

**Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie,
physikalische Medizin und Rehabilitation**
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

Biologische Aktivität von Metallpartikeln und - Ionen in vivo



Vorgelegt von

Dr. med. Alexander C. Paulus

München, Februar 2020

**Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie,
physikalische Medizin und Rehabilitation**
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson

Biologische Aktivität von Metallpartikeln und - Ionen in vivo

Habilitationsschrift zum Erwerb der Venia Legendi
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorgelegt von
Dr. med. Alexander C. Paulus
München, Februar 2020

1. Einleitung	5
1.1 Einführung zum Thema und Fragestellung	5
1.2 Geschichte der Hüftendoprothetik	12
1.3 Gleitpaarungen in der Hüftendoprothetik	14
1.3.1 Polyethylen – Metall	16
1.3.2 Keramik – Keramik und Keramik – Polyethylen	16
1.3.3 Metall – Metall	17
1.4 Besonderheiten des Metallabriebs	19
1.4.1 Metallionen	20
1.4.2 Metallpartikel	21
2. Material und Methoden	23
2.1 Generierung von Abriebpartikeln	23
2.1.1 Metallpartikelanalyse	24
2.1.2 Polyethylenpartikelanalyse	24
2.2 Generierung von Metallionen	25
2.3 Vorbereitung der Polyethylen Abriebpartikel für die <i>in vivo</i> Untersuchungen	25
2.4 Tierversuche	26
2.4.1 Versuchstiere	27
2.4.2 Versuchsaufbau	28
2.5 Histologische Analyse	31
2.5.2 Histologische Analyse der Kniegelenke	32
2.6 Immunhistochemie	33
2.6.1 Immunhistochemische Färbung der Kniegelenke	33
2.6.2 Histologische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate	36
2.6.2 Immunhistochemische Analyse der Organe	36
2.7 Statistik	36

2.7.1 Statistische Auswertung Intravitalmikroskopie und Histologie	36
2.7.2 Statistische Auswertung Immunhistochemie	37
3. Ergebnisse	38
3.1 Partikelanalyse	38
3.1.1 Partikelanalyse der Metallpartikel	38
3.1.2 Partikelanalyse der Polyethylenpartikel	39
3.2 Tierversuche	40
3.2.1 Kniegelenksdurchmesser	40
3.2.2 Intravitalmikroskopie	41
3.3 Histologische Analysen	44
3.3.1 Histologische Auswertung der murinen Kniegelenke	44
3.4 Immunhistochemische Analysen	47
3.4.1 Immunhistochemische Analyse des linken Kniegelenks	48
3.4.2 Immunhistochemische Analyse des rechten Kniegelenks	53
3.4.3 Immunhistochemische Organanalysen	57
4. Diskussion	63
5. Zusammenfassung	84
7. Abbildungsverzeichnis	107
8. Anhang	111
Materialliste	111
9. Danksagung	115

1. Einleitung

1.1 Einführung zum Thema und Fragestellung

Die endoprothetische Versorgung des Hüftgelenks bei degenerativen Erkrankungen wurde als „Operation des Jahrhunderts“ betitelt (130) - und das nicht zu unrecht. Bei steigender Lebenserwartung und höherem Mobilitätsanspruch im Alter vor allem in den Industrieländern stand und steht die Orthopädie in diesen Regionen vor einer großen Herausforderung (13, 42). Der häufigste Grund zur Implantation einer Endoprothese stellt eine primäre Arthrose dar (39). Weitere Gründe, welche zur Ausbildung einer sekundären Arthrose führen können sind gelenknahe Frakturen, chronisch-entzündlich rheumatische Erkrankungen, Fehlstellungen sowie pathologische Veränderungen des Knochens im Sinne einer Erkrankung des Knochenmetabolismus wie der Osteoporose oder Tumorerkrankungen mit Metastasierung in die Knochen (39).

Die erfolgreiche Endstrecke in der Behandlung der Arthrose: Der künstliche Gelenkersatz führt zu einer Schmerzreduktion, Verbesserung der Mobilität und einer höheren Lebensqualität. Im Optimalfall wird durch den operativen Eingriff eine vollständige schmerzfreie Selbstständigkeit mit der Möglichkeit einer ggf. sogar sportlichen Belastbarkeit erreicht (130, 172). Unter diesen Umständen kam es global und insbesondere in Deutschland zu steigenden Implantationszahlen im Bereich der Endoprothetik, siehe Abbildung 1 (5, 13).

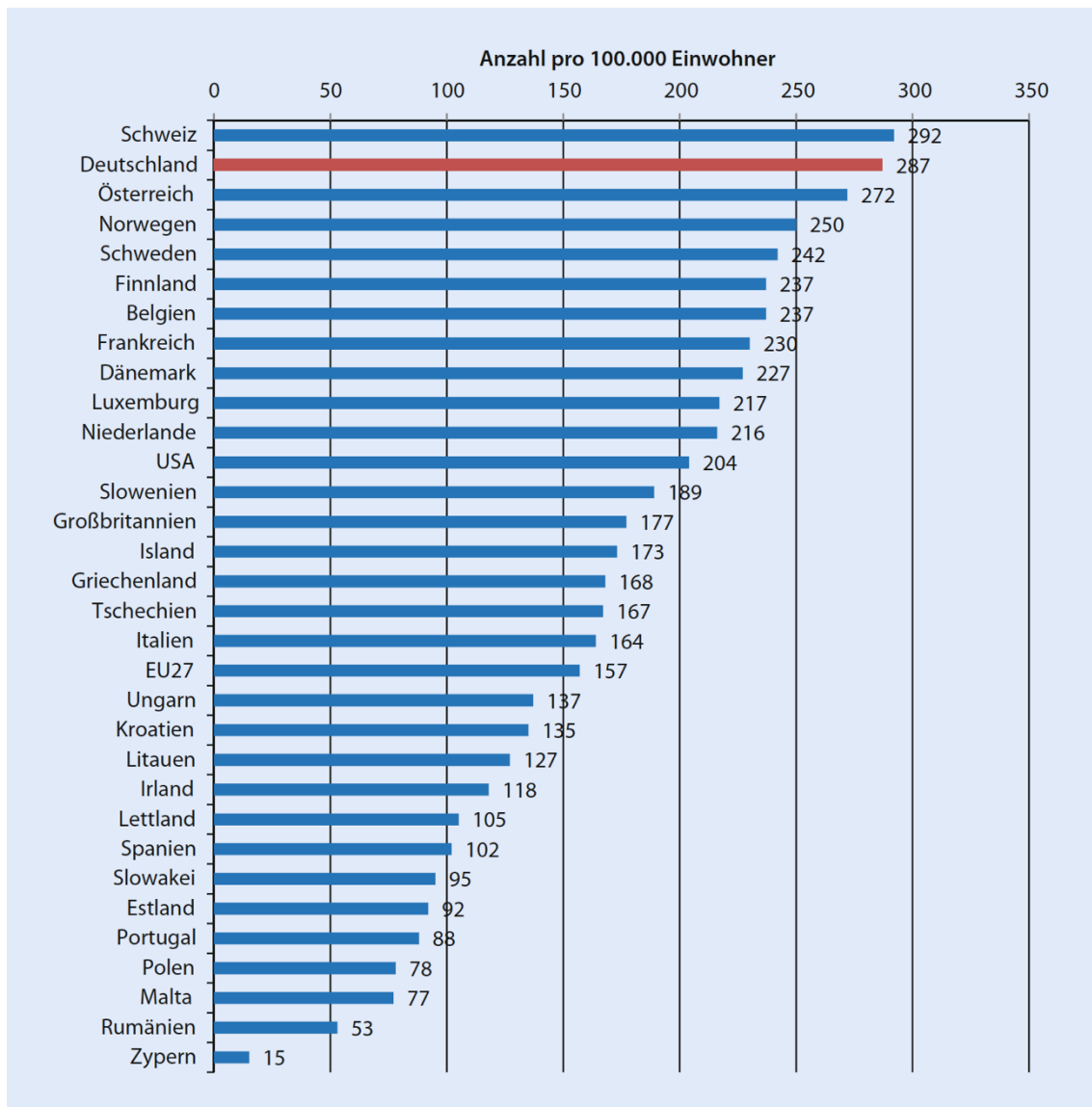


Abbildung 1: Inanspruchnahme Hüftgelenkersatz pro 100.000 Einwohner in den OECD-Ländern und den USA, 2012 oder aktuellste Daten; Quelle: Weißbuch EPRD, IGES – OECD 2014 (13)

Zahlreiche Fortschritte in der Endoprothetik hinsichtlich operativen Zugangswegen, fachlicher Weiterbildung der Operateure und technischen Weiterentwicklungen bei den genutzten Implantaten ebneten schließlich den Weg zum Erfolg dieser Operation. Aufgrund der hohen Patientenzufriedenheit endoprothetischen Gelenkersatz titelte Learmonth 2007 dann wie eingangs erwähnt: „The operation of the century: total hip replacement“ (130). Doch mit steigenden Implantationszahlen kommt es bedauerlicherweise auch zunehmend zu operativen Revisionseingriffen, welche wiederum die Patienten, das Gesundheitssystem und die Operateure vor neue Herausforderungen stellen (5, 13, 78). Es steigt die Anzahl der Primärimplantationen und mit Erreichen von gewissen Standzeiten steigt auch die Ausfallwahrscheinlichkeit der Implantate im Sinne einer Langzeitkomplikation, welche eine

Revisionsoperation erforderlich machen (Abbildung 2, (5)). Grund hierfür ist eine periprotetische Lockerungsreaktion.

Die aseptische Prothesenlockerung ist eine der Hauptprobleme der Endoprothetik und endet regelhaft in einer operativen Revisionsoperation. Die aseptische Hüftendoprothesenlockerung wird in über 40% durch eine Gewebereaktion auf Abriebpartikel ("wear disease") verursacht (88, 184). Die verwendeten Materialien nach der Implantation einer Totalendoprothese in ein Gelenk unterliegen dem Verschleiß, so dass es zur Bildung und Ablagerung von Abriebpartikeln kommt. Abriebpartikel entstehen meist in der Gleitfläche Prothesenkopf-Pfanne, aber auch in der Grenzfläche Implantat-Knochen bzw. Implantat-Knochenzement (79, 235). Eine im Detail noch unklare akut oder chronisch entzündliche Reaktion im periprotetischen Gewebe, die sich gegen entstandene Abriebpartikel der verwendeten Prothesenmaterialien richtet, wird als einer der Hauptfaktoren der aseptischen Prothesenlockerung angesehen (88, 117, 184, 235, 240, 242). *In vitro* wurden in Abhängigkeit von Größe, Morphologie und Zusammensetzung der Partikel unterschiedliche Wirkungen gezeigt (74, 149-151, 174). Letztendlich kommt es zur Bildung einer synoviaartigen Pseudomembran und die Prothese wird locker (2).

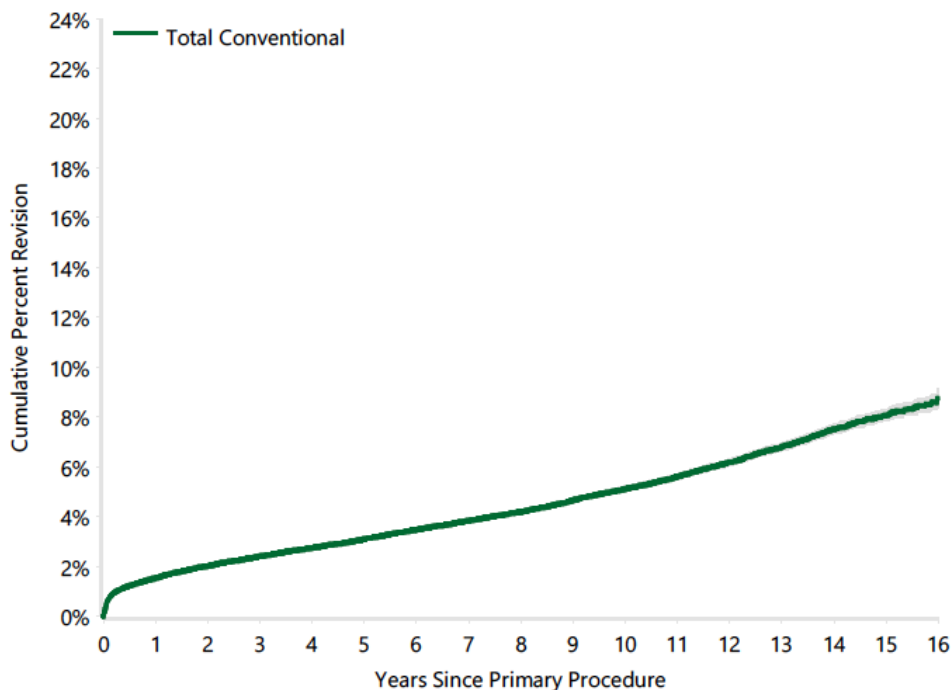


Abbildung 2: Kumulative Revisionsrate in % entsprechend der Standzeit einer Hüftprothese in Jahren; Quelle: AOA, Annual Report 2018 (5)

Weitere wesentliche Revisionsgründe sind im Einzelnen entsprechend Abbildung 3:

- Periprothetische Infektion
- Luxation
- Periprothetische Fraktur
- Implantatverschleiß
- Implantatversagen

	Anteil (%)	Alter	m/w (%)
Infektion	17,9	74	53/47
Lockerung	38,2	75	42/58
Pfanne	20,7	75	36/64
Schaft	12,8	74	50/50
Pfanne und Schaft	4,7	77	45/55
Osteolyse bei festem Implantat	0,9	73	45/55
Pfanne	0,4	74	40/60
Schaft	0,3	72,5	53/47
Pfanne und Schaft	0,2	70	45/55
Periprothetische Fraktur	10,7	79	31/69
Luxation	10,9	76	38/62
Implantatverschleiß	7,5	74	42/58
Versagen einer Implantatkomponente	1,9	72	47/53
Implantatfehlage (Dislokation)	1,7	73	32/68
Progression der Arthrose	0,2	75	33/67
Zustand nach Prothesenentfernung	1,9	72	49/51
Andere Gründe	8,3	73	42/58

Abbildung 3: Gründe für Revisionsoperationen in der Hüftendoprothetik entsprechend der EPRD Auswertung 2016 (78)

Insgesamt stellt die aseptische Prothesenlockerung jedoch den Hauptrevisionsgrund in der Endoprothetik dar (5, 11, 13, 30, 78). Obwohl der exakte Mechanismus der aseptischen Prothesenlockerung nach wie vor nicht vollständig geklärt ist, konnte in den vergangenen Jahren bewiesen werden, dass der Abrieb der Prothese einen entscheidenden Einfluss hat: Es zeigte sich, dass der Abrieb sich in Form von Abriebpartikeln im Submikronbereich im Peripimplantatbereich ansammelt und dort eine Reaktion anstößt, welche letzten Endes in Knochenabbau und eine Lockerung der Endoprothese mündet (30, 88, 184). Zusätzlich

konnten verschiedene Autoren darstellen, dass insbesondere Partikelanzahl, -Form und -Größe wesentlichen Einfluss auf das Ausmaß der genannten biologischen Aktivierung haben (30, 75, 88, 184, 215, 222). Mit dem Zweck der Abriebminimierung und des primären Knochenerhaltes - insbesondere bei jungen Patienten - durch „kleine“ Implantate setzte sich aufgrund guter Simulatordaten der Oberflächenersatz zu Beginn des neuen Millenniums in der Hüftendoprothetik durch (61, 201, 202).



Abbildung 4: Oberflächenersatz Typ Birmingham der Fa. Smith & Nephew; Quelle: <http://www.smith-nephew.com>

Doch mit Beginn der Implantationen zeichneten sich frühzeitig Komplikationen mit teilweise sehr hohen Revisionsraten ab (4, 5, 175). Es mehrten sich Berichte über hohe Cobalt- und Chromionenspiegel in Patienten mit einem Oberflächenersatz an der Hüfte, ferner kamen erste Fallbeschreibungen von sogenannten Pseudotumoren auf, welche sich um das Implantat bilden (124, 175).

Nebst „primärem“, in der Regel noch gemäßigttem Abrieb bei Oberflächenersatzprothesen in der koxalen Primärendoprothetik, kam es in der Vergangenheit auch immer wieder zu vital bedrohlichen Komplikationen, bedingt durch vermehrten Metallabrieb. Der Einsatz von metallischen Artikulationskomponenten in der operativen Revision führt mitunter zu schwersten Metallosen und schweren Ionenintoxikationen (54). Abbildungen 5 und 6 sollen eine solche Komplikation durch Metallabrieb verdeutlichen.



Abbildung 5: Die Verschattung periartikulär an der a.p. Röntgenaufnahme der rechten Hüfte entspricht diffusem Metallabrieb, gut sichtbar insbesondere um den Trochanter major und am kaudalen Acetabulumsrand.



Abbildung 6: Intraoperativer Situs bei einer HTEP-Revision mit braun-schwärzlichem Serom als Zeichen einer schwereren Metallose

Allergische Typ IV Reaktionen werden mitunter vermutet (175), letzten Endes ist der Pathomechanismus dieser biologischen Reaktion, welche zu diesen schweren Komplikationen führt, bis heute ungeklärt. Im August 2010 nahm der Hersteller Depuy (heute Johnson & Johnson, New Brunswick Middlesex County, New Jersey, USA) die Prothesen ASR™ XL und ASR™ vom Markt. Seitens der Arbeitsgemeinschaft Endoprothetik (39), der European Hip Society (81), der deutschen Arthroshilfe und European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology (81) wurde 2012 eine Konsensus-Empfehlung zum Umgang mit Patienten mit Metall-Metall Gleitpaarungen herausgegeben (81). Trotz des ausgewiesenen Expertenkomitees wurden keine eindeutigen Richtwert-Empfehlungen eines Serumschwellenwertes von Cobalt (Co)- und Chromionen abgegeben, da deren exakter Einfluss auf die biologische Reaktion noch unverstanden ist. So heißt es: „Referenzwerte: Co-Werte <2 µg/L sind derzeit ohne klinische Relevanz. Der Schwellenwert für klinische Bedenken wird voraussichtlich im Bereich von 2 bis 7 µg/L sein (der genaue Schwellenwert muss noch ermittelt werden)“ (81). Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein grundlegendes Verständnis für die Pathophysiologie der inflammatorischen Reaktion auf metallische Abriebprodukte von

Endoprothesen zu erzielen. Im Speziellen sollte der Unterschied zwischen einer reinen Ionenbelastung (Cobalt und Chrom, CoCr) und einer soliden Metallpartikel-Belastung (CoCr) herausgearbeitet werden. Der Inflammationsprozess wird am Mausmodell quantifiziert, da die Komplexität der ablaufenden Reaktionen *in vitro* nicht vollständig abzubilden ist. Dabei sollen die Auswirkungen auf das periimplantäre anliegende Gewebe wie Knochen, Kapsel- und Synovialgewebe *in vivo* überprüft werden. Als Messparameter dienen hierzu die Leukozyten-Endothelzellinteraktion, darstellbar mittels intravitalmikroskopischer Messung, eine histologische Auswertung und die gewebspezifische Zytokinausschüttung.

Da sich der Themenkreis Metallabrieb durch Endoprothetik größtenteils auf Hüftendoprothetik reduzieren lässt, sollen im Folgenden die spezifischen Hintergründe der Thematik in Bezug auf Hüftendoprothetik erörtert werden.

1.2 Geschichte der Hüftendoprothetik

Die Geschichte der Endoprothetik beginnt mit Themistocles Gluck, welcher erste Gelenkersatzoperationen mit Elfenbeinprothesen durchführte (62, 98, 210, 233, 239). Katastrophale Ergebnisse, bedingt durch Infektionen und Frakturen, waren die Folge und die weitere endoprothetische Entwicklung kam daher vorerst zum Erliegen (98, 239). Anfang des 20. Jahrhunderts wurden unfixierte Gelenkinterponate aus Glas genutzt. Sie sollten die direkte Reibung beider Gelenkflächen aufeinander vermeiden (99). Bei weiterhin nicht zufriedenstellenden Ergebnissen wurde schließlich dem Jahr 1938 Vitallium, eine Legierung aus Chrom, Kobalt und Molybdän, eingesetzt (99). Diese Implantate aber auch die Monoblock Judet-Prothese aus Polymethylmetacrylat (PMMA) Mitte des 20. Jahrhunderts scheiterte (39, 181).

An dieser Stelle erfolgte der Übergang zu metallischen Artikulationskomponenten: Moore nutzte eine Cobalt-Chrom-Legierung zur Verbesserung Protheseneigenschaften, jedoch kam es zu Penetrationen des Metallkopfes in das kleine Becken (157). Aus diesem Grund wurde durch Wiles eine Totalendoprothese mit einer Metall-Metall-Gleitpaarung konzipiert. Aufgrund ungenauer Herstellungsmechanismen kam es jedoch zu massiven Abrieb und frühzeitigen Lockerungen der Prothese (39).

Revolutioniert wurde die Hüft-Endoprothetik durch Sir John Charnley. Er nutzte ultrahochvernetztes Polyethylen (159) als Pfannenkomponente, der Prothesenkopf als Artikulationspartner war aus Metall. Mit Polymethylmetacrylat (PMMA) fixierte er den Schaft der Prothese und die Hüftpfanne im Knochen (33). Durch die Verwendung von Polyethylen sah man sich jedoch erstmals mit der Komplikation der aseptischen Prothesenlockerung konfrontiert, welche damals allerdings noch fälschlicherweise einer infektiösen Genese zugeschrieben wurde (34). Die aseptische Prothesenlockerung wurde erst Anfang der 1970er Jahre näher erforscht und beschrieben. So wurde diese initial den verwendeten Komponenten der Endoprothese, Polyethylen und PMMA, zugeschrieben (237). Es war jedoch ersichtlich, dass Abriebpartikel im Fokus standen. Die Lösung des Problems sollte, basierend auf der Hypothese, dass PMMA hauptverantwortlich an diesem Prozess ist, die zementfreie Implantation einer Hüfttotalendoprothese (HTEP) bringen (36). Auch hier kam es jedoch zu Lockerungen, so dass man vom Terminus „Zementkrankheit“ zu „Partikelkrankheit“ wechselte (117). Seitdem fokussiert sich die Forschung auf diesen Bereich mit dem Ziel, die Abriebeigenschaften der genutzten Artikulationsflächen weiter zu optimieren und reduzieren. Bei einer Vielzahl der heute auf dem Markt erhältlichen Hüftprothesendesigns kann eine Unterteilung hinsichtlich der Nutzung von PMMA getroffen werden: zementfreie HTEP, teilzementierte / Hybrid HTEP und zementierte HTEP. Aktuelle Registerdaten zeigen eine Tendenz zu zementfreien und teilzementierten Prothesenvarianten, wobei diese Entwicklung auch regional sehr unterschiedlich ist (5, 78). Die Abbildungen 7 und 8 veranschaulichen graphisch den prozentualen Anteil an zementfreien, teilzementierten und vollzementierten Prothesen aus der BRD (Daten EPRD, Abbildung 7) und aus Australien (Daten aus dem australischen Prothesenregister, Abbildung 8).

	Anteil (%)	Alter	m/w (%)
Zementfreie Implantationen	78,4	67	45/55
Hybride Implantationen	14,4	77	28/72
Zementierte Implantationen	5,9	80	26/74
Revers-hybride Implantationen	1,3	74	28/72

Abbildung 7: Auszug aus dem Endoprothesenregister Deutschland. In der BRD ist eine zementfreie Technik deutlich führend, auch teilzementierte Verankerungen sind hier seltener als in Australien (78).

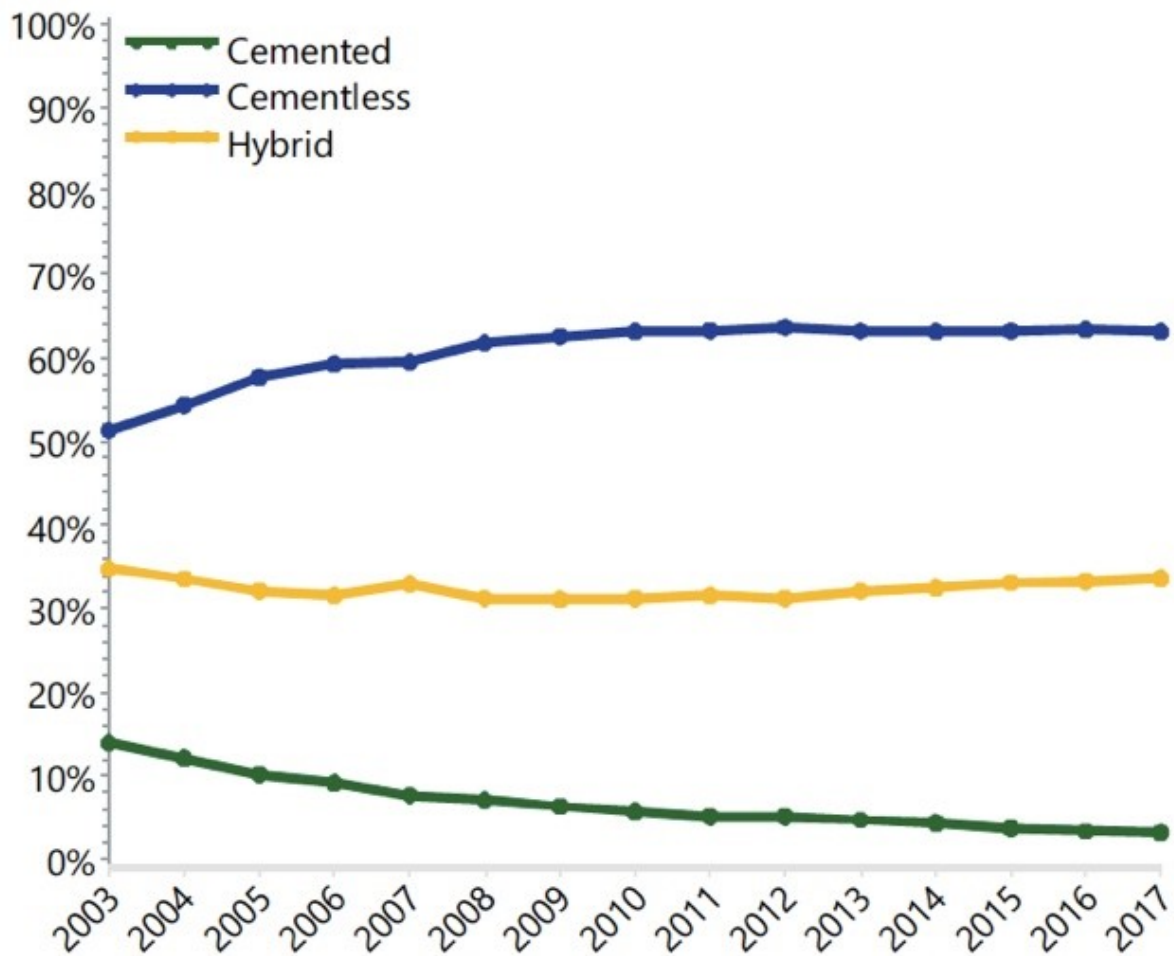


Abbildung 8: Auszug aus dem australischen Prothesenregister, es zeigt sich ein Trend hin zu zementfreier oder teilzementierter Verankerung, wohingegen der Anteil der vollzementierten Prothesen über die letzten Jahre weiter abnimmt (5).

2000 hat das National Institute for Health and Clinical Excellence (NICE) eine Benchmark für die Standzeit von Implantaten in der Primärendoprothetik veröffentlicht. In der Aktualisierung von 2014, werden einzig Hüftgelenksendoprothesen empfohlen, die eine Revisionsrate von weniger als 10 % binnen 10 Jahren aufweisen können (163, 164).

1.3 Gleitpaarungen in der Hüftendoprothetik

Ein Fokus der heutigen Materialforschung liegt insbesondere auf der Entwicklung von optimierten Gleitpaarungen mit dem Ziel, Abrieb zu minimieren und die Standzeit der Endoprothese zu erhöhen. In der Hüftendoprothetik haben sich sogenannte Hart-Hart und

Hart-Weich Gleitpaarungen durchgesetzt, Kombinationsmöglichkeiten ergeben sich entsprechend Tabelle 1.

Tabelle 1: Kombinationsmöglichkeiten von Artikulationsflächen moderner Hüfttotalendoprothesen

Hart-Hart-Paarung	Hart-Weich-Paarung
Keramik-Keramik	Keramik-Polyethylen
Metall-Keramik	Metall-Polyethylen
Metall-Metall	

Abriebuntersuchungen der genannten Materialkombinationen ergaben eine primär deutliche Überlegenheit der Hart-Hart Gleitpaarungen, wie in Tabelle 2 ersichtlich.

Tabelle 2: Linearer Abrieb und Abriebsvolumen verschiedener Gleitpaarungen (208).

Materialkombination	Linearer Abrieb / a [mm]	Abriebsvolumen / a [mm²]
Metall-UHMWPE	0,2	55,71
Keramik-UHMWPE	0,1	17,91
Metall/Keramik-XLPE	< 0,1	< 10
Metall-Metall	0,01	0,88
Keramik-Keramik	0,005	0,04

1.3.1 Polyethylen – Metall

Als Vorreiter dieser Gleitpaarung ist Sir John Charnley zu nennen. Er kombinierte einen Metallkopf aus Colbalt-Chrom auf dem Prothesenschaft mit einer zementierten Polyethylenpfanne, bestehend aus ultrahochvernetztem Polyethylen (ultra high molecular weight polyethylene – UHMWPE) (33, 35). UHMWPE hielt sich fortan als Standard der Hart-Weich Paarung. Erst Ende des vergangenen Millenniums konnten die Materialeigenschaften des Polyethylens durch eine Bestrahlung des Materials weiter verbessert werden (153, 154). Dieser sogenannte Crosslinking Prozess führte zu einer geordneten Ausrichtung der Kohlenstoffketten im Polyethylen und damit zu einer erhöhten Widerstandsfähigkeit des Materials und dessen Abriebeigenschaften (56, 64, 159, 218, 220, 222). Seither ersetzte crosslinked Polyethylen (XLPE) zunehmend UHMWPE als Gleitpartner vor allem in der Hüftendoprothetik. Eine ähnliche Entwicklung ist auch in der Knieendoprothetik zu erkennen (5, 78). Jedoch wurde die Gleitpaarung Metall-Polyethylen heutzutage in der BRD von der Gleitpaarung Keramik – XLPE abgelöst (siehe Abbildung 10).

	Anteil [%]	Alter	m/w [%]
XLPE/Keramik	52,5	69	41/59
XLPE+Antioxidans/Keramik	15,3	69	42/58
Keramik/Keramik	10,2	62	48/52
PE/Keramik	9,8	74	35/65
XLPE/Metall	6,5	77	39/61
PE/Metall	2,8	80	30/70
XLPE+Antioxidans/Metall	0,6	78	34/66
Metall/Metall	0,1	54	92/8
Nicht eindeutig bestimmbar	2,2	69	37/63

Abbildung 9: Auszug aus dem Endoprothesenregister Deutschland. XPE hat auch in der BRD PE nahezu vollständig in der primären Hüftendoprothetik abgelöst (78).

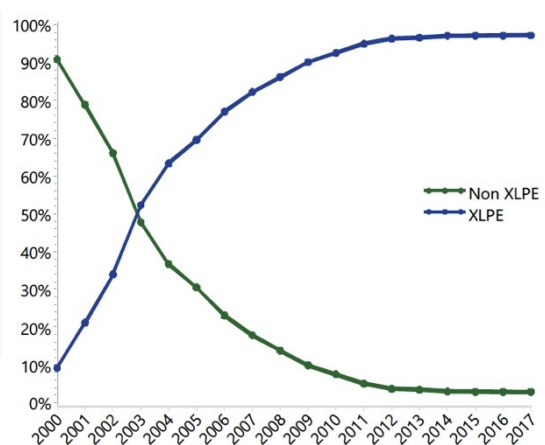


Abbildung 10: Auszug aus dem australischen Prothesenregister. XPE hat seit 2003 konventionelles UHMWPE als Gleitpaarungspartner in der primären Hüftendoprothetik nahezu vollständig abgelöst (5).

1.3.2 Keramik – Keramik und Keramik – Polyethylen

Eine rein keramische Artikulation wurde durch Boutin et al. vorgestellt (17). Die Kombination Keramik – Keramik zeigte eine ausgezeichnete Gewebeverträglichkeit und optimierte

Abriebwerte (17, 18, 38). Brüche der Keramik, welche initial gehäuft auftraten (51, 54, 84, 96), wurden durch eine stetige Weiterentwicklung der Keramik bis hin zur heutigen Delta-Keramik Generation deutlich reduziert. Die Keramik – Keramik Gleitpaarung zeichnet sich derzeit durch das geringste Abriebvolumen in der Hüftgelenkendoprothetik aus (Tabelle 2). Wie bereits unter 1.3.1 erwähnt, stellt die Gleitpaarung Keramik – XLPE heutzutage die am häufigsten verwendete Gleitpaarung in der Primärendoprothetik dar (5, 78).

1.3.3 Metall – Metall

Aufgrund der Verschleißproblematik bei der Nutzung von Polyethylen in den frühen Jahren der Hüftendoprothetik seit Sir John Charnley etablierte sich parallel die Nutzung der Metall – Metall Gleitpaarung. Erste nennenswerte Implantationszahlen erfolgten im vereinigten Königreich durch McKee und J.P. Watson-Farrar (152). Trotz anfänglich überzeugender Ergebnisse waren diese Implantate durch eine extrem hohe Revisionsrate in den ersten Jahren nach Implantation gekennzeichnet (230). Nachfolgend konnte gezeigt werden, dass Prothesenkomponenten unterschiedlicher Hersteller genutzt wurden und somit ein inadäquates Spiel der Prothesenkomponenten möglich war (180). Hieraus ergab sich ein deutlich erhöhter Abrieb der Komponenten, welcher zum Frühversagen der Prothesen führte (180). Die Tatsache, dass es auch Standzeiten von > 10 Jahren gab ohne Lockerungszeichen in einer relativ großen Patientenkohorte wurde darauf zurückgeführt, dass es zufällig getroffene Implantatherstellerkombinationen gab, welche tribologisch effektiv funktionierten und nur geringen Abrieb generierten (121). Diese teils äußerst langlebigen Implantate waren Anlass, die Entwicklung der Metall – Metall Gleitpaarungen- unter dem Vorsatz nur noch Kombinationen eines Herstellers zu verwenden - weiter voran zu treiben (230). In Zusammenarbeit mit einem namenhaften Hersteller (Fa. Zimmer, heute Fa. ZimmerBiomet, Warsaw, Indiana, USA) wurde Metasul™ entwickelt. Die klinischen Ergebnisse waren in einem Zeitraum von 1-5 Jahren nach Implantation äußerst zufriedenstellend (230). Die Tatsache, dass zahlreiche Simulatorstudien extrem niedrige Verschleißraten zeigten (208), führte zur Überlegung diese Materialkombination insbesondere bei jungen Patienten einzusetzen. Da Polyethylen im Bereich der Pfanne aufgrund des Verschleißverhaltens dickwandig sein musste, ergab sich mit einer Metall – Metall Gleitpaarung die Möglichkeit einer dünnwandigen Pfannenlauffläche. Als Folge setzte die Entwicklung der Oberflächenersatzprothesen ein (61, 201, 202). Erste

Studien zeigten einen primären Erfolg, jedoch konnten ohne mittel- bis langfristige Ergebnisse keine klaren Aussagen getroffen werden (77, 115, 190). In den folgenden Jahren wurden zunehmend Erfahrungsberichte und Studien bekannt, welche zahlreiche Probleme und Komplikationen nach Implantation einer solchen großköpfigen Gleitpaarung beschrieben (69, 82, 175, 228).



Abbildung 11: Historische Entwicklung der Metall - Metall Gleitpaarung

Das Augenmerk der Publikationen richtete sich vornehmlich auf verschiedene Endpunkte: Zum einen wurde die Entstehung von tumorartigen Neoplasien beschrieben, den sogenannten Pseudotumoren (47, 124, 175). Auf der anderen Seite konnte bei zahlreichen Patienten im Serum eine deutlich erhöhte Konzentration von Chrom und Cobalt gemessen werden. Nephrotoxische, kardiotoxische und zerebrotoxische Wirkungen wurden beschrieben (4, 40, 48, 95). Die extremen Folgen des Metallabriebs beschrieben auch Zywiell et al. Nach einem Keramikkopfbruch wurde im Rahmen der Revision auf einen Metallkopf gewechselt. Die in situ verbliebenen Keramikpartikel fungierten als Dreikörperverschleiß, so dass es binnen kurzer Zeit zu einem massiven Anfall von Metallabrieb kam mit einer entsprechenden Ionenfreisetzung (243). Nach Exitus letalis wurde in der Autopsie eine Kardiomyopathie mit erhöhten Co- Werten und Metall in den kardialen Mitochondrien nachgewiesen (243). Diese Umstände führten nach einem Peak zu Beginn der 2000er Jahre zu einem schnellen Rückgang der Gleitpaarung Metall - Metall, gleichwohl die biologischen Reaktionen bis heute nicht im Detail geklärt sind.

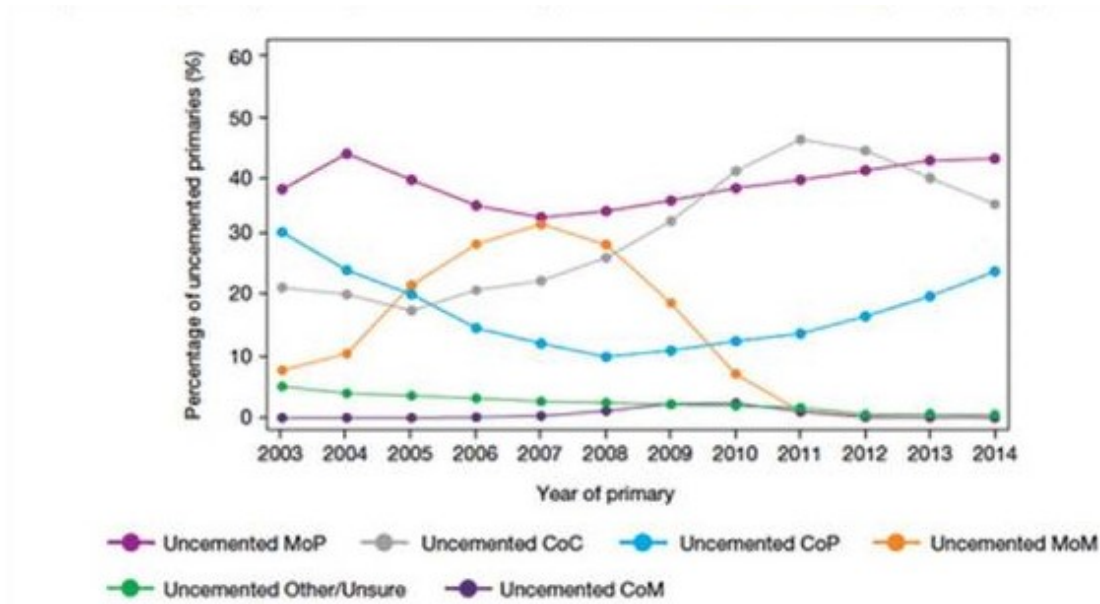


Abbildung 12: Prozentzahlen verschiedener Gleitpaarung uncementierter Total-Endoprothesen nach Daten National Joint Registry (UK) seit 2003 bis einschl. 2014. Man beachte den Peak der Metall-Metall Gleitpaarung 2007 mit dem raschen Abfall (146)

1.4 Besonderheiten des Metallabriebs

Bei zahlreichen Patienten in der klinischen Beobachtung nach Implantation einer HTEP mit einer Metall – Metall Gleitpaarung konnten periartikuläre Gewebeveränderungen beobachtet werden, so genannte „adverse local tissue reactions“ (ALTRs) (20, 68). Zu diesen ALTR zählen auch die sogenannten Pseudotumoren, entsprechend periprothetischen Nekrosen und aseptischen lymphozytären Reaktionen, diese werden als „ALVAL“ – aseptic lymphocytic vasculitis-associated lesions zusammengefasst (236).

Die ALVAL setzen sich aus perivaskulären Infiltraten von T- und B- Lymphozyten und Plasmazellen, hochendothelialen Venolen, massiver Fibrinexsudation, der Akkumulation von Makrophagen und einer Infiltration von eosinophilen Granulozyten und Nekrose zusammen (236).

ALTR wurden vor allem bei Metall – Metall Gleitpaarungen beobachtet (60, 125), treten jedoch, wenn auch deutlich seltener, bei den konventionellen Metall-auf-Polyethylen-Gleitpaarungen auf (144, 209, 227).

Als weitere Form der Gewebereaktion wird die Metallose beschrieben. Dabei handelt es sich um die makroskopisch sichtbare dunkle bis schwarze Verfärbung des periprothetischen

Weichteilgewebes durch den entstandenen Metallabrieb, entsprechend Abbildung 6. Das Auftreten einer Metallose korreliert hierbei mit dem Ausmaß des Metallabriebs (85).

Schätzungsweise treten Pseudotumoren insgesamt mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 % bei Patienten mit einer Metall – Metall Gleitpaarung binnen 5 Jahren auf (175). Der genaue Auslösemechanismus ist jedoch noch nicht bekannt, zusätzlich ist unklar ob die genannten Reaktionen durch soliden Metallabrieb in Form von Partikeln ausgelöst werden oder durch Cobalt und Chrom Ionen. Ein multifaktoriellen Geschehen wird hypothetisiert, und zwar eine toxische Reaktion durch den metallischen Abrieb (solide oder Partikel) mit gegebenenfalls einer Hypersensitivitätsreaktion auf den entstandenen Abrieb (70, 175). Pandit et al. vermuten, dass es sich bei Pseudotumoren um eine Typ IV Immunantwort handelt (176), wohingegen Hallab et al. eine komplexere Signalkaskade vermuten, welche so noch nicht beschrieben ist (87).

Erwiesenermaßen treten Überempfindlichkeitsreaktionen auch bei Patienten mit geringem Abrieb auf (55). Es bleibt daher fraglich, ob der Metallabrieb unabhängig von seiner Form (solide oder ionisiert) für die schlechten Standzeiten der Metall – Metall Gleitpaarungen in der Hüftendoprothetik verantwortlich ist oder ob patientenindividuelle Einflüsse aufgrund von Überempfindlichkeitsreaktionen eine Rolle spielen (55). Diese individuellen Faktoren sind bis heute weitestgehend unklar, spielen mit hoher Wahrscheinlichkeit aber eine Rolle bei der Entstehung von ALTR bei Patienten mit Metallabrieb (10).

1.4.1 Metallionen

Seitens der Arbeitsgemeinschaft für Endoprothetik (AE) existieren Empfehlungen zur Behandlung von Hüftprothesen-Patienten mit einer Metall-Metall Gleitpaarung (81). Die genannten Konsensusempfehlungen richten sich vor allem auf eine systemische Metallionenbelastung (Schwellenwert für Co im Bereich von 2 bis 7 µg/L). Hintergrund sind systemische sowie lokale Reaktionen, insbesondere die Gefahr der lokalen Pseudotumorbildung. Neben den artikulierenden Metall-Metall-Gleitpaarungen ist die Konus-Steckverbindung als weitere Quelle von Verschleiß- und Korrosionsprodukten zu nennen. Verschiedene Untersuchungen zeigten dabei, dass sich diese in ihren klinischen Auswirkungen noch aggressiver darstellen als die Verschleißprodukte artikulierender Komponenten (59). Obwohl Co und Cr Ionen essentielle Elemente für biologische Funktionen

im Körper sind, können diese Elemente in hohen Konzentrationen lokale und systemische toxische Reaktionen hervorrufen (194). Folge der erhöhten Metallkonzentration im Blut können unter anderem nephrologische, neurologische und cerebrale Komplikationen sein (40, 216). Die Toxizität von Cobalt und Chrom ist abhängig von ihrer oxidativen Wertigkeit, wobei vor allem Cr(III) und Co(II) in den Körperflüssigkeiten von Patienten nachgewiesen werden können (194). Andererseits kommt es zur Ablagerung von Cr(IV) im periimplantären Gewebe (200). Durch die lokale Ansäuerung des Umgebungsmilieus wird zusätzlich die Reaktion mit Phosphationen begünstigt, wodurch z.B. schwerlösliche CrPO_4 Komplexe im Gewebe abgelagert werden (68). Darüber hinaus sind die Metallionen in der Lage, die Hirn-Blut-Schranke zu überwinden, um sich möglicherweise im Gehirn abzulagern. So konnte bereits im Tiermodell nachgewiesen werden, dass Cobalt und Chrom sich für Nervenzellen in der Ratte als toxisch erwiesen hat und die Apoptose der Zellen einleiten (65).

1.4.2 Metallpartikel

Metallpartikel unterscheiden sich von Polyethylen-Partikeln in ihrer Größe, Form und Verteilung. Gewebeanalysen und Simulatorstudien konnten zeigen, dass diese Partikel eine Größe von etwa 25 bis 50 nm aufweisen und überwiegend rund oder oval sind. Die Biokompatibilität metallischer Implantatwerkstoffe muss kritisch betrachtet werden, da diese zu elektrochemischer Korrosion und Ionenfreisetzung neigen, bei denen chemisch aktive Degradationsprodukte entstehen können (107, 108). Im Gegensatz zu massiven Implantaten weisen Metall-Partikel ein hohes Oberflächen-Volumenverhältnis auf und bieten somit eine große Reaktionsfläche für Korrosionsprozesse und Freisetzung von Ionen (103). Bei Metallpartikeln kommt es daher *in vivo* zu einer kontinuierlichen Änderung der Größe, Form und chemischen Zusammensetzung (199). Während Kobalt und Molybdän relativ schnell über die Nieren eliminiert werden, neigt Chrom dazu, im Körper insbesondere in parenchymatösen Organen zu akkumulieren und in diesen unterschiedlichen Geweben in seiner Konzentration zu variieren (156). Chrom- und Kobalt-Ionen gehen Bindungen mit Proteinen ein, insbesondere mit Albumin, welches den höchsten Proteinanteil im Blutplasma aufweist und somit für einen Transport der Metall-Protein-Komplexe im gesamten Organismus sorgt (89, 156). Eine systematische Verteilung von Metallpartikeln wurde durch histologische Untersuchungen an endoprothetisch versorgten Patienten beobachtet (128). Metallpartikel

verbleiben nicht nur im periprothetischen Gewebe, sondern werden über das lymphatische System unter anderem in Leber, Milz und Knochenmark transportiert (28, 217).

Die Zytotoxizität von Verschleißprodukten von Hüftendoprothesen wurde in diversen *in vitro* Studien nachgewiesen und ist stark von der Partikel- bzw. Ionenkonzentration abhängig (3, 145, 206). So konnten etwa Germain et al. nachweisen, dass eine Partikeldosis zwischen 5 und 50 μm^3 pro Zelle zu einer Reduktion der Lebensfähigkeit von ca. 42 % bis 95 % führt (66). Aus Gewebeanalysen und *in vitro* Studien ist bekannt, dass es durch die Partikel- bzw. Ionenbelastung zu mutagenen Reaktionen sowie Chromosom- und DNA-Schädigung kommen kann (43, 46). In Tierexperimenten wurde die kanzerogene Wirkung von Kobalt und Chrom nachgewiesen (16), obwohl auch gegenteilige Ergebnisse aus Tierexperimenten vorliegen (134). Es existieren Fallberichte, in denen über implantatassoziierte, kanzerogene Wirkungen berichtet wird (1, 92). So wurde in einem Fall von einem High-Grade Sarkom im Bereich der Hüfte berichtet, 3 Jahre nach Implantation einer modularen Hüftprothese mit einer Cobalt-Legierung (1).

2. Material und Methoden

2.1 Generierung von Abriebpartikeln

Die Herstellung der Metallpartikel erfolgte im Rahmen eines DFG Gemeinschaftsprojektes durch das Labor für Biomechanik und Implantatforschung (Leitung: Prof. Dr. sc. hum. P. Kretzer), Schlierbacher Landstraße 200A, 69118 Heidelberg.

Zur Generierung von Metallabriebpartikeln wurden Probenkörper einer CoCr29Mo6 Legierung (Standardlegierung in der Hüft- und Knieendoprothetik) gemäß ISO 5832-12 und ASTM F1537 einem Verschleißtest unterzogen. Dabei wurde der Hüftkontaktmechanismus in einer neu entwickelten Pin-on-Plate-Prüfeinheit simuliert. Analog der physiologischen Bahnkurve zwischen Hüftkopf und Hüftpfanne wurde dabei eine elliptische Bahnkurve mit einem Längenverhältnis der Hauptachsen von 5,5 simuliert. Auf Grundlage eines normierten Gangbildes ergaben sich bei einem üblichen Hüftkopf (\varnothing 36 mm) die Hauptachsen von 15 mm bzw. 2,7 mm (192). Dabei wurde die physiologische Flächenpressung im künstlichen Hüftgelenk - bestimmt durch die Probenkörper sowie die Axiallast (i.d.R. im Bereich von 2 bis 80 MPa) - in der Pin-on-Plate-Prüfeinheit berücksichtigt, so dass eine annähernd physiologische *in vitro* Testung der Probenkörper möglich war. Die Artikulation erfolgte mit einer Frequenz von 1 Hz. Das Verschleißvolumen wurde im Testmedium mittels Ultraspurenanalytik (HRICPMS) bestimmt.

Zudem sollten in einem Hüftabriebsimulator (Type C3 / 1-08 bzw. Type C6/2-08, Fa. Endolab GmbH, Rosenheim; Gleitpaarung Keramik-Polyethylen) Polyethylen Abriebpartikel erzeugt werden. Die Hüftköpfe bestehen aus reinem Al₂O₃ (BioloX® forte, Fa. CeramTec, Plochingen, Deutschland) und die Pfanneninserts aus sequentiell quervernetztem Polyethylen (X3™, Fa. Stryker, Kalamazoo, Michigan, USA). Es wurden neue, vakuumverpackte Inserte verwendet, um oxidative Veränderungen am Polyethylen zu vermeiden. Bei der Abriebsimulation wurden demzufolge Partikel aus Polyethylen unter standardisierten Bedingungen gemäß ISO Norm 14242, d.h. unter definierten Bewegungszyklen und Umgebungsbedingungen (Kälberserum mit 37°C) über 5 Mio. Lastzyklen generiert. Nach dem Abriebtest wurde das Testmedium mit den Abriebpartikeln bei Raumtemperatur aufbewahrt.

2.1.1 Metallpartikelanalyse

Da die Metallpartikel nicht in einem Serum gewonnen wurden, war eine Separation der Partikel aus einer proteinhaltigen Lösung in diesem Fall nicht notwendig. Nach Vakuumfiltration wurden die Metall-Partikel im Feldemissionsrasterelektronenmikroskop (erreichbare Nachweisgrenze: 5 nm) untersucht. Die Charakterisierung erfolgte auch im Fall der Metallpartikelanalyse individuell mittels Grauwertdifferenzierungssoftware (Leica Q-WIN, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland). Folgende Parameter wurden gemäß ASTM F1877-05 bzw. ISO 17853 charakterisiert: Partikelanzahl (n), Equivalent Circle Diameter (ECD), Aspect Ratio (AR), Roundness (R), Form Factor (FF). Die Testung der chemischen Zusammensetzung des generierten Abriebs erfolgt mittels „high resolution inductively-coupled plasma mass spectrometer“ (ICP-Massenspektrometrie, HR-ICP-MS).

Diese Größe und Morphologie ist in guter Übereinstimmung mit klinisch entstehenden Metallpartikeln bei entsprechendem Gelenkersatz (186, 195). Die Partikelanalysen erfolgten daher in zwei Ansätzen. Zum einen wurden nur die erkennbaren Nanopartikel analysiert und zusätzlich erfolgten weitere Analysen, die sich auf eine separate Charakterisierung der Agglomerate fokussierten.

2.1.2 Polyethylenpartikelanalyse

Zur Charakterisierung der Partikelgröße, Anzahl und Morphologie wurden die Verschleißpartikel aus Polyethylen separat analysiert. Dazu erfolgte zunächst der Aufschluss der Testmedien zur Eliminierung organischer Bestandteile mittels Säuredigestion (161). Dazu wurden die Testmedien zentrifugiert und mit 65 %iger Salzsäure vermischt. Anschließend wurde die Lösung für eine Stunde bei 60 °C gerührt, um die Bestandteile im Kälberserum aufzuspalten. Die Lösung wurde danach mit Methanol verdünnt und die Abriebpartikel über einen Polycarbonatfilter unter Vakuum filtriert. Die PE-Partikelanalyse erfolgte mittels Rasterelektronenmikroskopie vor und nach der Endotoxinaufreinigung (siehe 2.3). Die Charakterisierung erfolgte individuell mittels Grauwertdifferenzierungssoftware (Leica Q-WIN, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland). Folgende Parameter werden gemäß ASTM F1877-05 bzw. ISO 17853 charakterisiert: Partikelanzahl (n), Equivalent Circle Diameter (ECD), Aspect Ratio (AR), Roundness (R), Form Factor (FF).

2.2 Generierung von Metallionen

Entsprechend 2.1 erfolgte die Herstellung der Metallpartikel im Rahmen eines DFG Gemeinschaftsprojektes durch das Labor für Biomechanik und Implantatforschung (Leitung: Prof. Dr. P. Kretzer), Schlierbacher Landstraße 200A, 69118 Heidelberg.

Solide Werkstoffproben einer CoCr29Mo6 Legierung gemäß ISO 5832-12 und ASTM F1537 wurden in einer Korrosionsmesszelle zur Korrosion gebracht. Als Umgebungsmedium wurde phosphatgepufferte Salzlösung genutzt (PBS von englisch phosphate-buffered saline) verwendet. Die Werkstoffproben wurden mit einem elektrischen Potential gegen eine Wasserstoffbrückenelektrode anodisch geschaltet, um eine Metallionenabgabe zu forcieren. Der gelöste Metallionengehalt aller Legierungsbestandteile wurde mittels Ultraspurenanalytik (HRICPMS) bestimmt.

Über die lokale Ionenbelastung im Gelenk liegen kontroverse Daten vor. Bei symptomatischen Patienten konnten lokal in der Gelenkflüssigkeit Chrom- und Kobaltkonzentrationen von weit über 1000 µg/l nachgewiesen werden (45). Allerdings zeigten eigene aktuelle *in-vitro* Studien, dass es bei derartigen Konzentrationen zu zytotoxischen Reaktionen kommt. Daher wurde für tier-experimentellen Untersuchungen die Metall-Gesamtionenkonzentration in PBS auf 200 µg/l eingestellt. Die gewählte Konzentration von 200 µg/l orientiert sich an einer Untersuchung, bei der das Gelenkpunktat von Patienten vor dem Revisionseingriff (bei Metall-Metall-Gleitpaarungen) analysiert wurde (48). Hier wurden median-Konzentrationen im Bereich von 200-250 µg/l gemessen. Zur Eliminierung adhärenter Endotoxine erfolgte eine Hitzeinkubation der Metallionen-Lösung.

2.3 Vorbereitung der Polyethylen Abriebpartikel für die *in vivo* Untersuchungen

Die gewonnenen Partikel wurden zur Bestimmung ihrer inflammatorischen Aktivität *in vivo* eingesetzt. Hierzu mussten vor Versuchsbeginn sämtliche Störgrößen eliminiert werden. Die relevanteste Störgröße stellten Lipopolysaccharide als Bestandteil gramnegativer Bakterien dar, sog. Endotoxine. Um einen Einfluss von adhärentem Endotoxin auf die Ergebnisse zu vermeiden, mussten die generierten Partikel von Endotoxin befreit werden. Dies geschah im

Fall des Metall-Abriebs durch Hitzeinkubation, im Fall des Polyethylen-Abriebs durch Waschen mit Ethanol und Ultrazentrifugation nach einem eigens entwickelten Protokoll (177).

Ferner wurden alle Partikelsuspensionen vor den geplanten *in vivo* Versuchen auf ihren Endotoxingehalt hin von einem ausgegliederten Laboratorium untersucht (Fa. Lonza. Verviers, Belgien). Im Anschluss findet eine erneute elektronenmikroskopische Partikelanalyse zur Reevaluation der Partikelanzahl und –morphologie, sowie zur Konzentrationsbestimmung statt. Zur Berechnung der Partikelkonzentration wurde folgende Rechendarstellung genutzt:

In einem oder mehreren Bildausschnitten auf der genutzten Filtermembran wurden Abriebpartikel rasterelektronenmikroskopisch vermessen. Zur Vereinfachung wurde ein kugeliges Volumen der Partikel angenommen, der ECD (equivalent circle diameter ECD) wurde genutzt, da er die Partikeloberfläche einem Kreis gleichsetzt. Der Bildausschnitt wurde ebenfalls vermessen und die entsprechende Fläche berechnet. Die gesamte Filterfläche war ebenfalls bekannt. Es ergibt sich folgende Gesamtformel:

$$\left(\frac{ECD_{mean}}{2}\right)^3 \times \frac{4}{3} \times \pi \times n_{Bild} \times \frac{A_{Filter}}{A_{Bildausschnitt}} = V_{Partikel}$$

Das Volumen der filtrierten Suspension war bekannt. Der prozentuale Anteil der Partikel am Gesamtvolumen lässt sich nun dementsprechend berechnen.

2.4 Tierversuche

In einem mehrschichtigen Untersuchungsprinzip wurde die Auswirkung der unterschiedlichen Abriebpartikel und Metallionen an einem etablierten Mausmodell (221, 223, 240, 241) detailliert untersucht. Es handelt sich hierbei um ein synoviales Inflammationsmodell. Die Aktivität der applizierten Partikel und Ionen wird hinsichtlich des inflammatorischen Potentials an der Gelenkhaut (Synovialis) beurteilt. Dies fußt auf der Hypothese, dass die osteolytische Kaskade im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung durch das synoviale Inflammationsgeschehen eingeleitet und unterhalten wird. Dieses Modell wurde gewählt, da die entstehenden Abriebpartikel aus der Artikulationsfläche der Endoprothese im Patienten

vorzugsweise über die Gelenkflüssigkeit mit der Gelenkkapsel in Kontakt treten. Daher erschien dieses Modell hinsichtlich der Analyse der inflammatorischen Reaktion auf Metallpartikel und –Ionen geeignet zu sein.

Die Tierversuche wurden am Walter-Brendel-Zentrum für experimentelle Medizin am Klinikum der Universität München, Standort Großhadern durchgeführt. Genehmigt wurde dies durch die Regierung von Oberbayern (Tierversuchsantrag AZ: 55.2-1-54-2532-82.12). Alle am Tier durchgeführten Maßnahmen standen im Einklang mit der Tierschutz-Versuchstierverordnung – TierSchVersV.

2.4.1 Versuchstiere

Bei den Tieren handelte es sich um weibliche Balb/C Mäuse (Alter 6-8 Wochen, Gewicht ca. 20-22g, Fellfarbe: weiß (Albino). MHC Haplotyp H2^d. Strain code: 028). Sie wurden eigens für Tierversuche von der Charles River Wiga GmbH (Sandhofer Weg 7, 97633 Sulzfeld, Deutschland) gezüchtet (§§ 19 bis 24 TierSchVersV). Ein Gesundheitszeugnis lag für jede Tiergruppe vor. Die Haltung der Tiere erfolgte im Walter-Brendel-Zentrum entsprechend den erforderlichen speziellen Hygienebedingungen (FELASA erweitert) in dafür eingerichteten Räumen. Die Mäuse wurden gewichtsabhängig in Standard Makrolon Käfigen (Gruppenhaltung bei Tieren mit > 20 g KGW = 5 Tiere / Käfig Typ II long) mit freiem Zugang zu Wasser und Futter bei einem Tag-Nachtrhythmus von 12 Stunden gehalten. Die Raumtemperatur liegt im Mittel bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$, die rel. Luftfeuchtigkeit bei $55 \pm 5\%$. Als Einstreu wurde zertifizierte, staubarme Weichholzfaser verwendet. Die Fütterung erfolgte ad libitum mit einem standardisierten, pelletierten Alleinfuttermittel für Mäuse. Als Enrichment kommt zertifizierte grobe Einstreu (Abbed Nestbaumaterial NGB E-011, Faserbreite 3,5 mm, E-012, Faserbreite 4 mm + NBU E-014, Faserbreite 120 mm) zum Einsatz. Additiv wurden zertifizierte, autoklavierbare Spieltunnel und Nagerhölzer, weiche weiße Cellulose in Form von Labortücher (Henry Schein) und Kokon bzw. Zellstofftupfer (4 x 5 cm) eingesetzt. In der Zucht und Haltung kamen noch weitere Maushäuschen bzw. Maustunnel aus zertifiziertem, rotem Kunststoff zum Einsatz.

Nach Akklimatisierung über 14 Tage wurde nur die Versuchstiere akzeptiert, die ein unauffälliges Fress-, Putz- und Spielverhalten zeigten, und in die Untersuchungs- bzw.

Kontrollgruppen randomisiert. Diese wurde, gemeinsam mit Gewichtskontrollen im Zeitraum der Versuche reevaluiert.

2.4.2 Versuchsaufbau

Die Tiere wurden randomisiert insgesamt 4 Gruppen (Metallpartikel MP, Metallionen MI, Polyethylenpartikel PE, Kontrolle PBS) zugeteilt, jede Gruppe wies eine Stärke von 10 Tieren auf.

Die Tierversuche fanden zweizeitig statt. In einer ersten Sitzung wurde der Maus in das linke Knie in Inhalationsnarkose die jeweilige Partikelsuspension bzw. die Metallionen (Konzentration von 200 µg/l) injiziert. Die Tiere wurden jeweils nach 7 Tagen erneut narkotisiert. Hier erfolgten dann die analytischen Untersuchungen wie unten detailliert aufgeführt.

2.4.2.1 Narkoseverfahren der Versuchstiere

An den Versuchstagen 0 und Tag 7 wurde zunächst bei jeder Maus das Gewicht ermittelt. Zur Hypothermieprävention wurde die Maus auf einer Wärmeplatte bei kontinuierlicher rektaler Temperaturkontrolle (Zielwerte: zwischen 36,5°C und 38,0°C) gelagert. Anschließend erfolgte die Narkoseeinleitung in der Induktionsboxe durch 5%iges Isofluran und einer Beimischung von 600 ml/min Sauerstoff über einen Vaporisator. Die Narkose wurde per Gesichtsmaske durch ein Gasgemisch aus 1,2%igem Isofluran mit Sauerstoff (Fi O₂ 35%) und Lachgas über den Vaporisator aufrechterhalten. Dieses Mischverhältnis wurde an den Bedarf des Tieres angepasst. Mittels Applikation eines arteriellen Katheters und Drucktransduzers am proximalen Mäuseschwanz-Drittel wurde der Blutdruck überwacht. Durch eine Dexpanthenol-Salbe (5%) wurde einer Austrocknung der Augen während der Narkose vorgebeugt.

2.4.2.2 Intraartikuläre Injektion

An Tag 0 erfolgte nach Narkotisierung der Tiere ein Erfassen von Gewicht und Größe mit Hilfe eines Standard-Messschiebers, zudem wurde der Kniegelenksdurchmesser vor Punktion

ermittelt (Messgenauigkeit 0,01 mm). Diese Parameter wurden am Tag 7 im Rahmen der Versuchsanordnung erneut erhoben.

Nach der Identifikation der Patellarsehne und des Kniegelenkspalts erfolgte nach ausgiebiger Desinfektion die Injektion von je 50µl Suspension über eine Mikrokanüle Gauge 27. Entsprechend der Gruppenzuordnung wurden folgende pH-neutrale Suspensionen verabreicht:

- CoCr29Mo6 - Metallpartikel: 0,1 Vol.-% - 8,3 mg/ml
- Metallionen CoCr 200 µg/l
- UHMWPE 0,1 Vol.-%
- PBS-Lösung 0,1 Vol.-%

Direkt vor Injektion der Partikellösungen erfolgte eine Ultrasonikation für 30 Minuten im Wasserbad zur Auflösung von Agglomeratbildungen.

2.4.2.3 Intravitalmikroskopie

Die Tiere werden jeweils nach 7 Tagen erneut narkotisiert. Es erfolgte im ersten Schritt die Intravitalmikroskopie des betroffenen Gelenkes. Nach Präparation und Mobilisierung der Schwanzarterie wurde zunächst ein arterieller Katheter zur Blutdruckkontrolle und ggf. Volumensubstitution sowie zur Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran (c = 5 % in 0,9 % NaCl, Dosierung 15 mg/kg Körpergewicht) und Rhodamin 6G (c = 0,05 % in 0,9 % NaCl, Dosierung 0,15 mg/kg Körpergewicht) gelegt. Anschließend wurde die Kniegelenkspräparation durchgeführt. Nach Hautinzision in Längsrichtung über dem Kniegelenk erfolgte die Präparation der Patellarsehne mit nachfolgender Durchtrennung. Das



Abbildung 13: Rückenlagerung der Maus und Darstellung der Patellarsehne nach kutaner Längsinzision

Knie wurde entsprechend unter dem Intravitalmikroskop positioniert. Das Austrocknen des Präparats wurde durch Wasserimmersion mit steriler isotoner Kochsalzlösung vermieden. Unter Verwendung des Immersionsobjektiv des Auflichtmikroskops konnte maximal eine 550-fache Gesamtvergrößerung erreicht werden (94).

Nun wurden die beiden Fluoreszenzfarbstoffe nacheinander appliziert. Es wurden pro Tier drei Videoaufnahmen á 30 Sekunden rhodaminkontrastiert erstellt. Dies ermöglichte, die definierten Zielgrößen der vorbeikommenden (passing), rollenden (rolling), und adhären (sticking) Leukozyten sowie die Flussgeschwindigkeit festzuhalten. FITC-Dextran-kontrastiert wurden weitere dreimal 30 Sekunden lange Videosequenzen aufgezeichnet. Dies diente der Messung der funktionellen Kapillardichte (Functional capillar density – FCD) als Maß der nutritiven Perfusion des Gewebes (166). Die Aufnahmen werden auf einem Speichermedium festgehalten und anschließend nach den o.g. Zielgrößen ausgewertet.

In einem zweiten Schritt an Tag 7 erfolgte die intrakardiale Punktion zur Serumgewinnung mit anschließender Euthanasierung (Überdosis Pentobarbital intrakardial 0,5 ml). Es wurde Serum und Kniegelenkkapselgewebe zur Durchführung von Serumbestimmungen und zur histologischen und immunhistochemischen Analyse entnommen, ferner die Milz, Lunge, Leber und Nieren. Die entnommenen Knie und Organe wurden anschließend in, mit 4-%igem Formalin gefüllten, Einzelgefäßen fixiert.

2.4.2.4 Digitale Videoauswertung der Intravitalmikroskopie

Die Auswertung erfolgte über CapImage™ (Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland). Der Gefäßdurchmesser wurde in Mikrometern ermittelt. Hier wurden pro Gefäß sechs Messungen gemittelt. Darauf folgte die Erhebung der intravasalen Blutflussgeschwindigkeit anhand der Geschwindigkeit der Erythrozyten im zentralen Gefäßlumen wurde die Blutflussgeschwindigkeit vermessen. Für die Auswertung der leukozytären Parameter galt im Besonderen:

- „Passing“ Leukozyten: Fluss in der Geschwindigkeit des Blutstromes durch das Gefäß.
- „Rolling“ Leukozyten: Fluss langsamer als der Blutstrom mit Interaktion mit der Gefäßwand.

- „Sticking“ Leukozyten: Als „Sticking“ wurden die Zellen definiert, die eine halbminütige Beobachtungszeit an der Endothelwand anhafteten.

Die „Zahl adhärenter Zellen“ stellte die Menge der gezählten „sticking“ Leukozyten die über den Aufnahmezeitraum, bezogen auf die Fläche (mm²) der endothelialen Oberfläche, an einem Punkt anhängend waren, dar:

$$\text{Anzahl adhärenter Zellen} = \frac{\text{Sticking}}{d \times \pi \times L}$$

Zeichenerklärung:

d = Gefäßdurchmesser (μm)

π = Kreiskonstante (3,14)

L = Gefäßlänge (μm)

Die Anzahl der „rolling“ Leukozyten an allen durchfließenden Leukozyten ergibt sich wie folgt als Fraktion rollender Leukozyten:

$$\text{Fraktion rollender Leukozyten} = \frac{\text{Rolling}}{\text{Rolling} + \text{Passing}}$$

Aus drei Gesichtsfeldern pro Tier wurde die funktionelle Kapillardichte anhand der Länge der Kapillaren, welche durch den Plasmamarker wahrnehmbar wurde, gemessen. Ebenso wie die Zahl adhärenter Zellen und die Fraktion rollender Leukozyten stellt die Kapillardichte einen Inflamationsparameter dar.

2.5 Histologische Analyse

Nach der o.g. min. 24-stündigen Formalinfixierung wurden die entnommenen Organe für 96 Stunden mit der Entkalkungslösung Osteosoft® (Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland) entkalkt. Anschließend wurden die Präparate in einem Entwässerungsautomaten entwässert und mit Paraffin in einer Gießstation eingebettet.

2.5.2 Histologische Analyse der Kniegelenke

Die in Paraffin gebetteten Schnitte (Schichtdicke 6 µm) wurden mittels der Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) angefärbt. Pro Versuchstier wurde je ein repräsentativer HE-gefärbter Gewebeschnitt des infiltrierten linken Kniegelenks, sowie des unbehandelten rechten Kniegelenks ausgewertet. Anhand eines digitalen Mikroskops wurden mit der zugehörigen Software die synoviale Dicke und der Brackertz-Score bestimmt (19). Tabelle 3 gibt eine Übersicht über die Zusammensetzung des Brackertz-Scores. Dieser beschreibt in einem Punktesystem von 0 bis 4 unter den Gesichtspunkten synoviale Zellschicht, mononukleäre Zellen, definierte Arthritis und Pannusbildung histopathologisch eine entzündliche Gelenkreaktion (19).

Tabelle 3: Histopathologischer Score nach Brackertz et al. (19)

Brackertz-Score Merkm	0	1	2	3	4
Synoviale Zellschicht	unauffällig	unauffällig	2-3 Zellreihen	≥3 Zellreihen	≥3 Zellreihen
Mononukleäre Zellen	unauffällig	vereinzelt	verstreut	dichte Infiltration	dichte Infiltration
Definierte Arthritis	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
Pannus mit Erosion von Gelenkknorpel und subchondralem Knochen	Nein	Nein	Nein	Nein	Ja

Eine deskriptive Beurteilung der Schnitte beinhaltete Veränderungen an Knochenmark und Epiphysenfuge, knöchernen Umbauten, Infiltraten und Periostverdickungen. Die Dicke der synovialen Membran wurde an sechs definierten Punkten gemessen. In der Sagittalebene lagen jeweils vier Punkte an der ventralen und zwei Punkte an der dorsalen Kniegelenksfläche. Die gemessenen Werte beinhalteten die synovialen Deckzellen, das lockere Bindegewebe mit Blut- und Lymphgefäßen und Nervenfasern.

2.6 Immunhistochemie

Mittels Immunhistochemie (IHC) können Antigene auf histologischen Gewebeschnitten mit spezifischen Antikörpern markiert und sichtbar gemacht werden. Hierzu bindet ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper (AK) an das entsprechende gewebe- oder zellspezifische Antigen. Ein Antigen-Antikörper-Komplex entsteht. Zur Sichtbarmachung der Komplexe werden Marker wie Enzyme, Fluoreszenzfarbstoffe oder radioaktive Isotope genutzt (direkte IHC) (127). Im Gegensatz dazu werden bei der indirekten IHC Sekundärantikörper genutzt, die sich gegen den Primärantikörper richten und je nach Methode mit unterschiedlichen Markern ausgestattet sind. Dies hat den Vorteil einer Signalverstärkung (127). Die indirekte IHC ist heutzutage gebräuchlich und wurde auch im Rahmen dieses Studienkomplexes genutzt.

Im Rahmen der sogenannten Polymermethode wurde das histologische Gewebe mit einem Primärantikörper inkubiert. In dieser Studie handelte es sich um polyklonale Kaninchen-AK, die eine Komplexbildung mit dem darzustellenden Antigen eingingen. Hieran ist ein Dextran-Polymer-Konjugat geknüpft bestehend aus den o.g. Sekundärantikörpern. Diese sind an ein Polysaccharidgerüst gebunden, das zusätzlich mit Horse-Redish-Peroxidase-Enzymen (HRP) bestückt ist. Letztere sind enzymatische Marker, die bei Hinzugabe von DAB (3,3-Diaminobenzidin), dieses umsetzen und so einen braunen, lichtmikroskopisch sichtbaren Farbniederschlag erzeugen. Die Komplexbildung ist in Abbildung 14 veranschaulicht.

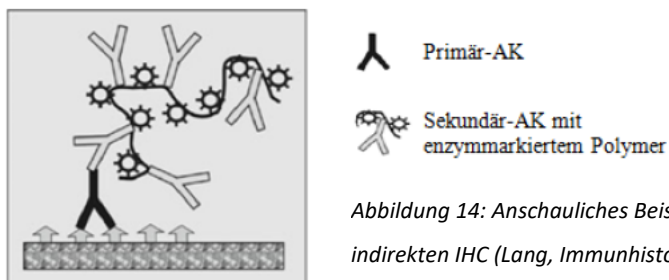


Abbildung 14: Anschauliches Beispiel einer indirekten IHC (Lang, Immunhistochemie, 2013)

2.6.1 Immunhistochemische Färbung der Kniegelenke

Auf einer Kühlplatte (-20°C) wurden die Schnittblöcke mittels Microtom geschnitten. Die Dicke der Schnittpräparate betrug dabei 2 µm. Nach einem sog. Streckbad zur Faltenminimierung wurden die Schnittpräparate anschließend auf beschriftete Objektträger aufgezogen. Im

Anschluss wurden die Objektträger für ca. 15min auf einer Streckplatte bei 75°C belassen um darunter überschüssiges Wasser verdunsten lassen zu können sowie einen Teil des Paraffins schmelzen und abfließen lassen zu können.

Die Gewebeschnitte wurden immunhistochemisch auf folgende Antigene untersucht: TNF α , IL-1 β , IL-6, CD 68, CD 45 und CD 3.

Jedes der sechs Antigene wurde dabei getrennt auf den Schnittpräparaten der 4 Gruppen getestet. Schnittpräparate von Milz, Lunge und Tonsille dienten als Positivkontrolle.

Sämtliche Färbungen erfolgten in der Reihenfolge: Entparaffinierung und Hitze-induzierte Demaskierung, Peroxidase Block, Primärantikörper, Sekundärantikörper, Chromogen und Gegenfärbung, Entwässerung und Eindeckung.

Im ersten Schritt wurden die Schnitte in einer absteigenden Alkoholreihe (Xylol 2 x 10 min., 100 % 2 x 10 min., 96 % 2 x 10 min., 50 % 5 min., abschließend dest. Wasser) entparaffiniert und entwässert, um Hintergrundfärbungen durch Paraffin zu vermeiden. Durch Formalin maskierte Antigene wurden in einer EDTA Pufferlösung in einer Mikrowelle (700 W, 3 x 5min) zum Kochen gebracht und demaskiert. Nach Abkühlung und Fixation des Objektträgers wurden die Schnitte erneut in einer Waschpufferlösung gewaschen.

Zur Blockade von endogenen Peroxidasen folgte eine 4-minütige Behandlung mit 3% H₂O₂, diese Lösung wurde im Anschluss erneut 3 x über 2 Minuten im Waschpuffer ausgewaschen.

Vor den nun folgenden Primärantikörperfärbung wurden die erforderlichen Konzentrationen der Antikörper getestet (Tabelle 4). Alle Präparate wurden in einer Feuchtkammer mit 180 μ l des Primärantikörpers für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, gefolgt von einer erneuten Waschung vor Zugabe des Sekundärantikörpers (Dextran-Polymer-Konjugat mit HRP) mit 50 – 150 μ l des Sekundärantikörperkits für weitere 15 Minuten in der Feuchtkammer. Eine abschließende Waschung ist obligat.

Tabelle 4: Genutzte AK der Immunhistochemie mit entsprechender Verdünnung und Herstellerangabe

Primärantikörper	Verdünnung	Material	Firma
TNF α – AK	1 : 200	Anti-mouse polyklonaler Rabitt – TNF α – AK 100 μ g / 200 μ l	Biorbyt Ltd., United Kingdom
IL-1 β – AK	1 : 150	Anti-mouse polyklonaler Rabitt – IL1 β – AK 100 μ g / 200 μ l	Biorbyt Ltd., United Kingdom
IL-6 – AK	1 : 200	Anti-mouse polyklonaler Rabitt – IL6 – AK 100 μ g / 200 μ l	Biorbyt Ltd., United Kingdom
CD 68 – AK	1 : 100	Anti-mouse polyklonaler Rabitt – CD 68 – AK 100 μ g / 200 μ l	Biorbyt Ltd., United Kingdom
CD 45 – AK	1 : 400	Anti-mouse polyklonaler Rabitt – CD 45 – AK 100 μ g / 200 μ l	Biorbyt Ltd., United Kingdom
CD 3 – AK	1 : 100	Anti-mouse polyklonaler Rabitt – CD 3 – AK 100 μ g / 200 μ l	Biorbyt Ltd., United Kingdom

Nach Inkubation mit den Sekundärantikörpern folgte die Zugabe von 50 – 100 μ l des Chromogens DAB je Präparat für 5 Minuten in der Feuchtkammer. Im letzten Waschvorgang wurden die Präparate einmalig für 3 Minuten gewaschen und dann in Aquadest überführt vor einer Gegenfärbung für 30 Sekunden mit Haematoxilin. In aufsteigender Alkoholreihe (70% 5min, 96% 5min, 100% 3x 5min, Xylol 2x 10min) wurden die Schnittpräparate entwässert, bevor diese mit Eukitt und Deckgläschen eingedeckt werden konnten. Im Anschluss erfolgte die Trocknung der Präparate im Trockenschrank bei 65°C für mind. 10 Minuten.

Nach durchlaufen dieser Färbemethode folgte die lichtmikroskopische Auswertung.

2.6.2 Histologische Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate

Die Auswertung der fixierten Präparate erfolgte anhand eines digitalen Mikroskops.

Ausgewertet wurde dabei das Synovialgewebe der sowohl linken, behandelten Kniegelenke als auch der rechten unbehandelten Kniegelenke. Hierbei wurde die Synovialmembran auf das Vorkommen von TNF α -, IL-6-, IL-1 β -, CD 68-, CD 45-, CD 3-positiven Zellen untersucht. Kniegelenke unbehandelter Tiere dienten jeweils als Negativkontrolle (= NegKo). Zellen wurden dabei als positiv gewertet, welche eine sichtbare Braunfärbung im Zytoplasma zeigten und deren Zellkern mit Hämatoxilin gegengefärbt war. In die Bewertung gingen nur positive Zellen der Synovialmembran ein. Diese wurde in Gesichtsfelder bei einer 200fachen Vergrößerung eingeteilt und jede positive Zelle einzeln gezählt.

2.6.2 Immunhistochemische Analyse der Organe

Zur Analyse der systemischen Auswirkungen von Metallionen und Metallpartikeln wurden immunhistochemische Schnittpräparate von Niere, Lunge, Leber und Milz angefertigt. Die Auswertung erfolgte analog zu 2.6.2, aufgrund der hohen Anzahl an notwendigen Schnitten aus 4 parenchymatösen Organen der Versuchstiere standen die Inflammationsparameter TNF α , IL-6 und IL-1 β im Fokus. Zellen wurden dabei als positiv gewertet, welche eine sichtbare Braunfärbung im Zytoplasma zeigten und deren Zellkern mit Hämatoxilin gegengefärbt war. Die Schnitte wurden in Gesichtsfelder bei einer 200fachen Vergrößerung eingeteilt und jede positive Zelle einzeln gezählt.

2.7 Statistik

2.7.1 Statistische Auswertung Intravitalmikroskopie und Histologie

Die Auswertung erfolgte anhand der Software SPSS Statistics (IBM SPSS Statistics 23). Es wurde als multivarianter Test für unabhängige Stichproben die Kruskal-Wallis-Analyse verwendet. Sich daraus ergebende signifikante Ergebnisse (Signifikanzniveau $p < 0,05$) zwischen den Versuchsgruppen wurden als Post-hoc-Test durch multiple paarweise Mann-

Whitney-U-Tests überprüft. Hierbei wurde mit Hilfe der Bonferroni-Korrektur eine Alphafehler-Kumulierung bei multiplen Vergleichen neutralisiert. Dadurch ergab sich ein adjustierter Signifikanzwert von $p < 0,0083$. Mit einem Stern (*) wurden signifikante Werte gekennzeichnet. Die Angabe des Mittelwerts „MW“ erfolgte plus / minus des Standardfehlers „SEM“. Als statistisch signifikant gilt im Folgenden der adjustierter Signifikanzwert nach Bonferroni von $p^* < 0,0083$.

Für die übersichtlichere Darstellung der Ergebnisse wurde auf Abkürzungen der Gruppennamen zurückgegriffen:

- PBS = Kontrollgruppe mit phosphatgepuffertes Salzlösung
- (UHMW) PE = (ultrahochmolekulargewichtiges) Polyethylen
- MI = Metallionen-Gruppe
- MP = Metallpartikel-Gruppe

Die grafische Darstellung der Werte erfolgte durch Box-Plots und Balkendiagramme.

2.7.2 Statistische Auswertung Immunhistochemie

Die Auswertung erfolgte anhand der Software SPSS Statistics. Es wurde als multivarianter Test für unabhängige Stichproben die Kruskal-Wallis-Analyse verwendet. Dabei galten p-Werte kleiner 0,05 als statistisch signifikant und wurden durch die Bonferroni-Korrektur angepasst. Die graphische Ergebnisdarstellung erfolgte anhand von Boxplots. Die Abkürzung der Gruppennamen in den graphischen Darstellungen erfolgte analog zu 2.7.2:

- PBS = Kontrollgruppe mit phosphatgepuffertes Salzlösung
- (UHMW) PE = (ultrahochmolekulargewichtiges) Polyethylen
- MI = Metallionen-Gruppe
- MP = Metallpartikel-Gruppe

3. Ergebnisse

3.1 Partikelanalyse

3.1.1 Partikelanalyse der Metallpartikel

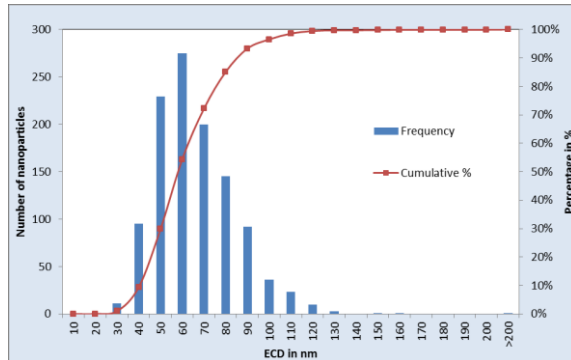


Abbildung 15: Größenhistogramm der generierten Partikel

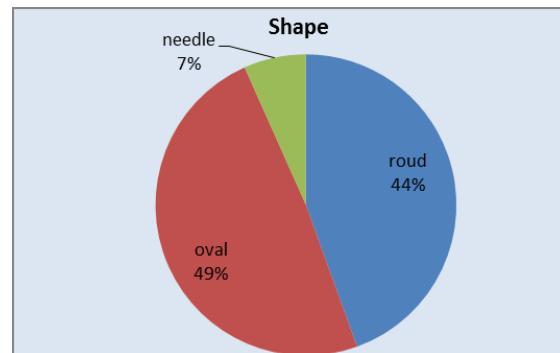


Abbildung 16: Formverteilung der generierten Partikel

Die generierten Partikel wiesen eine mittlere Größe im Nanometerbereich (Abb. 15, mittlerer ECD: $61,25 \pm 18,47$ nm) bei einem Aspect Ratio von $1,69 \pm 0,66$ und einer Rundheit von $0,64 \pm 0,16$ auf. Die Partikelform war somit überwiegend oval und rund mit einem kleinen Anteil nadelförmiger Partikel (Abb. 14).

Allerdings führte die starke Konzentration der Metallpartikel in der wässrigen Lösung unweigerlich zu einer Agglomerationstendenz der Partikel, die sich auch nicht durch die Anwendung weiterer physikalischer Verfahren (z.B. Ultraschall) aufheben ließ. Dies wird auch anhand der Abb. 16 deutlich, wo sich mit steigender Partikelkonzentration auch eine zunehmende Agglomerationstendenz erkennen lässt.

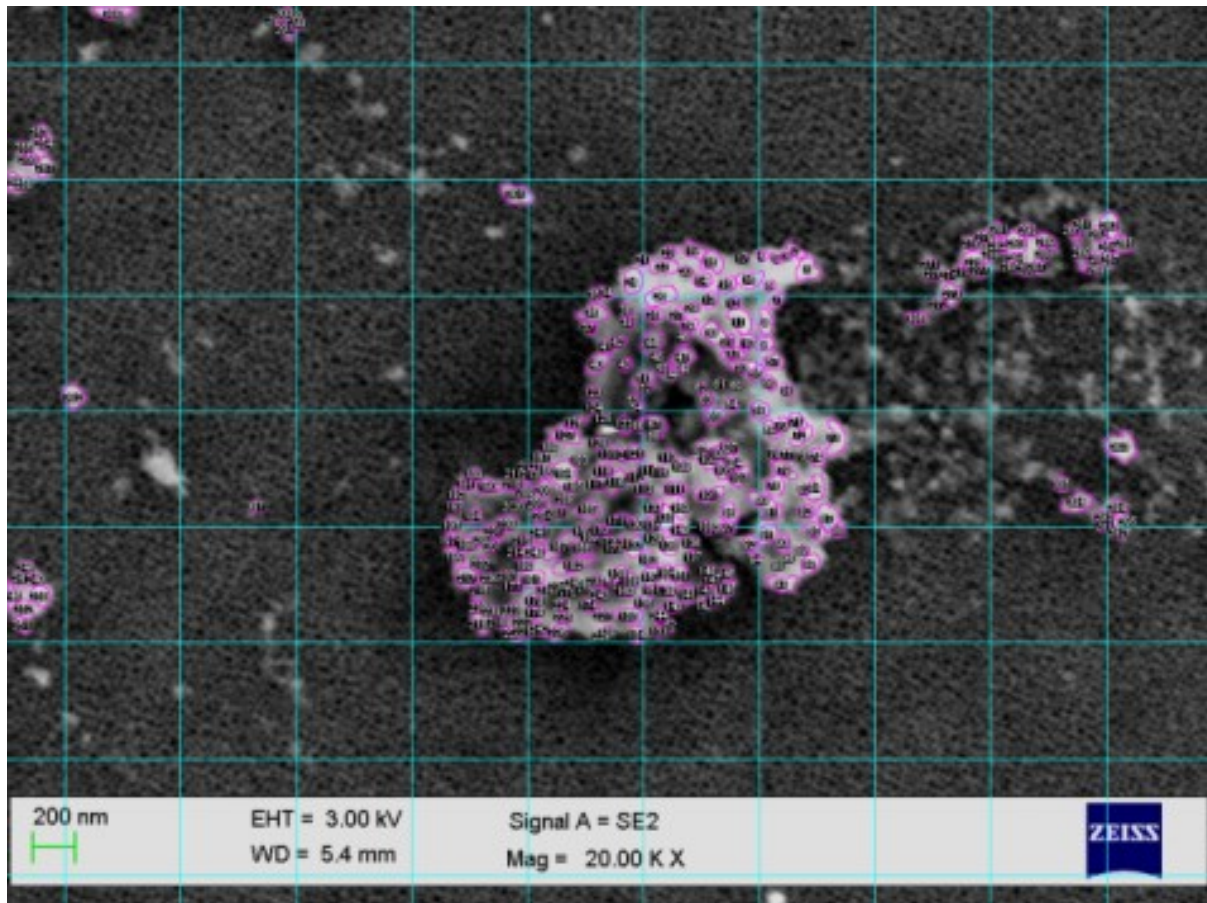


Abbildung 17: Isolierte Metallpartikel mit Agglomeratbildung

3.1.2 Partikelanalyse der Polyethylenpartikel

Die Endotoxinelimination der PE Partikel erfolgte nach einer im Vorfeld etablierten Methode mittels Ultrazentrifugation (177). Eine Endotoxinfreiheit konnte nach Protokoll erreicht werden, jedoch konnten nicht die notwendigen Mengen/Konzentrationen an endotoxinfreien PE Partikeln, um den notwendigen Bedarf für die geplanten Tierversuche abzudecken. Daher musste auf kommerziell erwerbliche Partikel gewechselt werden (Project Number UF-PE-03-15 UHMWPE GUR 1020, BioEngineering Solutions Inc., Oak Park, USA).

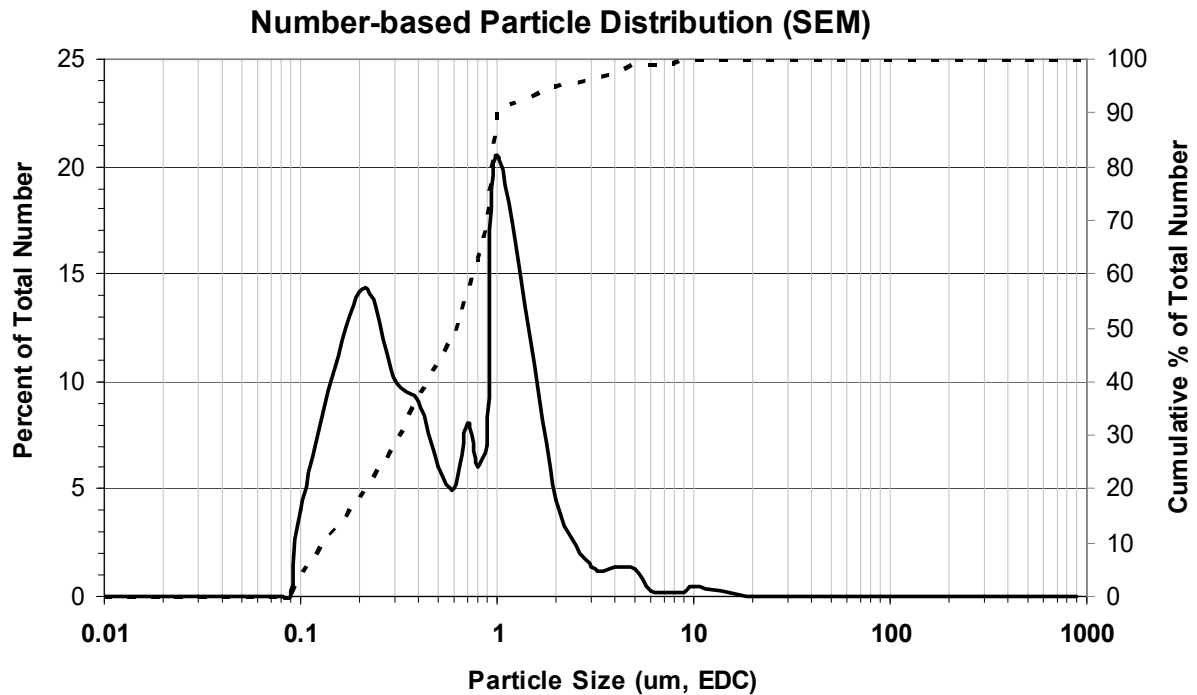


Abbildung 18: Die erworbenen Partikel entsprachen folgenden Größenangaben seitens des Herstellers: Mean Particle Size 1,07 µm, Average Aspect Ratio 1,62, Average Roundness 0,66, Average Form Factor 0,71, Average Perimeter 4,60 µm.

3.2 Tierversuche

3.2.1 Kniegelenksdurchmesser

Nach Vergleich der Mittelwerte ergab sich eine signifikante Zunahme des Kniegelenksdurchmessers in der Metallpartikelgruppe ($0,6 \text{ mm} \pm 0,2$; $p = 7,25e^{-04}$) und in der Metallionengruppe ($0,2 \text{ mm} \pm \text{SEM } 0,1$; $p = 0,002$) im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe ($0,0 \text{ mm} \pm 0,0$). Auch bei der Injektion von UHMWPE-Partikeln ($0,1 \text{ mm} \pm 0,0$; $p = 0,218$) konnte eine Zunahme des Kniegelenksdurchmessers beobachtet werden, jedoch nicht statistisch signifikant (Tabelle 5).

Tabelle 5: Mittelwert und Standardfehler der Zunahme des Kniegelenksdurchmessers an Tag 7 in mm. * = $p < 0,0083$.

	PBS	PE	MI*	MP*
	n = 10	n = 10	n = 10	n = 10
MW ± SEM	0,0 ± 0,0	0,1 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,6 ± 0,2

3.2.2 Intravitalmikroskopie

3.2.2.1 Zahl adhärenter Zellen

In den Gruppen PE Partikel ($11,8 \pm 1,6$; $p = 0,043$) und Metallpartikel ($20,5 \pm 4,8$; $p = 0,019$) wurden höhere Werte bei der Zahl adhärenter Zellen im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet. Dieser Unterschied konnte bei einer explorativen Testung ($p < 0,05$) als signifikantes Ergebnis gewertet werden, ein signifikantes Ergebnis bei adjustiertem p-Wert von $p < 0,0083$ konnte nicht erzielt werden (Abbildung 18).

Keinen Hinweis auf Signifikanz in jeglicher Weise ergab die Zahl der adhärenter Zellen in der Metallionengruppe ($5,1 \pm 1,4$; $p = 0,123$).

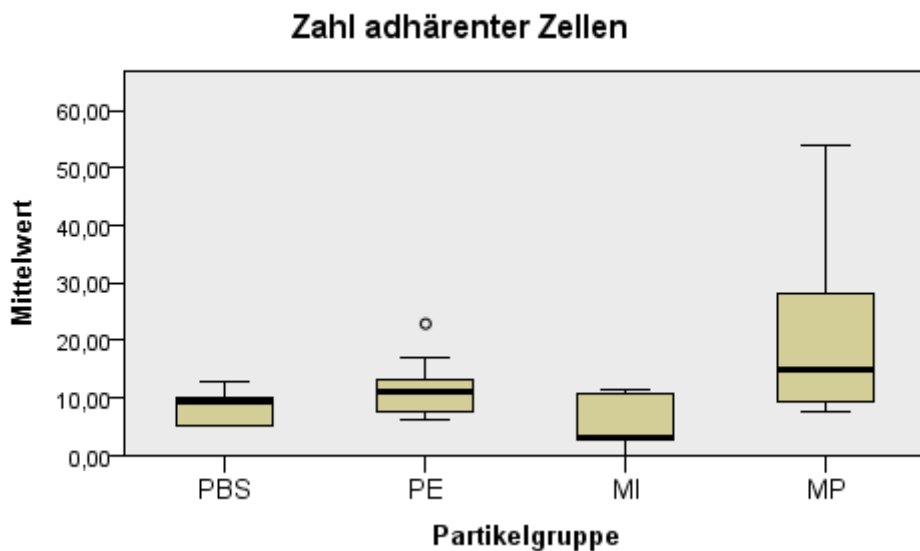


Abbildung 19: Box Plot zur Darstellung der Zahl der adhärenter Zellen in der Intravitalmikroskopie. Die Metallpartikelgruppe verzeichnet einen deutlich höheren Wert an adhärenter Zellen im Vergleich zu allen anderen Gruppen ($p = 0,019$).

3.2.2.2 Fraktion rollender Leukozyten

Mittelwertvergleich Fraktion rollender Leukozyten

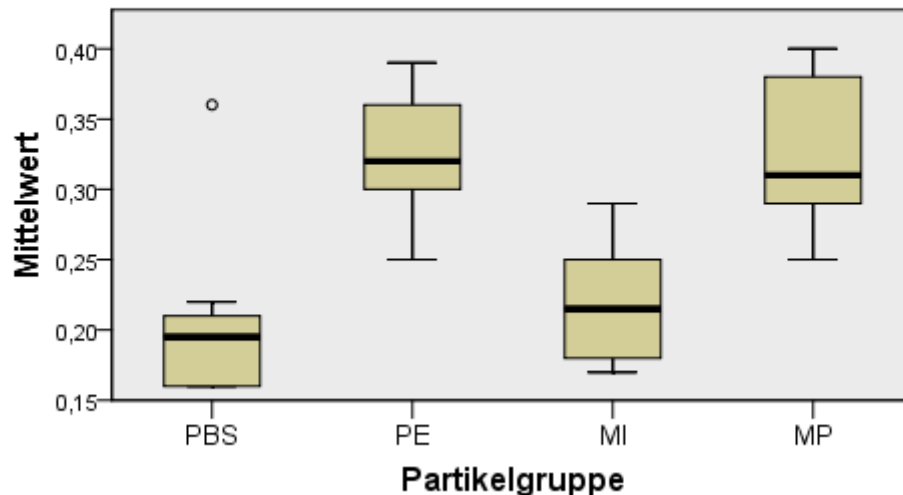


Abbildung 20: Box Plot Darstellung der Fraktion rollender Leukozyten. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Leukozytenfraktion in der Metallpartikel- und der Polyethylengruppe im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,0083$)

Bei der Messung der Fraktion rollender Leukozyten ergab sich ein statistisch signifikanter Anstieg in den Gruppen Polyethylen ($0,32 \pm 0,013$; $p < 0,0083$) und Metallpartikel ($0,32 \pm 0,016$; $p < 0,0083$) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Die Injektion von Metallionen führte zu einer numerischen Zunahme der Fraktion rollender Leukozyten, jedoch blieb hier eine statistische Signifikanz aus ($0,22 \pm 0,012$; $p = 0,190$).

3.2.2.3 Flussgeschwindigkeit

Die kapillare Flussgeschwindigkeit der korpuskularen Blutbestandteile, gemessen an den passierenden Erythrozyten, nahm in allen Gruppen mit soliden Partikelinjektionen statistisch signifikant ab. In der Polyethylen Gruppe ergab sich ein Wert von $4,79 \text{ mm/s} \pm 0,18$ ($p < 0,0083$), in der Metallpartikel Gruppe eine mittlere Flussgeschwindigkeit von $5,52 \text{ mm/s} \pm 0,30$ ($p < 0,0083$). Tabelle 5 fasst diese Ergebnisse zusammen.

Tabelle 6: Mittlere Flussgeschwindigkeit in mm/s. Signifikante Abnahme der Geschwindigkeit in den Gruppen PE und MP (* = $p < 0.0083$).

	PBS n = 10	PE* n = 10	MI n = 10	MP* n = 10
MW ± SEM	7,17 ± 0,32	4,79 ± 0,18	6,78 ± 0,50	5,52 ± 0,30

3.2.2.4 Funktionelle Kapillardichte

Die Injektion von Polyethylen- und Metallpartikeln führte in diesen beiden Gruppen zu einer tendenziellen Zunahme der funktionellen Kapillardichte, auch wenn ein statistisch signifikantes Ergebnis nach Bonferroni-Korrektur ausblieb. Die Infiltration von Metallionen schien im Vergleich zur Kontrollgruppe keinerlei biologische Reaktionen auszulösen, welche eine Zunahme der funktionellen Kapillardichte mit sich bringen (Tabelle 7).

Tabelle 7: In keiner Gruppe konnte eine statistisch signifikante Zu- oder Abnahme der Kapillardichte gemessen werden.

	PBS n = 10	PE n = 10	MI n = 10	MP n = 10
MW ± SEM	7,17 ± 0,32	4,79 ± 0,18 (p = 0,03)	6,78 ± 0,50 (p = 0,247)	5,52 ± 0,30 (p = 0,023)

3.3 Histologische Analysen

3.3.1 Histologische Auswertung der murinen Kniegelenke

3.3.1.1 Histopathologischer Score nach Brackertz

Die semiquantitative Auswertung nach Brackertz zeigte eine signifikante Zunahme des Scores in der Metallpartikel-, (MW $3,6 \pm \text{SEM } 0,2$; $p^* < 0,001$), der Polyethylenpartikel- (MW $2,5 \pm \text{SEM } 0,2$; $p^* = 0,002$) und der Metallionengruppe (MW $2,3 \pm \text{SEM } 0,2$; $p^* = 0,003$) zu. Der Score der PE-Gruppe und der Metallionengruppe erreicht jedoch keine Signifikanz.

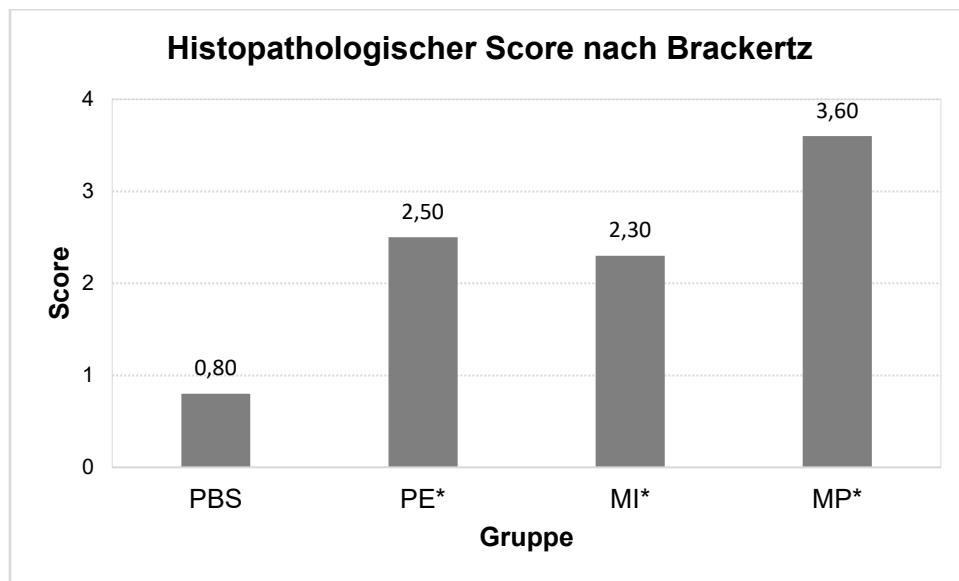


Abbildung 21: Der Brackertz-Score ergab eine statistisch signifikante Zunahme der synovialen Reaktion in der PE und der MP Gruppe (* = $p < 0,0083$).

3.3.1.2 Dicke der Synovialmembran

Die Dicke der Synovialmembran steigerte sich in der Metallpartikel ($187,3 \mu\text{m} \pm 44,4$; $p < 0,0083$) signifikant und war gegenüber der Kontrollgruppe um mehr als das 10fache erhöht. Tabelle 8 veranschaulicht die deutliche Zunahme der synovialen Dicke. Eine geringere, jedoch ebenfalls statistisch signifikante Zunahme der Dicke der Synovialmembran ergab sich in den Gruppen Polyethylen ($46,8 \mu\text{m} \pm 7,1$; $p < 0,0083$) und Metallionen ($41,3 \mu\text{m} \pm 3,9$; $p < 0,0083$).

Tabelle 8: Vergleich der Dicke der Synovialmembran der unterschiedlichen Gruppen. Beachtenswert ist die deutliche Zunahme in der Metallpartikelgruppe, wobei sich alle Gruppen statistisch signifikant von der Kontrollgruppe unterscheiden (= $p < 0,0083$).*

	PBS n = 10	PE * n = 10	MI * n = 10	MP * n = 10
MW ± SEM	14,6 ± 3,3	46,8 ± 7,1	41,3 ± 3,9	187,3 ± 44,4

3.3.1.3 Deskriptive Beurteilung der Kniegelenkschnitte in HE-Färbung

Analog zur Zunahme der Dicke der Synovialmembran zeigt sich mikroskopisch in der HE-Färbung auffällig eine deutliche Reaktion des Synovialgewebes in der Metallpartikelgruppe. Das expansiv wachsende Gewebe ausgehend von der Synovialis wächst destruktiv an/in den Knochen und den Gelenkknorpel. Es zeigen sich Auffälligkeiten im Knochenmark, ebenso wie in der Metallionengruppe. Auffallend sind die knöchernen Umbaureaktionen in der PE und MP Gruppe, sowie die deutliche Periostreaktion in der MP Gruppe (Abbildung 21). Tabelle 9 inkludiert Schnitte durch die murinen Kniegelenke in HE-Färbung sämtlicher Gruppen. Die deutliche Gewebszunahme mit entsprechenden angrenzenden Reaktionen ist äußerst auffällig.

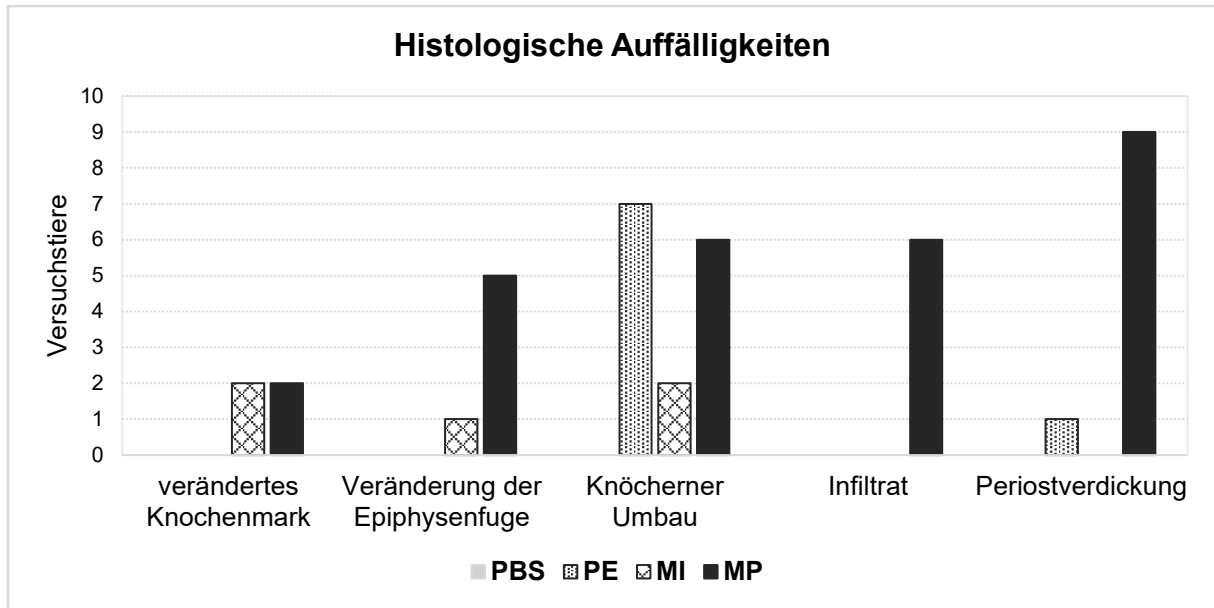
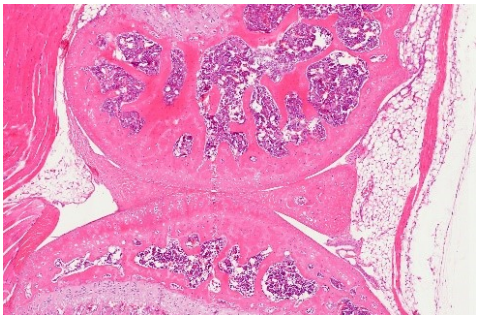
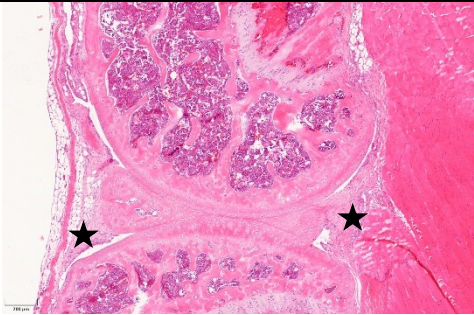
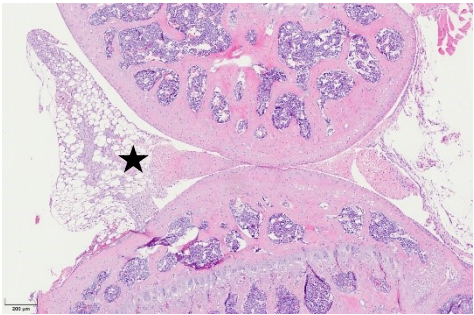
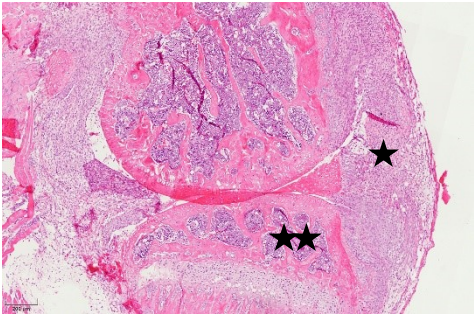


Abbildung 22: Beobachtung periartikulärer Veränderungen nach Infiltration, quantifiziert anhand des Auftretens bei den Versuchstieren.

Tabelle 9: HE Färbungen von Schnittpräparaten sämtlicher Gruppen. Kennzeichnungen im Bild: * = synoviale Reaktion, ** = ossäre Reaktion

	HE-Färbung des linken Kniegelenks in 5-facher Vergrößerung	Beschreibung
PBS		In der Übersichtsdarstellung eines Kniegelenks der Kontrollgruppe zeigt sich keine wesentliche Veränderung, das Gelenk mitsamt Binnenstrukturen kommt nativ zur Darstellung.

<p>PE</p>		<p>Der Schnitt durch ein Kniegelenk der PE Gruppe zeigt geringe knöcherne Umbauvorgänge und eine Zunahme der Dicke der Synovialmembran (*)</p>
<p>MI</p>		<p>Die Schnitte durch die Präparate der Metallionengruppe zeigen eine ähnliche Veränderung der Synovialmembran (*), verglichen mit der PE Gruppe mit einer Zunahme der Reaktion verglichen mit der Kontrollgruppe.</p>
<p>MP</p>		<p>Die synoviale Verdickung ist nicht zu übersehen (*), auffallend vor allem auch die ossären / periostalen Reaktionen mit entsprechenden Desktruktionen (**)</p>

3.4 Immunhistochemische Analysen

Eine immunhistochemische Anfärbung der histologischen Schnitte der PE-Gruppe gelang trotz zahlreicher Wiederholungen und Verfahrensänderungen nicht und war somit nicht auswertbar. Folglich fließen diese nicht in die Ergebnisse ein. Die folgende Tabelle fasst die in den folgenden detaillierten Ausführungen zusammen.

Tabelle 10: Zusammenfassung der statistischen Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse. **Fett hervorgehoben** stellt eine signifikante Mehrexpression des entsprechenden Zytokins gegenüber den Vergleichsgruppen dar, entsprechend $p < 0,05$.

	Linke Kniegelenke	Rechte Kniegelenke
TNF α	MP > PBS	MP > PBS
IL-6	MP > PBS	Kein signifikanter Unterschied
IL-1 β	MP > PBS	MP > PBS
CD 68	MP > PBS, MI	Kein signifikanter Unterschied
CD 45	MP + MI > PBS	MI > PBS, MP
CD 3	Kein signifikanter Unterschied	Kein signifikanter Unterschied

3.4.1 Immunhistochemische Analyse des linken Kniegelenks

3.4.1.1 Expression TNF α – positiver Zellen

Die MP-Gruppe (Median von 139,63 positiven Zellen/Gesichtsfeld) zeigte eine statistisch signifikante Überexpression von TNF α -positiven Zellen im Vergleich zur PBS-Gruppe ($p = 0,000$). Hinsichtlich der MI-Gruppe (Median von 15,65 positiven Zellen/Gesichtsfeld) konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im direkten Vergleich zur PBS-Gruppe ($p = 0,056$) und zur MP-Gruppe ($p = 0,174$) festgestellt werden. Abbildungen 23 und 24 zeigen den signifikanten Unterschied in der Darstellung positiver Zellen zwischen der PBS Gruppe (Abbildung 23) und der MP Gruppe (Abbildung 24).

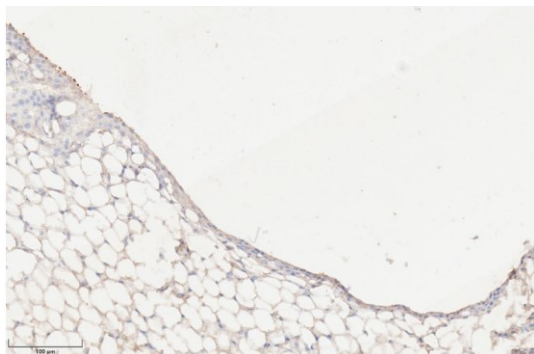


Abbildung 25 veranschaulicht die Expression von TNF α in den verschiedenen Gruppen.

Abbildung 24: Färbung eines Schnittes mit TNF α Antikörper. PBS-Gruppe, linkes Knie

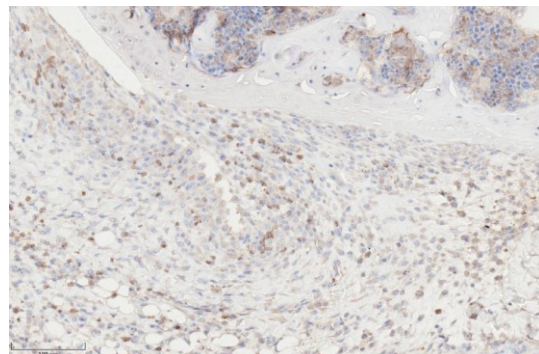


Abbildung 23: Färbung eines Schnittes mit TNF α Antikörper. MP-Gruppe, linkes Knie

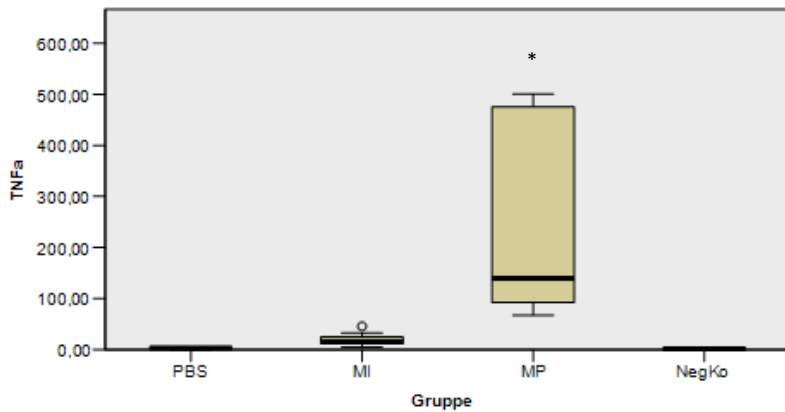


Abbildung 25: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Deutliche Mehrexpression von TNF α in der MP Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen.

* = $p < 0,05$

3.4.1.2 Expression IL-6 – positiver Zellen

Auch bei IL-6 ergab sich bei der MP-Gruppe (Median von 69,73b positiven Zellen/ Gesichtsfeld) eine starke Überexpression von IL-6-positiven Zellen im Vergleich zur PBS-Gruppe ($p = 0,000$). Hinsichtlich der MI-Gruppe (Median von 13,29 positiven Zellen/ Gesichtsfeld) ergaben sich keine relevanten Unterschiede im direkten Vergleich zur PBS-Gruppe ($p = 0,124$) und zur MP-Gruppe ($p = 0,068$).

Abbildungen 26 und 27 zeigen den Unterschied in der Darstellung positiver Zellen zwischen der PBS Gruppe (Abbildung 26) und der MP Gruppe (Abbildung 27).

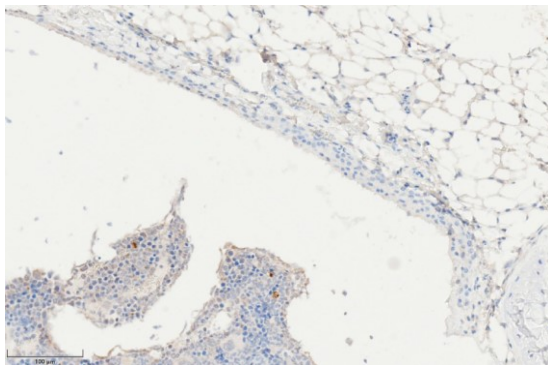


Abbildung 26: Färbung eines Schnittes mit IL-6 Antikörpern, PBS Gruppe. linkes Knie

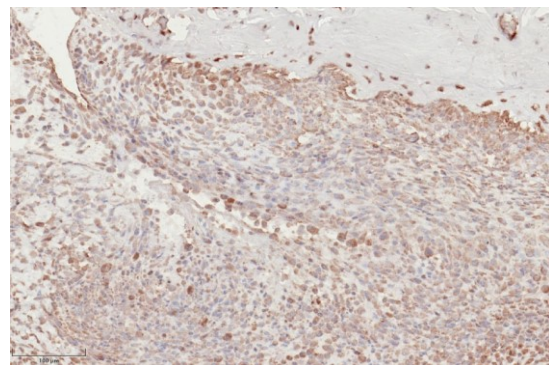


Abbildung 27: Färbung eines Schnittes mit IL-6 Antikörpern, MP Gruppe, linkes Knie

Abbildung 28 veranschaulicht die Expression von IL-6 in den verschiedenen Gruppen.

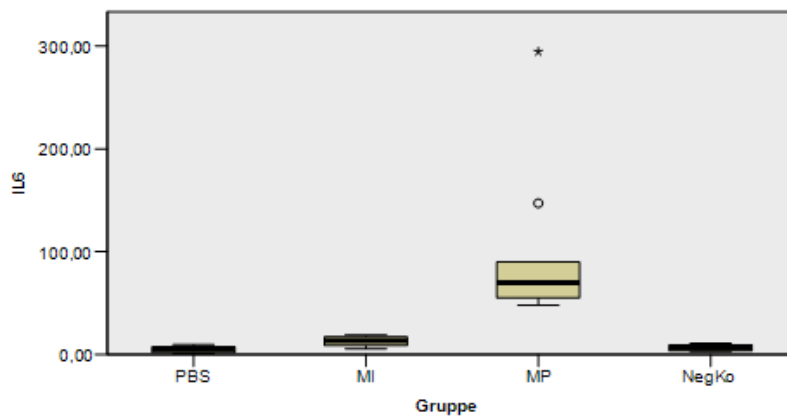


Abbildung 28: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Analog zu $TNF\alpha$ zeigt sich auch bei IL-6 eine deutliche Mehrexpression in der MP Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen.

* = $p < 0,05$

3.4.1.3 Expression IL-1 β – positiver Zellen

Analog zu $TNF-\alpha$ und IL-6 war auch die Expression von IL-1 β in der MP Gruppe hochsignifikant mehr-exprimiert (Median von 17,66 positiven Zellen/Gesichtsfeld) im Vergleich zur PBS-Gruppe ($p = 0,000$). Es konnten keine statistisch signifikanten Unterschiede im direkten Vergleich zwischen der MI-Gruppe und der PBS-Gruppe ($p = 0,420$) und zur MP-Gruppe ($p = 0,082$) festgestellt werden.

Abbildungen 29 und 30 zeigen den Unterschied in der Darstellung positiver Zellen zwischen der PBS Gruppe (Abbildung 29) und der MP Gruppe (Abbildung 30).

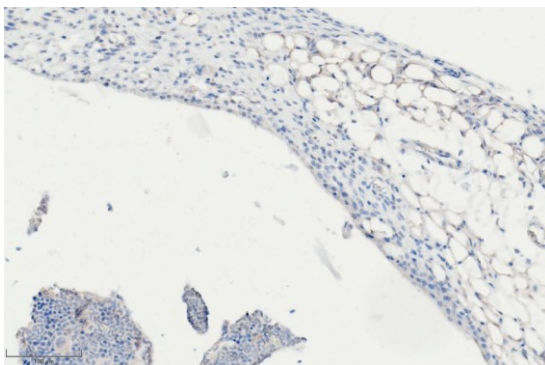


Abbildung 29: Färbung eines Schnittes mit IL-1 β Antikörpern, PBS Gruppe, linkes Knie

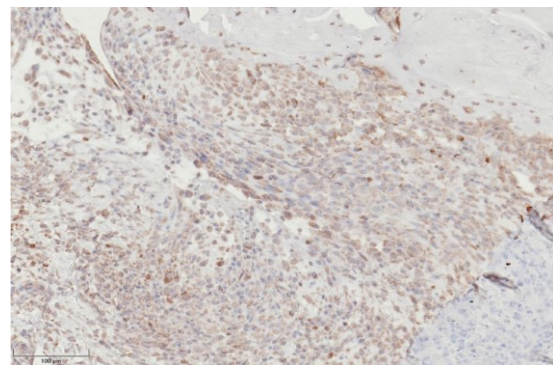


Abbildung 30_ Färbung eines Schnittes mit IL-1 β Antikörpern, MP Gruppe, linkes Knie

Abbildung 31 veranschaulicht die Expression von IL-6 in den verschiedenen Gruppen.

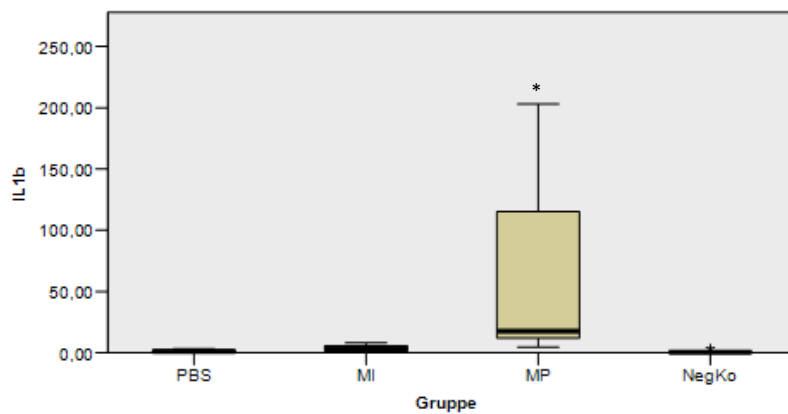


Abbildung 31: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Ähnlich wie bei den o.g. Markern fällt eine deutliche Mehrexpression von IL-1 β in der MP Gruppe auf. Nahezu keine Aktivierung bei Metallionen.

* = $p < 0,05$

3.4.1.4 Expression CD 68 – positiver Zellen

Ein ähnliches Bild, passend zu den erhöhten inflammatorischen Zytokinen unter 3.4.1.1. bis 3.4.1.3 ergibt sich bei der Expression von CD 68: Die MP-Gruppe (Median von 159,80 ^{positiven Zellen/Gesichtsfeld}) zeigte eine Überexpression von CD68-positiven Zellen im Vergleich zur PBS-Gruppe ($p = 0,000$), sowie auch zur MI-Gruppe ($p = 0,004$). Zwischen den anderen Gruppen ergaben sich keine relevanten Unterschiede.

Abbildungen 32 und 33 zeigen den deutlichen Unterschied in der Darstellung positiver Zellen zwischen der PBS Gruppe (Abbildung 29) und der MP Gruppe (Abbildung 30).

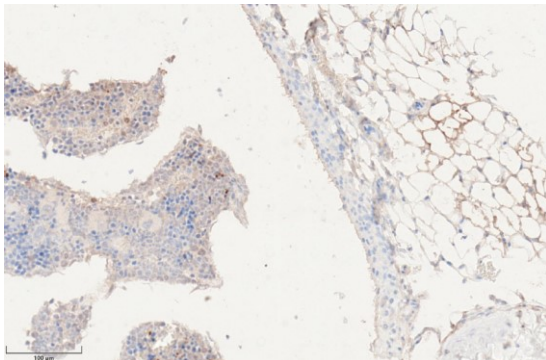


Abbildung 32: Färbung eines Schnittes mit CD 68 Antikörpern, PBS Gruppe, linkes Knie

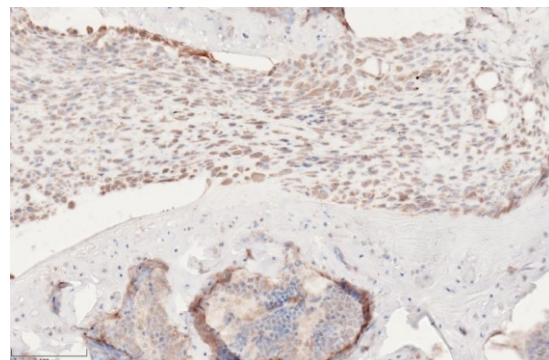


Abbildung 33: Färbung eines Schnittes mit CD 68 Antikörpern, MP Gruppe, linkes Knie

Abbildung 34 veranschaulicht die Expression von CD 68 in den verschiedenen Gruppen.

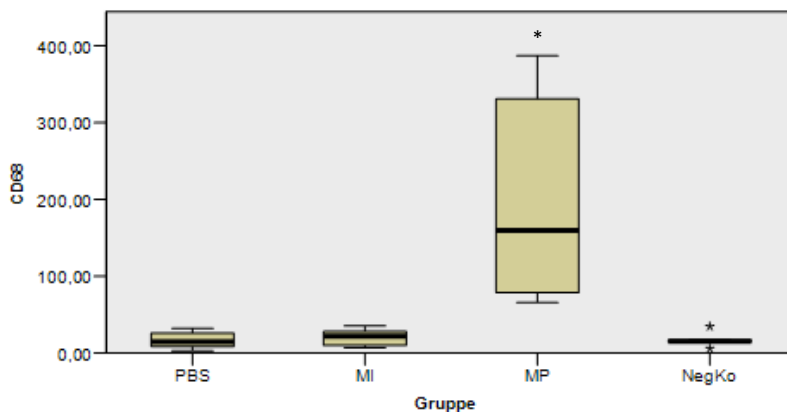


Abbildung 34: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Ähnlich wie bei den o.g. Markern fällt eine deutliche Mehrexpression von CD68 in der MP Gruppe auf. Nahezu keine Aktivierung bei Metallionen.

* = $p < 0,05$

3.4.1.5 Expression CD 45 – positiver Zellen

Die MP-Gruppe zeigte sich hinsichtlich der CD45-Expression ebenso deutlich erhöht (Median von 101,53 positiven Zellen/ Gesichtsfeld). Die MP-Gruppe zeigte somit eine deutlich statistisch signifikante Überexpression von CD45-positiven Zellen im Vergleich zur PBS-Gruppe ($p = 0,000$). Ebenso zeigte die MI-Gruppe (Median von 30,25 positiven Zellen/ Gesichtsfeld) eine statistisch signifikante Mehrexpression von CD68 gegenüber der PBS-Gruppe ($p = 0,017$).

Es gab sich kein statistisch signifikanter Unterschied im direkten Vergleich der MI-Gruppe zur MP-Gruppe ($p = 1,0$).

Abbildungen 34 bis 36 zeigen den deutlichen Unterschied in der Darstellung positiver Zellen zwischen der PBS Gruppe (Abbildung 35), der MI Gruppe (Abbildung 36) und der MP Gruppe (Abbildung 37).

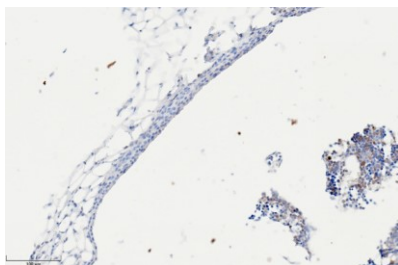


Abbildung 35: Färbung eines Schnittes mit CD45 Antikörpern, PBS Gruppe, linkes Knie

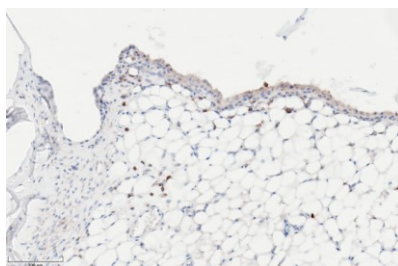


Abbildung 36: Färbung eines Schnittes mit CD45 Antikörpern, MI Gruppe, linkes Knie

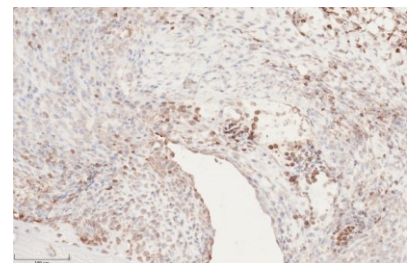
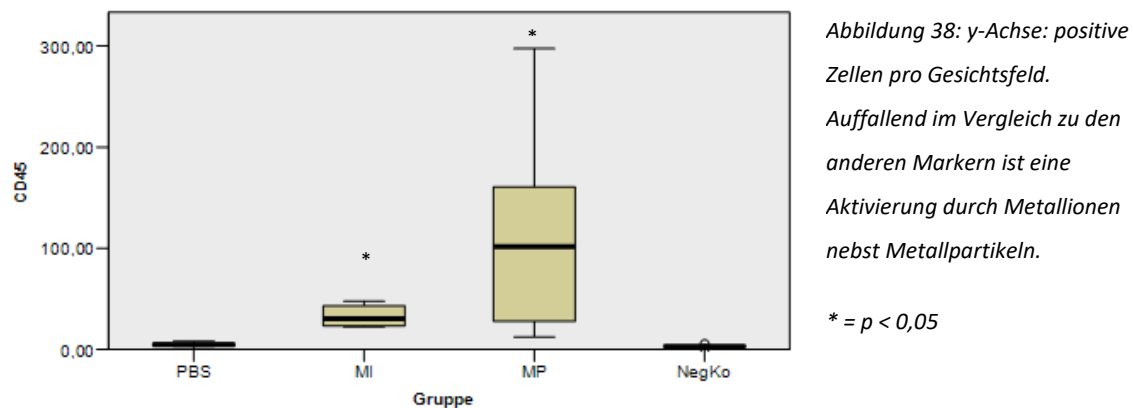


Abbildung 37: Färbung eines Schnittes mit CD45 Antikörpern, MP Gruppe, linkes Knie

Abbildung 38 veranschaulicht die Expression von CD 45 in den verschiedenen Gruppen.



3.4.1.6 Expression CD 3 – positiver Zellen

Es zeigten sich in der PBS-Gruppe keine Anfärbungsmuster von CD 3 positiv gefärbten Zellen. Dies gilt auch für die MI-Gruppe. Lediglich in der MP-Gruppe zeigte sich eine geringe Expression CD3-positiver Zellen bei einem Median von 0,13 positiven Zellen/ Gesichtsfeld). Somit ergaben sich insgesamt im direkten Gruppenvergleich hinsichtlich einer Expression CD3-positiver Zellen keine statistisch signifikanten Werte.

3.4.2 Immunhistochemische Analyse des rechten Kniegelenks

Um eine systemische Reaktion durch linksseitige Kniegelenksinfiltration darstellen zu können, folgte eine Färbung der rechten Kniegelenke aller Gruppen analog zu 3.4.1.

3.4.2.1 Expression TNF α – positiver Zellen

Immunhistochemisch zeigte sich die Expression TNF α -positiver Zellen in der MP-Gruppe statistisch signifikant erhöht gegenüber der PBS-Gruppe ($p = 0,013$). Es konnte keine signifikante Erhöhung zwischen der MI-Gruppe im direkten Gruppenvergleich festgestellt werden (MI-PBS: $p = 0,956$; MI-MP: $p = 0,267$). Abbildungen 39 und 40 veranschaulichen den Unterschied in der Darstellung positiver Zellen zwischen der PBS Gruppe (Abbildung 39) und der MP Gruppe (Abbildung 40).

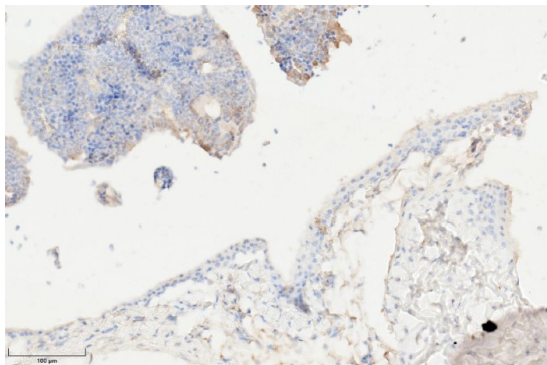


Abbildung 39: Färbung eines Schnittes mit TNF α Antikörpern, PBS Gruppe, rechtes Knie

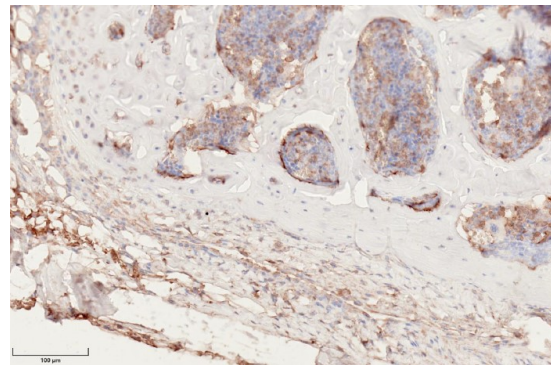


Abbildung 40: Färbung eines Schnittes mit TNF α Antikörpern, MP Gruppe, rechtes Knie

Abbildung 41 veranschaulicht die Expression von TNF α in den verschiedenen Gruppen.

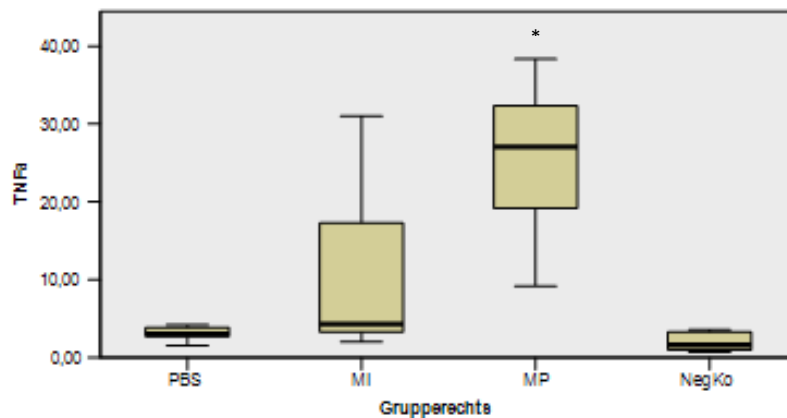


Abbildung 41: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Auffallend im Vergleich zu den anderen Markern ist eine Aktivierung durch Metallpartikel. Insg. im Vergleich zum rechten Knie geringere Expression.

* = $p < 0,05$

3.4.2.2 Expression IL-6 – positiver Zellen

In keiner Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Unterschied hinsichtlich der Expression des Zytokins IL-6 nachgewiesen werden, es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen.

3.4.2.3 Expression IL-1 β – positiver Zellen

Im Gegensatz zur IL-6 Expression konnte immunhistochemisch die Expression IL-1 β -positiver Zellen in der MP-Gruppe statistisch signifikant erhöht gegenüber der PBS-Gruppe nachgewiesen werden ($p = 0,033$). Zwischen den anderen Gruppen konnte im direkten Vergleich kein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (PBS-MI: $p = 1,0$; MI-MP: $p = 0,133$). Abbildungen 42 und 43 zeigen den Unterschied in der Darstellung positiver Zellen zwischen der PBS Gruppe (Abbildung 42) und der MP Gruppe (Abbildung 43).

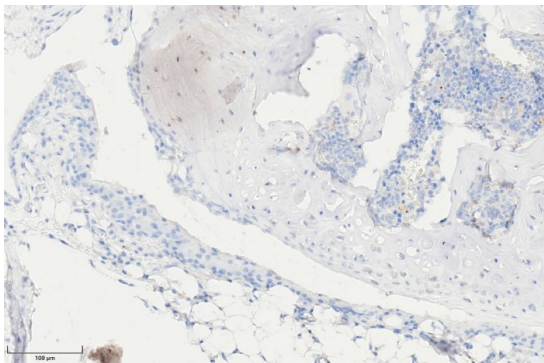


Abbildung 43: Färbung eines Schnittes mit IL-1 β Antikörpern, PBS Gruppe, rechtes Knie

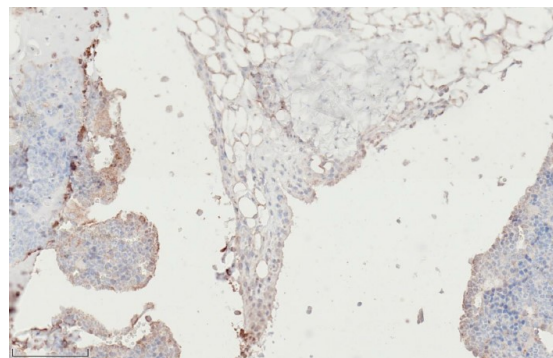


Abbildung 42: Färbung eines Schnittes mit IL-1 β Antikörpern, MP Gruppe, rechtes Knie

Abbildung 44 veranschaulicht die Expression von IL-1 β in den verschiedenen Gruppen.

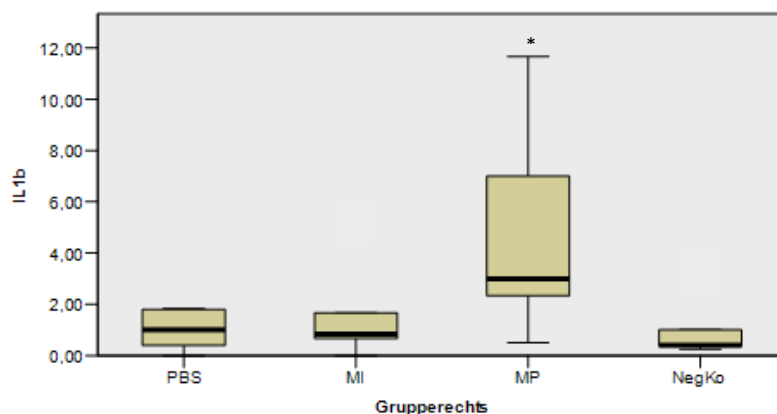


Abbildung 44: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Insgesamt schwach vermehrte Expression von IL-1 β in der MP Gruppe, aber signifikant zur PBS Gruppe.

* = $p < 0,05$

3.4.2.4 Expression CD 68 – positiver Zellen

In keiner Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Unterschied hinsichtlich der Expression des Zytokins und „Makrophagenmarkers“ CD 68 nachgewiesen werden, es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen.

3.4.2.5 Expression CD 45 – positiver Zellen

Im Rahmen der immunhistochemischen Begutachtung des Synovialgewebes zeigte sich die Expression CD45-positiver Zellen in der MI-Gruppe statistisch signifikant erhöht gegenüber allen anderen Gruppen (zu PBS: $p = 0,002$; zu MP: $p = 0,000$). Kein statistisch signifikanter Unterschied konnte im direkten Vergleich der PBS- und der MP-Gruppe untereinander

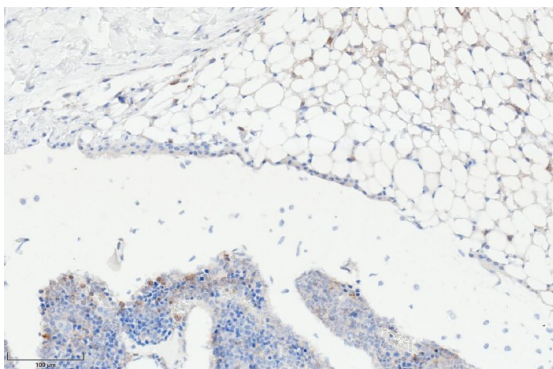


Abbildung 45: Färbung eines Schnittes mit CD45 Antikörpern, PBS Gruppe, rechtes Knie

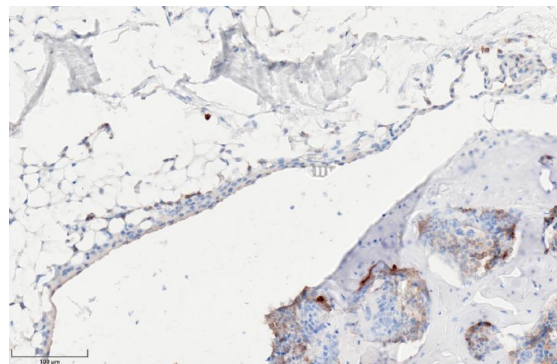


Abbildung 46: Färbung eines Schnittes mit CD45 Antikörpern, MI Gruppe, rechtes Knie

festgestellt werden ($p = 1,0$). Abbildungen 45 und 46 verdeutlichen den Unterschied in der Darstellung positiver Zellen zwischen der PBS Gruppe (Abbildung 45) und der MP Gruppe (Abbildung 46). Abbildung 47 veranschaulicht die Expression von CD 45 in den verschiedenen Gruppen.

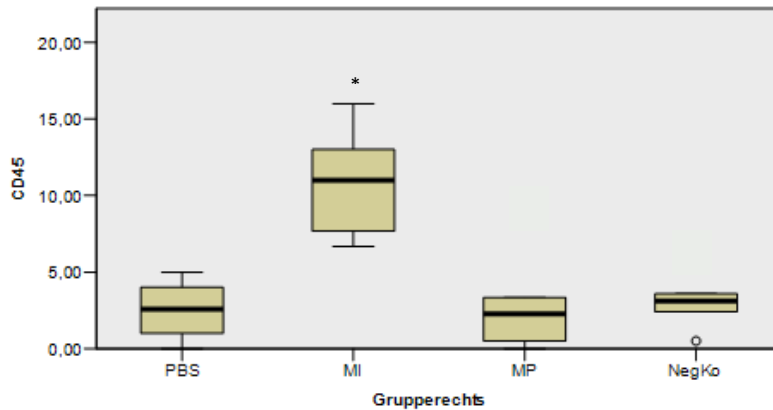


Abbildung 47: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Insgesamt schwach vermehrte Expression von CD 45 in der MI Gruppe, aber signifikant zur PBS Gruppe.

* = $p < 0,05$

3.4.2.6 Expression CD 3 – positiver Zellen

In keiner Gruppe konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein Unterschied hinsichtlich der Expression des Zytokins und „Lymphozytenmarkers“ CD 3 nachgewiesen werden, es ergab sich kein signifikanter Unterschied zwischen allen Gruppen.

3.4.3 Immunhistochemische Organanalysen

Die Ergebnisse sind im Gegensatz zu den Auswertungen am Kniegelenk sehr heterogen und fallen für sämtliche Organe unterschiedlich aus. Die statistischen Angaben erfolgen unter Berücksichtigung einer Bonferroni-Korrektur.

3.4.3.1 Expression inflammatorischer Zytokine – Niere

Im Gegensatz zu den Analysen der Kniegelenke zeigt sich an der Niere vor allem eine Toxizität von Metallionen. Die Stimulation mit Metallionen führte im Vergleich zu den anderen Gruppen, insbesondere hinsichtlich der Parameter $TNF\alpha$ und IL6, zu einer vermehrten Expression der inflammatorischen Zytokine.

$TNF\alpha$: Es ergaben sich unterschiedliche Signifikanzen zwischen den einzelnen Gruppen: So war der Unterschied der MI-Gruppe zur PBS Kontrollgruppe am größten ($p < 0,001$). signifikant waren die Unterschiede der Ergebnisse zwischen der PBS Kontrollgruppe und der PE Gruppe ($p = 0,008$). Wesentlich ist auch der die deutliche vermehrte Zytokinexpression der MI Gruppe

im Vergleich zur MP Gruppe ($p < 0,001$). Die Ergebnisse für $TNF\alpha$ sind in Abbildung 48 veranschaulicht.

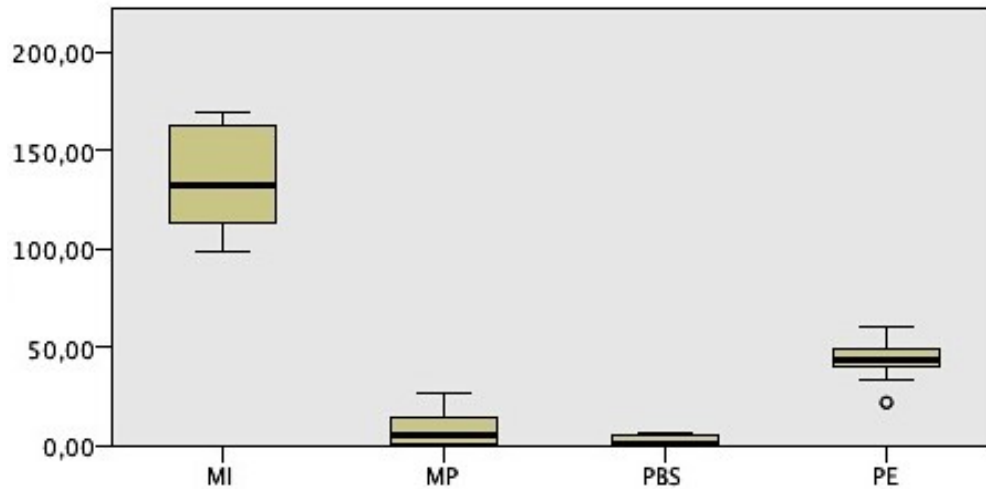


Abbildung 48: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von $TNF\alpha$ in der Niere. Die Ergebnisse zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied von MI zu allen anderen Gruppen.

IL-6: Bei der Expression von IL-6 zeigt sich ein ähnliches Muster, jedoch ergibt sich hier auch eine erhöhte Expression in der MP Gruppe. Die Unterschiede zur MP und MI Gruppe zur PBS Kontrollgruppe waren hochsignifikant unterschiedlich (je $p < 0,001$). Vermehrt war die Expression von IL6 in der MI Gruppe verglichen mit der PE Gruppe ($p = 0,006$), wie in Abbildung 49 dargestellt.

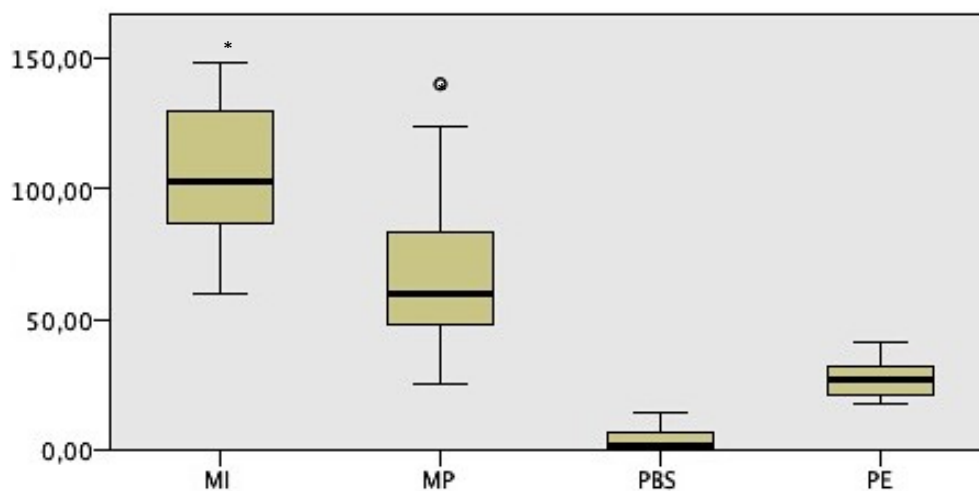


Abbildung 49: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von IL6 in der Niere. Die Ergebnisse zeigen eine vermehrte Expression von IL6 in der MI und der MP Gruppe. * = $p < 0,001$.

Im Hinblick auf IL-1 β zeigten sich in allen Gruppen kaum angefärbte Zellen, allenfalls in der Metallionengruppe war die Expression im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe erhöht (Abbildung 50).

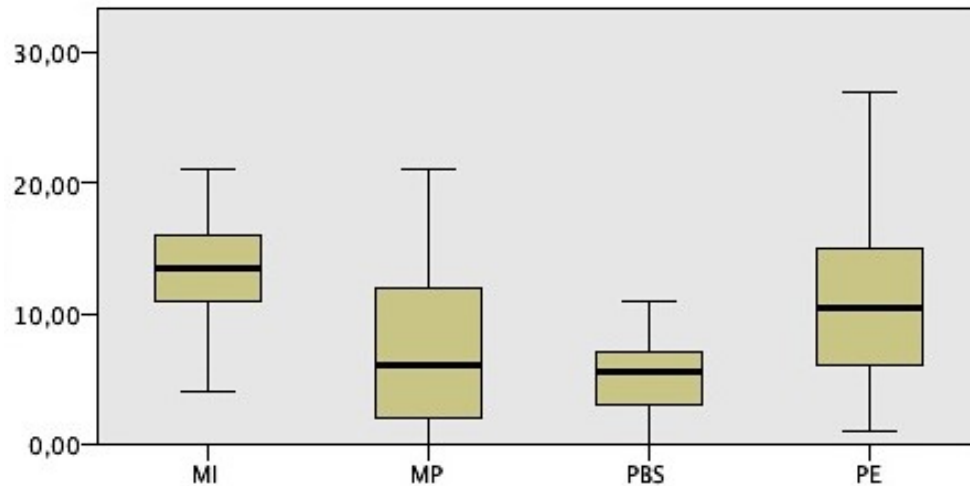


Abbildung 50: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von IL-1 β in der Niere. Die Ergebnisse zeigen eine eine nur geringe Expression des Zytokins in allen Gruppen.

3.4.3.2 Expression inflammatorischer Zytokine – Leber

In der Leber zeigte sich ein unterschiedliches Verteilungsmuster der exprimierten Zytokine im Vergleich zum Expressionsmuster der Niere. Die Ergebnisse waren gruppenspezifisch äußerst heterogen. So kam es nur in der MP Gruppe zu einer deutlichen Expression von TNF α ($p = 0,045$), die Expression von IL6 war deutlich gesteigert in der MI- und interessanterweise der PE Gruppe (jeweils im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe für PE $p = 0,004$, für MI $p < 0,001$). Bei IL-1 β zeigte sich eine vermehrte Expression bei allen Versuchsgruppen im Vergleich zu der PBS Kontrollgruppe (PE $p < 0,001$, MI $p < 0,041$, MP $p < 0,045$). Sämtliche Ergebnisse sind den Abbildungen 51-53 veranschaulicht.

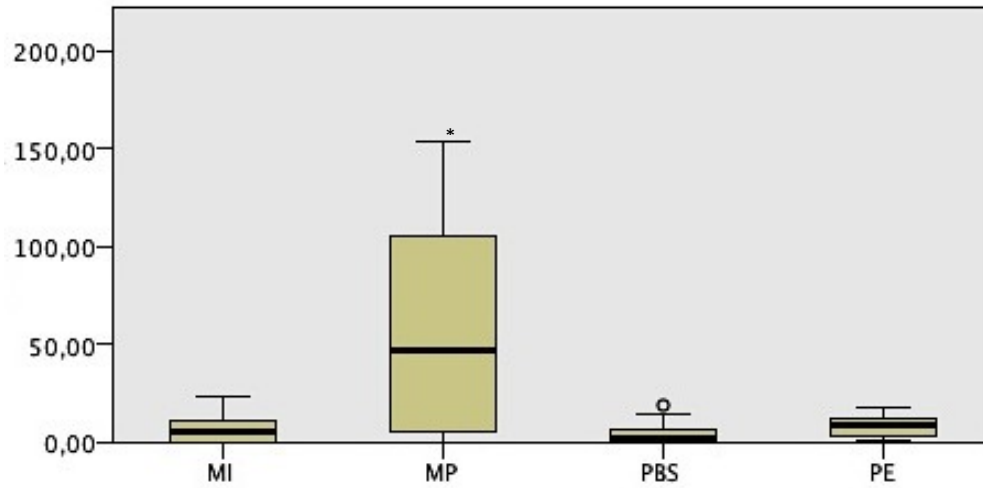


Abbildung 51: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von TNF α in der Leber. Die Ergebnisse zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied von MP zu allen anderen Gruppen.

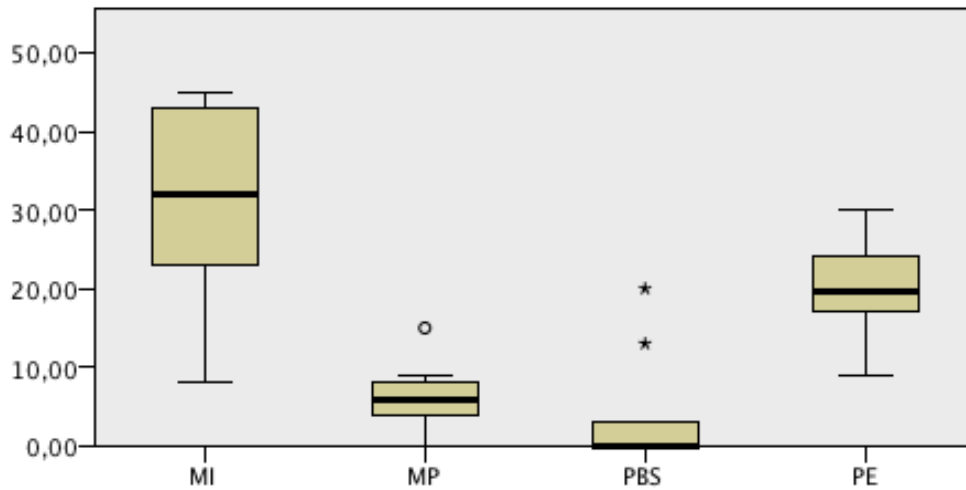


Abbildung 52: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von IL6 in der Leber. Die Ergebnisse zeigen eine vermehrte Expression von IL6 in der MI und der PE Gruppe. * = $p < 0,001$.

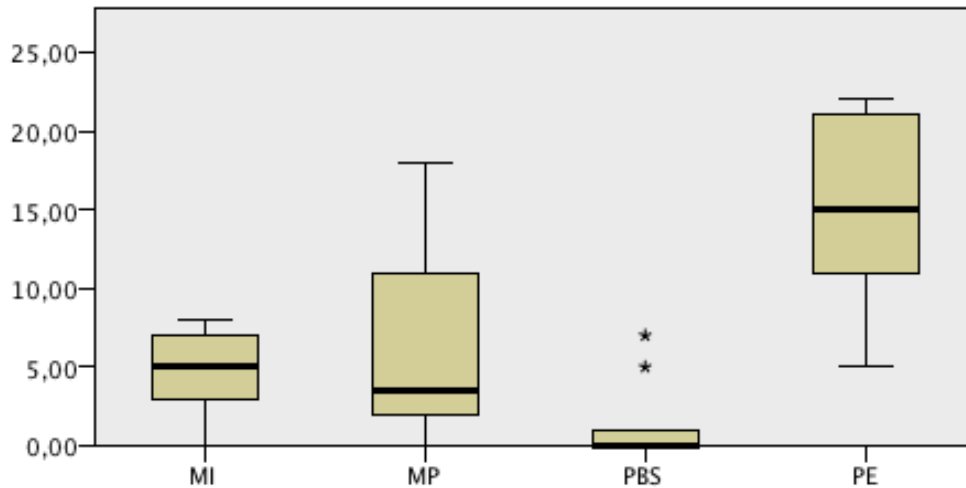


Abbildung 53: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von IL-1 β in der Leber. Die Ergebnisse zeigen eine nur geringe Expression des Zytokins in allen Gruppen, am meisten jedoch in der PE Gruppe.

3.4.3.3 Expression inflammatorischer Zytokine – Milz

In der Milz konnten bei den Versuchstieren nur mäßig positiv gefärbte Zellen bei den inflammatorischen Zytokinexpressionsmustern detektiert werden. Dennoch ergaben sich signifikante Unterschiede, besonders bei der Expression von IL6. Die Expression in der MP Gruppe war signifikant erhöht (PBS – MP $p = 0,027$; MI – PE $p = 0,03$; MI – MP $p = 0,002$), wobei sich die Expression von IL6 in der PE Gruppe gegenüber der MI Gruppe erhöht zeigte. Hinsichtlich IL1 β ergaben sich keine statistischen Unterschiede. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 54-55 dargestellt.

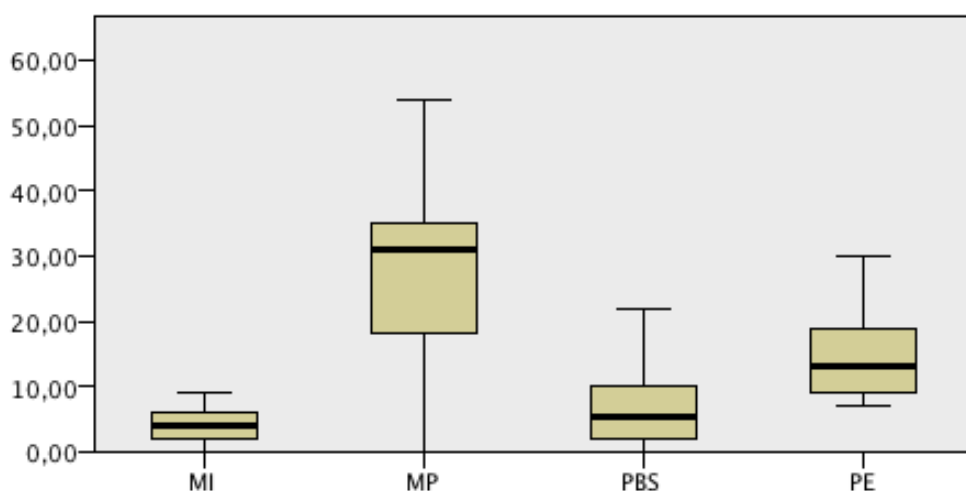


Abbildung 54: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von IL6 in der Miz. Die Ergebnisse zeigen eine vermehrte Expression von IL6 in der MP und der PE Gruppe gegenüber der MI Gruppe.

3.4.3.4 Expression inflammatorischer Zytokine – Lunge

In der Lunge konnte nur das Zytokin $\text{TNF}\alpha$ ausgewertet werden. Im Vergleich zu allen anderen Organen zeigten sich hier eine stark erhöhte Anzahl an Zellen, die als positiv detektiert werden konnten (y-Achse, Abbildung 55). Vermehrte Färbungen ergaben sich in allen Versuchsgruppen im Vergleich zur PBS Gruppe, jedoch zeigte die MP Gruppe das ausgiebigste Expressionsmuster von $\text{TNF}\alpha$ mit ca. 2000 Zellen / Gesichtsfeld. Dies stellt zugleich die stärkste immunhistochemische Reaktion der Organe auf die im Versuch genutzten Stimulantien dar. Die Lunge der Versuchstiere reagierte entsprechend hochreaktiv mit der Expression von $\text{TNF}\alpha$.

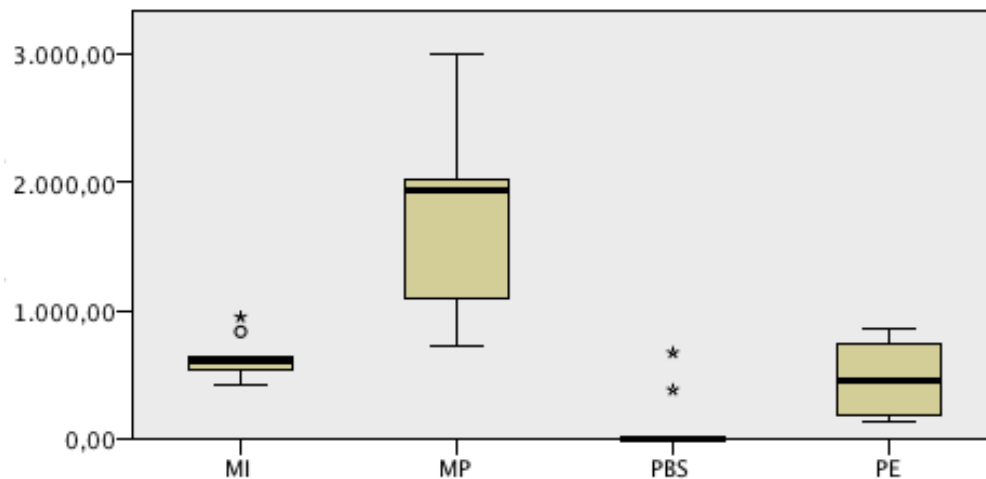


Abbildung 55: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von $\text{TNF}\alpha$ in der Leber. Die Ergebnisse zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied von MP zu allen anderen Gruppen. Beachtenswert ist die hohe Skalierung der y-Achse, bedingt durch die insg. Hohe Anzahl an positiv gefärbten Zellen. * = $p < 0,001$.

4. Diskussion

Die aseptische Prothesenlockerung ist nach wie vor der häufigste Grund für Revisionsoperationen nach endoprothetischen Gelenkersatz (78). Ursächlich sind an dem Prozess der biologischen Reaktion, welche letzten Endes zur periprothetischen Osteolyse führt, Abriebpartikel der verwendeten artikulierenden Gleitflächen (32). Im Zuge der tribologischen Forschung und Optimierung des Verschleißverhaltens, insbesondere im Bereich der Hüftendoprothetik, war das erklärte Ziel die Reduktion des Abriebsvolumens. Insbesondere bei der Versorgung junger Patienten ist dies eine der wesentlichen Entscheidungskriterien bei der Auswahl einer HTEP. Parallel zur Nutzung von Polyethylen, etablierte sich die Nutzung einer Hart-Hart Gleitpaarung, nämlich Metall auf Metall. Nach anfänglich unzufrieden stellenden Ergebnissen gab es dennoch große Patientenkohorten mit sehr langen Standzeiten von weit über 10 Jahren (230).

Dies wurde darauf zurückgeführt, dass es Implantatherstellerkombinationen gab, welche tribologisch effektiv funktionierten und nur gering Abrieb generierten (121). Diese teils äußerst langlebigen Implantate waren Anlass, die Entwicklung der Metall – Metall (105) Gleitpaarungen weiter voran zu treiben unter dem Vorsatz nur noch Kombinationen eines Herstellers zu verwenden (230). Die Tatsache, dass zahlreiche Simulatorstudien extrem niedrige Verschleißraten zeigten (208), führte dann dazu, dass diese Implantate mit artikulierenden Oberflächen einer CoCrMo-Legierung insbesondere bei jungen Patienten eingesetzt wurden.

Mit dem „Revival“ der MoM- Gleitpaarungen folgten weitere Arbeiten aus dem klinischen Bereich wie auch aus der Grundlagenforschung mit Ergebnissen über deutliche Gewebsreaktionen auf den metallischen Mikroabrieb (26, 58). Diese unerwünschten Reaktionen („adverse local tissue reactions“ - ALTR) auf den entstanden metallischen Abrieb sind der häufigste Grund für Revisionsoperationen nach einem Oberflächengelenkersatz an der Hüfte (160). Die britische Aufsichtsbehörde für Medizinprodukte und Produkte der Gesundheitsfürsorge stellte ein inakzeptabel erhöhtes Revisionsrisiko nach MoM-Endoprothesen als bei anderen Gleitpaarungen fest (7, 160, 185). Im Rahmen von Revisionsoperationen, welche aufgrund von Beschwerden und Auffälligkeiten nach einer MoM Hüfttotalendoprothese notwendig waren, konnten insbesondere bei Frauen

periprothetische lymphozytäre Gewebereaktionen identifiziert werden, sogenannte Pseudotumoren (26, 47, 105, 124).

Diese hohen Revisionsraten mit der Bildung von lokalen Neoplasien, welche osseodestruktiv wirken, führte zu einem Rückgang der Implantationen mit MoM-Gleitpaarungen, wenngleich diese vereinzelt insbesondere im Rahmen von Oberflächenersatzprothesen implantiert werden (5, 78). Als durch die Analysen des National Joint Registry von England und Wales (JNR) die hohen Revisionsraten der MoM-Prothesen bekannt wurden, nahmen sogar einige Hersteller, wie etwa das ASR™ System der Firma Depuy, ihre MoM-Prothesen-Modelle vom Markt(100).

Obwohl die Implantationsprävalenz von MoM-Endoprothesen auf weniger als drei Prozent gesunken ist, gibt es derzeit noch fast eine Million Patienten, die künstliche Hüftgelenke mit einer MoM-Gleitpaarung tragen, was die aktuelle klinische Relevanz der Thematik zeigt (58).

Trotz zahlreicher Studien und vielfältiger Forschungsansätze ist die Kaskade der biologischen Reaktion durch den entstandenen Metallabrieb nach wie vor nicht abschließend geklärt. Zahlreiche Untersuchungen und Empfehlungen stützten sich auf den Serum-Ionenspiegel von Kobalt und Chrom, letzten Endes auch zur Einschätzung der Abriebmenge und der lokalen biologischen Aktivität (53, 82, 91, 103, 123, 175). So richten sich auch die Empfehlungen der Arbeitsgemeinschaft Endoprothetik nach den Serumionenspiegeln, wobei es nach wie vor an evidenzbasierten Grenzwerten und sich danach richtenden klaren Handlungsempfehlungen mangelt (81). Es verbleibt jedoch bis heute auch unklar, ob Metallionen oder solide Metallpartikel an den in der Literatur beschriebenen biologischen Reaktionen ursächlich beteiligt sind.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die erste Studie, in der *in vivo* das inflammatorische Potential von Metallionen und Metallpartikel getrennt voneinander betrachtet und mit Polyethylenpartikeln verglichen wurde.

Die Anwendung eines *in vivo* - Modells zur Untersuchung der Reaktionen auf Abriebpartikel grenzt sich deutlich von Zellversuchen mit einzelnen Zellreihen ab, der komplexe Organismus mit einer Vielzahl von Zellen und diversen Reaktionsmöglichkeiten je nach Zelltyp lässt eine gesamtbiologisch detaillierte Betrachtungsweise zu. Hieraus ergab sich dieses Studiendesign,

um *in vivo* die inflammatorische Aktivität von soliden Metallpartikeln, Metallionen und Polyethylenabrieb zu bewerten.

Bei dem verwendeten Kleintiermodell handelt es sich um ein Inflammationsmodell. Die Injektion der zu untersuchenden Suspension direkt in den Gelenkspalt des Tiers ermöglicht *in vivo* die Analyse zahlreicher Parameter. So konnten intravitalmikroskopisch das Leukozytenflussverhalten und die Veränderung der Mikrovaskularisation gemessen werden (240-242). Zudem ist die anschließende histologische Untersuchung von Synovialgewebe und von periartikulärem Gewebe möglich (221). Dieses Modell wurde zur intravitalmikroskopischen Darstellung der Mikrozirkulation an der Maus als Arthritismodell entwickelt (224), wurde von Zysk et al. dann aber so modifiziert, dass mit diesem weiterentwickelten Modell erstmals inflammatorische Reaktionen auf Abriebpartikel von Endoprothesen untersucht werden konnten (240-242). Dieses Modell zeigte sich imstande biologische Reaktionsunterschiede auf unterschiedliche Biomaterialien zu analysieren und Unterschiede darzustellen (240, 241). Auch bei der Untersuchung hinsichtlich des inflammatorischen Potentials diverserer Polyethylene und von Poly-Ether-Ether-Keton kam das Modell zum Einsatz ließ materialbiologische Rückschlüsse zu (218, 219, 221).

Bei der Untersuchung von Metallgleitpaarungen und deren Verschleißpartikeln und -Ionen handelt es sich prinzipiell um eine Fragestellung aus der Hüftgelenkendoprothetik, da Metall-Metall Gleitpaarungen in der Knieendoprothetik keine Anwendung finden. In dieser Studie wurde jedoch an der Maus das Kniegelenk stellvertretend für das humane Hüftgelenk ausgewählt, da das Gelenk einer Injektion, nachfolgenden Intravitalmikroskopie und folgender Resektion zur histologischen und immunhistochemischen Analyse einfacher zugänglich ist (240-242). Der deutliche Vorteil dieses Modells im Vergleich zu anderen Tiermodellen ist die Analyse einer Reaktion auf Verschleißsubstanzen, wo er nach endoprothetischer Versorgung im Menschen auch tatsächlich primär anfällt.

Eine mögliche Limitation der vorliegenden Studie ergibt sich jedoch aus der Tatsache, dass die intraartikuläre Applikation einer Suspension zu einer Erhöhung des periartikulären Druckes führen kann, was auch zu einer Beeinträchtigung des Blutflusses im Endstromgebiet führen könnte (224, 225). Durch die Applikation von 50µl PBS (phosphate-buffered-saline, Kontrollsubstanz) in die Kniegelenke der Kontrollgruppen-Tiere, wurde der Einfluss des

Flüssigkeitsvolumens bei der statistischen Auswertung der Reaktion auf die Suspensionen minimiert.

Diverse andere *in vivo* Modelle, welche in den vergangenen Jahrzehnten in der Forschung der aseptischen Prothesenlockerung weltweit eingesetzt wurden, kamen der Fragestellung des Tierversuchvorhabens nicht nahe genug. Zu nennen sind an dieser Stelle das Hautfaltenklammer – Modell (120), das „Air Pouch“ – Modell (238) sowie das Schädelkalottenmodell (231) und intramedulläre Implantatmodelle (57, 229).

Das Hautfaltenklammer – Modell am Hamster lässt zwar eine mikrozirkulatorische Messung intravitalmikroskopisch zu, jedoch findet diese gelenkfern statt, was der Untersuchung von intraartikulär anfallenden Verschleißprodukten von Endoprothesen widerspricht (120, 131). Aufgrund der ebenfalls fehlenden gelenkäquivalenten anatomischen Verhältnisse wurde das „air pouch“ Modell für ebenso unpassend im Sinne der Fragestellung erachtet. Dabei erfolgt nach mehrtägiger subkutaner Luftinjektion die Partikelinjektion oder Implantation von Knochenstücken in die Luftkissen der Rückenhaut von Versuchsmäusen oder -ratten (238). Weiterhin wird das Schädelkalottenmodell zur Messung von Knochenreaktionen und Knochenresorption eingesetzt. Dieses Modell ist zur Beurteilung des Effekts der injizierten Partikel auf den Knochen gut geeignet, nicht jedoch zur Beurteilung der periartikulären Inflammation (231). Die Versuche finden wie die beiden zuvor beschriebenen Modelle gelenkfern statt.

Der große Vorteil des gewählten Modells besteht in der direkten Analyse einer knochenmetabolischen Aktivität im Sinne einer implantat- oder verschleißbedingten Osteolyse. Diesen Vorteil bietet auch eine intramedulläre Implantattestung. Dabei werden dem Versuchstier distal femoral Implantate oder proximal tibial intramedulläre, lasttragende-Hemiendoprothesen eingesetzt und zusätzlich Partikel um das Implantat eingebracht (57, 229). Es können dabei einzeitige Partikelimplantationen vorgenommen oder über subkutane Pumpen kontinuierlich intramedullär Partikel kontinuierlich infundiert werden (57, 229).

Weitere Vorteile unseres Modells liegen in der artikulären Lokalisation und der kontinuierlichen Partikelfreisetzung, was dem Prozess im menschlichen Organismus nahekommt. Das Modell muss jedoch hinsichtlich der korrekten Implantation der Materialien bei den gegebenen Größenverhältnissen hinterfragt werden (57, 218, 229). Wenn man sich beispielhaft den mittleren Kniegelenkdurchmesser von gerade einmal 4,3 mm bei den

Versuchstieren der Studie vor Augen führt, ist kritisch zu überdenken inwieweit eine adäquate Versorgung mittels Implantat mit gutem Sitz, ohne Trauma und unter Erhalt der Gelenkintegrität möglich ist (218). Durch diesen komplexen Eingriff wird das Versuchstier zudem einer längeren Operationsdauer und Narkosezeit ausgesetzt (141), zudem wäre die Ausfallwahrscheinlichkeit höher, was eine höhere Anzahl an Versuchstieren und Reservetieren erforderlich macht. Dies wurde im Rahmen dieser Studie für die Versuchstiere als nicht vertretbar und seitens der Fragestellung als nicht zielführend erachtet.

Die Versuchstieranzahl wurde mittels statistischer Gutachten festgelegt mit einer Gruppenstärke von $n = 10$ bei einem optimalen Verhältnis zwischen Ethik und statistischer Power. Interindividuelle Reaktionen auf die verwendeten CoCr – Verschleißprodukte waren entsprechend Literatur zu erwarten (178). In Vorarbeiten waren zuletzt weniger Tiere erforderlich ($n = 8$) (221), jedoch ergab sich im Rahmen der aktuellen Fragestellung mit dem Versuch des Nachweises eines Pseudotumors oder anderweitiger „adverse local tissue reactions“ (36) eine neue, vorher unbekannte Hauptzielgröße.

Ein weiterer wesentlicher Diskussionspunkt ist die Inkubationszeit im verwendeten Mausmodell. Vorausgegangene Untersuchungen von Zysk. et al. oder Utzschneider et al. nutzten für die Intravitalmikroskopie und nachfolgende histologische und immunohistochemische Auswertungen ebenfalls das Zeitfenster von 7 Tagen. Dabei wurde der schnellere Stoffwechsel der Maus im Vergleich zum Menschen berücksichtigt (219, 223, 240-242). Die Wahl dieses Zeitraumes wurde auch von anderen Arbeitsgruppen mit Kleintiermodellen genutzt. Dabei ist beispielsweise die Arbeit von Taki et al. mit dem o.g. Schädelkalottenmodell zu nennen, hier traten Osteolysen bereits nach fünf bis sieben Tagen auf (211). Andere Arbeitsgruppen mit in vivo Versuchen an Kleintieren nutzten ähnliche Zeitfenster (93, 102, 189). Angesichts der vorbestehenden Erfahrung der Arbeitsgruppe mit diesem Zeitfenster bei diesem Modell und nahezu identischen Inkubationszeiten in der Literatur wurde in dieser Studie ebenfalls ein Untersuchungsintervall von 7 Tagen gewählt.

Eine parallele Dosisfindungstudie wäre wünschenswert gewesen, um eine kritische Metallabriebbelastungsschwelle ausfindig machen zu können. Ein entsprechendes Vorhaben wäre mit einer unverhältnismäßig großen Anzahl von Versuchstieren verknüpft gewesen, was ethisch nicht vertretbar war.

Aus diesem Grunde wurde im aktuellen Vorhaben auf bestehende Evidenz zurückgegriffen. Die Wahl der Konzentration der applizierten Dosis erfolgte somit anhand Vorerfahrung und Literatur, wie etwa den Untersuchungen von De Smet et al., welche die Metallionenbelastung und Konzentration von Abriebbestandteilen in der periartikulären Synovialflüssigkeit am Patienten gemessen haben (48). Entsprechend der Voruntersuchungen der eigenen Arbeitsgruppe aus den vergangenen Jahrzehnten, enthielt die Metallpartikelsuspension eine Konzentration von 0,1 Vol.-% gelöst in PBS, entsprechend der identischen Dosierung in Vorversuchen mit diversen Abriebpartikeln unterschiedlicher Biomaterialien (139, 221, 240-242).

Die Dosis der Polyethylenpartikel wurde wie die der Metallpartikeln auf 0,1 Vol.-% eingestellt. Die Berechnung der Dosierung basierte auf dem vermessenen Partikelvolumen, ähnlich gängiger Verfahren in der Literatur (29, 30, 74, 75). Diese Konzentration wurde bereits von Margevicius et al. (147) beschrieben und von Zysk et al. weiterhin genutzt und etabliert (242). Weitere Untersuchungen ergaben, dass sich hochquervernetzte Polyethylene (XLPE) biologisch inflammatorisch nicht von konventionellen Polyethylenfabrikaten unterscheiden, so dass kein Konzentrationswechsel erforderlich ist zwischen XLPE und PE (223). XLPE hat sich in der Hüftendoprothetik aufgrund tribologischer Überlegenheit und verbesserten Standzeiten gegenüber konventionellem PE durchgesetzt (5, 78, 160), weshalb im vorliegenden Studienprotokoll auf XLPE zurückgegriffen werden sollte. Das angestrebte Ziel mit XLPE anstatt PE als Vergleichsgruppe zu arbeiten, scheiterte daran, dass die benötigten Mengen an endotoxinfreiem Polyethylenabrieb aus den verwendeten Hüftgelenks-simulatoren des DFG Kooperationspartners Heidelberg nicht herstellbar waren. Dies liegt mit großer Wahrscheinlichkeit an den deutlich geringeren Abriebraten von XLPE im Vergleich zu UHMWPE (25, 56, 64, 122, 171, 220, 222). Um trotzdem einen Vergleich der inflammatorischen Eigenschaften von Metallabrieb mit Polyethylenabrieb durchführen zu können, wurde auf industriell gefertigtes UHMWPE zurückgegriffen (siehe auch 3.1.2, Project Number UF-PE-03-15 UHMWPE GUR 1020, BioEngineering Solutions Inc., Oak Park, USA). Hinsichtlich der biologischen Aktivität wurden im Vorfeld keine relevanten Unterschiede zwischen UHMWPE und XLPE gesehen (223), es überwiegt jedoch der tribologische Vorteil von XLPE. Ein nicht zu verachtender Punkt ist jedoch der Größenunterschied der Partikel. XLPE Partikel aus dem Hüftgelenksimulator, vergleichbar mit Partikelspektren aus Gelenkpunktaten von Patienten mit einer XLPE Gleitpaarung, sind großteils im Submicron Bereich bei einer

Größe von 10-30 nm (56, 64, 154, 197, 222), die industriell gefertigten Partikel sind jedoch deutlich größer. Nach Green et al. weisen größere Partikel eine geringe Reaktionstendenz biologisch auf (75). Es ist nicht auszuschließen, dass die Nutzung der industriell gefertigten Partikel einen anderen Effekt auf die biologische Reaktion haben könnten, so dass die Ergebnisse der Studie hinsichtlich des Polyethylens beeinflusst sein könnten.

Die Auswahl der Konzentration der Metallionen gestaltete sich problematischer. Die Konzentration sollte dabei möglichst nahe an die Werte in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit MoM - Prothesen kommen. Patienten, die aufgrund einer hüftbezogenen Symptomatik untersucht wurden, zeigten maximale Kobalt- und Chromkonzentrationen von teilweise über 1000 µg/l (45). Im Rahmen von parallel zu diesem Tierprojekt durchgeführte in vitro Studien belegten zytotoxische Reaktionen bei solch hohen Ionenkonzentrationen (109). Eine von De Smet et al. durchgeführte Analyse der Gelenkpunkttate von Patienten mit MoM - Prothesen vor deren Revisionseingriff ergab eine mediane Ionenkonzentrationen 200-250 µg/l (48). Da es nicht sinnvoll erschien, sich an der maximal gemessenen Ionen- Konzentration und damit eventuell an Ausreißern oder sogar Messfehlern zu orientieren, wurde für das aktuelle Vorhaben eine Metallionenkonzentration von 200 µg/l gelöst in PBS gewählt. Ob die im Serum gemessenen Ionenkonzentrationen von Kobalt und Chrom mit der intraartikulär anfallenden Dosis korrelieren, ist bisher nicht eindeutig belegt (45, 48).

Für die histologische Auswertung der HE-gefärbten Schnitte wurde das von Brackertz et al. entwickelte Scoring-System genutzt. Dieser Bewertungsalgorithmus wurde bereits in einigen Vorarbeiten zu partikelinduzierten Gelenkreaktionen am murinen Knie genutzt. Er ist für die Einordnung der entzündlichen Veränderungen des Kniegelenks etabliert (221, 241).

Es konnte nur ein repräsentativer Gewebeschnitt der jeweiligen Kniegelenke histologisch untersucht werden. Es wurde explizit darauf geachtet, bei jedem Schnitt die gleiche Schnittebene durch das Kniegelenk zu erhalten. Die Anzahl der gewählten Schnitte war limitiert, da für die nachfolgenden immunhistochemischen Untersuchungen der murinen Kniegelenke zahlreiche Präparateschnitte benötigt wurden. Im Rahmen des Verständnisses der inflammatorischen Aktivität der Partikel und Ionen wog der Interessensgewinn durch die Messung der Matrixmetalloproteasen, Oberflächenantigene und Interleukine stärker als die Unterstützung der gewonnenen Ergebnisse durch weitere HE-Färbungen.

In diversen *in-vivo*- und *in-vitro*-Studien konnte gezeigt werden, dass die Zytokine TNF α , IL-1 β und IL-6 eine zentrale Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung der lokalen Inflammation spielen, welche im Rahmen der osteolytischen Kaskade stattfindet. Makrophagen nehmen dabei eine Schlüsselrolle ein, da sie durch den Kontakt mit dem Abrieb aktiviert werden und diese Mediatoren ausschütten (32, 88, 184).

Die Folge ist die Rekrutierung weiterer Zellen, die sich am Entzündungsgeschehen und der folgenden Knochenresorption beteiligen. Zudem sind aktivierte Makrophagen befähigt, selbst die Rolle der knochenabbauenden Osteoklasten einzunehmen (32, 88, 184).

Im Fall von Metallabrieb assoziierten Osteolysen spielen jedoch weitere Einflussfaktoren eine wesentliche Rolle: Lohmann et al. fanden bei niedrigem Metallgehalt in Revisionsgewebe von Implantaten eine unspezifische, durch Makrophagen vermittelte Reaktion, hingegen dominierten bei sehr hohem Metallgehalt Lymphozyten in der Antwort (138). Vor allem Metallionen sollen dabei mit Proteinen eine Komplexbildung eingehen und sensitivieren so T-Zellen (30, 32, 71). Viele Autoren sehen diese Reaktion nicht nur als mögliche Ursache für die Entstehung eines Pseudotumors (124, 143, 175), sondern als potentieller Verursacher einer aseptischen Prothesenlockerung (137).

Lymphozyteninfiltrationen werden bislang teilweise mit einer Hypersensitivitätsreaktion assoziiert (236), ferner führt deren Ansammlung speziell in Weichgewebsvermehrungen bei metallhaltigen Gleitpaarungen zur Deklaration eines Pseudotumors (14, 175). Pandit et al. testeten das Revisionsgewebe von Patienten, bei denen eine sichtbare Massenzunahme im periprothetischen Gewebe bei entsprechenden Prothesen beobachtet wurde. Sie fanden Koagulationsnekrosen, massive Makrophageninfiltrationen mit Granulombildung und Riesenzellen, zusätzlich diffuse Lymphozyten- (darunter auch CD3-Positive) und Plasmazellinfiltrationen. Als ursächlich für diese Pseudotumorentstehung hypothetisierten die Autoren eine Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion (176). Entsprechend diesen Vermutungen wurde im Rahmen dieses Projektes ein muriner CD3 Antikörper eingesetzt, um T-Zellen im Gewebe nachweisen zu können.

Neben den T-Zellen gibt es in Immunantwort weitere immunkompetente Zellen, die für eine biologische Reaktion auf Partikel und Ionen in Betracht kommen. Um primär sämtliche Leukozyten darstellen zu können, wurde ein CD45 Antikörper als Panleukozytenmarker eingesetzt. CD45 wird auf allen kernhaltigen, hämatopoetischen Zellen exprimiert (exklusive

Thrombozyten und Erythrozyten) (52, 86, 97, 212, 213, 226). Bei Nachweis von CD45 sind Lymphozyten, Natürliche Killerzellen, Granulozyten, dendritische Zellen und Monozyten/Makrophagen erfasst. Die Schlüsselzellen der Inflammation im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung sind allen voran die Makrophagen. Sie sind Hauptakteure des angeborenen Immunsystems, die Initiatoren in der Bekämpfung des Prothesenabriebs (71) und nehmen eine Schlüsselrolle in der Initiierung der periprothetischen Inflammation spielen (32, 88, 104, 184). Sie bilden als Typ-A-Synoviozyten einen Teil der Synovialmembran (106) und stellen bei aseptisch gelockerten Implantaten mit einem Anteil von 60-80% die dominierenden Zellen im periprothetischen Gewebe dar (191). Partikel einer Größe $<10\mu\text{m}$ (207) werden phagozytiert und proinflammatorische Zytokine wie $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 werden freigesetzt (24, 170). Ren et al. demonstrierten die Wichtigkeit von Makrophagen in einem murinen Air-pouch-Modell (188). Nach Partikelinjektion depletierte die Arbeitsgruppe Makrophagen mit einer Bisphosphonat-Injektion. Die Makrophagen wurden nach Phagozytose der Clodronat-Liposomen zerstört und so die Expression von $\text{IL-1}\beta$ und $\text{TNF}\alpha$ deutlich abgeschwächt. Die partikelinduzierte Inflammationsreaktion mit folgendem osteolytischem Potenzial wurde so signifikant reduziert (188). Eine klinische Studie überprüfte die Wirksamkeit von Clodronat bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (9). Eine Einmalinjektion reduzierte signifikant die Anzahl der CD68-positiven Zellen. Wooley et al. nutzten ebenso das murine Air-pouch-Modell und verglichen die inflammatorische Antwort verschiedener Partikel aus Polymethylmethacrylat, Titan, UHMWPE und Cobalt-Chrom (238). Dabei konnten sie bei allen Partikeln im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) eine signifikante Zunahme der Makrophagen nach Partikelkontakt feststellen, als auch einen signifikanten Anstieg von $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 . Um die Makrophagenaktivität im vorliegenden Projekt immunhistochemisch zu verifizieren, wurden CD68-Antikörper genutzt, welche spezifisch für diesen Zelltyp sind (148).

Für die Überprüfung des inflammatorischen Potenzials der Metallpartikel als auch der Ionen wurden die immunhistochemische Marker für $\text{TNF}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$ und IL-6 genutzt.

In vielen *in vitro*- (24, 31, 76, 165) als auch *in vivo*- Studien (116, 211, 238) konnte die verstärkte Expression dieser Zytokine als Reaktion auf Abriebpartikel nachgewiesen werden (32, 88, 184).

Wie wichtig TNF α als Initiator in der partikelinduzierten Inflammation ist, wird vor allem bei Studien deutlich, die genetisch oder pharmakologisch dessen Signalkaskade inhibieren und erfolgreich die Entzündungsreaktion mit folgender Osteolyse eindämmen (37, 155, 196). Für Stea et al. korrelierte die Schwere der Osteolyse mit der Höhe der TNF α -Werte im periprothetischen Gewebe (204). Anhand eines murinen Schädelkalottenmodells konnte durch eine genetische Blockade der TNF α -Signalwege eine Inflammation unterdrückt und dadurch folgende osteolytische Prozesse verhindert werden (196). Demgegenüber zeigen Polymorphismen in der TNF α -Promoterregion eine erhöhte Assoziation zur aseptischen Prothesenlockerung (234).

IL-1 β wird wie TNF α im Prozess der aseptischen Prothesenlockerung verstärkt exprimiert (118, 204). Dies konnte sowohl bei Studien partikelinduziert *in-vitro* (24) als auch *in-vivo* (238) beobachtet werden. Wurde bspw. genetisch die Signalkaskade des IL-1 blockiert reduzierte sich signifikant die partikelinduzierte Inflammation (57).

Ebenso wird IL-6 im Rahmen der aseptischen Prothesenlockerung verstärkt exprimiert (204) und zeigt sich im Revisionsgewebe von Hüftprothesen erhöht (119). Gordon et al. stellten zudem eine positive Korrelation eines Polymorphismus im IL-6-Gen zu einer erhöhten Osteolysegefahr nach endoprothetischem Hüftersatz fest (72).

Im Prozess der aseptischen Prothesenlockerung sind daher alle drei Zytokine wesentlicher Bestandteil in der Initiierung der Entzündungskaskade (30, 88, 118, 119, 184, 204).

Nach Auswertung der intravitalmikroskopischen und histologischen Ergebnisse konnten deutliche Unterschiede hinsichtlich der inflammatorischen Aktivität der unterschiedlichen Abriebmaterialien festgestellt werden. Dies deutete sich bereits vorab bei der Vermessung der murinen Kniegelenke an, welche eine deutliche Umfangsvermehrung zeigten. Die größte Schwellung der Kniegelenke zeigten die Versuchstiere nach der Applikation von Metallpartikeln. Die Schwellung präsentierte sich dabei mehr als ausgeprägter als die, der Reaktion auf Metallionen (MP 0,6mm Zunahme Kniegelenksdurchmesser, MI 0,2mm Zunahme Kniegelenksdurchmesser). Dagegen reagierten die Versuchstiere auf Polyethylen und PBS mit keiner klinisch erfassbaren Kniegelenkschwellung. Hier zeigte sich bereits das inflammatorische Potential der soliden Metallpartikel.

Die Injektion selbst sowie die Applikation von 50 µl Volumen haben keinen wesentlichen Einflussfaktor auf die Knieschwellung, was durch das Ausbleiben der signifikanten Kniegelenkschwellung bei der Vergleichsgruppe mit PBS gezeigt werden konnte. Gestützt wird diese Annahme durch die Untersuchungen von Zysk et al. zur Etablierung der gewählten Methode (242). Diese Gewebereaktionen konnten auch histologisch belegt werden, mitunter anhand der Vermessung der Brackertz-Scores, wobei hier periostale Reaktionen ebenfalls als inflammatorisches Zeichen zu werten sind (11).

Die erwähnte makroskopische Reaktion ließ sich bereits vor der histologischen Auswertung bestätigen. So ergab die intravitalmikroskopische Untersuchung eine Migration von Leukozyten durch eine vermehrte periartikuläre Kapillarisation. Diese Zunahme der Kapillardichte wird durch die gesteigerte Rekrutierung vorbestehender, nicht perfundierter Kapillaren und eine inflammatorische Neovaskularisation bedingt (166, 225, 242). Insbesondere in der Metallpartikelgruppe zeigte sich die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion der Gefäße, der Synovialmembran und des Hoffa-Fettkörpers verändert. Durch die vermehrte Leukozytenrekrutierung und einer tendenziell gesteigerten kapillären Dichte deuten die intravitalmikroskopischen Ergebnisse auf die Induktion einer inflammatorischen Reaktion durch die soliden Metallpartikel hin. So konnte der stärkste Zusammenhang zwischen der Applikation der zu untersuchenden Suspensionen und einer inflammatorischen Reaktion in der Gruppe der Metallpartikel verzeichnet werden. Die Exposition gegenüber soliden CoCr - Partikeln war mit einer deutlichen Verdickung der Synovialmembran und teilweise mit pseudotumor-ähnlicher Gewebekonstruktion verbunden. Im Rahmen der starken Synovitis gab es dabei Zeichen für eine Destruktion des artikulären Knorpels und subchondralen Knochens. In der qualitativen Beurteilung der histologischen Präparate fielen in der Metallpartikel-Gruppe ausgeprägte ossäre und periostale Veränderungen sowie zellreiche intraossäre granulomatöse Infiltrate auf, die am ehesten auf ein entzündliches Geschehen zurückzuführen sind.

Das osteodestruktive und inflammatorische Potential von Metallabrieb ist vorbekannt, ebenso das Potential des metallischen Abriebs, sogenannte Pseudotumoren zu induzieren (12, 26, 60, 124, 175). Es war jedoch bisher nicht geklärt, ob solide Metallpartikel oder Metallionen das toxische Agens in der entzündlichen Kaskade darstellen. Durch den histologischen Nachweis der periprothetischen Gewebevermehrung als Reaktion auf Metallpartikel zeigen

die Ergebnisse der vorliegenden Studie, dass Metallpartikel eine Schlüsselrolle bei der lokalen Gewebereaktion einnehmen. Die starke biologische Aktivität von Metallabrieb wurde durch Topolovec et. al in Untersuchungen von Gewebeproben nach Revisionsoperationen von Endoprothesen mit einem metallischen Gleitpartner (MoM, MoP) ebenfalls gezeigt (12, 214). Trotz deutlich geringerer Verschleißraten ergaben sich in der Studie in der MoM Gruppe eine stärkere periprothetische, lymphozytäre Gewebereaktion als in der MoP Gruppe (214). Den Ergebnissen dieser Studie folgend sowie den eigenen Resultaten, ist Metallabrieb biologisch deutlich reaktiver als Polyethylenabrieb. Denn auch in der vorliegenden Studie waren Konzentration von PE und Metallpartikeln mit 0,1 Vol.-% identisch, die biologische Reaktion auf Metall aber deutlich intensiver. Das widerspricht Arbeiten, die eine positive Korrelation zwischen Abriebrate und der Ausbildung von Pseudotumoren beschrieben haben (26, 70). Dennoch ist davon auszugehen, dass die Reaktion der Versuchstiere dosisabhängig ist und bei Reduktion der Dosis eine Reduzierung der Reaktion zu erwarten wäre. Im Gegensatz dazu wäre eine Verstärkung der Reaktion bei Dosiserhöhung zu erwarten. Daher muss konstituiert werden, dass eine Minimierung des Verschleißes unter Optimierung der Triboparameter im Rahmen einer Hüftendoprothese mit metallischen Gleitpartnern angestrebt werden muss. Dennoch ist es möglich, dass eine geringe Anzahl von Pseudotumoren auch bei geringem Abrieb auftreten kann im Sinne einer überschießenden Immunantwort (73).

Der Einfluss einer Hypersensibilität wurde in dieser Arbeit nicht näher beleuchtet, eine Reaktion im Sinne einer Hypersensibilität einzelner Versuchstiere stellt dennoch einen möglichen Einflussfaktor auf die ausgelöste Reaktion dar.

Die Tatsache, dass die soliden Metallpartikel im Rahmen dieser Studie massive Gewebereaktionen induziert haben, sollte nicht zwangsläufig den Rückschluss bedeuten, dass Metallionen nicht für sich auch ein hohes biologisches Potential haben. So ergab sich intravitalmikroskopisch keine erhöhte Interaktion der Leukozyten mit dem Gefäßendothel und somit auch keine Änderung der kapillaren Dichte. Dennoch zeigte die histologische Untersuchung einen signifikant erhöhten Brackertz – Score. Dieser war auch verglichen mit Vorarbeiten zu Polyethylenabrieb deutlich erhöht (223). In der aktuellen Studie zeigten sich in der semiquantitativen Auswertung nach Brackertz, eine signifikante Zunahme des Scores in der Metallpartikel-, (MW $3,6 \pm \text{SEM } 0,2$; $p^* < 0,001$), der Polyethylenpartikel- (MW $2,5 \pm \text{SEM } 0,2$; $p^* = 0,002$) und der Metallionengruppe (MW $2,3 \pm \text{SEM } 0,2$; $p^* = 0,003$). Der Score der

PE-Gruppe und der Metallionengruppe unterschied sich hingegen statistisch nicht. Utzschneider et al. konnten beim Vergleich von 6 verschiedenen Polyethylen-Inlays (4 davon XLPE, 2 davon konventionelles PE) hinsichtlich der biologischen Aktivität des PE Abriebs keine Unterschiede zwischen den einzelnen PE-Gruppen herausarbeiten, wenn sich auch die Werte des Brackertz-Scores sämtlich statistisch signifikant von der Kontrollgruppe unterschieden haben (Werte zwischen 1,3 – 1,8) (221). Auch hinsichtlich der synovialen Membrandicke sticht die Metallpartikelgruppe mit einer mittleren Dicke von $187,3 \mu\text{m} \pm \text{SEM } 44,4 \mu\text{m}$ hervor. Diese Werte sind auch erhöht im Vergleich mit den Daten zur synovialen Dicke von Utzschneider et al. zu diversen Polyethylenpartikeln ($91 - 120 \mu\text{m}$ Dicke) (221). Auffällig ist hier jedoch auch ein Unterschied zwischen den Kontrollgruppen der beiden Studien. So ergab sich in der vorliegenden Arbeit eine Dicke der synovialen Membran in der Kontrollgruppe von $14,57 \mu\text{m}$, bei Utzschneider et al. waren es $46,6 \mu\text{m}$. Dieser Unterschied mag durch eine Interobservervariabilität erklärbar sein.

Der histologische Nachweis dieser deutlichen synovialen Verdickung mit einer infiltrativ/expansiv wachsenden Gewebsvermehrung lässt sicherlich einen Pseudotumor vermuten, entsprechend der Literatur im Sinne einer Hypersensitivitätsreaktion unter der Beteiligung von T-Lymphozyten (47, 124, 175, 176, 236). Wie bereits oben erwähnt wurden immunhistochemische Färbungen mit CD3 Antikörpern durchgeführt, um den Nachweis von T-Zellen zu erbringen. Interessanterweise wurde festgestellt, dass in keiner Gruppe eine nennenswerte Anzahl an T-Zellen gefunden werden konnte, auch nicht in der Metallionengruppe, für die eine Haptenbildung noch als wahrscheinlicher anzunehmen war. Sowohl linke als auch rechte Knie zeigten keine gruppenspezifischen Tendenzen. Eine T-Zellansammlung als Grundlage für eine Metallhypersensitivität und als möglicher Grund für eine T-Zell vermittelte aseptische Implantatlockerung konnte in keiner Gruppe nachgewiesen werden. Das widerspricht weitestgehend klinischen Erfahrungen mit histopathologischen Untersuchungen des periprothetischen Gewebes von MoM-Gleitpaarungen im Patienten, hier ist das prädominante Bild eine Gewebeformation mit dominant lymphozytärem Bild (26, 124, 175, 176).

Allerdings könnte die Tatsache einer zu kurzen Expositionszeit auf die metallischen Suspensionen eine Limitation darstellen: Eine Expositionszeit auf Metallabrieb *in vivo* für 7 Tage könnte unter Umständen nicht ausreichend gewesen sein, um eine Aktivierung des

erworbenen Immunsystems anzuregen. Allerdings sind Prothesenträger jahrelang einer Metallexposition ausgesetzt, bevor es zur aseptischen Implantatlockerung kommt und einige Autoren, die das Revisionsgewebe speziell auf das Vorhandensein von T-Zellen untersuchten, fanden ebenso keine nennenswerten Ansammlungen. So analysierten Dapunt et al. Revisionsgewebe von Patienten mit einer Implantatlockerung, die entweder durch Infektion oder im Rahmen einer aseptischen Lockerung entstand. Dabei konnten die Autoren CD3-positive Zellen im infektiösen Revisionsgewebe beobachten und weniger im Gewebe mit einer aseptischer Implantatlockerung (44). Goodman et al. kamen ebenfalls zu dem Schluss, dass T-Zellen wohl keinen großen Einfluss auf die partikelinduzierte Prothesenlockerung einnehmen (71), da die Arbeitsgruppe nur vereinzelt T-Zellen in Gewebeteilen von Patienten mit einer entsprechenden aseptischen Prothesenlockerung fanden. Inwieweit sich aus der festgestellten Gewebeformation ein Pseudotumor hätte entwickeln können, kann in der immunhistochemischen Analyse nicht abschließend beantwortet werden, da die T-Zellen, die sowohl Bestandteil eines Pseudotumors sind und Basis für eine Typ-IV-Hypersensitivitätsreaktion, nicht nachgewiesen werden konnten.

In der Metallpartikel- und Metallionengruppe der behandelten linken Kniegelenke zeigten sich signifikant vermehrt CD45-positive Zellen. Diese Vermehrung war jedoch auch in der Metallionengruppe der rechten, unbehandelten Kniegelenke zu beobachten. Möglich wäre daher eine systemische Verteilung der Metallionen bis in das rechte Knie gewesen, die sich als bioaktive Reaktion in Form von CD45-positiven Zellen im dortigen Gewebe zeigte. Wesentlich erscheint hierbei, dass CD45 ein wichtiger Regulator in der Funktion und Differenzierung der Lymphozyten ist. Ein Fehlen von CD45 zeigt den Zusammenbruch des Immunsystems, mit einer schweren Funktionsbeeinträchtigung der T- und B-Zellen, an (97). Eine T-Zell-Präsenz konnte ohne den Nachweis CD3-positiver Zellen im Gewebe ausgeschlossen werden und so käme nur eine Beteiligung der anderen genannten immunkompetenten Zellen, wie Makrophagen, Granulozyten, Natürliche Killerzellen oder dendritische Zellen, in Betracht. Makrophagen wurden spezifisch mittels CD68 angefärbt und stimmten nicht mit dem Färbemuster der CD45-positiven Zellen überein, womit auch Makrophagen für dieses Färbeergebnis ausgeschlossen werden müssen. Ein Vorkommen von CD45 auf Makrophagen ist durchaus bekannt (6, 97), dennoch ist entsprechend den Ergebnissen der vorliegenden sowie anderer Studie die Expression sehr gering ausgeprägt (198),. Daher kommen nur

Granulozyten, NK-, dendritische und B-Zellen in Betracht. Nur wenige Autoren, wie Lacal et al. berichten über eine Expression auf Granulozyten (126).

Die Arbeitsgruppe um Pandey et al. interpretierte eine signifikante Anwesenheit von neutrophilen Granulozyten als geeigneten Marker für eine histopathologische Diagnostik eines septischen Endoprothesenversagens aufgrund mikrobieller Prozesse und weniger einer aseptischen Lockerung (158, 173). Morawietz et al. empfahlen die Anwendung eines CD15-Antikörpers zur immunhistochemischen Diagnostik der Neutrophilen. Entsprechend ist das Vorhandensein von neutrophilen Granulozyten bei den ermittelten Ergebnissen dieser Arbeit eher unwahrscheinlich und für Folgestudien sollte sicherlich ein granulozytenspezifischer Marker verwendet werden (158, 173).

Weitere CD45-positive Zellen sind Natürliche Killerzellen (86, 162). Deren Hauptfunktion liegt in der Abwehr von neoplastischen (205) oder virusinfizierten (83, 133, 140) Zellen. Huss et al. untersuchten synoviales Revisionsgewebe von Patienten mit Hüft- oder Knieendoprothesen (CoCr/UHMWPE), mit dem Nachweis einer periprothetischen Osteolyse (101). Immunhistochemisch machten dabei die NK-Zellen einen Anteil von 30% der CD45-positiven Zellen aus. Dies zeigt eine nicht unwesentliche Beteiligung dieser Zelllinie an inflammatorischen Prozessen im betroffenen Gelenk.

Lin et al. konnten *in vitro* eine proinflammatorische Zytokinexpression von NK- und dendritischen Zellen als Reaktion auf UHMWPE-Partikel nachweisen. Sie folgerten, dass diese Zellen auch an dem Prozess der periprothetischen Lockerung beteiligt sind (136). Für Kim et al. nehmen NK-Zellen eine ebenfalls wesentliche Rolle in der inflammatorischen Kaskade bei Gelenken ein (114). NK-Zellen induzieren eine Gelenkentzündung durch Sekretion von Interleukin-4 und IFN- γ (Interferon-gamma). Diese unterdrücken in der Synovia die Produktion von TGF- β 1 (Transforming Growth Factor beta 1), ein Zytokin, das andere proinflammatorische Zytokine inhibiert. Als weitere mögliche CD45-positive Zellen kommen dendritische und B-Zellen in Betracht. So untersuchten Ogunwale et al. *in vitro* die Proliferation und Lebensfähigkeit von dendritischen als auch B- und T-Zellen, die CoCr-Partikeln ausgesetzt wurden (168). Es wurden weder dendritische noch B-Zellen aktiviert. Lediglich die T-Zellproliferation zeigte sich rückläufig, worüber sie die in anderen Studien beobachteten CD8-positiven T-Zellniedrigungen in Patienten mit MoM-Implantaten als möglichen Erklärungsansatz sahen.

Entsprechend dieser Angaben in der Literatur kann abschließend nicht vollständig geklärt werden, inwiefern NK-Zellen spezifisch auf Metallpartikel oder -ionen reagieren, aber eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass es sich bei den detektierten CD45-positiven Zellen in der vorliegenden Arbeit um NK-Zellen handelt. So müssen in Folgestudien NK-Zellen im Gewebe berücksichtigt und deren Anwesenheit mit einem spezifischen Marker zu verifiziert werden.

Um die Makrophagenanzahl immunhistochemisch zu verifizieren, wurde wie bereits erwähnt ein CD68-Antikörper genutzt (148). Die Ergebnisse waren deutlich. Es zeigte sich dabei eine hohe Anzahl an Makrophagen in der Metallpartikelgruppe der linken Kniegelenke. Die injizierten Metallpartikel entsprachen in Form, Größe und Zusammensetzung weitestgehend Partikeln, wie sie bei menschlichen Metall-Metall-Prothesenträgern generiert werden (21, 53, 107) und repräsentieren daher ausreichend das bioreaktive Szenario auf Zellebene. Die Wertigkeit bestätigt sich im Ausbleiben einer ähnlichen Reaktion in der Kontrollgruppe. So löste der Vorgang der Injektion mit einer sterilen PBS-Lösung selbst keine inflammatorische Reaktion aus, zumindest keine Aktivierung der Makrophagen als Schlüsselzellen einer solchen. Ebenso zeigte sich kein signifikantes Ergebnis nach Metallioneninjektion.

Ein möglicher Grund für das Ausbleiben eines Anstiegs der Makrophagenzahl in der Metallionengruppe könnte sein, dass sich die Ionen nach intraartikulärer Injektion systemisch verteilen und lokal dementsprechend kein ausreichendes Potential für eine signifikante Entzündungsreaktion haben. Verschiedene Studien ermöglichen die Schlussfolgerung, dass es in der vorliegenden Studie nach intraartikulärer Ioneninjektion zumindest teilweise zu einer systemischen Verteilung kam. Viele Patienten mit gelockerten Prothesen einer MoM Gleitpaarung fallen durch hohe Cobalt-Ionen-Konzentrationen im Serum auf (63, 129, 179). Cobalt-Ionen unterliegen eher einer systemischen Verteilung als Chrom-Ionen. Letztere tendieren dazu stabile Komplexe zu formen und sich im Gewebe um das Implantat abzulagern (183, 203). Trotzdem können beide Metallionen ein hohes Bindungsbestreben zu körpereigenen Proteinen zeigen (8, 15, 41, 90, 142), welche so über die Blutzirkulation verteilt werden. Diese Annahme wird durch Studien bekräftigt, die Revisionsgewebe von Patienten mit aseptischer Hüftprothesenlockerung untersuchten. Hier konnte gezeigt werden, dass erhöhte Ionenkonzentrationen von Cobalt und Chrom vornehmlich im Serum und weniger in der Synovialflüssigkeit lokalisiert werden konnten (132). Es wird neben einer Erhöhung der

Ionenkonzentration im Serum und Urin, teilweise über eine Verteilung bis in entfernt liegende Organe, wie Leber, Lymphknoten und Milz berichtet (22, 193).

Was wiederum gegen eine mutmaßliche Verteilung der Ionen nach Injektion spricht, sind die bereits erläuterten Ergebnisse der CD45-Auswertung. Hier lag in der Metallionen-Gruppe ein deutlich signifikantes Ergebnis vor, da hier ein oder mehrere Zelltypen auf Ionen reagiert haben. Welche Zelltypen das waren, ist nach wie vor unklar. Hier wird aber deutlich, dass dieses Ergebnis gegen eine Umverteilung der Ionen spricht und eher dafür, dass Makrophagen mehr durch Partikel und weniger von Ionen aktiviert werden und als Reaktion ihre proinflammatorischen Zytokine exprimieren.

Einige *in-vitro*-Versuche zeigen durchaus ein Ansprechen von Makrophagen auf Metallionen, die als Reaktion dosis- und zeitabhängig proinflammatorische Zytokine wie IL-1 β und TNF α freisetzen (23, 31, 49).

Caicedo et al. testeten *in-vitro* die Reaktion von humanen Monozyten/Makrophagen auf CoCr-Partikel und -Ionen (24). Dabei konnten sie ähnlich ausgeprägte Zytokinexpressionen von IL-1 β , TNF α und IL-6 feststellen. Zusätzlich provozierten die Ionen stärker als die Partikel eine Expression von T-Zell-stimulierenden Oberflächenmolekülen. Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Jonitz-Heincke et al. die humane Osteoblasten und PBMC's (peripheral blood mononuclear cell) einzeln und in Co-Kultur einer Ionenlösung von CoCr29Mo6 aussetzten in der gleichen Konzentration, wie wir es verabreichten (200 μ g/L) (110). Dabei differenzierten sich die mononukleären Zellen ioneninduziert zu Makrophagen. Dieser Effekt war unter den Bedingungen der Co-Kultivierung sogar stärker ausgeprägt.

Die Arbeitsgruppe verdeutlichte dabei aber auch, dass *in-vitro*-Versuche anhand einzelner Zelllinien sehr statisch sind und sich wohl bessere Ergebnisse mit Co-Kulturen erzielen lassen. Je mehr Zelllinien untereinander reagieren können, desto besser können die Ergebnisse auf die *in-vivo*-Situation übertragen werden. Das Zusammenspiel vieler Zellen und Gewebe in unserem synovialen Inflammationsmodell macht es schwierig eine Aussage darüber zu treffen, warum die Metallionen hier keine Reaktion durch Makrophagen hervorgerufen haben und unsere Ergebnisse widersprüchlich zu oben genannten *in-vitro*-Experimenten sind. Dabei zeigen auch *in-vitro*-Versuche, dass oft Reaktionen auf Metallionen zeit- und dosisabhängig waren. Hier könnte also der Faktor Zeit nicht ausgereicht haben oder die Ionendosis für eine

in-vivo-Situation doch zu gering gewesen zu sein, als dass Makrophagen darauf hätten ansprechen können.

Eine signifikante Makrophagenvermehrung zeigte sich also einzig allein in der Synovia der mit Metallpartikeln behandelten Kniegelenke. Sowohl in der Metallionen-, PBS-, NegKo-Gruppe, als auch in allen kontralateralen unbehandelten Kniegelenken blieb eine Makrophagenzunahme im Sinne einer inflammatorischen Antwort aus.

In der vorliegenden Arbeit konnte in der Metallpartikel-Gruppe der linken Kniegelenke jeweils eine signifikant erhöhte Expression von TNF α , IL-6 und IL-1 β gegenüber der Negativkontroll- und PBS-Gruppe festgestellt werden. Dieser Anstieg proinflammatorischer Zytokine auf Metallpartikel im linken Knie deckt sich auch mit den Ergebnissen unseres makrophagen-spezifischen Markers CD68. Makrophagen, die als wesentliche Produzenten dieser Zytokine gelten, wiesen ebenso eine deutliche Anzahlzunahme auf Metallpartikel auf. Die Metallioneninjektion hingegen zeigte keine signifikante Freisetzung proinflammatorischer Zytokine gegenüber den anderen Gruppen. Entsprechend kann man postulieren, dass hauptsächlich Partikel und nicht Ionen eine lokale Entzündungsreaktion auslösen.

Demgegenüber zeigen allerdings *in vitro* - Untersuchungen einen metallioneninduzierten Zytokinanstieg von TNF α , IL-1 β und IL-6 (24, 165). Niki et al. bspw. beobachteten anhand Zellkulturen mit Synoviozyten und Makrophagen die verstärkte Freisetzung von TNF α , IL-1 β und IL-6 als Reaktion auf Cobalt- und Chrom-Ionen. Eine Steigerung der Ionenkonzentration führte dabei zu einem Anstieg dieser Entzündungsmediatoren (165). Ähnliche Ergebnisse erzielten auch Posada et al. Anhand makrophagenähnlicher Zellkulturen, wobei vor allem ein IL-6-Anstieg beobachtet werden konnte, konnten sie herausfinden, dass es zu einer verstärkten Reaktion kommen, wenn den mit Metallpartikeln exponierten Zellen zusätzlich Cobalt-Ionen hinzugefügt (183). Hier scheinen Cobalt-Ionen wesentliche Triggerfaktoren der Inflammation zu sein und wirken *synergistisch* zu Metallpartikeln. Dies widerspricht den vorliegenden *in vivo* Ergebnissen lokal im affizierten linken Kniegelenk. Unterstützt wird dies im aktuellen Vorhaben durch die Ergebnisse für den makrophagenspezifischen CD68-Antikörper. Makrophagen, die wesentlich zur Produktion von IL-6, TNF α und IL-1 β beitragen, waren nach Metallioneninjektion nicht signifikant erhöht. Dies bestätigt die ausbleibende Zytokinexpression auf Ionen, entsprechend sind hier die aktuellen Ergebnisse als schlüssig zu werten.

Es zeigte sich bei den unbehandelten rechten Kniegelenken der Metallpartikel-Gruppe ebenso eine inflammatorische Reaktion im Sinne einer signifikanten TNF α und IL-1 β -Expression in der synovialen Membran. IL-6 hingegen zeigte sich hierbei aber nicht signifikant erhöht, jedoch könnte ein zeitlicher Faktor eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben dieser Expression sein. IL-6 wird vor allem unter dem Einfluss von TNF α und IL-1 β produziert (50, 57, 232), diese beiden zeigten sich bereits positiv in unseren Ergebnissen. Epstein et al. sowie Kaufman et al. verdeutlichten in ihren Studien auch, dass der IL-6 Sezernierung in der periprothetischen Membran erst eine Expression von TNF α und IL-1 β vorausgeht (57, 112). In der Synovialmembran der rechten Kniegelenke fand also bereits eine beginnende Inflamationsreaktion mit TNF α und IL-1 β statt. Dies könnte somit ein Hinweis sein für eine systemische Reaktion auf Metallpartikel. Dieser Gedanke wird auch durch Ren et al. bestätigt, die eine Abnahme der Knochendichte im kontralateralen, unbehandelten Femur beobachten konnten, nachdem eine kontinuierliche Infusion von UHMWPE-Partikeln in den femoralen Markraum von Mäusen erfolgte (187). Unserer These entgegen liegt jedoch eine signifikante Anwesenheit von TNF α und IL-1 β in der Metallpartikelgruppe der rechten Kniegelenke ohne ein relevantes Vorkommen von Makrophagen vor, welche diese Zytokine in erster Linie freisetzen. Jedoch bedeutet das Fehlen einer signifikanten Anzahl CD68-positiver Zellen nicht, dass überhaupt keine Infiltration stattgefunden hat, sondern lediglich, dass eine vermehrte Ausschüttung dieser inflammatorischen Zytokine nicht unbedingt mit einer signifikanten Ansammlung von Makrophagen einhergehen muss.

Auch hier kann die Inkubationsdauer diskutiert werden: Eventuell kann eine zeitliche Verlängerung der Inkubationsdauer auch zu einem IL-6-Anstieg führen wie auch zu einer deutlichen Zunahme der Makrophagenanzahl.

Die histologischen und intravitalmikroskopischen sowie lokal immunhistochemischen Ergebnisse bezüglich der Metallionen lassen vermuten, dass deutlich höhere Konzentrationen nötig sein müssten, um eine entsprechende Immunantwort zu provozieren. Im Falle der Metallpartikelgruppe mag es aber durchaus der Fall sein, dass freigesetzte Metallionen die eigentliche Reaktion induziert haben. Massenspektrometrisch konnte gezeigt werden, dass Metall-Partikel signifikante Mengen von Kobalt- und Chrom- Ionen in ein Kulturmedium freisetzen können (182). Posada et al. erforschten in einem in vitro-Versuch, dass Metallabrieb als Induktor der Apoptose wirksamer war, wenn die Zellen mit Kobalt-Ionen vorbehandelt

worden waren (182). Zudem findet sich eine Korrelation zwischen hohen Serum-Metallionenwerten bei Patienten mit Hüftkappenprothesen mit höheren Revisionsraten und einem häufigeren Auftreten von ALTRs (125). In der Zusammenschau der eigenen Ergebnisse ließe sich vermuten, dass aus den Metallpartikeln Kobalt- und Chrom-Ionen entstehen und diese synergistisch, passend zu der schweren Gewebereaktion in der Metallpartikel-Gruppe, eine starke periprotetische Reaktion auslösen. Zu vermuten ist, dass die Metallpartikel intraartikulär korrodieren und damit zu einer Generierung größerer Mengen reaktiver Ionen geführt haben, was die deutliche lokale Inflammation bewirkt oder verstärkt haben könnte.

Das reaktive Potential der Metallionen zeigt sich unter anderem in der qualitativen Ausarbeitung der histologischen Präparate, in denen sich auch Auffälligkeiten der Knochenstruktur ergeben haben. Dies stützt Untersuchungen aus *in vitro* Versuchen, bei denen die zytotoxische Wirkung von Metallionen vor allem auf Osteozyten und auf die osteogene Differenzierung von mesenchymalen Stromazellen im Knochenmark gezeigt wurde (111, 185). Die Arbeitsgruppe um Jonitz et al. wies *in vitro* nach, dass Metallionen in humanen Osteoblasten in Co-Kultur mit peripheren mononukleären Blutzellen pro-osteolytische Mediatoren exprimieren (110). *In vivo* bestätigte sich eine negative Wirkung der Metallionen am Knochen, die verglichen mit der Reaktion auf Metallpartikel jedoch weniger häufig beobachtet wurde und geringer ausgeprägt war. Hier besteht die Möglichkeit, dass die applizierte Metallionenkonzentration deutlich geringer war, als die Menge durch reaktive Metallpartikel freigesetzter Ionen. Es bleibt unklar, wie hoch die *in vivo* freigesetzte lokale Ionenkonzentration im Gewebe war.

Während Metallpartikel vor allem eine lokale Rolle spielen, da sie hauptsächlich von vor Ort phagozytierenden Zellen aufgenommen werden, spielen Metallionen eine wesentliche Rolle im Hinblick auf eine systemische Wirkung im Körper (20, 27, 135, 167). Dementsprechend können Effekte von Metallionen auch systemisch in entfernten parenchymatösen Organen wie der Niere, Leber, Milz und Lunge beobachtet werden (113, 156, 169, 217).

Bei den Ergebnissen der organbezogenen Analyse zeigt sich eine vermehrte Expression von IL6 eigenständig nur in der Milz in der MP Gruppe, ansonsten ist die Expression der Zytokine äußerst heterogen. Wie in der Literatur bekannt, bedingten die Metallionen eine deutliche Mehrexpression sämtlicher Zytokine in der Niere der Versuchstiere (20, 47, 67, 80). Wie Eingangs bereits erwähnt, obwohl Co und Cr Ionen essentielle Elemente für biologische

Funktionen im Körper sind, können diese Elemente in hohen Konzentrationen lokale und systemische toxische Reaktionen hervorrufen (194). Folge der erhöhten Metallkonzentration im Blut können unter anderem nephrologische, neurologische und cerebrale Komplikationen sein (40, 216). Die nephrologische Komponente konnte mit den Ergebnissen dieser Arbeit bestätigt werden. Interessant ist zudem auch die ausgeprägte reaktive Reaktion in der Lunge, nachgewiesen durch die vermehrte Expression von TNF α , jedoch hier bedingt durch solide Metallpartikel und nicht durch Ionen. Dieses gegensätzliche, zytokinspezifische Reaktionsmuster zeigt sich auch bei der Untersuchung von Leber und Milz. So scheint in der Leber TNF α durch Metallpartikel getriggert zu sein, IL6 eher durch Metallionen. Bei der Expression von IL1b ergibt sich kein eindeutig erkennbares Muster, jedoch zeigt sich hier dann auch eine vermehrte Expression in der Gruppe der Polythylenpartikel. Andersherum wirkt dies bei der Betrachtung der Milz, hier scheint IL6 durch solide Metallpartikel getriggert zu werden. Im Hinblick auf die systemische Wirkung der genutzten Reagenzien muss konstatiert werden, dass insbesondere die systemischen Effekte sowohl durch solide Partikel (Lunge, Leber) als auch durch Ionen getriggert werden. Die exakten Wege können auch mit der vorliegenden Arbeit nicht detektiert werden, jedoch lässt sich schlussfolgern, dass sowohl Ionen als auch Partikel einen relevanten Teil im Prozess der biologischen Reaktion auf metallische CoCr Produkte spielen. Eine Fokussierung auf systemische Ionen ist nicht ausreichend. Weitere Studien sollten klären, inwiefern eine sich eine kritische Dosis von Metallpartikeln und Metallionen definieren lässt, zudem wären Langzeituntersuchungen angezeigt, die die komplexe zelluläre Beteiligung am vorliegenden biologisch reaktiven Prozess weiter aufschlüsseln und so die vorliegenden Ergebnisse mit kontroversen klinischen Daten in Einklang bringen.

Trotz der mitunter erkenntnisreichen Ergebnisse der vorliegenden Studie weist die Methodik auch einige Schwachstellen auf. Aufgeführt werden müssen hier die genutzten Dosierungen insbesondere von Metallionen und Metallpartikeln, für die es bisher keine vorausgehenden Dosisstudien oder Dosisfindungsstudien gab. Die genutzten Konzentrationen orientierten sich an bekannten klinischen und tierexperimentellen Gesichtspunkten, jedoch ist in naher Zukunft eine Dosisfindungsstudie zu Metallionen und Metallpartikeln geplant, um letzten Endes in Zukunft patientennähere Abschätzungen und Entscheidungen treffen zu können bei einer vorliegenden Belastung mit CoCr haltigen Abrieb bei entsprechenden Prothesenkomponenten.

Ferner lässt das Design nur eine deskriptive Beurteilung der Reaktionen unter Bemessung zahlreicher Zytokine zu, eine genaue Beschreibung insbesondere des systemischen Signalweges der Reaktion auf Ionen und Partikel bleibt offen.

Hier muss auch angeführt werden, dass die Ergebnisse der Polyethylengruppe durch den Nutzen von kommerziellen Partikeln beeinflusst sein können, da sich diese auch im Größenspektrum von Partikeln von crosslinked Polyethylenkomponenten unterscheiden. Dem entgegen stehen vorausgehende Ergebnisse aus der eigenen Arbeitsgruppe, die hier ähnliche biologische Reaktionen auf Polyethylenpartikel beschreiben konnten (220-223).

Zuletzt soll auf den kurzen Beobachtungszeitraum von sieben Tagen im genutzten Tiermodell hingewiesen werden. Komplexe weiterführende Mechanismen auf zellulärer und immunohistochemischer Ebene außerhalb des beobachteten Zeitraums zwischen Infiltration und Analyse der Tiere nach 7 Tagen können in der vorliegenden Arbeit nicht beleuchtet werden. Insbesondere die klinische Annahme, es handle sich bei der biologischen Reaktion auf CoCr Korrosionsprodukte um eine immunologische Typ IV Reaktion, konnte in der durchgeführten Studie nicht bestätigt werden.

Aufbauend auf den vorliegenden Ergebnissen und dem Erkenntnisgewinn sind Folgestudien geplant. Einerseits sollen kritische Dosierungen von Metallpartikeln und Metallionen herausgearbeitet werden, ab welchen mit metallassoziierten Komplikationen zu rechnen wäre, ferner sollen unterschiedliche und vor allem längere Beobachtungsintervalle untersucht werden, um eine Dynamik in diesem inflammatorischen Prozess analysieren zu können.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die biologische Aktivität von Metallionen und Metallpartikeln in einem murinen Kleintiermodell untersucht. Hintergrund der Arbeit ist die bisher weitestgehend ungeklärte Reaktion auf Metallabrieb unter dem klinischen Fokus auf Metallionen. Bekannt ist dabei, dass es weitreichende Komplikationen auf Metallabrieb nach endoprothetischer Versorgung geben kann, begonnen bei lokalen Reaktionen mit Lockerungsprozessen der Implantate bis hin zur Pseudotumorbildung unter Destruktion des angrenzenden Knochens, bis hin zu letalen Konsequenzen durch schwere systemische Wirkungen auf Herz, Nervensystem und Nieren. Es werden immer wieder Fälle beschrieben,

bei denen im Rahmen einer Autopsie post-mortem Metallpartikel in Herzmuskelzellen nachgewiesen werden konnten. Dennoch gab es bisher keine Untersuchungen, ob Metallionen, solide Metallpartikel oder eine Kombination von beidem zu den genannten Effekten führen. Dies zum Anlass genommen, wurden in einem etablierten Tiermodell CoCr Ionen, CoCr Partikel, PE Partikel und PBS als Kontrolllösung in linke Kniegelenke von Balb/c Mäusen injiziert. Nach einer Inkubationszeit von 7 Tagen wurden die Tiere erst intravitalmikroskopisch untersucht und im Anschluss euthanasiert für eine histologische und immunhistochemische Analyse der Kniegelenke sowie parenchymatöser Organe wie Lunge, Milz, Niere und Leber.

Es zeigte sich, dass die lokalen Reaktionen im Gelenk durch solide Metallpartikel induziert werden. In diesem Zusammenhang konnten neben einer deutlichen Verdickung der murinen Synovialmembran auch pseudotumorähnliche Gewebsformationen mit einem lokal aggressiven Wachstumsverhalten beobachtet werden. In der angeschlossenen Immunhistochemie bestätigte sich die lokale Inflammation durch Nachweis entsprechender Zytokine, jedoch wurde auch festgestellt, dass die gefundenen Tumoren keine Lymphozyten, sondern vornehmlich Markophagen aufweisen, was sie von den in der Literatur am Patienten beschriebenen Pseudotumoren abgrenzt. Dennoch ist dies der erste beschriebene Nachweis von entsprechenden Gewebsformationen in einem Tiermodell, provoziert durch solide Metallpartikel. Dennoch zeigte sich auch eine Pathogenität der Metallionen. Dabei kommen am ehesten systemische Effekte zu tragen, was insbesondere am Nachweis von Inflammationszytokinen in den Nieren der betroffenen Tiere zu erkennen war. Bei den systemischen Effekten sind jedoch auch die Metallpartikel nicht unwirksam. Auch dabei zeigten sich zytokinabhängige Auswirkungen auf Leber, Milz und vor allem Lunge.

Zusammenfassend kann konstatiert werden, dass Metallpartikel, zumindest im vorliegenden Tiermodell, verantwortlich für die lokale Reaktion auf den Metallabrieb waren. Die beschriebenen Gewebsformationen waren pseudotumorähnlich und (noch) lymphozytenfrei, was durch die begrenzte Inkubationszeit von 7 Tagen erklärt werden könnte. Die systemischen Effekte waren äußerst heterogen und abhängig von den einzelnen Markern und Zielorganen. Hervorsticht jedoch die Reaktion von Metallionen auf die Nieren sowie die Wirkung von Metallpartikeln in den Lungen sowie die äußerst differenzierten Zytokinexpressionsmuster in

der Leber der Tiere. Dies lässt möglicherweise auf eine deutlich komplexere Signalkaskade schließen als anfangs vermutet.

Mit dem Erkenntnis der vorliegenden Studie muss im nächsten Schritt nach dosisabhängigen Reaktionen für Metallionen und -partikel gesucht werden, ferner gilt es die Signalkaskade der systemischen Reaktion auf Metallabrieb näher zu beleuchten, um letzten Endes prädiktive Werte und Therapien für Patienten im klinischen Setting darauf ableiten zu können.

6. Literaturverzeichnis

1. Adams JE, Jaffe KA, Lemons JE, Siegal GP. Prosthetic implant associated sarcomas: a case report emphasizing surface evaluation and spectroscopic trace metal analysis. *Ann Diagn Pathol.* 2003;7(1):35-46.
2. al-Saffar N, Revell PA. Pathology of the bone-implant interfaces. *J Long Term Eff Med Implants.* 1999;9(4):319-47.
3. Allen MJ, Myer BJ, Millett PJ, Rushton N. The effects of particulate cobalt, chromium and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro. *J Bone Joint Surg Br.* 1997;79(3):475-82.
4. Antoniou J, Zukor DJ, Mwale F, Minarik W, Petit A, Huk OL. Metal ion levels in the blood of patients after hip resurfacing: a comparison between twenty-eight and thirty-six-millimeter-head metal-on-metal prostheses. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90 Suppl 3:142-8.
5. Association AO. Hip, Knee & Shoulder Arthroplasty Annual Report 2018.
6. Athanasou NA, Quinn J. Immunophenotypic differences between osteoclasts and macrophage polykaryons: immunohistological distinction and implications for osteoclast ontogeny and function. *Journal of clinical pathology.* 1990;43(12):997-1003.
7. Atrey A, Hart A, Hussain N, Waite J, Shepherd AJ, Young S. 601 metal-on-metal total hip replacements with 36 mm heads a 5 minimum year follow up: Levels of ARMD remain low despite a comprehensive screening program. *J Orthop.* 2017;14(1):108-14.

8. Bar-Or D, Curtis G, Rao N, Bampos N, Lau E. Characterization of the Co(2+) and Ni(2+) binding amino-acid residues of the N-terminus of human albumin. An insight into the mechanism of a new assay for myocardial ischemia. *European journal of biochemistry / FEBS*. 2001;268(1):42-7.
9. Barrera P, Blom A, van Lent PL, van Bloois L, Beijnen JH, van Rooijen N, et al. Synovial macrophage depletion with clodronate-containing liposomes in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism*. 2000;43(9):1951-9.
10. Baskey SJ, Lehoux EA, Catelas I. Effects of cobalt and chromium ions on lymphocyte migration. *J Orthop Res*. 2017(1554-527X (Electronic)).
11. Bauer TW, Schils J. The pathology of total joint arthroplasty.II. Mechanisms of implant failure. *Skeletal Radiol*. 1999;28(9):483-97.
12. Bisschop R, Boomsma MF, Van Raay JJ, Tiebosch AT, Maas M, Gerritsma CL. High prevalence of pseudotumors in patients with a Birmingham Hip Resurfacing prosthesis: a prospective cohort study of one hundred and twenty-nine patients. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(17):1554-60.
13. Bleß H-H, Kip M. *Versorgungssituation endoprothetischer Hüft- und Knieoperationen in Deutschland*: Springer; 2016.
14. Boardman DR, Middleton FR, Kavanagh TG. A benign psoas mass following metal-on-metal resurfacing of the hip. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2006;88(3):402-4.
15. Borguet F, Cornelis R, Delanghe J, Lambert MC, Lameire N. Study of the chromium binding in plasma of patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1995;238(1):71-84.
16. Bouchard PR, Black J, Albrecht BA, Kaderly RE, Galante JO, Pauli BU. Carcinogenicity of CoCrMo (F-75) implants in the rat. *J Biomed Mater Res*. 1996;32(1):37-44.
17. Boutin P. Total hip arthroplasty using a ceramic prosthesis. Pierre Boutin (1924-1989). *Clin Orthop Relat Res*. 2000(379):3-11.
18. Boutin P, Christel P, Dorlot JM, Meunier A, de Roquancourt A, Blanquaert D, et al. The use of dense alumina-alumina ceramic combination in total hip replacement. *J Biomed Mater Res*. 1988;22(12):1203-32.
19. Brackertz D, Mitchell GF, Mackay IR. Antigen-induced arthritis in mice. I. Induction of arthritis in various strains of mice. *Arthritis Rheum*. 1977;20(3):841-50.

20. Bradberry SM, Wilkinson JM, Ferner RE. Systemic toxicity related to metal hip prostheses. *Clin Toxicol (Phila)*. 2014;52(8):837-47.
21. Brown C, Williams S, Tipper JL, Fisher J, Ingham E. Characterisation of wear particles produced by metal on metal and ceramic on metal hip prostheses under standard and microseparation simulation. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(5):819-27.
22. Cadosch D, Chan E, Gautschi OP, Filgueira L. Metal is not inert: role of metal ions released by biocorrosion in aseptic loosening--current concepts. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2009;91(4):1252-62.
23. Caicedo MS, Desai R, McAllister K, Reddy A, Jacobs JJ, Hallab NJ. Soluble and particulate Co-Cr-Mo alloy implant metals activate the inflammasome danger signaling pathway in human macrophages: a novel mechanism for implant debris reactivity. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2009;27(7):847-54.
24. Caicedo MS, Pennekamp PH, McAllister K, Jacobs JJ, Hallab NJ. Soluble ions more than particulate cobalt-alloy implant debris induce monocyte costimulatory molecule expression and release of proinflammatory cytokines critical to metal-induced lymphocyte reactivity. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2010;93(4):1312-21.
25. Callary SA, Field JR, Campbell DG. Low Wear of a Second-generation Highly Crosslinked Polyethylene Liner: A 5-year Radiostereometric Analysis Study. *Clin Orthop Relat Res*. 2013;471(11):3596-600.
26. Campbell P, Ebrahimzadeh E, Nelson S, Takamura K, De Smet K, Amstutz HC. Histological features of pseudotumor-like tissues from metal-on-metal hips. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(9):2321-7.
27. Campbell PA, Kung MS, Hsu AR, Jacobs JJ. Do retrieval analysis and blood metal measurements contribute to our understanding of adverse local tissue reactions? *Clin Orthop Relat Res*. 2014;472(12):3718-27.
28. Case CP, Langkamer VG, James C, Palmer MR, Kemp AJ, Heap PF, et al. Widespread dissemination of metal debris from implants. *J Bone Joint Surg Br*. 1994;76(5):701-12.
29. Catelas I, Huk OL, Petit A, Zukor DJ, Marchand R, Yahia L. Flow cytometric analysis of macrophage response to ceramic and polyethylene particles: effects of size, concentration, and composition. *J Biomed Mater Res*. 1998;41(4):600-7.
30. Catelas I, Jacobs JJ. Biologic activity of wear particles. *Instr Course Lect*. 2010;59:3-16.

31. Catelas I, Petit A, Zukor DJ, Antoniou J, Huk OL. TNF-alpha secretion and macrophage mortality induced by cobalt and chromium ions in vitro-qualitative analysis of apoptosis. *Biomaterials*. 2003;24(3):383-91.
32. Catelas I, Wimmer MA, Utzschneider S. Polyethylene and metal wear particles: characteristics and biological effects. *Seminars in immunopathology*. 2011;33(3):257-71.
33. Charnley J. Arthroplasty of the hip. A new operation. *Lancet*. 1961;1(7187):1129-32.
34. Charnley J, Follacci FM, Hammond BT. The long-term reaction of bone to self-curing acrylic cement. *J Bone Joint Surg Br*. 1968;50(4):822-9.
35. Charnley J, Halley DK. Rate of wear in total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res*. 1975(112):170-9.
36. Chiari K, Zweymuller K, Paltrinieri M, Trentani C, Stark N. [A ceramic total hip endoprosthesis for implantation without bone cement. Preliminary report (author's transl)]. *Archiv fur orthopadische und Unfall-Chirurgie*. 1977;89(3):305-13.
37. Childs LM, Goater JJ, O'Keefe RJ, Schwarz EM. Efficacy of etanercept for wear debris-induced osteolysis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2001;16(2):338-47.
38. Christel P, Meunier A, Dorlot JM, Crolet JM, Witvoet J, Sedel L, et al. Biomechanical compatibility and design of ceramic implants for orthopedic surgery. *Ann N Y Acad Sci*. 1988;523:234-56.
39. Claes L, Kirschner S, Perka C, Rudert M. *AE-Manual der Endoprothetik - Hüfte und Hüftrevision*. Heidelberg: Springer; 2012.
40. Clark MJ, Prentice JR, Hoggard N, Paley MN, Hadjivassiliou M, Wilkinson JM. Brain structure and function in patients after metal-on-metal hip resurfacing. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2014;35(9):1753-8.
41. Clodfelder BJ, Emamaullee J, Hepburn DD, Chakov NE, Nettles HS, Vincent JB. The trail of chromium(III) in vivo from the blood to the urine: the roles of transferrin and chromodulin. *Journal of biological inorganic chemistry : JBIC : a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*. 2001;6(5-6):608-17.
42. Crowninshield RD, Rosenberg AG, Sporer SM. Changing demographics of patients with total joint replacement. *Clin Orthop Relat Res*. 2006;443:266-72.

43. Daley B, Doherty AT, Fairman B, Case CP. Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture. *J Bone Joint Surg Br.* 2004;86(4):598-606.
44. Dapunt U, Giese T, Prior B, Gaida MM, Hansch GM. Infectious versus non-infectious loosening of implants: activation of T lymphocytes differentiates between the two entities. *International orthopaedics.* 2014;38(6):1291-6.
45. Davda K, Lali FV, Sampson B, Skinner JA, Hart AJ. An analysis of metal ion levels in the joint fluid of symptomatic patients with metal-on-metal hip replacements. *J Bone Joint Surg Br.* 2011;93(6):738-45.
46. Davies AP, Willert HG, Campbell PA, Learmonth ID, Case CP. An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissues around contemporary metal-on-metal joint replacements. *J Bone Joint Surg Am.* 2005;87(1):18-27.
47. Davis DL, Morrison JJ. Hip Arthroplasty Pseudotumors: Pathogenesis, Imaging, and Clinical Decision Making. *J Clin Imaging Sci.* 2016;6:17.
48. De Smet K, De Haan R, Calistri A, Campbell PA, Ebramzadeh E, Pattyn C, et al. Metal ion measurement as a diagnostic tool to identify problems with metal-on-metal hip resurfacing. *J Bone Joint Surg Am.* 2008;90 Suppl 4:202-8.
49. Delaunay C, Petit I, Learmonth ID, Oger P, Vendittoli PA. Metal-on-metal bearings total hip arthroplasty: the cobalt and chromium ions release concern. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR.* 2010;96(8):894-904.
50. Dinarello CA. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *The Journal of experimental medicine.* 2005;201(9):1355-9.
51. Diwanji SR, Seon JK, Song EK, Yoon TR. Fracture of the ABC ceramic liner: a report of three cases. *Clin Orthop Relat Res.* 2007;464:242-6.
52. Donovan JA, Koretzky GA. CD45 and the immune response. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN.* 1993;4(4):976-85.
53. Doorn PF, Campbell PA, Worrall J, Benya PD, McKellop HA, Amstutz HC. Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles. *J Biomed Mater Res.* 1998;42(1):103-11.
54. Durr HR. [The problem of fractures of ceramic heads. What should be done?]. *Orthopade.* 2009;38(8):698-703.

55. Ebramzadeh E, Campbell P, Tan TL, Nelson SD, Sangiorgio SN. Can wear explain the histological variation around metal-on-metal total hips? *Clin Orthop Relat Res.* 2015;473(2):487-94.
56. Endo M, Tipper JL, Barton DC, Stone MH, Ingham E, Fisher J. Comparison of wear, wear debris and functional biological activity of moderately crosslinked and non-crosslinked polyethylenes in hip prostheses. *Proc Inst Mech Eng H.* 2002;216(2):111-22.
57. Epstein NJ, Warme BA, Spanogle J, Ma T, Bragg B, Smith RL, et al. Interleukin-1 modulates periprosthetic tissue formation in an intramedullary model of particle-induced inflammation. *J Orthop Res.* 2005;23(3):501-10.
58. Espallargas N, Fischer A, Munoz AI, Mischler S, Wimmer MA. In-situ Generated Tribomaterial in Metal/Metal Contacts: current understanding and future implications for implants. *Biotribology (Oxf).* 2017;10:42-50.
59. Esposito CI, Wright TM, Goodman SB, Berry DJ, Clinical B, Bioengineering Study Groups from Carl TBW. What is the trouble with trunnions? *Clin Orthop Relat Res.* 2014;472(12):3652-8.
60. Fehring TK, Odum S, Sproul R, Weathersbee J. High frequency of adverse local tissue reactions in asymptomatic patients with metal-on-metal THA. *Clin Orthop Relat Res.* 2014;472(2):517-22.
61. Firkins PJ, Tipper JL, Saadatzadeh MR, Ingham E, Stone MH, Farrar R, et al. Quantitative analysis of wear and wear debris from metal-on-metal hip prostheses tested in a physiological hip joint simulator. *Biomed Mater Eng.* 2001;11(2):143-57.
62. Folz BJ, Silver CE, Rinaldo A, Ferlito A. Themistocles Gluck: biographic remarks emphasising his contributions to laryngectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2011;268(8):1175-9.
63. Friesenbichler J, Maurer-Ertl W, Sadoghi P, Lovse T, Windhager R, Leithner A. Serum metal ion levels after rotating-hinge knee arthroplasty: comparison between a standard device and a megaprosthesis. *International orthopaedics.* 2012;36(3):539-44.
64. Galvin A, Kang L, Tipper J, Stone M, Ingham E, Jin Z, et al. Wear of crosslinked polyethylene under different tribological conditions. *J Mater Sci Mater Med.* 2006;17(3):235-43.

65. Garoui E, Ben Amara I, Driss D, Elwej A, Chaabouni SE, Boudawara T, et al. Effects of cobalt on membrane ATPases, oxidant, and antioxidant values in the cerebrum and cerebellum of suckling rats. *Biol Trace Elem Res*. 2013;154(3):387-95.
66. Germain MA, Hatton A, Williams S, Matthews JB, Stone MH, Fisher J, et al. Comparison of the cytotoxicity of clinically relevant cobalt-chromium and alumina ceramic wear particles in vitro. *Biomaterials*. 2003;24(3):469-79.
67. Gessner BD, Steck T, Woelber E, Tower SS. A Systematic Review of Systemic Cobaltism After Wear or Corrosion of Chrome-Cobalt Hip Implants. *J Patient Saf*. 2015.
68. Gibon E, Amanatullah DF, Loi F, Pajarinen J, Nabeshima A, Yao Z, et al. The biological response to orthopaedic implants for joint replacement: Part I: Metals. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016.
69. Glyn-Jones S, Pandit H, Kwon YM, Doll H, Gill HS, Murray DW. Risk factors for inflammatory pseudotumour formation following hip resurfacing. *J Bone Joint Surg Br*. 2009;91(12):1566-74.
70. Glyn-Jones S, Roques A, Taylor A, Kwon YM, McLardy-Smith P, Gill HS, et al. The in vivo linear and volumetric wear of hip resurfacing implants revised for pseudotumor. *J Bone Joint Surg Am*. 2011;93(23):2180-8.
71. Goodman SB. Wear particles, periprosthetic osteolysis and the immune system. *Biomaterials*. 2007;28(34):5044-8.
72. Gordon A, Kiss-Toth E, Stockley I, Eastell R, Wilkinson JM. Polymorphisms in the interleukin-1 receptor antagonist and interleukin-6 genes affect risk of osteolysis in patients with total hip arthroplasty. *Arthritis and rheumatism*. 2008;58(10):3157-65.
73. Grammatopoulos G, Pandit H, Kamali A, Maggiani F, Glyn-Jones S, Gill HS, et al. The correlation of wear with histological features after failed hip resurfacing arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2013;95(12):e81.
74. Green TR, Fisher J, Matthews JB, Stone MH, Ingham E. Effect of size and dose on bone resorption activity of macrophages by in vitro clinically relevant ultra high molecular weight polyethylene particles. *J Biomed Mater Res*. 2000;53(5):490-7.
75. Green TR, Fisher J, Stone M, Wroblewski BM, Ingham E. Polyethylene particles of a 'critical size' are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials*. 1998;19(24):2297-302.

76. Greenfield EM, Bi Y, Ragab AA, Goldberg VM, Nalepka JL, Seabold JM. Does endotoxin contribute to aseptic loosening of orthopedic implants? *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;72(1):179-85.
77. Grigoris P, Roberts P, Panousis K, Bosch H. The evolution of hip resurfacing arthroplasty. *Orthop Clin North Am*. 2005;36(2):125-34, vii.
78. Grimberg A, Jansson V, Liebs T, Melsheimer O, Steinbrück A. Endoprothesenregister Deutschland - Jahresbericht 2016: EPRD Deutsche Endoprothesenregister gGmbH; 2017.
79. Grosse S, Haugland HK, Lilleng P, Ellison P, Hallan G, Hol PJ. Wear particles and ions from cemented and uncemented titanium-based hip prostheses-a histological and chemical analysis of retrieval material. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2015;103(3):709-17.
80. Grote CW, Cowan PC, Anderson DW, Templeton KJ. Pseudotumor from Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty Causing Unilateral Leg Edema: Case Presentation and Literature Review. *Biores Open Access*. 2018;7(1):33-8.
81. Günther K-P, Schmitt J, Campbell P. Aktuelle Konsensus-Empfehlungen zur Handhabung von Metall-Metall-Gleitpaarungen 2012.
82. Gunther KP, Lutzner J, Hannemann F, Schmitt J, Kirschner S, Goronzy J, et al. [Update on metal-on-metal hip joints]. *Orthopade*. 2013;42(5):373-87; quiz 88-9.
83. Guo H, Kumar P, Moran TM, Garcia-Sastre A, Zhou Y, Malarkannan S. The functional impairment of natural killer cells during influenza virus infection. *Immunology and cell biology*. 2009;87(8):579-89.
84. Ha YC, Kim SY, Kim HJ, Yoo JJ, Koo KH. Ceramic liner fracture after cementless alumina-on-alumina total hip arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;458:106-10.
85. Haddad FS, Thakrar RR, Hart AJ, Skinner JA, Nargol AV, Nolan JF, et al. Metal-on-metal bearings: the evidence so far. *J Bone Joint Surg Br*. 2011;93(5):572-9.
86. Haidl ID, Ng DH, Rothenberger S, Johnson P, Jefferies WA. Detection of restricted isoform expression and tyrosine phosphatase activity of CD45 in murine dendritic cells. *European journal of immunology*. 1995;25(12):3370-4.
87. Hallab NJ, Caicedo M, Epstein R, McAllister K, Jacobs JJ. In vitro reactivity to implant metals demonstrates a person-dependent association with both T-cell and B-cell activation. *J Biomed Mater Res A*. 2010;92(2):667-82.
88. Hallab NJ, Jacobs JJ. Biologic effects of implant debris. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2009;67(2):182-8.

89. Hallab NJ, Jacobs JJ, Skipor A, Black J, Mikecz K, Galante JO. Systemic metal-protein binding associated with total joint replacement arthroplasty. *J Biomed Mater Res.* 2000;49(3):353-61.
90. Hallab NJ, Skipor A, Jacobs JJ. Interfacial kinetics of titanium-and cobalt-based implant alloys in human serum: Metal release and biofilm formation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials.* 2003;65(3):311-8.
91. Hanawa T. Metal Ion release from implant materials. *Materials Science and Engineering C.* 2004;12(6):745-52.
92. Hansen MB, Johansen JD, Menne T. Chromium allergy: significance of both Cr(III) and Cr(VI). *Contact Dermatitis.* 2003;49(4):206-12.
93. Hao HN, Zheng B, Nasser S, Ren W, Latteier M, Wooley P, et al. The roles of monocytic heat shock protein 60 and Toll-like receptors in the regional inflammation response to wear debris particles. *J Biomed Mater Res A.* 2010;92(4):1373-81.
94. Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K. An improved intravital microscopy system. *International journal of microcirculation, clinical and experimental / sponsored by the European Society for Microcirculation.* 1997;17(6):322-7.
95. Hart AJ, Skinner JA, Winship P, Faria N, Kulinskaya E, Webster D, et al. Circulating levels of cobalt and chromium from metal-on-metal hip replacement are associated with CD8+ T-cell lymphopenia. *J Bone Joint Surg Br.* 2009;91(6):835-42.
96. Hasegawa M, Sudo A, Hirata H, Uchida A. Ceramic acetabular liner fracture in total hip arthroplasty with a ceramic sandwich cup. *J Arthroplasty.* 2003;18(5):658-61.
97. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annual review of immunology.* 2003;21:107-37.
98. Hernigou P. Earliest times before hip arthroplasty: from John Rhea Barton to Themistocles Gluck. *International orthopaedics.* 2013;37(11):2313-8.
99. Hernigou P. Smith-Petersen and early development of hip arthroplasty. *International orthopaedics.* 2014;38(1):193-8.
100. Medical Device Alert- All metal-on-metal (MoM) hip replacements [press release]. 2010.

101. Huss RS, Huddleston JI, Goodman SB, Butcher EC, Zabel BA. Synovial tissue-infiltrating natural killer cells in osteoarthritis and periprosthetic inflammation. *Arthritis and rheumatism*. 2010;62(12):3799-805.
102. Illgen RL, 2nd, Bauer LM, Hotujec BT, Kolpin SE, Bakhtiar A, Forsythe TM. Highly crosslinked vs conventional polyethylene particles: relative in vivo inflammatory response. *J Arthroplasty*. 2009;24(1):117-24.
103. Ingham E, Fisher J. Biological reactions to wear debris in total joint replacement. *Proc Inst Mech Eng H*. 2000;214(1):21-37.
104. Ingham E, Fisher J. The role of macrophages in osteolysis of total joint replacement. *Biomaterials*. 2005;26(11):1271-86.
105. Iwamoto T, Ikari K, Momohara S. Pseudotumor from a metal-on-metal hip. *The Journal of rheumatology*. 2011;38(10):2265.
106. Iwanaga T, Shikichi M, Kitamura H, Yanase H, Nozawa-Inoue K. Morphology and functional roles of synoviocytes in the joint. *Archives of histology and cytology*. 2000;63(1):17-31.
107. Jacobs JJ, Gilbert JL, Urban RM. Corrosion of metal orthopaedic implants. *J Bone Joint Surg Am*. 1998;80(2):268-82.
108. Jacobs JJ, Hallab NJ, Skipor AK, Urban RM. Metal degradation products: a cause for concern in metal-metal bearings? *Clin Orthop Relat Res*. 2003(417):139-47.
109. Jonitz-Heincke A, Schröder M, Hansmann D, Utzschneider S, Kretzer J, Bader R. The influence of metallic ions from CoCr28Mo6 on the osteogenic differentiation and cytokine release of human osteoblasts. *Current Directions in Biomedical Engineerin*. 2015;1:498-502.
110. Jonitz-Heincke A, Tillmann J, Klinder A, Krueger S, Kretzer JP, Hol PJ, et al. The Impact of Metal Ion Exposure on the Cellular Behavior of Human Osteoblasts and PBMCs: In Vitro Analyses of Osteolytic Processes. *Materials (Basel)*. 2017;10(7).
111. Kanaji A, Orhue V, Caicedo MS, Viridi AS, Sumner DR, Hallab NJ, et al. Cytotoxic effects of cobalt and nickel ions on osteocytes in vitro. *J Orthop Surg Res*. 2014;9:91.
112. Kaufman AM, Alabre CI, Rubash HE, Shanbhag AS. Human macrophage response to UHMWPE, TiAlV, CoCr, and alumina particles: analysis of multiple cytokines using protein arrays. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2008;84(2):464-74.

113. Keegan GM, Learmonth ID, Case CP. Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: A review of current knowledge and future strategies. *J Bone Joint Surg Br.* 2007;89(5):567-73.
114. Kim HY, Kim HJ, Min HS, Kim S, Park WS, Park SH, et al. NKT cells promote antibody-induced joint inflammation by suppressing transforming growth factor beta1 production. *The Journal of experimental medicine.* 2005;201(1):41-7.
115. Knecht A, Witzleb WC, Gunther KP. [Resurfacing arthroplasty of the hip]. *Orthopade.* 2005;34(1):79-89; quiz 90.
116. Kobayashi Y, Kim KJ, Itoh T. Gene expression of bone-resorbing cytokines in rat osteolysis model. *Journal of orthopaedic science : official journal of the Japanese Orthopaedic Association.* 2005;10(1):62-9.
117. Kohn D, Plitz W. [Endoprosthesis and bone reaction]. *Orthopade.* 1995;24(5):409-15.
118. Konttinen YT, Kurvinen H, Takagi M, Michelsson JE, Eklund KK, Nordsletten L, et al. Interleukin-1 and collagenases around loosening total hip prostheses. *Clinical and experimental rheumatology.* 1996;14(3):255-62.
119. Konttinen YT, Xu JW, Waris E, Li TF, Gomez-Barrena E, Nordsletten L, et al. Interleukin-6 in aseptic loosening of total hip replacement prostheses. *Clinical and experimental rheumatology.* 2002;20(4):485-90.
120. Kraft CN, Burian B, Perlick L, Wimmer MA, Wallny T, Schmitt O, et al. Impact of a nickel-reduced stainless steel implant on striated muscle microcirculation: a comparative in vivo study. *J Biomed Mater Res.* 2001;57(3):404-12.
121. Kreuz-Brinker R. Klinische Erfahrungen mit der McKee-Farrar-Endoprothese. In: Huber, editor. *Die Metallpaarung „Metasul“ in der Hüftendoprothetik.* Bern: Schmidt; 1995.
122. Kurtz SM, Gawel HA, Patel JD. History and systematic review of wear and osteolysis outcomes for first-generation highly crosslinked polyethylene. *Clin Orthop Relat Res.* 2011;469(8):2262-77.
123. Kwon YM, Glyn-Jones S, Simpson DJ, Kamali A, McLardy-Smith P, Gill HS, et al. Analysis of wear of retrieved metal-on-metal hip resurfacing implants revised due to pseudotumours. *J Bone Joint Surg Br.* 2010;92(3):356-61.
124. Kwon YM, Thomas P, Summer B, Pandit H, Taylor A, Beard D, et al. Lymphocyte proliferation responses in patients with pseudotumors following metal-on-metal hip resurfacing arthroplasty. *J Orthop Res.* 2010;28(4):444-50.

125. Laaksonen I, Donahue GS, Madanat R, Makela KT, Malchau H. Outcomes of the Recalled Articular Surface Replacement Metal-on-Metal Hip Implant System: A Systematic Review. *J Arthroplasty*. 2016.
126. Lacal P, Pulido R, Sanchez-Madrid F, Mollinedo F. Intracellular location of T200 and Mo1 glycoproteins in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry*. 1988;263(20):9946-51.
127. Lang G. *Histotechnik. Immunhistochemie*: Springer; 2013. p. 269-304.
128. Langkamer VG, Case CP, Heap P, Taylor A, Collins C, Pearse M, et al. Systemic distribution of wear debris after hip replacement. A cause for concern? *J Bone Joint Surg Br*. 1992;74(6):831-9.
129. Lavigne M, Belzile EL, Roy A, Morin F, Amzica T, Vendittoli PA. Comparison of whole-blood metal ion levels in four types of metal-on-metal large-diameter femoral head total hip arthroplasty: the potential influence of the adapter sleeve. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2011;93 Suppl 2:128-36.
130. Learmonth ID, Young C, Rorabeck C. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*. 2007;370(9597):1508-19.
131. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol*. 1993;143(4):1055-62.
132. Lehtovirta L, Reito A, Parkkinen J, Hothi H, Henckel J, Hart A, et al. Analysis of bearing wear, whole blood and synovial fluid metal ion concentrations and histopathological findings in patients with failed ASR hip resurfacings. *BMC musculoskeletal disorders*. 2017;18(1):523.
133. Leung KN, Ada GL. Induction of natural killer cells during murine influenza virus infection. *Immunobiology*. 1981;160(3-4):352-66.
134. Lewis CG, Belniak RM, Plowman MC, Hopfer SM, Knight JA, Sunderman FW, Jr. Intraarticular carcinogenesis bioassays of CoCrMo and TiAlV alloys in rats. *J Arthroplasty*. 1995;10(1):75-82.
135. Leyssens L, Vinck B, Van Der Straeten C, Wuyts F, Maes L. Cobalt toxicity in humans-A review of the potential sources and systemic health effects. *Toxicology*. 2017;387:43-56.
136. Lin TH, Kao S, Sato T, Pajarinen J, Zhang R, Loi F, et al. Exposure of polyethylene particles induces interferon-gamma expression in a natural killer T lymphocyte and dendritic cell coculture system in vitro: a preliminary study. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2015;103(1):71-5.

137. Lohmann CH, Hameister R, Singh G. Allergies in orthopaedic and trauma surgery. *Orthopaedics & traumatology, surgery & research : OTSR*. 2017;103(1s):S75-s81.
138. Lohmann CH, Meyer H, Nuechtern JV, Singh G, Junk-Jantsch S, Schmotzer H, et al. Periprosthetic tissue metal content but not serum metal content predicts the type of tissue response in failed small-diameter metal-on-metal total hip arthroplasties. *The Journal of bone and joint surgery American volume*. 2013;95(17):1561-8.
139. Lorber V, Paulus AC, Buschmann A, Schmitt B, Grupp TM, Jansson V, et al. Elevated cytokine expression of different PEEK wear particles compared to UHMWPE in vivo. *J Mater Sci Mater Med*. 2014;25(1):141-9.
140. Lunemann S, Malone DF, Hengst J, Port K, Grabowski J, Deterding K, et al. Compromised function of natural killer cells in acute and chronic viral hepatitis. *The Journal of infectious diseases*. 2014;209(9):1362-73.
141. Ma T, Huang Z, Ren PG, McCally R, Lindsey D, Smith RL, et al. An in vivo murine model of continuous intramedullary infusion of polyethylene particles. *Biomaterials*. 2008;29(27):3738-42.
142. Magone K, Luckenbill D, Goswami T. Metal ions as inflammatory initiators of osteolysis. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*. 2015;135(5):683-95.
143. Mahendra G, Pandit H, Kliskey K, Murray D, Gill HS, Athanasou N. Necrotic and inflammatory changes in metal-on-metal resurfacing hip arthroplasties. *Acta orthopaedica*. 2009;80(6):653-9.
144. Mak KH, Wong TK, Poddar NC. Wear debris from total hip arthroplasty presenting as an intrapelvic mass. *J Arthroplasty*. 2001;16(5):674-6.
145. Maloney WJ, Peters P, Engh CA, Chandler H. Severe osteolysis of the pelvis in association with acetabular replacement without cement. *J Bone Joint Surg Am*. 1993;75(11):1627-35.
146. Malviya A, Abdul N, Khanduja V. Outcomes Following Total Hip Arthroplasty: A Review of the Registry Data. *Indian J Orthop*. 2017;51(4):405-13.
147. Margevicius KJ, Bauer TW, McMahon JT, Brown SA, Merritt K. Isolation and characterization of debris in membranes around total joint prostheses. *J Bone Joint Surg Am*. 1994;76(11):1664-75.

148. Martinez-Pomares L, Platt N, McKnight AJ, da Silva RP, Gordon S. Macrophage membrane molecules: markers of tissue differentiation and heterogeneity. *Immunobiology*. 1996;195(4-5):407-16.
149. Matthews JB, Besong AA, Green TR, Stone MH, Wroblewski BM, Fisher J, et al. Evaluation of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles of known size and dose. *J Biomed Mater Res*. 2000;52(2):296-307.
150. Matthews JB, Green TR, Stone MH, Wroblewski BM, Fisher J, Ingham E. Comparison of the response of primary human peripheral blood mononuclear phagocytes from different donors to challenge with model polyethylene particles of known size and dose. *Biomaterials*. 2000;21(20):2033-44.
151. Matthews JB, Green TR, Stone MH, Wroblewski BM, Fisher J, Ingham E. Comparison of the response of primary murine peritoneal macrophages and the U937 human histiocytic cell line to challenge with in vitro generated clinically relevant UHMWPE particles. *Biomed Mater Eng*. 2000;10(3-4):229-40.
152. McKee GK, Watson-Farrar J. Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. *J Bone Joint Surg Br*. 1966;48(2):245-59.
153. McKellop H, Shen FW, Lu B, Campbell P, Salovey R. Development of an extremely wear-resistant ultra high molecular weight polyethylene for total hip replacements. *J Orthop Res*. 1999;17(2):157-67.
154. McKellop HA, Shen FW, Campbell P, Ota T. Effect of molecular weight, calcium stearate, and sterilization methods on the wear of ultra high molecular weight polyethylene acetabular cups in a hip joint simulator. *J Orthop Res*. 1999;17(3):329-39.
155. Merkel KD, Erdmann JM, McHugh KP, Abu-Amer Y, Ross FP, Teitelbaum SL. Tumor necrosis factor-alpha mediates orthopedic implant osteolysis. *The American journal of pathology*. 1999;154(1):203-10.
156. Merritt K, Brown SA. Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions. *Clin Orthop Relat Res*. 1996(329 Suppl):S233-43.
157. Moore AT. Metal hip joint; a new self-locking vitallium prosthesis. *South Med J*. 1952;45(11):1015-19.
158. Morawietz L, Tiddens O, Mueller M, Tohtz S, Gansukh T, Schroeder JH, et al. Twenty-three neutrophil granulocytes in 10 high-power fields is the best histopathological threshold

to differentiate between aseptic and septic endoprosthesis loosening. *Histopathology*. 2009;54(7):847-53.

159. Muratoglu OK, Bragdon CR, O'Connor DO, Jasty M, Harris WH, Gul R, et al. Unified wear model for highly crosslinked ultra-high molecular weight polyethylenes (UHMWPE). *Biomaterials*. 1999;20(16):1463-70.

160. National-Joint-Registry-for-England-and-Wales. NATIONAL JOINT REPLACEMENT REGISTRY: Hip, Knee & Shoulder Arthroplasty - Annual Report. Hertfordshire; 2016.

161. Niedzwiecki S, Klapperich C, Short J, Jani S, Ries M, Pruitt L. Comparison of three joint simulator wear debris isolation techniques: acid digestion, base digestion, and enzyme cleavage. *J Biomed Mater Res*. 2001;56(2):245-9.

162. Nieminen P, Saksela E. NK-9, a distinct sialylated antigen of the T200 family. *European journal of immunology*. 1986;16(5):513-8.

163. NifHaCE N. Guidance on the Selection of Prostheses for Primary Total Hip Replacement. *Br J Perioper Nurs*. 2000;10(6)(285).

164. NifHaCE N. Total hip replacement and resurfacing arthroplasty for end-stage arthritis of the hip 2014.

165. Niki Y, Matsumoto H, Suda Y, Otani T, Fujikawa K, Toyama Y, et al. Metal ions induce bone-resorbing cytokine production through the redox pathway in synoviocytes and bone marrow macrophages. *Biomaterials*. 2003;24(8):1447-57.

166. Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp*. 1995;15(5):244-9.

167. Novak CC, Hsu AR, Della Valle CJ, Skipor AK, Campbell P, Amstutz HC, et al. Metal ion levels in maternal and placental blood after metal-on-metal total hip arthroplasty. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*. 2014;43(12):E304-8.

168. Ogunwale B, Schmidt-Ott A, Meek RM, Brewer JM. Investigating the immunologic effects of CoCr nanoparticles. *Clinical orthopaedics and related research*. 2009;467(11):3010-6.

169. Oliveira H, Santos TM, Ramalho-Santos J, de Lourdes Pereira M. Histopathological effects of hexavalent chromium in mouse kidney. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2006;76(6):977-83.

170. Olliviere B, Wimhurst JA, Clark IM, Donell ST. Current concepts in osteolysis. *The Journal of bone and joint surgery British volume*. 2012;94(1):10-5.

171. Oral E, Muratoglu OK. Vitamin E diffused, highly crosslinked UHMWPE: a review. *International orthopaedics*. 2011;35(2):215-23.
172. Pabinger C, Geissler A. Utilization rates of hip arthroplasty in OECD countries. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society*. 2014;22(6):734-41.
173. Pandey R, Drakoulakis E, Athanasou NA. An assessment of the histological criteria used to diagnose infection in hip revision arthroplasty tissues. *Journal of clinical pathology*. 1999;52(2):118-23.
174. Pandey R, Quinn J, Joyner C, Murray DW, Triffitt JT, Athanasou NA. Arthroplasty implant biomaterial particle associated macrophages differentiate into lacunar bone resorbing cells. *Ann Rheum Dis*. 1996;55(6):388-95.
175. Pandit H, Glyn-Jones S, McLardy-Smith P, Gundle R, Whitwell D, Gibbons CL, et al. Pseudotumours associated with metal-on-metal hip resurfacings. *J Bone Joint Surg Br*. 2008;90(7):847-51.
176. Pandit H, Vlychou M, Whitwell D, Crook D, Luqmani R, Ostlere S, et al. Necrotic granulomatous pseudotumours in bilateral resurfacing hip arthroplasties: evidence for a type IV immune response. *Virchows Arch*. 2008;453(5):529-34.
177. Paulus A, Schröder C, Sievers B, Frenzel J, Jansson V, Utzschneider S. Evaluation of different methods to eliminate adherent endotoxin of polyethylene wear particles. *Wear*. 2012;295:319-25.
178. Pearson MJ, Williams RL, Floyd H, Bodansky D, Grover LM, Davis ET, et al. The effects of cobalt-chromium-molybdenum wear debris in vitro on serum cytokine profiles and T cell repertoire. *Biomaterials*. 2015;67:232-9.
179. Penny JO, Varmarken JE, Ovesen O, Nielsen C, Overgaard S. Metal ion levels and lymphocyte counts: ASR hip resurfacing prosthesis vs. standard THA: 2-year results from a randomized study. *Acta orthopaedica*. 2013;84(2):130-7.
180. Plitz W. [Metal/metal coupling in total hip arthroplasty. Progress or setback?]. *Orthopade*. 2007;36(3):212, 4-6, 8-9.
181. Plominski J, Kwiatkowski K. [History of hip arthroplasty]. *Pol Merkur Lekarski*. 2007;22(128):83-5.
182. Posada OM, Gilmour D, Tate RJ, Grant MH. CoCr wear particles generated from CoCr alloy metal-on-metal hip replacements, and cobalt ions stimulate apoptosis and expression

- of general toxicology-related genes in monocyte-like U937 cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2014;281(1):125-35.
183. Posada OM, Tate RJ, Grant MH. Effects of CoCr metal wear debris generated from metal-on-metal hip implants and Co ions on human monocyte-like U937 cells. *Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA*. 2015;29(2):271-80.
184. Purdue PE, Koulouvaris P, Potter HG, Nestor BJ, Sculco TP. The cellular and molecular biology of periprosthetic osteolysis. *Clin Orthop Relat Res*. 2007;454:251-61.
185. Rakow A, Schoon J, Dienelt A, John T, Textor M, Duda G, et al. Influence of particulate and dissociated metal-on-metal hip endoprosthesis wear on mesenchymal stromal cells in vivo and in vitro. *Biomaterials*. 2016;98:31-40.
186. Reinders J, Sonntag R, Vot L, Gibney C, Nowack M, Kretzer JP. Wear testing of moderate activities of daily living using in vivo measured knee joint loading. *PloS one*. 2015;10(3):e0123155.
187. Ren PG, Irani A, Huang Z, Ma T, Biswal S, Goodman SB. Continuous infusion of UHMWPE particles induces increased bone macrophages and osteolysis. *Clinical orthopaedics and related research*. 2011;469(1):113-22.
188. Ren W, Markel DC, Schwendener R, Ding Y, Wu B, Wooley PH. Macrophage depletion diminishes implant-wear-induced inflammatory osteolysis in a mouse model. *Journal of biomedical materials research Part A*. 2008;85(4):1043-51.
189. Ren WP, Markel DC, Zhang R, Peng X, Wu B, Monica H, et al. Association between UHMWPE particle-induced inflammatory osteoclastogenesis and expression of RANKL, VEGF, and Flt-1 in vivo. *Biomaterials*. 2006;27(30):5161-9.
190. Roberts J, Meek RM, Roberts P, Grigoris P. Metal-on-metal hip resurfacing. *Scott Med J*. 2005;50(1):10-2.
191. Sabokbar A, Fujikawa Y, Neale S, Murray DW, Athanasou NA. Human arthroplasty derived macrophages differentiate into osteoclastic bone resorbing cells. *Annals of the rheumatic diseases*. 1997;56(7):414-20.
192. Saikko V. A hip wear simulator with 100 test stations. *Proc Inst Mech Eng H*. 2005;219(5):309-18.
193. Savarino L, Granchi D, Ciapetti G, Cenni E, Nardi Pantoli A, Rotini R, et al. Ion release in patients with metal-on-metal hip bearings in total joint replacement: a comparison with

- metal-on-polyethylene bearings. *Journal of biomedical materials research*. 2002;63(5):467-74.
194. Scharf B, Clement CC, Zolla V, Perino G, Yan B, Elci SG, et al. Molecular analysis of chromium and cobalt-related toxicity. *Sci Rep*. 2014;4:5729.
195. Schroder C, Reinders J, Zietz C, Utzschneider S, Bader R, Kretzer JP. Characterization of polyethylene wear particle: The impact of methodology. *Acta Biomater*. 2013;9(12):9485-91.
196. Schwarz EM, Lu AP, Goater JJ, Benz EB, Kollias G, Rosier RN, et al. Tumor necrosis factor-alpha/nuclear transcription factor-kappaB signaling in periprosthetic osteolysis. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society*. 2000;18(3):472-80.
197. Scott M, Morrison M, Mishra SR, Jani S. Particle analysis for the determination of UHMWPE wear. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2005;73(2):325-37.
198. Shah VO, Civin CI, Loken MR. Flow cytometric analysis of human bone marrow. IV. Differential quantitative expression of T-200 common leukocyte antigen during normal hemopoiesis. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1988;140(6):1861-7.
199. Shahgaldi BF, Heatley FW, Dewar A, Corrin B. In vivo corrosion of cobalt-chromium and titanium wear particles. *J Bone Joint Surg Br*. 1995;77(6):962-6.
200. Shrivastava R, Upreti RK, Seth PK, Chaturvedi UC. Effects of chromium on the immune system. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2002;34(1):1-7.
201. Silva M, Heisel C, Schmalzried TP. Metal-on-metal total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res*. 2005(430):53-61.
202. Silva M, Lee KH, Heisel C, Dela Rosa MA, Schmalzried TP. The biomechanical results of total hip resurfacing arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*. 2004;86-A(1):40-6.
203. Simonsen LO, Harbak H, Bennekou P. Cobalt metabolism and toxicology--a brief update. *The Science of the total environment*. 2012;432:210-5.
204. Stea S, Visentin M, Granchi D, Ciapetti G, Donati ME, Sudanese A, et al. Cytokines and osteolysis around total hip prostheses. *Cytokine*. 2000;12(10):1575-9.
205. Street SE, Hayakawa Y, Zhan Y, Lew AM, MacGregor D, Jamieson AM, et al. Innate immune surveillance of spontaneous B cell lymphomas by natural killer cells and gammadelta T cells. *The Journal of experimental medicine*. 2004;199(6):879-84.

206. Sun JS, Tsuang YH, Chang WH, Li J, Liu HC, Lin FH. Effect of hydroxyapatite particle size on myoblasts and fibroblasts. *Biomaterials*. 1997;18(9):683-90.
207. Suner S, Tipper J, Emami N. Biological effects of wear particles generated in total joint replacements: trends and future prospects. *Tribology-Materials, Surfaces & Interfaces*. 2012;6(2):39-52.
208. Surgeons AAoO, editor Committee of Biomedical Engineering - Material combinations and Wear Measurements. AAOS; 1999.
209. Svensson O, Mathiesen EB, Reinholt FP, Blomgren G. Formation of a fulminant soft-tissue pseudotumor after uncemented hip arthroplasty. A case report. *J Bone Joint Surg Am*. 1988;70(8):1238-42.
210. T G. Autoplastik - Transplantation - Implantation von Fremdkörpern. *Berliner Klinische Wochenschrift*. 1890;27.
211. Taki N, Tatro JM, Nalepka JL, Togawa D, Goldberg VM, Rimnac CM, et al. Polyethylene and titanium particles induce osteolysis by similar, lymphocyte-independent, mechanisms. *J Orthop Res*. 2005;23(2):376-83.
212. Tchilian EZ, Beverley PC. Altered CD45 expression and disease. *Trends in immunology*. 2006;27(3):146-53.
213. Tchilian EZ, Beverley PC. CD45 in memory and disease. *Archivum immunologiae et therapiae experimentalis*. 2002;50(2):85-93.
214. Topolovec M, Cor A, Milosev I. Metal-on-metal vs. metal-on-polyethylene total hip arthroplasty tribological evaluation of retrieved components and periprosthetic tissue. *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials*. 2014;34:243-52.
215. Toumbis CA, Kronick JL, Wooley PH, Nasser S. Total joint arthroplasty and the immune response. *Seminars in arthritis and rheumatism*. 1997;27(1):44-7.
216. Tower SS. Arthroprosthetic cobaltism associated with metal on metal hip implants. *BMJ*. 2012;344:e430.
217. Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavrilocic J, Black J, Peoc'h M. Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement. *J Bone Joint Surg Am*. 2000;82(4):457-76.
218. Utzschneider S. Verwendung von crosslinked Polyethylenen in der Knieendoprothetik und deren biologische Aktivität in vivo [Habilitationsschrift]: Ludwig-Maximilians-Universität München, Campus Großhadern; 2010.

219. Utzschneider S, Becker F, Grupp TM, Sievers B, Paulus A, Gottschalk O, et al. Inflammatory response against different carbon fiber-reinforced PEEK wear particles compared with UHMWPE in vivo. *Acta Biomater.* 2010;6(11):4296-304.
220. Utzschneider S, Harrasser N, Schroeder C, Mazoochian F, Jansson V. Wear of contemporary total knee replacements--a knee simulator study of six current designs. *Clinical biomechanics.* 2009;24(7):583-8.
221. Utzschneider S, Lorber V, Dedic M, Paulus AC, Schroder C, Gottschalk O, et al. Biological activity and migration of wear particles in the knee joint: an in vivo comparison of six different polyethylene materials. *J Mater Sci Mater Med.* 2014;25(6):1599-612.
222. Utzschneider S, Paulus A, Datz JC, Schroeder C, Sievers B, Wegener B, et al. Influence of design and bearing material on polyethylene wear particle generation in total knee replacement. *Acta biomaterialia.* 2009;5(7):2495-502.
223. Utzschneider S, V; L, M; D, AC; P, C; S, Jansson V, editors. Biological activity and migration of wear particles in the knee joint – an in vivo comparison of six different polyethylene materials. 6th UHMWPE International Meeting; 2013 October, 10th-11th, 2013; Torino, Italy.
224. Veihelmann A, Harris AG, Krombach F, Schutze E, Refior HJ, Messmer K. In vivo assessment of synovial microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction in mouse antigen-induced arthritis. *Microcirculation.* 1999;6(4):281-90.
225. Veihelmann A, Szczesny G, Nolte D, Krombach F, Refior HJ, Messmer K. A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Res Exp Med (Berl).* 1998;198(1):43-54.
226. Vollmar A, Zündorf I, Dingermann T. *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe; mit 216 Tabellen: Wiss. Verlag-Ges.;* 2013.
227. Walsh AJ, Nikolaou VS, Antoniou J. Inflammatory pseudotumor complicating metal-on-highly cross-linked polyethylene total hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2012;27(2):324 e5-8.
228. Walter LR, Marel E, Harbury R, Wearne J. Distribution of chromium and cobalt ions in various blood fractions after resurfacing hip arthroplasty. *J Arthroplasty.* 2008;23(6):814-21.
229. Warme BA, Epstein NJ, Trindade MC, Miyanishi K, Ma T, Saket RR, et al. Proinflammatory mediator expression in a novel murine model of titanium-particle-induced intramedullary inflammation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;71(2):360-6.

230. Weber B. Die Metall/Metall-Paarung METASUL für die Hüfttotalprothese: Entwicklung und erste Resultate. In: Huber C, editor. Die Metallpaarung „Metasul“ in der Hüftendoprothetik. Bern: Schmidt; 1995.
231. Wedemeyer C, Neuerburg C, Pfeiffer A, Heckeley A, Bylski D, von Knoch F, et al. Polyethylene particle-induced bone resorption in alpha-calcitonin gene-related peptide-deficient mice. *J Bone Miner Res.* 2007;22(7):1011-9.
232. Wei S, Kitaura H, Zhou P, Ross FP, Teitelbaum SL. IL-1 mediates TNF-induced osteoclastogenesis. *The Journal of clinical investigation.* 2005;115(2):282-90.
233. Wessinghage D. [Themistocles Gluck. 100 years artificial joint replacement]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1991;129(5):383-8.
234. Wilkinson JM, Wilson AG, Stockley I, Scott IR, Macdonald DA, Hamer AJ, et al. Variation in the TNF gene promoter and risk of osteolysis after total hip arthroplasty. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research.* 2003;18(11):1995-2001.
235. Willert HG, Bertram H, Buchhorn GH. Osteolysis in alloarthroplasty of the hip. The role of ultra-high molecular weight polyethylene wear particles. *Clin Orthop Relat Res.* 1990(258):95-107.
236. Willert HG, Buchhorn GH, Fayyazi A, Flury R, Windler M, Koster 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):28-36.
237. Willert HG, Semlitsch M. Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses. *J Biomed Mater Res.* 1977;11(2):157-64.
238. Wooley PH, Morren R, Andary J, Sud S, Yang SY, Mayton L, et al. Inflammatory responses to orthopaedic biomaterials in the murine air pouch. *Biomaterials.* 2002;23(2):517-26.
239. Zipple J, Meyer-Ralfs M. [Themistocles Gluck (1853-1942), pioneer in endoprosthesis]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb.* 1975;113(1):134-9.
240. Zysk SP, Gebhard H, Plitz W, Buchhorn GH, Sprecher CM, Jansson V, et al. Influence of orthopedic particulate biomaterials on inflammation and synovial microcirculation in the murine knee joint. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004;71(1):108-15.

241. Zysk SP, Gebhard HH, Kalteis T, Schmitt-Sody M, Jansson V, Messmer K, et al. Particles of all sizes provoke inflammatory responses in vivo. Clin Orthop Relat Res. 2005(433):258-64.
242. Zysk SP, Gebhard HH, Pellengahr C, Refior HJ, Plitz W, Messmer K, et al. [Inflammatory responses to wear particles in vivo: a novel model in the murine knee joint]. Orthopade. 2003;32(4):305-11.
243. Zywiell MG, Brandt JM, Overgaard CB, Cheung AC, Turgeon TR, Syed KA. Fatal cardiomyopathy after revision total hip replacement for fracture of a ceramic liner. Bone Joint J. 2013;95-B(1):31-7.

7. Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Inanspruchnahme Hüftgelenkersatz pro 100.000 Einwohner in den OECD-Ländern und den USA, 2012 oder aktuellste Daten; Quelle: Weißbuch EPRD, IGES – OECD 2014 (13).....</i>	<i>6</i>
<i>Abbildung 2: Kumulative Revisionsrate in % entsprechend der Standzeit einer Hüftprothese in Jahren; Quelle: AOA, Annual Report 2018 (5).....</i>	<i>7</i>
<i>Abbildung 3: Gründe für Revisionsoperationen in der Hüftendoprothetik entsprechend der EPRD Auswertung 2016 (78).....</i>	<i>8</i>
<i>Abbildung 4: Oberflächenersatz Typ Birmingham der Fa. Smith & Nephew; Quelle: http://www.smith-nephew.com.....</i>	<i>9</i>
<i>Abbildung 5: Die Verschattung periartikulär an der a.p. Röntgenaufnahme der rechten Hüfte entspricht diffusem Metallabrieb, gut sichtbar insbesondere um den Trochanter major und am kaudalen Acetabulumsrand.....</i>	<i>10</i>
<i>Abbildung 6: Intraoperativer Situs bei einer HTEP-Revision mit braun-schwärzlichem Serom als Zeichen einer schwereren Metallose.....</i>	<i>11</i>
<i>Abbildung 7: Auszug aus dem Endoprothesenregister Deutschland. In der BRD ist eine zementfreie Technik deutlich führend, auch teilzementierte Verankerungen sind hier seltener als in Australien (78).</i>	<i>13</i>

<i>Abbildung 8: Auszug aus dem australischen Prothesenregister, es zeigt sich ein Trend hin zu zementfreier oder teilzementierter Verankerung, wohingegen der Anteil der vollzementierten Prothesen über die letzten Jahre weiter abnimmt (5).</i>	14
<i>Abbildung 9: Auszug aus dem Endoprothesenregister Deutschland. XPE hat auch in der BRD PE nahezu vollständig in der primären Hüftendoprothetik abgelöst (78).</i>	16
<i>Abbildung 10: Auszug aus dem australischen Prothesenregister. XPE hat seit 2003 konventionelles UHMWPE als Gleitpaarungspartner in der primären Hüftendoprothetik nahezu vollständig abgelöst (5).</i>	16
<i>Abbildung 11: Historische Entwicklung der Metall - Metall Gleitpaarung</i>	18
<i>Abbildung 12: Prozentzahlen verschiedener Gleitpaarung unzementierter Total-Endoprothesen nach Daten National Joint Registry (UK) seit 2003 bis einschl. 2014. Man beachte den Peak der Metall-Metall Gleitpaarung 2007 mit dem raschen Abfall (146)</i>	19
<i>Abbildung 13: Rückenlagerung der Maus und Darstellung der Patellarsehne nach kutaner Längsinzision</i>	29
<i>Abbildung 14: Anschauliches Beispiel einer indirekten IHC (Lang, Immunhistochemie, 2013)</i>	33
<i>Abbildung 15: Größenhistogramm der generierten Partikel</i>	38
<i>Abbildung 16: Formverteilung der generierten Partikel</i>	38
<i>Abbildung 17: Isolierte Metallpartikel mit Agglomeratbildung</i>	39
<i>Abbildung 18: Die erworbenen Partikel entsprachen folgenden Größenangaben seitens des Herstellers: Mean Particle Size 1,07 μm, Average Aspect Ratio 1,62, Average Roundness 0,66, Average Form Factor 0,71, Average Perimeter 4,60 μm.</i>	40
<i>Abbildung 19: Box Plot zur Darstellung der Zahl der adhärenen Zellen in der Intravitalmikroskopie. Die Metallpartikelgruppe verzeichnet einen deutlich höheren Wert an adhärenen Zellen im Vergleich zu allen anderen Gruppen ($p = 0,019$).</i>	41
<i>Abbildung 20: Box Plot Darstellung der Fraktion rollender Leukozyten. Es zeigt sich ein statistisch signifikanter Anstieg der Leukozytenfraktion in der Metallpartikel- und der Polyethylengruppe im Vergleich zur Kontrolle ($p < 0,0083$)</i>	42
<i>Abbildung 21: Der Brackertz-Score ergab eine statistisch signifikante Zunahme der synovialen Reaktion in der PE und der MP Gruppe ($* = p < 0,0083$).</i>	44
<i>Abbildung 22: Beobachtung periartikulärer Veränderungen nach Infiltration, quantifiziert anhand des Auftretens bei den Versuchstieren.</i>	46

<i>Abbildung 23: Färbung eines Schnittes mit TNFα Antikörper. MP-Gruppe, linkes Knie</i>	48
<i>Abbildung 24: Färbung eines Schnittes mit TNFα Antikörper. PBS-Gruppe, linkes Knie</i>	48
<i>Abbildung 25: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Deutliche Mehrexpression von TNFα in der MP Gruppe gegenüber allen anderen Gruppen.</i>	49
<i>Abbildung 26: Färbung eines Schnittes mit IL-6 Antikörpern, PBS Gruppe. linkes Knie</i>	49
<i>Abbildung 27: Färbung eines Schnittes mit IL-6 Antikörpern, MP Gruppe, linkes Knie</i>	49
<i>Abbildung 28: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Analog zu TNFα zeigt sich auch bei IL-6 eine deutliche Mehrexpression in der MP Gruppe im Vergleich zu allen anderen Gruppen.</i>	50
<i>Abbildung 29: Färbung eines Schnittes mit IL-1β Antikörpern, PBS Gruppe, linkes Knie</i>	50
<i>Abbildung 30_ Färbung eines Schnittes mit IL-1β Antikörpern, MP Gruppe, linkes Knie</i>	50
<i>Abbildung 31: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Ähnlich wie bei den o.g. Markern fällt eine deutliche Mehrexpression von IL-1β in der MP Gruppe auf. Nahezu keine Aktivierung bei Metallionen.</i>	51
<i>Abbildung 32: Färbung eines Schnittes mit CD 68 Antikörpern, PBS Gruppe, linkes Knie</i>	51
<i>Abbildung 33: Färbung eines Schnittes mit CD 68 Antikörpern, MP Gruppe, linkes Knie</i>	51
<i>Abbildung 34: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Ähnlich wie bei den o.g. Markern fällt eine deutliche Mehrexpression von CD68 in der MP Gruppe auf. Nahezu keine Aktivierung bei Metallionen.</i>	52
<i>Abbildung 35: Färbung eines Schnittes mit CD45 Antikörpern, PBS Gruppe, linkes Knie</i>	52
<i>Abbildung 36: Färbung eines Schnittes mit CD45 Antikörpern, MI Gruppe, linkes Knie</i>	52
<i>Abbildung 37: Färbung eines Schnittes mit CD45 Antikörpern, MP Gruppe, linkes Knie</i>	52
<i>Abbildung 38: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Auffallend im Vergleich zu den anderen Markern ist eine Aktivierung durch Metallionen nebst Metallpartikeln.</i>	53
<i>Abbildung 39: Färbung eines Schnittes mit TNFα Antikörpern, PBS Gruppe, rechtes Knie</i>	54
<i>Abbildung 40: Färbung eines Schnittes mit TNFα Antikörpern, MP Gruppe, rechtes Knie</i>	54
<i>Abbildung 41: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Auffallend im Vergleich zu den anderen Markern ist eine Aktivierung durch Metallpartikel. Insg. Im Vergleich zum rechten Knie geringere Expression.</i>	54
<i>Abbildung 42: Färbung eines Schnittes mit IL-1 β Antikörpern, MP Gruppe, rechtes Knie</i>	55

<i>Abbildung 43: Färbung eines Schnittes mit IL-1 β Antikörpern, PBS Gruppe, rechtes Knie</i>	55
<i>Abbildung 44: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Insgesamt schwach vermehrte Expression von IL-1β in der MP Gruppe, aber signifikant zur PBS Gruppe</i>	55
<i>Abbildung 45: Färbung eines Schnittes mit CD45 Antikörpern, PBS Gruppe, rechtes Knie</i>	56
<i>Abbildung 46: Färbung eines Schnittes mit CD45 Antikörpern, MI Gruppe, rechtes Knie</i>	56
<i>Abbildung 47: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Insgesamt schwach vermehrte Expression von CD 45 in der MI Gruppe, aber signifikant zur PBS Gruppe</i>	57
<i>Abbildung 48: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von TNFα in der Niere. Die Ergebnisse zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied von MI zu allen anderen Gruppen</i>	58
<i>Abbildung 49: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von IL6 in der Niere. Die Ergebnisse zeigen eine vermehrte Expression von IL6 in der MI und der MP Gruppe</i>	58
<i>Abbildung 50: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von IL-1β in der Niere. Die Ergebnisse zeigen eine nur geringe Expression des Zytokins in allen Gruppen</i>	59
<i>Abbildung 51: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von TNFα in der Leber. Die Ergebnisse zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied von MP zu allen anderen Gruppen</i>	60
<i>Abbildung 52: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von IL6 in der Leber. Die Ergebnisse zeigen eine vermehrte Expression von IL6 in der MI und der PE Gruppe</i>	60
<i>Abbildung 53: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von IL-1β in der Leber. Die Ergebnisse zeigen eine nur geringe Expression des Zytokins in allen Gruppen, am meisten jedoch in der PE Gruppe</i>	61
<i>Abbildung 54: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von IL6 in der Miz. Die Ergebnisse zeigen eine vermehrte Expression von IL6 in der MP und der PE Gruppe gegenüber der MI Gruppe</i>	61
<i>Abbildung 55: y-Achse: positive Zellen pro Gesichtsfeld. Expression von TNFα in der Leber. Die Ergebnisse zeigen einen statistisch signifikanten Unterschied von MP zu allen anderen Gruppen. Beachtenswert ist die hohe Skalierung der y-Achse, bedingt durch die insg. Hohe Anzahl an positiv gefärbten Zellen</i>	62

8. Anhang

Materialliste

Produkt	Hersteller
Balb/C-Mäuse	Charles-River-Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland
Datenbank zur Erfassung der Zucht und Haltung von Versuchstieren: Tier-Base	T.Base license version TBv570b99, Universität Heidelberg, Heidelberg, Deutschland
Tiernahrung Ratte/Maus-Haltung, Extrudat	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
Laborwaage	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Messschieber 150mm	Mitutoyo Deutschland GmbH, Neuss, Deutschland
OP-Tisch Heizplatte	KE-Gerätebau Effenberger, Pfaffing, Deutschland
Temperatursonde	Hugo Sachs, Elektronik – Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, Deutschland
arterieller Katheter	SIMS Portex Ltd, Smith Medical, Kent, UK
Drucktransducer	Sirecust 300 D, Siemens AG, München, Deutschland
Dräger Isofluran-Vapor	Drägerwerk AG Co.KgaG, Lübeck, Deutschland
Forene [®] Isofluran	Abbott GmbH Co. KG, Wiesbaden, Deutschland
Dexpanthenol-Salbe 5% Bepanthen [®] -Augensalbe	Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland
Ultraschall-Homogenisator LABSONIC [®] M	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Ultraschallbad: Bandelin Sonorex Super RK510H	BANDELIN electronic GmbH & Co. KG, Berlin, Deutschland
Einmalkanülen STERICAN (Gauge 27)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Polyethylenschlauch (Portex [®] Polyethylen-Tubing 0,4 mm ID/0,8 mm OD)	Smith Medical International Ltd., Kent, UK
isotone Kochsalzlösung	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Deckglas	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, Deutschland
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Mikrokanüle (Gauge 33)	Fine Science Tools GmbH, Heidelberg, Deutschland
Endotoxintestung	Lonza Verviers Sprl, Verviers, Belgien
Hautdesinfektionsmittel Cutasept	Bode Chemie, Hamburg, Deutschland
Rhodamin 6G	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Fluoresceinisothiocyanat-Dextran	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland
Immersionsobjektiv Archoplan 20 x / 0,5 W	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Auflichtmikroskop AxioTech Vario 100HD	Carl Zeiss AG, Oberkochen, Deutschland
Videozeitgenerator VTG - 33	FOR-A Company Ltd., Tokio, Japan
Digitaler Videokassettenrecorder DSR-45P	Sony Europe Ltd., Berlin, Deutschland
Videobildschirm PVM-20M2MDE	Sony Europe Ltd., Berlin, Deutschland
Videokassetten: Panasonic Digital Video Cassette	AY-DV124AMQ, Panasonic Deutschland, Hamburg, Deutschland
CapImage™	Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland
Heparin-Natrium 25000 I.E:	ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland
Zentrifuge Elmi Skyline	ELMI Ltd laboratory equipment, Riga, Lettland
Gefrierschrank -20°C: Liebherr Premium No Frost	Liebherr-International Deutschland GmbH, Biberach an der Riß, Deutschland
Pentobarbital Narcoren	Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland
Buprenorphin	Hexal AG, Holzkirchen, Deutschland
Ethanol 70% (vollständig vergällt mit Methylketon)	Apotheke, Campus Innenstadt, LMU, München, Deutschland

Sterile Sicherheitswerkbank LaminAir	Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland
Neutral gepufferte Formaldehydlösung 4%	Microcos Products GmbH, Garching, Deutschland
CapImage™	Dr. Zeintl, Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland
Knochenentkalkung Osteosoft®	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Entwässerungsautomat Hypercenter XP	Thermo Shandon GmbH Frankfurt, Deutschland
Einbettkassetten	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Paraffinausgießstation Leica EG 1160	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Rotationsmikrotom Leica RM2255	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland
Microtom Blade N35HR-pfm	Feather Safety Razor Co., Ltd., Osaka, Japan
Wasserbad GFL 1052	GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel, Deutschland
Adhäsions-Objektträger SuperFrost® Ultra Plus	Thermo Fisher Scientific Gerhard Menzel B.V. & Co. GK, Braunschweig, Deutschland
Objektträger-Strecktisch Typ 12801	MEDAX GmbH Co.KG, Rendsburg, Deutschland
Trockenschrank FED 53	BINDER GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Färbeküvetten	Wagner & Munz GmbH, München, Deutschland
Abzug 2-453-DAND	Köttermann GmbH & Co KG, Uetze, Deutschland
Ethanol 96% vollständig vergällt mit Methylketon	Apotheke, Campus Innenstadt, LMU, München, Deutschland

Ethanol 99% vergällt mit 1% Petrolether	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
Xylol reinst >98%	SAV Liquid Production GmbH, Flintsbach a. Inn, Deutschland
Mayer`s Hematoxylin Solution	AppliChem, Darmstadt, Deutschland
Eosin Y Solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
M8 Microscope and Scanner	PreciPoint GmbH, Freising, Deutschland
Software Mikroskop: PreciPoint software	PreciPoint GmbH, Freising, Deutschland
IBM SPSS Statistics 23	IBM Deutschland GmbH, Ehningen, Deutschland

9. Danksagung

Besonderer Dank gilt hierbei **Herrn Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. V. Jansson**, Direktor der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, physikalische Medizin und Rehabilitation der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die unermüdliche Unterstützung und Ermöglichung des Habilitationsvorhabens in seiner Klinik.

Zum Abschluss dieser Arbeit möchte ich mich bei **Frau Prof. Dr. med. Sandra Utzschneider** für Ihre Hilfe und Unterstützung bedanken. Mit Begeisterung für das Thema stand sie mir jederzeit mit vielen Anregungen insbesondere bei der Projektentwicklung zur Seite.

Weiterhin möchte ich **Frau Sandra Haßelt**, Labor für Biomechanik und Experimentelle Orthopädie Klinik und Poliklinik für Orthopädie, physikalische Medizin und Rehabilitation der Ludwig-Maximilians-Universität München, für die stetige Unterstützung und gute Zusammenarbeit danken.

Ich möchte mich auch herzlich bei **Frau Dr. med. Kathrin Ebinger, Frau Sabine Dirmeier und Frau Kerstin Panzer** bedanken, ohne deren Hilfe und unermüdliches Engagement das Versuchsvorhaben nie möglich gewesen wäre.

Ferner möchte ich bei **Herrn PD Dr. med. Denis Ehrl** für seine Unterstützung im alltäglichen Beruf und bei der Anfertigung der Habilitationsschrift bedanken.

Auch bei meinen Schwiegereltern, **Frau Ute Franck und Herrn Johann Franck**, möchte ich mich herzlich für Ihre stetige Unterstützung bedanken.

Der größte Dank gilt an dieser Stelle auch meiner Ehefrau **Dr. med Julia Paulus** für Ihre Liebe und geduldige Unterstützung.

Besonderer Dank gilt meinen **wunderbaren Eltern Frau Ingrid Paulus und Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. dent. Gerhard Paulus**, die mich in meinem Leben stets voller Kraft, Rückhalt und Liebe unterstützt haben, meine Ziele in jeder Lebenslage zur verwirklichen.