

Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie der Technischen Universität
München
Klinikum rechts der Isar
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe)

**Deskriptiver Erstdnachweis von AMP- und Zytokinmustern
in intraoperativ gewonnenen Blut- und
Synovialflüssigkeitproben bei septischer und aseptischer
Prothesenlockerung**

Felix Maximilian Pankow

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. E. J. Rummeny

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. R. von Eisenhart-Rothe
2. apl. Prof. Dr. H. Gollwitzer

Die Dissertation wurde am 31.10.2014 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 15.07.2015 angenommen.

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
2 EINLEITUNG	2
2.1 Endoprothetik von Hüft- und Kniegelenk	2
2.1.1 Entwicklung und aktueller Stand.....	2
2.1.2 Stellenwert für Individuum und Volkswirtschaft	7
2.1.3 Komplikationen	9
2.2 Implantatlockerung	9
2.2.1 Ätiologie	9
2.2.1.1 Aseptische nichtallergische Prothesenlockerung.....	9
2.2.1.2 Aseptische Prothesenlockerung mit allergischer Beteiligung.....	10
2.2.1.3 Septische Prothesenlockerung	11
2.2.2 Diagnostischer Algorithmus	12
2.2.3 Therapeutischer Algorithmus.....	13
2.2.4 Periprothetischer Low Grade Infekt (PLGI): Diagnostische Lücke mit Gefahr der falschen Therapieentscheidung.....	15
2.3 Antimikrobielle Peptide (AMP)	15
2.3.1 Klassifikation.....	16
2.3.2 Wirkmechanismus und -spektrum	16
2.3.3 AMPs und Gelenkinfektionen	18
2.3.3.1 Lokale AMP-Expression im Gelenk.....	18
2.3.3.2 Systemische AMP-Expression im Blut	19
3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT	21
4 MATERIAL UND METHODEN	23
4.1 Studiendesign.....	23
4.2 Diagnosesicherung	23
4.2.1 Anamnese und klinische Untersuchung	24
4.2.2 Radiologische Verfahren	25
4.2.3 Blutchemische Entzündungsparameter	26
4.2.4 Mikrobiologische Diagnostik	26
4.2.5 Zytologie des Gelenkpunktats	26
4.3 Patientenrekrutierung	28
4.3.1 Einschlusskriterien.....	28
4.3.2 Ausschlusskriterien.....	29

4.4 Studienablauf.....	29
4.5 Messung der Zytokinspiegel	30
4.6 Messung der AMP-Spiegel	31
4.7 Statistik	31
5 ERGEBNISSE	34
5.1 Patientenkollektiv	34
5.2 Blutchemische Entzündungsparameter.....	36
5.3 Keimnachweis in Gelenkpunktat und Gewebeproben	37
5.4 Histopathologie intraoperativ entnommener Gewebeproben.....	37
5.5 Zytologie des Gelenkpunkts	38
5.6 Zytokinmuster.....	38
5.6.1 Lokale Zytokinexpression im Gelenkpunktat	38
5.6.2 Systemische Zytokinexpression im Serum	41
5.7 AMP-Muster	43
5.7.1 Lokale AMP-Expression in der Gelenkflüssigkeit	43
5.7.2 Systemische AMP-Expression im Serum	47
5.8 Diagnostische Güte (AUC-Wert)	51
5.9 Infekttafel	55
6 DISKUSSION.....	56
6.1 Gegenwärtige Standarddiagnostika des periprothetischen Infekts / der septischen Prothesenlockerung und deren Schwächen.....	57
6.2 Aktuelle diagnostische Lücke bei Periprothetischem Low Grade Infekt (PLGI).....	60
6.3 Bestätigung bekannter und Etablierung neuer Zytokine als (lokale) Biomarker des PLGI / der septischen Prothesenlockerung.....	62
6.3.1 Lokale Zytokinkonzentration	62
6.3.2 Systemische Zytokinkonzentration	63
6.4 Erstnachweis von AMPs als (lokale) Biomarker des PLGI.....	63
6.4.1 Lokale AMP-Konzentration	64
6.4.2 Systemische AMP-Konzentration	64
6.5 Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit durch Kombination von Biomarkern	65
6.6 Ausblick	66

7 ZUSAMMENFASSUNG.....	68
8 LITERATURVERZEICHNIS	70
9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS.....	79
10 DANKSAGUNG.....	82
11 ANHANG	83
Eigene Veröffentlichung	83

1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

99mTc-AGS	Technetium-99m-Antigranulozytenszintigraphie
AMP	Antimikrobielles Peptid
ASA-Score	<i>American Society of Anesthesiologist-Klassifikation</i>
AUC	<i>Area under the curve</i> , Fläche unter der Kurve
AUD	Australischer Dollar
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
CBA	<i>Cytometric Bead Array</i>
CRP	C-reaktives Protein
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
FDG-PET	18F-Fluordesoxyglucose-Positronenemissionstomographie
GBD2	<i>Goat beta defensin 2</i>
GHE-Stiel	Grunde-Henßge-Etspüler-Stiel
GT-Schlitten	Grunde-Thomas-Schlitten
H-TEP	Hüfttotalendoprothese
HBD2	<i>Human beta defensin 2</i>
HBD3	<i>Human beta defensin 3</i>
HRP	<i>Horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase</i>
IFN-γ	Interferon gamma
IL	Interleukin
IP-10/CXCL10	<i>Interferon gamma-induced protein 10/C-X-C motif chemokine 10</i>
K-TEP	Knietotalendoprothese
KNAST	Koagulase-negativen Staphylokokken
LL-37	(Aktives Spaltprodukt des) humanen Cathelicidins
LL-37/hCAP-18	<i>human cathelicidin</i>
NPV	<i>Negative predictive value</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononucleated cells</i>
PCR	Polymerase chain reaction
PE	Polyethylen
PLGI	Periprothetischer Low Grade Infekt
PMMA	Polymethylmethacrylat
PPV	<i>Positive predictive value</i>
QALY	<i>Quality-adjusted life year</i>
R	freie Programmiersprache für statistisches Rechnen

2 EINLEITUNG

2.1 Endoprothetik von Hüft- und Kniegelenk

2.1.1 Entwicklung und aktueller Stand

Die Entwicklung der Endoprothetik großer Extremitätengelenke begann vor etwa 130 Jahren. Bis zu diesem Zeitpunkt versuchte man die Funktion zerstörter oder erkrankter Extremitätengelenke durch sparsame Resektion von gelenknahen Knochenanteilen und anschließender Arthroplastik zu verbessern. Zusätzlich zur Resektion wurden damals meist Interponate aus körpereigenem Gewebe (Haut, Faszie, Muskulatur, Fett) oder körperfremden Materialien wie Holz, Zelluloid, Metallfolien oder -teile zwischen die neu modellierten Artikulationsflächen eingebracht, um eine knöcherne Verwachsung des neu geschaffenen Gelenks zu verhindern. Mit diesem Eingriff war zwar eine gewisse Beweglichkeit und ausreichende Stabilität des neuen Gelenks zu erreichen, eine langfristige Besserung stellte sich jedoch nicht ein (Wessinghage, 2000).

Eine Verbesserung der Operationsergebnisse versprach man sich erst durch den 1885 von Themistocles Gluck (1853–1942) vorgeschlagenen Austausch erkrankter Gelenke durch amputierte Gelenke von frischen Leichen oder durch Scharniergelenke aus Elfenbein. Gluck war es auch, der seine Idee als erster in die Tat umsetzte und in einem zweizeitigen Eingriff selbst hergestellte Elfenbeinprothesen implantierte (Abb. 2.1). Zu deren Fixierung und zur Defektauffüllung entwickelte er einen sog. Steinkitt, der als erste Form des Knochenzements angesehen werden kann (Wessinghage, 1995).

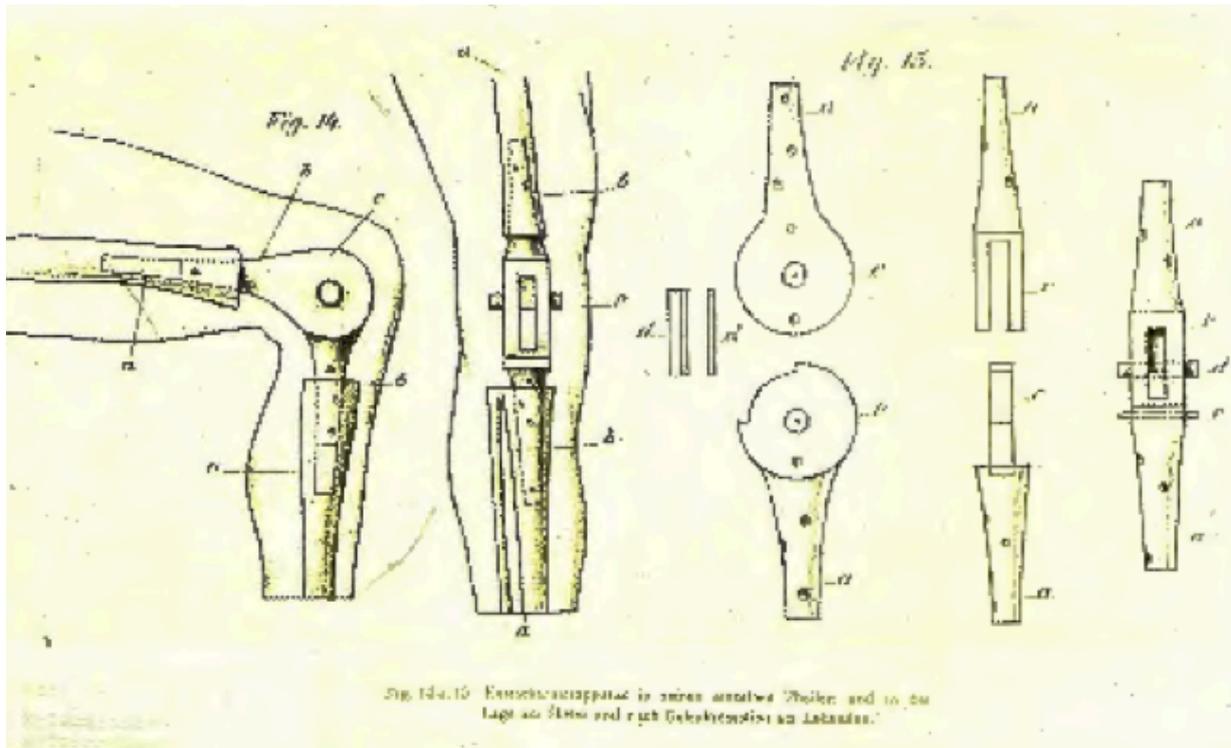


Abbildung 2.1: Modell einer Kniegelenksprothese aus Elfenbein nach T. Gluck
(aus (Wessinghage, 1995))

Auch wenn die damals erreichten Operationsergebnisse weder bezüglich der initialen Stabilität noch der Standzeit mit heutigen Resultaten zu vergleichen sind, stellt die von Gluck erstmalig durchgeführte Implantation eines künstlichen Gelenks sicherlich die Geburtsstunde der modernen Endoprothetik dar, da sie den Anstoß für eine ganze Reihe weiterer Entwicklungen bei den verwendeten Materialien und den angewandten Operationsmethoden gab.

Den nächsten Schritt stellte dabei eine Plexiglasschale dar, die Smith-Petersen im Jahr 1923 implantierte, um so zerstörte Hüftköpfe zu ersetzen. Doch auch dieses Verfahren stellte sich auf Grund mangelhafter Verankerung im Knochen sowie schlechter Standfestigkeit des Materials als nicht sehr viel versprechend heraus (L, 1953).

Erst als Venable und Stuck 13 Jahre später die neue Cobalt-Chrom-Molybdän-Legierung Vitallium einführten, welche sich sowohl durch ihre mechanische Festigkeit als auch durch ihre Korrosionsbeständigkeit auszeichnete (Venable and Stuck, 1943), zeigte die von Smith-Petersen durchgeführte sog. „Mould Arthroplasty“ längerfristige Erfolge.

Des Weiteren verhalf die Verwendung von Vitallium der Kopfstielprothese von Judet zu größeren Erfolgen und ermöglichte Moore und Thomsens Erfindung stielendiger Prothesen (Gradinger et al., 2006).

Allerdings zeigte sich bei allen Neuentwicklungen dieser Zeit ein gemeinsames Problem. Zwar waren die Prothesen nun biokompatibel und hielten enormen Belastungen stand, doch machte ihre Verankerung im Knochen weiterhin Probleme. Einen Lösungsansatz, und somit einen weiteren Meilenstein in der Entwicklung der Endoprothetik, lieferte in den sechziger Jahren der Engländer John Charnley. Er ergänzte nicht nur den Hüftkopfersatz um eine künstliche Hüftpfanne, sondern verankerte beide mit Polymethylmetacrylat (PMMA) Knochenzement im Knochen und sorgte so für eine bessere Kraftverteilung an der Prothesen-Knochen-Grenzschicht (Charnley, 1960).

Der Einsatz dieses aus der Zahnmedizin sowie plastischen Chirurgie schon vorher bekannten Knochenzements sowie die Verwendung reibungsbeständiger Gelenkpartner im Sinne einer „low-friction-Arthroplastik“, bei welcher der Metallkopf mit einer Kunststoffpfanne artikuliert, führten zu einer weiteren Verbreitung der Totalendoprothetik. So implantierten der Hamburger Buchholz und der Schweizer Müller im Jahr 1966 eigene Prothesenentwicklungen. Drei Jahre später stellten Buchholz und Weber ihre weiterentwickelte Prothese vor (Gradinger et al., 2006).

Im Bereich der Knieendoprothetik zeigte sich eine ähnliche Entwicklung. Waren die Modelle nach Shiers und Walldius in den fünfziger Jahren noch reine Scharnierendoprothesen, die zur zementlosen Verankerung extra lange Stiele besaßen, war das 1968 vorgestellte Modell der Guepar-Gruppe bereits für die Zementfixierung vorgesehen. Bei den Oberflächenersatzprothesen waren zu diesem Zeitpunkt der Typ „St.Georg“ von Buchholz und Link sowie das Modell von Mamor (USA) Stand der Technik (Jerosch and Heisel, 1999).

Ab den siebziger Jahren lag das Augenmerk auf der Anpassung der Prothesen an die menschliche Anatomie. Diese Entwicklung gipfelte 1975 in der Einführung der ersten keramischen Gleitachs-Vollprothese durch Grundei und Thomas, welche die physiologischen Roll-, Gleit- und Rotierbewegungen des Knies realisierte und zusammen mit den zeitnah entwickelten querovalen Femur- und Tibiastielen die Standfestigkeit der Knieendoprothesen weiter erhöhte (Thomas and Grundei, 1982). Als weiteres Resultat aus ihren Studien konnten Grundei und Thomas zwei Jahre

später die sog. „Anatomische GT-Schlitten-Endoprothese“, einen Oberflächenersatz, erstimplantieren.

Auch bei den Hüftendoprothesen wurde die ungünstige Kraftverteilung des technisch geformten Prothesenstiels durch dessen Anpassung an die Anatomie des Femurs optimiert. Der von Grundei, Henßge und Etspüler entwickelte, anatomisch geformte GHE-Stiel wurde 1980 erstmalig implantiert (Henßge et al., 1985).

Trotz der zahlreichen Innovationen im Bereich der gewählten Materialien sowie der verwendeten Prothesenform zeigten sich immer noch Probleme im Bezug auf die Standfestigkeit der Prothesen. Der zur Befestigung verwendete PMMA-Zement ermöglichte zwar eine bessere Kraftverteilung als bei zementfrei implantierten Prothesen, durch seine Oberflächenstruktur verhinderte er aber ein festes Einwachsen in den Knochen, was immer wieder eine aseptische Lockerung der Totalendoprothesen (TEPs) zur Folge hatte. Diese Problematik führte dazu, dass verschiedene Arbeitsgruppen an der Entwicklung zementfrei zu fixierender Prothesen arbeiteten. Ihr Ziel war hierbei das Ermöglichen der knöchernen Integration der Implantate durch Verbesserung bzw. Vergrößerung der Prothesenoberfläche. Einfache aber dennoch erfolgreiche Formen der Oberflächenvergrößerung waren kraterförmige Vertiefungen (Judet, 1975), gewindeartige Strukturen (McKee and Watson-Farrar, 1966) oder Tragrippen (Mittelmeier, 1974). Eine weitere Verbesserung stellten aufgesinterte Kugeln (Lord and Bancel, 1983) sowie das Fiber-Mesh-Verfahren (Galante et al., 1971) dar, bei dem Metallspäne aus Titan- oder Kobalt-Chrom-Legierungen willkürlich vermischt und auf der Prothese fixiert wurden. Der Vorteil dieser beiden Verfahren lag darin, dass das Knochengewebe nicht nur an das Implantat heranwachsen konnte, sondern durch die offene Raumstruktur zu einem gewissen Teil in die Oberfläche hineinwachsen konnte. Als nachteilig erwies sich die teilweise instabile Verbindung von Kugeln bzw. Spänen und dem Implantat selbst (Gradinger et al., 2006). Den letzten Schritt in diesem Entwicklungsbereich stellte die an die Bälkchenstruktur des Knochens angelehnte Metall-Spongiosa® dar, welche die stabile Durchwachsung der Implantatoberfläche durch den Knochen ermöglichte (Krüger et al., 1985).

Den bisher aktuellsten Schritt in der Entwicklung der Endoprothetik von Knie- und Hüftgelenk markieren jedoch nicht neue Prothesenmaterialien, sondern die Optimierung der Operationsplanung und- durchführung. Seit den 1990er Jahren kommen dabei vermehrt computer- beziehungsweise robotergestützte Verfahren

zum Einsatz (Lang et al., 2011). Zwar konnten die sogenannten autonomen Robotersysteme, die gewisse Operationsschritte selbständig durchführen, die anfänglich an sie gerichteten Erwartungen nicht erfüllen; die passiven, operateurgesteuerten Verfahren scheinen jedoch sogar besser als anfänglich erwartet. Ihr großer Vorteil liegt in der Möglichkeit, durch computergestützte Navigation intraoperativ minimale Veränderungen vorzunehmen, um so für einen möglichst perfekten Sitz der Prothese zu sorgen. Sie sind dabei der konventionellen Prothesenimplantation bei den bisher durchgeführten kurz- und mittelfristigen Kontrollen in Sachen Präzision und Komplikationsfreiheit überlegen (Tolk et al., 2012, Dorr et al., 2011, Nakamura et al., 2010, Lang et al., 2011).

Der außerordentliche Erfolg der Endoprothetik spiegelt sich in der stetig steigenden Anzahl der jährlich implantierten TEPs wider (Abb. 2.2). So stiegen die Neuimplantationszahlen von H-TEPs im Zeitraum von 2004 bis 2008 allein in Deutschland um etwa 20.000 auf 157.350. Die Anzahl der neu implantierten K-TEPs stieg in der gleichen Zeitspanne sogar um etwa 40.000 auf einen Wert von 146.318.

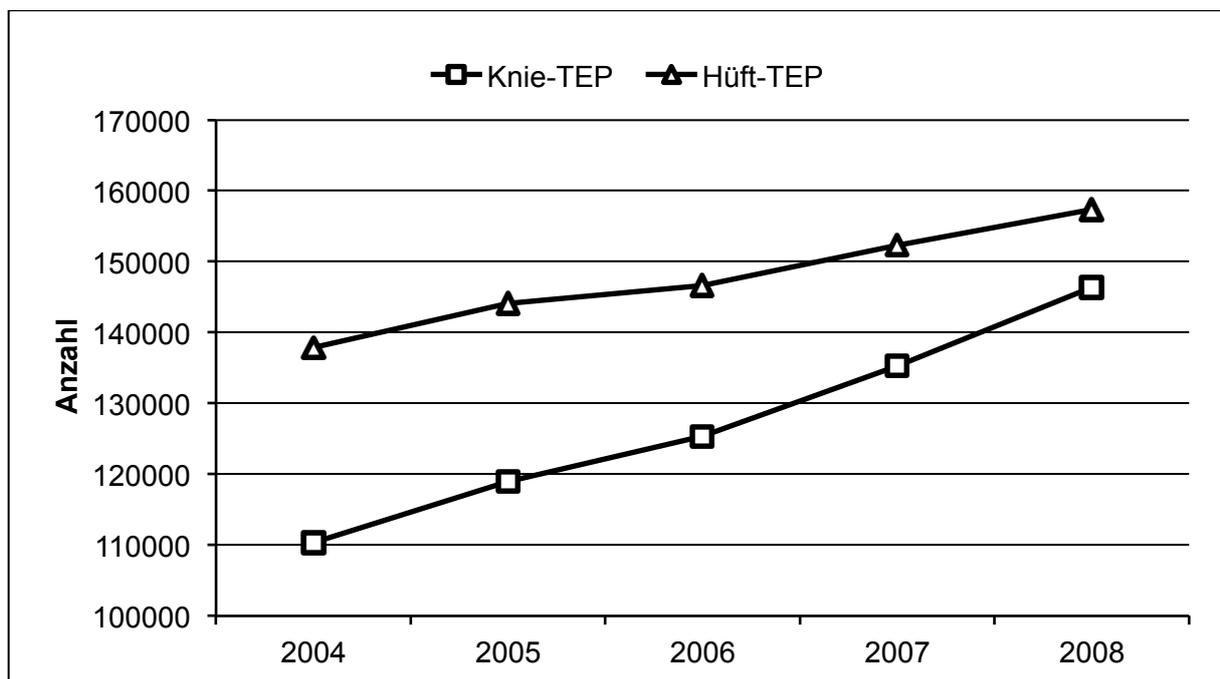


Abbildung 2.2: Anzahl der jährlich neu implantierten Hüft- und Knie-TEPs in Deutschland

(Quelle: http://www.bqsoutcome.de/2008/ergebnisse/leistungsbereiche/hueft_endo_erst/datengrundlage/0004_Vollst.html)

Aktuell zählen der totale und partielle Gelenkersatz von Hüft- und Kniegelenk zusammengenommen zu den am häufigsten durchgeführten orthopädischen Operationen (Nilsdotter and Isaksson, 2010).

Ein weiteres Merkmal für den Erfolg der Gelenkendoprothetik zeigt die heutige Marktvielfalt mit ihren vielfältigen Varianten an Prothesenausführungen, Materialien und deren Kombinationen. Heute ist die Verwendung von Mehrkomponenten-Hüft-TEPs die Regel. Sie bestehen meist aus einer azetabulären Komponente aus Metallpfanne und Polyethylän (PE)- oder Keramikinlay sowie einer zweiteiligen femoralen Komponente aus Metallstiel und Keramik-, PE- oder Metallkopf. Die Fixation im Knochen kann durch zementfreie „press-“ oder „interference-fit“ Verfahren, durch die Verwendung von Knochenzement aber auch durch die Kombination beider Techniken (sogenannte Hybridtechnik) erzielt werden. Ein ähnliches Bild zeigt sich im Bereich des endoprothetischen Kniegelenkersatzes. Auch hier erlaubt ein Mehrkomponentenaufbau der Prothese eine exakte Anpassung des Implantats an die anatomischen Gegebenheiten durch den Operateur. Die Prothese besteht meistens aus einer Tibiakomponente mit Tibiaplateau aus Metall, einer Femurkomponente aus Metall sowie einer variierbaren Gleitfläche aus Polyethylen. Zur Fixation im Knochen kommen hier ebenfalls zementfreie, zementierende oder auch kombinierte (Hybrid-) Verfahren zum Einsatz (Martin and Thornhill, 2011, Erens et al., 2013).

Insbesondere diese technische Entwicklung und Optimierung trägt zu einem großen Teil zu den aktuellen Prothesenstandzeiten bei. Sowohl bei Hüft- als auch bei Knie-TEPs kann heutzutage von einem revisionsfreien Patientenanteil von über 90% nach zehn Jahren ausgegangen werden. Nach 15 Jahren liegt dieser Anteil für beide Prothesenarten bei ca. 85 % und selbst nach mehr als 20 Jahren ist mit Standzeiten von über 70% zu rechnen (Hailer et al., 2010, Rand et al., 2003, Karrholm, 2010, Knutson and Robertsson, 2010).

2.1.2 Stellenwert für Individuum und Volkswirtschaft

Der totale Ersatz des Hüft- und Kniegelenkes zählt bezüglich der Anzahl durchgeführter Operationen, der dabei auftretenden Komplikationsrate sowie den erreichten Langzeitergebnissen zu den erfolgreichsten orthopädischen Operationsverfahren (Learmonth et al., 2007). Er bietet die effektivste Möglichkeit,

Patienten mit verschiedensten Formen schwerer Gelenkerkrankungen zu behandeln. Dies zeigt sich insbesondere in einer hohen Patientenzufriedenheit (Nilsdotter et al., 2009). Dabei liegt der direkte Nutzen für den Patienten vor allem in der Schmerzreduktion (Kirwan et al., 1994), der Verbesserung der Gelenkfunktion, der Alltagsmobilität (Gill and Joshi, 2001) sowie einer daraus resultierenden Steigerung der Lebensqualität, beschwerdefreien Lebenszeit und der Lebenserwartung. Ob und in welchem Ausmaß diese Steigerung der Lebenserwartung jedoch nur auf den durchgeführten totalen Gelenkersatz allein zurückzuführen ist, oder ob sie von der nicht repräsentativen Patientenselektion herrührt, ist allerdings fraglich (Barrett et al., 2005).

Die Steigerung der beschwerdefreien Lebenszeit kann auch zu einer Verlängerung der Arbeitszeit führen und ist damit auch von großem volkswirtschaftlichen Nutzen. Der totale Hüft- und Kniegelenkersatz ist, gemessen an der alternativen Therapie, als kosteneffektiv und aus gesellschaftlicher Sicht sinnvoller Eingriff zu werten (Lavernia et al., 1997). Zu diesem Ergebnis kommen mehrere Studien, die den Zugewinn an Lebenszeit- und Qualität, die sogenannten qualitätsadjustierten Lebensjahre (*Quality-adjusted life years*, QALYs), und die dafür aufgewendeten Kosten berechneten. Die Ergebnisse, mit Kosten von £5623/QALY (Dakin et al., 2012), AUD 12000/QALY (entspricht \$11000) (Higashi and Barendregt, 2011) und \$18300/QALY (Losina et al., 2009) für den totalen Kniegelenkersatz beziehungsweise AUD 5000/QALY (entspricht \$4600) (Higashi and Barendregt, 2011) für den totalen Hüftgelenkersatz liegen dabei weit unter den von Gesundheitsökonomern (\$30000/QALY) (Lavernia et al., 1997) und Gesundheitssystemen (£20000-30000/QALY) (Dakin et al., 2012) angegebenen Kosteneffektivitätsgrenzen. Auch die Berücksichtigung der durch den Hüft- beziehungsweise Kniegelenkersatz ansteigenden Kosten bei höherer Lebenserwartung (K-TEP: \$20800 (Losina et al., 2009)) ließen die Kosten pro QALY zwar ansteigen (H-TEP: AUD 17000 (entspricht \$15600), K-TEP: AUD 26000 (entspricht \$23800) (Higashi and Barendregt, 2011)), machten den totalen Hüft- und Kniegelenkersatz aber immer noch zu einem gesundheitsökonomisch sinnvollen Eingriff. Kritisch gesehen führt die dadurch verbundene Steigerung der Rentenzeit aber auch zu einer zusätzlichen Belastung des Gesundheitssystems und damit auch der Volkswirtschaft.

2.1.3 Komplikationen

Trotz stetiger Verbesserung von Material, Operationstechnik und Nachbehandlung kommt es bei fast zehn Prozent der mit einer Hüft- oder Knie-TEP versorgten Patienten bis zu ihrem Lebensende zu implantatassoziierten Komplikationen (Trampuz and Zimmerli, 2005). Neben der aseptischen Prothesenlockerung (ca. 75% aller Komplikationen), Luxation, periprothetischen Fraktur und Implantatfraktur (insgesamt ca. 12% aller Komplikationen) stellen insbesondere die Protheseninfektion und septische Prothesenlockerung (ca. 8% aller Komplikationen) aufgrund der aufwendigen Folgeoperationen und -behandlungen eine große Herausforderung für den Patienten selbst, den behandelnden Arzt aber auch für das gesamte Gesundheitssystem dar (Malchau et al., 2002).

2.2 Implantatlockerung

2.2.1 Ätiologie

Die genaue differentialdiagnostische Klärung der Ursache der Prothesenlockerung mündet in die Wahl der richtigen Therapie und ist damit als wesentlich für die Sicherstellung des Behandlungserfolges einer Prothesenwechseloperation zu erachten.

2.2.1.1 Aseptische nichtallergische Prothesenlockerung

Die Ätiologie der aseptischen Prothesenlockerung (häufigste Form der Auslockerung, auch umgangssprachlich als „Verschleiß“ bezeichnet) ist vielfältig und bis heute nicht abschließend geklärt. Als Hauptursache für diesen Typus des Prothesenversagens werden eine durch Partikel induzierte Lockerung sowie eine mangelnde initiale Stabilität angesehen (Erens et al., 2013, Drees et al., 2007).

Die durch Partikel induzierte Lockerung stellt die häufigste Form des aseptischen Prothesenversagens dar (Erens et al., 2013). Dabei werden die durch Materialabnutzung freiwerdenden Polyethylen-, Metall- oder Zementpartikel von Makrophagen phagozytiert. Die dadurch aktivierten Makrophagen stimulieren eine Vielzahl weiterer Zellen wie zum Beispiel Osteoklasten (Drees et al., 2007). Eine

überschießende Knochenresorption mit der Ausbildung periprothetischer Osteolysen kann resultieren und zu einer Lockerung der Prothese führen (Amstutz et al., 1992, Murray and Rushton, 1990, Baumann et al., 2008).

Eine mangelnde initiale Stabilität entsteht zum einen durch eine nicht optimale Einpassung der Prothese in den Knochen. Repetitive Mikrobewegungen verhindern in der Folge die knöcherne Integration des Implantates, was anfänglich zur Ausbildung einer periprothetischen Bindegewebsmembran führt und, nach unterschiedlich langer Latenzzeit schließlich in einer Lockerung der Prothese mündet (Hukkanen et al., 1997). Zum anderen wird für eine initiale Instabilität der frühzeitige Um- und Abbau von druckbedingt abgestorbenem Knochen gesehen. Auch hier kommt es zur Bildung einer bindegewebigen Grenzschicht um das Implantat, mit der Folge einer Migration und Auslockerung der Prothese (Aspenberg and Herbertsson, 1996).

2.2.1.2 Aseptische Prothesenlockerung mit allergischer Beteiligung

Zu der aseptischen Prothesenlockerung kann nach heutigem Kenntnisstand auch eine Hypersensitivitätsreaktion oder Implantatallergie in unterschiedlich hohem Maße beitragen. Metallionen oder Nanopartikel der Prothese (vor allem Nickel, Kobalt und Chrom) sowie Bestandteile des Knochenzements (insbesondere Gentamicin, Benzoylperoxid und Hydrochinon) führen zu einer Antigenpräsentation und können zu einer lokalen Hochregulation der Immunreaktion führen (Eben et al., 2010). Die löslichen Antikörper werden eingewanderten T-Helferzellen präsentiert und diese dadurch aktiviert. Sie lösen eine T-Zell vermittelte Hypersensibilitätsreaktion vom Spättyp (sog. Typ-IV-Hypersensibilitätsreaktion) aus (Brown et al., 2006). Anders als bei einer „klassischen“ Allergie spielt die Produktion und Bindung von Antikörpern hierbei keine Rolle. Vielmehr kommt es durch die stimulierten Immunzellen zu einer vermehrten Expression verschiedener Zytokine wie IFN- γ und IL-17. Letzteres scheint dabei eine besondere Rolle in der Entstehung der klinischen Symptome einer Prothesenlockerung als Folge einer allergischen Reaktion zu spielen (Summer et al., 2010).

2.2.1.3 Septische Prothesenlockerung

Bei der septischen Lockerung einer Prothese ist eine Besiedelung der vulnerablen Implantatoberfläche (Gristina et al., 1988) durch Bakterien, Pilze oder Viren (Geipel, 2009) als ursächlich zu erachten. Die Erreger können sowohl bei der Primärimplantation oder späteren Revisionsoperationen eingebracht werden, als auch durch eine hämatogene Streuung, beispielsweise ausgehend von einem Infekt im Kieferbereich, auf die Implantatoberfläche gelangen. Durch verbesserte Operationstechniken und eine standardisierte perioperative Antibiotikabehandlung konnte die Infektionsrate bei primär implantierten K-TEPs auf 0,8-1,9% und bei H-TEPs auf 0,3-1,7% gesenkt werden (Del Pozo and Patel, 2009). Chronische, sogenannte low-grade Infekte stellen allerdings, aufgrund ihres oft milden klinischen Verlaufs und der damit verbundenen geringeren Beachtung nach wie vor ein großes Problem dar. Die auf der Implantatoberfläche persistierenden Pathogene rufen eine zunächst lokale Immunreaktion mit den typischen klinischen Zeichen einer Entzündung und Implantatlockerung hervor.

Protheseninfektionen können unterschiedlich eingeteilt werden: Tsukayama et al. klassifiziert die septische Prothesenlockerung nach ihrem zeitlichen Auftreten (Tsukayama et al., 1996):

Tabelle 2.1: Einteilung der Protheseninfektionen nach Tsukayama et al..

Typ 1	Positive intraoperative Kulturen während des Prothesenwechsels
Typ 2	Frühe postoperative Infektion (<1 Monat nach OP)
Typ 3	Akute hämatogene Infektion (>2 Jahre nach OP)
Typ 4	Späte (chronische) Infektion (>1 Monat nach OP)

Auch kann die periprothetische Infektion therapierelevant anhand des Spektrums der das Implantat besiedelnden Keime eingeteilt werden. Virulentere Keime wie *Staphylococcus aureus* (12-28% der Infektionen) und gramnegative Bazilli (3-6%) führen häufig zu frühen postoperativen und akuten hämatogenen Infektionen. Weniger virulente Keime wie beispielsweise Koagulase negative Staphylokokken (KNASt, 30-43%) sind meist der Auslöser für späte beziehungsweise chronische Infektionen (Baumann et al., 2008, Hope et al., 1989, Trampuz and Zimmerli, 2005). Weitere bisher in diesem Zusammenhang beschriebene Keime sind (beta-

hämolsierende) Streptokokken (4-10% der Infektionen), Anaerobier (4%) und Enterokokken (3-7%) (Trampuz and Zimmerli, 2005).

2.2.2 Diagnostischer Algorithmus

Die aseptische und die septische Prothesenlockerung erfordern ein fundamental unterschiedliches therapeutisches Vorgehen (siehe 2.2.3). Die sichere präoperative Differenzierung der Versagensursache ist daher von größter Wichtigkeit zur Gewährleistung des Therapieerfolges. Zu der gewissenhaften präoperativen Diagnostik gehören deshalb eine gründliche Anamnese sowie klinische Untersuchung, die Labordiagnostik von Entzündungsparametern wie Leukozyten und C-reaktivem Protein (CRP), konventionelle Röntgenübersichtsaufnahmen (im Einzelfall auch die zusätzliche Computertomographie), die mikrobiologische und zytologische Untersuchung des Gelenkpunktes und, bei weiterhin unklarem Befund, additive bildgebende Verfahren wie zum Beispiel die 3-Phasen-Skelettszintigraphie (Mueller et al., 2008, Corvec et al., 2012). Die Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit (BSG) kommt aufgrund geringerer diagnostischer Genauigkeit zunehmend weniger zum Einsatz.

Als sicherer präoperativer Nachweis einer periprothetischen Infektion ist jedoch, sofern eine Kontamination sicher ausgeschlossen werden kann, lediglich ein positiver Keimnachweis in der mikrobiologischen Untersuchung zu werten (Bauer, 2006).

Verfahren wie die Bestimmung des CRP (Sensitivität: 0,67-1,0; Spezifität: 0,38-0,78 (Di Cesare et al., 2005, Kordelle et al., 2004, Gollwitzer et al., 2006a)) und der BSG (Sensitivität: 0,60-0,80; Spezifität: 0,63-0,65 (Barrack et al., 1997, Levitsky et al., 1991)) sowie das 3-Phasen-Skelettszintigramm (Sensitivität: 1,00 ;Spezifität: 0,05 (Larikka et al., 2001)) gelten bei hoher Sensitivität und geringer Spezifität hingegen nur als Ausschlusskriterien, da ein positives Testergebnis zwar nicht beweisend für eine periprothetische Infektion ist, ein negatives Testergebnis beziehungsweise normale Entzündungswerte eine Infektion jedoch unwahrscheinlich machen (Gollwitzer et al., 2006b).

Mit diesen aktuellen Diagnoseverfahren lassen sich mit hoher Sensitivität (bis 92%) und Spezifität (bis zu 97%, (Lachiewicz et al., 1996)) akut septische und höhergradige Infektionen relativ sicher diagnostizieren (Berbari and Baddour, 2013).

Bei den in 23-41% der Infektionen (Giulieri et al., 2004, Laffer et al., 2006) auftretenden chronischen oder Periprothetischen Low Grade Infekten (PLGI) lassen sich mit diesen Standarddiagnostika jedoch oft keine definitiven Aussagen treffen (Trampuz and Zimmerli, 2005). Das wissenschaftliche als auch klinische Interesse ist daher hier sehr groß und eine Vielzahl neuartiger Diagnosemethoden befindet sich in der Erprobung: Als vielversprechend sind in diesem Zusammenhang die Erhebung der Serumparameter IL-6 (Gallo and Kaminek, 2011) und Procalcitonin (Bottner et al., 2007, Ali et al., 2009, Glehr et al., 2013) sowie nuklearmedizinische Verfahren wie die Technetium-99m-Antigranulozytenszintigraphie (99mTc-AGS) (Kordelle et al., 2004) und die Fluor-18-Desoxyglukose-Positronenemissionstomographie (FDG-PET) (Gemmel et al., 2012) zu nennen, die durch ihre teils sehr hohe Sensitivität bei guter Spezifität als Ausschluss- beziehungsweise Diagnosekriterium dienen können (Gollwitzer et al., 2006b). Allerdings ist diesen neueren Verfahren, dem relativ sicheren intraoperativen histologischen Schnellschnittverfahren (Sensitivität: 0,95; Spezifität: 0,92) (Mueller et al., 2008) sowie der als Goldstandard geltenden mikrobiologischen und histologischen Untersuchung intraoperativ entnommener Gewebeproben (Gollwitzer et al., 2006b, Morawietz et al., 2006) gemein, dass sie auf Grund hoher Kosten, geringer Verfügbarkeit, langer Untersuchungszeiten oder erhöhter Invasivität für die präoperative Diagnostik als ungeeignet anzusehen sind.

2.2.3 Therapeutischer Algorithmus

Unabhängig von der Ätiologie der Prothesenlockerung ist eine Revisionsoperation mit ggf. additiver Therapie die einzige Möglichkeit, dem Prothesenversagen wirkungsvoll entgegen zu treten.

Bei gesicherter aseptischer Prothesenlockerung gilt der Wechsel der gelockerten Komponenten oder sogar der gesamten Prothese mit ggf. konvertieren auf ein größeres Implantat als etabliertes Vorgehen mit meist zufriedenstellenden Ergebnissen (Schaumburger et al., 2012).

Bei der aseptischen Prothesenlockerung mit fraglicher oder sogar gesicherter Hypersensitivitätsreaktion oder Allergie auf Bestandteile der Prothese ist der Wechsel sämtlicher allergener Komponenten mit konvertieren auf ein allergenarmes (z. B. aus Titan) oder -freies Implantat zu wählen. Im Einzelfall muss sogar eine individuell angefertigte Beschichtung von Implantaten in Erwägung gezogen werden.

Bei gesichertem septischen Prothesenversagen oder dem periprothetischen Infekt steht hingegen die Beherrschung der Infektion klar im Vordergrund. Als Therapieoptionen gelten dabei Debridement und Spülung des Gelenks, die Resektionsarthroplastik, die ein- oder mehrzeitigen Wechseloperationen sowie, in vitalen Notfällen oder nicht anderweitig beherrschbaren Infektsituationen, die Amputation. Die Wahl der Behandlungsstrategie hängt von der Art der Infektion (Typ1-4), den infizierenden Keimen und verschiedenen Patientenfaktoren wie z.B. dem Zustand der Prothesenfixation, der lokalen Weichteilsituation und allgemeinen Faktoren wie ASA-Score, dem psychologischen Status oder etwa dem Bedarf einer dauerhaften oralen Antikoagulation ab (Hernigou et al., 2010). In unserer Klinik wird in den meisten Fällen der septischen Prothesenlockerung eine zweizeitige Wechseloperation gewählt da diese, vor allem bei chronischen Infekten bessere Ergebnisse aufweist (Giulieri et al., 2004). In einer ersten Operation werden sämtliche Prothesenteile und sonstige Fremdkörper (Schrauben, Zement etc.) entfernt, das Wundgebiet ubiquitär debridiert und mit 6-9 Liter Spülflüssigkeit (Jet-Lavage) gespült. Im Einzelfall werden auch antibiotikahaltige Spacermaterialien als Platzhalter zur Erhaltung einer gewissen Funktionalität und Erhaltung der Beinlänge eingebracht. Das operative Spülprogramm mit jeweiligem Debridement wird solange durchgeführt, bis es zum negativen intraoperativen Keimnachweis kommt. Dies bedarf in der Regel 2 bis 3 Folgeoperationen. Additiv kommt eine testgerechte Antibiose zum Einsatz. Nach intraoperativ nachgewiesener Keimfreiheit kommt es zu einer operationsfreien und idealerweise implantatfreien Latenzphase über mehrere Wochen mit systemischer testgerechter Langzeitantibiotikatherapie und regelmäßiger blutchemischer Untersuchung der Entzündungsparameter. 2 Wochen nach Normalisierung der blutchemischen Entzündungsparameter bei klinischer Infektfreiheit erfolgt eine mikrobiologische Untersuchung des Gelenkpunktates mit 14-tägiger Bebrütung zur Erfassung auch residualer Erreger des „Low-grade“-Infektes. Bei Keimfreiheit und fehlenden systemischen Entzündungsparametern erfolgt dann schließlich die Reimplantation einer Prothese unter dem Schutz einer postoperativ verlängerten, testgerechten Antibiotikagabe (Hanssen and Rand, 1999).

2.2.4 Periprothetischer Low Grade Infekt (PLGI): Diagnostische Lücke mit Gefahr der falschen Therapieentscheidung

Eine häufige Form der septischen Prothesenlockerung stellt der sog. „Low-grade“ Infekt dar. Bei dieser Form der Implantatinfektion kommt es nach einem relativ langen symptomfreien Intervall zu Schmerzen ohne eine akute, klinisch auffällige Exazerbation der Infektion (Baumann et al., 2008). Die in der Regel niedrig virulenten Erreger des PLGI adhären an der Implantatoberfläche und bilden einen Biofilm aus Ionen, Metallen und exozellulären Produkten. Dieser Biofilm schützt die Erreger nicht nur vor der Immunreaktion des Körpers, sondern auch vor einer lokalen oder systemischen Antibiotikatherapie (Gollwitzer, 2002). Außerdem führt er dazu, dass die Bakterien in eine Art Ruhezustand übergehen, der wiederum ein langes Überleben der Organismen ermöglicht und das lange symptomfreie Intervall erklärt. Gelegentlich kann es zu einem Übergang der sessilen Bakterien in ihre planktonische Form kommen, bei welcher sich die Bakterien von der Oberfläche und dem Biofilm ablösen. Klinisches Korrelat ist die Entzündungsreaktion und somit die Stimulation der lokalen und ggf. auch systemischen Immunabwehr (Frommelt, 2008). Dies kann in einer ausgeprägten Schmerzsymptomatik mit Zeichen der Prothesenlockerung und größtenteils nur gering oder unspezifisch erhöhten systemischen Entzündungsparametern resultieren. Ein zur sicheren Differentialdiagnose erforderlicher Keimnachweis im Gelenkpunktat gelingt dabei auch bei verlängerter Inkubationszeit nur in ca. 80% der Fälle (Wodtke and Lohr, 2008).

Die daraus vielfach resultierenden, präoperativ falsch negativen Diagnosen können fatale Folgen haben. So zieht eine fälschlicherweise angewandte, einzeitige Wechseloperation bei präoperativ nicht erkannter Infektion weitere unnötige Eingriffe nach sich, die das Leiden der Patienten zusätzlich, im Einzelfall bis hin zur vitalen Gefährdung, erhöhen und mit beachtlichen volkswirtschaftlichen Kosten verbunden sind (Wodtke et al., 2005).

2.3 Antimikrobielle Peptide (AMP)

„Antimikrobielle Peptide“ bezeichnet eine Gruppe von Peptiden, welche die Fähigkeit besitzen, das Wachstum von Mikroorganismen zu hemmen oder diese abzutöten

(Radek and Gallo, 2007). Als Produkt der Langzeitevolution agieren sie als einer der erster Abwehrmechanismen des angeborenen/unspezifischen Immunsystems (Gallo and Nizet, 2008). Nach der Erstbeschreibung einiger AMPs durch Glynn, Zeya und Spitznagel in den sechziger Jahren (Zeya and Spitznagel, 1966, Glynn and Milne, 1965) werden heute alle bekannten AMPs in der „Antimicrobial Peptide Database“ aufgelistet. Sie umfasst zum 24.11.2013 insgesamt 2319 verschiedene AMPs ((Wang et al., 2009);Database).

2.3.1 Klassifikation

Es existieren mehrere Klassifikations- und Einteilungsmöglichkeiten von antimikrobiellen Peptiden. Neben Vorkommen und funktionellen Eigenschaften wird mehrheitlich ihre Peptidstruktur zur genauen Klassifikation herangezogen.

Generell handelt es sich bei den AMPs um weniger als 50 Aminosäuren lange, positiv geladene Peptide (Hancock, 2001). Die zwei bekanntesten Peptidgruppen sind die Defensine und die Cathelicidine. Die Gruppe der Defensine zeichnet sich dabei durch drei enthaltene Disulfidbindungen aus. Basierend auf deren Ausbildung unterteilt man sie weiter in α - und β -Defensine. Das einzige beim Menschen vorkommende Cathelicidin LL-37/hCAP-18 weist, wie alle Peptide dieser Gruppe, eine evolutionär stark konservierte N-terminale Cathelin-Domäne auf, die die Speicherung der aktiven C-terminalen Domäne ermöglicht. Sie entfaltet ihre Wirkung erst nach Abspaltung durch eine Protease (Bowdish et al., 2006).

2.3.2 Wirkmechanismus und -spektrum

Die mehrheitliche Wirkungsweise von AMPs ist ein direkter antimikrobieller Effekt. Die kationischen Peptide werden durch die negativ geladene Hülle bzw. Membran der Bakterien angezogen. Nach ihrer Bindung an die Bakterienmembran und einer anschließenden Polymerisation kommt es zu einer Störung der Bakterienmembranintegrität durch die Bildung von Poren (Abb. 2.3 (Lai and Gallo, 2009)). Die Fassauben-, Ringkörper- und Teppichmodelle gelten als wahrscheinlichste Mechanismen dieser Porenbildung (Palffy et al., 2009).

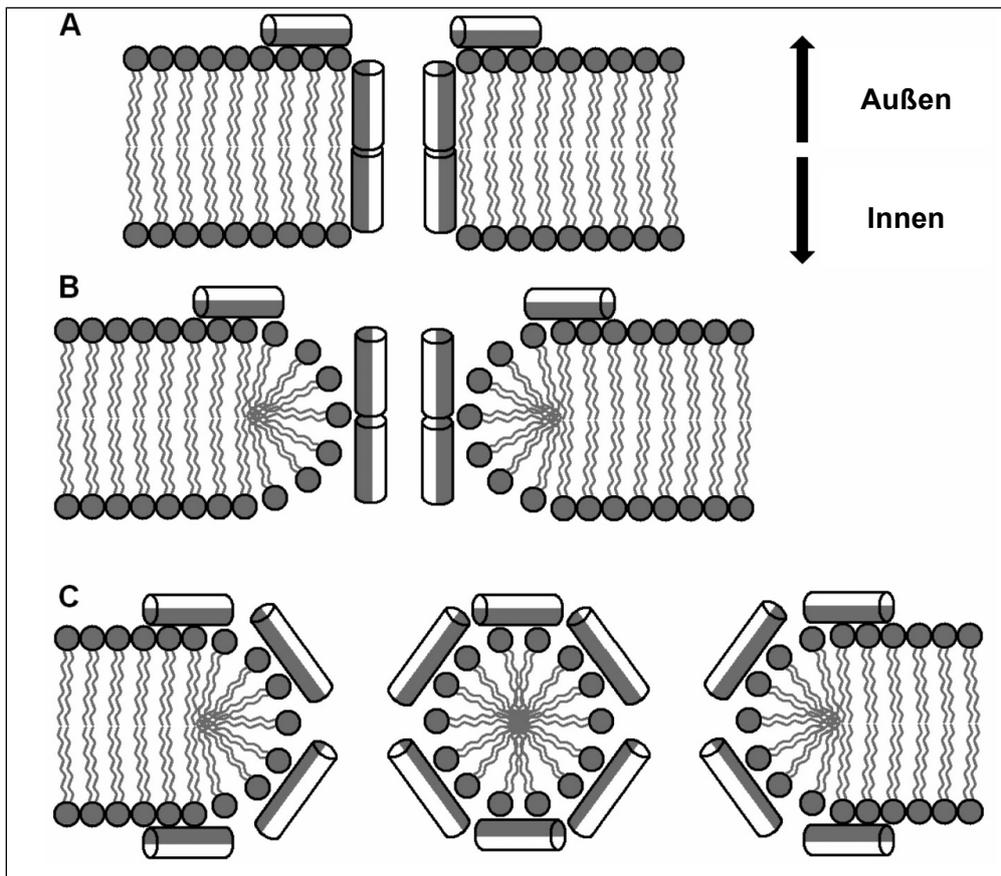


Abbildung 2.3: Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide – Porenbildung. AMPs werden durch die Zylinder dargestellt. Der graue Teil entspricht hydrophobischen Bereichen, der weiße hydrophilen Bereichen der bakteriellen Zellwand. (A) Fasstdaubenmodell (Barrel-stave model); (B) Ringkörpermodell; (C) Teppichmodell. (aus (Palfy et al., 2009))

Weitere direkte antimikrobielle Wirkungsweisen der AMPs umfassen die Inaktivierung der bakteriellen Lipopolysaccharide durch Bindung an ihre Endotoxinreste, die Inhibierung der bakteriellen DNA- und/oder Proteinsynthese sowie die Beeinflussung bakterieller mitochondrialer Prozesse (Palfy et al., 2009, Guani-Guerra et al., 2010).

Zusätzlich zu ihrer direkten antimikrobiellen Wirkung zeigen AMPs auch ein breites Spektrum weiterer Wirkungsweisen. So aktivieren sie Wundheilungsprozesse und die Angiogenese, stimulieren die Produktion und Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Zytokinen, wirken chemotaktisch und fördern durch Oponierung die Phagozytose von Mikroorganismen. Sie fungieren somit als wichtiges Bindeglied zwischen dem unspezifischen und spezifischen Immunsystem (Elsbach, 2003).

Das Wirkspektrum antimikrobieller Peptide ist extrem weit gefächert (Abb. 2.4). So erstreckt sich ihre Wirksamkeit nicht nur gegen Bakterien, Pilze und Viren, sondern

auch gegen Tumorzellen und den HI-Virus, und es wurden auch antiparasitäre, chemotaktische, insektizide und spermizide Peptide beschrieben ((Wang et al., 2009), Database).

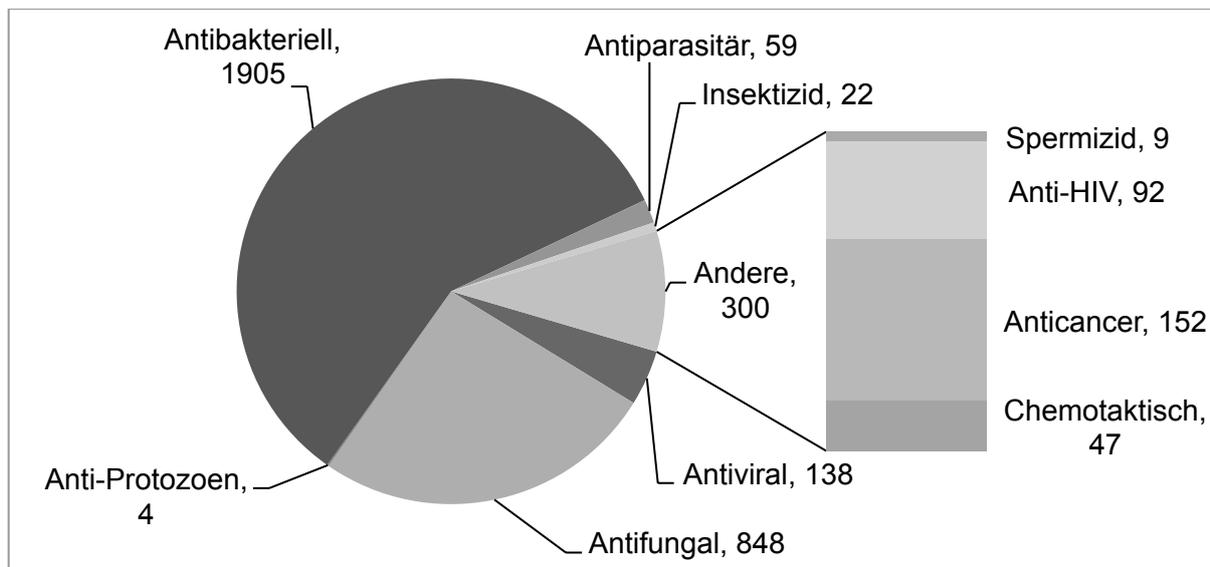


Abbildung 2.4: Wirkspektrum antimikrobieller Peptide. (Stand: 24.11.2013, (Wang et al., 2009), Database)

2.3.3 AMPs und Gelenkinfektionen

Als Teil des unspezifischen Immunsystems zeigt sich vor allem in Leukozyten und einer Vielzahl verschiedener Epithelien eine konstitutive Expression von AMPs. Ferner reagieren einige Gewebe auf Verletzung, Entzündung (Dorschner et al., 2001) und andere Milieustimuli wie beispielsweise einem erhöhten Vitamin-D₃-Gehalt mit einer gesteigerten AMP-Expression (Schauber et al., 2006).

2.3.3.1 Lokale AMP-Expression im Gelenk

Neben ihrem Vorkommen in Abwehrzellen und Epithelien konnten einige Arbeiten die sowohl konstitutive als auch stimulierbare Expression von AMPs in weiteren Gewebe- und Zelltypen mesenchymalen Ursprungs nachweisen, wo sie ebenfalls Aufgaben der lokalen Immunabwehr übernehmen. So zeigen sich in Fibroblasten mit

IP-10/CXCL10 (Proost et al., 2003), Osteozyten bzw. -blasten mit β -Defensinen (Varoga et al., 2008, Varoga et al., 2009, Warnke et al., 2006), Chondrozyten bzw. -blasten mit β -Defensinen (Paulsen et al., 2001) und Synoviozyten mit β -Defensinen (Bokarewa et al., 2003, Paulsen et al., 2002, Paulsen et al., 2001) (Varoga et al., 2004, Varoga et al., 2005a, Varoga et al., 2005b, Proost et al., 2003) erhöhte AMP-Spiegel. Darüber hinaus erbrachten Paulsen et al. den Nachweis, dass sich zum einen die AMP-Expression in der Synovialmembran gesunder gegenüber erkrankter Gelenke unterscheidet und zum anderen, dass das AMP-Expressionsmuster von der Art der Gelenkentzündung (Arthritis) abhängt (Paulsen et al., 2002). Insbesondere die AMPs Humanes Beta Defensin 2 (HBD2), HBD3 und Cathelicidin LL-37 waren bei gesunden Probanden nicht nachzuweisen, zeigten aber unterschiedlich erhöhte Expressionsspiegel bei Osteoarthritis, rheumatoider und pyogener Arthritis. Genau dieses unterschiedliche Muster macht die drei AMPs für eine mögliche Unterscheidung zwischen aseptischen und septischen Prothesenlockerungen bzw. Diagnosesicherung periprothetischer Infektionen attraktiv.

Tabelle 2.2: Muster der in der Synovialmembran nachweisbaren AMPs (Paulsen et al., 2002). Nachweis mittels Immunhistochemie und/oder PCR.

Marker	Gesund	Pyogene Arthritis	Osteoarthritis	Rheumatogene Arthritis
HBD2	-	-	+	+
HBD3	-	+	+	-
LL-37	-	-	+	+

2.3.3.2 Systemische AMP-Expression im Blut

Die vordergründige Aufgabe der antimikrobiellen Peptide liegt in der lokalen Immunabwehr. Dies spiegelt sich in den bereits erwähnten, vielfach lokalen Nachweisen verschiedener AMPs, wie zum Beispiel im Gelenk und Knochen, in der Haut und im Gastrointestinaltrakt wider. Allerdings konnte in einigen wenigen Arbeiten auch der Nachweis einer gesteigerten systemischen Expression einzelner AMPs erbracht werden. So zeigten De Smet et al. sowie Hollox et al., dass beispielsweise HBD2 von überall vorkommenden Leukozyten exprimiert wird (De Smet and Contreras, 2005, Hollox et al., 2003). Diese Expression wurde dabei von verschiedenen proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α (Harder et al., 1997, Yin et

al., 2010, Varoga et al., 2006b), IL-1b (Harder et al., 1997, Yin et al., 2010, Varoga et al., 2006a, Bajaj-Elliott et al., 2002), IL-6 (Varoga et al., 2006a) und IFN- γ (Duits et al., 2002) beeinflusst. Auch die Ergebnisse von Vordenbaumen et al. stützen die Annahme einer systemischen Rolle einzelner AMPs zusätzlich. Sie konnten bei Patienten mit Wegener-Granulomatose ebenfalls eine signifikante Erhöhung der systemischen HBD2-Konzentration nachweisen (Vordenbaumen et al., 2011).

3 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Die sichere Differenzierung zwischen der septischen und aseptischen Endoprothesenlockerung ist Voraussetzung für die Wahl der richtigen Therapie und Gewährleistung des Therapieerfolges. Insbesondere der klinisch meist stumme Periprothetische Low Grade Infekt (PLGI) stellt jedoch eine große Herausforderung für die gegenwärtigen Standarddiagnostika dar. Selten kommt es hier, trotz chronischer Bakterienpersistenz, zum Keimnachweis. Falsch negative Befunde mit diagnostischen und therapeutischen Irrgängen können resultieren und schlussendlich fatale Konsequenzen für den Patienten zur Folge haben. Der Bedarf neuartiger und im Alltag praktikabler Infektdiagnostika ist, vor allem vor dem Hintergrund der ständig steigenden Anzahl an Prothesenimplantationen, offensichtlich. Die Funktion von antimikrobiellen Peptiden (AMPs) als fester Bestandteil der lokalen Immunabwehr sowie die sowohl konstitutiv als auch induzierbare Expression von AMPs in Knochen-Knorpel- und Synovialzellen legt die Vermutung nahe, dass es auch bei implantatassoziierten Gelenkinfektionen zu einer diagnostisch relevanten, lokalen Erhöhung von AMPs kommt. Insbesondere die AMPs Humanes Beta Defensin (*human beta defensin*, HBD) 2, HBD3 und aktives humanes Cathelicidin (LL-37) scheinen, aufgrund ihrer unterschiedlichen Expressionserhöhung in der Synovialmembran von unter verschiedenartigen Arthritiden leidenden Patienten gegenüber gesunden Patienten, als neuartige Infektparameter prädestiniert zu sein. Aufgrund der klinischen Praktikabilität sollte der Nachweis im Gelenkpunktat gegenüber der invasiven und zeitintensiven Gewebegewinnung bevorzugt werden. Ziel der Arbeit war es daher, erstmalig die Konzentration von AMPs (HBD2, HBD3 und LL-37) in der Gelenkflüssigkeit und im Serum von Patienten mit gesicherter septischer und aseptischer Prothesenlockerung zu vergleichen, und damit deren möglichen Nutzen für die präoperative Diagnostik von implantatassoziierten Infektionen zu evaluieren. Ferner sollten die Spiegel von in diesem Kontext bereits beschriebenen, aber auch von anderen, bisher nicht damit in Verbindung gebrachten proinflammatorischen Zytokinen, in der Gelenkflüssigkeit und im Serum von Patienten mit gesicherter septischer und aseptischer Prothesenlockerung gegenübergestellt werden. Schließlich sollte die diagnostische Genauigkeit dieser AMPs und Zytokine mittels Berechnung der Fläche unterhalb der Kurve (AUC) in einer Grenzwertoptimierungskurve (ROC) einzeln und mittels logistischer

Regressionsanalyse in Kombination erhoben und mit gegenwärtigen Standarddiagnostika verglichen werden.

4 MATERIAL UND METHODEN

4.1 Studiendesign

Im Zeitraum von Februar bis Dezember 2009 wurde an der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München eine prospektive monozentrische Studie mit Genehmigung der lokalen Ethikkommission (Studennummer 2544/09) und finanzieller Förderung durch die Kommission für Klinische Forschung der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München (KKF-Projektnummer 08/09) durchgeführt.

In dieser kontrollierten klinischen Studie wurden 43 konsekutive Patienten, bei denen eine aseptische oder infektionsbedingte Lockerung ihrer Knie- oder Hüft-Totalendoprothese (K- bzw. H-TEP) eine Revisionsoperation notwendig machte, untersucht. Patienten, welche die Einschlusskriterien erfüllten sowie ihr Einverständnis schriftlich erklärten, wurden in die Studie aufgenommen.

Eine präoperativ gewonnene, venöse Blutprobe und eine prä- bzw. intraoperativ im Rahmen des normalen Operationsablaufs gewonnene Gelenkflüssigkeitsprobe der Patienten wurde auf den Gehalt ausgewählter AMPs und proinflammatorischer Zytokine untersucht. Zusätzlich wurde eine mikrobiologische Untersuchung der entnommenen Gelenkflüssigkeit und Gewebe und eine histopathologische Untersuchung der intraoperativ gewonnenen Gewebeproben vorgenommen.

4.2 Diagnosesicherung

Ausgangspunkt des Diagnoseprozesses war eine gründliche Anamneseerhebung sowie die klinische Untersuchung der Patienten. Diese wurde durch etablierte Standardverfahren zur Diagnose von Endoprothesenlockerungen (Röntgenübersichtsaufnahme, im Einzelfall Szintigraphie) und durch weitere differentialdiagnostische Nachweise zur Eingrenzung eines septischen versus aseptischen Geschehens (blut- und gelenkflüssigkeitschemische Entzündungsparameter, mikrobiologische Untersuchung von Gelenkpunktat und Gewebeproben mit 14-tägiger Bebrütung, histopathologische Untersuchung der Pseudokapsel) ergänzt.

Die endgültige Diagnose einer septischen Prothesenlockerung erfolgte durch mindestens einer der folgenden Kriterien:

- (1) Darstellung eines vorhandenen Fistelgangs
- (2) Nachweis von zwei positiven Hauptkriterien
- (3) Nachweis von einem positiven Hauptkriterium und mindestens einem positiven Nebenkriterium

Als positives Hauptkriterium galten dabei ein intraoperativer Keimnachweis sowie eine positive histopathologische Einteilung (Typ II / III nach Morawietz (Morawietz et al., 2006)). Als positives Nebenkriterium wurde ein CRP von > 1,0 mg/dl sowie ein Keimnachweis im Gelenkpunktat gewertet (Tab. 4.1, (Gollwitzer et al., 2006b)).

Tabelle 4.1: Haupt und Nebenkriterien der Diagnosesicherung von Implantatinfekten.

Hauptkriterien:	Nebenkriterien
- Intraoperativer Keimnachweis	- CRP > 1,0 mg/dl
- positive histopathologische Einteilung (Typ II/III nach Morawietz)	- Keimnachweis im Gelenkpunktat

4.2.1 Anamnese und klinische Untersuchung

Als Hinweise auf das Vorliegen einer septischen Prothesenlockerung wurden Komplikationen bei der Wundheilung, eine zurückliegende Antibiotikabehandlung, eine persistierende Wundsekretion und andauernde Schmerzen seit der Implantation gewertet (Gollwitzer et al., 2006b). Ebenso galten frühzeitig (< 2 Jahre postoperativ) neu aufgetretene Bewegungseinschränkungen sowie Nacht- und Ruheschmerzen bei initial mindestens dreimonatiger Beschwerdefreiheit als Anhaltspunkt für ein infektiöses Geschehen (Gollwitzer et al., 2006b). Unspezifische klinische Befunde wie eine postoperativ persistierende schmerzhafte Bewegungseinschränkung, Schwellung, intraartikuläre Ergussbildung, Rötung und (sub-)febrile Temperaturen ließen differentialdiagnostisch ebenfalls an eine septische Prothesenlockerung denken.

Als eindeutiges Infektzeichen wurde jede Fistel gewertet. Durch die direkte Verbindung zur Haut ist von einer bakteriellen Besiedlung der Endoprothese auszugehen (Gollwitzer et al., 2006b).

4.2.2 Radiologische Verfahren

Die radiologische Routinediagnostik mittels Beckenübersichts- und axialer Hüftgelenksaufnahme bzw. Kniegelenksaufnahme in zwei Ebenen erfolgte im Institut für Radiologie der TU München. Sie wurde sowohl vom radiologischen als auch orthopädischen Facharzt ausgewertet.

Neben offensichtlichen Anzeichen für implantatassoziierte Komplikationen wie Dislokation und Fraktur des Fremdmaterials bzw. Knochens wurden die Kriterien nach Pluot et al. (Pluot et al., 2009) zur Diagnose einer möglichen H-TEP-Lockerung herangezogen:

- mehr als 2 mm breiter, strahlendurchlässiger/röntgennegativer Osteolysesaum um das Knochen-Metall- bzw. Knochen-Zement-Interface
- größenprogredienter strahlendurchlässiger Bereich um das Metall-Zement-Interface
- gut abgrenzbare fokale röntgennegative Osteolyseareale am Knochen-Metall- bzw. Knochen-Zement-Interface
- „Pedestal-Zeichen“ : Endostale Sklerosierung an der Spitze des Femurschafts (nur in Verbindung mit weiteren Zeichen, da alleine nicht wegweisend)
- progredienter Metallabrieb ("Progressive metal bead shedding")
- Absinken der Prothese von mehr als 10 mm oder fortschreitende Neigung des femoralen Anteils
- Pfannenwanderung
- Zementfrakturen
- asymmetrische Stellung des Femurkopfes im der acetabulären Komponente

Analoge Kriterien wurden bei der radiologischen Evaluation einer möglichen K-TEP-Lockerung angewandt.

In zweifelhaften Fällen wurde zusätzlich die Computertomographie mit hoher fokaler Auflösung und die Szintigraphie mit lokaler Anreicherung bei Endoprothesenlockerung eingesetzt.

4.2.3 Blutchemische Entzündungsparameter

Bei der laborchemischen Routineanalyse der präoperativ gewonnenen Blutproben wurden im Institut für Klinische Chemie der TU München die Entzündungsparameter C-reaktives Protein (CRP) im Serum und die Leukozytenzahl bestimmt. Die Überschreitung der Grenzwerte (CRP > 0,5 mg/dl, Leukozytenzahl > 9000 G/l) diente als Hinweis auf ein entzündliches Geschehen.

4.2.4 Mikrobiologische Diagnostik

Die mikrobiologische Untersuchung im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München gliederte sich in zwei Teile.

In einem ersten Schritt wurde bei Verdacht auf eine Infektion der Prothese das betroffene Gelenk vor der Operation und vor Antibiotikagabe unter sterilen Kautelen punktiert. Wurde von einer aseptischen Prothesenlockerung ausgegangen, erfolgte die Punktion vor der Eröffnung der Gelenkkapsel im Rahmen der Wechseloperation. Das gewonnene Punktat wurde anschließend unter verlängerter, 14-tägiger anaerober sowie aerober Bebrütungszeit auf Erreger untersucht. Kam es zu einem positiven Keimnachweis, wurde dies als Hinweis auf das Vorliegen einer Protheseninfektion gewertet.

In einem zweiten Schritt wurden die unter sterilen Bedingungen intraoperativ entnommenen Gewebeproben mikrobiologisch evaluiert. Zu diesem Zweck wurden von jedem Patienten mindestens sechs Proben unterschiedlicher Lokalisationen auf Keimwachstum unter verlängerter, 14-tägiger anaerober sowie aerober Bebrütungszeit untersucht. Ein positiver Keimnachweis im intraoperativ entnommenen Gewebe galt als Hauptkriterium für das Vorliegen einer Protheseninfektion.

4.2.5 Zytologie des Gelenkpunktats

Eine routinemäßige Untersuchung der Zellzahl und Zelldifferenzierung des Gelenkpunktates wurde nicht durchgeführt. Lediglich der Verdacht auf einen Periprothetischen Low Grade Infekt (PLGI), sowie nicht eindeutige Befunde der restlichen präoperativen Untersuchungen hatten eine zytologische Untersuchung des

Gelenkpunktats zur Folge. Ein Leukozytengehalt des Gelenkpunktates von $>1,7 \times 10^3/\mu\text{l}$ wurde dabei als infektverdächtig gewertet (Trampuz and Zimmerli, 2005).

4.2.6 Histopathologische Diagnostik

Die histopathologische Untersuchung im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München wurde an ebenfalls intraoperativ gewonnenem Gewebe (Knochen-Implantat-Interface und Pseudokapsel) durchgeführt. In einem ersten Schritt wurde das Gewebe auf das Vorhandensein von Fremdmaterialpartikel und Entzündungszellen mit gegebenenfalls genauer Spezifizierung derselben untersucht. Anschließend wurde die periprothetische Interface Membran anhand der Kriterien von Morawietz et al. (Tab. 4.2, (Morawietz et al., 2006)) in eine der vier möglichen Typen eingeteilt.

Tabelle 4.2: Histopathologische Klassifikation der periprothetischen Interface Membran (Morawietz et al., 2006).

Periprothetische Membran	Nachweisbare Zellen	Nachweisbare Partikel
Abriebtyp (Typ I)	<ul style="list-style-type: none"> -Vornehmlich Makrophagen -Mehrkernige Riesenzellen -Bilden mehr als 20 % der Membranoberfläche 	<ul style="list-style-type: none"> -PE-Partikel -PMMA Knochenzementfragmente -Metallabriebpartikel -Polygonale Keramikpartikel
Infektionstyp (Typ II)	<p><u>Manifeste Infektion:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> -Vielzahl von neutrophilen Granulozyten in ödematös geschwollenem Bindegewebe <p><u>PLGI:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> -Neutrophile Granulozyten, Plasmazellen und Lymphozyten in chronischem Granulationsgewebe -Aktivierte Fibroblasten, Neovaskularisationen 	Keine Partikel nachweisbar

kombinierter Typ (Typ III)	-Areale wie in Typ I -Areale wie in Typ II -Gleich häufig	Teilweise Partikel wie im Typ I
Intermediärer Typ (Typ IV)	-Zellarmes, kollagenreiches Bindegewebe -Wenige oberflächliche neutrophile Granulozyten -Randzone fibrinreich oder gekennzeichnet durch eine Fibroblasten- und Makrophagenschicht	Keine Partikel nachweisbar

Eine periprothetische Membran vom Typ I gilt als Hinweis auf eine abriebinduzierte aseptische Prothesenlockerung. Periprothetische Membranen vom Typ II und III weisen eine infektiös bedingte Lockerung der Prothese nach. Eine Besonderheit stellt die periprothetische Membran vom Typ IV dar. Sie liefert weder Anhaltspunkte für ein septisches Geschehen, noch deuten Fremdmaterialpartikel auf eine abriebinduzierte Lockerung hin. Vielmehr spiegelt das kollagenreiche Bindegewebe einen aseptischen Vernarbungsprozess wider.

4.3 Patientenrekrutierung

Im Zeitraum von Februar bis Dezember 2009 wurden insgesamt 43 konsekutive Patienten, bei denen auf Grund einer aseptischen Prothesenlockerung oder einer periprothetischen Infektion eine Revisionsoperation geplant war, primär überprüft. 35 von 43 Patienten erfüllten die Einschlusskriterien und wiesen keine Ausschlusskriterien auf und wurden somit in die vorliegende Studie eingeschlossen.

4.3.1 Einschlusskriterien

Die Kriterien für den Einschluss in die Studie waren eine geplante Revisionsoperation aufgrund septischer oder aseptischer Lockerung der H- bzw. K-TEP oder aufgrund vermuteter periprothetischer Infektion ohne Lockerung der Prothese. Innerhalb der Patienten mit periprothetischer Infektion wurden nur solche mit mikrobiologisch positivem Staphylokokkennachweis oder makroskopisch eitrigem Infekt eingeschlossen, um dieses Kollektiv hinsichtlich der zu untersuchenden AMP-

Expression möglichst homogen zu halten. Ferner galt ein Intervall von mindestens drei Monaten zwischen Primärimplantation und Revision als Einschlusskriterium.

4.3.2 Ausschlusskriterien

Die Ausschlusskriterien der Studie waren eine Infektion mit anderen Keimen als Staphylokokken und das Vorhandensein von weiteren, nicht mit dem untersuchten Gelenk in Verbindung stehenden Infektionen. Des Weiteren wurden Patienten, bei denen eine Autoimmunerkrankung oder andere entzündliche Erkrankungen wie Psoriasis oder Gicht bestand, nicht in die Studie aufgenommen. Auch ein nur teilweise erfolgter endoprothetischer Gelenkersatz und eine bereits bekannte Allergie gegen Implantate, Metall oder Knochenzementbestandteile stellten ein Ausschlusskriterium dar. Schließlich führte eine in den letzten zwei Monaten vor der Revisionsoperation durchgeführte Antibiotikabehandlung und/oder eine in den letzten drei Monaten vor der Revisionsoperation durchgeführte operative Versorgung zum Ausschluss des Patienten von der Studie.

4.4 Studienablauf

Zusätzlich zu den präoperativ durchgeführten, oben genannten standardisierten Routineuntersuchungen zur Diagnosesicherung einer Prothesenlockerung und Differenzierung zwischen aseptischer Lockerung und Lockerung aufgrund einer Protheseninfektion, wurden von jedem Studienteilnehmer 15 ml venöses Blut und 5-15 ml Gelenkflüssigkeit entnommen.

Bei Patienten mit aseptischer Lockerung wurde die Blutprobe unmittelbar vor dem geplanten Eingriff gewonnen. Die Gelenkflüssigkeit dieser Patienten wurde im Rahmen des normalen Operationsablaufs unter sterilen Bedingungen entnommen. Um einer Verunreinigung mit Blut entgegen zu wirken, wurde die Gelenkkapsel kurz vor der Eröffnung des Gelenks direkt punktiert.

Bei Patienten mit Protheseninfektion wurde darauf geachtet, dass sowohl die Blut- als auch die Gelenkflüssigkeitsprobe (Punktion unter sterilen Kautelen) vor Antibiotikagabe gewonnen wurde.

Sofort nach Entnahme der Blutprobe wurde diese identisch zu der Serumgewinnung im klinischen Alltag bei 4 °C und 3000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das nach

Absammeln des Überstands gewonnene Serum wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

Bis auf das Zentrifugieren wurde mit der Synovialflüssigkeit in gleicher Weise verfahren.

Die Proben wurden nach Vorlage aller Patientenproben in die Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig Maximilians Universität München zur Messung der Zytokin- und AMP-Konzentration verbracht.

Des Weiteren wurden intraoperativ mindestens sechs Gewebeproben zur mikrobiologischen Diagnosesicherung sowie weitere Proben zur histopathologischen Untersuchung entnommen. Erstere wurden dabei im Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Hygiene der TU München, letztere im Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der TU München untersucht.

4.5 Messung der Zytokinspiegel

Zusätzlich zur Standarddiagnostik wurden die Expressionsspiegel verschiedener Zytokine in jeweils einer Blut- und Synoviaprobe jedes Patienten ermittelt. Die Messung erfolgte an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig Maximilians Universität München mit Hilfe des Cytometric Bead Array™ (CBA; BD Biosciences, Heidelberg, Germany). Bei dieser Art von Test werden mittels Durchflusszytometrie Mikropartikel anhand ihrer Oberflächenstruktur und Zusammensetzung differenziert und quantifiziert. Gegenüber der auf ELISA basierenden Zytokinmessung hat der CBA unter anderem den Vorteil, dass in einer Messung die Konzentrationen von bis zu 30 verschiedenen Zytokinen auf einmal ermittelt werden können. Dies hat zur Folge, dass sowohl eine geringe Probenmenge für die Untersuchung mehrerer Zytokinkonzentrationen ausreicht und weniger Zeit für die Testdurchführung benötigt wird, da mehrfach auszuführende Arbeitsschritte entfallen (Chen et al., 1999).

Die Grundlage des CBA bilden Mikroperlen mit identischer Größe. Diese unterscheiden sich anhand der gebundenen Fangantikörper. Mikroperlen mit identischen Fangantikörpern weisen dabei jedoch identische optische Eigenschaften auf. Kommt es nun zur Bindung des gesuchten Antigens an den Fangantikörper der Mikroperle, kann diese Reaktion mittels Durchflusszytometrie sicher detektiert und

quantifiziert werden (Tarnok et al., 2003). In dieser Studie wurden die Konzentration der Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-17A, TNF α und IFN- γ bestimmt.

4.6 Messung der AMP-Spiegel

Die Bestimmung der AMP-Spiegel fand an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der Ludwig Maximilians Universität München statt. Zum Vergleich der AMP-Expressionslevel in Blutserum und Gelenkflüssigkeit von Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung und Protheseninfektion wurde die Konzentrationen der AMPs Humanes Beta Defensin (*human beta defensin*, HBD) 2, HBD3 und aktives humanes Cathelicidin (LL-37) in den entsprechenden Patientenproben mittels ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) gemessen (LL-37: Human ELISA-KIT Hycult® Biotechnologies, Uden, The Netherlands; HBD2/HBD3: Peprotech, Rocky Hill, NJ, USA).

Bei dieser Messmethode binden die zu analysierenden AMPs als Antigene an spezifisch gegen sie gerichtete Antikörper, die auf einer Mikrotiterplatte fixiert sind. Dieser erste Schritt dient der Immobilisation der zu messenden AMPs. Anschließend wird ein biotinierter polyklonaler Antikörper hinzu gegeben, welcher wiederum spezifisch an das AMP bindet. Darauf folgt die Zugabe von mit Meerrettichperoxidase (HRP, „horseradish peroxidase“) markiertem Streptavidin bzw. einem Streptavidin-Peroxidase-Konjugat, wodurch es zu einer Biotin-/Streptavidinwechselwirkung und zum Ablauf einer Peroxidasereaktion kommt. Das dabei anfallende Produkt führt zur Änderung der optischen Eigenschaften der Testlösung, die dann photometrisch bei 450nm gemessen werden kann. Die Menge der in der Proxidasereaktion entstandenen Produkte verhält sich dabei direkt proportional zur Menge der gebundenen AMPs. Aus diesem Grund ist es möglich, mit dem Ergebnis der photometrischen Messung die Konzentration des zu analysierenden AMPs zu bestimmen.

4.7 Statistik

Der Vergleich der gemessenen AMP- und Zytokinkonzentrationen in Gelenkflüssigkeit und Blutserum von Patienten mit aseptischer gegenüber Patienten mit infektionsbedingter Lockerung ihrer Knie- oder Hüft-Totalendoprothese wurde in

Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München (Dr. Alexander Hapfelmeier) durchgeführt. Für eine konsistente Schätzung von Effekt- und Lagemaßen, Variabilität und Konfidenzintervallen, welche den Schwerpunkt dieser explorativen Datenanalyse ausmachten, waren die Gruppengrößen mit 20 und 15 Patienten ausreichend. Die Annahme einer Normalverteilung der Messergebnisse musste nach grafischer Beurteilung (Boxplot, Histogramm) verworfen werden. Vielmehr zeigte sich eine asymmetrische Verteilung der Ergebnisse mit Vorhandensein von Ausreißern. Daher wurden als geeignete deskriptive Statistiken für Lage- und Streuungsmaße Median und Interquartilsabstand gewählt. Zusätzlich wurde das 95%-ige Konfidenzintervall des Medians ermittelt. Zur Darstellung der Zytokinwerte wurden jedoch, aufgrund der großen Anzahl der bestimmten Werte, zur besseren Übersicht Säulendiagramme und Standardabweichung eingesetzt (siehe Abb. 5.5, 5.6).

Die erhobenen Unterschiede wurden mittels Mann-Whitney-U Test auf statistische Signifikanz überprüft. Der Test ist für jede Art von Messergebnisverteilung anwendbar und zeichnet sich durch seine Robustheit gegenüber Ausreißern aus. Aufgrund zahlreich vorhandener Bindungen (exakt gleiche Werte des Expressionsspiegels) wurde ein exakter P-Wert, wie von Hothorn et al. beschrieben, mit einem konditionalen Mann-Whitney-U Test (Permutationstest) errechnet (Hothorn et al., 2008). Alle statistischen Tests waren zweiseitig und wurden explorativ auf einem 5%-igen Signifikanzniveau durchgeführt. Für alle statistischen Untersuchungen wurden SPSS (Version 19.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und R (Version 2.11.1; R Foundation, Wien, Österreich) verwendet.

4.8 Diagnostische Güte (Fläche unter der Kurve)

Die Berechnung der Güte untersuchter Biomarker bei der Diagnose des periprothetischen Infekts wurde ebenfalls in Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München (Dr. Alexander Hapfelmeier) durchgeführt. Um die Diskriminationsfähigkeit der AMP- und Zytokinexpressionsspiegel beurteilen zu können, wurden zunächst Grenzwertoptimierungs- (*Receiver operating characteristic*-, ROC-) Kurven, in denen die Sensitivität gegen 1-Spezifität für jeden möglichen Schwellenwert (Cutpoint) der einzelnen Parameter aufgetragen wird, erstellt. Hieraus konnten dann die den

Youden-Index (Sensitivität + Spezifität - 1) maximierenden und damit nach diesem Maß als optimal zu bezeichnende Schwellenwerte der einzelnen AMP- und Zytokinexpressionsspiegel bestimmt werden. Entsprechend wurden Sensitivität, Spezifität, positiver (*Positive predictive value*, PPV) und negativer prädiktiver Wert (*Negative predictive value*, NPV) für den optimalen Schwellenwert berechnet.

Anschließend wurde die Fläche unterhalb der jeweiligen ROC-Kurve (*Area under the curve*, AUC) berechnet. Der AUC-Wert kann dabei in einem Bereich von 0,5 bis 1 liegen und stellt ein globales schwellenwertunabhängiges Maß für die Güte des diagnostischen Tests dar. Besitzt ein Test eine AUC von 0,5, so übertrifft er nicht die Güte einer zufälligen Entscheidung für bzw. gegen das Vorliegen eines Ereignisses (Münzwurf). Ein Test mit einem AUC-Wert von 0,9 und höher besitzt hingegen eine exzellente diagnostische Güte.

Darüber hinaus wurde eine multivariate Analyse anhand logistischer Regressionen durchgeführt, um die diagnostische Güte der Kombination zweier Biomarker bestimmen zu können. Die Schwellenwerte der kombinierten Biomarker wurden dem Ergebnis der linearen Regressionsgleichungen (siehe 5.7) entnommen.

5 ERGEBNISSE

5.1 Patientenkollektiv

Von Februar bis Dezember 2009 wurden 43 konsekutive Patienten, bei denen aufgrund einer aseptischen Lockerung oder Infektion der Knie- oder Hüfttotalendoprothese (K- bzw. H-TEP) eine Revisionsoperation geplant war, untersucht. Insgesamt 35 Patienten erfüllten die Einschlusskriterien und konnten in die Studie aufgenommen werden. Acht Patienten mussten aus der Studie ausgeschlossen werden, da sie ein oder mehrere Ausschlusskriterien aufwiesen. Bei 15 der 35 Patienten wurde anhand der als gegenwärtigen Goldstandard angesehenen o.g. Kriterien der endgültigen Diagnosesicherung eine septische Prothesenlockerung bzw. eine periprotetische Infektion diagnostiziert. 20 der 35 Patienten erfüllten diese Kriterien nicht und wurden daraufhin der Gruppe mit aseptischer Prothesenlockerung zugeordnet.

Der jüngste Patient der Studie war zum Zeitpunkt der Revisionsoperation 52 Jahre, der älteste 98 Jahre alt. Das mittlere Alter lag insgesamt bei 70 ± 13 Jahren. Das durchschnittliche Alter der aseptischen (70 ± 13) und septischen Gruppe (71 ± 13) unterschied sich nicht signifikant (Abb. 5.1).

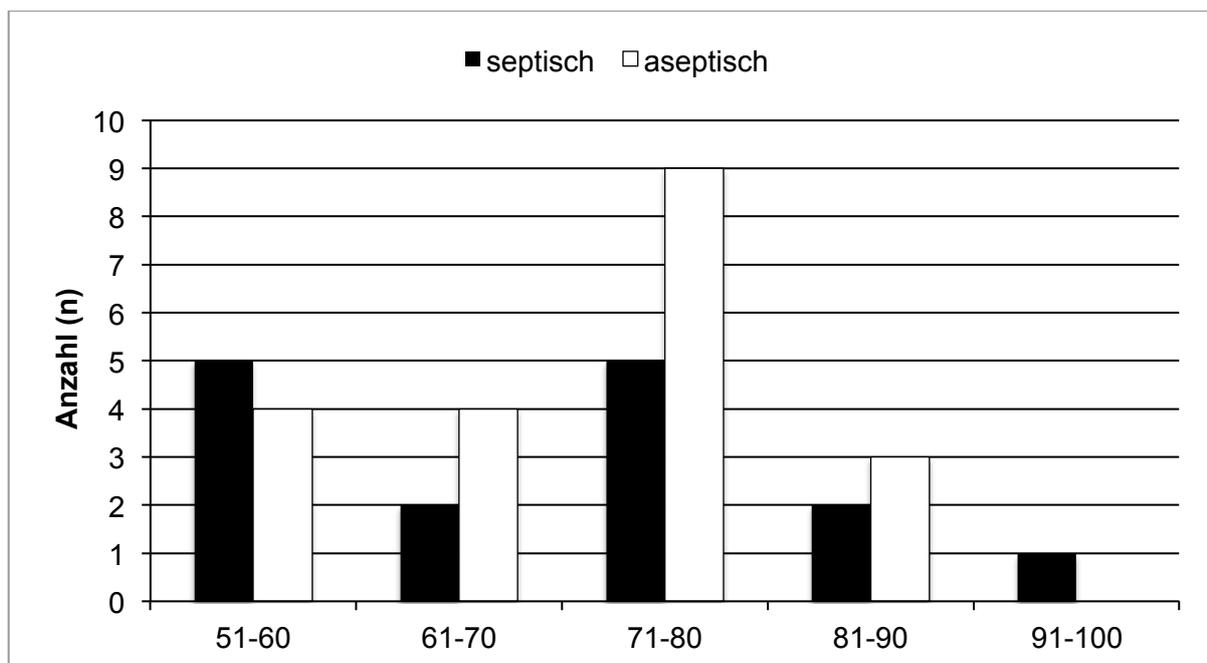


Abbildung 5.1: Altersverteilung der Probanden.

Insgesamt waren mit einem Verhältnis von 23 zu 12 mehr Frauen als Männer in der Studie vertreten. Eine ähnliche Geschlechtsverteilung zeigte sich dementsprechend auch in der aseptischen (13 Frauen, 7 Männer) und septischen Gruppe (10 Frauen, 5 Männer) (Tab. 5.1).

Tabelle 5.1: Geschlechterverhältnis des Patientenkollektivs und der beiden Gruppen.

	Frauen	Männer	insgesamt
septisch	10	5	15
aseptisch	13	7	20
insgesamt	23	12	

Bei 20 der 35 Patienten kam es zu einer Revision der H-TEP, bei den anderen 15 zu einer Revision der K-TEP. Die aseptische Gruppe wies 12 H-TEPs und 8 K-TEPs, die septische Gruppe 8 H-TEPs und 7 K-TEPs auf (Abb. 5.2).

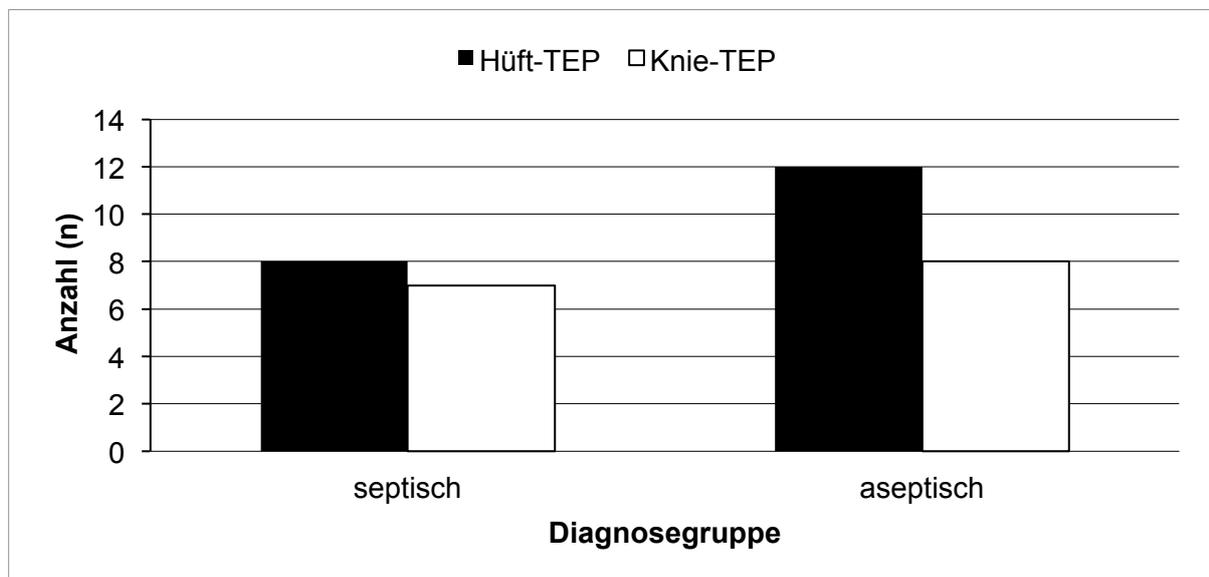


Abbildung 5.2: Verteilung der revidierten Prothesen in der septischen und aseptischen Gruppe.

Die Anzahl der vor der Revisionsoperation stattgefundenen Operationen war in der septischen Gruppe mit durchschnittlich $3,1 \pm 2,0$ Voroperationen höher als in der aseptischen Gruppe mit $1,8 \pm 1,2$ Voroperationen (Abb. 5.3).

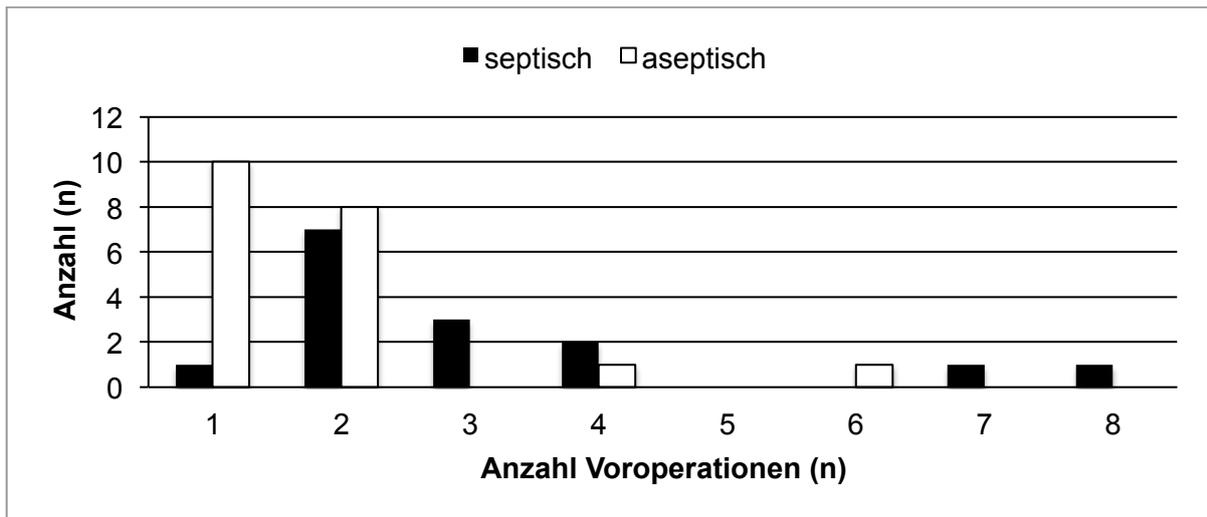


Abbildung 5.3: Anzahl von Voroperationen in der septischen und aseptischen Gruppe.

Entsprechend zeigte sich in der septischen Gruppe eine geringere Standzeit der primären Prothese mit einer mittleren Dauer von $3,8 \pm 4,1$ Jahren als in der aseptischen Gruppe, in der die mittlere Standzeit $8,3 \pm 6,4$ Jahre betrug (Abb. 5.4).

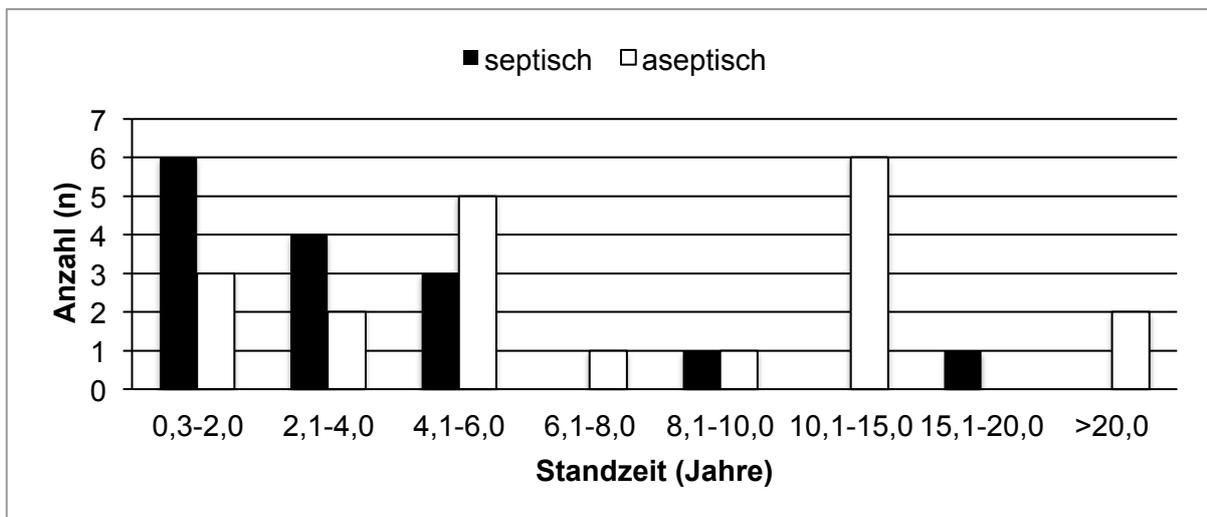


Abbildung 5.4: Standzeiten der zu revidierenden TEPs in der septischen und aseptischen Gruppe.

5.2 Blutchemische Entzündungsparameter

Bei der Untersuchung der blutchemischen Entzündungsparameter zeigte sich bei dem CRP-Wert (Normalwert $< 0,5$ mg/dl) in der septischen Gruppe mit durchschnittlich $10,3 \pm 12,5$ mg/dl und Spitzenwerten von über 30 mg/dl ein durchgängig pathologischer Wert. Dies unterschied sich signifikant von der

aseptischen Gruppe mit einem physiologischen Mittelwert von $0,4 \pm 0,3$ mg/dl. Die Untersuchung der Leukozytenzahl erbrachte keinen signifikanten Unterschied der beiden untersuchten Gruppen und lieferte somit keine zusätzlichen, die Diagnose beeinflussenden Erkenntnisse.

5.3 Keimnachweis in Gelenkpunktat und Gewebeproben

Bei allen Patienten der aseptischen Gruppe war sowohl der präoperativ (Gelenkpunktat) als auch der intraoperativ (Gelenkpunktat, Synovialisgewebe) erhobene mikrobiologische Keimnachweis negativ.

Die mikrobiologische Untersuchung in der septischen Gruppe hingegen ergab bei 13 von 15 Patienten einen positiven Erregernachweis. Bei 9 Patienten der septischen Gruppe konnten sowohl im präoperativen Gelenkpunktat als auch in den intraoperativ gewonnenen Gewebeproben das Wachstum von Keimen bestätigt werden. Dabei korrelierten die im Gelenkpunktat gefundenen Keime stets mit denen der intraoperativen Proben. Bei vier Patienten der septischen Gruppe ließen sich bei fehlendem Keimnachweis im Gelenkpunktat Keime in den Gewebeproben nachweisen. Im Einzelnen zeigte sich in der septischen Gruppe bei zehn Patienten eine Kolonisation mit Koagulase negativen Staphylokokken, bei drei Patienten fand man eine Infektion mit *Staphylokokkus aureus*.

In den zwei Fällen, in denen bei der mikrobiologischen Untersuchung kein positiver Erregernachweis geführt werden konnte, handelte es sich um klinisch hochaktive Entzündungen, die bei der Punktion bzw. Eröffnung des Gelenks durch große Mengen von Eiter imponierten.

5.4 Histopathologie intraoperativ entnommener Gewebeproben

Die histopathologische Untersuchung der intraoperativ gewonnenen Gewebeproben nach Morawietz (Morawietz et al., 2006) stimmte in allen Fällen mit den Befunden der mikrobiologischen Untersuchung überein. Bei allen Patienten der septischen Gruppe zeigten sich periprothetische Membranen von Infektionstyp (Typ II) oder kombinierten Typ (Typ III). Bei den Patienten der aseptischen Gruppe zeigten sich hingegen ausschließlich periprothetische Membranen vom Abriebtyp (Typ I) oder intermediären Typ (Typ IV).

5.5 Zytologie des Gelenkpunktats

Die zytologische Untersuchung des Gelenkpunktats mit Bestimmung von Zellzahl und Zelldifferenzierung (neutrophile Granulozyten) wurde nicht routinemäßig durchgeführt. Sie kam lediglich bei nicht eindeutigen präoperativen Befunden sowie beim Verdacht eines Periprothetischen Low Grade Infekts (PLGI) zum Einsatz. In diesen Fällen entsprach das Ergebnis jeweils dem der später bestätigten Diagnose.

5.6 Zytokinmuster

Durch die Untersuchung der Spiegel proinflammatorischer Zytokine sollte bestimmt werden, ob sich diese Biomarker zur Unterscheidung von Protheseninfektionen gegenüber aseptischen Prothesenlockerungen eignen.

5.6.1 Lokale Zytokinexpression im Gelenkpunktat

Wie bereits in vorherigen Arbeiten anhand einiger ausgewählter Zytokine gezeigt werden konnte, kommt es bei periprothetischen Infektionen zu einer Erhöhung der lokalen Expression proinflammatorischer Zytokine in der betroffenen Gelenkflüssigkeit. Die lokale Expressionserhöhung der in diesem Zusammenhang schon beschriebenen Zytokine (Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α), Interleukin- (IL-) 1 β , und IL-6 (Nilsson-Augustinsson et al., 2007)) sollte daher vor Untersuchung neuartiger Zytokine und anderer innovativer Biomarker, überprüft werden. Es stellte sich ferner die Frage, ob es bei weiteren proinflammatorischen Zytokinen im Fall einer Protheseninfektion ebenfalls zu einer signifikanten Steigerung der lokalen Expression kommt. Aus diesem Grund wurden zusätzlich die lokalen Konzentrationen der Zytokine IL-2, IL-4, IL-17A und Interferon gamma (IFN- γ) bestimmt. Der Vergleich der Zytokinkonzentrationen in der Gelenkflüssigkeit beider Patientengruppen zeigte bei IL-1 β (P=0,001), IL-4 (P<0,001), IL-6 (P=0,002), IL-17A (P=0,026), TNF α (P=0,001) und IFN- γ (P=0,001) eine signifikante lokale Erhöhung der Konzentration bei vorliegender Protheseninfektion (Abb. 5.5, Tab. 5.2).

Gelenkflüssigkeit

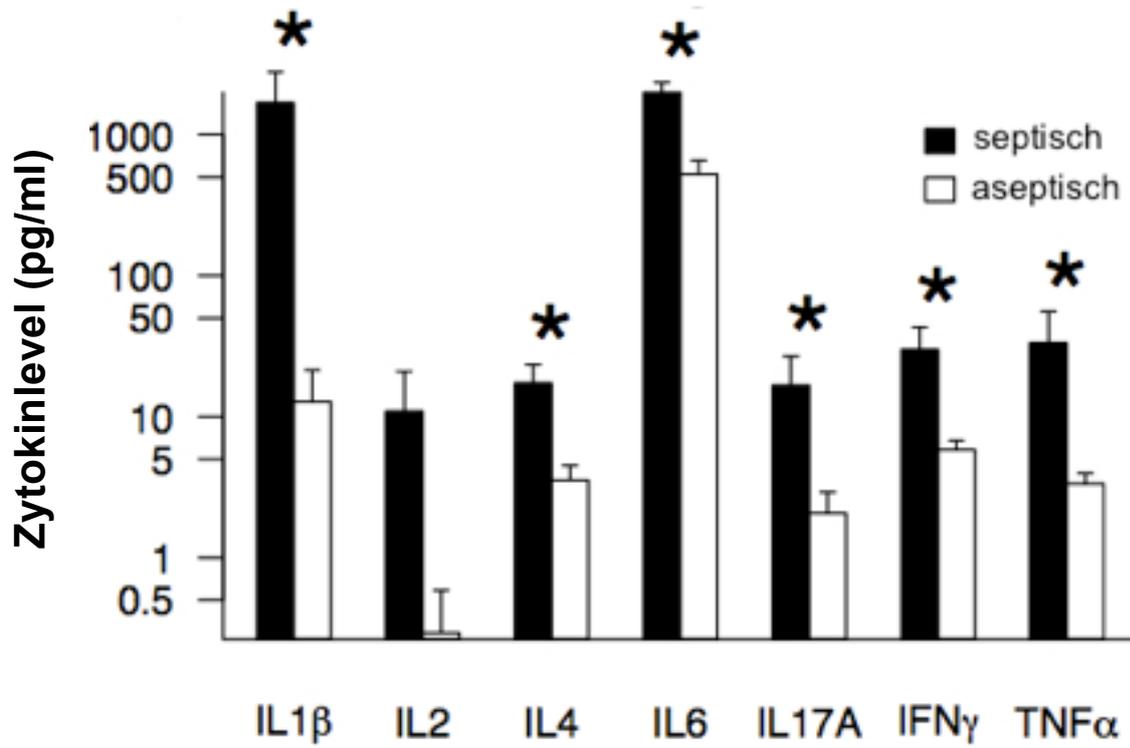


Abbildung 5.5: Ergebnisse der Zytokinmessung in der Gelenkflüssigkeit. Vergleich der Konzentrationen in der septischen und aseptischen Gruppe (Säulendiagramm mit Standardabweichung). (*) = signifikanter Unterschied ($P \leq 0,05$)

Tabelle 5.2: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Zytokinmessung in der Gelenkflüssigkeit (1). Die jeweiligen, durch den Hersteller angegebenen minimalen Detektionswerte der einzelnen Assays waren: IL-1beta: 2,3 pg/ml, IL-2: 11,2 pg/ml, IL-4: 1,4 pg/ml, IL-6: 1,6 pg/ml, IL-17A: 0,3 pg/ml, IFN- γ : 0,8 pg/ml, TNF α : 1,2 pg/ml.

Marker	Range (Maximum/Minimum)		Median		Mittelwert	
	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch
IL-1 β (pg/ml)	16402	175,38	79,91	3,38	1681,75	12,77
	0	0				
IL-2 (pg/ml)	150,91	5,85	0	0	10,86	0,29
	0	0				
IL-4 (pg/ml)	101,34	13,06	12,15	2,11	17,32	3,54
	4,79	0				
IL-6 (pg/ml)	3990,46	2233,05	2213,9	405,8	1983,65	523,84
	64,62	2,1				
IL-17A (pg/ml)	155,8	12	4,93	0	16,65	2,06
	0	0				
IFN- γ (pg/ml)	201,56	14,86	12,88	5,04	29,78	5,82
	3,51	0				
TNF- α (pg/ml)	342,95	9,02	7,41	2,8	33,27	3,34
	2,32	0				

Tabelle 5.3: Statistische Auswertung der Zytokinmessung in der Gelenkflüssigkeit (2). SEM = „Standard error of the mean“, Standardabweichung; KI = Konfidenzintervall.

Marker	SEM		95% KI des Median		Mann Whitney U Test
	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch	
IL-1 β (pg/ml)	1093	8,61	2102,86	4,71	P=0,001
			4,86	2,45	
IL-2 (pg/ml)	10,04	0,29	0	0	P>0,050
			0	0	
IL-4 (pg/ml)	6,06	0,97	13,94	5,4	P<0,001
			8,4	0	
IL-6 (pg/ml)	355,3	130,3	3192,04	592,63	P=0,002
			460,71	83,34	
IL-17A (pg/ml)	10,13	0,85	13,59	3,39	P=0,026
			0	0	
IFN- γ (pg/ml)	201,6	14,86	15,04	8,01	P=0,001
			7,73	3,42	
TNF- α (pg/ml)	22,38	0,62	13,08	5,14	P=0,001
			4,44	1,5	

5.6.2 Systemische Zytokinexpression im Serum

Trotz ihres eher untergeordneten Stellenwerts in der endokrinen Signalübermittlung ist bekannt, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF α bei periprothetischen Infektionen auch systemisch vermehrt gebildet werden (Bottner et al., 2007). Dies führte zu der Annahme, dass bei Infektionen von K-TEPs und H-TEPs auch erhöhte Konzentrationen weitere Zytokine nachgewiesen werden könnten. Folglich wurden zusätzlich zu den bereits bekannten Zytokinen IL-6 und TNF α auch die Spiegel der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-17A und IFN- γ im Serum beider Patientengruppen bestimmt. Beim Vergleich der Zytokinkonzentrationen im Blutserum beider Gruppen zeigte sich dabei, dass sowohl die Konzentration von IL-6 (P=0,012) als auch von IL-4 (P=0,002) bei vorliegender Protheseninfektion signifikant erhöht waren (Abb. 5.6).

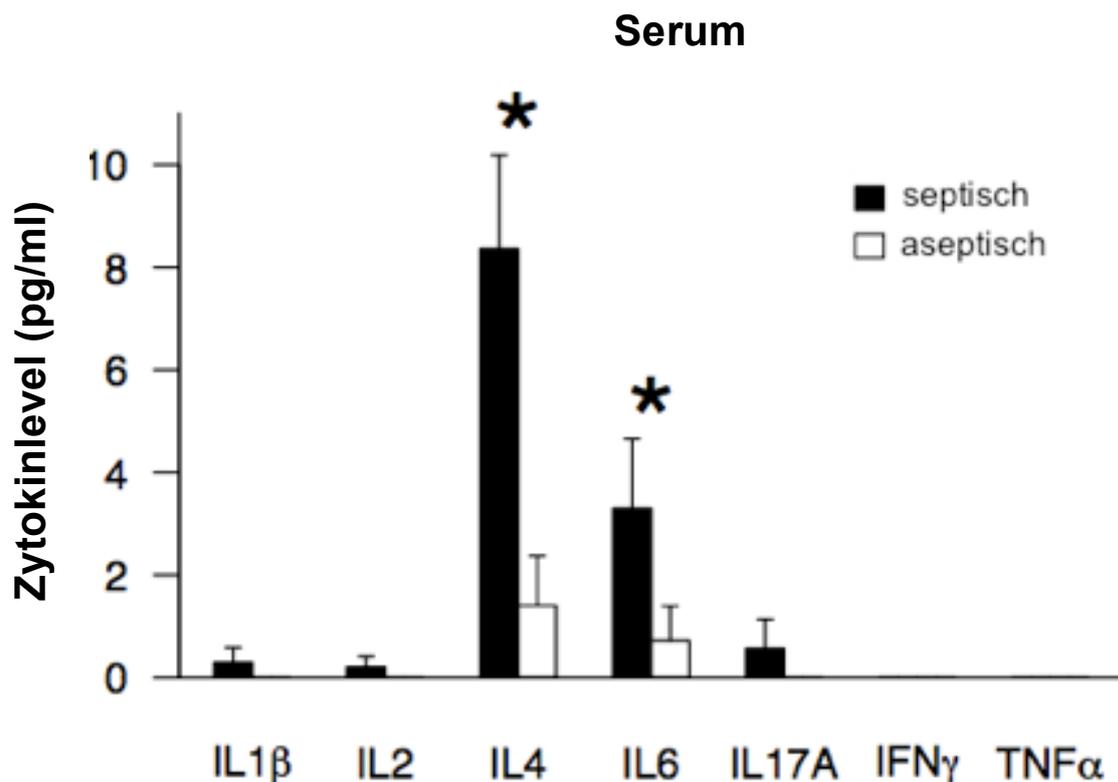


Abbildung 5.6: Ergebnisse der Zytokinmessung im Serum. Vergleich der Konzentrationen in der septischen und aseptischen Gruppe (Säulendiagramm mit Standardabweichung)

Tabelle 5.4: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Zytokinmessung im Serum (1). Die jeweiligen, durch den Hersteller angegebenen minimalen Detektionswerte der einzelnen Assays waren: IL-1 β : 2,3 pg/ml, IL-2: 11,2 pg/ml, IL-4: 1,4 pg/ml, IL-6: 1,6 pg/ml, IL-17A: 0,3 pg/ml, IFN- γ : 0,8 pg/ml, TNF α : 1,2 pg/ml.

Marker	Spannweite		Median		Mittelwert	
	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch
IL-1 β (pg/ml)	4,4	0	0	0	0,29	0
	0	0				
IL-2 (pg/ml)	3,14	0	0	0	0,21	0
	0	0				
IL-4 (pg/ml)	14,39	14,39	13,64	0	8,36	1,4
	0	0				
IL-6 (pg/ml)	16,89	13,42	0	0	3,3	0,73
	0	0				
IL-17A (pg/ml)	8,55	0	0	0	0,57	0
	0	0				
IFN- γ (pg/ml)	0	0	0	0	0	0
	0	0				
TNF- α (pg/ml)	0	0	0	0	0	0
	0	0				

Tabelle 5.5: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Zytokinmessung im Serum (2). SEM = „Standar error of the mean“, Standardabweichung; KI = Konfidenzintervall.

Marker	SEM		95% KI des Median		Mann Whitney U Test
	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch	
IL-1 β (pg/ml)	0,29	0	0	0	P=0,429
			0	0	
IL-2 (pg/ml)	0,21	0	0	0	P=0,429
			0	0	
IL-4 (pg/ml)	1,83	0,97	13,98	0	P=0,002
			0	0	
IL-6 (pg/ml)	1,36	0,67	5,3	0	P=0,012
			0	0	
IL-17A (pg/ml)	0,57	0	0	0	P=0,429
			0	0	
IFN- γ (pg/ml)	0	0	0	0	n.a.
			0	0	
TNF- α (pg/ml)	0	0	0	0	n.a.
			0	0	

Neben der Bestätigung einer lokalen Erhöhung bekannter und bisher noch nicht beschriebener Zytokine konnte auch eine signifikante systemische Konzentrationserhöhung einzelner proinflammatorischer Zytokine bei periprothetischem Infekt gezeigt werden. Es stellte sich nun die Frage, ob es auch bei den vornehmlich lokal wirkenden Antimikrobiellen Peptiden (AMPs) zu erhöhten Konzentrationsspiegeln in der Gelenkflüssigkeit bei Protheseninfektionen kommt.

5.7 AMP-Muster

Als hoch konservierter Teil des angeborenen Immunsystems nehmen AMPs eine bedeutende Rolle in der lokalen Infektabwehr ein. (Radek and Gallo, 2007). Ihre Hauptaufgabe liegt dabei in der direkten antimikrobiellen Wirkung durch eine Vielzahl von Wirkmechanismen (Palffy et al., 2009). Diese Eigenschaften machen AMPs als potentielle lokale Marker für Infektionen interessant und führen zu der Frage, ob es auch in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit Protheseninfektion zu diagnostisch relevanten Konzentrationserhöhungen einzelner AMPs kommt.

5.7.1 Lokale AMP-Expression in der Gelenkflüssigkeit

Das vornehmlich lokale Wirkspektrum von AMPs ist bekannt. Paulsen et al. konnte unterschiedliche Expressionsmuster der drei AMPs Humanes Beta Defensin (*human beta defensine*, HBD) 2, HBD3 und aktives humanes Cathelicidin (LL-37) in der Synovialmembran von Patienten mit verschiedenen Arthritiden nachweisen (Paulsen et al., 2002). Dies und die Tatsache, dass keines der genannten AMPs in gesunder Synovialmembran (Paulsen et al., 2002) nachweisbar war, prädestinieren sie für die Rolle als mögliche lokale synoviale Biomarker periprothetischer Infektionen. Aus diesem Grund musste ein hypothetisierter und für die Routinediagnostik relevanter Konzentrationsunterschied der drei AMPs HBD2, HBD3 und LL-37 in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit Protheseninfektion gegenüber aseptischer Prothesenlockerung überprüft werden. Der Vergleich dieser AMP-Konzentrationen in der Gelenkflüssigkeit beider Gruppen zeigte bei den AMPs LL-37 (Abb. 5.7; $P < 0,001$) und HBD-3 (Abb. 5.8; $P = 0,012$) eine signifikante lokale Erhöhung bei Patienten mit periprothetischem Infekt (Tab. 5.6). Der Vergleich der lokalen HBD-2-Spiegel beider Gruppen hingegen wies keinen signifikanten Unterschied auf (Abb. 5.9; Tab. 5.6).

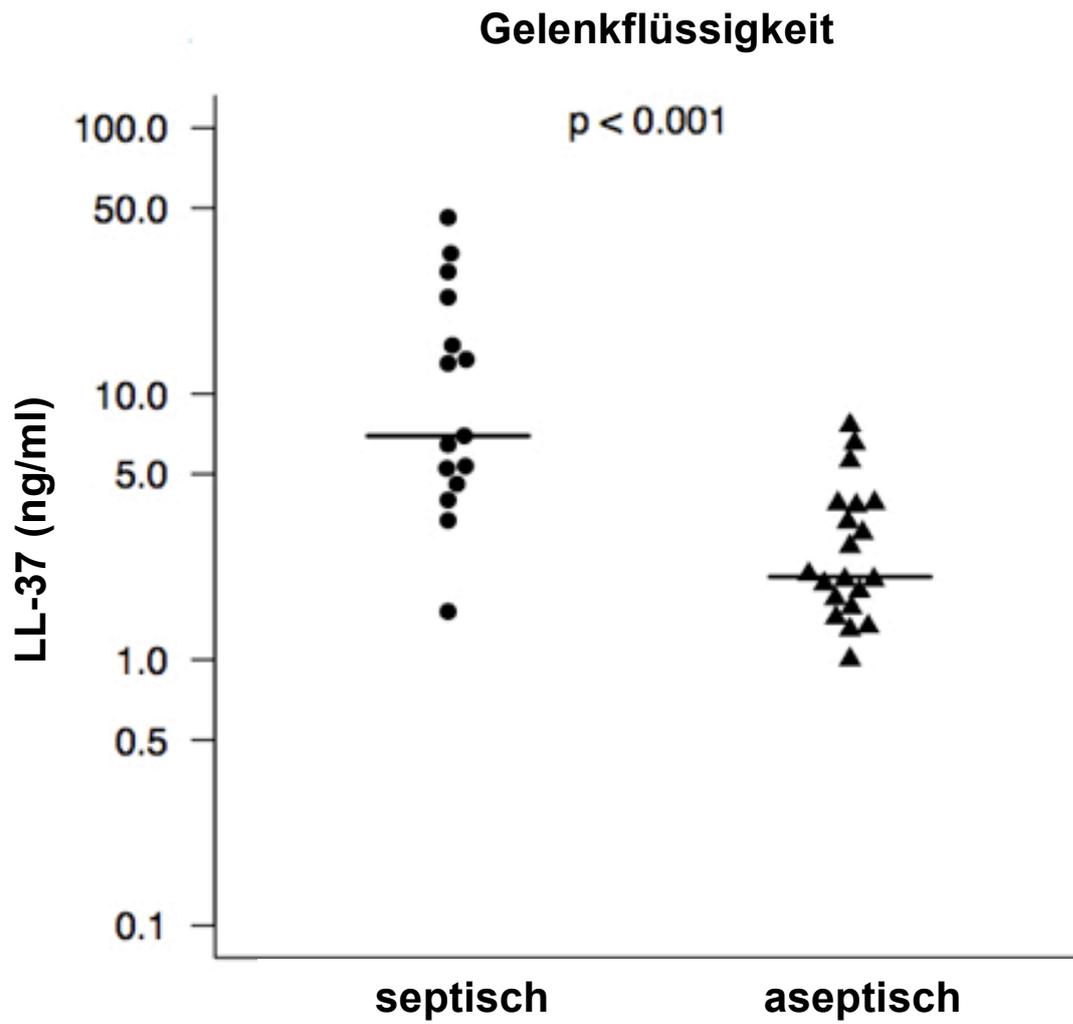


Abbildung 5.7: Vergleich der LL-37-Spiegel in der Gelenkflüssigkeit von Patienten der septischen gegenüber der aseptischen Gruppe (Punktdiagramm mit Median).

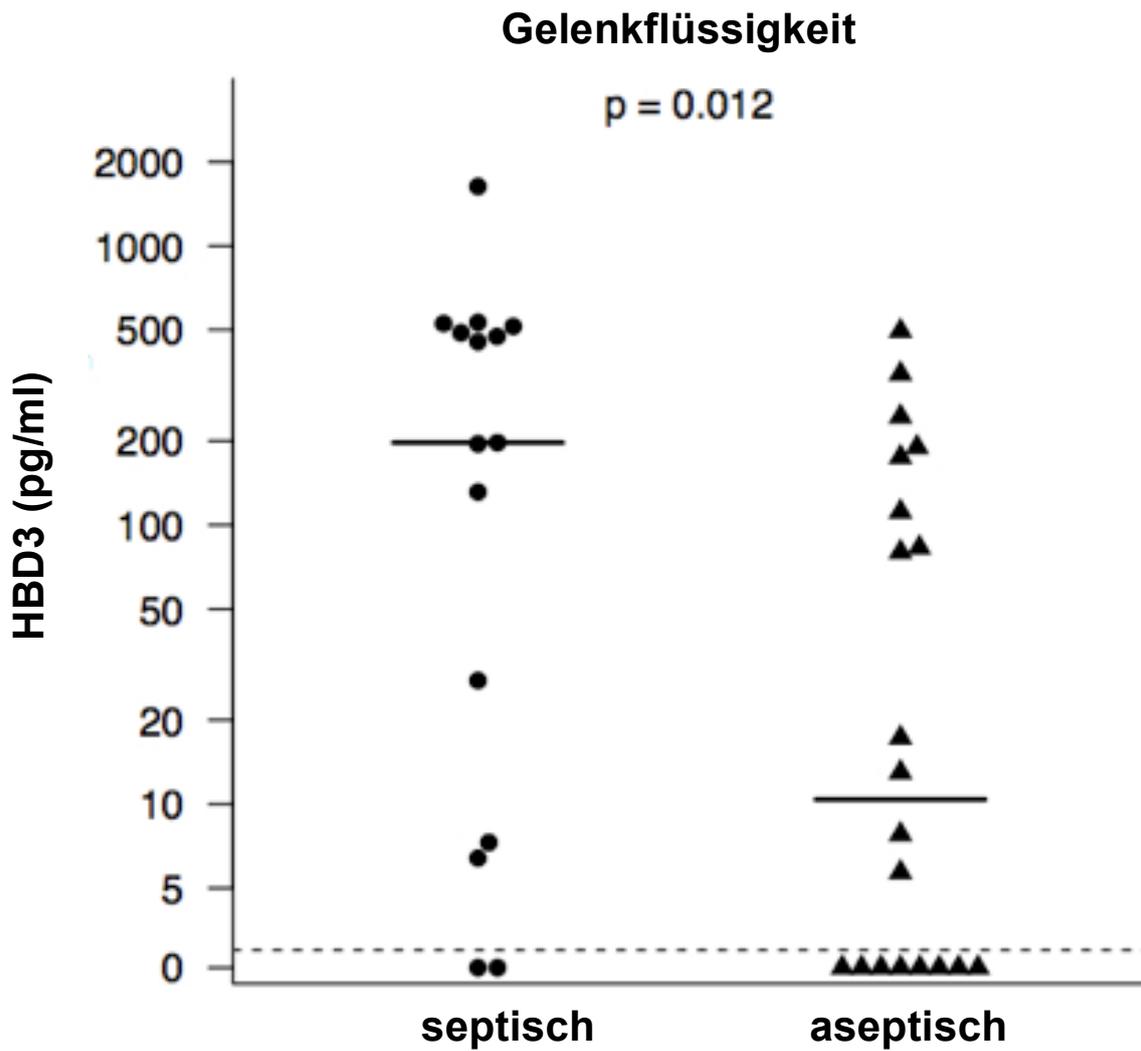


Abbildung 5.8: Vergleich der HBD3-Spiegel in der Gelenkflüssigkeit von Patienten der septischen und aseptischen Gruppe (Punktdiagramm mit Median).

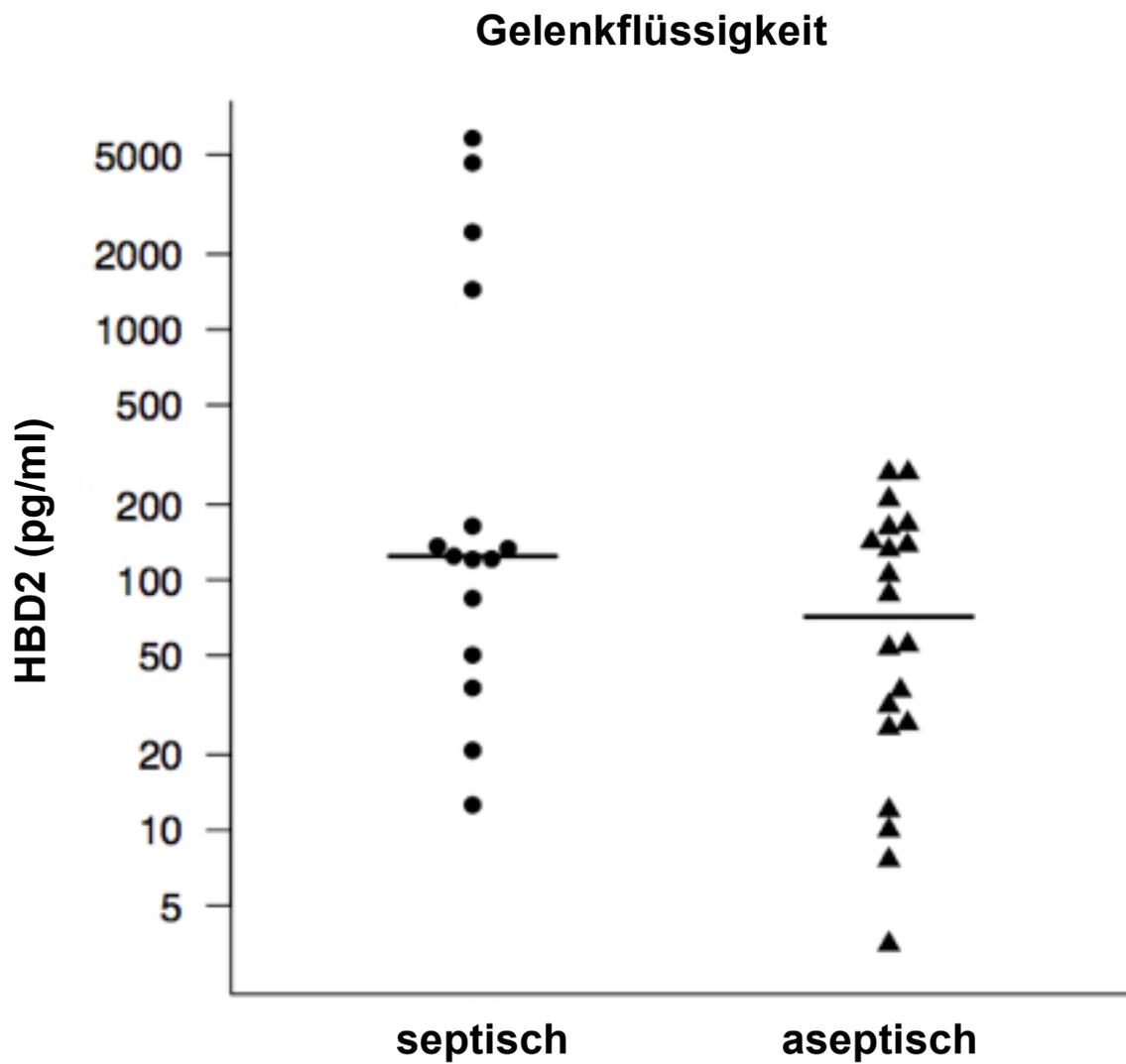


Abbildung 5.9: Vergleich der HBD2-Spiegel in der Gelenkflüssigkeit von Patienten der septischen und aseptischen Gruppe (Punktdiagramm mit Median).

Tabelle 5.6: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der AMP-Messung in der Gelenkflüssigkeit (1). Die jeweiligen, durch den Hersteller angegebenen minimalen Detektionswerte der einzelnen Assays waren: LL-37: 0,1 ng/ml, HBD2: 8 pg/ml, HBD3: 15 pg/ml.

Marker	Spannweite		Median		Mittelwert	
	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch
LL-37 (ng/ml)	46	8	7	2	14	3
	2	1				
HBD-2 (pg/ml)	5794	268	124	71	1021	97
	13	4				
HBD-3 (pg/ml)	1628	495	197	10,5	345	89
	0	0				

Tabelle 5.7: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der AMP-Messung in der Gelenkflüssigkeit (2). SEM = „Standard error of the mean“, Standardabweichung; KI = Konfidenzintervall.

Marker	SEM		95% KI des Median		Mann Whitney U Test
	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch	
LL-37 (ng/ml))	3,42	0,45	23	4	P<0,001
			5	2	
HBD-2 (pg/ml)	475,6	19,06	1445	142	P=0,166
			50	27	
HBD-3 (pg/ml)	108	30,86	515	212	P=0,012
			7	0	

Der gelungene Nachweis eines signifikanten Unterschieds der HBD3- und LL-37-Konzentration in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit periprothetischem Infekt gegenüber aseptischer Prothesenlockerung führte schließlich zu der Frage, ob trotz des lokalen Wirkcharakters von AMPs auch signifikante systemische Spiegel nachzuweisen sind.

5.7.2 Systemische AMP-Expression im Serum

Neben ihrer direkten, lokalen antimikrobiellen Wirkung dienen AMPs unter anderem durch Chemotaxis auch als Bindeglied zwischen angeborenem und erworbenen Immunsystem (Elsbach, 2003). Eine Rolle in der systemischen Immunreaktion scheint somit auch denkbar. Aus diesem Grund sollte untersucht werden, ob es auch

zu systemisch erhöhten Spiegeln von AMPs bei periprothetischem Infekt kommt. Hierzu wurden die Konzentrationen von HBD2, HBD3 und LL-37 im Serum der Patienten beider Gruppen bestimmt. Der Vergleich der systemischen AMP-Konzentrationen ergab für LL-37 (Abb. 5.10) und HBD3 (Abb. 5.11) keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen (Tab. 5.8 und 5.9). Allerdings wurde interessanterweise bei den Patienten der septischen Gruppe eine signifikante Erhöhung der systemischen HBD2-Werte (Abb. 5.12; Tab. 5.8 und 5.9; $P=0,016$) festgestellt.

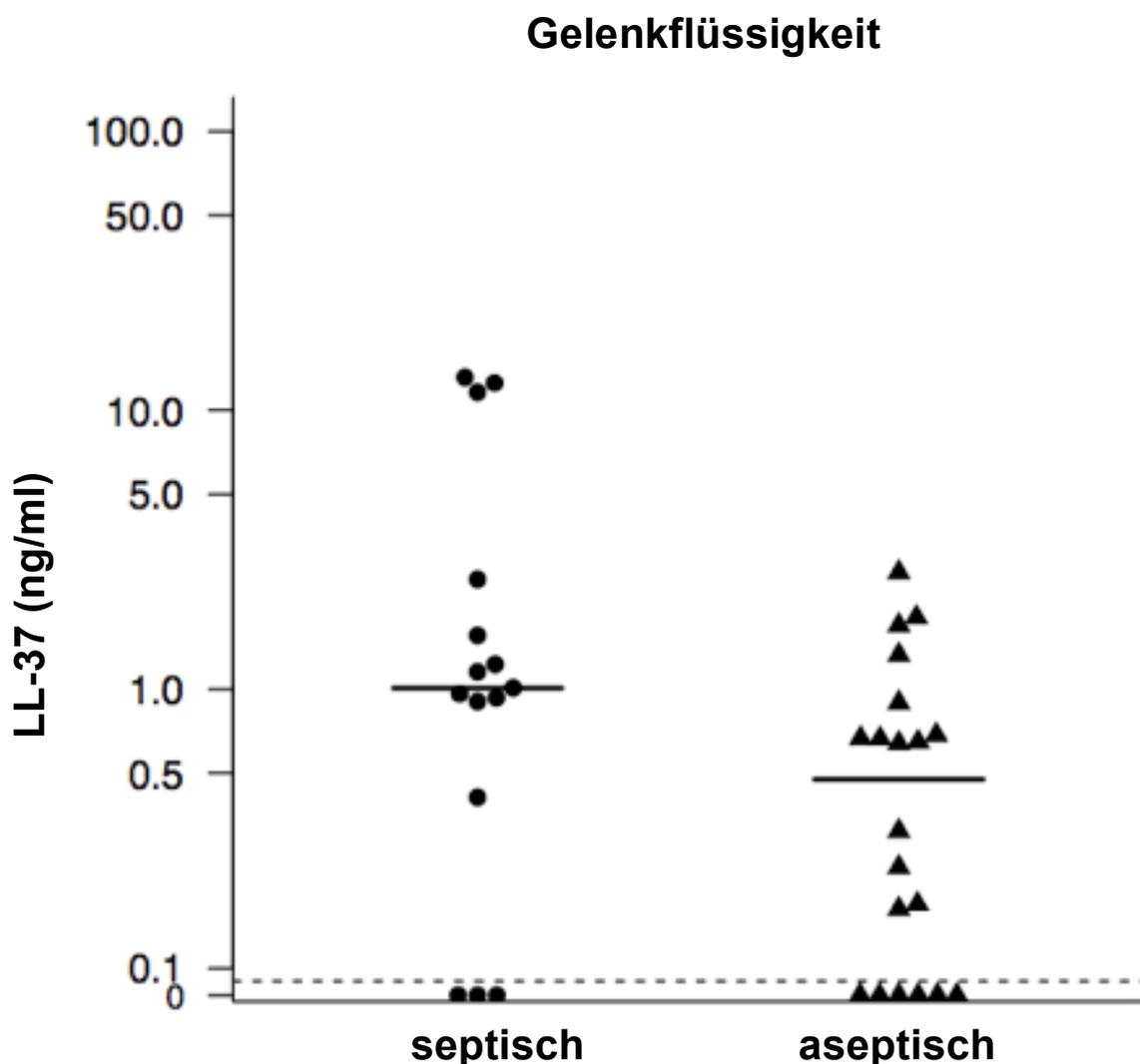


Abbildung 5.10: Vergleich der LL-37-Spiegel im Serum von Patienten der septischen und aseptischen Gruppe (Punktdiagramm mit Median).

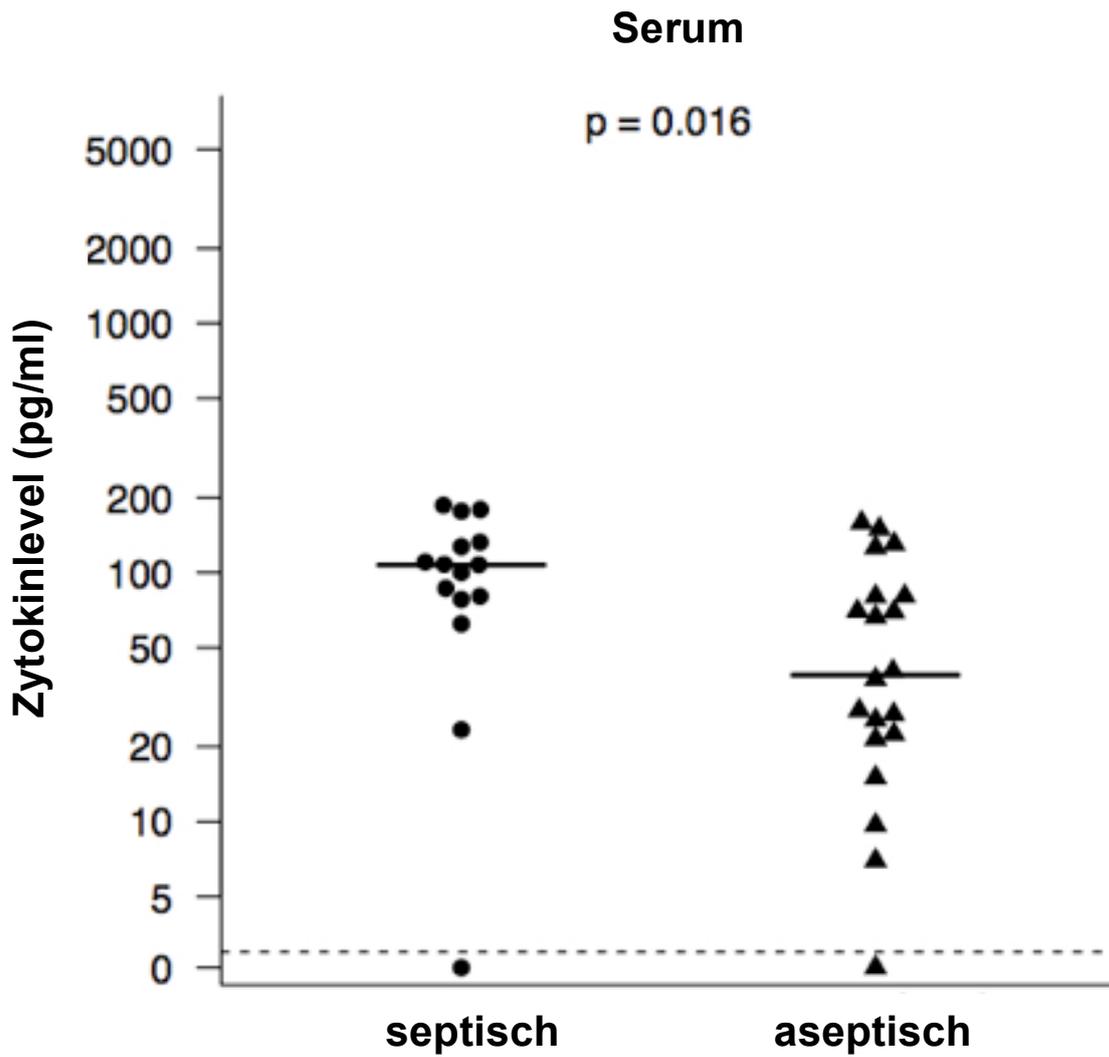


Abbildung 5.12: Vergleich der HBD2-Spiegel im Serum von Patienten der septischen und aseptischen Gruppe (Punktdiagramm mit Median).

Tabelle 5.8: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der AMP-Messung im Serum (1). Die jeweiligen, durch den Hersteller angegebenen minimalen Detektionswerte der einzelnen Assays waren: LL-37: 0,1 ng/ml, HBD2: 8 pg/ml, HBD3: 15 pg/ml.

Marker	Spannweite		Median		Mittelwert	
	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch
LL-37 (ng/ml)	13	3	1	0,5	3	1
	0	0				
HBD-2 (pg/ml)	186	159	107	38,5	104	58
	0	0				
HBD-3 (pg/ml)	1340	128	0	0	134	11
	0	0				

Tabelle 5.9: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der AMP-Messung im Serum (2). SEM = „Standard error of the mean“, Standardabweichung; KI = Konfidenzintervall.

Marker	SEM		95% KI des Median		Mann Whitney U Test
	septisch	aseptisch	septisch	aseptisch	
LL-37 (ng/ml)	1,24	0,19	2	1	P=0,093
			0	0	
HBD-2 (pg/ml)	13,74	11,01	132	80	P=0,016
			78	22	
HBD-3 (pg/ml)	88,92	6,79	127	0	P=0,109
			0	0	

Nach dem signifikanten lokalen und systemischen Nachweis einzelner proinflammatorischer Zytokine und antimikrobieller Peptide musste hinsichtlich der klinischen Relevanz als mögliche neuartige diagnostische Biomarker, nun deren diagnostische Genauigkeit hinsichtlich der Differenzierung einer Protheseninfektion von einer aseptischen Prothesenlockerung untersucht werden.

5.8 Diagnostische Güte (AUC-Wert)

Um die klinisch höchst relevante diagnostische Güte der einzelnen untersuchten Biomarker bestimmen zu können, wurden zunächst deren jeweilige, als optimal zu bezeichnende Schwellenwerte in der Gelenkflüssigkeit und im Serum ermittelt. Dies geschah durch die Analyse von Grenzwertoptimierungs- (*Receiver operating*

characteristic-, ROC-) Kurven und Youden-Index (Sensitivität + Spezifität - 1) Maximierung der einzelnen AMP- und Zytokinexpressionsspiegel. Anschließend konnte die Fläche unterhalb der ROC-Kurve (*Area under the curve*, AUC) des jeweiligen Biomarkers als direktes Maß der diagnostischen Güte berechnet werden (Tab. 5.10 und 5.11).

Tabelle 5.10: Zusammenfassung der Diskriminationsfähigkeitsanalyse der lokalen Zytokinkonzentrationen aller Studienteilnehmer mit aseptischer und septischer Prothesenlockerung. AUC = „Area under the curve“; KI = Konfidenzintervall; GW = Grenzwert; Sens = Sensitivität; Spez = Spezifität; PPV = „Positive predictive value“, positiver Vorhersagewert; NPV = „Negative predictive Value“, negativer Vorhersagewert.

Marker	AUC	oberes 95% KI	unteres 95% KI	P-Wert	GW pg/dl	Sens	Spez	PPV	NPV
IL-1 β	0,822	0,661	0,982	0,001	27,57	0,667	0,950	0,909	0,792
IL-2	0,545	0,347	0,743	0,653	12,04	0,133	1,000	1,000	0,606
IL-4	0,920	0,828	1,000	<0,001	7,79	0,933	0,850	0,824	0,944
IL-6	0,807	0,653	0,961	0,002	1896,56	0,600	0,947	0,900	0,750
IL-17A	0,700	0,515	0,885	0,046	12,43	0,400	1,000	1,000	0,690
IFN- γ	0,817	0,675	0,958	0,002	6,90	0,867	0,650	0,650	0,867
TNF- α	0,827	0,690	0,963	0,001	4,04	0,867	0,700	0,684	0,875

Tabelle 5.11: Zusammenfassung der Diskriminationsfähigkeitsanalyse der systemischen Zytokinkonzentrationen aller Studienteilnehmer mit aseptischer und septischer Prothesenlockerung. AUC = „Area under the curve“; KI = Konfidenzintervall; GW = Grenzwert; Sens = Sensitivität; Spez = Spezifität; PPV = „Positive predictive value“, positiver Vorhersagewert; NPV = „Negative predictive Value“, negativer Vorhersagewert.

Marker	AUC	oberes 95% KI	unteres 95% KI	P-Wert	GW pg/dl	Sens	Spez	PPV	NPV
IL-1 β	0,533	0,336	0,731	0,739	4,40	0,067	1,000	1,000	0,588
IL-2	0,533	0,336	0,731	0,739	3,14	0,067	1,000	1,000	0,588
IL-4	0,745	0,569	0,921	0,014	13,50	0,600	0,900	0,818	0,750
IL-6	0,687	0,499	0,874	0,062	1,89	0,467	0,950	0,875	0,704
IL-17A	0,533	0,336	0,731	0,739	8,55	0,067	1,000	1,000	0,588
IFN- γ	n.a.								
TNF- α	n.a.								

Hierbei zeigte sich für die lokale Konzentration von IL-4 die höchste Vorhersagegenauigkeit mit einem AUC-Wert von 0,92 bei einem Grenzwert von 7,79 pg/ml, einer Sensitivität von 0,933, einer Spezifität von 0,850, einem PPV von 0,824 und einem NPV von 0,944. Generell zeigte die lokale Zytokinkonzentrationsanalyse höhere AUC-Werte als die systemische Zytokinspiegelbestimmung. Dies unterstützte die Hypothese einer höheren diagnostischen Genauigkeit der Analyse von Gelenkflüssigkeit gegenüber Serum.

Die Berechnung der als optimal zu bezeichnende Schwellenwerte und dadurch der diagnostischen Genauigkeit der drei AMPs in der Gelenkflüssigkeit und im Serum erfolgte auf die gleiche Weise wie bei den Zytokinen.

Tabelle 5.12: Zusammenfassung der Diskriminationsfähigkeitsanalyse der lokalen AMP-Konzentrationen aller Studienteilnehmer mit aseptischer und septischer Prothesenlockerung. AUC = „Area under the curve“; KI = Konfidenzintervall; GW = Grenzwert; Sens = Sensitivität; Spez = Spezifität; PPV = „Positive predictive value“, positiver Vorhersagewert; NPV = „Negative predictive Value“, negativer Vorhersagewert.

Marker	AUC	oberes 95% KI	unteres 95% KI	P-Wert	GW pg/dl	Sens	Spez	PPV	NPV
LL-37	0,875	0,759	0,991	<0,001	5,00	0,800	0,850	0,800	0,850
HBD-2	0,640	0,454	0,826	0,162	37,00	0,867	0,400	0,520	0,800
HBD-3	0,745	0,574	0,916	0,014	195,00	0,600	0,850	0,750	0,739

Tabelle 5.13: Zusammenfassung der Diskriminationsfähigkeitsanalyse der systemischen AMP-Konzentrationen der/aller Studienteilnehmer mit aseptischer und septischer Prothesenlockerung. AUC = „Area under the curve“; KI = Konfidenzintervall; GW = Grenzwert; Sens = Sensitivität; Spez = Spezifität; PPV = „Positive predictive value“, positiver Vorhersagewert; NPV = „Negative predictive Value“, negativer Vorhersagewert.

Marker	AUC	oberes 95% KI	unteres 95% KI	P-Wert	GW pg/dl	Sens	Spez	PPV	NPV
LL-37	0,657	0,471	0,843	0,117	1,00	0,733	0,500	0,524	0,714
HBD-2	0,738	0,564	0,913	0,017	78,00	0,800	0,700	0,667	0,824
HBD-3	0,610	0,414	0,806	0,271	68,00	0,333	0,950	0,833	0,655

Die statistische Analyse der diagnostischen Genauigkeit ergab für die lokale AMP-Bestimmung von LL-37 die höchste Vorhersagegenauigkeit mit einen AUC-Wert von

0,875 bei einem Grenzwert von 5,00 ng/ml, einer Sensitivität von 0,800, einer Spezifität von 0,850, einem PPV von 0,800 und einem NPV von 0,850 (Tab. 5.12, Abb. 5.13A). Die Auswertung der lokal signifikant erhöhten HBD3-Konzentration ergab einen AUC-Wert von 0,745 bei einem Grenzwert von 195,00 ng/ml (Tab. 5.12, Abb. 5.13A). Ein ähnlicher Wert ergab sich für die systemische Konzentration von HBD2 mit einem AUC-Wert von 0,738 bei einem Grenzwert von 78,00 ng/ml (Tab. 5.13, Abb. 5.13A).

Schließlich musste überprüft werden, ob sich eine weitere Verbesserung der diagnostischen Genauigkeit durch Kombination zweier Infektmarker erzielen ließ. Diese Annahme beruhte auf den Ergebnissen bisheriger Arbeiten, die eine direkte Beeinflussung der Zytokinspiegel durch die AMP-Konzentrationen und umgekehrt zeigen konnten (Yin et al., 2010, Presicce et al., 2009). Zu diesem Zweck wurde eine multivariate Analyse anhand logistischer Regression durchgeführt, um die diagnostische Genauigkeit zweier Infektmarker in Kombination berechnen zu können. Die Schwellenwerte der kombinierten Biomarker wurden dem Ergebnis linearer Regressionsgleichungen entnommen.

Tabelle 5.14: Zusammenfassung der vier lokalen Biomarkerkombinationen mit den höchsten AUC-Werten, der jeweiligen Gleichung zur Berechnung des Vorhersagewerts und den zugehörigen Grenzwerten.

Biomarker	Berechnung des Vorhersagewerts	Grenzwert	AUC-Wert
LL-37 & IL-4	$-3,392 + 0,040 \times \text{LL-37} + 0,374 \times \text{IL-4}$	-0,35	0,916
LL-37 & IL-6	$-3,287 + 0,921 \times \text{LL-37} - 0,002 \times \text{IL-6}$	-0,83	0,895
HBD3 & IL-4	$-7,025 - 0,020 \times \text{HBD-3} + 1,276 \times \text{IL-4}$	0,25	0,972
HBD3 & IL-6	$-2,072 - 0,005 \times \text{HBD-3} + 0,003 \times \text{IL-6}$	-0,23	0,849

Äußerst vielversprechende AUC-Werte mit sehr guter bis hervorragender diagnostischer Genauigkeit konnten durch die Kombination von LL-37 und IL-4 (AUC = 0,916) bei einem Vorhersagewert von -0,35, LL-37 und IL-6 (AUC = 0,895) bei einem Vorhersagewert von -0,83, HBD3 und IL-4 (AUC = 0,972) bei einem Vorhersagewert von 0,25 und HBD3 und IL-6 (AUC = 0,849) bei einem Vorhersagewert von -0,23 erzielt werden (Tab. 5.14, Abb. 5.13B)

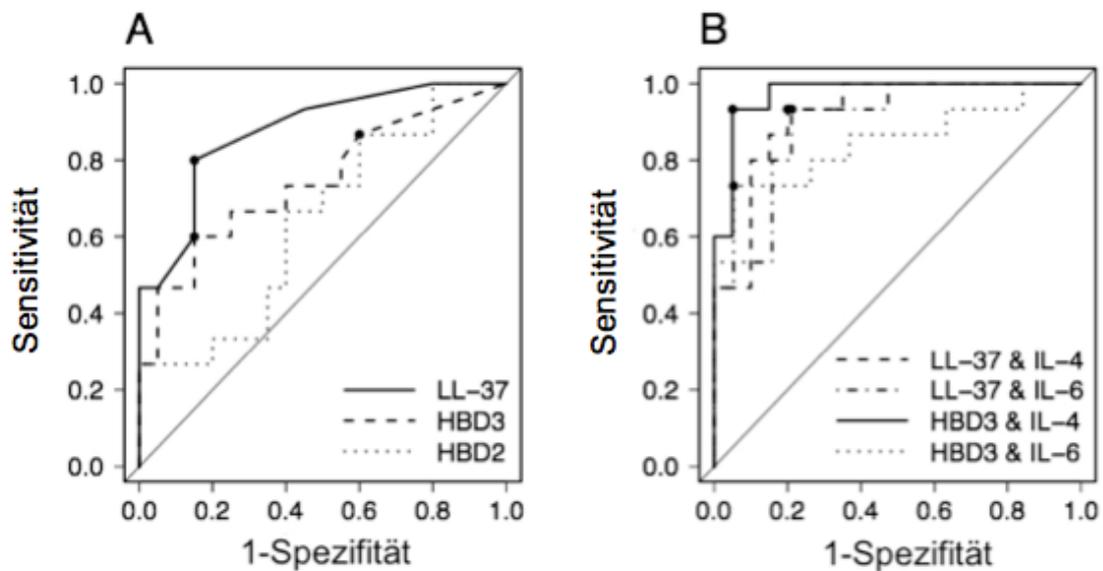


Abbildung 5.13: Vergleich der ROC-Kurven der einzelnen AMPs (A) und der kombinierten Infektmarker (B). AUC-Werte der einzelnen AMPs: LL-37 = 0,875; HBD-3 = 0,745; HBD-2 = 0,640. AUC-Werte der kombinierten Infektmarker: LL-37 & IL-4 = 0,916; LL37 & IL-6 = 0,895; HBD3& IL-4 = 0,972; HBD3 & IL-6 = 0,849.

5.9 Infekttafel

Das komplexe Profil der lokalen und systemischen Expression von 3 antimikrobiellen Peptiden sowie 6 proinflammatorischen Zytokinen bei Patienten mit periprothetischem Infekt gegenüber Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung wurde in einer diagnostischen Tafel zusammengefasst (Tab. 5.15). Bisher in der Literatur bei periprothetischer Infektion bzw. septischer Prothesenlockerung noch nicht beschrieben waren die signifikante Erhöhung der 3 AMPs sowie der 3 Zytokine IL-4, IL-17A und INF- γ .

Tabelle 5.15: Infekttafel. (*)= signifikant ($p \leq 0,05$) erhöhte Konzentration bei septischer Prothesenlockerung; (n.s.) = kein signifikanter Unterschied zwischen septischer und aseptischer Gruppe; GF=Gelenkflüssigkeit; Se=Serum.

	LL-37	HBD3	HBD2	IL-1 β	IL-4	IL-6	IL-17A	TNF α	IFN- γ
GF	*	*	n.s.	*	*	*	*	*	*
Se	n.s.	n.s.	*	n.s.	*	*	n.s.	n.s.	n.s.

6 DISKUSSION

Mit dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass es bei periprothetischen Infektionen von Knie- und Hüft-Totalendoprothesen zu einer signifikanten Erhöhung der lokalen Konzentration einzelner antimikrobieller Peptide sowie mehrerer, in diesem Zusammenhang noch nicht beschriebener proinflammatorischer Zytokine kommt. Dazu wurden zunächst die Konzentrationen der im Rahmen von periprothetischen Infekten bereits beschriebenen (Nilsdotter-Augustinsson et al., 2007), proinflammatorischen Zytokine Interleukin- (IL-) 1 β , IL-6 und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) in der Synovia des betroffenen Gelenks von Patienten mit gesicherter septischer beziehungsweise aseptischer Prothesenlockerung bestimmt und verglichen. Darüber hinaus erfolgte der Vergleich der proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-4, IL-17A und Interferon gamma (IFN- γ) sowie der antimikrobiellen Peptide (AMPs) Humanes Beta Defensin (*human beta defensin*, HBD) 2, HBD3 und aktives humanes Cathelicidin (LL-37) der Gelenkflüssigkeit dieser Patienten. Dies erbrachte den Erstdnachweis einer Erhöhung der lokalen Konzentration der AMPs HBD3 und LL-37 sowie der proinflammatorischen Zytokine IL-4, IL-17A und INF- γ in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit periprothetischer Infektion.

In einem weiteren Schritt erfolgte der Vergleich der Konzentrationen der beschriebenen AMPs und proinflammatorischen Zytokine auch im Blutserum dieser Patienten mit septischer und aseptischer Prothesenlockerung. Hierbei bestätigte sich die bereits beschriebene, signifikante Erhöhung von IL-6 und TNF α (Bottner et al., 2007). Bei IL-4 und HBD2 kam es in diesem Zusammenhang zum erstmaligen Nachweis einer signifikanten Erhöhung.

Anschließend folgte die statistische Analyse der erhobenen Daten mittels Analyse der Grenzwertoptimierungskurven (*Receiver operating characteristic*-, ROC-Kurve) und Youden-Index-Maximierung, um die jeweiligen Grenzwerte zur bestmöglichen Unterscheidung zwischen septischer und aseptischer Prothesenlockerung zu bestimmen. Die Beurteilung der diesbezüglichen diagnostischen Güte der einzelnen Biomarker erfolgte dann durch die Berechnung der Fläche unterhalb der ROC-Kurven (*Area under the curve*, AUC-Wert) der AMP- und Zytokinwerte. Hier zeigte sich für die lokale Konzentration der AMPs LL-37 und HBD3 mit AUC-Werten von 0,875 und 0,745 eine gute Vorhersagegenauigkeit. In der Gruppe der Zytokine

zeigten sich IL-1 β , IL-6, IFN- γ und TNF α mit guter und IL-4 sogar mit einer sehr guten Vorhersagegenauigkeit bei einem AUC-Wert von 0,944.

Danach wurde durch multivariate Analyse anhand logistischer Regression überprüft, ob durch Kombination zweier lokaler Entzündungsparameter eine zusätzliche Steigerung der Vorhersagegenauigkeit erzielt werden kann. Hierbei zeigte sich für die Kombination aus HBD3 und IL-4 ein AUC-Wert von 0,972 und damit eine exzellente Vorhersagegenauigkeit.

Somit konnte der potenzielle Nutzen der lokalen Konzentrationsbestimmung der AMPs LL-37 und HBD3 sowie der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-4, IL-6, IFN- γ und TNF α für die prä- und intraoperative Differentialdiagnostik der septischen gegenüber der aseptischen Prothesenlockerung demonstriert werden.

6.1 Gegenwärtige Standarddiagnostika des periprothetischen Infekts / der septischen Prothesenlockerung und deren Schwächen

Die korrekte Therapiewahl verlangt beim Verdacht einer Protheseninfektion bzw. septischen Prothesenlockerung eine sichere Differenzierung von septischem und aseptischem Geschehen. Die gegenwärtige (Gold-) Standarddiagnostik beginnt deshalb, wie in dieser Studie, mit einer gründlichen Beschwerdeanamnese und körperlichen Untersuchung mit Fokussierung auf die betroffene Extremität. Daran schließt sich die Anfertigung von Röntgenaufnahmen des betroffenen Gelenks an. In Einzelfällen werden diese durch CT-Aufnahmen und die Skelettszintigraphie ergänzt. Ebenso gehört die laborchemische Bestimmung der systemischen Entzündungsparameter CRP, BSG und Leukozytenzahl zum Routinevorgehen (Zimmerli et al., 2004, Trampuz and Zimmerli, 2005). Diesen Untersuchungsverfahren ist jedoch gemein, dass sie meist nur bei hochakuten Geschehen aussagekräftige Werte bzw. Verläufe liefern (Tigges et al., 1994).

Dementsprechend ergab sich in dieser Studie zwar ein signifikanter Unterschied der CRP-Konzentrationen der beiden Gruppen mit einem durchschnittlichen Wert von $10,3 \pm 12,5$ mg/dl in der septischen gegenüber $0,4 \pm 0,3$ mg/dl in der aseptischen Gruppe. Der Hauptgrund dafür war jedoch das Vorliegen einzelner Spitzenwerte von über 30 mg/dl in der septischen Gruppe, was durch die große Spannweite von $\pm 12,5$ mg/dl unterstrichen wird. Eine alleinige, sichere Unterscheidung von septischen und aseptischen Prothesenlockerungen anhand des systemischen CRP-Wertes war

somit in Übereinstimmung mit der Literatur nicht möglich. Auch die Bestimmung der Leukozytenzahl im Blut der Patienten konnte nicht zur sicheren Unterscheidung von infektiösen und nichtinfektiösen Implantatlockerungen herangezogen werden, da der Vergleich der Durchschnittswerte der beiden Gruppen keinen signifikante Differenz zeigte. Dieses Ergebnis wird unter anderem durch die Arbeiten von Di Cesare et al. und Kordelle et al. bestätigt, die für die Bestimmung der systemischen CRP-Konzentration im Rahmen von Protheseninfektionen jeweils eine hohe Sensitivität (0,94 respektive 1,0) bei nur mäßiger Spezifität (0,78 respektive 0,38) zeigen konnte (Di Cesare et al., 2005). Dies lässt den systemischen CRP-Wert als Ausschlussdiagnostikum erscheinen, der, falls erhöht, eher für ein entzündliches Geschehen spricht, dieses jedoch nicht beweisen kann. Aufgrund der Eigenschaft als universeller Entzündungsmarker ist der Wert darüberhinaus sehr störanfällig. Ein CRP-Wert von $< 1,0$ mg/dl spricht dagegen gegen das Vorliegen einer Infektion (Di Cesare et al., 2005, Kordelle et al., 2004). Auch die diesbezüglich geringe Aussagekraft der Leukozytenzahl, insbesondere deren geringe Sensitivität, lässt sich durch bereits durchgeführte Studien bestätigen (Gollwitzer et al., 2006a).

Den nächsten Schritt im diagnostischen Algorithmus der periprothetischen Infektion stellt die auf die Basisuntersuchungen folgende, präoperative Punktion des betroffenen Gelenks mit anschließender laborchemischer, zytologischer und mikrobiologischer Untersuchung des Punktats unter verlängerter, 14-tägiger Bebrütung dar. Nur sie allein gilt, neben der invasiveren arthroskopischen Zupfbiopsie, in der gegenwärtigen präoperativen Standarddiagnostik bei positivem mikrobiologischen Keimnachweis als sicherer Beweis eines Protheseninfekts (Bauer et al., 2006). Ein solcher Nachweis gelang bei 9 der 15 Patienten aus der Gruppe der septischen Prothesenlockerungen, was einer Sensitivität von 0,6 entspricht. Unterschiedliche Studien zur diagnostischen Relevanz der mikrobiologischen Untersuchung des präoperativen Gelenkpunktats kommen dabei zu einer großen Bandbreite der diagnostischen Aussagekraft mit Sensitivitätswerten von 0,65 – 0,94 (Spangehl et al., 1999). Diese resultieren jedoch aus unterschiedlichen Standards für die Definition einer Protheseninfektion im Sinne der jeweiligen Einschlusskriterien und stehen in Verbindung mit unterschiedlichen Methoden der Probengewinnung und -verwertung. Werden grundlegende Punkte wie Kontaminationsvermeidung, Punktion vor Beginn einer Antibiotikatherapie und optimale Bebrütungsmethoden beachtet, gilt die mikrobiologische Untersuchung des präoperativen Gelenkpunktats

mit ihrer sehr hohen Spezifität von 0,81 – 1,00 jedoch als sinnvolle Maßnahme und ermöglicht bei positivem Keimnachweis zugleich eine erregerspezifische Antibiotikatherapie (Gollwitzer et al., 2006b). Die niedrige Sensitivität der mikrobiologischen Untersuchung des präoperativen Gelenkpunktats in dieser Studie wird einerseits durch die fulminante Klinik zweier Patienten der septischen Gruppe, bei denen auf Grund einer massiven intrartikulären Eiteransammlung offensichtlich kein Keimnachweis möglich war, mitbedingt, andererseits beleuchtet sie auch die Schwierigkeit des präoperativen Infektionsnachweises, welche die Grundlage dieser Arbeit darstellt.

Im Vergleich dazu liefert die invasive mikrobiologische Untersuchung arthroskopisch oder offen chirurgisch gewonnener Gewebeproben mit jeweiliger verlängerter Bebrütungsdauer von 14 Tagen sehr sichere Ergebnisse. Werden diese in einer ausreichenden Anzahl (>5), sowie von repräsentativen Orten wie der Knochen-Implantat-Grenzschicht entnommen, erreicht die mikrobiologische Untersuchung von Gewebeproben eine Genauigkeit von 0,95 im Vergleich zur histopathologischen Untersuchung der Gewebeproben und gilt als beweisendes, definitives Diagnostikum einer septischen Prothesenlockerung (Gollwitzer et al., 2006b). Aus diesem Grund wurde der intraoperative Keimnachweis als eines der beiden Hauptkriterien für die Diagnosestellung einer septischen Prothesenlockerung in dieser Studie gewählt. Dementsprechend war bei 13 der 15 Patienten aus der septischen Gruppe der Keimnachweis in den intraoperativ gewonnenen Gewebeproben positiv. Auch hier handelt es sich bei den nicht geführten Keimnachweisen um die beiden Patienten mit fulminanter Klinik und massivem eitrigem Gelenkerguss. Insgesamt zeigte sich bei 10 Patienten eine Besiedelung der Prothese mit Koagulase negativen Staphylokokken (KNASt). Bei den drei weiteren septischen Prothesenlockerungen handelte es sich um Infektionen mit *Staphylokokkus aureus*. Zum Einen entspricht dieses Erregerspektrum den Einschlusskriterien dieser Studie, zum Anderen spiegelt es aber auch das durch Zimmerli et al. beschriebene Erregermuster wider (Zimmerli et al., 2004). Im Fall der 9 Patienten, bei denen ein positiver prä- und intraoperativer Keimnachweis geführt werden konnte, stimmten die jeweils nachgewiesenen bakteriellen Besiedelungen überein. Die zwei Patienten, bei denen weder prä- noch intraoperativ eine bakterielle Besiedelung nachgewiesen werden konnte, erfüllten aufgrund ihrer fulminanten Klinik mit massiver intrartikulärer Eiteransammlung die Einschlusskriterien für diese Studie.

Als letztes Diagnosekriterium im diagnostischen Algorithmus dient derzeit die invasive histologische Untersuchung intraoperativ gewonnener Gewebeproben. Sie weist eine von mehreren Studien bestätigte sehr hohe Genauigkeit von meist über 0,95 auf, da bei ihr eine schichtweise Analyse jeder einzelnen Probe stattfindet (Gollwitzer et al., 2006b). Ähnlich der mikrobiologischen Untersuchung von Gewebeproben kommt es auch hier auf eine repräsentative Probenentnahme aus entzündlich veränderten Arealen an, um möglichst aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten. Wird dies berücksichtigt, gilt der Befund der histopathologischen Untersuchung der fixierten Gewebeprobe als sicherster Einzelbefund (Gollwitzer et al., 2006b, Bauer, 2006). Dementsprechend wurde ein positiver Befund bei der histopathologischen Untersuchung der intraoperativ gewonnenen Gewebeproben in dieser Studie als zweites Hauptkriterium für die Zuteilung zur septischen Gruppe gewählt. In Übereinstimmung damit konnte bei allen Patienten der septischen Gruppe bei der histopathologischen Untersuchung eine periprothetische Membran Typ II oder III nach Morawietz et al. nachgewiesen werden (Morawietz et al., 2006).

Nach Studienbeginn wurde durch die *Musculoskeletal Infection Society* ein Vorschlag eines diagnostischen Goldstandards publiziert (Parvizi J, 2011). Vergleicht man die in der vorliegenden Arbeit gestellten Diagnosen mit den neueren Kriterien der *Musculoskeletal Infection Society*, so stimmen die finalen Diagnosen in allen Fällen überein, weshalb die aktuelle Studie auch auf die neuen Diagnosekriterien übertragbar ist.

6.2 Aktuelle diagnostische Lücke bei Periprothetischem Low Grade Infekt (PLGI)

Die Implantation von Fremdmaterial birgt stets ein erhöhtes Risiko für Infektionen. Dies beruht auf der vermehrten Prädisposition des Fremdmaterials für eine bakterielle Kolonisation. Das Risiko steigt dabei mit der Größe der Implantatoberfläche und der Oberflächenadhärenz der Bakterien. Ferner kann eine Potenzierung des Keimwachstums dazu führen, dass ursprünglich gering bzw. apathogene, opportunistische Organismen zu virulenten Erregern werden (Gristina et al., 1988). Die so stimulierten Erreger adhären an der Implantatoberfläche und produzieren Polysaccharide, Glykopeptide und Proteine, die eine Schutzschicht, den

sog. „Biofilm“ bilden. Dadurch geschützt, gehen die sessilen Bakterien in verschiedene Ruhestadien über (Costerton et al., 1999, Donlan, 2001, Gollwitzer, 2002). Studien zeigen auf, dass es durch die Bildung des Biofilms zu einer Interferenz mit der Immunabwehr kommt und die besiedelnden Erreger mit der Zeit eine Resistenz gegen körpereigene und körperfremde antimikrobielle Stoffe aufweisen (Anwar et al., 1992).

Die so erreichte Resistenz, in Verbindung mit der ruhestadienbedingten Verlangsamung des bakteriellen Stoffwechsels, machen die Diagnose und Therapie mancher periprothetischer Infekte besonders schwierig. Derartige Infektionen neigen dazu, erst Wochen bis Monate nach der Operation klinisch manifest zu werden. Trotz anfänglichem Ansprechen auf die antibiotische Therapie kommt es Tage bis Wochen nach deren Absetzen erneut zu einem Wiederaufflammen des Infekts. Hier verspricht in der Regel nur ein vollständiger Prothesenwechsel mit intermittierender mehrwöchiger Absenz jeglichen Implantationsmaterials (Girdlestone-Situation), chirurgischem Spülprogramm, ggf. Implantation eines antibiotikahaltigen Spacers und testgerechter Antibiose eine Chance auf Infektausheilung. Auch der für die präoperative Diagnose wichtige Keimnachweis gelingt nur selten (Berbari and Baddour, 2013). Auch in dieser Studie konnte diese Schwäche in der präoperativen Diagnostik verdeutlicht werden. Trotz einer verlängerten an- und aeroben Bebrütungszeit von 14 Tagen gelang lediglich in 9 von 13 Fällen ein positiver präoperativer Keimnachweis.

Hieraus ist ersichtlich, warum eine große Anzahl von PLGI präoperativ fälschlicherweise als aseptische Lockerung diagnostiziert werden. Beispielhaft dafür sind die Ergebnisse von Engesaeter et al, die belegen, dass eine systemische und lokale Antibiotikaprophylaxe nicht nur die Zahl der septischen Prothesenlockerungen, sondern auch die der als aseptisch eingeschätzten Lockerungen senkt. (Engesaeter et al., 2003). Moojen et al. untersuchten 176 Patienten mit präoperativ als aseptisch diagnostizierter Prothesenlockerung mittels Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR). Sie fanden, je nach Strenge der Diagnosekriterien, eine dennoch bestehende Infektionsrate von 4 – 13 % (Moojen et al., 2010).

Diese große diagnostische Lücke, mit einer hohen Anzahl falsch negativer Diagnosen, führt folglich zu einer suboptimalen Therapie wie z.B. des einzeitigen Implantatwechsels bei Infektion, die sowohl mit Risiken und vermehrtem Leiden für den Patienten als auch mit enormen volkswirtschaftlichen Kosten verbunden sind.

Aber auch zu sensitive Diagnoseverfahren und eine zu leichtfertige Diagnosestellung, wie z.B. bei der Kontamination des Gelenkpunktats mit von der Hautoberfläche stammenden Keimen, führen zu unnötigen Risiken und Kosten im Sinne von unnötigen operativen mehrzeitigen Eingriffen und verzichtbarer Antibiotiktherapie. Diese oft schmale diagnostische und therapeutische Gradwanderung, die gegenwärtig im klinischen Alltag herrscht, macht das Management von PLGI zu einem nach wie vor risikobehafteten und schwierigen Unterfangen mit weitreichenden Folgen. Der dringende Bedarf an neuartigen, sicheren Diagnoseverfahren, Grundstein dieser Arbeit, wird hier nochmals klar ersichtlich.

6.3 Bestätigung bekannter und Etablierung neuer Zytokine als (lokale) Biomarker des PLGI / der septischen Prothesenlockerung

Im Gegensatz zu einer bisher nicht beschriebenen Expression von AMPs bei septischen Prothesenlockerungen existieren bereits mehrere Studien, die erhöhte Konzentrationen verschiedener proinflammatorischer Zytokine in der Gelenkflüssigkeit (Nilsdotter-Augustinsson et al., 2007) und im Serum (Bottner et al., 2007) von Patienten mit Protheseninfektionen aufgezeigt haben. Deshalb wurde in dieser Studie zunächst ebenfalls die Konzentration der in diesem Zusammenhang schon beschriebenen, proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α überprüft, um so eine Referenz zur bisherigen Datenlage herzustellen. Zusätzlich wurden die Konzentrationen der diesbezüglich noch nicht beschriebenen, aber hinsichtlich eines periprothetischen Infektgeschehens als vielversprechend geltenden proinflammatorischen Zytokine IL-2, IL-4, IL-17A und IFN- γ in der Gelenkflüssigkeit und im Serum von Patienten mit aseptischer und septischer Prothesenlockerung gemessen und verglichen.

6.3.1 Lokale Zytokinkonzentration

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Nilsdotter-Augustinsson et al. konnte auch in dieser Studie eine signifikante lokale Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF α bestätigt werden (Nilsdotter-Augustinsson et al., 2007). Darüber hinaus konnte eine bis jetzt noch nicht beschriebene signifikante

Erhöhung der Konzentration der Zytokine IL-4, IL-17A und INF- γ in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit septischer Prothesenlockerung bzw. Protheseninfektion dokumentiert werden. Dies stützt die Annahme einer engen Verzahnung der einzelnen Zytokine im periprothetischen Infektgeschehen miteinander und macht auch diese Biomarker für die präoperative periprothetische Infektdiagnostik über die Untersuchung des Gelenkpunktats interessant.

6.3.2 Systemische Zytokinkonzentration

Auch die Untersuchung der systemischen Zytokinkonzentrationen im Serum bestätigt die bisherige Datenlage. So ließ sich in dieser Studie die bereits von Bottner et al. beschriebene signifikante Erhöhung der systemischen IL-6-Konzentration bei Patienten mit septischer Prothesenlockerung bestätigen (Bottner et al., 2007). Ferner zeigt die vorliegende Studie eine zusätzliche signifikante Erhöhung der IL-4-Konzentration im Serum der Patienten mit Protheseninfektion, wogegen sich die systemischen Konzentrationen von IL-17A und INF- γ in der septischen und aseptischen Gruppe nicht signifikant unterschieden.

Dieser Sachverhalt geht mit einer in-vitro Studie von Ibarra-Velarde und Alcala-Canto über die Pathogenese der Coccidiose bei Ziegen einher. Sie beschreiben, dass IL-4 die Expression von INF- γ in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononucleated cells*, PBMCs) herunterregulieren kann (Ibarra-Velarde and Alcala-Canto, 2007).

Eine Erklärung für die hohen IL-6-Konzentrationen im Serum der Patienten mit septischer Prothesenlockerung könnte durch hohe systemische HBD2-Konzentrationen bedingt sein. Denn wie Yin et al. und Boniotta et al. zeigten, kann HBD2 eine vermehrte IL-6-Sekretion in antigenpräsentierende dendritische Zellen (Yin et al., 2010) und PBMCs (Boniotta et al., 2006) induzieren.

6.4 Erstnachweis von AMPs als (lokale) Biomarker des PLGI

Wie bereits dargestellt, handelt es sich bei AMPs in erster Linie um einen Bestandteil der lokalen Immunabwehr. Ihr systemischer Einfluss gilt als zweitrangig (Elsbach, 2003). Diese Annahme wird vor allem durch ein breites Spektrum lokaler

Abwehrmechanismen, wie zum Beispiel der Abtötung von Mikroorganismen durch Membranperforation, untermauert (Palfy, 2009).

6.4.1 Lokale AMP-Konzentration

In Übereinstimmung mit der vorherrschenden Auffassung über die hauptsächlich lokale Aufgabe der AMPs, konnte in dieser Studie der Erstdnachweis einer signifikanten Erhöhung der Konzentration von HBD3 und LL-37 in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit Protheseninfektion im Vergleich zu Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung gezeigt werden. Vor allem LL-37 zeigte dabei mit einem AUC-Wert von 0,875 eine vielversprechende diagnostische Vorhersagegenauigkeit. Im Gegensatz dazu zeigte sich beim Vergleich der septischen und aseptischen Gruppe bezüglich der lokalen Konzentration von HBD2 kein signifikanter Unterschied. Dieser fehlende Unterschied könnte durch eine implantatassoziierte Erhöhung der lokalen HBD2-Expression in beiden Gruppen bedingt sein. Die sichere Einschätzung einer solchen, möglicherweise fremdmaterialinduzierten Expressionssteigerung ist durch das Fehlen einer implantatfreien Kontrollgruppe in dieser Studie nicht möglich und erfordert daher weitere Studien mit den entsprechenden (Kontroll-) Gruppen.

Eine weitere Ursache für den fehlenden Unterschied bei den lokalen HBD2-Spiegeln könnten die ebenfalls nachgewiesenen hohen lokalen IL-4-Konzentrationen sein. In ihrer Studie über die Coccidiose der Ziege konnten Ibarra-Velarde und Alcalá-Canto neben der erwähnten Interaktion von IL-4 mit $\text{INF-}\gamma$ ferner zeigen, dass es durch hohe IL-4-Konzentrationen zur verminderten Freisetzung von "goat beta defensin 2" (GBD2) aus intestinalen, epithelialen Zellen kommt (Ibarra-Velarde and Alcalá-Canto, 2007). Eine Übertragung auf HBD2 und das menschliche Gelenk ist denkbar.

6.4.2 Systemische AMP-Konzentration

Der Vergleich der systemischen AMP-Konzentration von Patienten mit Protheseninfektion und Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung ergab sowohl für HBD3 als auch für LL-37 keine signifikanten Unterschiede. Interessanterweise konnte jedoch eine signifikant höhere HBD2-Konzentration im Serum von Patienten mit Protheseninfektion im Vergleich zu Patienten der aseptischen Gruppe

nachgewiesen werden. Ein Grund hierfür könnten die funktionellen Eigenschaften von HBD2 sein. Denn neben seiner direkt antimikrobiziden Aktivität wirkt es als Chemokin und Bindeglied zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem (Yang et al., 2004, Yang and Oppenheim, 2004). So wird es im Allgemeinen von Leukozyten exprimiert (Hollox et al., 2003) und dabei durch proinflammatorische Zytokine wie TNF α (Varoga et al., 2006a), IL-1 β (Bajaj-Elliott et al., 2002, Yin et al., 2010, Varoga et al., 2006a)(s.166), IL-6 (Varoga et al., 2006a) und IFN- γ (Duits et al., 2002) beeinflusst. Die erhöhten HBD2-Serumspiegel könnten deshalb durch die zusätzliche Aktivierung der systemischen zur lokalen Immunabwehr, wie sie auch von Vordenbaum et al. im Rahmen der Wegener-Granulomatose gezeigt werden konnte (Vordenbaumen et al., 2011), erklärt werden. Diese Vermutung wird ebenfalls durch die in dieser Studie gezeigte Erhöhung der systemischen Konzentration einiger proinflammatorischer Zytokine untermauert. Zur gänzlichen Klärung des beobachteten Phänomens sind jedoch weitere Studien notwendig.

6.5 Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit durch Kombination von Biomarkern

Nachdem der Erstdnachweis erbracht wurde, dass es im Fall einer septischen Prothesenlockerung zu einer signifikanten Erhöhung mehrerer AMPs und proinflammatorischer Zytokine kommt, stellte sich konsequenterweise die Frage, ob sich durch eine Kombination einzelner AMPs und Zytokine eine Erhöhung der diagnostischen Güte erzielen lässt. Diese Annahme stützte sich auf die Tatsache, dass AMPs die Fähigkeit besitzen, durch Induktion spezifischer Zytokinexpressionmuster mit verschiedensten proinflammatorischen Zytokinen zu interagieren (Yin et al., 2010, Presicce et al., 2009). Auch der parallele Nachweis beider Biomarkerklassen, demonstriert in der „Infekttafel“ (Tab. 5.15), untermauert dies. Hier zeigte sich ein breites Spektrum verschiedener AMPs und Zytokine mit signifikant erhöhten lokalen Konzentrationen in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit septischen Prothesenlockerungen. Basierend auf dieser Hypothese wurden die AUC-Werte verschiedener AMP-Zytokinkombinationen mittels multivariater Analyse anhand logistischer Regression berechnet. Obwohl es sich dabei, auf Grund der kleinen Stichprobengröße, nur um Zweierkombinationen handeln konnte, zeigten die vielversprechendsten Biomarkerpaare (LL-37/IL-4, LL-37/IL-6, HBD3/IL-4 und

HBD3/IL-4) gute bis exzellente AUC-Werte. Mit der höheren diagnostischen Genauigkeit der Kombination aus HBD-3 und IL-4 sowie LL-37 und IL-4 gegenüber derjenigen der einzelnen Biomarker bestätigte sich die Hypothese einer Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit durch Biomarkerkombination.

6.6 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Studie deuten, durch Analyse der lokalen AMP-Expression im Gelenkpunktat, auf neue Aspekte des körpereigenen Versuchs der Bewältigung der Endoprotheseninfektion hin. Ferner liefert die Studie einen wichtigen, klinisch möglicherweise nutzbaren Anhaltspunkt für die diagnostische Verbesserung der Differenzierung von aseptischen gegenüber septischen, periprothetischen Entzündungsprozessen. Schon die alleinige lokale Analyse der LL-37-Expression lieferte eine gute Vorhersagegenauigkeit bei der Unterscheidung der beiden Krankheitsentitäten. Die AMP-Analyse der Gelenkflüssigkeit stellt dabei vor allem eine frühzeitige, kostengünstige und im klinischen Management unkomplizierte präoperative Diagnosemöglichkeit dar. So kann die Probengewinnung ohne Mehraufwand im Rahmen der, bei beschwerdebehafteter Knie- und Hüfttotalendoprothetik routinemäßig durchgeführter, präoperativer Gelenkpunktion in der ambulanten Patientenversorgung durchgeführt werden. Ein zusätzlicher invasiver Eingriff zur Gewebeprobengewinnung mit später Diagnosestellung, oder eine zusätzliche Strahlenbelastung, wie sie bei bildgebenden Diagnoseverfahren notwendig sind, entfallen dabei völlig.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Analyse einer Kombination aus zwei verschiedenen Biomarkern in der Gelenkflüssigkeit eine deutliche Verbesserung ihrer individuellen Vorhersagegenauigkeit bewirkt und somit der Analyse einzelner Serumparameter zum gegenwärtigen Kenntnisstand auf diesem Gebiet vorzuziehen ist. Dies unterstreicht die Ergebnisse bisheriger Studien, dass verschiedene AMPs und Zytokine in einer engen Wechselwirkung miteinander stehen und ihre lokale Konzentration gegenseitig beeinflussen (Yin et al., 2010). Eine vermutete weitere Steigerung der Vorhersagegenauigkeit durch eine Kombination von mehr als zwei Biomarkern ließ sich in dieser Pilotstudie, auf Grund der Stichprobengröße von 35 Patienten, nicht durchführen. Hierzu werden in unserer Arbeitsgruppe Folgestudien mit größerem Patientenkollektiv aktuell durchgeführt. Ziel ist die Validierung

bisheriger Ergebnisse und Etablierung „verbindlicher“ Grenzwerte der einzelnen AMPs und Zytokine bzw. deren Kombinationen zur sicheren präoperativen Differenzierung von septischer und aseptischer Prothesenlockerung.

Ziel von weiteren Studien mit einem größeren Erregerspektrum wird außerdem sein, das intrartikuläre AMP- und Zytokinexpressionsmuster in Verbindung mit dem infizierenden Keim zu bringen. Ein präoperativ bestimmtes, erregerspezifisches Expressionsmuster, ähnlich der Infekttafel dieser Studie (Tab. 5.15), könnte dann einen wertvollen Hinweis auf die Art der zugrunde liegenden Keimbesiedelung geben und dadurch eine frühzeitig gezielte antibiotische Therapie des infizierten Gelenks ermöglichen. Die bisher in der Klinik stattfindende, empirische Antibiotikagabe mit der Gefahr der weiteren Resistenzbildung ließe sich dadurch vermeiden.

Mit einem ähnlichen Ansatz könnte dann außerdem das Expressionsmuster von klinisch manifesten, akuten periprothetischen Infektionen mit dem von klinisch inapparenten, chronischen PLGI verglichen werden. Besonders sensitive AMPs oder proinflammatorische Zytokine könnten dann helfen, die gegenwärtige diagnostische Lücke des PLGI zu schließen.

Auch ein Vergleich der Biomarkerexpressionsmuster in der Gelenkflüssigkeit von gesunden Probanden gegenüber Patienten mit infektiöser Arthritis ohne Gelenkersatz könnte das Zusammenspiel der einzelnen Infektparameter im Bezug auf implantierte Fremdkörper weiter beleuchten.

Abschließend scheint auch eine Ausweitung der Ergebnisse dieser bzw. darauf aufbauender Studien auf andere operative Bereiche wie den Teilgelenkersatz oder Weichteiloperationen wie zum Beispiel der Kreuzbandersatzplastik sinnvoll.

7 ZUSAMMENFASSUNG

Hüfttotalendoprothetik (H-TEP) und Knieendoprothetik (K-TEP) zählen zu den am häufigsten durchgeführten operativen Eingriffen in der Orthopädie und gelten als sichere und effektive Methoden zur Behandlung fortgeschrittener Gelenkerkrankungen. Dennoch kommt es in ca. 10 % der Fälle zu implantatassoziierten Komplikationen. Die sichere Differenzierung aseptischer und septischer Versagensursachen gilt hier als wesentlich für den Therapieerfolg. Insbesondere der unscheinbare, sogenannte *Periprothetische Low Grade Infekt (PLGI)* stellt dabei eine besondere Herausforderung dar, da er klinisch nur wenig Anhalt für ein infektiöses Geschehen bietet und durch bisherige Standarddiagnoseverfahren nicht sicher zu identifizieren ist.

Antimikrobielle Peptide (AMPs) sind Teil des angeborenen Immunsystems. Sie wirken gegen eine Vielzahl von Mikroorganismen, vordergründig durch ihr breites Spektrum an direkten antimikrobiellen Eigenschaften. Ihre Hauptwirkung liegt dabei in der lokalen Abwehr von Krankheitserregern mit Aktivierung der adaptiven Immunabwehr. Ihr Vorkommen im Gelenkbereich mit gesteigerter Expression bei entzündlichen Gelenkerkrankungen wurde in vorherigen Arbeiten gezeigt.

Ziel der Arbeit war es, den Nutzen ausgesuchter AMPs und proinflammatorischer Zytokine für die Diagnostik des Protheseninfektes zu evaluieren.

Dafür wurde in einer prospektiven, kontrollierten, monozentrischen Studie das Gelenkpunktat und Blutserum von 15 konsekutiven Patienten mit gesicherter septischer Hüft- oder Knieprothesenlockerung sowie 20 Kontrollpatienten mit gesicherter aseptischer Hüft- oder Knieprothesenlockerung untersucht. Die Spiegel der AMPs Humanes Betadefensin 2 (HBD2), HBD3 und Cathelicidin LL-37 wurden mittels ELISA ermittelt, die der proinflammatorischen Zytokine mit Hilfe eines Cytometric Bead Arrays (CBA).

Beim Vergleich der beiden Gruppen zeigte sich bei Patienten mit septischer Prothesenlockerung eine signifikante lokale Erhöhung der AMPs HBD3 ($P=0,012$) und LL-37 ($P<0,001$) mit einem AUC-Wert in einer Grenzwertoptimierungskurven (ROC) Berechnung von 0,745 und 0,875. Ferner war eine signifikante lokale Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine Interleukin-1 beta (IL-1 β) ($P=0,001$), IL-4 ($P<0,001$), IL-6 ($P=0,002$), IL-17A ($P=0,001$), Interferon-gamma (IFN- γ) und Tumornekrosefaktor alpha (TNF α) bei den Infektpatienten zu beobachten. Die

Kombination von einem AMP und einem Zytokin mittels logistischer Regressionsanalyse führte zu einer Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit mit AUC-Werten von 0,916 (LL-37 und IL-4), 0,895 (LL-37 und IL-6), 0,972 (HBD-3 und IL-4) und 0,849 (HBD-3 und IL-6). Die Untersuchung der systemischen AMP- und Zytokinkonzentrationen wies hingegen - mit Ausnahme von HBD2, IL-4 und IL-6 (AUC-Wert $<0,75$) - keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit septischer gegenüber aseptischer Lockerung auf.

In dieser Arbeit wurde erstmalig eine Erhöhung von AMPs sowie ausgesuchter proinflammatorischer Zytokine in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit septischer Endoprothesenlockerung bzw. -infektion gezeigt. Dieser Erstdnachweis sowie die Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit durch Kombination dieser Marker kann für eine verbesserte Diagnostik des PLGI wegweisend sein.

8 LITERATURVERZEICHNIS

- ALI, S., CHRISTIE, A. & CHAPEL, A. 2009. The pattern of procalcitonin in primary total hip and knee arthroplasty and its implication in periprosthetic infection. *J Clin Med Res*, 1, 90-4.
- AMSTUTZ, H. C., CAMPBELL, P., KOSOVSKY, N. & CLARKE, I. C. 1992. Mechanism and clinical significance of wear debris-induced osteolysis. *Clinical orthopaedics and related research*, 7-18.
- ANWAR, H., STRAP, J. L., CHEN, K. & COSTERTON, J. W. 1992. Dynamic interactions of biofilms of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* with tobramycin and piperacillin. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 36, 1208-14.
- ASPENBERG, P. & HERBERTSSON, P. 1996. Periprosthetic bone resorption. Particles versus movement. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 78, 641-6.
- BAJAJ-ELLIOTT, M., FEDELI, P., SMITH, G. V., DOMIZIO, P., MAHER, L., ALI, R. S., QUINN, A. G. & FARTHING, M. J. 2002. Modulation of host antimicrobial peptide (beta-defensins 1 and 2) expression during gastritis. *Gut*, 51, 356-61.
- BARRACK, R. L., JENNINGS, R. W., WOLFE, M. W. & BERTOT, A. J. 1997. The Coventry Award. The value of preoperative aspiration before total knee revision. *Clinical orthopaedics and related research*, 8-16.
- BARRETT, J., LOSINA, E., BARON, J. A., MAHOMED, N. N., WRIGHT, J. & KATZ, J. N. 2005. Survival following total hip replacement. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 87, 1965-71.
- BAUER, T. W. 2006. Diagnosis of Periprosthetic Infection. *The Journal of Bone and Joint Surgery*, 88, 869-882.
- BAUER, T. W., PARVIZI, J., KOBAYASHI, N. & KREBS, V. 2006. Diagnosis of periprosthetic infection. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 88, 869-82.
- BAUMANN, B., FUERST, M., KIRSCHNER, S., LOHMANN, C., NUECHTERN, J. V., RADER, C., RUETHER, W., SEIFERT, J. D. & ZUSTIN, J. 2008. Versagensursachen primärer Implantationen. In: WIRZ, D., RADER, C. P. & REICHEL, H. (eds.) *Revisionsendoprothetik der Hüftpfanne*. Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- BERBARI, E. & BADDOUR, L. M. 2013. *Clinical manifestation and diagnosis of prosthetic joint infections* [Online]. Available: <http://www.uptodate.com/contents/clinical-manifestation-and-diagnosis-of-prosthetic-joint-infections> [Accessed 15. Nov. 2013].
- BOKAREWA, M. I., JIN, T. & TARKOWSKI, A. 2003. Intraarticular release and accumulation of defensins and bactericidal/permeability-increasing protein in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 30, 1719-24.
- BONIOTTO, M., JORDAN, W. J., ESKDALE, J., TOSSI, A., ANTCHEVA, N., CROVELLA, S., CONNELL, N. D. & GALLAGHER, G. 2006. Human beta-defensin 2 induces a vigorous cytokine response in peripheral blood mononuclear cells. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 50, 1433-41.
- BOTTNER, F., WEGNER, A., WINKELMANN, W., BECKER, K., ERREN, M. & GOTZE, C. 2007. Interleukin-6, procalcitonin and TNF-alpha: markers of periprosthetic infection following total joint replacement. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 89, 94-9.
- BOWDISH, D. M., DAVIDSON, D. J. & HANCOCK, R. E. 2006. Immunomodulatory properties of defensins and cathelicidins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 306, 27-66.

- BROWN, C., FISHER, J. & INGHAM, E. 2006. Biological effects of clinically relevant wear particles from metal-on-metal hip prostheses. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers. Part H, Journal of engineering in medicine*, 220, 355-69.
- CHARNLEY, J. 1960. Anchorage of the femoral head prosthesis to the shaft of the femur. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 42-B, 28-30.
- CHEN, R., LOWE, L., WILSON, J. D., CROWTHER, E., TZEKGAI, K., BISHOP, J. E. & VARRO, R. 1999. Simultaneous Quantification of Six Human Cytokines in a Single Sample Using Microparticle-based Flow Cytometric Technology. *Clinical chemistry*, 45, 1693-1694.
- CORVEC, S., PORTILLO, M. E., PASTICCI, B. M., BORENS, O. & TRAMPUZ, A. 2012. Epidemiology and new developments in the diagnosis of prosthetic joint infection. *Int J Artif Organs*, 0.
- COSTERTON, J. W., STEWART, P. S. & GREENBERG, E. P. 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284, 1318-22.
- DAKIN, H., GRAY, A., FITZPATRICK, R., MACLENNAN, G. & MURRAY, D. 2012. Rationing of total knee replacement: a cost-effectiveness analysis on a large trial data set. *BMJ Open* [Online], 2.
- DE SMET, K. & CONTRERAS, R. 2005. Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett*, 27, 1337-47.
- DEL POZO, J. L. & PATEL, R. 2009. Infection Associated with Prosthetic Joints. *New England Journal of Medicine*, 361, 787-794.
- DI CESARE, P. E., CHANG, E., PRESTON, C. F. & LIU, C. J. 2005. Serum interleukin-6 as a marker of periprosthetic infection following total hip and knee arthroplasty. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 87, 1921-7.
- DONLAN, R. M. 2001. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 33, 1387-92.
- DORR, L. D., JONES, R. E., PADGETT, D. E., PAGNANO, M., RANAWAT, A. S. & TROUSDALE, R. T. 2011. Robotic guidance in total hip arthroplasty: the shape of things to come. *Orthopedics*, 34, e652-5.
- DORSCHNER, R. A., PESTONJAMASP, V. K., TAMAKUWALA, S., OHTAKE, T., RUDISILL, J., NIZET, V., AGERBERTH, B., GUDMUNDSSON, G. H. & GALLO, R. L. 2001. Cutaneous injury induces the release of cathelicidin antimicrobial peptides active against group A Streptococcus. *J Invest Dermatol*, 117, 91-7.
- DREES, P., ECKARDT, A., GAY, R. E., GAY, S. & HUBER, L. C. 2007. Mechanisms of disease: Molecular insights into aseptic loosening of orthopedic implants. *Nat Clin Pract Rheumatol*, 3, 165-71.
- DUIJS, L. A., RAVENSBERGEN, B., RADEMAKER, M., HIEMSTRA, P. S. & NIBBERING, P. H. 2002. Expression of beta-defensin 1 and 2 mRNA by human monocytes, macrophages and dendritic cells. *Immunology*, 106, 517-25.
- EBEN, R., DIETRICH, K. A., NERZ, C., SCHNEIDER, S., SCHUH, A., BANKE, I. J., MAZOOCHIAN, F. & THOMAS, P. 2010. [Contact allergy to metals and bone cement components in patients with intolerance of arthroplasty]. *Dtsch Med Wochenschr*, 135, 1418-22.
- ELSBACH, P. 2003. What is the real role of antimicrobial polypeptides that can mediate several other inflammatory responses? *J Clin Invest*, 111, 1643-5.

- ENGESAETER, L. B., LIE, S. A., ESPEHAUG, B., FURNES, O., VOLLSET, S. E. & HAVELIN, L. I. 2003. Antibiotic prophylaxis in total hip arthroplasty: effects of antibiotic prophylaxis systemically and in bone cement on the revision rate of 22,170 primary hip replacements followed 0-14 years in the Norwegian Arthroplasty Register. *Acta Orthop Scand*, 74, 644-51.
- ERENS, G. A., THORNHILL, T. S. & KATZ, J. N. 2013. *Complications of total hip arthroplasty* [Online]. Available: <http://www.uptodate.com/contents/complications-of-total-hip-arthroplasty> [Accessed 15. Nov. 2013].
- FROMMELT, L. 2008. [Aspiration of joint fluid for detection of the pathogen in periprosthetic infection]. *Der Orthopade*, 37, 1027-34; quiz 1035-6.
- GALANTE, J., ROSTOKER, W., LUECK, R. & RAY, R. D. 1971. Sintered fiber metal composites as a basis for attachment of implants to bone. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 53, 101-14.
- GALLO, J. & KAMINEK, M. 2011. [Preoperative diagnosis of prosthetic joint infection]. *Acta chirurgiae orthopaedicae et traumatologiae Cechoslovaca*, 78, 510-8.
- GALLO, R. L. & NIZET, V. 2008. Innate barriers against infection and associated disorders. *Drug discovery today. Disease mechanisms*, 5, 145-152.
- GEIPEL, U. 2009. Pathogenic organisms in hip joint infections. *International journal of medical sciences*, 6, 234-40.
- GEMMEL, F., VAN DEN WYNGAERT, H., LOVE, C., WELLING, M. M., GEMMEL, P. & PALESTRO, C. J. 2012. Prosthetic joint infections: radionuclide state-of-the-art imaging. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*, 39, 892-909.
- GILL, G. S. & JOSHI, A. B. 2001. Long-term results of cemented, posterior cruciate ligament-retaining total knee arthroplasty in osteoarthritis. *Am J Knee Surg*, 14, 209-14.
- GIULIERI, S. G., GRABER, P., OCHSNER, P. E. & ZIMMERLI, W. 2004. Management of infection associated with total hip arthroplasty according to a treatment algorithm. *Infection*, 32, 222-8.
- GLEHR, M., FRIESENBICHLER, J., HOFMANN, G., BERNHARDT, G. A., ZACHERL, M., AVIAN, A., WINDHAGER, R. & LEITHNER, A. 2013. Novel biomarkers to detect infection in revision hip and knee arthroplasties. *Clinical orthopaedics and related research*, 471, 2621-8.
- GLYNN, A. A. & MILNE, C. M. 1965. Lysozyme and immune bacteriolysis. *Nature*, 207, 1309-10.
- GOLLWITZER, H. 2002. *Eine resorbierbare Poly-D,L-Laktid-Beschichtung zur Ausrüstung medizinischer Implantate: mit antithrombogenen Oberflächen in der Neonatologie und antiinfektiven Oberflächen in der Orthopädie*. Doktor der Medizin, Technische Universität München.
- GOLLWITZER, H., DIEHL, P., GERDESMAYER, L. & MITTELMEIER, W. 2006a. [Diagnostic strategies in cases of suspected periprosthetic infection of the knee. A review of the literature and current recommendations]. *Der Orthopade*, 35, 904, 906-8, 910-6.
- GOLLWITZER, H., DIEHL, P., GERDESMAYER, L. & MITTELMEIER, W. 2006b. Diagnostische Strategien bei Verdacht auf periprothetische Infektion einer Kniegelenkttotalendoprothese. *Der Orthopade*, 35, 904-916.
- GRADINGER, R., GOLLWITZER, H. & GRUNDEI, H. 2006. Geschichtliche Entwicklung der Endoprothetik und der Fixation durch Spongiosa-Metal®. *Ossäre Integration*. Springer Berlin Heidelberg.

- GRISTINA, A. G., NAYLOR, P. & MYRVIK, Q. 1988. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface. *Med Prog Technol*, 14, 205-24.
- GUANI-GUERRA, E., SANTOS-MENDOZA, T., LUGO-REYES, S. O. & TERAN, L. M. 2010. Antimicrobial peptides: general overview and clinical implications in human health and disease. *Clin Immunol*, 135, 1-11.
- HAILER, N. P., GARELLICK, G. & KARRHOLM, J. 2010. Uncemented and cemented primary total hip arthroplasty in the Swedish Hip Arthroplasty Register. *Acta orthopaedica*, 81, 34-41.
- HANCOCK, R. 2001. Cationic peptides: effectors in innate immunity and novel antimicrobials. *The Lancet Infectious Diseases*, 1, 156-164.
- HANSEN, A. D. & RAND, J. A. 1999. Evaluation and treatment of infection at the site of a total hip or knee arthroplasty. *Instructional course lectures*, 48, 111-22.
- HARDER, J., BARTELS, J., CHRISTOPHERS, E. & SCHRODER, J. M. 1997. A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387, 861.
- HENSSG, E. J., GRUNDEI, H., ETSPÜLER, R., KOLLER, W. & FINK, K. 1985. Die anatomisch angepasste Endoprothese des proximalen Femures. *Z Orthop Unfall*, 123, 821,828.
- HERNIGOU, P., FLOUZAT-LACHIANETTE, C. H., JALIL, R., UIRASSU BATISTA, S., GUISSOU, I. & POIGNARD, A. 2010. Treatment of infected hip arthroplasty. *Open Orthop J*, 4, 126-31.
- HIGASHI, H. & BARENDREGT, J. J. 2011. Cost-effectiveness of total hip and knee replacements for the Australian population with osteoarthritis: discrete-event simulation model. *PLoS One*, 6, e25403.
- HOLLOX, E. J., ARMOUR, J. A. & BARBER, J. C. 2003. Extensive normal copy number variation of a beta-defensin antimicrobial-gene cluster. *Am J Hum Genet*, 73, 591-600.
- HOPE, P. G., KRISTINSSON, K. G., NORMAN, P. & ELSON, R. A. 1989. Deep infection of cemented total hip arthroplasties caused by coagulase-negative staphylococci. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 71, 851-5.
- HOTHORN, T., HORNIK, K., VAN DE WIEL, M. A. & ZEILEIS, A. 2008. Implementing a class of permutation tests: The coin package. *Journal of Statistical Software*, 28, 1-23.
- HUKKANEN, M., CORBETT, S. A., BATTEN, J., KONTTINEN, Y. T., MCCARTHY, I. D., MACLOUF, J., SANTAVIRTA, S., HUGHES, S. P. & POLAK, J. M. 1997. Aseptic loosening of total hip replacement. Macrophage expression of inducible nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase-2, together with peroxynitrite formation, as a possible mechanism for early prosthesis failure. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 79, 467-74.
- IBARRA-VELARDE, F. & ALCALA-CANTO, Y. 2007. Downregulation of the goat beta-defensin-2 gene by IL-4 in caprine intestinal epithelial cells infected with *Eimeria* spp. *Parasitol Res*, 101, 613-8.
- JEROSCH, J. & HEISEL, J. 1999. *Knieendoprothetik*, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg.
- JUDET, R. 1975. [Total hip endoprosthesis made of porometal without cement anchoring]. *Zeitschrift fur Orthopadie und ihre Grenzgebiete*, 113, 828-9.
- KARRHOLM, J. 2010. The Swedish Hip Arthroplasty Register (<http://www.shpr.se>). *Acta orthopaedica*, 81, 3-4.
- KIRWAN, J. R., CURREY, H. L., FREEMAN, M. A., SNOW, S. & YOUNG, P. J. 1994. Overall long-term impact of total hip and knee joint replacement surgery

- on patients with osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol*, 33, 357-60.
- KNUTSON, K. & ROBERTSSON, O. 2010. The Swedish Knee Arthroplasty Register (<http://www.knee.se>). *Acta orthopaedica*, 81, 5-7.
- KORDELLE, J., KLETT, R., STAHL, U., HOSSAIN, H., SCHLEICHER, I. & HAAS, H. 2004. [Infection diagnosis after knee-TEP-implantation]. *Zeitschrift für Orthopädie und ihre Grenzgebiete*, 142, 337-43.
- KRÜGER, M., HENSSGE, E. J. & SELLIN, D. 1985. Gegossene Spongiametall Implantate im Tierversuch. *Z Orthop Unfall*, 123, 962-965.
- L, W. A. 1953. Dr M. N. SMITH-PETERSEN. *Journal of Bone and Joint Surgery - British Volume*, 35-B, 482-484.
- LACHIEWICZ, P. F., ROGERS, G. D. & THOMASON, H. C. 1996. Aspiration of the hip joint before revision total hip arthroplasty. Clinical and laboratory factors influencing attainment of a positive culture. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 78, 749-54.
- LAFFER, R. R., GRABER, P., OCHSNER, P. E. & ZIMMERLI, W. 2006. Outcome of prosthetic knee-associated infection: evaluation of 40 consecutive episodes at a single centre. *Clin Microbiol Infect*, 12, 433-9.
- LAI, Y. & GALLO, R. L. 2009. AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*, 30, 131-41.
- LANG, J. E., MANNAVA, S., FLOYD, A. J., GODDARD, M. S., SMITH, B. P., MOFIDI, A., SEYLER, T. M. & JINNAH, R. H. 2011. Robotic systems in orthopaedic surgery. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 93, 1296-9.
- LARIKKA, M. J., AHONEN, A. K., JUNILA, J. A., NIEMELA, O., HAMALAINEN, M. M. & SYRJALA, H. P. 2001. Improved method for detecting knee replacement infections based on extended combined 99mTc-white blood cell/bone imaging. *Nucl Med Commun*, 22, 1145-50.
- LAVERNIA, C. J., GUZMAN, J. F. & GACHUPIN-GARCIA, A. 1997. Cost effectiveness and quality of life in knee arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research*, 134-9.
- LEARMONTH, I. D., YOUNG, C. & RORABECK, C. 2007. The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*, 370, 1508-19.
- LEVITSKY, K. A., HOZACK, W. J., BALDERSTON, R. A., ROTHMAN, R. H., GLUCKMAN, S. J., MASLACK, M. M. & BOOTH, R. E., JR. 1991. Evaluation of the painful prosthetic joint. Relative value of bone scan, sedimentation rate, and joint aspiration. *J Arthroplasty*, 6, 237-44.
- LORD, G. & BANCEL, P. 1983. The madreporic cementless total hip arthroplasty. New experimental data and a seven-year clinical follow-up study. *Clinical orthopaedics and related research*, 67-76.
- LOSINA, E., WALENSKY, R. P., KESSLER, C. L., EMRANI, P. S., REICHMANN, W. M., WRIGHT, E. A., HOLT, H. L., SOLOMON, D. H., YELIN, E., PALTIEL, A. D. & KATZ, J. N. 2009. Cost-effectiveness of total knee arthroplasty in the United States: patient risk and hospital volume. *Arch Intern Med*, 169, 1113-21; discussion 1121-2.
- MALCHAU, H., HERBERTS, P., EISLER, T., GARELLICK, G. & SODERMAN, P. 2002. The Swedish Total Hip Replacement Register. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 84-A Suppl 2, 2-20.
- MARTIN, G. M. & THORNHILL, T. S. 2011. *Total knee arthroplasty* [Online]. Waltham, MA. Available: <http://www.uptodate.com/contents/total-knee-arthroplasty> [Accessed 12. Dez. 2011].

- MCKEE, G. K. & WATSON-FARRAR, J. 1966. Replacement of arthritic hips by the McKee-Farrar prosthesis. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 48, 245-59.
- MITTELMEIER, H. 1974. [Fixing endoprotheses without cement using the principle of "weightbearing ribbing" (author's transl)]. *Zeitschrift fur Orthopadie und ihre Grenzgebiete*, 112, 27-33.
- MOOJEN, D. J., VAN HELLEMONDT, G., VOGELY, H. C., BURGER, B. J., WALENKAMP, G. H., TULP, N. J., SCHREURS, B. W., DE MEULEMEESTER, F. R., SCHOT, C. S., VAN DE POL, I., FUJISHIRO, T., SCHOOLS, L. M., BAUER, T. W. & DHERT, W. J. 2010. Incidence of low-grade infection in aseptic loosening of total hip arthroplasty. *Acta orthopaedica*, 81, 667-73.
- MORAWIETZ, L., CLASSEN, R. A., SCHRODER, J. H., DYNBYL, C., PERKA, C., SKWARA, A., NEIDEL, J., GEHRKE, T., FROMMELT, L., HANSEN, T., OTTO, M., BARDEN, B., AIGNER, T., STIEHL, P., SCHUBERT, T., MEYER-SCHOLTEN, C., KONIG, A., STROBEL, P., RADER, C. P., KIRSCHNER, S., LINTNER, F., RUTHER, W., BOS, I., HENDRICH, C., KRIEGSMANN, J. & KRENN, V. 2006. Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *Journal of clinical pathology*, 59, 591-7.
- MUELLER, M., MORAWIETZ, L., STRUBE, P., HASART, O., PERKA, C. & TOHTZ, S. 2008. Diagnosis of periprosthetic infection following total hip arthroplasty - evaluation of the diagnostic values of pre- and intraoperative parameters and the associated strategy to preoperatively select patients with a high probability of joint infection. *Journal of orthopaedic surgery and research*, 3, 31.
- MURRAY, D. W. & RUSHTON, N. 1990. Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles. *The Journal of bone and joint surgery. British volume*, 72, 988-92.
- NAKAMURA, N., SUGANO, N., NISHII, T., KAKIMOTO, A. & MIKI, H. 2010. A comparison between robotic-assisted and manual implantation of cementless total hip arthroplasty. *Clinical orthopaedics and related research*, 468, 1072-81.
- NILSDOTTER, A. K. & ISAKSSON, F. 2010. Patient relevant outcome 7 years after total hip replacement for OA - a prospective study. *BMC musculoskeletal disorders*, 11, 47.
- NILSDOTTER, A. K., TOKSVIG-LARSEN, S. & ROOS, E. M. 2009. Knee arthroplasty: are patients' expectations fulfilled? A prospective study of pain and function in 102 patients with 5-year follow-up. *Acta orthopaedica*, 80, 55-61.
- NILSDOTTER-AUGUSTINSSON, A., BRIHEIM, G., HERDER, A., LJUNGHUSEN, O., WAHLSTROM, O. & OHMAN, L. 2007. Inflammatory response in 85 patients with loosened hip prostheses: a prospective study comparing inflammatory markers in patients with aseptic and septic prosthetic loosening. *Acta orthopaedica*, 78, 629-39.
- PALFFY, R., GARDLIK, R., BEHULIAK, M., KADASI, L., TURNA, J. & CELEC, P. 2009. On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides. *Molecular medicine*, 15, 51-9.
- PARVIZI J, Z. B., BERBARI EF, BAUER TW, SPRINGER BD, DELLA VALLE CJ, GARVIN KL, WONGWORAWAT MD, FEHRING TK, OSMON DR, BARRACK RL, BEREND KR, ESTERHAI JL, GIOE TJ, KURTZ SM, MASRI BA, SPANGHEHL MJ, SEGRETI J. 2011. New definition for periprosthetic joint infection. *The Journal of Arthroplasty*, 26, 3.

- PAULSEN, F., PUFE, T., CONRADI, L., VAROGA, D., TSOKOS, M., PAPENDIECK, J. & PETERSEN, W. 2002. Antimicrobial peptides are expressed and produced in healthy and inflamed human synovial membranes. *The Journal of pathology*, 198, 369-77.
- PAULSEN, F., PUFE, T., PETERSEN, W. & TILLMANN, B. 2001. Expression of natural peptide antibiotics in human articular cartilage and synovial membrane. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 8, 1021-3.
- PLUOT, E., DAVIS, E. T., REVELL, M., DAVIES, A. M. & JAMES, S. L. 2009. Hip arthroplasty. Part 2: normal and abnormal radiographic findings. *Clinical Radiology*, 64, 961-71.
- PRESICCE, P., GIANNELLI, S., TADDEO, A., VILLA, M. L. & DELLA BELLA, S. 2009. Human defensins activate monocyte-derived dendritic cells, promote the production of proinflammatory cytokines, and up-regulate the surface expression of CD91. *J Leukoc Biol*, 86, 941-8.
- PROOST, P., VYNCKIER, A. K., MAHIEU, F., PUT, W., GRILLET, B., STRUYF, S., WUYTS, A., OPDENAKKER, G. & VAN DAMME, J. 2003. Microbial Toll-like receptor ligands differentially regulate CXCL10/IP-10 expression in fibroblasts and mononuclear leukocytes in synergy with IFN-gamma and provide a mechanism for enhanced synovial chemokine levels in septic arthritis. *Eur J Immunol*, 33, 3146-53.
- RADEK, K. & GALLO, R. 2007. Antimicrobial peptides: natural effectors of the innate immune system. *Semin Immunopathol*, 29, 27-43.
- RAND, J. A., TROUSDALE, R. T., ILSTRUP, D. M. & HARMSEN, W. S. 2003. Factors affecting the durability of primary total knee prostheses. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 85-A, 259-65.
- SCHAUBER, J., DORSCHNER, R. A., YAMASAKI, K., BROUHA, B. & GALLO, R. L. 2006. Control of the innate epithelial antimicrobial response is cell-type specific and dependent on relevant microenvironmental stimuli. *Immunology*, 118, 509-19.
- SCHAUMBURGER, J., WINKLER, S., HANDEL, M., GRIFKA, J. & BAIER, C. 2012. [Prosthesis loosening]. *Z Rheumatol*, 71, 785-97.
- SPANGEHL, M. J., MASRI, B. A., O'CONNELL, J. X. & DUNCAN, C. P. 1999. Prospective analysis of preoperative and intraoperative investigations for the diagnosis of infection at the sites of two hundred and two revision total hip arthroplasties. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 81, 672-83.
- SUMMER, B., PAUL, C., MAZOOCHIAN, F., RAU, C., THOMSEN, M., BANKE, I., GOLLWITZER, H., DIETRICH, K. A., MAYER-WAGNER, S., RUZICKA, T. & THOMAS, P. 2010. Nickel (Ni) allergic patients with complications to Ni containing joint replacement show preferential IL-17 type reactivity to Ni. *Contact dermatitis*, 63, 15-22.
- TARNOK, A., HAMBSCH, J., CHEN, R. & VARRO, R. 2003. Cytometric bead array to measure six cytokines in twenty-five microliters of serum. *Clinical chemistry*, 49, 1000-2.
- THOMAS, W. & GRUNDEI, H. 1982. Die anatomische GT-Gleitachsendoprothese des Kniegelenkes (Grundeit-Thomas). *Z Orthop Unfall*, 120, 22,28.
- TIGGES, S., STILES, R. G. & ROBERSON, J. R. 1994. Appearance of septic hip prostheses on plain radiographs. *AJR Am J Roentgenol*, 163, 377-80.
- TOLK, J. J., KOOT, H. W. & JANSSEN, R. P. 2012. Computer navigated versus conventional total knee arthroplasty. *J Knee Surg*, 25, 347-52.

- TRAMPUZ, A. & ZIMMERLI, W. 2005. Prosthetic joint infections- update in diagnosis and treatment. *Swiss medical weekly*, 135, 243-51.
- TSUKAYAMA, D. T., ESTRADA, R. & GUSTILO, R. B. 1996. Infection after total hip arthroplasty. A study of the treatment of one hundred and six infections. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 78, 512-23.
- VAROGA, D., PAULSEN, F. P., KOHRS, S., GROHMANN, S., LIPPROSS, S., MENTLEIN, R., TILLMANN, B. N., GOLDRING, M. B., BESCH, L. & PUFE, T. 2006a. Expression and regulation of human beta-defensin-2 in osteoarthritic cartilage. *The Journal of pathology*, 209, 166-73.
- VAROGA, D., PAULSEN, F. P., KOHRS, S., GROHMANN, S., LIPPROSS, S., MENTLEIN, R., TILLMANN, B. N., GOLDRING, M. B., BESCH, L. & PUFE, T. 2006b. Expression and regulation of human β -defensin-2 in osteoarthritic cartilage. *The Journal of pathology*, 209, 166-173.
- VAROGA, D., PUFE, T., HARDER, J., MEYER-HOFFERT, U., MENTLEIN, R., SCHRODER, J. M., PETERSEN, W. J., TILLMANN, B. N., PROKSCH, E., GOLDRING, M. B. & PAULSEN, F. P. 2004. Production of endogenous antibiotics in articular cartilage. *Arthritis and rheumatism*, 50, 3526-34.
- VAROGA, D., PUFE, T., HARDER, J., SCHRÖDER, J.-M., MENTLEIN, R., MEYER-HOFFERT, U., GOLDRING, M. B., TILLMANN, B., HASSENPFUG, J. & PAULSEN, F. 2005a. Human β -defensin 3 mediates tissue remodeling processes in articular cartilage by increasing levels of metalloproteinases and reducing levels of their endogenous inhibitors. *Arthritis & Rheumatism*, 52, 1736-1745.
- VAROGA, D., PUFE, T., MENTLEIN, R., KOHRS, S., GROHMANN, S., TILLMANN, B., HASSENPFUG, J. & PAULSEN, F. 2005b. Expression and regulation of antimicrobial peptides in articular joints. *Annals of Anatomy - Anatomischer Anzeiger*, 187, 499-508.
- VAROGA, D., TOHIDNEZHAD, M., PAULSEN, F., WRUCK, C. J., BRANDENBURG, L., MENTLEIN, R., LIPPROSS, S., HASSENPFUG, J., BESCH, L., MULLER, M., JURGENS, C., SEEKAMP, A., SCHMITT, L. & PUFE, T. 2008. The role of human beta-defensin-2 in bone. *J Anat*, 213, 749-57.
- VAROGA, D., WRUCK, C. J., TOHIDNEZHAD, M., BRANDENBURG, L., PAULSEN, F., MENTLEIN, R., SEEKAMP, A., BESCH, L. & PUFE, T. 2009. Osteoblasts participate in the innate immunity of the bone by producing human beta defensin-3. *Histochem Cell Biol*, 131, 207-18.
- VENABLE, C. S. & STUCK, W. G. 1943. CLINICAL USES OF VITALLIUM. *Annals of Surgery*, 117, 772-782.
- VORDENBAUMEN, S., TIMM, D., BLECK, E., RICHTER, J., FISCHER-BETZ, R., CHEHAB, G., SANDER, O. & SCHNEIDER, M. 2011. Altered serum levels of human neutrophil peptides (HNP) and human beta-defensin 2 (hBD2) in Wegener's granulomatosis. *Rheumatol Int*, 31, 1251-4.
- WANG, G., LI, X. & WANG, Z. 2009. APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic acids research*, 37, D933-7.
- WARNKE, P. H., SPRINGER, I. N., RUSSO, P. A., WILTFANG, J., ESSIG, H., KOSMAHL, M., SHERRY, E. & ACIL, Y. 2006. Innate immunity in human bone. *Bone*, 38, 400-8.
- WESSINGHAGE, D. 1995. Themistocles Gluck: Von der Organexstirpation zum Gelenkersatz. *Dtsch Arztebl*, 92, 2180-4.
- WESSINGHAGE, D. 2000. Historische Aspekte des Gelenkersatzes. *Der Orthopade*, 29, 1067-1071-1071.

- WODTKE, J., KLÜBER, D., FROMMELT, L. & LÖHR, J. F. 2005. Die infizierte Gelenkendoprothese. *Trauma und Berufskrankheit*, 7, S134-S138.
- WODTKE, J. & LOHR, J. F. 2008. [The infected implant]. *Der Orthopade*, 37, 257-67; quiz 268-9.
- YANG, D., BIRAGYN, A., HOOVER, D. M., LUBKOWSKI, J. & OPPENHEIM, J. J. 2004. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol*, 22, 181-215.
- YANG, D. & OPPENHEIM, J. J. 2004. Antimicrobial proteins act as "alarmins" in joint immune defense. *Arthritis and rheumatism*, 50, 3401-3.
- YIN, L., CHINO, T., HORST, O. V., HACKER, B. M., CLARK, E. A., DALE, B. A. & CHUNG, W. O. 2010. Differential and coordinated expression of defensins and cytokines by gingival epithelial cells and dendritic cells in response to oral bacteria. *BMC Immunol*, 11, 37.
- ZEYA, H. I. & SPITZNAGEL, J. K. 1966. Cationic proteins of polymorphonuclear leukocyte lysosomes. II. Composition, properties, and mechanism of antibacterial action. *Journal of bacteriology*, 91, 755-62.
- ZIMMERLI, W., TRAMPUZ, A. & OCHSNER, P. E. 2004. Prosthetic-joint infections. *The New England journal of medicine*, 351, 1645-54.

9 ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS

Abbildung 2.1: Modell einer Kniegelenksprothese aus Elfenbein nach T. Gluck (aus (Wessinghage, 1995))	3
Abbildung 2.2: Anzahl der jährlich neu implantierten Hüft- und Knie-TEPs in Deutschland	6
Tabelle 2.1: Einteilung der Protheseninfektionen nach Tsukayama et al.	11
Abbildung 2.3: Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide – Porenbildung. (Palffy et al., 2009)).....	17
Abbildung 2.4: Wirkspektrum antimikrobieller Peptide.....	18
Tabelle 2.2: Muster der in der Synovialmembran nachweisbaren AMPs (Paulsen et al., 2002).....	19
Tabelle 4.1: Haupt- und Nebenkriterien der Diagnosesicherung von Implantatinfekten.	24
Tabelle 4.2: Histopathologische Klassifikation der periprothetischen Interface Membran (Morawietz et al., 2006).	27
Abbildung 5.1: Altersverteilung der Probanden.	34
Tabelle 5.1: Geschlechterverhältnis des Patientenkollektivs und der beiden Gruppen.	35
Abbildung 5.2: Verteilung der revidierten Prothesen in der septischen und aseptischen Gruppe.....	35
Abbildung 5.3: Anzahl von Voroperationen in der septischen und aseptischen Gruppe.....	36
Abbildung 5.4: Standzeiten der zu revidierenden TEPs in der septischen und aseptischen Gruppe.....	36
Abbildung 5.5: Ergebnisse der Zytokinmessung in der Gelenkflüssigkeit.	39
Tabelle 5.2: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Zytokinmessung in der Gelenkflüssigkeit (1).....	40
Tabelle 5.3: Statistische Auswertung der Zytokinmessung in der Gelenkflüssigkeit (2)	40
Abbildung 5.6: Ergebnisse der Zytokinmessung im Serum. Vergleich der Konzentrationen in der septischen und aseptischen Gruppe	41
Tabelle 5.4: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Zytokinmessung im Serum (1).....	42

Tabelle 5.5: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der Zytokinmessung im Serum (2).....	42
Abbildung 5.7: Vergleich der LL-37-Spiegel in der Gelenkflüssigkeit von Patienten der septischen gegenüber der aseptischen Gruppe.....	44
Abbildung 5.8: Vergleich der HBD3-Spiegel in der Gelenkflüssigkeit von Patienten der septischen und aseptischen Gruppe.	45
Abbildung 5.9: Vergleich der HBD2-Spiegel in der Gelenkflüssigkeit von Patienten der septischen und aseptischen Gruppe.	46
Tabelle 5.6: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der AMP-Messung in der Gelenkflüssigkeit (1).....	47
Tabelle 5.7: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der AMP-Messung in der Gelenkflüssigkeit (2).....	47
Abbildung 5.10: Vergleich der LL-37-Spiegel im Serum von Patienten der septischen und aseptischen Gruppe.	48
Abbildung 5.11: Vergleich der HBD3-Spiegel im Serum von Patienten der septischen und aseptischen Gruppe.	49
Abbildung 5.12: Vergleich der HBD2-Spiegel im Serum von Patienten der septischen und aseptischen Gruppe.	50
Tabelle 5.8: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der AMP-Messung im Serum (1).....	51
Tabelle 5.9: Zusammenfassung der statistischen Auswertung der AMP-Messung im Serum (2).....	51
Tabelle 5.10: Zusammenfassung der Diskriminationsfähigkeitsanalyse der lokalen Zytokinkonzentrationen aller Studienteilnehmer mit aseptischer und septischer Prothesenlockerung.....	52
Tabelle 5.11: Zusammenfassung der Diskriminationsfähigkeitsanalyse der systemischen Zytokinkonzentrationen aller Studienteilnehmer mit aseptischer und septischer Prothesenlockerung.	52
Tabelle 5.12: Zusammenfassung der Diskriminationsfähigkeitsanalyse der lokalen AMP-Konzentrationen aller Studienteilnehmer mit aseptischer und septischer Prothesenlockerung.....	53
Tabelle 5.13: Zusammenfassung der Diskriminationsfähigkeitsanalyse der systemischen AMP-Konzentrationen der/aller Studienteilnehmer mit aseptischer und septischer Prothesenlockerung..	53

Tabelle 5.14: Zusammenfassung der vier lokalen Biomarkerkombinationen mit den höchsten AUC-Werten, der jeweiligen Gleichung zur Berechnung des Vorhersagewerts und den zugehörigen Grenzwerten.	54
Abbildung 5.13: Vergleich der ROC-Kurven der einzelnen AMPs (A) und der kombinierten Infektmarker (B)..	55
Tabelle 5.15: Infekttafel.....	55

10 DANKSAGUNG

Danken möchte ich Herrn Univ.-Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe (Direktor der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie) sowie Herrn Univ.-Prof. Dr. Reiner Gradinger (Ärztlicher Direktor Klinikum rechts der Isar), die es mir ermöglichten, die vorliegende Dissertation durchzuführen.

Besonders danken möchte ich auch meinem Doktorvater Herrn apl. Prof. Dr. Hans Gollwitzer, der mir die Mitarbeit an diesem spannenden Projekt ermöglicht hat und mich darüber hinaus mit wertvollen Denkanstößen bei der Fertigstellung dieser Arbeit unterstützt hat.

Ein herzlicher Dank gebührt auch Herrn Dr. Ingo Banke, der mir während der gesamten Arbeit durch seine konstruktive Kritik zu helfen wusste und mir insbesondere bei der Anfertigung der Dissertation stets zur Seite stand.

In diesem Sinne möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Peter Prodingler und Frau Dr. Belma Saldamli bedanken, die mich insbesondere in der Anfangsphase meiner Doktorandentätigkeit an das wissenschaftliche Arbeiten heran führten.

Ein besonderer Dank gilt außerdem Herrn Dipl. Stat. A. Hapfelmeier (Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie, TU München) für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung der gewonnenen Daten, sowie Herrn Nikolas Stade für die Aufarbeitung und Analyse der gewonnenen Proben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und allen weiteren Personen bedanken, die mich während dieser Dissertation unterstützt haben.

11 ANHANG

Eigene Veröffentlichung

Gollwitzer H, Dombrowski Y, Prodinge PM, Peric M, Summer B, Hapfelmeier A, Saldamli B, **Pankow F**, von Eisenhart-Rothe R, Imhoff AB, Schaubert J, Thomas P, Burgkart R, Banke IJ. Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection. J Bone Joint Surg Am. 2013 Apr 3;95(7):644-51.

Die Publikation wurde mit dem AE-Forschungspreis der Arbeitsgemeinschaft Endoprothetik 2012 ausgezeichnet.