

Aus der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation

Klinikum der

Ludwig-Maximilians-Universität München

Vorstand: Prof. Dr. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson

**Immunhistochemische Analyse der systemischen Reaktion von
Polyethylen- und Metallpartikeln, sowie Metallionen in murinen
parenchymatösen Organen**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Kerstin Panzer

aus

Regensburg

2022

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sandra Utzschneider

Prof. Dr. Christoph Walz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Inga Sinicina

Prof. Dr. Alexander Dietrich

Mitbetreuung durch den

promovierten Mitarbeiter: Dr. Alexander Paulus

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 17.02.2022

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	1
1. Einleitung	2
1.1. Grundlagen	3
1.1.1. Grundlagen der Hüftendoprothetik.....	3
1.1.2. Materialien und Gleitpaarungen der Hüftendoprothetik	7
1.1.3. Abrieb und Abriebpartikel in der Hüftendoprothetik	12
1.1.4. Biologische Aktivität von Abriebpartikeln und Ionen	13
1.1.4.1. Lokale Aktivität von Abriebpartikeln im periprothetischen Gewebe	14
1.1.4.2. Systemische Aktivität von Abriebpartikeln und Ionen	16
1.1.5. Zytokine	19
1.1.5.1. Tumornekrosefaktor α (TNF- α).....	20
1.1.5.2. Interleukin 6 (IL6)	20
1.1.5.3. Interleukin 1 β (IL1 β).....	21
1.2. Zielsetzung.....	22
2. Material und Methoden	23
2.1. Material und Geräte	23
2.2. Gewebeproben	23
2.3. Fixierung, Entwässerung und Paraffineinbettung.....	24
2.4. Herstellung von Paraffinschnitten	24
2.5. Immunhistochemische Färbung	25
2.5.1. Grundlagen der Immunhistochemie	25
2.5.2. Färbemethode und Färbeprotokoll.....	26
2.6. Auswertung	31
2.7. Statistik	31
3. Ergebnisse.....	33
3.1. Niere	33
3.1.1. Expression von TNF- α in der Niere	33
3.1.2. Expression von IL6 in der Niere	35
3.1.3. Expression von IL1 β in der Niere.....	37
3.2. Leber.....	39
3.2.1. Expression von TNF- α in der Leber	39
3.2.2. Expression von IL6 in der Leber.....	41
3.2.3. Expression von IL1 β in der Leber.....	43
3.3. Milz.....	45
3.3.1. Expression von IL6 in der Milz	45
3.3.2. Expression von IL1 β in der Milz.....	47
3.4. Lunge	49
3.4.1. Expression von TNF- α in der Lunge	49
4. Diskussion.....	51
4.1. Diskussion der Methodik	52
4.2. Diskussion der Ergebnisse.....	60
5. Zusammenfassung.....	68
6. Literaturverzeichnis	70
7. Material und Geräte.....	82
7.1. Antikörper	82
7.2. Allgemeine Reagenzien	83
7.3. Verbrauchsmaterialien.....	84

7.4. Geräte.....	86
8. Abbildungen und Tabellen.....	88
9. Danksagung.....	93
10. Eidesstattliche Versicherung	94

Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
Co	Cobalt
CoC	Ceramic-on-ceramic (Keramik-auf-Keramik)
CoM	Ceramic-on-metal (Keramik-auf-Metall)
CoP	Ceramic-on-polyethylene (Keramik-auf-Polyethylen)
Co-Cr-Mo	Cobalt-Chrom-Molybdän
Cr	Chrom
CRP	C-reaktives Protein
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
MI	Metallionen
Mo	Molybdän
MoM	Metal-on-metal (Metall-auf-Metall)
MoP	Metal-on-polyethylene (Metall-auf-Polyethylen)
MP	Metallpartikel
nm	Nanometer
PBS	phosphate buffered saline solution / phosphatgepufferte Salzlösung
PE	Polyethylen
Tab	Tabelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UHMWPE	ultra-high-molecular-weight polyethylene / ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen
µm	Mikrometer

1. Einleitung

Die Arthrose stellt eine der häufigsten Gelenkerkrankung weltweit dar (Weyerer 2013) und betrifft etwa 10% der Männer und 18% der Frauen über 60 Jahre (Pabinger and Geissler 2014). Nach Ausschöpfen der konservativen Therapiemöglichkeiten ist der totale Gelenkersatz die Methode der Wahl für Patienten mit Arthrose ((AOANJRR) 2019, Dapunt et al. 2014, Pabinger and Geissler 2014). In der Traumatologie wird der Hüftgelenkersatz ebenfalls bei Patienten mit Hüftfrakturen eingesetzt (Dapunt et al. 2014, Pabinger and Geissler 2014). In Deutschland werden pro Jahr rund 190.000 Hüftprothesen implantiert und der künstliche Hüftgelenkersatz ist eine der am häufigsten durchgeführten Operationen im Fachbereich Orthopädie (Klug et al. 2019, Schleicher et al. 2013).

Die verschiedenen Materialien der Hüftendoprothetik setzen Abriebpartikel frei, die unerwünschte Reaktionen bei Patienten auslösen können (Dapunt et al. 2014, Merritt and Brown 1996, Otto et al. 2006). Diese Abriebpartikel führen zu einer Phagozytenaktivierung und Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren wie zum Beispiel die Zytokine TNF α , IL6 und IL1 β , die lokal zu einer aseptischen entzündlichen Antwort und periprothetischen Osteolysen führen können (Bijukumar et al. 2018, Cobb and Schmalzreid 2006, Hallab and Jacobs 2009, Krenn 2009, Landgraeber et al. 2014).

Deshalb stellt die aseptische Prothesenlockerung durch Abriebpartikel der artikulierenden Oberflächenmaterialien der Implantate einen der häufigsten und bedeutendsten Gründe für Implantatversagen dar ((AOANJRR) 2019, Catelas et al. 2011, Drees et al. 2008, Rakow et al. 2016). Innerhalb von 15 Jahren müssen rund 10% der Prothesen aufgrund Implantatlockerung gewechselt werden und somit ist die aseptische Lockerung eine der häufigsten Ursachen für einen Revisionseingriff nach Gelenkersatz ((AOANJRR) 2019, Landgraeber et al. 2014, Otto et al. 2006, Schleicher et al. 2013).

Die in den Gelenkprothesen durch Abrieb entstandenen Partikel bleiben nicht nur lokal im periprothetischem Gewebe, sondern können auch systemisch verteilt werden (Bijukumar et al. 2018, Case et al. 1994, Cobb and Schmalzreid 2006, Jakobsen et al. 2007, Urban et al. 2000, Urban et al. 2004). Besonders Metallpartikel und -ionen können über das lymphatische System in regionale und auch weiter entfernte Lymphknoten zirkulieren und können ebenfalls in der Leber und Milz nachgewiesen werden (Bijukumar et al. 2018, Case et al. 1994, Jakobsen et al.

2007, Urban et al. 2000, Urban et al. 2004). Zusätzlich können Metallpartikel und -ionen in den Blutkreislauf gelangen und zudem wurden auch Polyethylenpartikel in der Leber und Milz gefunden (Bijukumar et al. 2018, Case et al. 1994, Cobb and Schmalzreid 2006, Jakobsen et al. 2007, Urban et al. 2000, Urban et al. 2004). Die im Blutkreislauf zirkulierenden Metallpartikel und -ionen werden über den Urin wieder aus dem Körper eliminiert (Chandran and Giori 2011, Chen et al. 2014, Corradi et al. 2011, Daniel et al. 2010, Jakobsen et al. 2007). Dadurch ist das Nierengewebe den Einflüssen der Metallionen ausgesetzt. Zudem ist bekannt, dass Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion die Ionen schlechter eliminieren können und dadurch erhöhte Serumwerte für Metallionen aufweisen (Chandran and Giori 2011, Niethard et al. 2012). Die mit dem Nierengewebe in Kontakt getretenen Metallionen können in höheren Dosen die Nierenfunktion beeinträchtigen und Tubulusnekrosen induzieren (Corradi et al. 2011, Keegan et al. 2007). Huk et al. beobachteten bei in vitro Experimenten, dass nach Inkubation von Makrophagen mit Metallionen für eine kurze Zeitspanne von 24 Stunden Apoptosen in den Zellen induziert werden (Huk et al. 2004). Nach einer längeren Inkubationszeit von 48 Stunden und höheren Konzentrationen der Metallionen wurde die Induktion von Nekrosen beobachtet (Huk et al. 2004).

Welche genauen Effekte die systemisch verteilten Partikel und Ionen jedoch auf die Organe haben und ob in den Organen durch Kontakt mit den Abriebpartikeln und Ionen entzündliche Reaktionen auftreten, ist weiterhin nicht genau verstanden.

1.1. Grundlagen

1.1.1. Grundlagen der Hüftendoprothetik

In der Hüftendoprothetik lassen sich grundsätzlich drei Systeme unterscheiden, die Totalendoprothese (TEP), die Kurzschaftprothese und der Oberflächenersatz (Kappenprothese) ((AOANJRR) 2019, Benignus et al. 2019, Giardina et al. 2018, Klug et al. 2019, Liang et al. 2018). In Abbildung 1 sind die drei verschiedenen Systeme der Hüftendoprothetik abgebildet (www.villarbjwa.com). Die Abbildung 2 zeigt eine Beckenübersichtsaufnahme mit einer implantierten Kurzschaftprothese (Pogliacomi et al. 2019). In Abbildung 3 ist ein Röntgenbild eines Beckens

dargestellt, in welchem rechts eine TEP und links eine Kappenprothese zu sehen sind (Roberts et al. 2005).



Abb. 1: Von links nach rechts Oberflächenersatz, Kurzschafthoprothese und Totalendoprothese (www.villarbjwa.com)



Abb. 2: Beckenübersichtsaufnahme einer implantierten Kurzschafthoprothese (Pogliacomi et al. 2019)



Abb. 3: Beckenübersichtsaufnahme mit Totalendoprothese rechts und Kappenprothese links (Roberts et al. 2005)

Zusätzlich gibt es noch Unterschiede in der Prothesenverankerung, hier steht die zementierte, die zementfreie und die teilzementierte (Hybridmethode) Implantation zur Verfügung (Kirschner 2005, Malviya et al. 2017, Morlock and Jäger 2016, Özkir et al. 2007, Schleicher et al. 2013, Willi et al. 2012). Die Primärimplantation von Hüft-TEPs wird vermehrt zementfrei durchgeführt ((AOANJRR) 2019, Hanstein et al. 2015, Klug et al. 2019, Registry 2019). Abbildung 4 zeigt die Trends der Verankerungsmethode bei der Primärimplantation einer Hüft-TEP im zeitlichen Verlauf (Registry 2019).

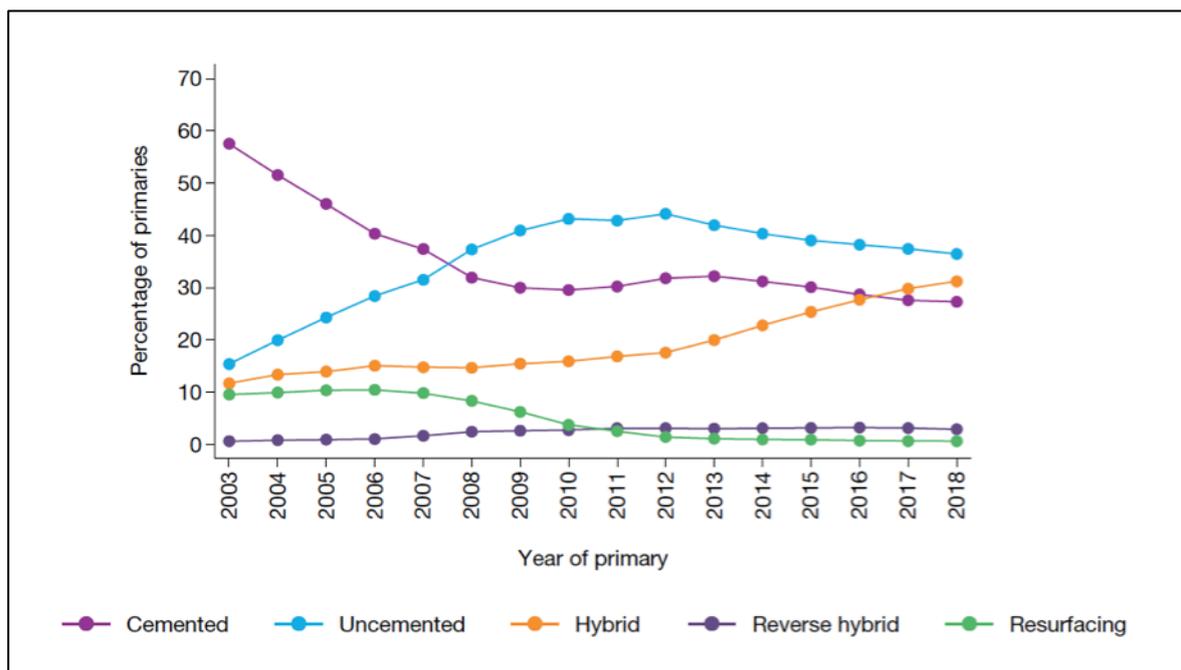


Abb. 4: Verankerungsmethode bei der Primärimplantation einer Hüfttotalendoprothese (Registry 2019)

Die Vorteile einer Totalendoprothese sind die hohe Stabilität und frühe Belastbarkeit der Prothese, als Nachteil wird der im Vergleich zu den anderen Systemen größere Knochenverlust bei der Implantation angesehen (Klug et al. 2019, Koetz and Kooter 2014). Bei der Implantation einer Kurzschaftprothese kommt es zu weniger Knochen- und Blutverlust, jedoch ist eine gute Knochensubstanz notwendig (Klug et al. 2019, Koetz and Kooter 2014). Die Kurzschaftprothese ist weniger resistent gegen axiale und Torsionskräfte aufgrund der kleineren Kontaktfläche des Prothesenschafts in der Metaphyse des Femurschafts im Vergleich zur TEP (Klug et al. 2019). Durch die reduzierte Implantatstabilität kommt es vermehrt zu Mikrobewegungen an den Grenzflächen, was zu einem erhöhten Risiko für eine Lockerung und erhöhten

Revisionsraten auf lange Sicht führt (Benignus et al. 2019, Giardina et al. 2018, Klug et al. 2019). Der Oberflächenersatz wird heutzutage fast nicht mehr durchgeführt (Klug et al. 2019). Vorteile des reinen Oberflächenersatzes sind der Erhalt der Biomechanik des Gelenks und wenig Knochenresektion bei der Implantation (Koetz and Kooter 2014). Nachteil des Oberflächenersatzes ist die hohe Versagensrate nach kurzer Zeit mit einer 10-Jahres Revisionsrate von 10-13% (Matharu et al. 2017).

1.1.2. Materialien und Gleitpaarungen der Hüftendoprothetik

In der Hüftendoprothetik stehen verschiedene Materialien für die Implantate zur Verfügung, woraus sich unterschiedliche Gleitpaarungen ergeben. Die verwendeten Materialien sollen eine gute Bioverträglichkeit und Funktionsfähigkeit aufweisen (Schleicher et al. 2013).

Für zementierte und zementfreie Schäfte werden Metalllegierungen aus Kobalt-Chrom-Molybdän (Co-Cr-Mo) und Titanlegierungen verwendet (Diehl et al. 2010, Schleicher et al. 2013). In Abbildung 5 sind ein zementfreier und zementierter Schaft zu sehen (www.zimmerbiomet.com). Bei den zementierten Pfannenkomponenten kommen konventionelles und quervernetztes ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen zur Anwendung (Günther et al. 2012, Schleicher et al. 2013, Willi et al. 2012). Die zementfrei implantierten Pfannengehäuse bestehen aus Co-Cr-Mo Legierungen, Titanlegierungen oder Reintitan, in welche Inlays aus konventionellem oder quervernetztem Polyethylen, Metall oder Keramik eingesetzt werden (Diehl et al. 2010, Günther et al. 2012, Schleicher et al. 2013, Willi et al. 2012). Abbildung 6 zeigt eine zementierte und Abbildung 7 zwei zementfreie Pfannenkomponenten (www.bbBraun.de). Auf den implantierten Hüftschaft wird ein Prothesenkopf aus Metall oder Keramik aufgesetzt (Diehl et al. 2010, Günther et al. 2012, Schleicher et al. 2013, Willi et al. 2012).



Abb. 5: Zementfreier (oben) und zementierter (unten) Schaft (www.zimmerbiomet.com)



Abb. 6: Zementierte Pfanne (www.bbraun.de)



Abb. 7: Zementfreie Pfanne mit Keramikinlay (links) und Polyethyleninlay (rechts) (www.bbraun.de)

Für die Gleitpaarung zwischen Hüftprothesenkopf und -pfanne stehen somit mehrere Kombinationen an Materialien zur Auswahl. In Abbildung 8 sind die aktuell am häufigsten verwendeten Gleitpaarungen zu sehen (www.bbraun.de). Bei den Hart-Weich-Gleitpaarungen wird ein Inlay aus konventionellem oder quervernetztem Polyethylen mit einem aus metallischem oder keramischem Werkstoff bestehenden Hüftkopf kombiniert (Günther et al. 2012, Sonntag et al. 2015). Bei der Verwendung von konventionellem Polyethylen können relativ hohe Verschleißraten festgestellt werden, welche durch die Verwendung von quervernetztem Polyethylen reduziert werden können (Geerdink et al. 2006, Rieker 2016, Sonntag et al. 2015). Als Hart-Hart-Paarungen stehen die Metall-Metall- und Keramik-Keramik-Gleitpaarung zur Verfügung (Benignus et al. 2019, Malviya et al. 2017). Die meist aus einer Co-Cr-Mo-Legierung bestehende Metallgleitpaarung zeigt zwar gute Abriebverhältnisse mit einem geringeren Verschleißvolumen als die Hart-Weich-Gleitpaarungen, jedoch bestehen Bedenken aufgrund der großen Menge der durch Abrieb entstehenden Metallpartikel und ihrer möglichen unerwünschten Reaktionen durch lokale und systemische Verteilung (Benignus et al. 2019, Günther et al. 2012, Sonntag et al.

2015). Die Keramikgleitpaarung weist ebenfalls eine hohe Abriebfestigkeit auf (Benignus et al. 2019, Günther et al. 2012, Kirschner 2005). Nachteilig angesehen werden bei dieser Gleitpaarung jedoch die Gefahr eines Implantatbruchs und die hohen Materialkosten (Benignus et al. 2019, Günther et al. 2012, Jansson and Fottner 2007, Schleicher et al. 2013, Sonntag et al. 2015). Die Abbildungen 9 und 10 zeigen den zeitlichen Verlauf der bei der Primärimplantation verwendeten Gleitpaarungen. Die Grafiken und Daten stammen aus dem jährlichen Bericht des National Joint Registry des Vereinigten Königreichs (Registry 2019).



Abb. 8: Am häufigsten verwendete Gleitpaarungen (www.bbraun.de)

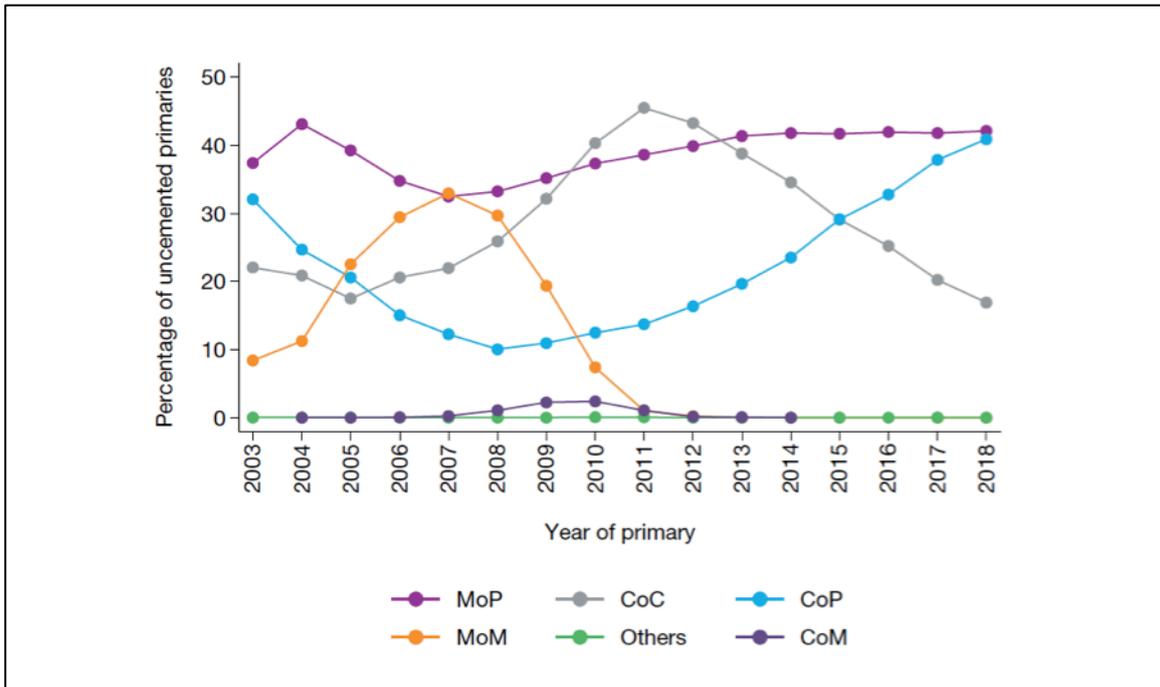


Abb. 9: Verwendete Gleitpaarungen bei der Primärimplantation zementfreier Hüft-TEPs (Registry 2019)

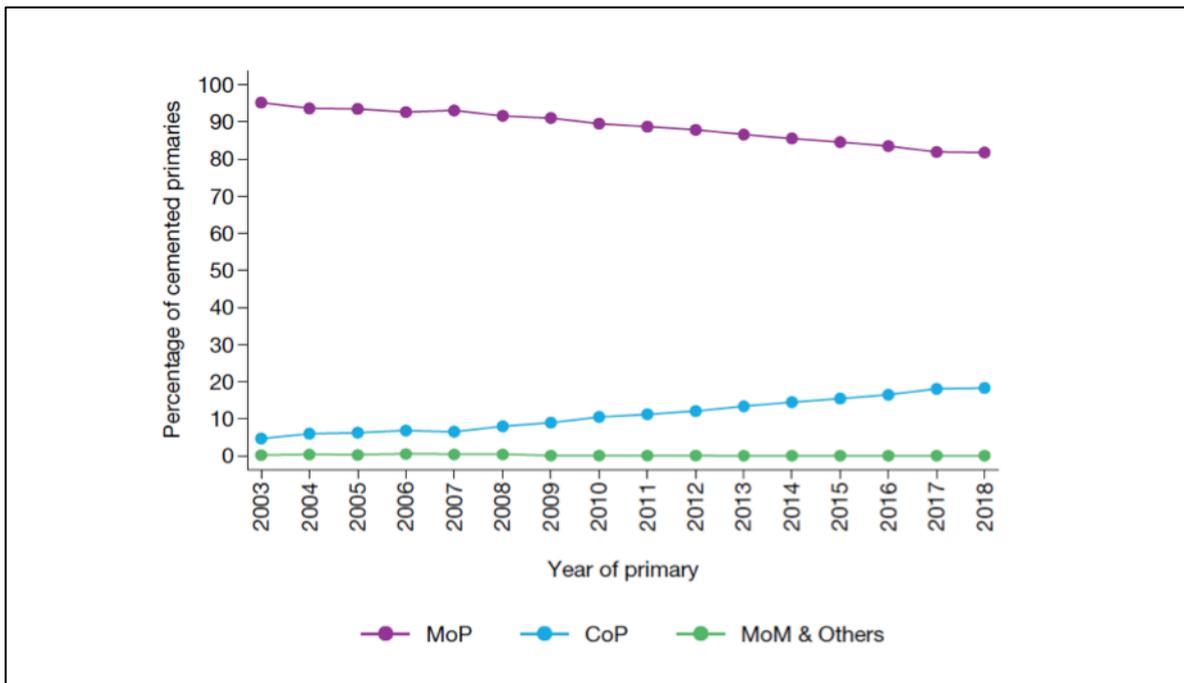


Abb. 10: Verwendete Gleitpaarungen bei der Primärimplantation zementierter Hüft-TEPs (Registry 2019)

1.1.3. Abrieb und Abriebpartikel in der Hüftendoprothetik

Abrieb kann als Oberflächenschaden mit Materialverlust durch mechanische Belastung erklärt werden (Di Puccio and Mattei 2015, McKellop et al. 2014).

Alle in der Hüftendoprothetik verwendeten Materialien unterliegen Abriebmechanismen und setzen Abriebpartikel frei (Dapunt et al. 2014). Bisher gibt es keine abriebfreie Gleitpaarung (Drees et al. 2008). Die Abriebpartikel der verschiedenen Gleitpaarungen unterscheiden sich in ihrer Größe, Form und chemischen Zusammensetzung (Catelas et al. 2011, Crainic et al. 2018, Jacobs et al. 2006, Rieker 2016). Die biologische Aktivität der Partikel ist abhängig von der Anzahl und den Charakteristika der Partikel (Catelas et al. 2011, Jacobs et al. 2006, Rieker 2016).

Polyethylenpartikel sind kleiner als $1\mu\text{m}$ bis mehrere $100\mu\text{m}$ groß und stellen sich rund bis nadelförmig dar (Catelas et al. 2011). Am biologisch aktivsten sind die PE-Partikel mit einer Größe zwischen $0,1\mu\text{m}$ bis $1\mu\text{m}$ (Baxter et al. 2013).

Die in den 1960er Jahren eingeführte Metall-auf-Polyethylen (MoP) - Gleitpaarung ist eine der am häufigsten verwendeten Gleitpaarungen in der Hüftendoprothetik (Drees et al. 2008, Hanna et al. 2016). Das primär verwendete UHMWPE (ultrahochmolekulargewichtiges Polyethylen) wurde in den späten 90er Jahren durch quervernetztes Polyethylen ersetzt, was zu einer verbesserten Abriebresistenz des PEs führte (Baxter et al. 2013, Hanna et al. 2016, Rieker 2016, Skripitz et al. 2013). Trotz guter Langzeitergebnisse und einer verringerten Revisionsrate durch den Einsatz von quervernetztem PE, bleibt der Abrieb und die durch die Abriebpartikel entstehende aseptische Lockerung weiterhin der Hauptgrund für eine Revisionsoperation und entscheidet somit über die Standzeit einer Hüftgelenksprothese (Baxter et al. 2013, Bozic et al. 2009, Rieker 2016).

Die Metall-auf-Metall (MoM) - Gleitpaarungen zeichnen sich zwar durch ein geringeres Abriebvolumen als die MoP-Prothesen aus, produzieren jedoch mehr kleinere Abriebpartikel im Nanometer-Bereich und zusätzlich werden Metallionen durch Korrosion der Partikel oder der Implantatoberflächen freigesetzt (Merola and Affatato 2019, Wang et al. 2017). Metallpartikel haben eine Größe von 30nm bis 500nm und sind zum Großteil rund und oval geformt, ein kleiner Anteil ist nadelförmig (Catelas et al. 2011, Wang et al. 2017). Aufgrund Abrieb-assoziierter

unerwünschter Reaktionen wurde der Einbau von MoM-Prothesen in den späten 2000er fast komplett gestoppt (Merola and Affatato 2019, Rieker 2016). Besonders besorgniserregend sind bei den MoM-Prothesen nicht nur die durch Metallpartikel entstehenden Osteolysen, sondern zusätzlich die mögliche Induktion einer Hypersensibilisierung und die potentiell toxischen lokalen und systemischen Effekte der durch Korrosion entstehenden Metallionen (Goodman and Gallo 2019, Merola and Affatato 2019, Rieker 2016, Wimmer et al. 2010).

1.1.4. Biologische Aktivität von Abriebpartikeln und Ionen

Die im künstlichen Gelenk entstehenden Abriebpartikel können mit dem umliegenden Gewebe und mit Geweben in weiter entfernten Organen interagieren und zu unerwünschten Reaktionen führen (Afolaranmi et al. 2012, Bijukumar et al. 2018, Otto et al. 2006). Abbildung 11 zeigt einen Überblick über die unerwünschten lokalen und systemischen Reaktionen von Abriebpartikeln (Bijukumar et al. 2018).

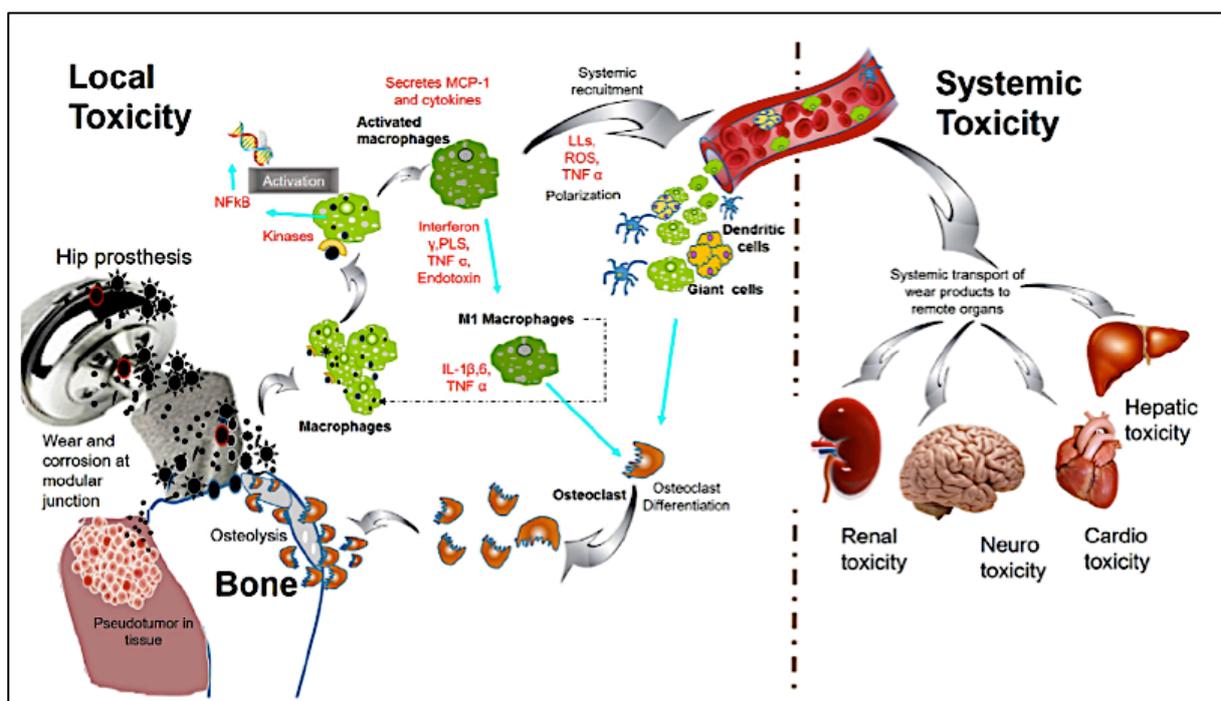


Abb. 11: Schematische Darstellung der unerwünschten lokalen und systemischen Reaktionen durch Abriebpartikel (Bijukumar et al. 2018)

1.1.4.1. Lokale Aktivität von Abriebpartikeln im periprothetischen Gewebe

Die durch Abrieb der verschiedenen Gleitpaarungen entstandenen Partikel können aus dem Gelenkspalt über die Synovialflüssigkeit in das periprothetische Gewebe transportiert werden (Drees et al. 2008). Sobald die Abriebpartikel aus den Prothesenmaterialien freigesetzt wurden, werden sie durch verschiedene Proteine und Moleküle wie Albumin, Kollagen, Immunglobuline oder Fibronectin gebunden (Drees et al. 2008). Diese Bindung erleichtert die Phagozytose der Partikel durch Makrophagen (Bijukumar et al. 2018, Catelas et al. 2011, Dapunt et al. 2014, Man et al. 2017, Purdue et al. 2006). Die phagozytierten Abriebpartikel aktivieren und stimulieren die Makrophagen zur Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL6 und IL1 β (Catelas et al. 2011, Landgraeber et al. 2014, Purdue et al. 2006). Die produzierten Zytokine können nicht nur eine lokale Entzündungsreaktion auslösen, sondern sind auch an der Osteoklastendifferenzierung und -aktivierung beteiligt (Catelas et al. 2011, Landgraeber et al. 2014). Diese durch Abriebpartikel ausgelösten unerwünschten Reaktionen führen zu Osteolysen und Knochenresorption und sind somit am Prozess der aseptischen Prothesenlockerung maßgeblich beteiligt (Bijukumar et al. 2018, Catelas et al. 2011, Dapunt et al. 2014, Man et al. 2017, Purdue et al. 2006).

Bei Patienten mit Osteolysen wurden im periprothetischen Gewebe und der Synovia erhöhte Zytokinwerte nachgewiesen (Purdue et al. 2006). Deshalb ist der immunhistochemische Nachweis der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL6 und IL1 β zur Untersuchung der unerwünschten Reaktionen und biologischen Aktivität von Abriebpartikeln von Bedeutung.

Neben den Partikel-induzierten Osteolysen kam es bei den MoM-Prothesen zu weiteren lokalen besorgniserregenden Reaktionen (Liow and Kwon 2017, Varnum 2017). Besonders bei Frauen bildeten sich im Gewebe um die MoM-Prothesen sogenannte Pseudotumore (Dapunt et al. 2014, Liow and Kwon 2017, Polyzois et al. 2012). Diese periprothetischen Läsionen sind als zystische, solide oder gemischt zystisch-solide Massen beschrieben und bestehen histologisch aus Nekrosen, Lymphozyten-Infiltraten und Makrophagen (Catelas et al. 2011, Hart 2013, Liow and Kwon 2017). Die Pseudotumore können komplett asymptomatisch sein oder durch Schmerzen zu Revisionsoperationen führen, wobei die Weichgewebenekrosen eine Revision ungünstig beeinflussen können (Campbell et al. 2010, Haddad et al. 2011, Hart 2013). In Abbildung 12 ist ein T2-gewichtetes axiales MRT Bild einer rechten

Hüfte mit einem zystischen Pseudotumor zu sehen (Hart 2013). Die Abbildung 13 zeigt einen soliden Pseudotumor in einem T1-gewichteten axialen MRT Bild (Pandit et al. 2008).



Abb. 12: T2-gewichtetes axiales MRT Bild einer rechten Hüfte mit zystischem Pseudotumor (Pfeil) (Hart 2013)

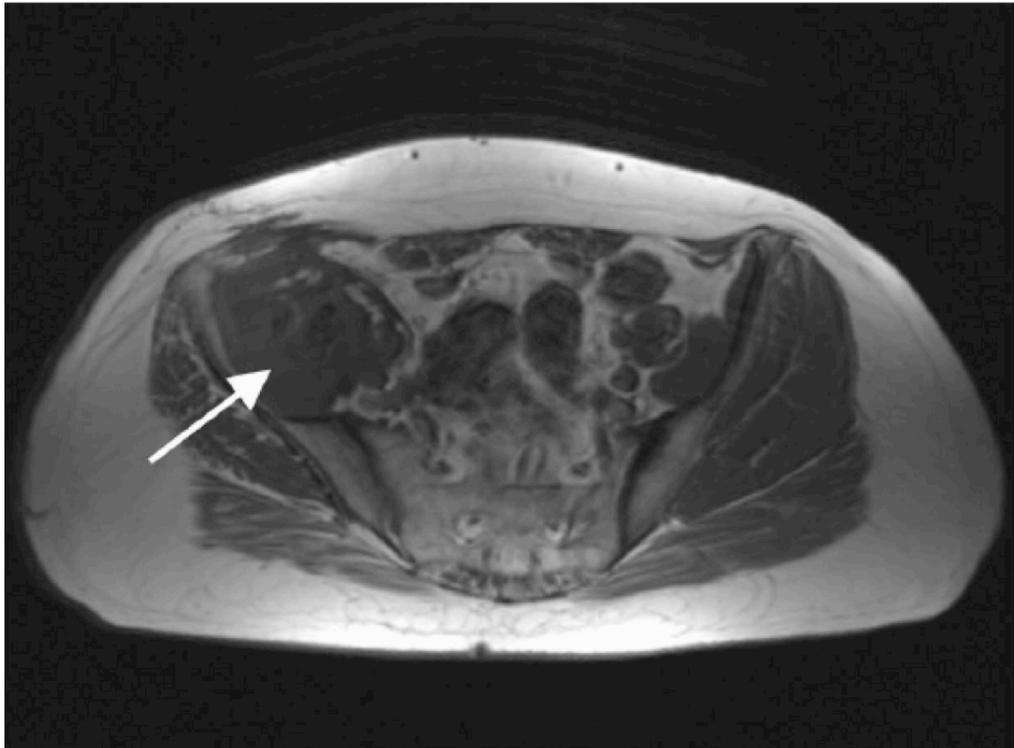


Abb. 13: T1-gewichtetes axiales MRT Bild. Solider Pseudotumor (Pfeil) (Pandit et al. 2008)

1.1.4.2. Systemische Aktivität von Abriebpartikeln und Ionen

Durch Abrieb im künstlichen Gelenk entstandene Partikel können nicht nur in das periprotetische Gewebe gelangen, sondern auch systemisch verteilt werden (Afolaranmi et al. 2012, Bauer et al. 1993, Bijukumar et al. 2018, Case et al. 1994, Cobb and Schmalzreid 2006, Gray et al. 1989, Shea et al. 1996, Urban et al. 2000).

Im Jahr 1994 konnten Case et al. in post-mortem Untersuchungen von Patienten mit Gelenkprothesen Metallpartikel in Lymphknoten, in der Leber und der Milz nachweisen (Case et al. 1994). In lokalen Lymphknoten waren die Partikel in Makrophagen zu finden und in Arealen mit der höchsten Konzentration an Metallpartikeln waren Nekrosen erkennbar (Case et al. 1994). In Leber und Milz waren die Metallpartikel ebenso innerhalb von Makrophagen nachweisbar, die Konzentration an Metallpartikeln war jedoch geringer als in den lokalen Lymphknoten und es waren keine Nekrosen sichtbar (Case et al. 1994). Patienten mit gelockerten Prothesen hatten höhere Konzentrationen an Metallpartikeln im Vergleich zu denjenigen mit festen Implantaten (Case et al. 1994). Ebenso berichteten Urban et al. in post-mortem Analysen an Patienten mit Gelenkersatz über systemisch verteilte Metall- und Polyethylenpartikel in der Leber, der Milz und paraaortalen Lymphknoten

(Urban et al. 2000). Die Partikel wurden vermehrt bei Patienten mit Prothesenversagen gefunden (Urban et al. 2000). Polyethylenpartikel, Metallpartikel und -ionen können über das lymphatische System zu Lymphknoten, in das Knochenmark, in die Leber und die Milz gelangen (Bijukumar et al. 2018). Metallpartikel können zusätzlich in den Blutkreislauf gelangen und in Erythrozyten akkumulieren (Bijukumar et al. 2018).

Die Metallimplantate der Hüftendoprothetik setzen neben Metallpartikeln auch lösliche Metallionen frei, die an Proteine gebunden im ganzen Körper verteilt werden können (Chandran and Giori 2011, Hallab and Jacobs 2009). Diese freigesetzten Metallionen führen zu erhöhten Cobalt- und Chromkonzentrationen im Blutserum und der Synovialflüssigkeit (Bijukumar et al. 2018, Chandran and Giori 2011). Die Serumspiegel für Cobalt und Chrom sind bei Patienten mit Metall-Metall- oder Metall-Polyethylen-Gleitpaarungen höher als bei Patienten ohne Prothesen (Campbell et al. 2014, Cobb and Schmalzreid 2006). Im Vergleich der Gleitpaarungen untereinander werden bei den Metall-Metall-Gleitpaarungen in verschiedenen Studien höhere Ionenkonzentrationen im Serum als bei Metall-Polyethylen-Gleitpaarungen nachgewiesen (Chen et al. 2014, Cobb and Schmalzreid 2006, Engh et al. 2014, MacDonald et al. 2003).

Die Metallionen werden über die Nieren aus dem Körper eliminiert (Chandran and Giori 2011, Cobb and Schmalzreid 2006, Corradi et al. 2011, Keegan et al. 2007, Merritt and Brown 1996). Es scheint, als würde ein Gleichgewicht zwischen Ionenproduktion und -ausscheidung entstehen. Nicht bekannt ist jedoch, ob es eine Nierenschwelle für Metallionen gibt. Dies würde bei vermehrtem Anfall von Metallionen durch erhöhte Abriebraten in lockeren oder schlecht implantierten Prothesen, oder bei verringerter Ausscheidung durch eine erniedrigte Nierenfunktion zu einem Anstieg der Ionenkonzentration im Serum führen (Chandran and Giori 2011, Cobb and Schmalzreid 2006, Daniel et al. 2010). Erhöhte Serumspiegel von Metallionen können jedoch Rückschlüsse auf das Abriebverhalten und die Festigkeit von Prothesen in vivo geben (Cobb and Schmalzreid 2006, De Smet et al. 2010, Matusiewicz 2014, Van Der Straeten et al. 2013). Hierfür wurde ein Schwellenwert für Co-Ionen im Vollblut von 2-7µg/l festgelegt (Lützner et al. 2019, Niethard et al. 2012). Werte unter 2µg/l werden als harmlos eingestuft und Werte über 7µg/l indizieren ein lokales Problem und sollten in Zusammenschau mit den Symptomen der Patienten zu weiterer Diagnostik führen (Lützner et al. 2019, Niethard et al.

2012). Bei Co-Ionen-Werten im Vollblut über 20µg/l sollte aufgrund potentieller Gewebenekrosen und langfristig gesundheitsgefährdender Effekte für den Patienten eine Revisionsoperation nach individueller Nutzen-Risiko-Abwägung in Betracht gezogen werden (Niethard et al. 2012). Eine Cobalt-Intoxikation mit neurologischen Effekten ist ab Werten über 300µg/l zu erwarten (Lützner et al. 2019).

Huk et al. konnten durch in-vitro Experimente zeigen, dass nach Zugabe von Cobalt- und Chromionen zu Makrophagen, Apoptosen und Nekrosen ausgelöst werden können (Huk et al. 2004). Die Art des Zelltods ist abhängig vom Ionen-Typ, der Inkubationszeit und der Ionenkonzentration (Huk et al. 2004). Kurze Inkubationszeiten von 24 Stunden und niedrige Ionenkonzentrationen führten zu apoptotischen Zellen. Längere Inkubationszeiten von 48 Stunden mit höheren Ionenkonzentrationen hingegen induzierten Zellnekrosen (Huk et al. 2004).

Aus verschiedenen Studien ist bekannt, dass es durch Metallpartikel- und Metallionenbelastung zu mutagenen Reaktionen wie beispielsweise DNA-Strangbrüchen, der Hemmung von DNA-Reparaturmechanismen und Chromosomenaberrationen kommen kann (Brown et al. 2013, Polyzois et al. 2012). Das Ausmaß der mutagenen Wirkung ist dabei von der Größe und Konzentration der Partikel und Ionen abhängig (Briggs et al. 2015, Brown et al. 2013, Daley et al. 2004, Dunstan et al. 2008, Polyzois et al. 2012). In der Literatur finden sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich der kanzerogenen Wirkung von Metallpartikeln (Cheung et al. 2016, Hallab and Jacobs 2009, Kirkpatrick et al. 2000, Mäkelä et al. 2014). Es gibt in-vivo Studien, die ein kanzerogenes Potential der Partikel nachweisen, da es zu einer vermehrten Bildung von Sarkomen in Versuchstieren kam (Hallab and Jacobs 2009, Kirkpatrick et al. 2000). Andere Tierexperimente konnten jedoch keine kanzerogene Wirkung durch Partikel nachweisen (Lewis et al. 1995, Meachim et al. 1982). In weiteren Studien konnte keine kanzerogene Wirkung und kein erhöhtes Krebsrisiko bei Patienten mit Gelenkprothesen im Vergleich zur Normalbevölkerung nachgewiesen werden (Cheung et al. 2016, Mäkelä et al. 2014, Visuri et al. 2010).

Da Metallionen Komplexe mit Proteinen bilden, können sie das Immunsystem aktivieren und besitzen dadurch ein allergisches Potential (Cobb and Schmalzreid 2006, Hallab and Jacobs 2009, Jacobs et al. 2008). Diese Komplexe fungieren als Allergene und können eine Hypersensibilisierung auslösen (Brown et al. 2006). Die allergische Reaktion stellt eine Typ IV-Reaktion (Spättyp) dar, die durch reaktive T-

Lymphozyten vermittelt wird, welche gegen ionenmodifizierte körpereigene Proteine gerichtet sind (Jacobs et al. 2008). Metalle, die zu einer Sensibilisierung führen können, sind vor allem Nickel, Cobalt und Chrom (Hallab and Jacobs 2009). Die Prävalenz für eine Metallsensibilisierung wird zwei- bis dreifach höher bei Patienten mit Prothesenversagen und bis zu sechsfach höher im Vergleich zur Normalbevölkerung angegeben (Hallab and Jacobs 2009). Welche Folgen eine solche Hypersensibilisierung gegenüber den Metallen der Gelenkprothesen für Patienten hat und ob diese allergische Reaktion vom Spättyp im Zusammenhang mit einer aseptischen Prothesenlockerung steht, bleibt bisher ungeklärt und sollte in weiteren Studien untersucht werden.

Ebenso fraglich bleibt, ob die durch die Oberflächenmaterialien der Gelenkprothesen produzierten Serumionenspiegel und systemisch verteilten Abriebpartikel in den Organen Entzündungsreaktionen auslösen und zu Gewebeschäden führen können.

1.1.5. Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 8 und 30 kDa, die von verschiedenen Zellen als Reaktion auf Stimuli freigesetzt werden und durch Bindung an spezifische Rezeptoren unterschiedliche Reaktionen auslösen (de Oliveira et al. 2011, Dinarello 2000, Zhang and An 2007). Unterschiedliche Zellarten können das gleiche Zytokin produzieren und ein Zytokin kann auf verschiedene Zellarten wirken (pleiotrope Wirkung) (de Oliveira et al. 2011, Gadola 2012, Kaufmann 2014). Sie dienen der autokrinen und parakrinen Zellkommunikation und sind wichtiger Bestandteil der angeborenen und erworbenen Immunität (de Oliveira et al. 2011, Gadola 2012, Vollmar et al. 2013). Dabei beeinflussen Zytokine die Aktivität, Differenzierung und Proliferation von Zellen des Immunsystems (de Oliveira et al. 2011). Die zahlreichen Zytokine lassen sich in mehrere Gruppen einteilen - die Familie der Interferone und Interleukine, die TNF-Familie, Chemokine und hämatopoetische Wachstumsfaktoren (Vollmar et al. 2013).

Ihre Wirkung besteht darin, Effektorzellen des Immunsystems zu mobilisieren, anzulocken und zu aktivieren (Vollmar et al. 2013). Die verschiedenen Zytokine können pro- oder antiinflammatorisch wirken (de Oliveira et al. 2011, Gadola 2012, Kaufmann 2014, Vollmar et al. 2013).

1.1.5.1. Tumornekrosefaktor α (TNF- α)

TNF- α ist ein Trimer aus 157 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 17 kDa und wird von Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, natürlichen Killerzellen, T-Zellen und Fibroblasten produziert (de Oliveira et al. 2011, Murphy et al. 2009, Sedger and McDermott 2014, Vollmar et al. 2013). Das Zytokin selbst kann eine lokale Entzündungsreaktion, Zelldifferenzierung und Apoptose induzieren (de Oliveira et al. 2011, Turner et al. 2014). Durch Aktivierung der lokalen Blutgerinnung kommt es zu einer Abkapselung eines Infektionsherdes, was zur Eindämmung einer Infektion beiträgt (de Oliveira et al. 2011, Murphy et al. 2009, Vollmar et al. 2013). Zusätzlich stimuliert TNF- α die Expression und Ausschüttung von Adhäsionsmolekülen für Leukozyten am Endothel, welche dadurch in entzündetes Gewebe gelangen können (Dinarello 2000). Außerdem induziert es die Akute-Phase-Reaktion in der Leber, welche zu einer erhöhten Freisetzung von Akute-Phase-Proteinen (z.B. CRP) aus den Hepatozyten führt (Murphy et al. 2009). Als endogenes Pyrogen kann TNF- α Fieber induzieren (Murphy et al. 2009). Außerdem aktiviert es Makrophagen und Granulozyten und stimuliert Phagozyten und andere Zellen weitere Zytokine wie Interleukin 1 oder Interleukin 6, sowie TNF- α selbst zu sezernieren (Murphy et al. 2009, Sedger and McDermott 2014, Vollmar et al. 2013). Zusätzlich fungiert TNF- α als T-Zell-Aktivator, stimuliert B-Zellen, regt die Produktion von Leukozyten im Knochenmark an und kann Osteoklasten aktivieren (de Oliveira et al. 2011, Dinarello 2000, Locksley et al. 1987, Murphy et al. 2009, Schütt and Bröker 2011, Sedger and McDermott 2014, Turner et al. 2014, Vollmar et al. 2013).

1.1.5.2. Interleukin 6 (IL6)

IL6 ist ein Monomer aus 184 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht zwischen 21 und 28 kDa und wird von Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, dendritischen Zellen, T-Zellen und Hepatozyten produziert und sezerniert (de Oliveira et al. 2011, Gadola 2012, Murphy et al. 2009, Turner et al. 2014, Vollmar et al. 2013). Die Produktion von IL6 wird durch die Zytokine TNF- α und IL1 β induziert (Gadola 2012, Sedger and McDermott 2014). IL6 nimmt eine wichtige Rolle in der frühen Immunantwort ein (Brockner et al. 2010). Es induziert die Differenzierung von B-Lymphozyten zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen und induziert die

Aktivierung, das Wachstum und die Differenzierung von T-Lymphozyten (Brocker et al. 2010, Turner et al. 2014). IL 6 hat die breiteste Wirkung auf die intrahepatische Synthese und Sekretion der Akute-Phase-Proteine (Gadola 2012, Murphy et al. 2009, Vollmar et al. 2013). Außerdem fördert IL6 die Akkumulation von Monozyten und Makrophagen in entzündetem Gewebe und verstärkt die Expansion von B- und T-Lymphozyten (Gadola 2012). Durch die Stimulation der Hypothalamus-Hypophysen-Achse wirkt es zusätzlich als endogenes Pyrogen (Gadola 2012). Des Weiteren kann IL6 die Osteoklastendifferenzierung aktivieren und fördern (Brocker et al. 2010, de Oliveira et al. 2011, Gadola 2012, Murphy et al. 2009, Schütt and Bröker 2011, Turner et al. 2014, Vollmar et al. 2013).

1.1.5.3. Interleukin 1 β (IL1 β)

IL1 β ist ein Monomer aus 153 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht zwischen 31 und 33 kDa und wird bei Zellverletzungen, Entzündungen oder Infektionen von Monozyten, Makrophagen, Epithel- und Endothelzellen, dendritischen Zellen und Fibroblasten freigesetzt (de Oliveira et al. 2011, Kaufmann 2014, Murphy et al. 2009, Zhang and An 2007). Es wird als Vorläufer Protein Pro-IL1 β produziert und wird durch das Enzym Caspase-1 in die aktive Form metabolisiert (de Oliveira et al. 2011). IL1 β ist ein Schlüsselenzym der Entzündungskaskade und dient der Infektkontrolle (Gadola 2012). Es führt zu Fieber, Vasodilatation und Hypotension, außerdem induziert es die Genexpression und Synthese von Effektormolekülen der Entzündungs- und Immunantwort (Dinarello 2009, Gadola 2012). Zusammen mit TNF- α führt IL1 β zu einer erhöhten Expression von Adhäsionsmolekülen am Endothel, wodurch immunkompetente Zellen von der Blutzirkulation in das extravaskuläre Gewebe gelangen können (Dinarello 2009, Gadola 2012). Zusätzlich fördert IL1 β die Produktion und Sekretion von IL6, induziert die B- und T-Zelldifferenzierung und ist ebenfalls für die Induktion der Akute-Phase-Reaktion in der Leber zuständig (Dinarello 2009, Gadola 2012, Murphy et al. 2009). IL1 β kann ebenso wie TNF- α und IL6 Osteoklasten aktivieren (Schütt and Bröker 2011).

1.2. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist es ein grundlegendes Verständnis für die biologische Aktivität und Pathophysiologie der inflammatorischen Reaktion auf Abriebpartikel und Ionen in den parenchymatösen Organen Niere, Leber, Milz und Lunge zu erhalten.

Da in der Hüftendoprothetik unterschiedliche Oberflächenmaterialien als Gleitpartner zur Verfügung stehen, sollten die Unterschiede zwischen Polyethylen- und Metallpartikeln, sowie Metallionen herausgearbeitet werden. Von besonderem Interesse war das inflammatorische Potential von Metallionen im Vergleich zu Metallpartikel.

Die immunhistochemische Analyse der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL6 und IL1 β sollte Erkenntnisse über die in den Organen als Antwort auf die systemisch verteilten Partikel und Ionen ausgelöste Entzündungsreaktion erbringen.

2. Material und Methoden

2.1. Material und Geräte

Alle in der Arbeit zur immunhistochemischen Färbung verwendeten Antikörper und Reagenzien und die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Geräte sind in Kapitel 7 aufgelistet.

2.2. Gewebeproben

Als Gewebeproben dienten die parenchymatösen Organe Niere, Leber, Milz und Lunge weiblicher Balb/c-Mäuse. Die Mäuse wurden von der Charles River Wiga GmbH für Tierversuche gezüchtet und bereitgestellt (§§ 19-24 TierSchVersV). Es gab drei Versuchsgruppen und eine Kontrollgruppe mit je zehn Mäusen. Den Versuchsgruppen wurden Suspensionen aus Metallpartikeln, Polyethylenpartikeln oder Metallionen in das Kniegelenk injiziert, für die Kontrollgruppe wurde PBS verwendet. Die Organe wurden sieben Tage nach Injektion der Suspension entnommen. Die Injektion der jeweiligen Suspension in die Kniegelenke der Mäuse und Entnahme der Präparate fand im Rahmen einer anderen Arbeit des DFG-geförderten Gemeinschaftsprojektes statt.

Die Versuche wurden gemäß des Tierschutzes bei der Regierung von Oberbayern registriert und bewilligt (Aktenzeichen: 55.2-1-54-2532-82.12).

Die Metallpartikel wurden im Rahmen des Gemeinschaftsprojektes von der Arbeitsgruppe Biomechanik und Implantatforschung der orthopädischen Uniklinik Heidelberg hergestellt. Die generierten Partikel hatten eine mittlere Größe von $61,25\text{nm} \pm 18,47\text{nm}$ (Kretzer). Ihre Form war überwiegend oval (49%) und rund (44%), ein kleiner Anteil der Metallpartikel war nadelförmig (7%) (Kretzer).

Die Metallionen wurden ebenfalls von der Arbeitsgruppe der orthopädischen Uniklinik Heidelberg hergestellt. Die mit PBS generierte Suspension hatte einen Metallionengehalt von 20,5mg/l und setzte sich zusammen aus 4,3mg/l Chrom, 13,7mg/l Cobalt, 0,8mg/l Molybdän und 1,7mg/l Nickel (Kretzer). Um eine Zielkonzentration von 200µg/l zu erreichen, wurde die Metallionenlösung mit PBS verdünnt (Kretzer).

Die verwendeten Polyethylenpartikel waren industriell generierte runde bis granuliert UHMWPE-Partikel von BioEngineering Solutions Inc. mit einem Durchmesser von 1,07µm.

2.3. Fixierung, Entwässerung und Paraffineinbettung

Nach Entnahme der Organe wurden diese in einer neutral gepufferten Formaldehydlösung 4% (Microcos GmbH Garching, Deutschland) für mindestens 24 Stunden eingelegt und konserviert.

Anschließend wurden die Präparate in einem Entwässerungsautomaten mit Paraffinbad (Entwässerungsautomat Hypercenter XP, Thermo Shandon GmbH Frankfurt, Deutschland) entwässert und mit einer Paraffinausgießstation (Paraffinausgießstation Leica EG1160, Leica Microsystems Nussloch, Deutschland) in Einbettkassetten eingebettet. Dazu wurde das Paraffin auf 60°C erhitzt und in flüssigem Zustand auf die in den Einbettkassetten zentrierten Organe gegossen. Zum Erstarren der Blöcke wurden diese auf eine Kühlplatte (-5°C) gestellt. Die fertigen Paraffinblöcke wurden bei Raumtemperatur gelagert.

2.4. Herstellung von Paraffinschnitten

Die Paraffinschnitte wurden an einem Rotationsmikrotom (Rotationsmikrotom Leica RM2255, Leica Microsystems Nussloch, Deutschland) mit passenden Mikrotommessern (Microtom Blade A35-pfm, Feather Safety Razor Co. Ltd. Osaka, Japan) angefertigt.

Vor dem Schneiden wurden die Paraffinblöcke auf einer Kühlplatte (Mobile Cooling System, pfm medical ag Köln, Deutschland) gekühlt. Der Block wurde auf dem Tisch des Mikrotoms eingespannt, bis zur gewünschten Ebene angeschnitten und 2 µm dicke Schnitte des Präparates angefertigt. Mit einer Pinzette wurden die Schnitte in ein Streckbad (Paraffin-Streckbad, Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel, Deutschland) gegeben und auf Objektträger (Objektträger Superfrost Plus, Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland) aufgezogen. Anschließend trockneten die Schnitte auf einer Heizplatte (Medax GmbH & Co.KG Büchenbach, Deutschland) bei 75°C für 20 Minuten.

2.5. Immunhistochemische Färbung

2.5.1. Grundlagen der Immunhistochemie

Das Ziel der Immunhistochemie ist es, antigene Komponenten in Gewebeschnitten oder Zellen mittels Antikörper sichtbar zu machen (DCS , Noll and Schaub-Kuhnen 2000). Dabei bindet ein spezifischer Antikörper an das Epitop des nachzuweisenden Antigens und mittels einer Enzymreaktion durch alkalische Phosphatase oder Peroxidase und einem Chromogen wird der gebundene Antikörper sichtbar gemacht (DCS , Noll and Schaub-Kuhnen 2000). In dieser Arbeit wurde als Enzym Meerrettich-Peroxidase verwendet. Als Chromogen wurde DAB (3,3-Diaminobenzidin) benutzt, welches durch Gegenfärbung mit Hämatoxylin ein braunes Farbprodukt ergibt.

Unter den zahlreichen Färbemethoden ist zunächst die direkte Immunhistochemie zu nennen, bei welcher der Primärantikörper direkt mit einem Enzym konjugiert wird (DCS , Lang 2013, Luttmann et al. 2014). Aufgrund des schwachen Farbsignals wird diese Methode selten genutzt (DCS , Luttmann et al. 2014).

Bei der indirekten Immunhistochemie bindet an den unkonjugierten Primärantikörper zusätzlich ein Sekundärantikörper, welcher gegen den Primärantikörper gerichtet und mit einem Enzym gekoppelt ist (DCS , Lang 2013, Noll and Schaub-Kuhnen 2000).

Eine weitere Färbemethode ist die doppelt indirekte Methode, bei der zusätzlich ein gleichartig konjugierter Tertiärantikörper, der gegen den konjugierten Sekundärantikörper gerichtet ist, hinzugegeben wird (Luttmann et al. 2014, Noll and Schaub-Kuhnen 2000).

Die Avidin-Biotin-Komplex-Methode (ABC-Methode) beruht auf der hohen Affinität von Avidin zu Biotin (DCS , Noll and Schaub-Kuhnen 2000). Avidin ist ein aus Hühnereiweiß gewonnenes Glykoprotein und besitzt vier Bindungsstellen für Biotin (DCS , Noll and Schaub-Kuhnen 2000). Da teilweise unspezifische Reaktionen bei der Verwendung von Avidin entstehen, wurde ein reineres, gentechnisch hergestelltes Produkt benötigt (Noll and Schaub-Kuhnen 2000). Dabei handelt es sich um Streptavidin, das aus dem Bakterium *Streptomyces avidinii* isoliert wird (DCS , Noll and Schaub-Kuhnen 2000). Bei dieser Färbemethode gibt man zum Primärantikörper einen biotinylierten Brückenantikörper, an den der Streptavidin-Biotin-Enzymkomplex bindet. Dieser Enzymkomplex besteht aus Streptavidin, das an drei von vier Bindungsstellen Biotin gebunden hat, welches wiederum an ein

biotinyliertes Enzym gekoppelt ist. (DCS , Lang 2013, Luttmann et al. 2014, Noll and Schaub-Kuhnen 2000)

Eine weitere auf die ABC-Methode aufbauende Färbemethode ist die Labeled Streptavidin-Biotin-Methode (LSAB-Methode), bei der im dritten Schritt zum biotinylierten Brückenantikörper ein direkt mit einem Enzym konjugiertes Streptavidin gegeben wird (Lang 2013, Luttmann et al. 2014, Noll and Schaub-Kuhnen 2000).

Als letzte Methode ist das Polymersystem zu nennen, welches in dieser Arbeit Anwendung fand. Dabei wird der Primärantikörper über ein Dextran-Polymer-Konjugat nachgewiesen. An ein Polymer sind mehrere Moleküle eines Sekundärantikörpers (Link) und eines Enzyms gekoppelt, dadurch wird eine verstärkte Anfärbung des Antigens erreicht. (DCS , Lang 2013, Luttmann et al. 2014, Noll and Schaub-Kuhnen 2000)

2.5.2. Färbemethode und Färbeprotokoll

Die Primärantikörper wurden bei -20°C, Link und Label sowie das Chromogen bei 4°C gelagert.

Vor der Färbung wurden die Präparate ausgewählt, beschriftet und in einem Objektträgerhalter (Färbe-Rack, Diapath S.P.A. Martinengo BG, Italien) für 16 Stunden bei 60°C im Trockenschrank (Binder GmbH Tuttlingen, Deutschland) vollständig getrocknet.

Die Schnitte wurden aus dem Trockenschrank genommen und auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Entparaffinierung erfolgte zweimal für je zehn Minuten mit Xylol (Xylol reinst >98%, SAV Liquid Production GmbH Flintsbach am Inn, Deutschland) und zur Rehydrierung kamen die Schnitte jeweils fünf Minuten in Küvetten mit Alkohol in absteigender Konzentration (Ethanol 100%, Ethanol 96%, Ethanol 70%, Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland).

Für die Antigen-Demaskierung, welche durch die Fixierung mit Formalin entstanden ist (Noll and Schaub-Kuhnen 2000), wurden die Schnitte in einem EDTA-Puffer pH 9 (DCS LabLine EDTA-Puffer pH 9 (10 x konzentriert), DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland) in einem Dampfgerät (Dampfgerät Braun MultiGourmet, De'Longhi Deutschland GmbH Geschäftsbereich Braun Household Neu-Isenburg, Deutschland) für 30 Minuten bei 100°C gekocht. Danach kühlten die

Schnitte im EDTA-Puffer für 20 Minuten ab und wurden anschließend für drei Minuten in einer PBS-Brij Lösung gewaschen.

Zur Blockade endogener Peroxidasen und dadurch unspezifischer Hintergrundfärbungen (Noll and Schaub-Kuhnen 2000) wurden die Präparate für vier Minuten in eine Küvette mit Wasserstoffperoxid 3% (Wasserstoffperoxid 30%, Merck KGaA Darmstadt, Deutschland) gegeben und danach dreimal zwei Minuten in PBS-Brij gewaschen.

Für die Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Schnitte in eine mit Aquadest gefüllte Färbekammer (Färbekammern Stain Tray, Carl Roth GmbH + Co Karlsruhe, Deutschland) gelegt und je 100 µl des Primärantikörpers auf die Präparate gegeben (Inkubation für 60 Minuten bei Raumtemperatur). Anschließend wurden die Schnitte dreimal zwei Minuten in PBS-Brij gewaschen und in die mit Aquadest gefüllte Färbekammer zur Inkubation mit dem Link (DCS Detection Line SUPERVision 2 Single Species HRP-Polymer Kaninchen, DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland) zurückgelegt. Es wurden je 100 µl des Links auf die Schnitte pipettiert und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde dreimal zwei Minuten in PBS-Brij gewaschen und die Präparate wurden in der Färbekammer mit je 100 µl des Labels (DCS Detection Line SUPERVision 2 Single Species HRP-Polymer Kaninchen, DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland) für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Vor der Inkubation mit dem Chromogen (DCS ChromoLine DAB-2 Komponenten/Chromogen-Kit, DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland) wurden die Schnitte erneut dreimal zwei Minuten in einer PBS-Brij Lösung gewaschen und zurück in die feuchte Färbekammer gelegt. Es wurden je 100 µl des Chromogens auf die Schnitte pipettiert und für fünf Minuten in der abgedunkelten Färbekammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dem Waschschrift mittels PBS-Brij für drei Minuten wurden die Schnitte für 30 Sekunden in Hämatoxylin (Mayer`s Hämatoxylin Solution, AppliChem Darmstadt, Deutschland) gegengefärbt und zum Wässern in eine Küvette mit Leitungswasser gegeben (zehn Minuten).

Zum Entwässern wurden die Schnitte nacheinander in eine in der Konzentration aufsteigende Alkoholreihe (Ethanol 70%, Ethanol 96%, Ethanol 100%) und Xylol gegeben, um abschließend mit einem Tropfen Eukitt (O.Kindler GmbH Freiburg,

Deutschland) fixiert und einem Deckglas (Deckgläser 24x32 mm/ 24x50 mm, Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland) eingedeckelt zu werden.

Die fertigen Präparate wurden in Färbekästen bei Raumtemperatur gelagert.

Die Herstellung der Puffer erfolgte nach folgendem Schema:

PBS-Puffer:

1 l PBS (Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland)
ad 9 l Aquadest

PBS-Brij:

1 ml Brij L23 solution (Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland)
ad 1000 ml PBS

Wasserstoffperoxid 3%:

1 l Wasserstoffperoxid 30% (Merck KGaA Darmstadt, Deutschland)
ad 9 l Aquadest

EDTA Puffer pH 9:

1 l DCS LabLine EDTA-Puffer pH9 (DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland)
ad 9 l Aquadest

Alle verwendeten Materialien und Geräte sind in Kapitel 7 aufgeführt. Das Färbeprotokoll ist in Tabelle 1 dargestellt.

Xylol	200 ml Färbeküvette	10 Min.
Xylol	200 ml Färbeküvette	10 Min.
Ethanol 100%	200 ml Färbeküvette	5 Min.
Ethanol 100%	200 ml Färbeküvette	5 Min.
Ethanol 96%	200 ml Färbeküvette	5 Min.
Ethanol 70%	200 ml Färbeküvette	5 Min.
EDTA-Puffer pH9 (10 x konzentriert)	Dampfgarer	30 Min. kochen bei 100°C, 20 Min. abkühlen
PBS-Brij	200 ml Färbeküvette	3 Min.
Wasserstoffperoxid 3%	200 ml Färbeküvette	4 Min.
PBS-Brij	200 ml Färbeküvette	3 x 2 Min.
Primärantikörper verdünnt mit Antikörper-Verdünnungspuffer TNF-alpha 1:500 IL-6 1:200 IL-1b 1:100	100 µl pro Schnitt in der Färbekammer	60 Min. bei Raumtemperatur
PBS-Brij	200 ml Färbeküvette	3 x 2 Min.

Link	100 µl pro Schnitt in der Färbekammer	20 Min. bei Raumtemperatur
PBS-Brij	200 ml Färbeküvette	3 x 2 Min.
Label	100 µl pro Schnitt in der Färbekammer	20 Min. bei Raumtemperatur
PBS-Brij	200 ml Färbeküvette	3 x 2 Min.
Chromogen	100 µl pro Schnitt in der abgedunkelten Färbekammer	5 Min. bei Raumtemperatur
PBS-Brij	200 ml Färbeküvette	3 Min.
Hämatoxylin	200 ml Färbeküvette	30 Sek.
Wässern mit Leitungswasser	200 ml Färbeküvette	10 Min.
Ethanol 70%	200 ml Färbeküvette	5 Min.
Ethanol 96%	200 ml Färbeküvette	5 Min.
Ethanol 100%	200 ml Färbeküvette	5 Min.
Ethanol 100%	200 ml Färbeküvette	5 Min.
Xylol	200 ml Färbeküvette	10 Min.

Xylol	200 ml Färbeküvette	10 Min.
Eindecken mit Eukitt		

Tabelle 1: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbung

2.6. Auswertung

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Präparate erfolgte an einem Lichtmikroskop (M8 Microscope and Scanner, PreciPoint GmbH Freising, Deutschland).

Als Negativkontrollen dienten entsprechende nicht vorbehandelte Organe. Als Positivkontrolle dienten Gewebe, die laut Antikörper Datenblatt sicher das Zielprotein exprimieren. Für die Färbungen mit TNF- α dienten Milzschnitte und für die Färbungen mit IL-6 und IL-1 β Lungenschnitte. Pro Schnitt wurden die positiven Zellen in 20 Gesichtsfeldern in 200x Vergrößerung gezählt, als positiv wurden bräunlich angefärbte Zellen gewertet. Alle Präparate wurden mit zwei entsprechenden Negativkontrollen verglichen, um unspezifische Bindungen von spezifischen Antigen-Antikörper-Bindungen zu unterscheiden. Da die Milz für die immunhistochemischen Färbungen mit TNF- α und die Lunge für die Färbungen mit IL-6 und IL-1 β als Positivkontrollen dienten, wurden diese aus der Arbeit ausgeschlossen.

2.7. Statistik

Die erhobenen Daten wurden mit dem Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel 2011 erfasst und zur statistischen Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS 24 gearbeitet.

Zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen wurde als statistischer Test der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet. Um die Gruppen zusätzlich paarweise vergleichen zu können, wurde als Post-hoc-Test eine Bonferroni-Korrektur durchgeführt.

Die angegebenen p-Werte wurden nach Bonferroni adjustiert. Adjustierte p-Werte unter 0,05 wurden als statistisch signifikant gewertet.

3. Ergebnisse

3.1. Niere

3.1.1. Expression von TNF- α in der Niere

In der Niere zeigte sich in der Metallionen- (MI) ($p < 0,001$) und Polyethylenpartikelgruppe (PE) ($p = 0,008$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) ein signifikanter Unterschied in der Expression von TNF- α . Im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Metallionen- (MI) und der Metallpartikelgruppe (MP) ($p < 0,001$).

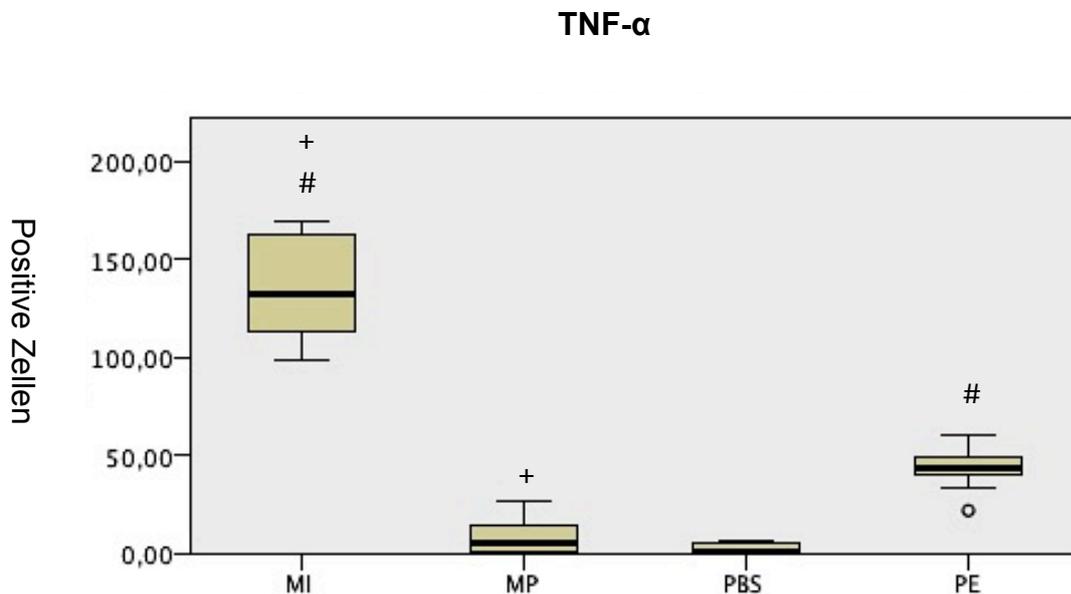


Abb. 14 zeigt die signifikant vermehrte Expression von TNF- α in der Niere in der Metallionen- (MI) ($p < 0,001$) und Polyethylenpartikelgruppe (PE) ($p = 0,008$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen der Metallionen- (MI) und der Metallpartikelgruppe (MP)

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

° = milder Ausreißer

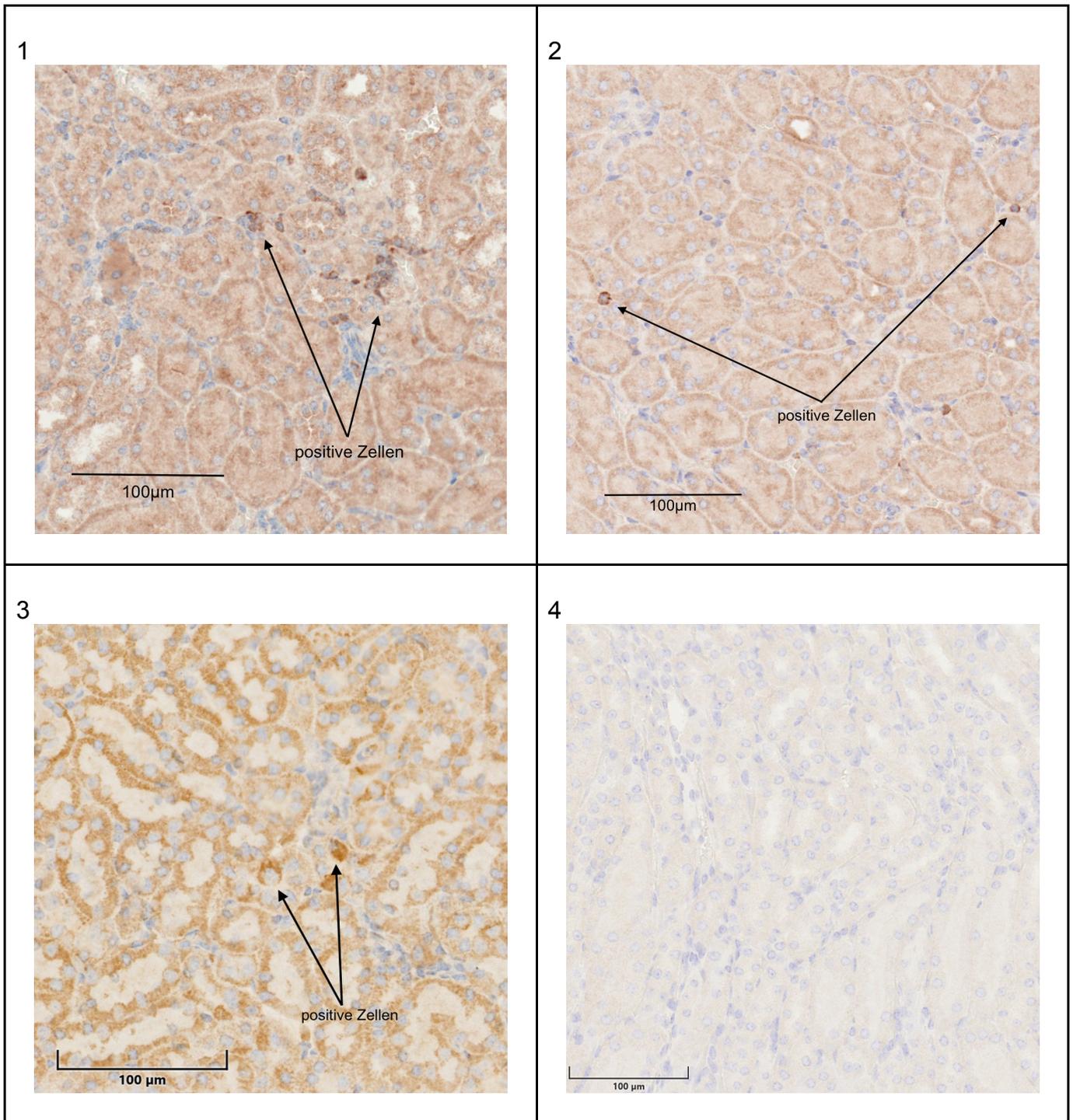


Abb. 15 zeigt Ausschnitte von Nieren Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit TNF- α gefärbt wurden. Abb. 15.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 15.2 einen Ausschnitt der MP-Gruppe, Abb. 15.3 der PE-Gruppe und Abb. 15.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert. Jeweils 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100 μ m

3.1.2. Expression von IL6 in der Niere

In der Expression von IL6 in der Niere zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen der Metallionen- (MI) und der Metallpartikelgruppe (MP) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Im Vergleich der Gruppen untereinander zeigte sich zusätzlich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,006$) zwischen der Metallionen- (MI) und der Polyethylenpartikelgruppe (PE).

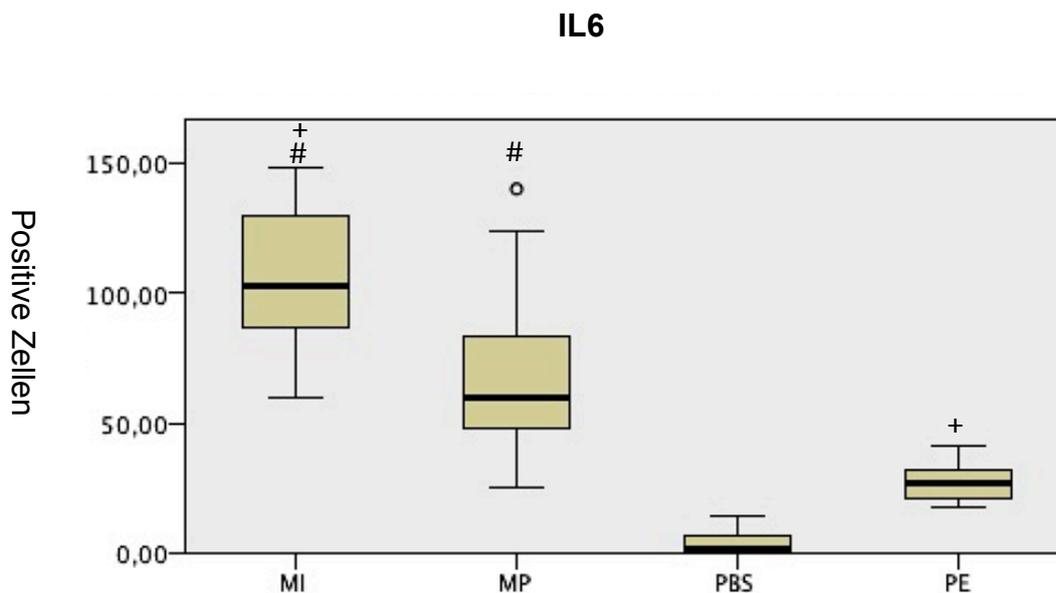


Abb. 16 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p < 0,001$) von IL6 in der Niere in der Metallionen- (MI) und Metallpartikelgruppe (MP) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,006$) zwischen der Metallionen- (MI) und Polyethylenpartikelgruppe (PE).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

° = milder Ausreißer

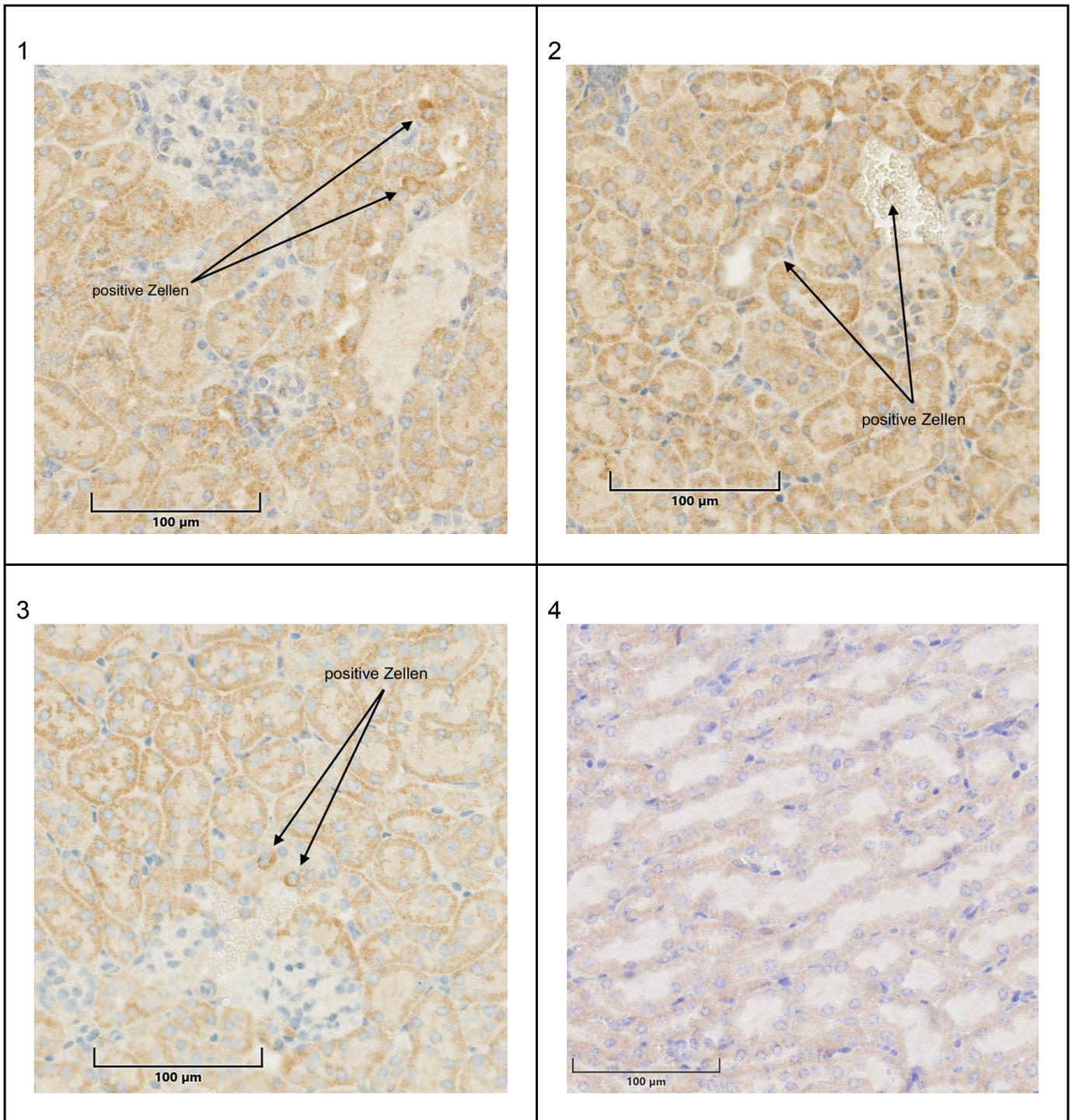


Abb. 17 zeigt Ausschnitte von Nieren Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL6 gefärbt wurden. Abb. 17.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 17.2 einen Ausschnitt der MP-Gruppe, Abb. 17.3 der PE-Gruppe und Abb. 17.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert. Jeweils 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100μm

3.1.3. Expression von IL1 β in der Niere

In der Expression von IL1 β zeigte sich lediglich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,034$) zwischen der Metallionen- (MI) und der Kontrollgruppe (PBS). Im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der Expression von IL1 β .

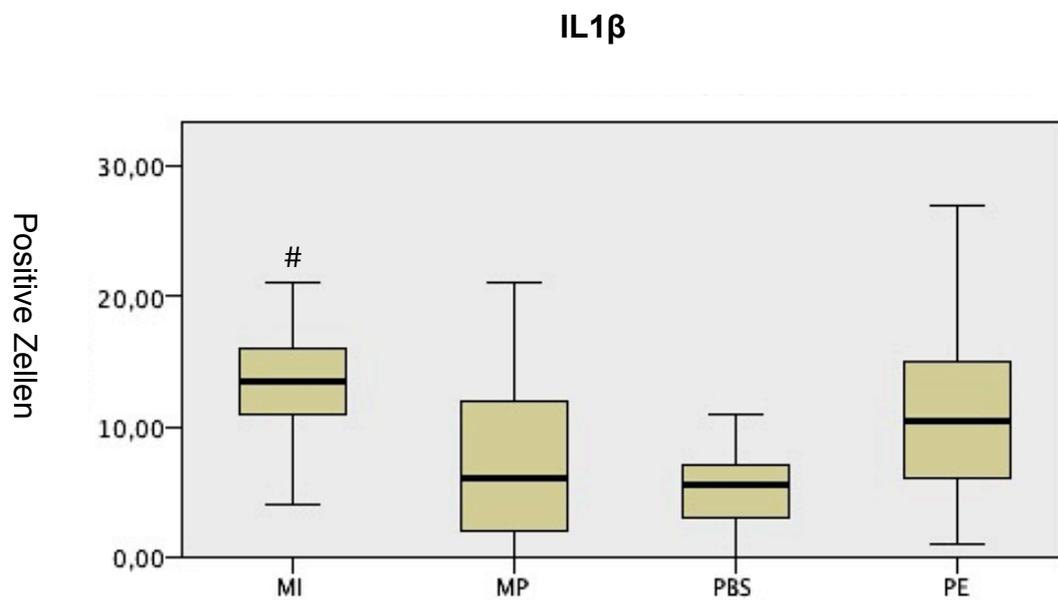


Abb. 18 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p = 0,034$) von IL1 β in der Niere in der Metallionengruppe (MI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der Expression von IL1 β .

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

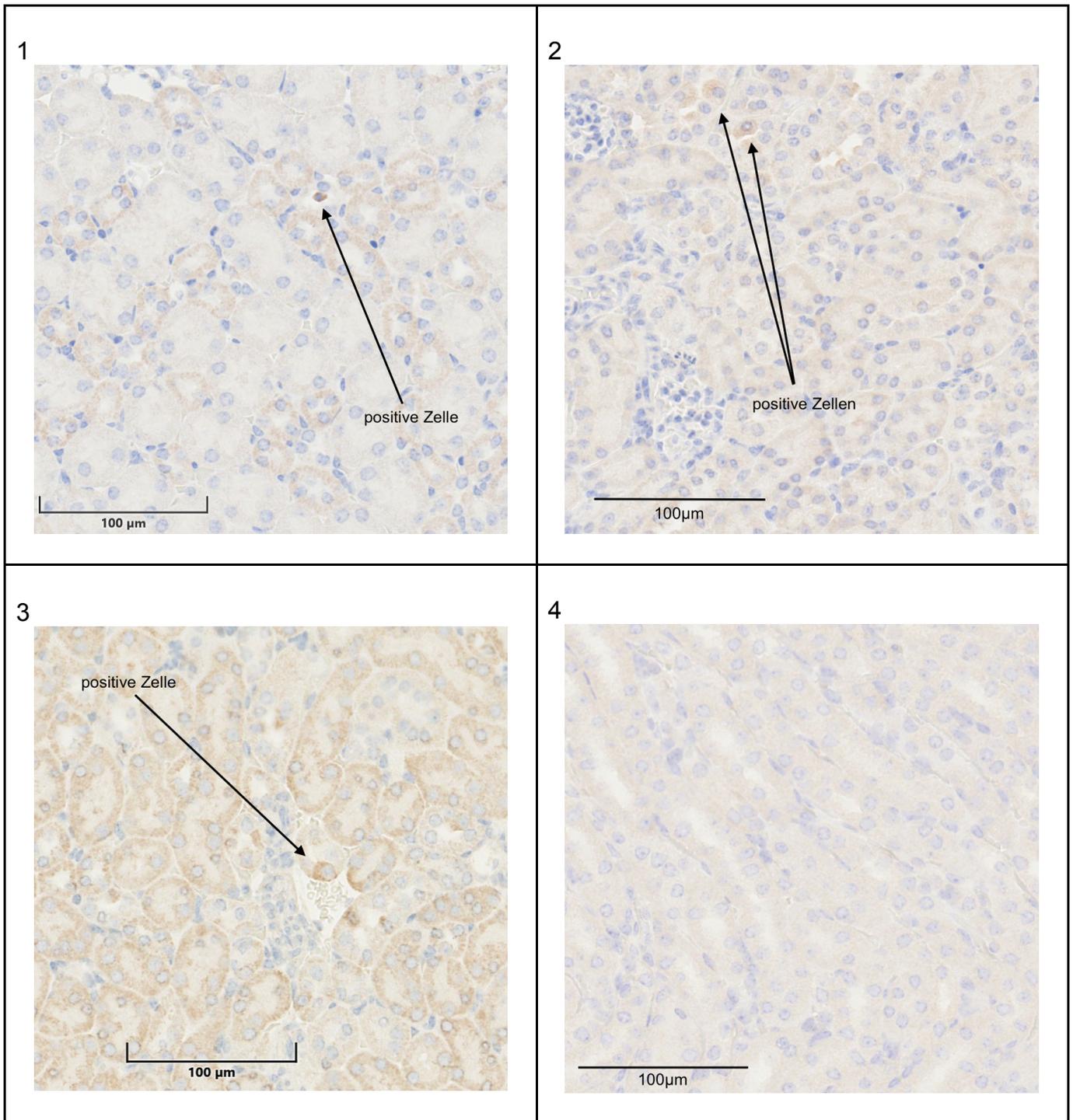


Abb. 19 zeigt Ausschnitte von Nieren Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL1 β gefärbt wurden. Abb. 19.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 19.2 einen Ausschnitt der MP-Gruppe, Abb. 19.3 der PE-Gruppe und Abb. 19.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert. Jeweils 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100 μ m

3.2. Leber

3.2.1. Expression von TNF- α in der Leber

Im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) zeigte sich in der Leber in der Expression von TNF- α lediglich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,045$) in der Metallpartikelgruppe (MP). Im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander ergab sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$).

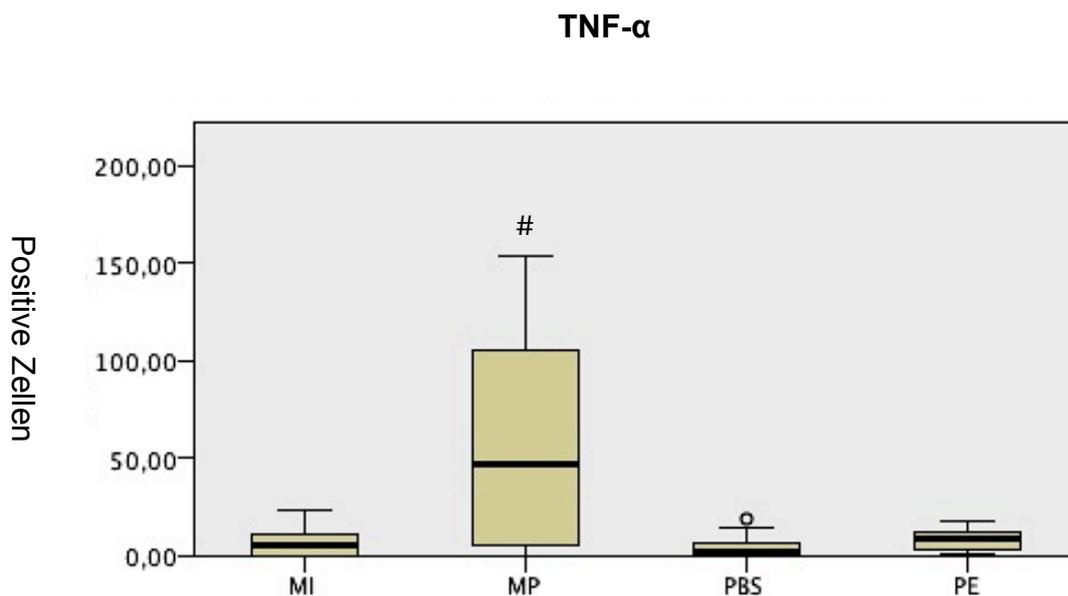


Abb. 20 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p = 0,045$) von TNF- α in der Leber in der Metallpartikelgruppe (MP) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der Expression von TNF- α .

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

° = milder Ausreißer

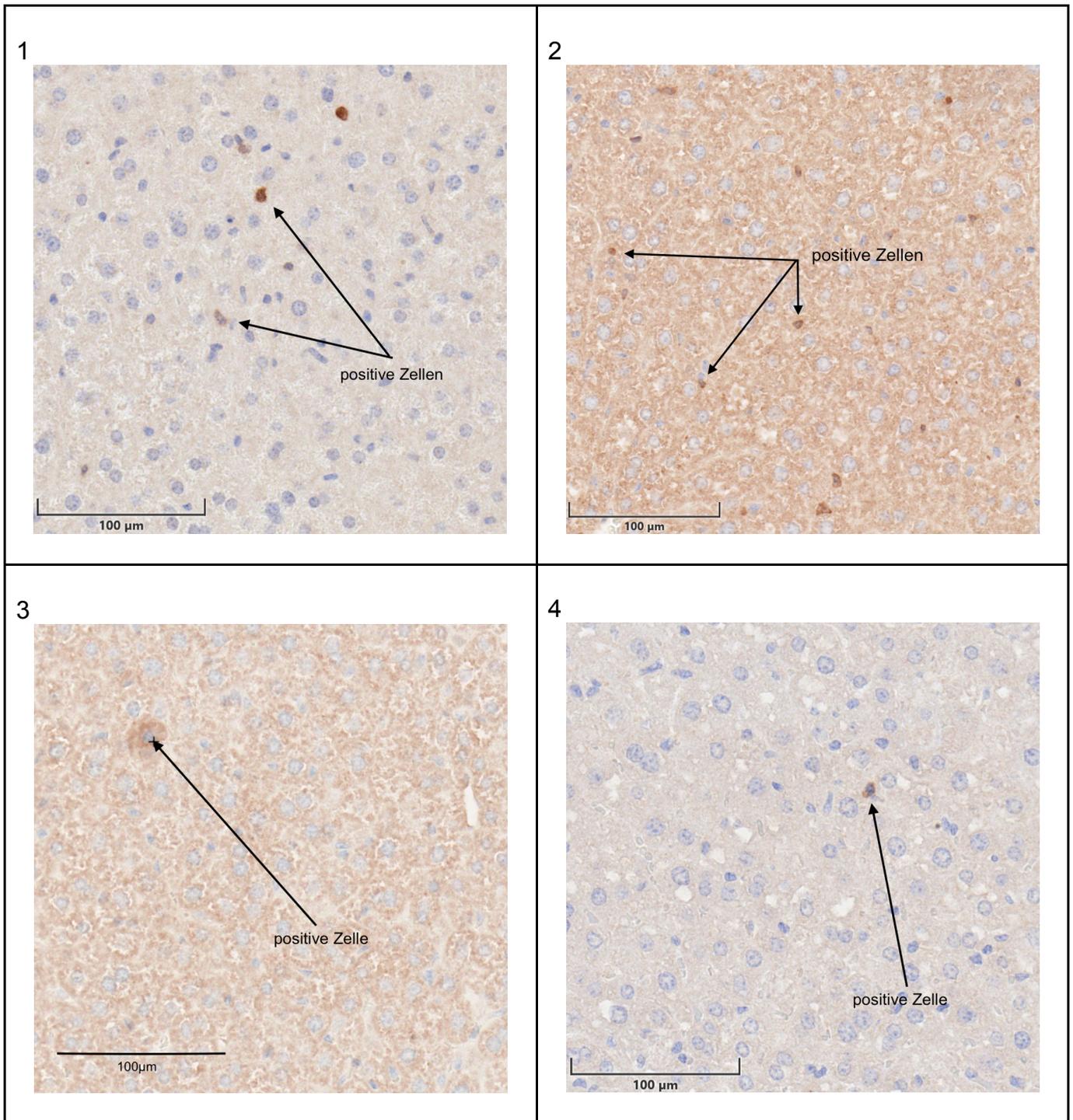


Abb. 21 zeigt Ausschnitte von Leber Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit TNF- α gefärbt wurden. Abb. 21.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 21.2 der MP-Gruppe, Abb. 21.3 der PE-Gruppe und Abb. 21.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Jeweils 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100 μ m

3.2.2. Expression von IL6 in der Leber

In der Expression von IL6 zeigte sich in der Leber im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) ein signifikanter Unterschied in der Metallionen- (MI) ($p < 0,001$) und Polyethylenpartikelgruppe (PE) ($p = 0,004$). Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,002$) zwischen der Metallionen- (MI) und Metallpartikelgruppe (MP).

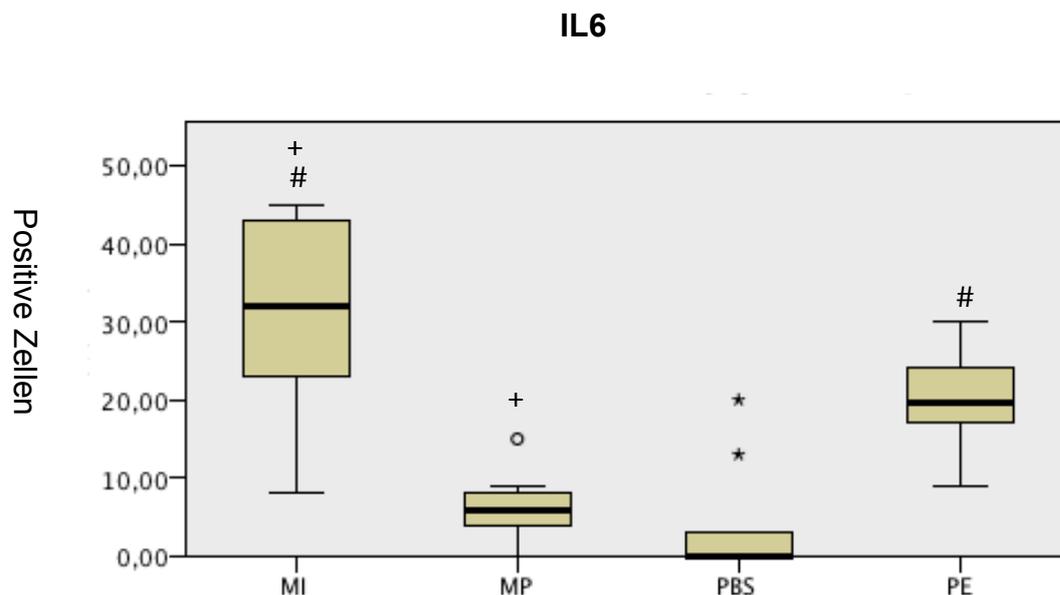


Abb. 22 zeigt die signifikant vermehrte Expression von IL6 in der Leber in der Metallionen- (MI) ($p < 0,001$) und Polyethylenpartikelgruppe (PE) ($p = 0,004$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,002$) zwischen der Metallionen- (MI) und Metallpartikelgruppe (MP).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

° = milder Ausreißer

* = extremer Ausreißer

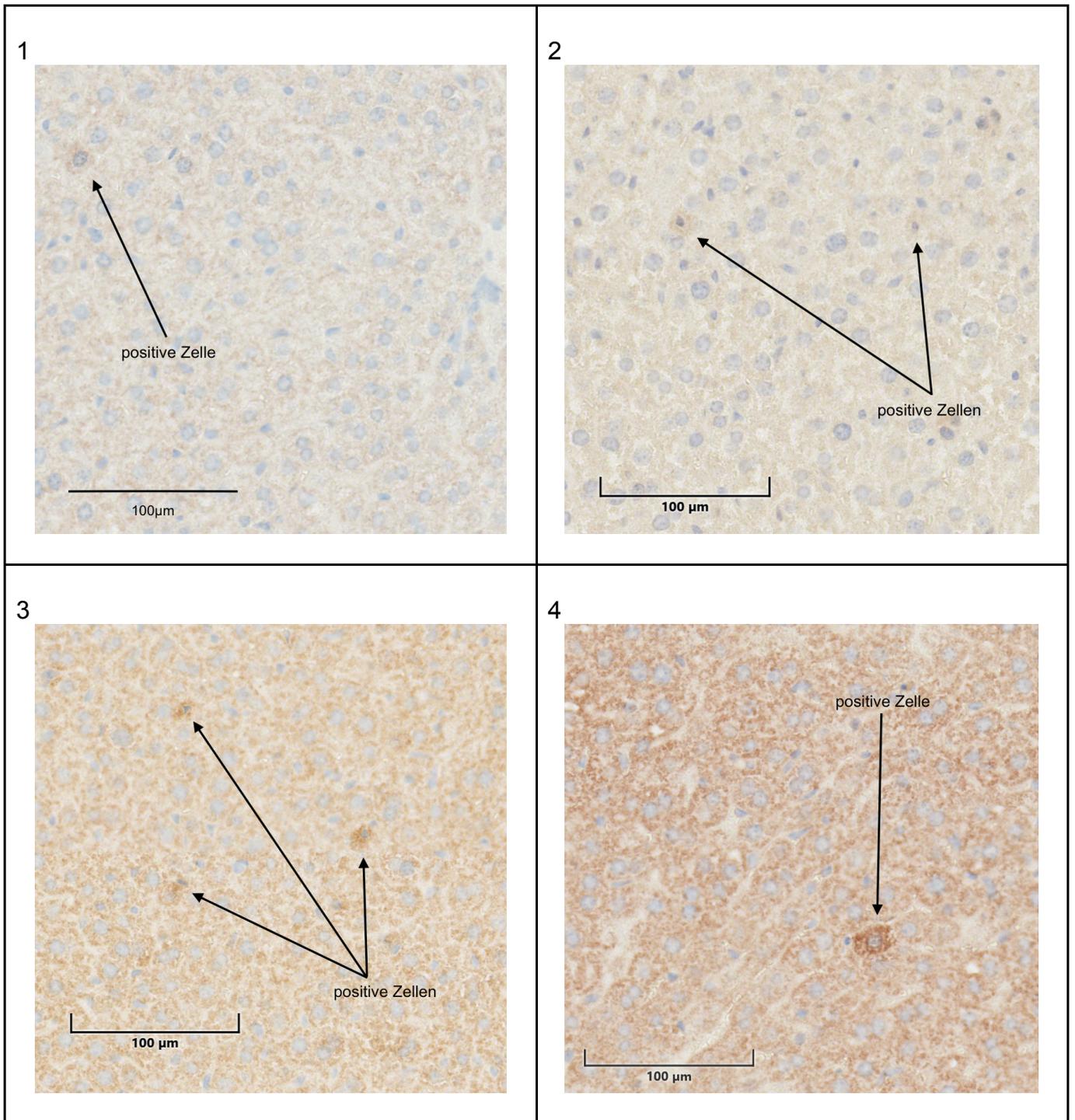


Abb. 23 zeigt Ausschnitte von Leber Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL6 gefärbt wurden. Abb. 23.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 23.2 der MP-Gruppe, Abb. 23.3 der PE-Gruppe und Abb. 23.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Jeweils 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100µm

3.2.3. Expression von IL1 β in der Leber

In der Leber zeigte sich in der Expression von IL1 β ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) in der Polyethylenpartikelgruppe (PE) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander ergab sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Polyethylenpartikel- (PE) und der Metallionengruppe (MI) ($p = 0,041$) und zwischen der Polyethylenpartikel- und der Metallpartikelgruppe (MP) ($p = 0,045$).

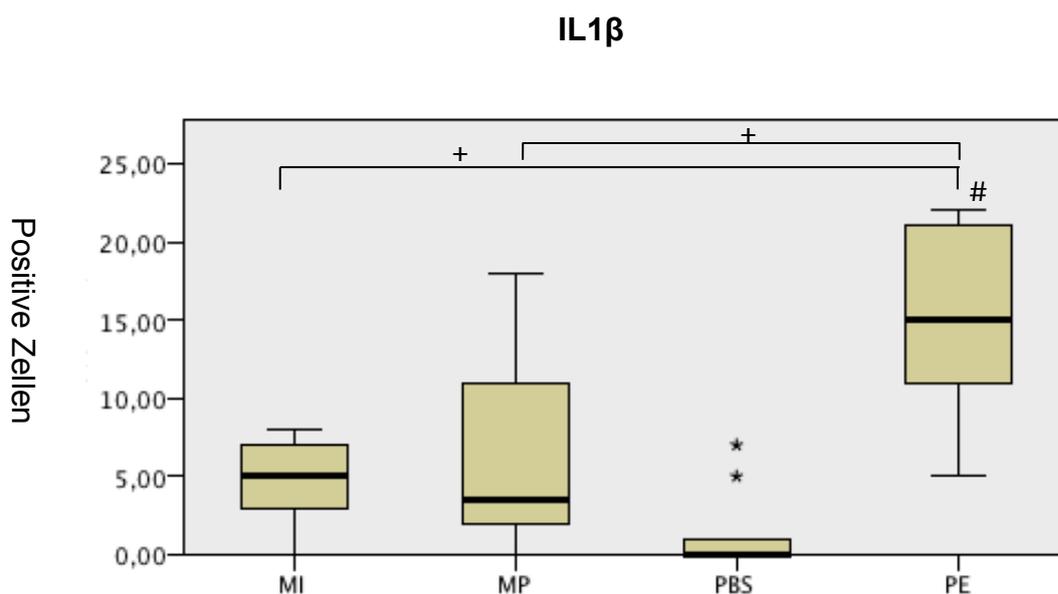


Abb. 24 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p < 0,001$) von IL1 β in der Leber in der Polyethylengruppe (PE) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Metallionen- (MI) und der Polyethylengruppe (PE) ($p = 0,041$) und zwischen der Metallpartikel- (MP) und der Polyethylengruppe (PE) ($p = 0,045$).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

* = extremer Ausreißer

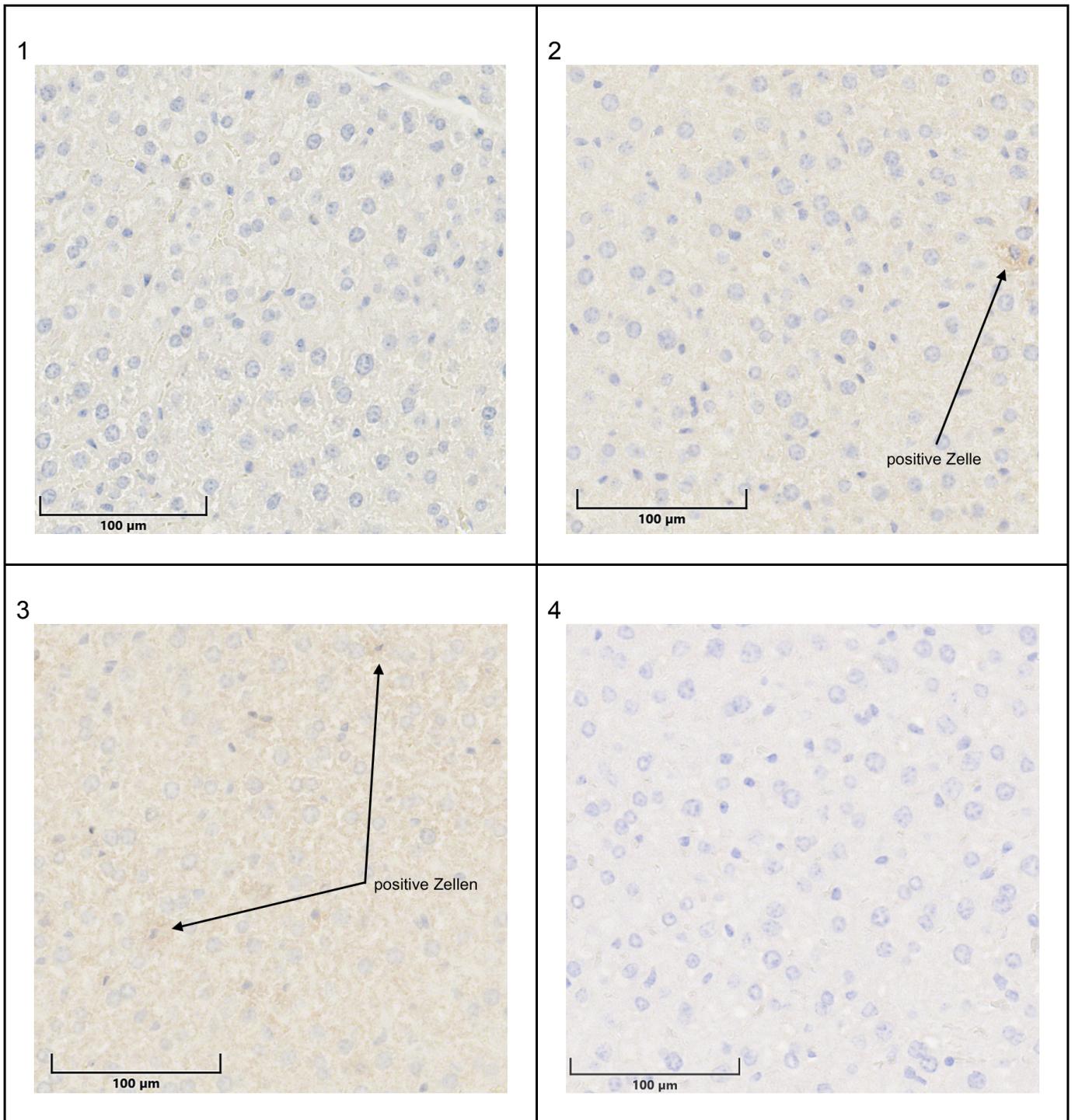


Abb. 25 zeigt Ausschnitte von Leber Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL1 β gefärbt wurden. Abb. 25.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 25.2 der MP-Gruppe, Abb. 25.3 der PE-Gruppe und Abb. 25.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Jeweils 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100 μ m

3.3. Milz

3.3.1. Expression von IL6 in der Milz

In der Milz zeigte sich in der Expression von IL6 ein signifikanter Unterschied ($p = 0,027$) in der Metallpartikelgruppe (MP) im Vergleich zu Kontrollgruppe (PBS). Im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Metallionen- (MI) und Polyethylenpartikelgruppe (PE) ($p = 0,03$) und zwischen der Metallpartikel- (MP) und Metallionengruppe (MI) ($p = 0,002$).

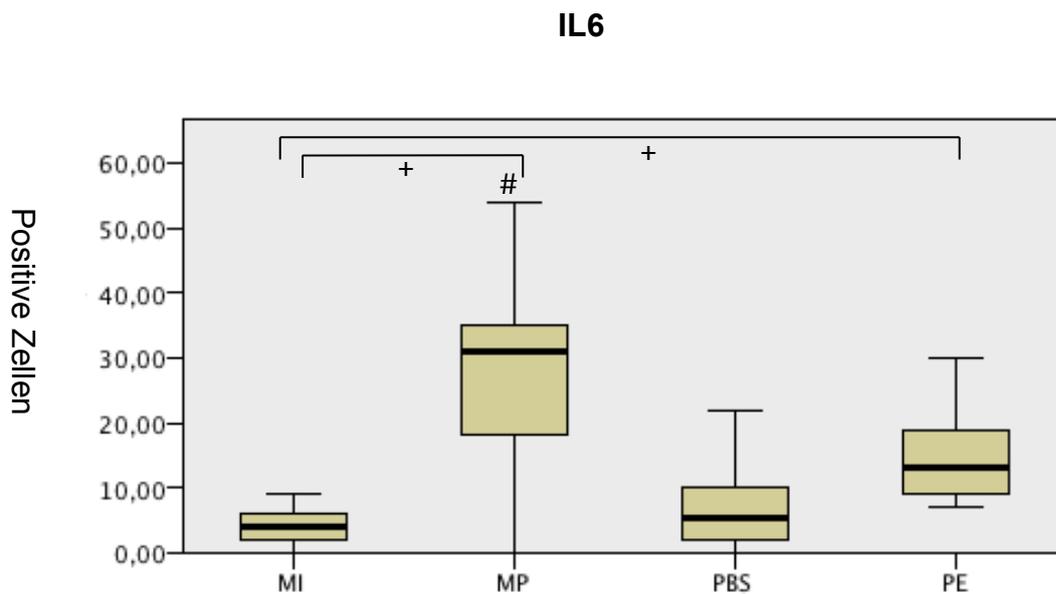


Abb. 26 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p = 0,027$) von IL6 in der Milz in der Metallpartikelgruppe (MP) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Metallionen- (MI) und der Polyethylenpartikelgruppe (PE) ($p = 0,03$) und zwischen der Metallpartikel- (MP) und der Metallionengruppe (MI) ($p = 0,002$).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

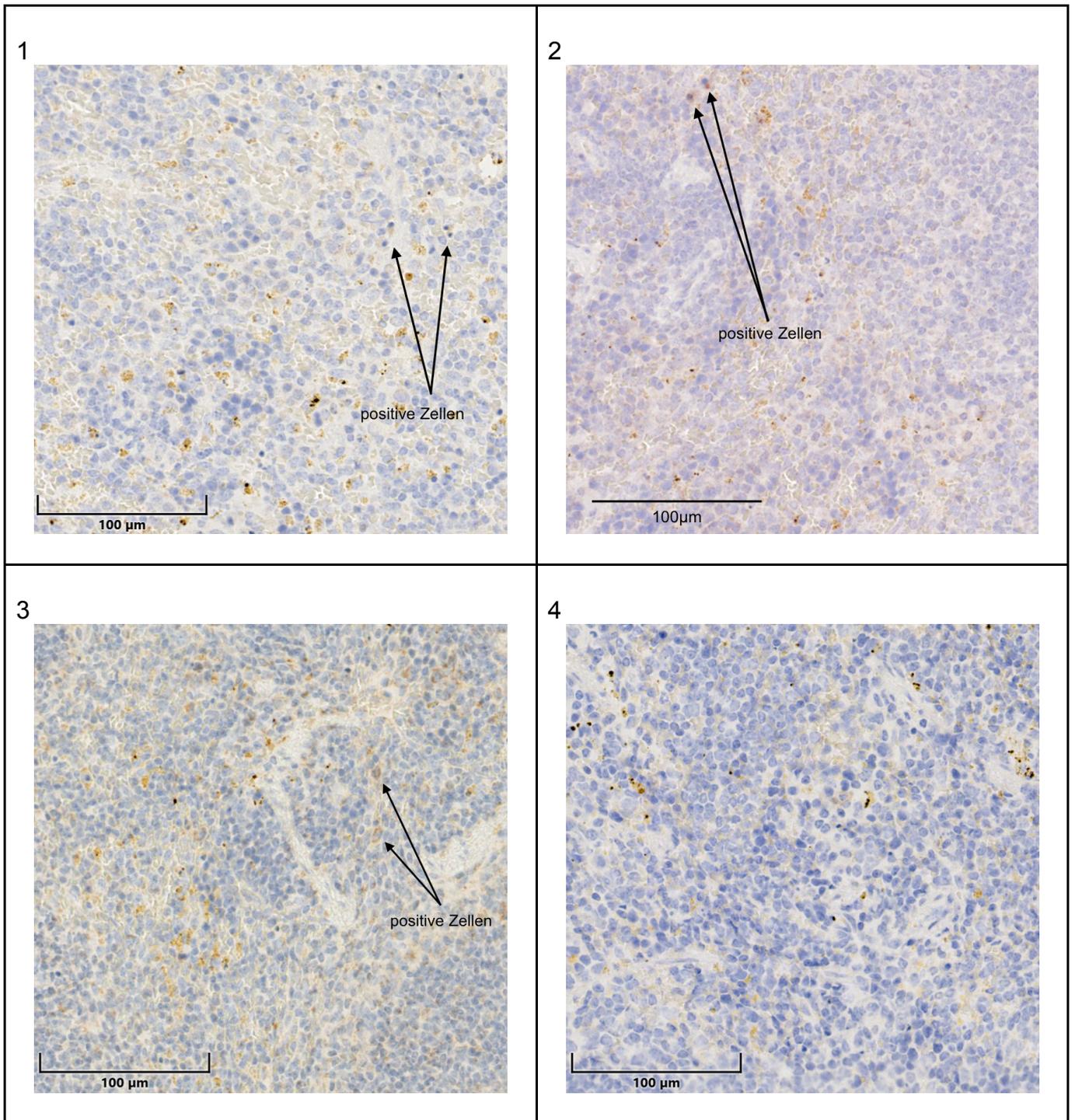


Abb. 27 zeigt Ausschnitte von Milz Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL6 gefärbt wurden. Abb. 27.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 27.2 der MP-Gruppe, Abb. 27.3 der PE-Gruppe und Abb. 27.4 der Kontrollgruppe. In den Abbildungen 27.1-3 wurden beispielhaft einige positive Zellen mit Pfeilen markiert. In Abb. 27.4 sind keine positiven Zellen zu sehen.

Jeweils 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100µm

3.3.2. Expression von IL1 β in der Milz

In der Expression von IL1 β zeigte sich in der Milz ein signifikanter Unterschied ($p = 0,036$) in der Metallionengruppe (MI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander ergab sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,014$) zwischen der Metallpartikel- (MP) und der Metallionengruppe (MI).

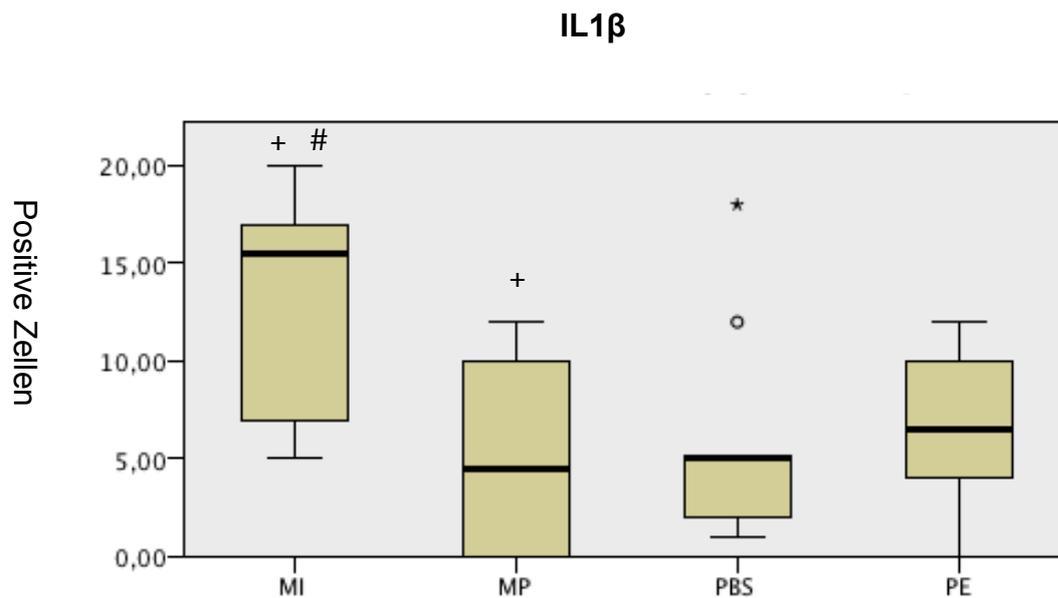


Abb. 28 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p = 0,036$) von IL1 β in der Milz in der Metallionengruppe (MI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Metallpartikel- (MP) und der Metallionengruppe (MI) ($p = 0,014$).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

° = milder Ausreißer

* = extremer Ausreißer

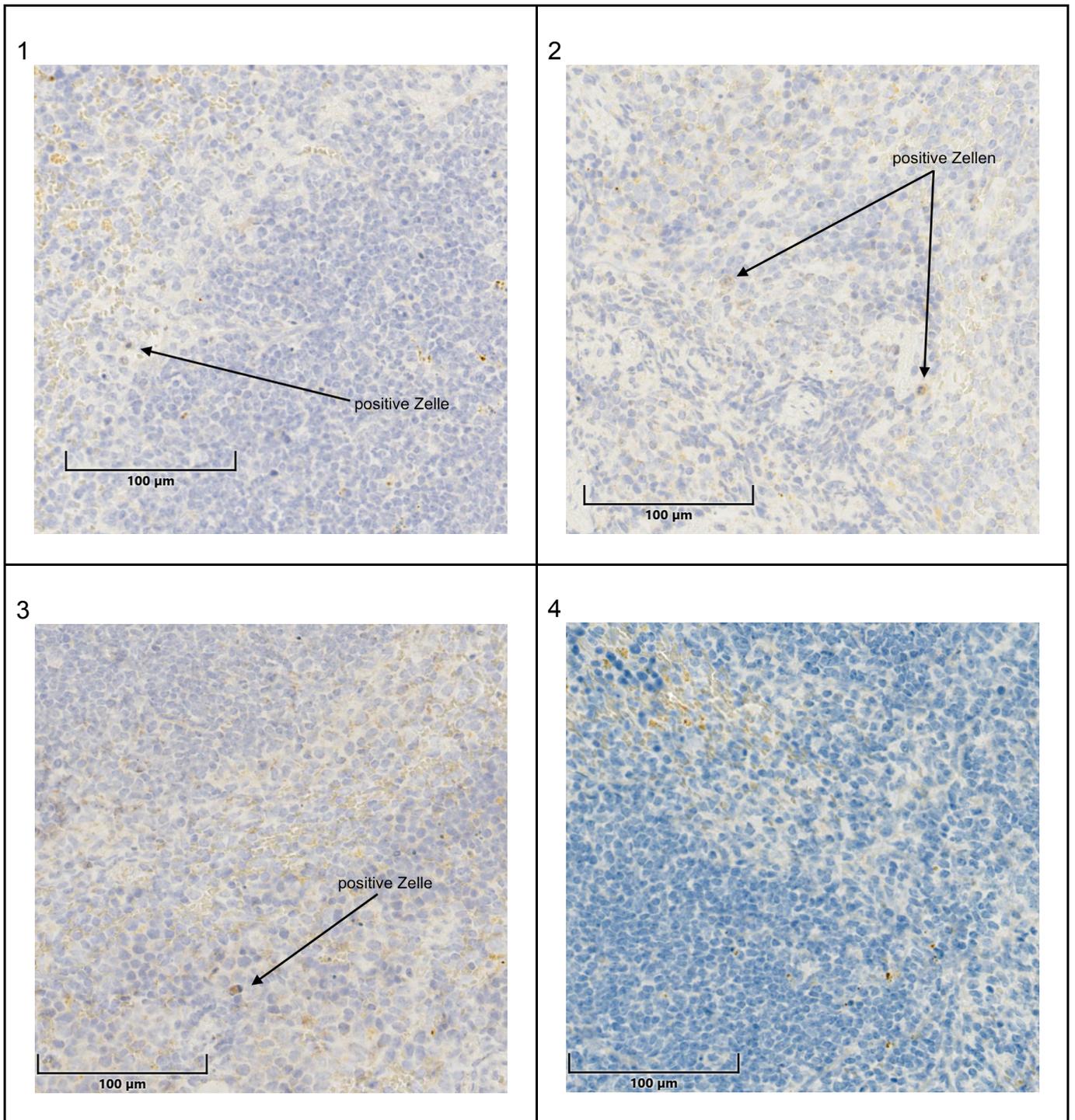


Abb. 29 zeigt Ausschnitte von Milz Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL1β gefärbt wurden. Abb. 29.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 29.2 der MP-Gruppe, Abb. 29.3 der PE-Gruppe und Abb. 29.4 der Kontrollgruppe. In den Abbildungen 29.1-3 wurden beispielhaft positive Zellen mit Pfeilen markiert. In Abb. 29.4 sind keine positiven Zellen zu sehen.

Jeweils 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100µm

3.4. Lunge

3.4.1. Expression von TNF- α in der Lunge

In der Lunge zeigte sich in allen Versuchsgruppen eine Hochregulierung des Zytokins TNF- α . Ein signifikanter Unterschied in der Expression zeigte sich in der Metallionen- (MI) ($p = 0,039$) und Metallpartikelgruppe (MP) ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Im Vergleich der Versuchsgruppen untereinander zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,01$) zwischen der Metallpartikel- (MP) und der Polyethylenpartikelgruppe (PE).

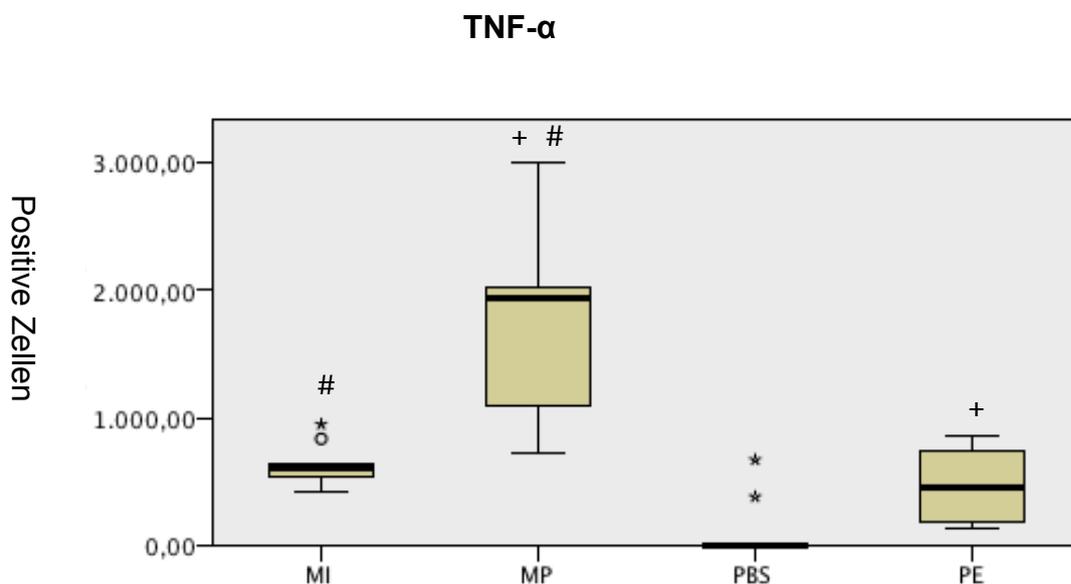


Abb. 30 zeigt die signifikant vermehrte Expression von TNF- α in der Lunge in der Metallionen- (MI) ($p = 0,039$) und Metallpartikelgruppe (MP) ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigte sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,01$) zwischen der Metallpartikel- (MP) und der Polyethylenpartikelgruppe (PE).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

° = milder Ausreißer

* = extremer Ausreißer

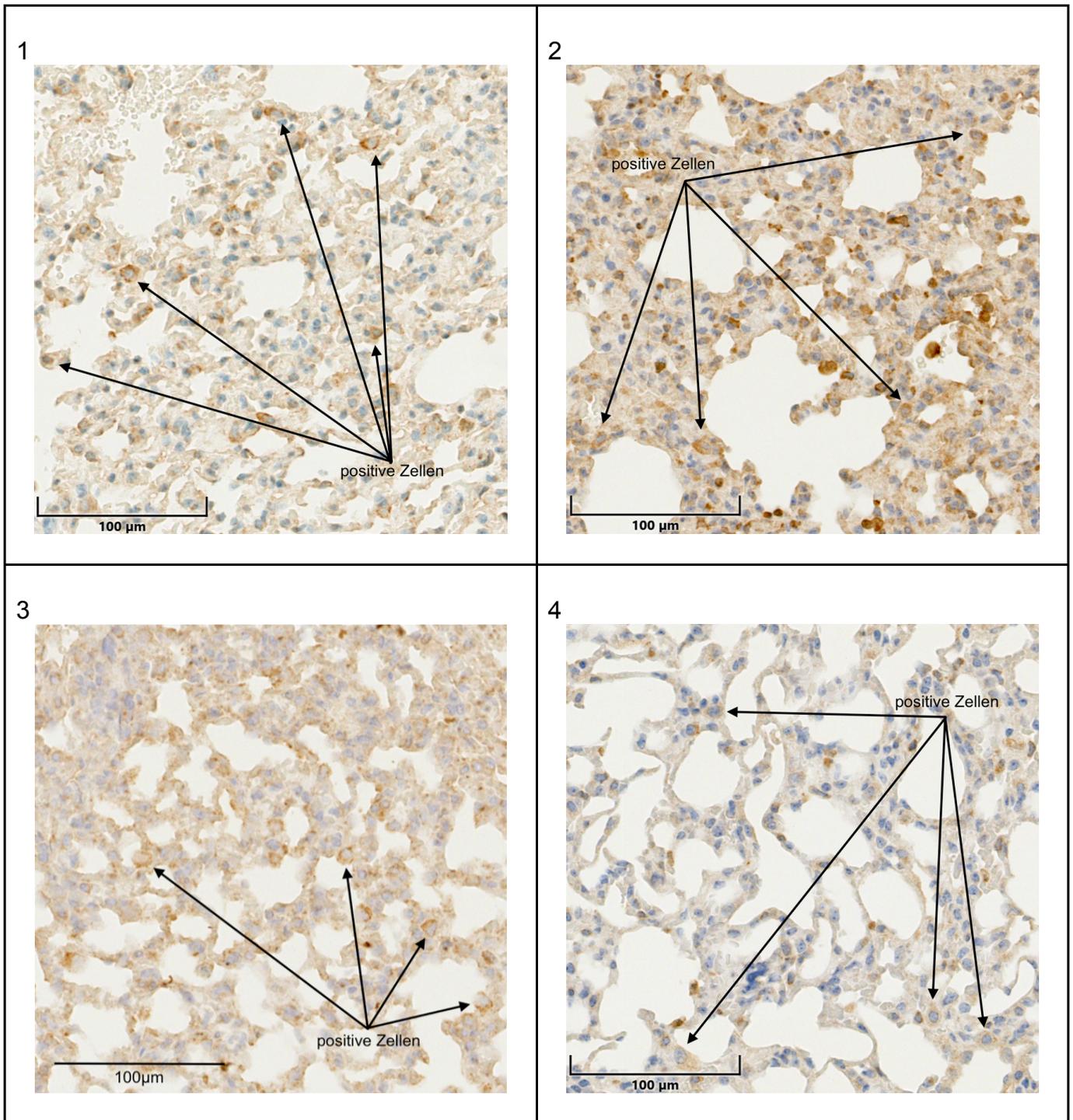


Abb. 31 zeigt Ausschnitte von Lungen Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit TNF- α gefärbt wurden. Abb. 31.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 31.2 der MP-Gruppe, Abb. 31.3 der PE-Gruppe und Abb. 31.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Jeweils 200-fache Vergrößerung, Maßstab im Bild: 100 μ m

4. Diskussion

Die in der Hüftendoprothetik verwendeten Materialien unterliegen unterschiedlichen Abriebmechanismen und Korrosion (Dapunt et al. 2014). Dadurch entstehen in den künstlichen Gelenken Abriebpartikel und lösliche Produkte wie Ionen, die unerwünschte Reaktionen in den Patienten hervorrufen können (Bauer and Shanbhag 2008, Hallab and Jacobs 2009, Merritt and Brown 1996, Otto et al. 2006). Lokal können die Abriebpartikel aus den künstlichen Gelenken in das periprothetische Gewebe gelangen und dort Makrophagen aktivieren (Hallab and Jacobs 2009, Kaddick et al. 2009, Man et al. 2017, Otto et al. 2006). Die aktivierten Makrophagen werden zur Produktion und Sekretion proinflammatorischer Zytokine angeregt, welche eine aseptische Entzündungsreaktion auslösen (Hallab and Jacobs 2009, Kaddick et al. 2009, Man et al. 2017, Otto et al. 2006). Das Ausmaß der proinflammatorischen Reaktion ist dabei von der Zusammensetzung, der Größe, der Form und der Anzahl der Partikel abhängig (Kaddick et al. 2009, Purdue et al. 2006). Die sezernierten Zytokine induzieren zusätzlich die Aktivierung und Differenzierung von Osteoklasten, was zu periprothetischen Osteolysen und letztendlich zu einer aseptischen Prothesenlockerung führen kann (Kaddick et al. 2009, Krenn 2013, Man et al. 2017). Die partikelinduzierte Implantatlockerung ist die häufigste Ursache des Prothesenversagens und stellt einen der Hauptgründe für einen Revisionseingriff nach Implantation einer Endoprothese dar (Diehl et al. 2010, Hallab and Jacobs 2009, Landgraeber et al. 2014).

Klinisch bedeutsam ist zusätzlich, dass die Abriebpartikel und Ionen nicht nur aus den Gelenken in das periprothetische Gewebe gelangen können, sondern auch systemisch verteilt werden (Bijukumar et al. 2018, Case et al. 1994, Urban et al. 2000). Metall- und Polyethylenpartikel wurden bei post mortem Analysen in lokalen und weiter entfernten Lymphknoten, in der Leber und der Milz von Patienten mit Gelenkprothesen gefunden (Case et al. 1994, Urban et al. 2000). Die Partikel wurden vermehrt bei Patienten mit Prothesenversagen nachgewiesen (Case et al. 1994, Urban et al. 2000). Bisher konnten noch keine direkten toxischen Effekte durch akkumulierte Partikel im Gewebe gezeigt werden (Bijukumar et al. 2018). Jedoch ist bekannt, dass Patienten mit Metall-Metall- oder Metall-Polyethylen-Prothesen erhöhte Serumkonzentrationen für Cobalt- und Chromionen aufweisen als Patienten ohne Prothesen (Cobb and Schmalzreid 2006, Rasquinha et al. 2006, Savarino et al. 2002). Da die Ionen mit dem Urin über die Nieren ausgeschieden werden, könnte es

bei erhöhten Ionenkonzentrationen oder bei verringerter Nierenfunktion zu einer toxischen Wirkung der Ionen auf das Nierengewebe kommen (Chandran and Giori 2011, Cobb and Schmalzreid 2006, Corradi et al. 2011). Huk et al. konnten in Zellkulturen nachweisen, dass nach Inkubation mit Cobalt- und Chrom-Ionen in Makrophagen Apoptosen und Nekrosen induziert werden (Huk et al. 2004).

Das Ziel dieser Arbeit war es, ein grundlegendes Verständnis für die inflammatorische Reaktion auf Abriebpartikel und Ionen in parenchymatösen Organen zu erhalten. Dafür wurde eine immunhistochemische Analyse der in den murinen Organen Niere, Leber, Milz und Lunge exprimierten proinflammatorischen Zytokine nach Injektion von Partikeln oder Ionen in das murine Kniegelenk durchgeführt.

4.1. Diskussion der Methodik

Die in dieser Arbeit verwendeten Gewebeproben stammten von einem in-vivo Maus Modell, bei welchem weiblichen Balb/c-Mäusen Suspensionen aus Partikeln oder Ionen intraartikulär in das Kniegelenk injiziert wurden.

In vielen anderen Studien wurde die biologische Aktivität von Abriebpartikeln und Ionen lediglich in in-vitro Modellen an einzelnen Zellarten untersucht (Catelas et al. 2003, Devitt et al. 2010, Huk et al. 2004, Kwon et al. 2009, Posada et al. 2014, Posada et al. 2015). An der inflammatorischen Reaktion auf Abriebpartikel sind jedoch nicht nur einzelne Zellarten wie Makrophagen, sondern auch andere Zellen wie beispielsweise Lymphozyten beteiligt (Zysk et al. 2003). Deshalb ist das in dieser Arbeit verwendete in-vivo Modell für die Untersuchung der komplexen Vorgänge der Entzündungsreaktion auf Abriebpartikel unter Berücksichtigung der Wechselwirkungen einer Vielzahl von Zellen untereinander und mit dem umgebenden Gewebe den in-vitro Modellen überlegen.

Die Maus wurde als Modellorganismus gewählt, da das Mausgenom seit 2001 vollständig sequenziert wurde und weitestgehend dem des Menschen entspricht (Graw 2015). Die in der Maus ablaufenden biochemischen und physiologischen Abläufe sind gut mit den Abläufen des Menschen vergleichbar (Graw 2015).

Das Kniegelenk wurde als Gelenk gewählt, weil es für die Injektion der verschiedenen Suspensionen gut zugänglich ist. Im Vergleich zu anderen in-vivo Studien (Afolaranmi et al. 2012, Burian et al. 2006, Jakobsen et al. 2007, Liu et al.

2010) wirken die Partikel durch die intraartikuläre Injektion am gleichen Ort, an dem sie bei Patienten mit Gelenkprothesen freigesetzt werden und von dort systemisch verteilt werden können. Die Partikel befinden sich nach Injektion somit intraartikulär in Kontakt mit der Synovialflüssigkeit, den Zellen, Molekülen und Proteinen, die die Partikel transportieren.

Ein anderes in-vivo Modell zur Untersuchung der systemischen Verteilung von Metallpartikeln und zusätzlich zur Messung von Metallkonzentrationen im Blut, ist das von Afolaranmi et al. genutzte Modell (Afolaranmi et al. 2012). Dabei wurden bei Mäusen subkutan am Rücken, durch Injektion steriler Luft, eine Rückenluftkammer gebildet und in diese Luftkammer wurde eine Suspension mit Co-Cr-Partikeln injiziert (Afolaranmi et al. 2012). Zur Simulation der systemischen Verteilung von Abriebpartikeln aus Gelenkprothesen ist dieses Modell nur begrenzt aussagekräftig, da die Partikel hier nicht aus dem Gelenk, sondern ausgehend vom Subkutangewebe verteilt werden.

Burian et al. verwendeten ein weiteres Modell zur in-vivo Analyse der systemischen Verteilung von Metallpartikeln (Burian et al. 2006). Dabei wurden bei Goldhamstern künstliche Rückenhautkammern gebildet, in welche Edelstahl- oder Titanpartikel implantiert wurden und daraufhin die systemische Verteilung der Partikel in die parenchymatösen Organe Herz, Lunge, Leber und Milz und Blutproben untersucht wurden (Burian et al. 2006). Dieses Modell ist ebenso nur bedingt geeignet, um Aussagen über die systemische Verteilung von Abriebpartikeln von Gelenkprothesen zu treffen, da die Partikel ausgehend von einem anderen Ort transportiert werden.

Ein weiteres in der Literatur beschriebene in-vivo Modell ist das von Jakobsen et al. verwendete Modell (Jakobsen et al. 2007). Dabei wurden Ratten Drähte aus einer Co-Cr-Mo Legierung in den Musculus gastrocnemius des linken Beines oder intraperitoneal für neun Monate implantiert und anschließend die Metallkonzentrationen in der Leber und Niere gemessen (Jakobsen et al. 2007). Auch bei diesem Modell ist die Aussagekraft zu diskutieren, da die implantierten Drähte nicht im Gelenk sondern intramuskulär oder intraperitoneal implantiert wurden.

Liu et al. untersuchten mit einem weiteren Modell die Toxizität von Cobalt-Ionen, die durch Korrosion der Gleitpartner der Metallprothesen und der Abriebpartikel entstehen können (Liu et al. 2010). Bei diesem Modell wurden Mäusen täglich Cobalt-Ionen über einen Zeitraum von drei Wochen intraperitoneal injiziert. Zu

unterschiedlichen Zeitpunkten wurden die Serumionenkonzentrationen gemessen und nach drei Wochen die Organe Leber, Niere und Herz makro- und mikroskopisch untersucht (Liu et al. 2010). Dieses Modell ist geeignet, um die Toxizität der Ionen zu untersuchen. Ob das Modell zur Simulation der systemischen Effekte der Metallionen, die durch die Oberflächenmaterialien von Gelenkprothesen entstehen, geeignet ist, bleibt fraglich, da die Ionen primär intraperitoneal injiziert wurden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass das in dieser Arbeit verwendete Modell am ehesten zur Simulation der systemischen Verteilung von Abriebpartikeln und Ionen geeignet ist. Da die untersuchten Partikel und Ionen intraartikulär injiziert wurden und sich dadurch im gleichen Umgebungsmilieu wie bei Patienten mit künstlichen Gelenken befanden. Dadurch lassen sich gute Vergleiche über die systemische inflammatorische Aktivität der Partikel und Ionen ziehen. Zusätzlich wurde das in dieser Arbeit verwendete Modell bereits in vielen weiteren Studien angewandt (Ebinger 2019, Lorber et al. 2014, Paulus et al. 2019, Utzschneider 2010, Utzschneider et al. 2010, Utzschneider et al. 2014) und stellt ein seit vielen Jahren bewährtes Modell zur Untersuchung der inflammatorischen Reaktion auf Abriebpartikel dar.

In dieser Arbeit wurde ein Zeitraum von sieben Tagen zwischen Partikel- und Ioneninjektion und Entnahme der Organe gewählt. Dieses Zeitfenster wurde bereits in dem von Zysk et al. etablierten Inflammationsmodell als optimaler Zeitraum festgelegt (Zysk et al. 2003). Afolaranmi et al. untersuchten die Metallpartikelverteilung in unterschiedliche Organe und konnten einen Anstieg der Metallkonzentrationen mit einem Maximum nach zwei bis drei Tagen nachweisen, zu späteren Zeitpunkten waren die Werte hingegen wieder fallend (Afolaranmi et al. 2012). In der Literatur werden zur Analyse der systemischen Verteilung von Partikeln und Ionen aber auch Zeiträume zwischen zwei und drei Wochen, bis zu neun Monaten genannt (Burian et al. 2006, Jakobsen et al. 2007, Liu et al. 2010). Metallionen werden innerhalb von 48 Stunden fast vollständig über die Nieren aus dem Körper eliminiert (Merritt and Brown 1996), was den Kurzzeitcharakter der Arbeit zur Analyse der systemischen Reaktion auf Abriebpartikel und Ionen unterstützt. In zahlreichen in-vitro Studien (Catelas et al. 2003, Dalal et al. 2012, Devitt et al. 2010, Huk et al. 2004, Posada et al. 2014) konnten bereits nach 24 bis 48 Stunden unterschiedliche Reaktionen wie erhöhte Zytokinsekretion, Zelltod oder

verringerte Lebensfähigkeit der Zellen nach Inkubation mit Partikeln oder Ionen nachgewiesen werden.

Die in dieser Arbeit verwendeten Polyethylenpartikel hatten einen Durchmesser von 1,07 µm und zeigten sich morphologisch als runde bis granuläre Partikel. Bei in der Literatur beschriebenen Partikelanalysen findet man Größenangaben der PE-Partikel von unter 1 µm bis mehrere 100 µm (Baxter et al. 2013, Catelas et al. 2011, Otto et al. 2006) und die Partikel werden als rund bis nadelförmig beschrieben (Catelas et al. 2011).

Die verwendeten Metallpartikel hatten eine mittlere Größe von 61,25nm ±18,47nm und waren überwiegend oval (49%) und rund (44%), ein kleiner Anteil war nadelförmig (7%) (Kretzer). In der Literatur werden Metallpartikel im Nanometer-Bereich meistens unter 100 nm bis 500 nm groß beschrieben (Catelas et al. 2011, Espallargas et al. 2017, Kovochich et al. 2018, Madl et al. 2015, Wang et al. 2017). Die zum Großteil runde und ovale Form und wenig nadelförmige Partikel stimmt mit den in anderen Studien beschriebenen Formen überein (Catelas et al. 2011, Crainic et al. 2020, Wang et al. 2017).

Basierend auf dem von Zysk et al. etablierten Inflammationsmodell wurde eine Partikelkonzentration von 0,1 Vol.-% gewählt (Zysk et al. 2003).

Die gewählte Metallionenkonzentration sollte möglichst nah an der in Patienten mit MoM Hüftprothesen gemessenen Konzentration liegen. Hierfür orientierten wir uns an der von De Smet et al. gemessenen Metallionenkonzentration der Synovialflüssigkeit, welche während Revisionsoperationen gewonnen wurde (De Smet et al. 2008). Hier zeigte sich eine mediane Chromionenkonzentration von 201 µg/l und eine mediane Cobaltionenkonzentration von 235 µg/l (De Smet et al. 2008). In der Arbeitsgruppe wurde sich für eine Ionenkonzentration von 200 µg/l in PBS gelöst, entschieden.

Als Limitation dieser Arbeit sind die nur einmalige Partikel- und Ioninjektion und der kurze Beobachtungszeitraum zu nennen. Es ist zu beachten, dass bei Patienten mit Gelenkprothesen Abriebpartikel und Ionen kontinuierlich durch verschiedene Abriebmechanismen und Korrosion über mehrere Jahre entstehen (Burian et al. 2006, Jacobs et al. 2006, Otto et al. 2006) und die systemische Verteilung und Reaktion auf die Partikel und Ionen über einen längeren Zeitraum abläuft.

Dieses Studienmodell soll zum grundlegenden Verständnis der systemischen Reaktion auf Abriebpartikel und Ionen beitragen. Deshalb wird in dieser Arbeit nur der einmalige Prozess untersucht, den die Partikel und Ionen in murinen parenchymatösen Organen innerhalb einer kurzen Zeitspanne auslösen. Es ist mit Sicherheit sinnvoll, eine Studie mit mehrmaliger Partikel- und Ioneninjektion und längeren Beobachtungszeiträumen zu planen und gegebenenfalls auch unterschiedliche Partikel- und Ionenkonzentrationen zu untersuchen. Für die Untersuchung der Zytokinfreisetzung in Bezug auf eine inflammatorische Reaktion auf Partikel und Ionen in den Organen, sollte diese Studie mit Kurzzeitcharakter ausreichend sein.

In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass Metall- und Polyethylenpartikel von Gelenkprothesen systemisch verteilt werden (Bauer et al. 1993, Case et al. 1994, Gray et al. 1989, Urban et al. 2000). Die Partikel konnten vor allem bei Patienten mit Prothesenversagen in Leber und Milz nachgewiesen werden (Case et al. 1994, Urban et al. 2000).

In mehreren in-vivo Studien konnten in den für diese Arbeit ausgewählten Organen erhöhte Metallkonzentrationen nach Exposition mit Metallpartikeln nachgewiesen werden (Afolaranmi et al. 2012, Burian et al. 2006, Jakobsen et al. 2007). Afolaranmi et al. konnten in einer in-vivo Studie nach Implantation von Co-Cr-Partikeln in eine Rückenluftkammer von Mäusen zeigen, dass es zu erhöhten Cobalt- und Chromspiegeln in der Niere, Leber, Milz und Lunge führt (Afolaranmi et al. 2012). Burian et al. implantierten Goldhamstern Metallpartikel in eine künstlich hergestellte Rückenhautfalte (Burian et al. 2006). Nach 14 Tagen wurden in den Organen Leber, Lunge, Milz und Herz zur quantitativen Elementanalyse mittels Massenspektrometrie erhöhte Chromwerte gemessen (Burian et al. 2006). Licht- und elektronenmikroskopisch konnten in den Organen keine Partikel nachgewiesen werden. Die Nieren wurden jedoch in dieser Studie nicht untersucht (Burian et al. 2006). Jakobsen et al. konnten nach intramuskulärer Implantation von Co-Cr-Mo Drähten in den Musculus gastrocnemius des linken Beines von Ratten nach neun Monaten erhöhte Werte für Molybdän in der Niere und Leber und für Chrom in der Leber nachweisen (Jakobsen et al. 2007).

In einer von Devitt et al. durchgeführten in-vitro Studie wurden Zellen unterschiedlicher Organsysteme mit Cobalt-Ionen in Zellkultur inkubiert (Devitt et al. 2010). In den Epithelzellen proximaler Nierentubuli und in den Epithelzellen des Respirationstrakts kam es nach Inkubation mit Cobalt-Ionen zu einer erhöhten Sekretion proinflammatorischer Chemokine (Devitt et al. 2010).

Die Analyse der Nieren ist von Bedeutung, da die von den Abriebpartikeln und Oberflächen der Gelenkprothesen freigesetzten Metallionen mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden werden (Chandran and Giori 2011, Cobb and Schmalzreid 2006, Corradi et al. 2011, Daniel et al. 2010, Merritt and Brown 1996). Dabei wird Cobalt innerhalb von 48 Stunden und Molybdän innerhalb von 24 Stunden fast vollständig aus dem Körper eliminiert (Merritt and Brown 1996). Chrom hingegen wird nicht so schnell aus dem Körper transportiert und kann dadurch im Körper akkumulieren (Merritt and Brown 1996). Tiusanen et al. konnten zeigen, dass es ein und zwei Jahre postoperativ nach Implantation einer Metall-Metall- oder Metall-Polyethylen-Prothese zu erhöhten Cobalt- und Chrom-Werten im Urin kommt (Tiusanen et al. 2013). Obwohl die Metallionen über die Nieren wieder aus dem Körper ausgeschieden werden, bleibt es jedoch fraglich, ob es bei erhöhtem Anfall von Ionen durch vermehrten Abrieb oder einer verringerten Nierenfunktion zu entzündlichen Reaktionen oder toxischen Gewebeschäden kommt. Deshalb wurden in dieser Studie neben den anderen genannten Organen auch die Reaktion der Nieren auf die unterschiedlichen Partikel und Ionen untersucht.

Zusammenfassend ist es sinnvoll, die in dieser Studie ausgewählten parenchymatösen Organe Niere, Leber, Milz und Lunge zu untersuchen. Es wurden bereits in mehreren Studien die Verteilung von Abriebpartikeln und erhöhte Metallkonzentrationen in diesen Organen nachgewiesen (Afolaranmi et al. 2012, Burian et al. 2006, Case et al. 1994, Urban et al. 2000). Besonders die Analyse der Reaktion der Nieren ist von Bedeutung, da Metallionen mit dem Urin über die Nieren eliminiert werden (Chandran and Giori 2011, Cobb and Schmalzreid 2006, Corradi et al. 2011, Daniel et al. 2010, Keegan et al. 2007, Merritt and Brown 1996).

Patienten mit eingeschränkter Nierenfunktion sollten keine Metall-Metall-Prothesen implantiert werden, da es zu erhöhten und gegebenenfalls toxischen Serummetallkonzentrationen kommen könnte (Chandran and Giori 2011, Daniel et al. 2010).

In weiteren Studien wäre es sinnvoll, zusätzlich zur immunhistochemischen Analyse der Organe, die Metallkonzentrationen im Serum und Urin zu messen, um eine Korrelation zwischen entzündlicher Aktivität in den Organen und erhöhten Serum- und Urinwerten zu untersuchen. Die zusätzliche morphologische Analyse der Gewebe auf mikroskopische Veränderungen durch Partikel oder Ionen mittels HE-Färbung wäre gegebenenfalls ein weiterer interessanter Aspekt. Zusätzlich müssten die Konzentrationen der einzelnen Partikel in den Geweben quantifiziert werden, um eine umfassende toxikologische Beurteilung zu erhalten.

Die untersuchten Zytokine sind proinflammatorische Zytokine, die vor allem von Makrophagen und weiteren Zellen wie Lymphozyten, Fibroblasten oder Endothelzellen sezerniert werden und eine Entzündungsreaktion auslösen (de Oliveira et al. 2011, Dinarello 2009, Gadola 2012, Turner et al. 2014). Alle drei Zytokine gelten als frühe Mediatoren der Entzündungskaskade und induzieren die Akute-Phase-Reaktion in der Leber, TNF- α und IL1 β fördern zusätzlich die Sekretion von IL6 (de Oliveira et al. 2011, Dinarello 2009, Gadola 2012, Sedger and McDermott 2014, Turner et al. 2014).

Es ist bekannt, dass Makrophagen nach der Phagozytose von Abriebpartikeln aktiviert und zur Sekretion dieser proinflammatorischen Zytokine angeregt werden (Haddad et al. 2011, Landgraeber et al. 2014, Nich and Goodman 2014).

In zahlreichen in-vitro Studien konnte gezeigt werden, dass es in verschiedenen Zellen zu einer gesteigerten Sekretion der in dieser Arbeit untersuchten Zytokine, nach Inkubation mit Metallpartikeln oder -ionen kommt (Catelas et al. 2003, Dalal et al. 2012, Trindade et al. 2001). Dalal et al. inkubierten in Zellkultur Osteoblasten, Fibroblasten und Makrophagen mit Co-Cr-Mo Partikeln (Dalal et al. 2012). Nach 24 und 48 Stunden kam es in den Makrophagen zu einer erhöhten Sekretion der Zytokine TNF- α und IL1 β (Dalal et al. 2012). In den Osteoblasten kam es zu einer gesteigerten Sekretion von IL6 nach Inkubation mit den Metallpartikeln für 48 Stunden (Dalal et al. 2012). In einer in-vitro Studie von Trindade et al. konnte eine erhöhte Produktion von TNF- α und IL6 durch Makrophagen und Lymphozyten nach Inkubation mit Co-Cr-Partikeln nachgewiesen werden (Trindade et al. 2001). Catelas et al. untersuchten in in-vitro Zellkulturen die TNF- α Sekretion durch Makrophagen

nach Inkubation mit Cobalt- und Chrom-Ionen (Catelas et al. 2003). Es zeigte sich ein von der Konzentration und Inkubationszeit der Ionen abhängiger Anstieg der Sekretion von TNF- α durch die Makrophagen (Catelas et al. 2003).

In weiteren in-vitro Studien zeigte sich, dass neben der Inkubation mit Metallpartikeln oder -ionen, es auch nach Inkubation mit Polyethylenpartikeln zu einer gesteigerten Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL1 β und IL6 kommt (Baumann et al. 2006, Horowitz and Gonzales 1997, Liu et al. 2015, Matthews et al. 2000, Rader et al. 1999). Baumann et al. und Horowitz und Gonzales untersuchten die TNF- α Sekretion makrophagenähnlicher Zelllinien nach Inkubation mit Polyethylenpartikeln (Baumann et al. 2006, Horowitz and Gonzales 1997). In beiden in-vitro Studien zeigte sich eine signifikant erhöhte Sekretion von TNF- α in den Zellkulturen (Baumann et al. 2006, Horowitz and Gonzales 1997). Rader et al. untersuchten in Zellkulturen die Sekretion der Zytokine TNF- α und IL1 β durch Makrophagen nach Inkubation mit Polyethylenpartikeln (Rader et al. 1999). In dieser Studie konnten erhöhte Zytokinwerte mit steigenden Konzentrationen der Polyethylenpartikel nachgewiesen werden (Rader et al. 1999). Matthews et al. untersuchten die Zytokinfreisetzung aus mononukleären Phagozyten nach Inkubation mit Polyethylenpartikeln unterschiedlicher Größe in Zellkultur (Matthews et al. 2000). Es zeigten sich signifikant erhöhte Werte der Zytokine TNF- α , IL1 β und IL6 nach Inkubation der Zellen mit 0,21 μ m und 0,49 μ m großen Polyethylenpartikeln (Matthews et al. 2000). Die Inkubation mit größeren Partikeln erbrachte keine erhöhten Werte der untersuchten Zytokine im Vergleich zur Kontrollgruppe (Matthews et al. 2000). Liu et al. inkubierten unterschiedlich große UHMWPE Partikel mit Phagozyten in in-vitro Zellkulturen und detektierten anschließend die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α , IL1 β und IL6 (Liu et al. 2015). Durch Partikel, die kleiner als 50nm waren, ergaben sich keine erhöhten Zytokinwerte. Eine erhöhte Freisetzung der gemessenen Zytokine ergab sich durch Inkubation mit UHMWPE Partikel, die größer als 50nm und bis zu einem Mikrometer groß waren (Liu et al. 2015).

Zusammenfassend ist es sinnvoll, die genannten Zytokine zur Analyse der inflammatorischen Reaktion der Organe auf Abriebpartikel und Ionen zu untersuchen, da bereits durch zahlreiche Studien die erhöhte Sekretion dieser

Zytokine durch verschiedene Zellarten nach Kontakt mit Polyethylen- und Metallpartikeln, sowie Metallionen nachgewiesen wurde (Baumann et al. 2006, Catelas et al. 2003, Dalal et al. 2012, Horowitz and Gonzales 1997, Liu et al. 2015, Matthews et al. 2000, Rader et al. 1999, Trindade et al. 2001). Zudem ist bereits bekannt, dass es lokal im periprothetischen Gewebe nach Phagozytose von Abriebpartikeln durch Makrophagen zu einer erhöhten Freisetzung dieser Zytokine kommt (Landgraeber et al. 2014, Nich and Goodman 2014) und die untersuchten Zytokine Schlüsselenzyme der Entzündungsreaktion darstellen (de Oliveira et al. 2011, Gadola 2012, Turner et al. 2014).

4.2. Diskussion der Ergebnisse

Die Niere stellt ein wichtiges Organ zur Untersuchung der systemischen Reaktion auf Abriebpartikel und Ionen von Gelenkprothesen dar, da die Metallionen über die Nieren aus dem Körper eliminiert werden (Chandran and Giori 2011, Corradi et al. 2011, Daniel et al. 2010, Jakobsen et al. 2007). Es ist nicht bekannt, ob es eine Nierenschwelle für Metallionen gibt, deshalb können die Ionen bei erhöhtem Anfall oder verringerter Nierenfunktion im Nierengewebe akkumulieren oder zu toxischen Serumwerten führen (Chandran and Giori 2011, Daniel et al. 2010, Jakobsen et al. 2007). Cobalt und Molybdän werden fast vollständig innerhalb von 24 bis 48 Stunden über den Urin ausgeschieden, Chrom dagegen wird langsamer eliminiert und kann deshalb leichter im Körper akkumulieren (Keegan et al. 2007, Merritt and Brown 1996).

In dieser Arbeit kam es in der Niere zu einer signifikant erhöhten Expression aller untersuchter Zytokine (TNF- α : $p < 0,001$, IL-6: $p < 0,001$, IL-1 β : $p = 0,034$) in der Metallionengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe, welche PBS in das Kniegelenk injiziert bekam.

Die vermehrte Expression der proinflammatorischen Zytokine in der Metallionengruppe kann darauf zurückgeführt werden, dass die Metallionen mit dem Urin über die Nieren aus dem Körper eliminiert werden (Chandran and Giori 2011, Jakobsen et al. 2007) und somit in Kontakt mit dem Nierengewebe kommen und dadurch eine entzündliche Antwort auslösen können. Unterstützt wird diese Annahme durch eine von Devitt et al. durchgeführte in-vitro Studie, bei der es nach

Inkubation von Epithelzellen proximaler Nierentubuli mit Cobalt-Ionen zu einer erhöhten Freisetzung proinflammatorischer Chemokine kam (Devitt et al. 2010).

Zusätzlich kam es in dieser Arbeit in der Metallpartikelgruppe zu einer erhöhten Freisetzung von IL6 ($p < 0,001$) und in der Polyethylenpartikelgruppe zu einer gesteigerten Sekretion von TNF- α ($p = 0,008$) in den Nieren im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Es ist somit anzunehmen, dass nicht nur Metallionen, sondern auch metallische und Abriebpartikel aus Polyethylen nach systemischer Verteilung in den Nieren zu entzündlichen Reaktionen führen können. Da es aber nicht zu einer Hochregulierung aller untersuchter Zytokine kam, ist anzunehmen, dass die Metallionen stärker mit dem umgebenden Nierengewebe in Kontakt treten und zu einer entzündlichen Antwort führen, als die Metall- und Polyethylenpartikel. Ebenso könnte es aufgrund der nur einmaligen Partikelinjektion und der Entnahme der Organe nach sieben Tagen bereits zu einem Rückgang der entzündlichen Reaktion auf die Partikel gekommen sein.

Es gab bisher noch keine Studien, die die systemische Reaktion auf Abriebpartikel untersuchten. Lediglich die systemische Verteilung und erhöhte Metallwerte in unterschiedlichen Organen wurden bisher analysiert. Case et al. konnten in post-mortem Analysen bei Patienten mit Gelenkprothesen nachweisen, dass Metallpartikel systemisch verteilt werden und fanden die Partikel in den Nieren innerhalb von Tubulusepithelzellen und im Mesangium (Case et al. 1994). Gewebeveränderungen wie Nekrosen wurden in den Nieren jedoch keine gefunden (Case et al. 1994). Afolaranmi et al. stellten in einer in-vivo Studie fest, dass es nach Injektion von Co-Cr-Partikeln in eine Rückenluftkammer von Mäusen zu erhöhten Cobalt und Chrom Werten in den Nieren kam (Afolaranmi et al. 2012). Die Maximalwerte wurden 72 Stunden nach Partikelinjektion erreicht, danach fielen die Werte wieder (Afolaranmi et al. 2012). Rubio et al. implantierten für zwölf Monate zylinderförmige Co-Cr-Implantate in vorgebohrte Kanäle der Femurkondylen von Ratten (Rubio et al. 2008). Nach einem Beobachtungszeitraum von einem Jahr wurden die Nieren der Versuchstiere auf Spuren der Metalle der verwendeten Implantate untersucht (Rubio et al. 2008). In den Nieren konnten erhöhte Werte für Cobalt und Chrom mittels Massenspektrometrie detektiert werden (Rubio et al. 2008).

Im Hinblick auf die Verwendung von Metalllegierungen als Oberflächenmaterialien der Gleitpartner von Gelenkprothesen ist es von klinischer Relevanz festzustellen, dass die durch Korrosion entstehenden Metallionen, die über die Nieren aus dem Körper eliminiert werden (Chandran and Giori 2011, Jakobsen et al. 2007), im Nierengewebe eine Entzündungsreaktion auslösen können. Dieser Aspekt sollte besonders berücksichtigt werden, wenn Patienten eine eingeschränkte Nierenfunktion vorweisen und es dadurch zur Akkumulation von Ionen im Nierengewebe und zu erhöhten Serumionenkonzentrationen kommen kann.

In der immunhistochemischen Analyse der Leber kam es zu einer erhöhten Expression von TNF- α ($p=0,045$) in der Metallpartikelgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der Polyethylenpartikelgruppe kam es hingegen zu einer Hochregulierung der Sekretion der Zytokine IL1 β ($p<0,001$) und IL6 ($p=0,04$).

Dass es durch die intraartikuläre Injektion von Metall- und Polyethylenpartikeln zu einer systemischen Verteilung der Partikel und zu einer erhöhten Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen in der Leber kommt, ist mit den Ergebnissen verschiedener Studien vereinbar (Afolaranmi et al. 2012, Burian et al. 2006, Case et al. 1994, Dalal et al. 2012, Jakobsen et al. 2007, Langkamer et al. 1992, Liu et al. 2015, Matthews et al. 2000, Rader et al. 1999, Trindade et al. 2001, Urban et al. 2000).

In post-mortem Fallstudien von Case et al. wurden bei Patienten mit Gelenkprothesen Metallpartikel innerhalb von Makrophagen und Kupffer-Zellen in der Leber gefunden (Case et al. 1994). Ebenso konnten Urban et al. die Verteilung von Metall- und Polyethylenpartikeln in die Leber bei post-mortem Analysen nachweisen (Urban et al. 2000). Burian et al. untersuchten in einer in-vivo Studie die systemische Verteilung von Metallpartikeln nach Implantation in eine künstlich hergestellte Rückenluftkammer syrischer Goldhamster (Burian et al. 2006). Nach 14 Tagen konnten mittels Massenspektrometrie erhöhte Chromwerte in der Leber nachgewiesen werden (Burian et al. 2006). Licht- und elektronenmikroskopisch waren jedoch keine Partikel im Lebergewebe nachweisbar (Burian et al. 2006). Afolaranmi et al. untersuchten ebenfalls in einer in-vivo Studie die systemische Verteilung von Co-Cr-Partikeln nach einmaliger Injektion in eine Rückenluftkammer von Mäusen (Afolaranmi et al. 2012). Es ergaben sich erhöhte Werte für Cobalt in

der Leber mit einem Maximum nach zwei Tagen und danach wieder fallenden Werten (Afolaranmi et al. 2012).

Diese Arbeit stellt die erste in-vivo Studie dar, in der die entzündliche Reaktion in Organen auf Abriebpartikel und Ionen aufgrund systemischer Verteilung untersucht wurde.

In den bisher durchgeführten in-vitro Studien konnte bereits die erhöhte Freisetzung der ebenfalls in dieser Arbeit untersuchten Zytokine durch Makrophagen oder mononukleären Zellreihen nach Inkubation mit Metall- oder Polyethylenpartikeln nachgewiesen werden (Dalal et al. 2012, Liu et al. 2015, Matthews et al. 2000, Rader et al. 1999, Trindade et al. 2001).

Die Ergebnisse der in-vitro Studien bekräftigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es durch die systemische Verteilung von Metall- und Polyethylenpartikel zu einer erhöhten Sekretion proinflammatorischer Zytokine und somit zu einer entzündlichen Reaktion in der Leber kommen kann. Außerdem ist bereits bekannt, dass Abriebpartikel von Makrophagen aufgenommen und dadurch aktiviert werden (Haddad et al. 2011, Jacobs et al. 2006, Purdue et al. 2006). In der Leber gibt es leberspezifische Makrophagen, welche als Kupffer-Zellen bezeichnet werden (Lüllmann-Rauch 2015). Diese Kupffer-Zellen und zusätzlich auch die Endothelzellen der Leber sind zur Entfernung von Fremdpartikeln durch Phagozytose befähigt, werden dadurch aktiviert und zur Freisetzung von Zytokinen stimuliert (Lüllmann-Rauch 2015). Dieser Vorgang wurde in der vorliegenden Arbeit simuliert und eine erhöhte Zytokinexpression in der Leber nach intraartikulärer Injektion von Abriebpartikeln nachgewiesen.

Zusätzlich kam es in dieser Arbeit in der Leber zu einer erhöhten Expression des Zytokins IL6 ($p < 0,001$) in der Metallionengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Es ist bereits bekannt, dass Metallionen an Proteine gebunden über den Blutkreislauf systemisch verteilt werden können (Cobb and Schmalzreid 2006, Hallab and Jacobs 2009) und es bei Patienten mit Metall-Metall-Gleitpaarungen zu erhöhten Serumwerten von Cobalt- und Chrom-Ionen kommt (Chen et al. 2014, Engh et al. 2014, Jacobs et al. 2008, Savarino et al. 2002). Zusätzlich werden Metallpartikel, über das lymphatische System zum mononukleären Phagozytensystem, welches früher als retikuloendotheliales System bezeichnet wurde, transportiert. Die transportierten Metallpartikel korrodieren und setzen Metallionen frei (Cobb and

Schmalzreid 2006, Polyzois et al. 2012). Da die Kupffer-Zellen der Leber einen Teil des mononukleären Phagozytensystems darstellen, erscheint es naheliegend, dass neben Metallpartikeln auch Metallionen durch eine systemische Verteilung in die Leber gelangen können (Aumüller et al. 2014, Lüllmann-Rauch 2015).

Jakobsen et al. konnten in einer in-vivo Studie nach intramuskulärer Implantation von Co-Cr-Mo-Drähten in die Beine von Ratten erhöhte Konzentrationen von Chrom- und Molybdän-Ionen in der Leber nachweisen (Jakobsen et al. 2007). Diese Studie zeigt somit, dass Metallionen aus Metalllegierungen freigesetzt werden und nach systemischer Verteilung in der Leber akkumulieren können (Jakobsen et al. 2007).

Da es in der Leber vor allem zu einer Hochregulierung der gemessenen Zytokine durch die intraartikuläre Injektion von Abriebpartikeln kam und in der Metallionengruppe nur eine erhöhte Sekretion von IL6 gefunden wurde, ist davon auszugehen, dass vor allem die Partikel durch eine systemische Verteilung in die Leber gelangen und dort inflammatorische Prozesse auslösen können.

In mehreren Studien wurde bereits nachgewiesen, dass Metallpartikel durch systemische Verteilung in die Milz gelangen können (Afolaranmi et al. 2012, Burian et al. 2006, Case et al. 1994, Urban et al. 2000).

Case et al. fanden in post-mortem Untersuchungen bei Patienten mit orthopädischen Implantaten Metallpartikel in der Milz (Case et al. 1994). Die Partikel befanden sich größtenteils intrazellulär in Makrophagen. Die Metallpartikel waren auch innerhalb von Lymphknoten zu finden wobei die höchste Konzentration an Partikel in den Lymphknoten nachgewiesen wurde, die das mit einem Implantat versorgte Gelenk drainierten. In den weiter entfernten Lymphknoten kam es zu niedrigeren Konzentrationen an Partikel (Case et al. 1994).

Ebenso konnten Urban et al. in post-mortem Analysen von Patienten mit Hüft- oder Kniegelenksprothesen Metallpartikel in der Milz nachweisen (Urban et al. 2000).

In einer in-vivo Studie von Afolaranmi et al. kam es bei Mäusen zu erhöhten Cobalt Werten in der Milz nach einmaliger Injektion von Co-Cr-Partikeln in künstlich hergestellte Rückenluftkammern (Afolaranmi et al. 2012). Die Cobalt Werte stiegen zwei Tage nach Partikelinjektion maximal an und sanken nach sieben Tage wieder auf die gleichen Werte wie in der Kontrollgruppe (Afolaranmi et al. 2012).

Burian et al. untersuchten ebenfalls die systemische Verteilung von Metallpartikeln, indem sie Goldhamstern einmalig Metallpartikel in eine künstlich hergestellte Rückenhautfalte implantierten (Burian et al. 2006). Nach 14 Tagen konnten mittels Massenspektrometrie in der Milz erhöhte Werte für Chrom nachgewiesen werden (Burian et al. 2006).

In einer weiteren Studie von Rubio et al. kam es nach einem Beobachtungszeitraum von zwölf Monaten zu erhöhten Konzentration von Chrom in der Milz, nach Implantation von Co-Cr-Zylindern in vorgebohrte Kanäle der Femurkondylen von Ratten (Rubio et al. 2008).

Diese Studien zeigen ebenso wie die vorliegende Arbeit, dass Metallpartikel durch eine systemische Verteilung in die Milz gelangen können.

In dieser Arbeit wurde die inflammatorische Reaktion muriner parenchymatöser Organe auf Abriebpartikel und Ionen untersucht. Bisher gab es nur in-vitro Studien zur Analyse der entzündlichen Reaktion monozytärer Zelllinien auf Abriebpartikel und Ionen (Caicedo et al. 2010, Trindade et al. 2001).

Caicedo et al. inkubierten monozytäre Zellen mit Co-Cr-Mo Partikeln in in-vitro Zellkulturen. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden kam es zu einer erhöhten Expression der proinflammatorischen Zytokine IL6, IL1 β und TNF- α (Caicedo et al. 2010).

Ebenso kam es in einer anderen in-vitro Studie von Trindade et al. zu einer erhöhten Sekretion der Zytokine IL6 und TNF- α durch Makrophagen, die für 48 Stunden mit CoCr-Partikeln in Zellkultur inkubiert wurden (Trindade et al. 2001).

Die Ergebnisse der genannten Studien unterstützen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass es durch die systemische Verteilung von Metallpartikeln in die Milz zu einer erhöhten Zytokinexpression und einer damit verbundenen inflammatorischen Reaktion kommen kann.

Zusätzlich kam es in dieser Arbeit in der Milz zu einer erhöhten Expression des Zytokins IL1 β ($p=0,036$) in der Metallionengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Wie bereits im vorausgehenden Abschnitt erwähnt, ist es bekannt, dass Metallionen an Plasmaproteine gebunden über den Blutkreislauf systemisch verteilt werden können und es durch Korrosion von systemisch verteilten Metallpartikel zu einer Freisetzung von Metallionen kommen kann (Cobb and Schmalzreid 2006, Hallab and Jacobs 2009, Polyzois et al. 2012). Außerdem wurden in mehreren klinischen

Studien bei Patienten mit Metall-Metall- und Metall-Polyethylen-Prothesen erhöhte Serumwerte für Metallionen nachgewiesen und damit die Annahme bestätigt, dass es über den Blutkreislauf zu einer systemischen Verteilung von Metallionen kommen kann (Chen et al. 2014, Engh et al. 2014, Jacobs et al. 2008, Savarino et al. 2002). In verschiedenen in-vitro Studien wurde bereits nachgewiesen, dass es durch die Inkubation von monozytären Zellreihen mit Metallionen zu einer erhöhten Freisetzung proinflammatorischer Zytokine kommen kann (Caicedo et al. 2009, Caicedo et al. 2010).

Durch diese Arbeit und die Ergebnisse anderer Studien wird gezeigt, dass Metallpartikel und -ionen aus den in der Gelenkprothetik verwendeten Metalllegierungen freigesetzt werden und durch eine systemische Verteilung in die Milz gelangen können. Im Milzgewebe können die Partikel und Ionen entzündliche Reaktionen auslösen. Ob diese entzündliche Aktivität lediglich als reaktiv angesehen werden kann oder negative Effekte auf das Milzgewebe hat, bleibt ungewiss. Deshalb bedarf es weiterer Studien, die die biologischen Effekte von Partikeln und Ionen auf die Organe untersuchen, in welche Abriebpartikel und Metallionen verteilt werden können.

Die systemische Verteilung von Metallpartikeln in die Lunge wurde bereits in anderen Studien untersucht und nachgewiesen (Afolaranmi et al. 2012, Burian et al. 2006). Afolaranmi et al. implantierten Co-Cr-Partikel in eine künstlich hergestellte Rückenluftkammer von Mäusen (Afolaranmi et al. 2012). Im Vergleich zur Kontrollgruppe kam es in den Versuchsgruppen zu erhöhten Cobaltkonzentrationen mit einem Maximum nach zwei Tagen und zu erhöhten Werten für Chrom mit Maximalwerten nach drei Tagen. An den nachfolgenden Tagen sanken die Werte wieder (Afolaranmi et al. 2012).

In einer in-vivo Studie von Burian et al. kam es 14 Tage nach Implantation von Metallpartikeln in eine künstliche Rückenhautfalte syrischer Goldhamster zu massenspektrometrisch nachgewiesenen erhöhten Chromkonzentrationen (Burian et al. 2006).

Eine erhöhte Zytokinsekretion durch Metallpartikel wurde bisher nur in in-vitro Analysen an Makrophagen in Zellkultur untersucht (Dalal et al. 2012, Trindade et al.

2001). Dalal et al. inkubierten Makrophagen mit CoCrMo-Partikeln für 24 und 48 Stunden. Dabei kam es zu einer erhöhten Expression der Zytokine TNF- α und IL1 β (Dalal et al. 2012). Trindade et al. führten in-vitro Untersuchungen an mit CoCr-Partikeln inkubierten Makrophagen in Zellkultur durch (Trindade et al. 2001). Nach einer Inkubationszeit von 48 Stunden konnten erhöhte Werte für TNF- α und IL6 gemessen werden (Trindade et al. 2001).

Die genannten in-vivo und in-vitro Studien konnten nachweisen, dass Metallpartikel durch eine systemische Verteilung in die Lunge gelangen können und dadurch in Kontakt mit dem Lungengewebe zu einer erhöhten Sekretion proinflammatorischer Zytokine und somit zu einer entzündlichen Reaktion führen können.

In der Metallionengruppe kam es in der Lunge ebenso zu einer signifikant erhöhten Expression von TNF- α ($p=0,039$) im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Dass es im Lungengewebe durch Kontakt mit Metallionen zu einer erhöhten Sekretion proinflammatorischer Zytokine kommt, wird durch die Ergebnisse einer in-vitro Studie von Devitt et al. unterstützt (Devitt et al. 2010). Nach Inkubation von Colonen mit Epithelzellen der Atemwege in Zellkultur konnten erhöhte Werte proinflammatorischer Zytokine nachgewiesen werden (Devitt et al. 2010). Catelas et al. konnten in in-vitro Zellkulturen von Makrophagen mit Co- und Cr-Ionen nachweisen, dass es zu einer gesteigerten Sekretion des Zytokins TNF- α kommt (Catelas et al. 2003). Die TNF- α Sekretion stieg in dieser Studie mit ansteigender Inkubationszeit und steigender Konzentration an (Catelas et al. 2003).

Wie bereits diskutiert, kam es auch im Lungengewebe zu einer erhöhten Expression der untersuchten Zytokine durch Metallpartikel und -ionen. Es ist somit anzunehmen, dass auch von einer Verteilung der Partikel und Ionen in das Lungengewebe auszugehen ist. Die Auswirkungen der entzündlichen Aktivität wurden bisher noch nicht genauer untersucht und bleiben ungewiss.

5. Zusammenfassung

Abriebpartikel und Ionen, die aus den Oberflächenmaterialien der Gelenkprothesen freigesetzt werden, stellen bis heute die Hauptproblematik der Endoprothetik dar. Einerseits die lokale Wirkung der Partikel, die zur aseptischen Prothesenlockerung führt, die nach wie vor den Hauptgrund für eine Revisionsoperation darstellt. Andererseits die systemische Verteilung und Wirkung der Partikel und Ionen in von den Prothesen weiter entfernten Geweben. Es kann dadurch zu erhöhten Serumwerten für Ionen und einer Akkumulation von Partikeln und Ionen in Organen kommen. Von den Abriebpartikeln und Ionen können zytotoxische, mutagene oder allergische Wirkungen ausgehen. Welche genauen Auswirkungen die in Patienten entstehenden Konzentrationen haben, ist bisher noch nicht genau geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, ein grundlegendes Verständnis für die Pathophysiologie und biologische Aktivität von Metall- und Polyethylenpartikeln sowie Metallionen zu erlangen und die Unterschiede herauszuarbeiten. Die systemische Verteilung und das inflammatorische Potential der Partikel und Ionen in parenchymatösen Organen waren dabei von besonderer Bedeutung.

Dafür wurden weibliche Balb/c-Mäuse vier verschiedenen Versuchsgruppen mit je zehn Mäusen zugeordnet. Den Gruppen wurden 50µl unterschiedlicher Suspensionen intraartikulär in das Kniegelenk injiziert, welche entweder Metallpartikel, Polyethylenpartikel, Metallionen oder für die Kontrollgruppe PBS enthielten. Nach sieben Tagen wurden die Tiere getötet und die parenchymatösen Organe Niere, Leber, Milz und Lunge entnommen. Die intraartikuläre Injektion und Organentnahme fand im Rahmen eines Gemeinschaftsprojektes statt. Die entnommenen Organe wurden daraufhin in Paraffin eingebettet und aus den Paraffinblöcken wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt, die mit den Primärantikörpern TNF- α , IL6 und IL1 β immunhistochemisch gefärbt wurden. Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden mit einem Lichtmikroskop ausgewertet. Dabei wurden pro Schnitt die positiven Zellen in 20 Gesichtsfeldern gezählt, als positiv galten bräunlich angefärbte Zellen. Um spezifische von unspezifischen Bindungen zu unterscheiden, wurden alle Präparate mit zwei Negativkontrollen verglichen. Zur statistischen Auswertung der Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurde eine Kruskal-Wallis-Analyse durchgeführt.

Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse zeigten vor allem die erhöhte inflammatorische Aktivität in den untersuchten Organen durch Metallpartikel und Metallionen. Besonders in der Niere kam es zu einer Hochregulierung aller untersuchter Zytokine durch die intraartikuläre Injektion von Metallionen (TNF- α : $p < 0,001$, IL6: $p < 0,001$, IL1 β : $p = 0,034$). In der Leber kam es durch Polyethylen- (IL6: $p = 0,004$, IL1 β : $p < 0,001$) und Metallpartikel (TNF- α : $p = 0,045$), aber auch durch Metallionen (IL6: $p < 0,001$) zu einer erhöhten Expression der Zytokine. In Milz und Lunge hatten Metallpartikel (Milz IL6: $p = 0,027$, Lunge TNF- α : $p < 0,001$) und Metallionen (Milz IL1 β : $p = 0,036$, Lunge TNF- α : $p = 0,039$) ein erhöhtes inflammatorisches Potential. Somit zeigte sich in dieser Arbeit, dass vor allem metallische Abriebpartikel und Metallionen und weniger Polyethylenpartikel zu einer erhöhten inflammatorischen Reaktion in den untersuchten Organen führen.

Berücksichtigt man die Ergebnisse dieser Arbeit und die Ergebnisse anderer Studien zur biologischen Aktivität von Abriebpartikeln und Ionen, sollte ein wichtiges Ziel der Endoprothetik sein, den Abrieb so gering wie möglich zu halten und durch die Weiterentwicklung der Materialien die Freisetzung von Ionen zu minimieren. Die lokalen Reaktionen von Abriebpartikeln und die Ursachen der aseptischen Lockerung sind bereits besser bekannt und untersucht als die systemische Verteilung und Reaktionen durch Partikel und Ionen. Das inflammatorische Potential von Partikeln und Ionen wurde in dieser Studie nachgewiesen, jedoch bleiben die genauen systemischen Folgen erhöhter Serumionenwerte und einer möglichen Akkumulation von Partikeln in den Organen ungewiss. Um eine systemische Verteilung der Partikel und Ionen direkt nachzuweisen, sind weitere morphologische Studien notwendig und sinnvoll. Für eine umfassende toxikologische Bewertung sollten zusätzlich die Konzentrationen der Partikel im Gewebe quantifiziert werden. Je nach Patient und Erfahrung des Operateurs sollten die Materialien der Gleitpaarungen für einen Hüftgelenkersatz sorgfältig ausgewählt werden. Zusätzlich sind weitere Studien notwendig, um die genauen Auswirkungen von Abriebpartikeln und Ionen auf den gesamten Organismus zu untersuchen.

6. Literaturverzeichnis

(AOANJRR) AOANJRR (2019). "Hip, Knee & Shoulder Arthroplasty." 2019 Annual Report.

Afolaranmi GA, Akbar M, Brewer J and Grant MH (2012). "Distribution of metal released from cobalt-chromium alloy orthopaedic wear particles implanted into air pouches in mice." J Biomed Mater Res A **100**(6): 1529-1538.

Aumüller G, Aust G, Engele J, Kirsch J, Mayerhofer A, Mense S, et al. (2014). Duale Reihe Anatomie, Georg Thieme Verlag.

Bauer TW, Saltarelli M, McMahon JT and Wilde AH (1993). "Regional dissemination of wear debris from a total knee prosthesis. A case report." The Journal of Bone and Joint Surgery. American volume **75**(1): 106-111.

Bauer TW and Shanbhag AS (2008). "Are there biological markers of wear?" Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons **16**(suppl 1): 68-71.

Baumann B, Rolf O, Jakob F, Goebel S, Sterner T, Eulert J, et al. (2006). "Synergistic effects of mixed TiAlV and polyethylene wear particles on TNF α response in THP-1 macrophages." Biomed Tech (Berl) **51**(5-6): 360-366.

Baxter RM, MacDonald DW, Kurtz SM and Steinbeck MJ (2013). "Characteristics of highly cross-linked polyethylene wear debris in vivo." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **101**(3): 467-475.

Benignus C, Morlock M and Beckmann J (2019). "Hüftendoprothetik beim jungen Patienten." Der Orthopäde **48**(4): 292-299.

Bijukumar DR, Segu A, Souza JCM, Li X, Barba M, Mercuri LG, et al. (2018). "Systemic and local toxicity of metal debris released from hip prostheses: A review of experimental approaches." Nanomedicine **14**(3): 951-963.

Bozic KJ, Kurtz S, Lau E, Ong K, Chiu V, Vail TP, et al. (2009). "The epidemiology of bearing surface usage in total hip arthroplasty in the United States." The Journal of bone and joint surgery. American volume. **91**(7): 1614-1620.

Briggs TWR, Hanna SA, Kayani B, Tai S, Pollock RC, Cannon SR, et al. (2015). "Metal-on-polyethylene versus metal-on-metal bearing surfaces in total hip arthroplasty." The Bone & Joint Journal **97-B**(9): 1183-1191.

Brocker C, Thompson D, Matsumoto A, Nebert DW and Vasiliou V (2010). "Evolutionary divergence and functions of the human interleukin (IL) gene family." Human Genomics **5**(1): 30-55.

Brown C, Fisher J and Ingham E (2006). "Biological effects of clinically relevant wear particles from metal-on-metal hip prostheses." Proc Inst Mech Eng H **220**(2): 355-369.

Brown C, Lacharme-Lora L, Mukonoweshuro B, Sood A, Newson RB, Fisher J, et al. (2013). "Consequences of exposure to peri-articular injections of micro- and nano-particulate cobalt-chromium alloy." Biomaterials **34**(34): 8564-8580.

Burian B, Wimmer MA, Kunze J, Sprecher CM, Pennekamp PH, von Engelhardt LV, et al. (2006). "Systemic spread of wear debris--an in-vivo study." Z Orthop Ihre Grenzgeb **144**(5): 539-544.

Caicedo MS, Desai R, McAllister K, Reddy A, Jacobs JJ and Hallab NJ (2009). "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." J Orthop Res **27**(7): 847-854.

Caicedo MS, Pennekamp PH, McAllister K, Jacobs JJ and Hallab NJ (2010). "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." J Biomed Mater Res A **93**(4): 1312-1321.

Campbell P, Ebramzadeh E, Nelson S, Takamura K, De Smet K and Amstutz HC (2010). "Histological features of pseudotumor-like tissues from metal-on-metal hips." Clin Orthop Relat Res **468**(9): 2321-2327.

Campbell PA, Kung MS, Hsu AR and Jacobs JJ (2014). "Do retrieval analysis and blood metal measurements contribute to our understanding of adverse local tissue reactions?" Clin Orthop Relat Res **472**(12): 3718-3727.

Case CP, Langkamer VG, James C, Palmer MR, Kemp AJ, Heap PF, et al. (1994). "Widespread dissemination of metal debris from implants." Journal of Bone and Joint Surgery **76**(5): 701-712.

Catelas I, Petit A, Zukor DJ, Antoniou J and Huk OL (2003). "TNF- α secretion and macrophage mortality induced by cobalt and chromium ions in vitro-Qualitative analysis of apoptosis." Biomaterials **24**(3): 383-391.

Catelas I, Wimmer MA and Utzschneider S (2011). "Polyethylene and metal wear particles: characteristics and biological effects." Semin Immunopathol **33**(3): 257-271.

Chandran SE and Giori NJ (2011). "Nine-year incidence of kidney disease in patients who have had total hip arthroplasty." J Arthroplasty **26**(6 Suppl): 24-27.

Chen Z, Wang Z, Wang Q, Cui W, Liu F and Fan W (2014). "Changes in early serum metal ion levels and impact on liver, kidney, and immune markers following metal-on-metal total hip arthroplasty." J Arthroplasty **29**(3): 612-616.

Cheung AC, Banerjee S, Cherian JJ, Wong F, Butany J, Gilbert C, et al. (2016). "Systemic cobalt toxicity from total hip arthroplasties." The Bone & Joint Journal **98-B**(1): 6-13.

Cobb AG and Schmalzreid TP (2006). "The clinical significance of metal ion release from cobalt-chromium metal-on-metal hip joint arthroplasty." Proc Inst Mech Eng H **220**(2): 385-398.

Corradi M, Daniel J, Ziaee H, Alinovi R, Mutti A and McMinn DJ (2011). "Early markers of nephrotoxicity in patients with metal-on-metal hip arthroplasty." Clin Orthop Relat Res **469**(6): 1651-1659.

Crainic AM, Callisti M, Palmer MR and Cook RB (2018). "Investigation of nano-sized debris released from CoCrMo secondary interfaces in total hip replacements: Digestion of the flakes." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.

Crainic AM, Callisti M, Veelen A, Michalik A, Milton JA, Palmer MR, et al. (2020). "A comparative study on the physicochemical characteristics of nanoparticles released in vivo from CoCrMo tapers and cement–stem interfaces of total hip replacements." Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials **108**(8): 3311-3322.

Dalal A, Pawar V, McAllister K, Weaver C and Hallab NJ (2012). "Orthopedic implant cobalt-alloy particles produce greater toxicity and inflammatory cytokines than titanium alloy and zirconium alloy-based particles in vitro, in human osteoblasts, fibroblasts, and macrophages." J Biomed Mater Res A **100**(8): 2147-2158.

Daley B, Doherty AT, Fairman B and Case CP (2004). "Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture." The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume **86-B**(4): 598-606.

Daniel J, Ziaee H, Pradhan C, Pynsent PB and McMinn DJ (2010). "Renal clearance of cobalt in relation to the use of metal-on-metal bearings in hip arthroplasty." J Bone Joint Surg Am **92**(4): 840-845.

Dapunt U, Giese T, Lasitschka F, Reinders J, Lehner B, Kretzer JP, et al. (2014). "On the inflammatory response in metal-on-metal implants." Journal of Translational Medicine **12**(74).

DCS Leitfaden für Immunhistochemie. Hamburg, DCS Innovative Diagnostik Systeme.

de Oliveira CMB, Sakata RK, Issy AM, Gerola LR and Salomão R (2011). "Cytokines and Pain." Brazilian Journal of Anesthesiology **61**(2): 255-265.

De Smet K, Campbell PA and Gill HS (2010). "Metal-on-metal hip resurfacing." The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume **92-B**(3): 335-336.

De Smet K, De Haan R, Calistri A, Campbell PA, Ebramzadeh E, Pattyn C, et al. (2008). "Metal ion measurement as a diagnostic tool to identify problems with metal-on-metal hip resurfacing." J Bone Joint Surg Am **90 Suppl 4**: 202-208.

Devitt BM, Queally JM, Vioreanu M, Butler JS, Murray D, Doran PP, et al. (2010). "Cobalt ions induce chemokine secretion in a variety of systemic cell lines." Acta Orthop **81**(6): 756-764.

Di Puccio F and Mattei L (2015). "Biotribology of artificial hip joints." World J Orthop **6**(1): 77-94.

Diehl P, Haenle M, Bergschmidt P, Gollwitzer H, Schauwecker J, Bader R, et al. (2010). "Cementless total hip arthroplasty: a review." Biomed Tech (Berl) **55**(5): 251-264.

Dinarello CA (2000). "Proinflammatory Cytokines." Chest **118**(2): 503-508.

Dinarello CA (2009). "Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family." Annu Rev Immunol **27**: 519-550.

Drees P, Eckardt A, Gay RE, Gay S and Huber LC (2008). "Molecular pathways in aseptic loosening of orthopaedic endoprosthesis." Biomed Tech (Berl) **53**(3): 93-103.

Dunstan E, Ladon D, Whittingham-Jones P, Carrington R and Briggs TW (2008). "Chromosomal aberrations in the peripheral blood of patients with metal-on-metal hip bearings." J Bone Joint Surg Am **90**(3): 517-522.

Ebinger K (2019). Messung der inflammatorischen Aktivität von Metallionen und Metall-Abriebpartikeln von Endoprothesen im Vergleich zu Ultra-High-Molecular-Weight Polyethylenen (UHMWPE) am Tiermodell., LMU München: Medizinische Fakultät

Engh CA, MacDonald SJ, Sritulanondha S, Korczak A, Naudie D and Engh C (2014). "Metal ion levels after metal-on-metal total hip arthroplasty: a five-year, prospective randomized trial." J Bone Joint Surg Am **96**(6): 448-455.

Espallargas N, Fischer A, Igual Muñoz A, Mischler S and Wimmer MA (2017). "In-situ generated tribomaterial in metal/metal contacts: Current understanding and future implications for implants." Biotribology **10**: 42-50.

Gadola SD (2012). Einführung in das Immunsystem. Klinische Immunologie. HH Peter, W Pichler and U Müller-Ladner, Elsevier GmbH, München. **3.Auflage**: 3-76.

Geerdink CH, Grimm B, Ramakrishnan R, Rondhuis J, Verburg AJ and Tonino AJ (2006). "Crosslinked polyethylene compared to conventional polyethylene in total hip replacement: pre-clinical evaluation, in-vitro testing and prospective clinical follow-up study." Acta Orthop **77**(5): 719-725.

Giardina F, Castagnini F, Stea S, Bordini B, Montalti M and Toni A (2018). "Short Stems Versus Conventional Stems in Cementless Total Hip Arthroplasty: A Long-Term Registry Study." The Journal of Arthroplasty **33**(6): 1794-1799.

Goodman SB and Gallo J (2019). "Periprosthetic Osteolysis: Mechanisms, Prevention and Treatment." J Clin Med **8**(12).

Graw J (2015). Die eukaryotische Zelle und Modellorganismen. Genetik. J Graw. Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg: 165-212.

Gray MH, Talbert MI, Talbert WM, Bansal M and Hsu A (1989). "Changes seen in lymph nodes draining the sites of large joint prostheses." The American Journal of Surgical Pathology **13**(12): 1050-1056.

Günther KP, Hamann C, Stiehler M, Kirschner S and Hartmann A (2012). "Die „Standardendoprothese“ am Hüftgelenk – Teil 1." Orthopädie und Unfallchirurgie up2date **7**(04): 275-284.

Haddad FS, Thakrar RR, Hart AJ, Skinner JA, Nargol AVF, Nolan JF, et al. (2011). "Metal-on-metal bearings: the evidence so far." The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume **93**(5): 572-579.

Hallab NJ and Jacobs JJ (2009). "Biologic Effects of Implant Debris." Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases **67**(2): 182-188.

Hanna SA, Somerville L, McCalden RW, Naudie DD and MacDonald SJ (2016). "Highly cross-linked polyethylene decreases the rate of revision of total hip arthroplasty compared with conventional polyethylene at 13 years' follow-up." The Bone & Joint Journal **98-B**(1): 28-32.

Hanstein T, Kumpe O, Mittelmeier W and Skripitz R (2015). "Teilzementierte und unzementierte Hüftendoprothetik." Der Orthopäde **44**(8): 617-622.

Hart A (2013). "Magnetresonanztomographische Untersuchungen bei Problemen mit Metall-auf-Metall-Implantaten." Der Orthopäde **42**(8): 629-636.

Horowitz SM and Gonzales JB (1997). "Effects of polyethylene on macrophages." Journal of Orthopaedic Research **15**(1): 50-56.

Huk OL, Catelas I, Mwale F, Antoniou J, Zukor DJ and Petit A (2004). "Induction of apoptosis and necrosis by metal ions in vitro." The Journal of Arthroplasty **19**(8): 84-87.

Jacobs JJ, Campbell PA and Konttinen YT (2008). "How has the biologic reaction to wear particles changed with newer bearing surfaces?" Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons **16**(Suppl 1): 49-55.

Jacobs JJ, Hallab NJ, Urban RM and Wimmer MA (2006). "Wear particles." The Journal of Bone and Joint Surgery **88**(99-102).

Jakobsen SS, Danscher G, Stoltenberg M, Larsen A, Bruun JM, Mygind T, et al. (2007). "Cobalt-chromium-molybdenum alloy causes metal accumulation and metallothionein up-regulation in rat liver and kidney." Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology **101**(6): 441-446.

Jansson V and Fottner A (2007). "Hüftendoprothetik." Orthopädie und Unfallchirurgie up2date **2**(5): 333-352.

Kaddick C, Catelas I, Pennekamp PH and Wimmer MA (2009). "Implant wear and aseptic loosening. An overview." Der Orthopäde **38**(8): 690-697.

Kaufmann SHE (2014). Basiswissen Immunologie, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Keegan GM, Learmonth ID and Case CP (2007). "Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: A review of current knowledge and future strategies." The Journal of Bone and Joint Surgery **89**(5): 567-573.

Kirkpatrick CJ, Alves A, Köhler H, Kriegsmann J, Bittinger F, Otto M, et al. (2000). "Biomaterial-Induced Sarcoma." The American Journal of Pathology **156**(4): 1455-1467.

Kirschner P (2005). "Hip endoprosthesis." Chirurg **76**(1): 95-103.

Klug A, Gramlich Y, Hoffmann R, Pfeil J, Drees P and Kutzner KP (2019). "Trends in Total Hip Arthroplasty in Germany from 2007 to 2016: What Has Changed and Where Are We Now?" Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie.

Koetz I and Kooter JM (2014). "Update: Hüft-TEP – Hipfes Ersatzteil." physiopraxis **12**(11/12): 48-53.

Kovochich M, Fung ES, Donovan E, Unice KM, Paustenbach DJ and Finley BL (2018). "Characterization of wear debris from metal-on-metal hip implants during normal wear versus edge-loading conditions." J Biomed Mater Res B Appl Biomater **106**(3): 986-996.

Krenn V (2009). Pathologien nach Implantation von Endoprothesen. Endoprothetik - Leitfäden für Praktiker. MG Krukemeyer and G Möllenhoff, Walter de Gruyter GmbH, Berlin.

Krenn V (2013). Pathologie und histopathologische Diagnostik nach Implantation von Endoprothesen. Endoprothetik, Ein Leitfaden für den Praktiker. G Krukemeyer Manfred and G Möllenhoff, Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston. **3. Auflage**

Kretzer JP "Generierung von Metallionen, Zusammensetzung der Lösung - bereitgestellte Analyseergebnisse."

Kretzer JP "Partikelanalyse Metall - bereitgestellte Analyseergebnisse."

Kwon YM, Xia Z, Glyn-Jones S, Beard D, Gill HS and Murray DW (2009). "Dose-dependent cytotoxicity of clinically relevant cobalt nanoparticles and ions on macrophages in vitro." Biomed Mater **4**(2): 025018.

Landgraeber S, Jager M, Jacobs JJ and Hallab NJ (2014). "The pathology of orthopedic implant failure is mediated by innate immune system cytokines." Mediators Inflamm **2014**.

Lang G (2013). Histotechnik - Praxislehrbuch für die biomedizinische Analytik. Wien, Springer.

Langkamer VG, Case CP, Heap P, Taylor A, Collins C, Pearse M, et al. (1992). "Systemic distribution of wear debris after hip replacement. A cause for concern?" The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume **74**(6): 831-839.

Lewis CG, Belniak RM, Plowman MC, Hopfer SM, Knight JA and Sunderman FW (1995). "Intraarticular carcinogenesis bioassays of CoCrMo and TiAlV alloys in rats." The Journal of Arthroplasty **10**(1): 75-82.

Liang H-D, Yang W-Y, Pan J-K, Huang H-T, Luo M-H, Zeng L-F, et al. (2018). "Are short-stem prostheses superior to conventional stem prostheses in primary total hip arthroplasty? A systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials." BMJ Open **8**(9): e021649.

Liow MHL and Kwon YM (2017). "Metal-on-metal total hip arthroplasty: risk factors for pseudotumours and clinical systematic evaluation." Int Orthop **41**(5): 885-892.

Liu A, Richards L, Bladen CL, Ingham E, Fisher J and Tipper JL (2015). "The biological response to nanometre-sized polymer particles." Acta Biomater **23**: 38-51.

Liu YK, Xu H, Liu F, Tao R and Yin J (2010). "Effects of serum cobalt ion concentration on the liver, kidney and heart in mice." Orthop Surg **2**(2): 134-140.

Locksley RM, Heinzel FP, Shepard HM, Agosti J, Eessalu TE, B. AB, et al. (1987). "Tumor necrosis factors alpha and beta differ in their capacities to generate interleukin 1 release from human endothelial cells." The Journal of Immunology **139**: 1891-1895.

Lorber V, Paulus AC, Buschmann A, Schmitt B, Grupp TM, Jansson V, et al. (2014). "Elevated cytokine expression of different PEEK wear particles compared to UHMWPE in vivo." J Mater Sci Mater Med **25**(1): 141-149.

Lüllmann-Rauch R (2015). Taschenlehrbuch Histologie. Stuttgart, Georg Thieme Verlag.

Luttmann W, Bratke K, Küpper M and Myrtek D (2014). Der Experimentator: Immunologie, Springer Spektrum, Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Lützner J, Günther KP, Postler A and Morlock M (2019). "Metal Ion Release after Hip and Knee Arthroplasty - Causes, Biological Effects and Diagnostics." Z Orthop Unfall.

MacDonald SJ, McCalden RW, Chess DG, Bourne RB, Rorabeck CH, Cleland D, et al. (2003). "Metal-on-metal versus polyethylene in hip arthroplasty: a randomized clinical trial." Clin Orthop Relat Res(406): 282-296.

Madl AK, Liang M, Kovochich M, Finley BL, Paustenbach DJ and Oberdorster G (2015). "Toxicology of wear particles of cobalt-chromium alloy metal-on-metal hip implants Part I: physicochemical properties in patient and simulator studies." Nanomedicine **11**(5): 1201-1215.

- Mäkelä KT, Visuri T, Pulkkinen P, Eskelinen A, Remes V, Virolainen P, et al. (2014). "Cancer incidence and cause-specific mortality in patients with metal-on-metal hip replacements in Finland." Acta Orthop **85**(1): 32-38.
- Malviya A, Abdul N and Khanduja V (2017). "Outcomes Following Total Hip Arthroplasty: A Review of the Registry Data." Indian J Orthop **51**(4): 405-413.
- Man K, Jiang L-H, Foster R and Yang XB (2017). "Immunological Responses to Total Hip Arthroplasty." Journal of Functional Biomaterials **8**(3): 33.
- Matharu GS, Pandit HG and Murray DW (2017). "Poor Survivorship and Frequent Complications at a Median of 10 Years After Metal-on-Metal Hip Resurfacing Revision." Clin Orthop Relat Res **475**(2): 304-314.
- Matthews JB, Green TR, H. Stone M, Mike Wroblewski B, Fisher J and Ingham E (2000). "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 **21**(20): 2033-2044.
- Matusiewicz H (2014). "Potential release of in vivo trace metals from metallic medical implants in the human body: from ions to nanoparticles--a systematic analytical review." Acta Biomater **10**(6): 2379-2403.
- McKellop HA, Hart A, Park SH, Hothi H, Campbell P and Skinner JA (2014). "A lexicon for wear of metal-on-metal hip prostheses." J Orthop Res **32**(9): 1221-1233.
- Meachim G, Pedley RB and Williams DF (1982). "A study of sarcogenicity associated with Co-Cr-Mo particles implanted in animal muscle." Journal of Biomedical Materials Research **16**(4): 407-416.
- Merola M and Affatato S (2019). "Materials for Hip Prostheses: A Review of Wear and Loading Considerations." Materials (Basel) **12**(3).
- Merritt K and Brown SA (1996). "Distribution of cobalt chromium wear and corrosion products and biologic reactions." Clinical orthopedics and related research(329 Suppl): 233-242.
- Morlock MM and Jäger M (2016). "Endoprothetik des älteren Menschen." Der Orthopäde **46**(1): 4-17.
- Murphy K, Travers P and Walport M (2009). Janeway Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Nich C and Goodman SB (2014). "The role of macrophages in the biological reaction to wear debris from joint replacements." Journal of long-term effects of medical implants **24**(4): 259-265.
- Niethard FU, Günther KP, Schmitt J, Campbell P, Delaunay CP, Drexler H, et al. (2012). "Metall-Metall-Gleitpaarungen - aktuelle Konsensusempfehlungen." Orthopädie und Unfallchirurgie - Mitteilungen und Nachrichten **1**(03): 296-299.

Noll S and Schaub-Kuhnen S (2000). Praxis der Immunhistochemie, Urban&Fischer Verlag München - Jena.

Otto M, Kriegsmann J, Gehrke T and Bertz S (2006). "Wear particles: key to aseptic prosthetic loosening?" Pathologe **27**(6): 447-460.

Özker S, Droste P and Echtermeyer V (2007). "Wann wird zementiert?" Trauma und Berufskrankheit **9**(S3): S351-S358.

Pabinger C and Geissler A (2014). "Utilization rates of hip arthroplasty in OECD countries." Osteoarthritis Cartilage **22**(6): 734-741.

Pandit H, Glyn-Jones S, McLardy-Smith P, Gundle R, Whitwell D, Gibbons CLM, et al. (2008). "Pseudotumours associated with metal-on-metal hip resurfacings." The Journal of Bone and Joint Surgery. British volume **90**(7): 847-851.

Paulus AC, Ebinger K, Cheng X, Hasselt S, Weber P, Kretzer JP, et al. (2019). "Local Biological Reactions and Pseudotumor-Like Tissue Formation in relation to Metal Wear in a Murine In Vivo Model." Biomed Res Int **2019**: 3649838.

Pogliacomi F, Schiavi P, Grappiolo G, Ceccarelli F and Vaienti E (2019). "Outcome of short versus conventional stem for total hip arthroplasty in the femur with a high cortical index: a five year follow-up prospective multicentre comparative study." International Orthopaedics **44**(1): 61-68.

Polyzois I, Nikolopoulos D, Michos I, Patsouris E and Theocharis S (2012). "Local and systemic toxicity of nanoscale debris particles in total hip arthroplasty." J Appl Toxicol **32**(4): 255-269.

Posada OM, Gilmour D, Tate RJ and Grant MH (2014). "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 **281**(1): 125-135.

Posada OM, Tate RJ and Grant MH (2015). "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 **29**(2): 271-280.

Purdue PE, Koulouvaris P, Nestor BJ and Sculco TP (2006). "The central role of wear debris in periprosthetic osteolysis." HSS J **2**(2): 102-113.

Rader CP, Sterner T, Jakob F, Schütze N and Eulert J (1999). "Cytokine response of human macrophage-like cells after contact with polyethylene and pure titanium particles." The Journal of Arthroplasty **14**(7): 840-848.

Rakow A, Schoon J, Dienelt A, John T, Textor M, Duda G, et al. (2016). "Influence of particulate and dissociated metal-on-metal hip endoprosthesis wear on mesenchymal stromal cells in vivo and in vitro." Biomaterials **98**: 31-40.

Rasquinha VJ, Ranawat CS, Weiskopf J, Rodriguez JA, Skipor AK and Jacobs JJ (2006). "Serum metal levels and bearing surfaces in total hip arthroplasty." J Arthroplasty **21**(6 Suppl 2): 47-52.

Registry NJ (2019). "16th Annual Report 2019."

Rieker CB (2016). "Tribology of total hip arthroplasty prostheses: What an orthopaedic surgeon should know." EFORT Open Rev **1**(2): 52-57.

Roberts J, Meek R, Roberts P and Grigoris P (2005). "Metal-on-metal hip resurfacing." Scottish medical journal **50**(1).

Rubio JC, Garcia-Alonso MC, Alonso C, Alobera MA, Clemente C, Munuera L, et al. (2008). "Determination of metallic traces in kidneys, livers, lungs and spleens of rats with metallic implants after a long implantation time." J Mater Sci Mater Med **19**(1): 369-375.

Savarino L, Granchi D, Ciapetti G, Cenni E, Nardi Pantoli A, Rotini R, et al. (2002). "Ion release in patients with metal-on-metal hip bearings in total joint replacement: a comparison with metal-on-polyethylene bearings." J Biomed Mater Res **63**(5): 467-474.

Schleicher I, Kilian O and Schnettler R (2013). Die primäre Endoprothetik des Hüftgelenkes. Endoprothetik - Ein Leitfaden für den Praktiker. MG Krukemeyer and G Möllenhoff, Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston. **3. Auflage**.

Schütt C and Bröker B (2011). Grundwissen Immunologie, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.

Sedger LM and McDermott MF (2014). "TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future." Cytokine Growth Factor Rev **25**(4): 453-472.

Shea KG, Bloebaum RD, Avent JM, Birk T and Samuelson KA (1996). "Analysis of lymph nodes for polyethylene particles in patients who have had a primary joint replacement." The Journal of Bone and Joint Surgery **78**(4): 497-504.

Skripitz R, Ellenrieder M, Skripitz C and Mittelmeier W (2013). Komplikationen in der Endoprothetik und deren Management. Endoprothetik - Ein Leitfaden für den Praktiker. MG Krukemeyer and G Möllenhoff, Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston. **3. Auflage**.

Sonntag R, Reinders J, Muller U and Kretzer JP (2015). "Bearing selection in total hip arthroplasty." Z Orthop Unfall **153**(6): 587-596.

Tiusanen H, Makela K, Kiilunen M, Sarantsin P, Sipola E and Pesola M (2013). "The effect of different bearing surfaces on metal ion levels in urine following 28 mm metal-on-metal and 28 mm metal-on-polyethylene total hip arthroplasty." Scandinavian Journal of Surgery **102**: 197-203.

Trindade MCD, Lind M, Sun D, Schurman DJ, Goodman SB and Lane Smith R (2001). "In vitro reaction to orthopaedic biomaterials by macrophages and lymphocytes isolated from patients undergoing revision surgery." Biomaterials **22**(3): 253-259.

Turner MD, Nedjai B, Hurst T and Pennington DJ (2014). "Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1843**(11): 2563-2582.

Urban RM, Jacobs JJ, Tomlinson MJ, Gavriloic J, Black J and Peoc'h M (2000). "Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement." The Journal of Bone and Joint Surgery **82**(4): 457-476.

Urban RM, Tomlinson MJ, Hall DJ and Jacobs JJ (2004). "Accumulation in liver and spleen of metal particles generated at nonbearing surfaces in hip arthroplasty." The Journal of Arthroplasty **19**(8): 94-101.

Utzschneider S (2010). "Verwendung von crosslinked Polyethylenen in der Knieendoprothetik und deren biologische Aktivität in vivo."

Utzschneider S, Becker F, Grupp TM, Sievers B, Paulus A, Gottschalk O, et al. (2010). "Inflammatory response against different carbon fiber-reinforced PEEK wear particles compared with UHMWPE in vivo." Acta Biomater **6**(11): 4296-4304.

Utzschneider S, Lorber V, Dedic M, Paulus AC, Schroder C, Gottschalk O, et al. (2014). "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 **25**(6): 1599-1612.

Van Der Straeten C, Van Quickenborne D, De Roest B, Calistri A, Victor J and De Smet K (2013). "Metal ion levels from well-functioning Birmingham Hip Resurfacings decline significantly at ten years." The Bone & Joint Journal **95-B**(10): 1332-1338.

Varnum C (2017). "Outcomes of different bearings in total hip arthroplasty - implant survival, revision causes, and patient-reported outcome." Dan Med J **64**(3): 2245-1919.

Visuri T, Pulkkinen P, Paavolainen P and Pukkala E (2010). "Cancer risk is not increased after conventional hip arthroplasty." Acta Orthop **81**(1): 77-81.

Vollmar A, Zündorf I and Dingermann T (2013). Immunologie Grundlagen und Wirkstoffe, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart.

Wang Y, Yan Y, Su Y and Qiao L (2017). "Release of metal ions from nano CoCrMo wear debris generated from tribo-corrosion processes in artificial hip implants." J Mech Behav Biomed Mater **68**: 124-133.

Weyerer S (2013). Epidemiologie degenerativer Gelenkerkrankungen. Endoprothetik - Ein Leitfaden für den Praktiker. MG Krukemeyer and G Möllenhoff, 2013 Walter de Gruyter GmbH, Berlin/Boston. **3.Auflage**.

Willi R, Rieker C, Thomsen M and Thomas P (2012). Implantate. AE-Manual der Endoprothetik. L Claes, P Kirschner, C Perka and M Rudert, Springer Heidelberg Dordrecht London New York.

Wimmer MA, Fischer A, Buscher R, Pourzal R, Sprecher C, Hauert R, et al. (2010). "Wear mechanisms in metal-on-metal bearings: the importance of tribochemical reaction layers." J Orthop Res **28**(4): 436-443.

<http://www.bbraun.de>. Retrieved 21.03.20.

<http://www.villarbjwa.com>. Retrieved 20.03.20.

<http://www.zimmerbiomet.com>. Retrieved 20.03.20.

Zhang JM and An J (2007). "Cytokines, inflammation, and pain." Int Anesthesiol Clin **45**(2): 27-37.

Zysk SP, Gebhard HH, Pellengahr C, Refior HJ, Plitz W, Messmer K, et al. (2003). "Inflammatory responses to wear particles in vivo: a novel model in the murine knee joint." Orthopade **32**(4): 305-311.

7. Material und Geräte

7.1. Antikörper

Material	Firma
Anti-Maus TNF- α IgG Konzentration: 0,5 mg/ml verdünnt mit Antikörper- Verdünnungspuffer Verdünnung: 1:500 Produktnummer: orb371962	Biorbyt Ltd. Cambridge, Großbritannien
Anti-Maus IL6 IgG Konzentration: 0,5 mg/ml verdünnt mit Antikörper- Verdünnungspuffer Verdünnung: 1:200 Produktnummer: orb6210	Biorbyt Ltd. Cambridge, Großbritannien
Anti-Maus IL1 β IgG Konzentration: 0,5 mg/ml verdünnt mit Antikörper- Verdünnungspuffer Verdünnung: 1:100 Produktnummer: orb10903	Biorbyt Ltd. Cambridge, Großbritannien

Tabelle 2: Antikörper

7.2. Allgemeine Reagenzien

Material	Firma
Neutral gepufferte Formaldehydlösung 4%	Microcos GmbH Garching, Deutschland
HistoSAV	SAV Liquid Production GmbH Flintsbach am Inn, Deutschland
Paraplast	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Ethanol 70% vollständig vergällt mit Methylketon	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Ethanol 96% vollständig vergällt mit Methylketon	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Ethanol 99% vergällt mit 1% Petrolether	SAV Liquid Production GmbH Flintsbach am Inn, Deutschland
Xylol reinst >98%	SAV Liquid Production GmbH Flintsbach am Inn, Deutschland
PBS-Puffer pH 7,4 (10 x konzentriert)	Apotheke Innenstadt Universität München, Deutschland
Brij L23 solution	Sigma Aldrich Chemie GmbH Steinheim, Deutschland

Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA Darmstadt, Deutschland
DCS Detection Line SUPERVision 2 Single Species HRP-Polymer Kaninchen	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland
DCS ChromoLine DAB-2 Komponenten/Chromogen-Kit	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland
DCS LabLine Antikörper- Verdünnungspuffer	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland
DCS LabLine EDTA-Puffer pH9 (10 x konzentriert)	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Hamburg, Deutschland
Mayer`s Hematoxylin Solution	AppliChem Darmstadt, Deutschland
Eukitt	O.Kindler GmbH Freiburg, Deutschland

Tabelle 3: Allgemeine Reagenzien

7.3. Verbrauchsmaterialien

Material	Firma
Einbettkassetten für Biopsien	Carl Roth GmbH + Co Karlsruhe, Deutschland
Messzylinder 1000ml, 500ml Duran	BRAND GmbH + CO KG Wertheim,

	Deutschland
Manuelle Färbestation, inkl. Färbere-Rack	Diapath S.P.A. Martinengo BG, Italien
Färbeküvetten	Wagner&Munz GmbH München, Deutschland
Färbekammern Stain Tray	Carl Roth GmbH + Co Karlsruhe, Deutschland
Microtom Blade A35-pfm	Feather Safety Razor Co. Ltd. Osaka, Japan
Objektträger Superfrost Plus	Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Deckgläser 24x32 mm/ 24x50 mm	Menzel GmbH & Co KG Braunschweig, Deutschland
Pipettenspitzen 10µl, 200µl, 1000µl	Gilson International B.V. Limburg-Offenheim, Deutschland
Serologische Pipette Costar Stripette 2ml, 5ml, 25ml, 50ml	Corning Inc. New York, USA
Reaktionsgefäße Eppendorf Tubes 1,5ml, 2ml	Eppendorf AG Hamburg, Deutschland
Münchner Mappen	Wagner&Munz GmbH München, Deutschland

Präparatekästen	neoLab für mein Labor Heidelberg, Deutschland
Mobile Cooling System	pfm medical ag Köln, Deutschland

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

7.4. Geräte

Gerät	Firma
Rotationsmikrotom Leica RM2255	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland
Paraffin-Streckbad	Gesellschaft für Labortechnik Burgwedel, Deutschland
Heizplatte	Medax GmbH & Co.KG Büchenbach, Deutschland
Trockenschrank	Binder GmbH Tuttlingen, Deutschland
Tischabzug	Köttermann GmbH & Co KG Uetze/Hänigsen, Deutschland
Entwässerungsautomat Hypercenter XP	Thermo Shandon GmbH Frankfurt, Deutschland
Paraffinausgießstation Leica EG1160	Leica Microsystems Nussloch, Deutschland

Gefrierschrank -20°C Liebherr Premium No Frost	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riß, Deutschland
Kühlschrank 4°C Liebherr Comfort	Liebherr-International Deutschland GmbH Biberach an der Riß, Deutschland
Dampfgarer Braun MultiGourmet	De'Longhi Deutschland GmbH Geschäftsbereich Braun Household Neu-Isenburg, Deutschland
Pipetus	Hirschmann Laborgeräte GmbH & Co.KG Heilbronn, Deutschland
Mikroliterpipette Transferpette S, typ variabel (10µl, 100µl, 200µl, 1000µl)	BRAND GmbH + CO KG Wertheim, Deutschland
M8 Microscope and Scanner	PreciPoint GmbH Freising, Deutschland

Tabelle 5: Geräte

8. Abbildungen und Tabellen

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Von links nach rechts Oberflächenersatz, Kurzschaftprothese und Totalendoprothese (www.villarbjwa.com)

Abb. 2: Beckenübersichtsaufnahme einer implantierten Kurzschaftprothese (Pogliacomì et al. 2019)

Abb. 3: Beckenübersichtsaufnahme mit Totalendoprothese rechts und Kappenprothese links (Roberts et al. 2005)

Abb. 4: Verankerungsmethode bei der Primärimplantation einer Hüfttotalendoprothese (Registry 2019)

Abb. 5: Zementfreier (oben) und zementierter (unten) Schaft (www.zimmerbiomet.com)

Abb. 6: Zementierte Pfanne (www.bbraun.de)

Abb. 7: Zementfreie Pfanne mit Keramikinlay links und Polyethyleninlay rechts (www.bbraun.de)

Abb. 8: Am häufigsten verwendete Gleitpaarungen (www.bbraun.de)

Abb. 9: Verwendete Gleitpaarungen bei der Primärimplantation zementfreier Hüft-TEPs (Registry 2019)

Abb. 10: Verwendete Gleitpaarungen bei der Primärimplantation zementierter Hüft-TEPs (Registry 2019)

Abb. 11: Schematische Darstellung der unerwünschten lokalen und systemischen Reaktionen durch Abriebpartikel (Bijukumar et al. 2018)

Abb. 12: T2-gewichtetes axiales MRT Bild einer rechten Hüfte mit zystischem Pseudotumor (Pfeil) (Hart 2013)

Abb. 13: T1-gewichtetes axiales MRT Bild. Solider Pseudotumor (Pfeil) (Pandit et al. 2008)

Abb. 14 zeigt die signifikant vermehrte Expression von TNF- α in der Niere in der Metallionen- (MI) ($p < 0,001$) und Polyethylenpartikelgruppe (PE) ($p = 0,008$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p < 0,001$) zwischen der Metallionen- (MI) und der Metallpartikelgruppe (MI).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

° = milder Ausreißer

Abb. 15 zeigt Ausschnitte von Nieren Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit TNF- α gefärbt wurden. Abb. 15.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 15.2 einen Ausschnitt der MP-Gruppe, Abb. 15.3 der PE-Gruppe und Abb. 15.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Abb. 16 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p < 0,001$) von IL6 in der Niere in der Metallionen- (MI) und Metallpartikelgruppe (MP) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,006$) zwischen der Metallionen- (MI) und Polyethylengruppe (PE).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

° = milder Ausreißer

Abb. 17 zeigt Ausschnitte von Nieren Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL6 gefärbt wurden. Abb. 17.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 17.2 einen Ausschnitt der MP-Gruppe, Abb. 17.3 der PE-Gruppe und Abb. 17.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Abb. 18 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p = 0,034$) von IL1 β in der Niere in der Metallionengruppe (MI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der Expression von IL1 β .

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

Abb. 19 zeigt Ausschnitte von Nieren Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL1 β gefärbt wurden. Abb. 19.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 19.2 einen Ausschnitt der MP-Gruppe, Abb. 19.3 der PE-Gruppe und Abb. 19.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Abb. 20 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p = 0,045$) von TNF- α in der Leber in der Metallpartikelgruppe (MP) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigt sich kein signifikanter Unterschied ($p > 0,05$) in der Expression von TNF- α .

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

° = milder Ausreißer

Abb. 21 zeigt Ausschnitte von Leber Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit TNF- α gefärbt wurden. Abb. 21.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 21.2 der MP-Gruppe, Abb. 21.3 der PE-Gruppe und Abb. 21.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Abb. 22 zeigt die signifikant vermehrte Expression von IL6 in der Leber in der Metallionen- (MI) ($p < 0,001$) und Polyethylenpartikelgruppe (PE) ($p = 0,004$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,002$) zwischen der Metallionen- und Metallpartikelgruppe.

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

° = milder Ausreißer

* = extremer Ausreißer

Abb. 23 zeigt Ausschnitte von Leber Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL6 gefärbt wurden. Abb. 23.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 23.2 der MP-Gruppe, Abb. 23.3 der PE-Gruppe und Abb. 23.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Abb. 24 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p < 0,001$) von IL1 β in der Leber in der Polyethylengruppe (PE) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Metallionen- (MI) und der Polyethylengruppe (PE) ($p = 0,041$) und zwischen der Metallpartikel- (MP) und der Polyethylengruppe (PE) ($p = 0,045$).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

* = extremer Ausreißer

Abb. 25 zeigt Ausschnitte von Leber Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL1 β gefärbt wurden. Abb. 25.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 25.2 der MP-Gruppe, Abb. 25.3 der PE-Gruppe und Abb. 25.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Abb. 26 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p = 0,027$) von IL6 in der Milz in der Metallpartikelgruppe (MP) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Metallionen- (MI) und der Polyethylenpartikelgruppe (PE) ($p = 0,03$) und zwischen der Metallpartikel- (MP) und der Metallionen- (MI) ($p = 0,002$).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

Abb. 27 zeigt Ausschnitte von Milz Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL6 gefärbt wurden. Abb. 27.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 27.2 der MP-Gruppe, Abb. 27.3 der PE-Gruppe und Abb. 27.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Abb. 28 zeigt die signifikant vermehrte Expression ($p = 0,036$) von IL1 β in der Milz in der Metallionengruppe (MI) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Metallpartikel- (MP) und der Metallionengruppe (MI) ($p = 0,014$).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

° = milder Ausreißer

* = extremer Ausreißer

Abb. 29 zeigt Ausschnitte von Milz Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit IL1 β gefärbt wurden. Abb. 29.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 29.2 der MP-Gruppe, Abb. 29.3 der PE-Gruppe und Abb. 29.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Abb. 30 zeigt die signifikant vermehrte Expression von TNF- α in der Lunge in der Metallionen- (MI) ($p = 0,039$) und Metallpartikelgruppe (MP) ($p < 0,001$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS). Zwischen den Versuchsgruppen zeigt sich ein signifikanter Unterschied ($p = 0,01$) zwischen der Metallpartikel- (MP) und der Polyethylenpartikelgruppe (PE).

= signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe (PBS)

+ = signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen

° = milder Ausreißer

* = extremer Ausreißer

Abb. 31 zeigt Ausschnitte von Lungen Präparaten der unterschiedlichen Versuchsgruppen, die mit TNF- α gefärbt wurden. Abb. 31.1 zeigt einen Ausschnitt der MI-Gruppe, Abb. 31.2 der MP-Gruppe, Abb. 31.3 der PE-Gruppe und Abb. 31.4 der Kontrollgruppe. Beispielhaft wurden einige positive Zellen mit Pfeilen markiert.

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Färbeprotokoll der immunhistochemischen Färbung

Tabelle 2: Antikörper

Tabelle 3: Allgemeine Reagenzien

Tabelle 4: Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Geräte

9. Danksagung

Mein besonderer Dank für die Betreuung meiner Promotion und für die langjährige Unterstützung gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. med. Sandra Utzschneider und meinem Betreuer Dr. med. Alexander Paulus.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. med. Dipl.-Ing. Volkmar Jansson für die Ermöglichung dieser Doktorarbeit an der Klinik und Poliklinik für Orthopädie, Physikalische Medizin und Rehabilitation der Ludwig-Maximilians-Universität danken.

Auch die erfolgreiche Zusammenarbeit mit den Partnern des DFG-Projektes „Biologische Aktivität metallischer Abriebpartikel und Metallionen in vitro und in vivo“ möchte ich hier hervorheben. Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit spreche ich meinen Dank der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) aus.

Frau Sandra Haßelt gilt besonderer Dank für den großen Einsatz bei der Vor- und Nachbereitung der Versuche und ihrer Unterstützung im Rahmen der immunhistochemischen Färbungen.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie, besonders meiner Mutter, Sabine Jäckel, die mir während meines Promotionsvorhabens stets mit unendlicher Geduld und einem offenen Ohr zur Seite stand.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe möchte ich ein herzliches Dankeschön für die gute Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima aussprechen.

Weiterhin möchte ich mich bei Hr. Dr. med. Alexander Crispin für die statistische Beratung bedanken.

10. Eidesstattliche Versicherung

Panzer, Kerstin

Name, Vorname

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

Immunhistochemische Analyse der systemischen Reaktion von Polyethylen- und Metallpartikeln, sowie Metallionen in murinen parenchymatösen Organen

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

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

München, 18.02.2022

Ort, Datum

K. Panzer

Unterschrift Doktorandin
