfenahme des LTT gelang es aber, die Nickelsensibilisierung bei dieser Patientin festzustellen. Bei einer anderen Patientin wiederum, welche im Epikutantest positiv auf Nickel reagierte, konnte kein erhöhter Stimulationsindex für Nickel gemessen werden. Darüber hinaus konnten bei zwei im Epikutantest positiven Reaktionen auf Chrom im LTT keine erhöhten Stimulationsindices für Chrom nachgewiesen werden. Auch im Patientenkollektiv II sind die meisten Patienten auf Nickel sensibilisiert. Bisher wurde noch nicht an einem größeren Kollektiv untersucht, wie eng – oder gering – eine Nickel-LTT-Reaktion mit einer ECT-Reaktion bei Implantat-(Endoprothesen)-Trägern korreliert. Ob periimplantäre Faktoren wie Infekt oder persistierende Entzündung eine Metall-(Nickel-)Sensibilisierung beeinflussen, geht aus der aktuellen Literatur nicht hervor.

### **5.1.3 Histomorphologische Untersuchung**

Die feingeweblichen Schnitte der periimplantären Membran wurden zunächst von zwei Dermatohistologen unabhängig voneinander untersucht und befundet. Im Anschluss erfolgte dann die Diskussion der beiden erhobenen Befunde. Der abschließende Befund wurde erstellt

mit der Einschränkung, dass die perioperativ gewonnene Probe der periimplantären Membran nur einen kleinen Abschnitt des zu untersuchenden Gewebes ausmacht. Vermutlich hätte die Analyse mehrerer Gewebeproben bessere Aussagen erlaubt. Uns stand aber nur eine Probe für die Histomorphologie zur Verfügung.

#### **5.1.4 Zytokinanalyse**

Die Analyse der einzelnen Zytokine wurde in dieser Arbeit mittels real-time-PCR durchgeführt. Die jeweiligen Proben wurden perioperativ bei Knie-TEP-Wechseloperationen in ein RNA-konservierendes Medium gegeben. Dies ermöglichte in weiteren Schritten die Detektion von im Gewebe vorhandenen Kopien der mRNA des jeweils zu untersuchenden Zytokins. Keinesfalls erfolgte der direkte Nachweis oder die Messung des Zytokins selbst. Um eine relative Zytokinexpressionsrate berechnen zu können, musste die Menge der RNA-Kopien der einzelnen Zytokine der gelenknahen Probe mit der einer entsprechenden gelenkfernen Probe, in diesem Fall subcutanes Fettgewebe, ins Verhältnis gesetzt werden. Damit erhält man eine Angabe, wie viel höher oder niedriger die gelenknahe Zytokinexpression gegenüber der im gelenkfernen Gewebe ist. Dadurch kann eine Aussage getroffen werden, ob die Zytokinexpression einen Unterschied zum „Grundwert im Gewebe“ aufweist. Allerdings ergeben sich daraus auch Schwierigkeiten des Verfahrens: Die Entnahme der Gewebeproben ist grundsätzlich abhängig vom operierenden Arzt. Beispielsweise kann eine Kontamination der gelenkfernen Probe mit Keratinozyten, wie sie etwa bei einer zu Kutis nahen Entnahme passieren kann, eine veränderte Messung der Zytokine gegenüber reinem Fettgewebe hervorrufen. Die Entnahme der einzelnen Gewebeproben ist einzig und allein abhängig vom Operateur. Aufgrund des Zustandes, dass die Patienten in unterschiedlichen Kliniken rekrutiert wurden, konnte nicht gewährleistet werden, dass jede Wechseloperation von ein und demselben Operateur durchgeführt wurde. Somit verbleibt eine Unsicherheit, da klarerweise nicht bei jedem Patienten eine identische Entnahmestelle sowohl für die implantatferne als auch für die implantatnahe Probe gewählt wurde. Zum Teil ergeben sich extrem hohe relative Expressionsraten. Dies rührt daher, weil ein Verhältnis angegeben wird. Wenn zum Beispiel in der gelenknahen Gewebeprobe Zytokin-RNA-Kopien vorhanden sind und in der gelenkfernen Probe keine detektiert werden kann, so ergibt sich daraus unter Umständen eine hohe Expressionsrate.

Wissenschaftliche Arbeiten, die sich auch mit der Expression von Zytokinen im gelenknahen Gewebe beschäftigen, bedienen sich zumeist der immunhistochemischen Analyse des entsprechenden histologischen Gewebeschnittes [100, 101]. Hieraus ergibt sich wiederum die komplizierte Konstellation, dass der histologische Schnitt lediglich einen verschwindend geringen Teil der gesamten Gewebeprobe darstellt. Die Methode wiederum, welche in dieser Arbeit angewandt wurde, errechnet ein durchschnittliches Zytokinprofil, das die gesamte Probe berücksichtigt.

In weiteren Studien, die sich beispielsweise mit der Expression von Zytokinen im Kniegelenk auseinandersetzen, wird die Messung der Zytokine vor allem in der Synovialflüssigkeit vollzogen [102-105]. Die am häufigsten angewandte Methode zur Zytokinmessung ist der ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), dabei wird die Konzentration des jeweiligen Zytokins in g/l (oft auch in pg/ml) angegeben. Um bei dieser Art von Messung ein Verhältnis zwischen der Konzentration des zu untersuchenden Zytokins in der Synovia und der Konzentration im übrigen Körper zu erhalten, erfolgt meist die Bestimmung der Zytokinkonzentration im peripheren Blut. Problematisch ist hier sicherlich, dass die Konzentration des jeweiligen Zytokins von der aktuellen Immunlage des menschlichen Organismus abhängig ist. Bereits leichte Infekte, zum Beispiel der ableitenden Harnwege, können das individuelle Zytokinniveau verändern und lassen somit nur schwer eine Aussage bezüglich der vorliegenden Gelenkproblematik zu. Darüber hinaus muss kritisch angemerkt werden, dass die in dieser Arbeit verwendete Methode die mRNA der Zytokine detektiert. Dies entspricht nur teilweise der vor Ort anzutreffenden Zytokinmenge.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Vergleichende Gegenüberstellung der Zytokinexpressionsraten der einzelnen Studienkollektive**

Allen Patienten ist gemeinsam, dass sie eine Lockerung ihrer Knieendoprothese erfahren hatten. Des Weiteren wurde bei jedem einzelnen Patienten eine Wechseloperation durchgeführt. Hierzu erfolgte die Untersuchung von Gewebeproben verschiedener Patientenkollektive. Patientenkollektiv I setzt sich aus Knieendoprothesenträgern zusammen, bei welchen eine Metallallergie im Epikutantest und/oder im LTT nachgewiesen wurde. Im Patientenkollektiv II finden sich ausschließlich Patienten, bei denen aufgrund einer septischen Endoprothesenlockerung eine Revision indiziert wurde. Das Kontrollkollektiv ergibt sich aus

Patienten, bei denen zwar eine aseptische Prothesenlockerung eingetreten war, jedoch weder im Epikutantest noch im LTT eine Metallallergie diagnostiziert werden konnte.

#### **5.2.1.1 TNF $\alpha$ -Expression**

In der vorliegenden Arbeit konnte kein signifikanter Unterschied in der Zytokinexpressionsrate von TNF $\alpha$  zwischen den einzelnen Patientenkollektiven gezeigt werden, allerdings ist ein Trend ersichtlich, wobei die Expressionsrate im Patientenkollektiv II bei 71 % erhöht (Expressionsrate >1) war. Hingegen weisen im Patientenkollektiv I sowie im Kontrollkollektiv lediglich 45 bzw. 40 % eine erhöhte Expressionsrate von TNF $\alpha$  auf. Wenn man auch den Median der Expressionsrate betrachtet, so fällt auf, dass im Patientenkollektiv II dieser bei 3,39 lag, wohingegen dieser im Patientenkollektiv I mit 0,51 errechnet wurde. Im Kontrollkollektiv lag der Median der Expressionsrate nur bei 0,08.

TNF $\alpha$  ist ein multifunktionaler Signalstoff im menschlichen Immunsystem. Bei lokalen wie auch bei systemischen Entzündungen wird TNF $\alpha$  vor allem von Makrophagen freigesetzt [106]. Dieses Zytokin ist essentiell bei der Infektabwehr – auch bei Knieendoprothetik [107]. Somit könnte auch erklärt werden, warum die Expressionsraten im Patientenkollektiv II gegenüber den anderen beiden Kollektiven erhöht sind.

Leider können anhand der relativ kleinen Fallzahl noch keine deutlicheren Unterschiede gezeigt werden.

#### **5.2.1.2 IL-6-Expression**

Die Expressionsrate von IL-6 ist im Patientenkollektiv II etwas höher als in den anderen beiden Kollektiven.

Die Ausschüttung von IL-6 geschieht durch Fibroblasten, zum Großteil jedoch durch Makrophagen. Diesem Zytokin kommt eine Schlüsselrolle in der Differenzierung von Knochen abbauenden Zellen (Osteoklasten) zu [108, 109, 132]. Des Weiteren trägt dieses Zytokin eine wesentliche Rolle bei der Regulation von Entzündungsreaktionen im menschlichen Organismus. Unter anderem ist es bei der Regulation der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität aktiv, unter anderem über Induktion eines T-Zell-Infiltrats. Eine weitere essentielle Aufgabe des IL-6 ist die Differenzierung von Monozyten hin zu Makrophagen [110].

Somit passt die erhöhte IL-6-Expressionsrate zum Patientenkollektiv II, bei dem eine septische Lockerung mittels mikrobiologischen Befunds nachgewiesen werden konnte. Interessant ist aber zudem, dass im Kontrollkollektiv (aseptische Lockerung ohne Allergienachweis) höhere Expressionsraten als im Patientenkollektiv I (Lockerung und Allergienachweis) gemessen wurden. Möglich wäre auch hier eine persistierende Low-Grade-Infektion im Kontrollkollektiv ohne mikrobiologischen Nachweis, zumal die Diagnostik bei niedrig virulenten Keimen außerordentlich komplex ist. Immerhin haben bis zu 3% aller Prothesenträger eine Infektion ihrer Endoprothese [111]. Vasso et al. postulieren daher, dass der IL-6-Serumspiegel hilfreich in der Diagnostik von septischen TEP-Lockerungen sein kann [112].

### **5.2.1.3 IL-1 $\beta$ -Expression**

Im Vergleich der Expressionsraten von IL-1 $\beta$  ist auffällig, dass vor allem der Median im Patientenkollektiv I mit 0,97 gegenüber 0 im Patientenkollektiv II und 0,04 im Kontrollkollektiv erhöht ist. Ein signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht nachgewiesen werden.

IL-1 $\beta$  hat als Entzündungsmediator eine weitreichende Wirkung. Hauptsächlich von Monozyten produziert, triggert es die Freisetzung von TNF $\alpha$ , IL-6 und Bildung von Prostaglandin-E<sub>2</sub>. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass IL-1 $\beta$  zur Migration und Reifung von antigenpräsentierenden Zellen beiträgt. Zudem ist IL-1 $\beta$  in der Lage, Keratinozyten zur TNF $\alpha$ -Ausschüttung zu stimulieren [12, 113, 132]. Diese Beobachtung gilt für das allergische Kontaktekzem der Haut. Wenn man eine etwaige Allergie im Bereich der periimplantären Membran annehmen würde, so könnte hier auch ein ähnliches Zytokinmuster wie bei der Allergie vom Typ IV zu finden sein. Es wurde bereits erwähnt, dass für TNF $\alpha$  eine etwas höhere mediane Expressionsrate im Patientenkollektiv I gegenüber dem Kontrollkollektiv vorliegt. Für das Zytokin IL-6 stellte sich dies allerdings umgekehrt dar.

Mehrere Übersichtsarbeiten verweisen darauf, dass die molekulare Pathophysiologie der aseptischen Prothesenlockerung einer sehr subtilen Regulation unterliegt [106, 114]. In einem 2017 von Hallab et al. vorgestellten „Denkmodell“ werden als Abriebpartikel-assoziierte Pathomechanismen z.B. Inflammasom-Aktivierung mit IL-1 $\beta$  Freisetzung wie auch direkte „tötende“ Effekte oder Hypoxie-bedingte Wirkung diskutiert [115].

Erstaunlicherweise muss die niedrige Expressionsrate im Patientenkollektiv II angemerkt werden. In Anbetracht der nachgewiesenen, vorherrschenden bakteriellen Entzündung würde man hier durchaus eine erhöhte Expressionsrate für IL-1 $\beta$  erwarten.

#### **5.2.1.4 IL-10-Expression**

Bezüglich IL-10 ließ sich im Patientenkollektiv I bei 45 % und im Patientenkollektiv II bei 71 % eine erhöhte Expression nachweisen. Hingegen war im Kontrollkollektiv keine einzige Probe, bei welcher eine erhöhte IL-10-Expression gemessen werden wurde. Trotz der teils relativ unterschiedlichen Expressionsraten ließ sich kein signifikanter Unterschied feststellen.

Seit längerem wird in Veröffentlichungen auf die immunsuppressive Wirkung von IL-10 auch im Hinblick auf eine Kontaktsensibilisierung hingewiesen [42, 44]. Die Untersuchungen sind zum Teil am Tiermodell durchgeführt worden und darüber hinaus wird die IL-10-Expression in der Haut betrachtet. Sollte jedoch das Modell der Typ-IV-Allergie auf die periimplantäre Membran zu übertragen sein, so würde dies bedeuten, dass die IL-10-Expressionsraten in der periimplantären Membran bei Patienten mit positiver Metallallergiediagnose „als Gegenregulation“ erhöht sein müssten. Das würde auch die Beobachtung stützen, dass im Kontrollkollektiv keine einzige erhöhte Expressionsrate für IL-10 gefunden werden konnte.

Im Jahr 2015 konnte die Forschungsgruppe um Ettinger mit ihrer Publikation keinen signifikanten Unterschied zwischen den IL-10-Serumspiegeln von Patienten mit aseptischer und septischer Lockerung zeigen [116]. Es besteht jedoch ein wesentlicher Unterschied in der Methodik: in unserer Arbeit wurden relative Expressionsraten in der periimplantären Membran gemessen, wohingegen Ettinger et al. IL-10-Spiegel im peripheren Blut bestimmt hatten.

#### **5.2.1.5 OPG- und RANKL-Expression**

Auch bei der Messung der relativen Zytokinexpression von Osteoprotegerin (OPG) und RANKL als zwei Faktoren für Knochenaufbau/-abbau waren keine signifikanten Unterschiede zu verzeichnen. Betrachtet man aber den OPG-Median der Expressionsrate kritisch, so kann dieser im Patientenkollektiv I mit 0,53 und im Patientenkollektiv II mit 1,04 angegeben werden. Im Kontrollkollektiv errechnet sich ein Median von 0.

Für die RANKL-Expressionsrate stellt sich der Median folgendermaßen dar: im Patientenkollektiv I 0,52; im Patientenkollektiv II 2,03 und im Kontrollkollektiv 0.

OPG stellt einen löslichen Rezeptor für RANKL dar. Somit hat es die Potenz die Osteoklastogenese zu hemmen, indem es RANKL bindet und dieses somit nicht mehr die Osteoklasten aktivieren kann. [117, 118]. Des Weiteren konnte eine Ratio zwischen RANKL und OPG gefunden werden, die zeigt, dass bei hoher RANKL- und niedriger OPG-Expression

die Knochenresorption zunimmt und vice versa [118]. Da wir in allen Kollektiven Patienten gebündelt hatten, die eine septische oder aseptische Lockerung erlitten hatten, könnte dies erklären, dass keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Zytokinexpressionsraten von Osteoprotegerin und RANKL aufgetreten waren. Sowohl bei septischer wie aseptischer Lockerung muss eine vermehrte Knochenresorption um die Prothese stattgefunden haben. Spannend ist aber, dass in der aktuellen Literatur angenommen wird, dass vor allem Abriebpartikel (Polyethylen und Metall) durch einen direkten Effekt auf Osteoklasten zu einer Erhöhung der Zytokine OPG und RANKL führen [119]. In unseren drei Kollektiven sind es jedoch die Patienten mit einer septischen Prothesenlockerung, die die höchsten Werte bezüglich der Expression der Zytokine aufgewiesen hatten. Bezieht man sich allerdings wieder auf die Ratio zwischen OPG/RANKL, so fällt auf, dass im jeweiligen Kollektiv der Median für beide Zytokine in etwa gleich ist.

#### **5.2.1.6 CCL2-Expression**

Bei der Zytokinexpression von CCL2 wurde im Patientenkollektiv I ein Median von 1,02 und im Patientenkollektiv II von 1,16 berechnet. Das Kontrollkollektiv wies hingegen lediglich einen Median von 0,02 auf. Während im Patientenkollektiv I 55 % und im Patientenkollektiv II 57 % der Proben eine erhöhte Expressionsrate zeigten waren es im Patientenkollektiv nur 20 % der Proben, in welchen eine erhöhte Expression festgestellt werden konnte.

Es existieren bisher nur limitierte Daten zu erhöhten Genexpression von Chemokinen wie CCL2 [120] im periprothetischen Gewebe von aseptisch gelockerten Implantaten. Eine zentrale Rolle wird dabei für CCL2 angenommen. In vivo Studien konnten durch die Blockade von CCL2 die Rekrutierung von Osteoklastenvorläuferzellen unterbinden und somit zu einer verringerten Osteolyse führen [121]. Auf der anderen Seite konnte die Arbeitsgruppe um Huang und Kollegen zeigen, dass die Unterbindung von CCL2 zu keiner effektiven Unterbindung der Makrophagen Rekrutierung führt [122]. Unter der Annahme der zentralen Rolle von CCL2 in der Entstehung der periprothetischen Osteolyse ist fraglich, ob ein direkter Zusammenhang zwischen der Höhe der Zytokinexpression und der tatsächlichen Osteolyse besteht. Möglicherweise könnte dies durch eine größer angelegte Studie mit Begutachtung der entsprechenden Röntgenbefunde objektiviert werden. In der Zusammenschau könnte dann vielleicht ein Hinweis gewonnen werden, warum speziell im Patientenkollektiv I und II jeweils eine durchaus beträchtliche Expressionsrate detektiert werden konnte.

### **5.2.1.7 OPN-Expression**

Bezugnehmend auf die Expressionsraten von OPN ist im Patientenkollektiv I ein Median von 1,53 auffällig, wohingegen im Patientenkollektiv II nur ein Median von 0,24 und im Kontrollkollektiv ein Median von null vorlag. Prozentual gesehen ist die Expressionsrate im Patientenkollektiv I bei 55%, im Patientenkollektiv II bei 29% und im Kontrollkollektiv bei 40% der gewonnenen Gewebeproben erhöht.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Expression von OPN durch dendritische Zellen die Expression von proinflammatorischen Zytokinen und die Differenzierung der T-Helfer-Zellen reguliert [123]. Bezogen auf das allergische Kontaktekzem sind es vor allem in der efferenten Phase die T-Helfer-Zellen, welche die Amplifikation der allergischen Reaktion steuern [41]. Unter Umständen könnte diese Annahme auch auf das periimplantäre Gewebe übertragen werden. In der vorliegenden Arbeit konnten vor allem, wenn auch nicht signifikant, im Patientenkollektiv I (metallallergische Endoprothesenträger) verglichen zu den anderen beiden Kollektiven erhöhte Expressionsraten für OPN gemessen werden. Unter Umständen wäre es in einer größer angelegten Studie möglich, damit für ein metallallergisches Patientenkollektiv eine allergische Genese der Prothesenlockerung zu unterstreichen. OPN kann auch die Expression proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und TNF $\alpha$  hochregulieren [124]. Nicht klar ist dabei, wieso die Expressionsraten von IL-6 und TNF $\alpha$  im Patientenkollektiv II gegenüber denen im Patientenkollektiv I und Kontrollkollektiv erhöht sind, wenn doch OPN im Patientenkollektiv I in den hier durchgeführten Messungen am höchsten exprimiert wird.

### **5.2.2 Histomorphologische Gegenüberstellung der Patientenkollektive**

Noch immer ist die Pathomorphologie einer Hypersensitivitätsreaktion (Typ-IV-Allergie) im periprothetischen Gewebe unklar [125]. Aufgrund des Fehlens großer epidemiologischer Studien gibt es nur Hinweise aus Untersuchungen kleiner Fallzahlen an Revisionsgeweben von gelockerten Metall-Metall-Hüftendoprothesen, die ein mögliches allergisches Geschehen postulieren. Willert et al. werteten lymphohistiozytäre Infiltrate mit dem Vorhandensein einer gelockerten Prothese und dem Fehlen einer Riesenzell-Fremdkörperantwort als einen möglichen Hinweis auf eine Überempfindlichkeitsreaktion im periprothetischen Gewebe [95]. In der Untersuchung von Willert et al. wie auch in der Arbeit von Witzleb et al. konnten diffuse perivaskuläre lymphozytäre Infiltrate beobachtet werden [95, 125]. Willert führte daraufhin den Begriff „aseptic lymphocytic vasculitis-associated lesion“, kurz ALVAL, ein. Des Weiteren



wurde der Begriff der „lymphocyte-dominated immunological answer“, kurz LYDIA, geschaffen. Kritisch anzumerken bleibt, dass ausschließlich bei Metall-Metall-Prothesengleitpaarungen lymphozytäre Infiltrate gesehen werden konnten. Bei Metall-Polyethylen-Kombinationen war dies nicht der Fall.

Für die Arbeitsgruppe um Krenn besteht die Möglichkeit einer Hypersensitivitätsreaktion, wenn eine periprothetische Membran vom Abrieb-induzierten Typ (Typ I) oder Indifferenztyp (Typ IV) mit deutlicher lymphozytärer Infiltration vorliegt [91, 95]. Besonders exzessive lymphozytäre Infiltrate lassen einen an eine Hypersensitivitätsreaktion denken, jedoch bleibt die genaue Bedeutung des Infiltratmusters für die Hypersensitivitätsreaktion ungewiss [91, 125]. Ob möglicherweise bei einer periimplantären Membran vom Indifferenztyp (Typ IV) eine Hypersensitivitätsreaktion vorliegt, ist nicht vollends geklärt. Zumindest weist die Arbeit von Thomas et al. unter Kooperation von V. Krenn und Berücksichtigung der hier vorgelegten Methoden einen Subtyp der Typ-IV-Membran mit lymphozytären Infiltraten als Allergiehinweis aus [126].

Alle histopathologischen Schnitte dieser Arbeit wurden entsprechend den Kriterien der initialen Konsensusklassifikation zur Befundung von periimplantärem Gewebe nach Morawietz et al. begutachtet [92].

Vergleicht man die Kollektive dieser Arbeit, so fällt auf, dass der Großteil der Proben in allen drei Kollektiven als Indifferenztyp (Typ IV) entsprechend der bereits oben erwähnten Konsensusklassifikation diagnostiziert wurde. Im Patientenkollektiv I wurden sieben von insgesamt elf histopathologischen Proben als Typ IV klassifiziert. Zudem wurden zwei Proben als Typ I beschrieben. Bei einer Probe waren die Schnitte nicht repräsentativ und bei einer weiteren Patientin wurde keine Untersuchung durchgeführt. Betrachtet man das Patientenkollektiv II, so findet sich hier bei vier von sieben Proben ein Indifferenztyp (Typ IV). Darüber hinaus konnte jeweils einmal ein Abrieb-induzierter Typ (Typ I) sowie ein Infektionstyp (Typ II) beschrieben werden. Auch im Patientenkollektiv II findet sich ein Patient, bei dem keine histopathologische Beurteilung erfolgt war. Im Kontrollkollektiv wurden zwei Proben als Typ IV und eine als Typ I klassifiziert. Die restlichen zwei histopathologischen Schnitte der insgesamt fünf Patienten wiesen kein repräsentatives Gewebe auf, welches eine Typeneinteilung zugelassen hätte.

In der Konsensusklassifikation werden die Untersuchungen an insgesamt 268 gelockerten Knie- oder Hüftendoprothesen zugrunde gelegt. Der Abrieb-induzierte Typ (Typ I) wurde in

51%, der infektiöse Typ (Typ II) in 20%, der Mischtyp (Typ III) in 5% und der Indifferenztyp (Typ IV) in lediglich 18% gesehen [92].

Auffällig ist also das Vorherrschen des Indifferenztyps in allen drei Kollektiven dieser Studie. Morawietz und Kollegen hatten Proben untersucht, die zu 81% von gelockerten Hüftendoprothesen und nur zu 19% von gelockerten Knieprothesen stammen. Eine Adaptation der Klassifikation an die Knieendoprothetik sollte noch erfolgen.

In dem Patientenkollektiv, das von Willert und Kollegen untersucht wurde, wurde in jedem der 19 Präparate ein perivaskuläres lymphozytäres Infiltrat gesehen. Dieses Infiltrat wurde mit einer Typ-IV-Allergie assoziiert. Zu beachten gilt es jedoch, dass bei keinem der Patienten ein Epikutantest durchgeführt wurde [95].

Unbeantwortet ist, ob die eben erwähnten lymphozytären Infiltrate als Kontaktallergie auf die Metallionen oder als „generelle“ Antwort des menschlichen Immunsystems auf die Abriebpartikel zu verstehen sind. Weiterhin stellt sich die Frage, ob ein Fehlen von nodalen lymphozytären Infiltraten eine Implantatallergie vollends ausschließt.

In einer eben erst veröffentlichten Untersuchung stellten Hopf et al. in Zusammenarbeit mit V. Krenn den sogenannten „CD3-Score“ als Beurteilungshilfe für mögliche periimplantäre Überempfindlichkeitsreaktionen vor. In dieser Publikation wird die Diagnose „Implantatallergie“ wahrscheinlicher, wenn ein entsprechendes CD3<sup>+</sup>-lymphozytäres Infiltrat im histologischen Schnitt vorliegt [127].

### **5.3 Ausblick**

Unklar ist, ob eine kutane Metallallergie eine frühzeitige Endoprothesenlockerung hervorrufen kann. Beispielsweise berichtete Granchi 2008 darüber, dass Patienten nach einer Knieendoprothesenimplantation signifikant mehr positive Reaktionen im Epikutantest auf Metalle zeigen. Bei Knieendoprothesenträgern mit festen Implantaten war die Metallallergikerrate in etwa 2,5-mal und bei Patienten mit gelockerter Prothese gar dreimal so hoch wie in der Normalbevölkerung ohne endoprothetischem Gelenkersatz [128]. Eine Studie, die allerdings an Hüftendoprothesenträgern durchgeführt wurde, spiegelt wider, dass bei 104 Patienten mit gelockerter Prothese und bei 53 Patienten mit fest sitzender Prothese und entsprechender positiver Epikutantestung auf Metalle eine kürzere Implantatstandzeit registriert werden konnte [84]. Gänzlich ungeklärt bleibt der Umstand, ob eine Endoprothese, die vermehrt Abrieb generiert, eine Potenz besitzt, allergisierend zu wirken. Die Arbeitsgruppe

um Thyssen et al. konnte in ihrer Arbeit widerlegen, dass ein Metallimplantat die Allergierate auf Metalle generell erhöht [129]. Münch et al. konnten aber bei Gegenüberstellungen von dänischen Endoprothesen- und Kontaktallergieregister zeigen, dass Patienten mit multiplen Revisionsoperationen signifikant häufiger Kontaktallergien haben [130].

So sollte natürlich der Befundung die aktuellste Einteilung von Krenn zu Grunde gelegt werden, bei der die Arthrofibrose mehr im Fokus steht, als sie dies bisher getan hatte [131]. Die Arthrofibrose wurde in den histomorphologischen Befunden der vorliegenden Arbeit nicht ausführlich genug beleuchtet, möglicherweise wäre eine weitere Differenzierung der größtenteils vorkommenden Typ-IV-Membran im periprothetischen Gewebe, wie dies von Krenn und Perino beschrieben wurde, gelungen.

Die hier vorgelegte Arbeit hat Methoden und Beurteilungsschemata mit etabliert, die in spätere Untersuchungen der Münchner Implantatallergie-Arbeitsgruppe aufgenommen werden konnten. Insofern geben die hier beschriebenen Ergebnisse Ausgangspunkte für weiterführende Untersuchungen.

## 6. Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde hinterfragt, ob eine Metallallergie zu Komplikationen beziehungsweise zur Lockerung von Knieendoprothesen führen kann. Anhand der allergologischen Diagnostik (ECT und LTT) wurden drei Kollektive geschaffen: Patientenkollektiv I mit elf Patienten, die im ECT und/oder LTT eine Nickelallergie zeigten und wegen einer aseptisch gelockerten Knieendoprothese eine Wechseloperation erhielten. Patientenkollektiv II mit sieben Patienten, die eine septische Knieendoprothesenlockerung hatten und deswegen revidiert werden mussten. Das Kontrollkollektiv waren fünf Patienten mit ebenfalls zu revidierender aseptisch gelockerter Knieendoprothese ohne Metallallergie.

Bei allen Revisionsoperationen wurde periimplantäres Gewebe und gelenkfernes Fettgewebe als Referenzgewebe gewonnen. Zunächst erfolgte die histomorphologische Beurteilung der periimplantären Membran. Die Klassifizierung wurde gemäß der Konsensusklassifikation von Prof. Krenn vorgenommen. Mehrheitlich wurde in allen drei Kollektiven eine periimplantäre Membran vom Typ IV (Indifferenztyp) mit Fibrosierung gesehen. Ein Typ I (abriebinduzierter Typ) konnte insgesamt viermal, der Typ II (infektiöser Typ) nur einmal im Patientenkollektiv II nachgewiesen werden. Nodale, perivaskuläre T-lymphozytäre Infiltrate, die am ehesten auf eine Metallunverträglichkeit weisen, wurden in allen drei Kollektiven viermal beobachtet. Allerdings fanden sich oft „diskrete“, diffus verteilte T-Zellen.

Die Zytokinexpression im periimplantären Gewebe wurde für RPL13a, TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-17, TGF $\beta$ , OPG, RANKL, CCL2, CCL3, OPN und PTGS2 über RT-PCR untersucht. Nach Quantifizierung der mRNA-Sequenzen wurden die relativen Expressionsraten in den einzelnen Kollektiven verglichen, wobei sich nicht signifikante, heterogene Muster zeigten. Insgesamt wurden methodische Grundlagen für weiterführende Studien geschaffen. Beobachtete Tendenzen, wie schütterere T-Zellinfiltrate auch bei Typ-IV-Membran oder unterschiedliche IFN $\gamma$ /TNF $\alpha$ /OPN-Expression, bedürfen größerer Anschluss-Studien.

## 7. Anhang

### 7.1 Auswahl von relevanten Zytokinen bei Materialunverträglichkeit

Zytokin	Produzent	Funktion bei Unverträglichkeit
TNF $\alpha$	Makrophagen, Monozyten, T-Zellen, NK-Zellen, Keratinozyten	proinflammatorisches Zytokin, Aktivierung von T- und NK-Zellen, Migration und Reifung von Antigen präsentierenden Zellen
IFN $\gamma$	Th1-Zellen, Tc1-Zellen	proinflammatorisches Zytokin, Differenzierung naiver T-Zellen zu Typ1-Zellen, Makrophagenaktivierung
IL-1 $\beta$	Makrophagen, Monozyten, T-Zellen und antigenpräsentierende Zellen	Synthese von Akute-Phase-Proteinen, u.a. Migration und Reifung von Antigen präsentierenden Zellen und Induktion der TNF $\alpha$ -Produktion von Keratinozyten
IL-2	Th1-Zellen, Tc1-Zellen, NK-Zellen	Steigerung der Zytotoxizität der CD8+ Zellen und NK-Zellen, Proliferation der T-Zellen
IL-6	Monozyten, Makrophagen, Th2-Zellen	Inflammatorisches Zytokin, steigert u.a. Synthese der Akute-Phase-Proteine und T-Zell-Proliferation im Lymphknoten, notwendig zur Differenzierung von Typ17-Zellen
IL-8	Endothelzellen, Monozyten, Epithelzellen, Fibroblasten	T-Zell-Chemotaxis, induziert von TNF $\alpha$
IL-10	Th2-Zellen, Treg	Immunsuppressiver Effekt durch Verminderung der T-Zell- und Makrophagenfunktion
IL-17	Th17, Tc17, Makrophagen, Monozyten, NK-Zellen	Co-Stimulation für T-Zellen, Induktion von Zytokinproduktion verschiedener Zellreihen (u.a. Fibroblasten, Endothel und Makrophagen)
TGF $\beta$	T-Zellen, Makrophagen, Monozyten	Immunregulation, Verminderung der IL-1-Rezeptor-Expression, Suppression von T-Zellen und Makrophagen
OPG	Lunge, Herz, Niere	löslicher Rezeptor, bindet RANKL, Reduktion der Osteoklastenmaturation
RANKL	Osteoblasten	Förderung der Osteoklastenreifung, Aufrechterhaltung des Gleichgewichts zwischen Knochenauf- und abbau
CCL2	Monozyten, dendritische Zellen, Th1-Zellen	Anlocken von Monozyten und basophilen wie eosinophilen Granulozyten, Osteoklastendifferenzierung
CCL3	Monozyten und Lymphozyten	lockt Makrophagen, neutrophile Granulozyten und Monozyten an
OPN	Osteoblasten, Osteozyten	Erhaltung der Knochensubstanz
PTGS2	Makrophagen und proliferierendes Endothel	Bildung von Prostaglandin H $_2$ , Entzündungssymptome

**Tabelle 7-1 Relevante Zytokine bei Metallunverträglichkeit**

## 7.2 Patientenfragebogen

### Fragebogen zu Metallverträglichkeit

(Prof. Dr. med. P. Thomas, Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München)

.....

Datum:.....

(Name, Vorname)

.....

Geschlecht: m w

(Geburtsdatum)

Bitte zutreffende Antworten ankreuzen bzw. ergänzen.

#### 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:  
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  
Zahnfleischentzündung    Zahnfleischverdickung  
Sonstiges .....

### 5. Allergische Erkrankungen

- Sind folgende Erkrankungen bei Ihnen aufgetreten?
- |                      |      |    |
|----------------------|------|----|
| <u>Heuschnupfen</u>  | Nein | Ja |
| <u>Asthma</u>        | Nein | Ja |
| <u>Neurodermitis</u> | Nein | Ja |
- Hautausschlag, durch
- |                                    |      |     |
|------------------------------------|------|-----|
| ▪ Metallkontakt an der <u>Haut</u> | 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 ECT-Ableseprotokolle

<b>Name</b>	
<b>Vorname</b>	
<b>Geburtsdatum</b>	
<b>Telefon</b>	
<b>Untersuchungsort</b>	
<b>Aufklebedatum</b>	

**Anmerkungen bzw. Kommentare:**

TRUE TEST™ Epikutan

Ablesung nach

Po	Substanz	48 h	72 h	144 h
1	Nickel sulphate			
2	Wool alcohols			
3	Neomycin sulphate			
4	Potassium dichromate			
5	Caine mix			
6	Fragrance mix			
7	Colophony			
8	Epoxy resin			
9	Quinoline mix			
10	Balsam of Peru			
11	Ethylenediamine dihydrochloride			
12	Cobalt chloride			
13	p-tert-Butylphenol formaldehyde resin			
14	Paraben mix			
15	Carba mix			
16	Black rubber mix			
17	Cl <sup>+</sup> Me <sup>-</sup> Isothiazolinone (Kathon CG)			
18	Quaternium-15			
19	Mercaptobenzothiazole			
20	p-Phenylenediamine			
21	Formaldehyde			
22	Mercapto mix			
23	Thiomersal			
24	Thiuram mix			
	<i>Handzeichen ablesender Arzt</i>			

**Knochenzementkomponenten Epikutan**

Ablesung nach

Po	Substanz	Konzentration	48 h	72 h	144 h
1	<b>2-Hydroxyethylmethacrylat (HEMA)</b>	1,0 %			
2	<b>Kupfer (II)-sulfat 5*H2O</b>	1,0 %			
3	<b>Benzoylperoxid</b>	1,0 %			
4	<b>Gentamicinsulfat</b>	20 %			
5	<b>Hydrochinon</b>	1,0 %			
6	<b>N,N-Dimethyl-p-toluidin</b>	2,0 %			
7	<b>Methylmethacrylat</b>	2,0 %			
	<i>Handzeichen ablesender Arzt</i>				

## 7.4 Methoden zur histologischen Färbung

	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	Hämatoxin n. Harris	10 Min
12	H <sub>2</sub> O	4 Min
13	HCL-Alkohol	1 sec
14	H <sub>2</sub> O	5 Min
15	Bläuen-Reagenz (Shandon)	1 Min
16	H <sub>2</sub> 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 7-2 HE-Färbeprotokoll nach Standard des Dermatohistologischen Labors der Dermatologischen Klinik der LMU-München

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, Vorbehandlung der Schnitte mit Protease Typ IVXX, 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

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

## 7.5 Verbrauchsmaterialien zur Zytokinanalyse

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

**Tabelle 7-4 Geräte**

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

**Tabelle 7-5 Materialien zur RNA-Isolierung**

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

**Tabelle 7-6 Sonstige Verbrauchsmaterialien und Reagenzien**

Nr	Gen	Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	Länge [bp]	Tm [°C]	Produktlänge [bp]
10	TNFa 151	TNFar	tct tct cga acc ccg agt ga	20	59,4	151
		TNFal	cct ctg atg gca cca cca g	19	61	
28	IL10 176	IL10 176F	tca agg cgc atg tga act cc	20	59,4	176
		IL10 176R	gat gtc aaa ctc act cat ggc t	22	58,4	
29	TGFbeta 1	TGFb1F	caa gca gag tac aca cag cat	21	57,9	129
		TGFb1R	tgc tcc act ttt aac ttg agc c	22	58,4	
37	IL2	IL2F	aac tca cca gga tgc tca cat tta	24	59,3	148
		IL2R	tcc ctg ggt ctt aag tga aag ttt	24	59,3	
40	IFNg 71	IFNgF	cag gtc att cag atg tag cgg at	23	58,2	71
		IFNgR	act ctc ctc ttt cca att ctt caa aa	26	58,6	
56	IL8	IL8F	tgc caa gga gtg cta aag	18	53,7	197
		IL8R	ctc cac aac cct ctg cac	18	58,2	
57	IL6	IL6F	tct cca caa gcg cct tcg	18	58,2	193
		IL6R	ctc agg gct gag atg ccg	18	60,5	
60	RANKL	RANKLF	cgt tgg atc aca gca cat cag	21	59,8	73
		RANKLR	gct cct ctt ggc cag atc taa c	22	62,1	
67	PTGS2	PTGS2F	gga aca caa cag agt atg cg	20	57,3	250
		PTGS2R	aag ggg atg cca gtg ata ga	20	57,3	
68	IL17	IL1784F	tgg gaa gac ctc att ggt gt	20	57,3	84
		IL1784R	gga ttt cgt ggg att gtg at	20	55,3	
75	IL1B	IL1BF	tcc cca gcc ctt ttg ttg a	19	56,7	91
		IL1BR	tta gaa cca aat gtg gcc gtg	21	57,9	
76	RPL13A	RPL13AF	cct gga gga gaa gag gaa aga ga	23	62,4	126
		RPL13AR	ttg agg acc tct gtg tat ttg tca a	25	59,7	
80	OPG	OPGF	gaa ggg cgc tac ctt gag at	20	59,4	102
		OPGR	gca aac tgt att tcg ctc tgg	21	57,9	
81	OPN	OPNF	gct tgg ttg tca gca gca	18	56	127
		OPNR	tgc aat tct cat ggt agt gag ttt	24	57,6	
83	CCL2	CCL2F	gat ctc agt gca gag gct cg	20	61,4	153
		CCL2R	tgc ttg tcc agg tgg tcc at	20	59,4	
84	CCL3	CCL3F	cgg tgt cat ctt cct aac ca	20	57,3	76
		CCL3R	gac ata ttt ctg gac cca ctc	21	57,9	

Tabelle 7-7 PCR-Primerliste

## **8. Danksagung**

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

Ein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. P. Thomas für die Bereitstellung des Themas und die außergewöhnlich gute Betreuung.

Speziell bei Herrn Dr. rer. hum. biol. B. Summer möchte ich mich für die eingehende Betreuung im Labor der Implantatallergie-Arbeitsgruppe bedanken.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson, Direktor der Orthopädischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität zu München, und Herrn Dr. med. P. Gruner, ehemaliger Chefarzt der Orthopädie an der Chirurgischen Klinik Dr. Rinecker, bedanke ich mich besonders für die Patientenakquise in der jeweiligen Klinik und die Probenentnahme hinsichtlich der periimplantären Membran während der Revisionsoperationen.

Außerdem gilt meiner Verlobten, Laura Andrei, und meiner Familie für den stetigen Rückhalt und die andauernde Motivation ein herzliches Dankeschön.



## 9. Literaturverzeichnis

1. A, G., et al., *Endoprothesenregister Deutschland: Jahresbericht 2015*. 2015.
2. G, G. and R. M, *Taschenatlas Allergologie*. 2008, Thieme. p. 28-88.
3. P, F., *Dermatologie, Venerologie, Grundlagen, Klinik, Atlas Vol. 2nd*. 2004, Berlin: Springer.
4. O, B.-F., et al., *Dermatologie und Venerologie*. Vol. 5th. 2005, Berlin Heidelberg: Springer.
5. Renz, H., et al., [*In vitro allergy diagnosis. Guideline of the German Society of Asthma and Immunology in conjunction with the German Society of Dermatology*]. *J Dtsch Dermatol Ges*, 2006. **4**(1): p. 72-85.
6. Stander, S., et al., *Evaluation of lymphocyte transformation tests as compared with patch tests in nickel allergy diagnosis*. *Contact Dermatitis*, 2017. **76**(4): p. 228-234.
7. 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.
8. 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.
9. 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.
10. Zhang, Y. and D.E. Wilcox, *Thermodynamic and spectroscopic study of Cu(II) and Ni(II) binding to bovine serum albumin*. *J Biol Inorg Chem*, 2002. **7**(3): p. 327-37.
11. Pichler, W.J., et al., *Pharmacological interaction of drugs with immune receptors: the p-i concept*. *Allergol Int*, 2006. **55**(1): p. 17-25.
12. Vocanson, M., et al., *Effector and regulatory mechanisms in allergic contact dermatitis*. *Allergy*, 2009. **64**(12): p. 1699-714.
13. Villadangos, J.A., *Hold on, the monocytes are coming!* *Immunity*, 2007. **26**(4): p. 390-2.
14. 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.
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. Bursch, L.S., et al., *Identification of a novel population of Langerin+ dendritic cells*. *J Exp Med*, 2007. **204**(13): p. 3147-56.
17. 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.
18. Wang, L., et al., *Langerin expressing cells promote skin immune responses under defined conditions*. *J Immunol*, 2008. **180**(7): p. 4722-7.
19. 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.
20. 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.
21. 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.
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. 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.
24. 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.
25. 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.
26. 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.

27. Bettelli, E., et al., *Induction and effector functions of T(H)17 cells*. Nature, 2008. **453**(7198): p. 1051-7.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. 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.
32. 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.
33. Cavani, A., et al., *Effector and regulatory T cells in allergic contact dermatitis*. Trends Immunol, 2001. **22**(3): p. 118-20.
34. 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 (TNCl)-induced murine contact hypersensitivity reactions*. J Dermatol, 2002. **29**(11): p. 699-708.
35. 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.
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. 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.
38. 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.
39. 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.
40. 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.
41. 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.
42. 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.
43. 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.
44. 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.
45. 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.
46. 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.
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. Geier, J., et al., [*Allergy diagnostics in suspected implant intolerance: practical approach. A position paper of the German Contact Dermatitis Research Group (DKG)*]. *Hautarzt*, 2008. **59**(7): p. 594-7.
49. Barceloux, D.G., *Nickel*. *J Toxicol Clin Toxicol*, 1999. **37**(2): p. 239-58.
50. Merritt, K. and S.A. Brown, *Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions*. *Clin Orthop Relat Res*, 1996(329 Suppl): p. S233-43.
51. Nowak, D., *Arbeitsmedizin*. 2006: Elsevier.
52. Uter, W., et al., *The prevalence of contact allergy differed between population-based and clinic-based data*. *J Clin Epidemiol*, 2004. **57**(6): p. 627-32.
53. Schafer, T., et al., [*Allergies in adults*]. *Gesundheitswesen*, 2005. **67 Suppl 1**: p. S187-92.
54. Schafer, T., et al., *Epidemiology of contact allergy in adults*. *Allergy*, 2001. **56**(12): p. 1192-6.
55. Oppel, T. and A. Schnuch, [*The most frequent allergens in allergic contact dermatitis*]. *Dtsch Med Wochenschr*, 2006. **131**(28-29): p. 1584-9.
56. Liden, C. and K. Norberg, *Nickel on the Swedish market. Follow-up after implementation of the Nickel Directive*. *Contact Dermatitis*, 2005. **52**(1): p. 29-35.
57. Barceloux, D.G., *Chromium*. *J Toxicol Clin Toxicol*, 1999. **37**(2): p. 173-94.
58. Niki, Y., et al., *Screening for symptomatic metal sensitivity: a prospective study of 92 patients undergoing total knee arthroplasty*. *Biomaterials*, 2005. **26**(9): p. 1019-26.
59. Barceloux, D.G., *Cobalt*. *J Toxicol Clin Toxicol*, 1999. **37**(2): p. 201-6.
60. *Pschyrembel*. 2002, Berlin New York: DeGruyter.
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. Cobb, A.G. and T.P. Schmalzreid, *The clinical significance of metal ion release from cobalt-chromium metal-on-metal hip joint arthroplasty*. *Proc Inst Mech Eng H*, 2006. **220**(2): p. 385-98.
63. Looney, R.J., et al., *Periprosthetic osteolysis: an immunologist's update*. *Curr Opin Rheumatol*, 2006. **18**(1): p. 80-7.
64. Thomas, P., et al., [*Orthopedic surgical implants and allergies. Joint statement by the Implant Allergy Working Group (AK 20) of the DGOOC (German Association of Orthopedics and Orthopedic Surgery), DKG (German Contact Dermatitis Research Group) and DGAKI (German Society for Allergology and Clinical Immunology)*]. *Hautarzt*, 2008. **59**(3): p. 220-9.
65. Teeny, S.M., et al., *Long-term follow-up care recommendations after total hip and knee arthroplasty: results of the American Association of Hip and Knee Surgeons' member survey*. *J Arthroplasty*, 2003. **18**(8): p. 954-62.
66. Bader, R., W. Mittelmeier, and E. Steinhauser, [*Failure analysis of total knee replacement. Basics and methodological aspects of the damage analysis*]. *Orthopade*, 2006. **35**(9): p. 896, 898-900, 902-3.
67. Malchau, H., et al., *Presidential guest address: the Swedish Hip Registry: increasing the sensitivity by patient outcome data*. *Clin Orthop Relat Res*, 2005. **441**: p. 19-29.
68. Drees, P., et al., *Mechanisms of disease: Molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants*. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 2007. **3**(3): p. 165-71.
69. Holzwarth, U., et al., [*Metallurgical differentiation of cobalt-chromium alloys for implants*]. *Orthopade*, 2005. **34**(10): p. 1046-7, 1049-51.
70. Schuh, A., et al., [*Allergic potential of titanium implants*]. *Orthopade*, 2005. **34**(4): p. 327-8, 330-3.
71. Okazaki, Y., et al., *Comparison of metal concentrations in rat tibia tissues with various metallic implants*. *Biomaterials*, 2004. **25**(28): p. 5913-20.
72. Bhamra, M.S. and C.P. Case, *Biological effects of metal-on-metal hip replacements*. *Proc Inst Mech Eng H*, 2006. **220**(2): p. 379-84.

73. Pandit, H., et al., *Necrotic granulomatous pseudotumours in bilateral resurfacing hip arthroplasties: evidence for a type IV immune response*. Virchows Arch, 2008. **453**(5): p. 529-34.
74. Pandit, H., et al., *Pseudotumours associated with metal-on-metal hip resurfacings*. J Bone Joint Surg Br, 2008. **90**(7): p. 847-51.
75. Delaunay, C., et al., *Metal-on-metal bearings total hip arthroplasty: the cobalt and chromium ions release concern*. Orthop Traumatol Surg Res, 2010. **96**(8): p. 894-904.
76. Sharkey, P.F., et al., *Insall Award paper. Why are total knee arthroplasties failing today?* Clin Orthop Relat Res, 2002(404): p. 7-13.
77. L, L., *Annual report 2002 - The Swedish Knee Arthroplasty Register*. Swedish Knee Arthroplasty Register, 2002.
78. H, M., et al., *Prognosis of total hip replacement*. 67th Annual Meeting of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2000.
79. Imai, S., et al., *High levels of expression of collagenase-3 (MMP-13) in pathological conditions associated with a foreign-body reaction*. J Bone Joint Surg Br, 1998. **80**(4): p. 701-10.
80. 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.
81. Toms, A.P., et al., *Early failure of a Birmingham resurfacing hip replacement with lymphoreticular spread of metal debris: pre-operative diagnosis with MR*. Br J Radiol, 2009. **82**(977): p. e87-91.
82. Baur, W., et al., *[Pathological findings in tissue surrounding revised metal/metal articulations]*. Orthopade, 2005. **34**(3): p. 225-6, 228-33.
83. 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.
84. Granchi, D., et al., *Sensitivity to implant materials in patients undergoing total hip replacement*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2006. **77**(2): p. 257-64.
85. Hallab, N.J., et al., *Immune responses correlate with serum-metal in metal-on-metal hip arthroplasty*. J Arthroplasty, 2004. **19**(8 Suppl 3): p. 88-93.
86. Hallab, N.J., et al., *Lymphocyte responses in patients with total hip arthroplasty*. J Orthop Res, 2005. **23**(2): p. 384-91.
87. Hallab, N.J., et al., *Orthopaedic implant related metal toxicity in terms of human lymphocyte reactivity to metal-protein complexes produced from cobalt-base and titanium-base implant alloy degradation*. Mol Cell Biochem, 2001. **222**(1-2): p. 127-36.
88. Nasser, S., *Orthopedic metal immune hypersensitivity*. Orthopedics, 2007. **30**(8 Suppl): p. 89-91.
89. Gawkrödger, D.J., *Metal sensitivities and orthopaedic implants revisited: the potential for metal allergy with the new metal-on-metal joint prostheses*. Br J Dermatol, 2003. **148**(6): p. 1089-93.
90. Carlsson, A. and H. Moller, *Implantation of orthopaedic devices in patients with metal allergy*. Acta Derm Venereol, 1989. **69**(1): p. 62-6.
91. Krenn, V., et al., *[Histopathologic diagnostics in endoprosthetics: periprosthetic neosynovialitis, hypersensitivity reaction, and arthrofibrosis]*. Orthopade, 2009. **38**(6): p. 520-30.
92. Morawietz, L., et al., *Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane*. J Clin Pathol, 2006. **59**(6): p. 591-7.
93. Leitlinien der Deutschen Dermatologischen, G., et al., *[Performing patch testing with contact allergens]*. J Dtsch Dermatol Ges, 2008. **6**(9): p. 770-5.
94. Krenn, V. and J. Kriegsmann, *Rheumapathologie/Gelenkpathologie und Infektionsdiagnostik*. Vol. 169. 2008, Bonn: Lehrserie IAP.
95. 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.
96. 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.

97. Bader, R., et al., *[Alternative materials and solutions in total knee arthroplasty for patients with metal allergy]*. Orthopade, 2008. **37**(2): p. 136-42.
98. Thomsen, M., M. Rozak, and P. Thomas, *Pain in a chromium-allergic patient with total knee arthroplasty: disappearance of symptoms after revision with a special surface-coated TKA--a case report*. Acta Orthop, 2011. **82**(3): p. 386-8.
99. Thomas, B., et al., *High frequency of contact allergy to implant and bone cement components, in particular gentamicin, in cemented arthroplasty with complications: usefulness of late patch test reading*. Contact Dermatitis, 2015. **73**(6): p. 343-9.
100. Stea, S., et al., *Cytokines and osteolysis around total hip prostheses*. Cytokine, 2000. **12**(10): p. 1575-9.
101. 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.
102. 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.
103. 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.
104. 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.
105. Loria, M.P., et al., *Role of cytokines in gonarthrosis and knee prosthesis aseptic loosening*. J Orthop Sci, 2004. **9**(3): p. 274-9.
106. Purdue, P.E., et al., *The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis*. HSS J, 2006. **2**(2): p. 102-13.
107. Hehlgans, T. and K. Pfeffer, *The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games*. Immunology, 2005. **115**(1): p. 1-20.
108. 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.
109. 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.
110. Jones, S.A., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6*. J Immunol, 2005. **175**(6): p. 3463-8.
111. Johnson, A.J., et al., *Minimizing dynamic knee spacer complications in infected revision arthroplasty*. Clin Orthop Relat Res, 2012. **470**(1): p. 220-7.
112. Vasso, M. and A. Schiavone Panni, *Low-grade periprosthetic knee infection: diagnosis and management*. J Orthop Traumatol, 2015. **16**(1): p. 1-7.
113. Gober, M.D. and A.A. Gaspari, *Allergic contact dermatitis*. Curr Dir Autoimmun, 2008. **10**: p. 1-26.
114. Cadosch, D., et al., *Metal is not inert: role of metal ions released by biocorrosion in aseptic loosening--current concepts*. J Biomed Mater Res A, 2009. **91**(4): p. 1252-62.
115. Hallab, N.J. and J.J. Jacobs, *Chemokines Associated with Pathologic Responses to Orthopedic Implant Debris*. Front Endocrinol (Lausanne), 2017. **8**: p. 5.
116. Ettinger, M., et al., *Circulating biomarkers for discrimination between aseptic joint failure, low-grade infection, and high-grade septic failure*. Clin Infect Dis, 2015. **61**(3): p. 332-41.
117. Boyce, B.F. and L. Xing, *Functions of RANKL/RANK/OPG in bone modeling and remodeling*. Arch Biochem Biophys, 2008. **473**(2): p. 139-46.
118. Wright, H.L., et al., *RANK, RANKL and osteoprotegerin in bone biology and disease*. Curr Rev Musculoskelet Med, 2009. **2**(1): p. 56-64.

119. Hofbauer, L.C. and M. Schoppet, *Clinical implications of the osteoprotegerin/RANKL/RANK system for bone and vascular diseases*. JAMA, 2004. **292**(4): p. 490-5.
120. Dasa, V., et al., *Is monocyte chemotactic protein 1 elevated in aseptic loosening of TKA? A pilot study*. Clin Orthop Relat Res, 2012. **470**(7): p. 1879-84.
121. Kim, M.S., et al., *MCP-1-induced human osteoclast-like cells are tartrate-resistant acid phosphatase, NFATc1, and calcitonin receptor-positive but require receptor activator of NFkappaB ligand for bone resorption*. J Biol Chem, 2006. **281**(2): p. 1274-85.
122. Huang, Z., et al., *Effects of orthopedic polymer particles on chemotaxis of macrophages and mesenchymal stem cells*. J Biomed Mater Res A, 2010. **94**(4): p. 1264-9.
123. Cantor, H. and M.L. Shinohara, *Regulation of T-helper-cell lineage development by osteopontin: the inside story*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(2): p. 137-41.
124. Shinohara, M.L., et al., *Osteopontin expression is essential for interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells*. Nat Immunol, 2006. **7**(5): p. 498-506.
125. Witzleb, W.C., et al., *Neo-capsule tissue reactions in metal-on-metal hip arthroplasty*. Acta Orthop, 2007. **78**(2): p. 211-20.
126. 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 Res Int, 2015. **2015**: p. 910156.
127. Hopf, F., et al., *CD3+ lymphocytosis in the peri-implant membrane of 222 loosened joint endoprostheses depends on the tribological pairing*. Acta Orthop, 2017. **88**(6): p. 642-648.
128. Granchi, D., et al., *Sensitivity to implant materials in patients with total knee arthroplasties*. Biomaterials, 2008. **29**(10): p. 1494-500.
129. Thyssen, J.P., et al., *The association between metal allergy, total hip arthroplasty, and revision*. Acta Orthop, 2009. **80**(6): p. 646-52.
130. Munch, H.J., et al., *The association between metal allergy, total knee arthroplasty, and revision: study based on the Danish Knee Arthroplasty Register*. Acta Orthop, 2015. **86**(3): p. 378-83.
131. Krenn, V., et al., *Revised histopathological consensus classification of joint implant related pathology*. Pathol Res Pract, 2014. **210**(12): p. 779-86.
132. von der Helm, C., *Charakteristika von Allergiediagnostik und histologisch-molekularer Analyse des periimplantären Gewebes bei Patienten mit Knieprothesenunverträglichkeit*, 2015.

## Eidesstattliche Versicherung

Schopf, Christoph

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Knieendoprothetik und Metallunverträglichkeit: Bewertung anhand von klinischen Parametern, Allergietestung und molekularbiologischer Analyse von periimplantärem Gewebe**

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.

München, 30.06.2019

Ort, Datum

Christoph Schopf

Unterschrift Doktorandin/Doktorand