

**Technische Universität München**

**Klinik und Poliklinik**

**für Orthopädie und Sportorthopädie**

**Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe)

**Antimikrobielle Peptide (AMP) in Gelenkschleimhaut  
und periprothetischer Membran bei infizierter  
Hüft- und Knie totalendoprothetik**

Nikolas Stade

- Dissertation -



Technische Universität München



Klinikum rechts der Isar





# **Technische Universität München**

## **Klinik und Poliklinik**

### **für Orthopädie und Sportorthopädie**

#### **Klinikum rechts der Isar**

(Direktor: Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe)

## **Antimikrobielle Peptide (AMP) in Gelenkschleimhaut und periprothetischer Membran bei infizierter Hüft- und Knieendoprothetik**

Nikolas Stade

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

Vorsitzender:

Prof. Dr. Jürgen Schlegel

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. Hans W. Gollwitzer
2. Prof. Dr. Rüdiger von Eisenhart-Rothe

Die Dissertation wurde am 17.05.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät der Medizin am 28.03.2018 angenommen.



- In Liebe und Dankbarkeit, meinen Eltern -



# Inhaltsverzeichnis

<b>1 Zusammenfassung</b>	<b>1</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Knie- und Hüfttotalendoprothetik</b>	<b>3</b>
2.1.1 Historisches	3
2.1.2 Anstieg der Implantationszahlen	5
2.1.3 Komplikationen	6
2.1.3.1 Periprothetische Fraktur	6
2.1.3.2 Prothesenluxation	7
2.1.3.3 Aseptische nichtallergische Endoprothesenlockerung	7
2.1.3.4 Aseptische allergische Endoprothesenlockerung	7
2.1.3.5 Septische Endoprothesenlockerung	8
<b>2.2 Periprothetischer Infekt</b>	<b>9</b>
2.2.1 Ökonomischer Hintergrund	9
2.2.2 Infektionsraten	10
2.2.3 Definition	10
2.2.4 Klassifikation der periprothetischen Infektion	11
2.2.5 Erregerspektrum	12
2.2.6 „Race for the Surface“	12
2.2.7 Risikofaktoren	13
2.2.8 Low-grade-Infekt	13
2.2.9 Aktuelle Diagnostik	14
2.2.9.1 Klinische Untersuchung	14
2.2.9.2 Laboruntersuchungen	14
2.2.9.3 Untersuchung des Gelenkpunktats	15
2.2.9.3.1 Mikrobiologische Punktatuntersuchung	15
2.2.9.3.2 Zellzahl und Zelldifferenzierung	16
2.2.9.4 Radiologische Untersuchung	16
2.2.9.5 Nuklearmedizinische Untersuchungen	16
2.2.9.6 Histologische Untersuchung	17
2.2.9.7 Sonikation	17
2.2.10 Therapiekonzepte	18
2.2.10.1 Prophylaktische Konzepte	18
2.2.10.2 Therapie des periprothetischen Infekts	19

<b>2.3</b>	<b>Synovialis und Synovia</b>	<b>21</b>
2.3.1	Anatomie	21
2.3.2	Histologische Analyse von Gelenkmembranen	22
2.3.3	Immunhistochemische Analyse	23
2.3.3.1	Synovialozytenzelllinie K4IM	23
2.3.3.2	Laminin	24
2.3.3.3	Hitze-Schock-Protein 27 (HSP 27)	25
2.3.3.4	Cluster of Differentiation 68 (CD 68)	26
2.3.3.5	Vimentin	27
<b>2.4</b>	<b>Antimikrobielle Peptide</b>	<b>28</b>
2.4.1	Klassifikation	28
2.4.2	Defensine	28
2.4.2.1	Humanes-beta-Defensin 2	29
2.4.2.2	Humanes-beta-Defensin 3	30
2.4.3	Humanes Cathelicidin	31
2.4.4	Wirkmechanismus	32
<b>3</b>	<b>Zielsetzung der Arbeit</b>	<b>34</b>
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>35</b>
<b>4.1</b>	<b>Geräte und Reagenzien</b>	<b>35</b>
4.1.1	Technische Geräte	35
4.1.2	Gewebeaufbereitung	36
4.1.3	Zellkultur	36
4.1.4	Paraffingewebe	37
4.1.5	Immunhistochemie und Antikörper	38
<b>4.2</b>	<b>Ethikantrag und Patientenaufklärung</b>	<b>39</b>
<b>4.3</b>	<b>Patientenkollektive</b>	<b>39</b>
<b>4.4</b>	<b>Probenentnahme</b>	<b>41</b>
<b>4.5</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>43</b>
4.5.1	Nährmedium	43
4.5.2	Synovialozytenisolierung	44
4.5.3	Zellzahl und Zellvitalität	44
4.5.4	Kultivieren und Passagieren von Synovialozyten	46
4.5.5	Wachstumseigenschaften	47
4.5.6	Fixierung und Lagerung von Chamberslides	48

<b>4.6 Paraffingewebe</b>	<b>49</b>
4.6.1 Aufbereitung und Einbettung	49
4.6.2 Schneiden und Aufbringen auf die Objektträger	50
4.6.3 Lagerung	51
<b>4.7 Immunhistochemie (IHC)</b>	<b>52</b>
4.7.1 Nachweismethoden	52
4.7.2 Kontrollen	53
4.7.2.1 Negativkontrolle	53
4.7.2.2 PBS-Kontrolle	53
4.7.2.3 Positivkontrolle	53
4.7.2.4 Isotypkontrolle	53
4.7.3 IHC von Zellen	54
4.7.4 IHC von Paraffingewebe	55
4.7.4.1 Entparaffinieren und Rehydrieren	55
4.7.4.2 Blocken der endogenen Peroxidase	56
4.7.4.3 Demaskieren der Antigene	56
4.7.4.4 Ablauf	57
<b>4.8 Semiquantitative Analyse</b>	<b>58</b>
4.8.1 Scores	58
4.8.1.1 Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner	58
4.8.1.2 Total Score nach Allred	59
4.8.2 Auszählen am Mikroskop	60
4.8.3 Bilddokumentation	60
<b>4.9 Statistik</b>	<b>60</b>
4.9.1 Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und p-Wert	61
4.9.2 Statistische Auswertung der Zellkultur	61
4.9.3 Statistische Auswertung von Paraffingewebe	62
4.9.4 Diagnostische Güte	62
<b>5 Ergebnisse</b>	<b>63</b>
<b>5.1 Patientenkollektiv</b>	<b>63</b>
<b>5.2 Zellkultur</b>	<b>64</b>
5.2.1 Wachstumseigenschaften	64
5.2.2 Versuchskontrollen der Zellkulturen	66
5.2.3 Synovialozytenidentifikation	66

5.2.4	HBD-2	69
5.2.4.1	Immunreaktiver Score	71
5.2.4.2	Total Score	72
5.2.5	HBD-3	74
5.2.5.1	Immunreaktiver Score	76
5.2.5.2	Total Score	77
5.2.6	LL-37	79
5.2.6.1	Immunreaktiver Score	81
5.2.6.2	Total Score	82
<b>5.3</b>	<b>Paraffingewebe</b>	<b>84</b>
5.3.1	Versuchskontrollen	84
5.3.2	HBD-2	85
5.3.2.1	Immunreaktiver Score	87
5.3.2.2	Total Score	88
5.3.2.3	Diagnostische Güte des HBD-2-Ergebnis	90
5.3.3	HBD-3	92
5.3.3.1	Immunreaktiver Score	94
5.3.3.2	Total Score	95
5.3.3.3	Diagnostische Güte des HBD-3-Ergebnis	97
5.3.4	LL-37	99
5.3.4.1	Immunreaktiver Score	101
5.3.4.2	Total Score	102
5.3.4.3	Diagnostische Güte des LL-37-Ergebnis	104
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>106</b>
<b>6.1</b>	<b>Kritische Analyse</b>	<b>107</b>
6.1.1	Patientenkollektiv	107
6.1.2	Keimspektrum	108
6.1.3	Scores	108
6.1.4	Wachstum	109
6.1.5	Identifikation	109
6.1.6	Aktuelle AMP Diagnostik	110
<b>6.2</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>111</b>
<b>6.3</b>	<b>Paraffingewebe</b>	<b>112</b>
<b>6.4</b>	<b>Ausblick für weitere Forschung</b>	<b>113</b>
<b>6.5</b>	<b>Fazit</b>	<b>114</b>



<b>7</b>	<b>Publikationen</b>	<b>115</b>
7.1	Poster DKOU Berlin 2014	115
7.2	Der Orthopäde 12/2015	116
7.3	Poster BASK London 2015	117
7.4	Poster DKOU 2016	118
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>119</b>
<b>9</b>	<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>120</b>
<b>10</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>124</b>
<b>11</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>132</b>
<b>12</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>134</b>
<b>13</b>	<b>Danksagung</b>	<b>136</b>
<b>14</b>	<b>Erklärung</b>	<b>137</b>



# 1 Zusammenfassung

Weltweit ist ein stetiger Anstieg von Endoprothesenimplantationen zu verzeichnen. Damit einhergehend steigen die Komplikationen wie der gefürchtete periprothetische Infekt (PPI) stark an. Noch gibt es keinen Standard zur sicheren PPI-Frühdagnostik. Die aktuelle diagnostische Lücke ist evident. Dabei stellt der Low-grade-PPI (LG-PPI) die größte Herausforderung dar und zieht häufig aufwendige Revisionen nach sich (Banke, Stade, et al., 2015). Meist bleibt beim LG-PPI eine Erhöhung systemischer Entzündungsparameter aus. Diese geben normalerweise Auskunft über ein Infektgeschehen. Des Weiteren gelingt nur in 60% der Fälle ein präoperativer Keimnachweis (Morawietz et al., 2006). 2013 konnte unsere Arbeitsgruppe erstmalig nachweisen, dass es beim LG-PPI von Knie- und Hüftendoprothesen (KTEP/HTEP) zu einer signifikanten Erhöhung antimikrobieller Peptide (AMPs) in der Gelenkflüssigkeit kommt. Dabei zeigten sich das humane beta-Defensin (HBD) sowie das humane Cathelicidin LL-37 als vielversprechende Marker, da sie eine höhere diagnostische Genauigkeit als der gegenwärtige Standard aufweisen (Gollwitzer et al., 2013). Nun stellte sich konsequenterweise die Frage der Herkunft dieser AMPs. Ziel dieser Arbeit war es daher, die Expression von HBD-2, HBD-3 und LL-37 in der Gelenkschleimhaut und der periprothetischen Membran nachzuweisen. Dazu wurde die gelenkseitige Synovialmembran als Monolayer-Zellkultur sowie als Paraffingewebe aufbereitet. Nach der Identifikation der Synovialozyten folgten immunhistochemische Experimente (IHC). Der Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner (IRS) (Remmele & Stegner, 1987) sowie der Total Score nach Allred (TS) (Allred, Harvey, Berardo, & Clark, 1998) dienten zur semiquantitativen Analyse der Färberegebnisse. Die Probanden wurden in drei Kollektive eingeteilt. Die Gruppe primäre TEP (pTEP) und aseptische Lockerung hatten keine Interaktion mit Keimen. Das Gewebe der septischen Lockerung war mit grampositiven Staphylokokken konfrontiert. Analog zu den Ergebnissen der AMP-Konzentration in der Gelenkflüssigkeit konnten die HBD-2-Ergebnisse belegen, dass es zu keiner signifikanten Erhöhung kommt. Die HBD-3-Ergebnisse zeigten, dass es bei pTEP sowie bei der aseptischen Lockerung ebenfalls zu keiner signifikanten Expression kommt. Jedoch resultiert eine signifikante HBD-3-Expression in septischen Zellen mit grampositivem Keimnachweis. Auch bei den Versuchen mit LL-37 kommt es zu einer deutlichen Erhöhung der Expression in septischen Zellen ohne Signifikanz in den anderen beiden Kollektiven. Damit konnte der Erstdnachweis einer signifikanten AMP-Erhöhung bei infizierten K- und HTEPs auf zellulärer und Gewebeebene erbracht werden. Diese Erkenntnis weist auf eine neuartige Möglichkeit zur frühzeitigen Diagnostik von PPI und zur sicheren Bestimmung des LG-PPI hin und eröffnet neue diagnostische Perspektiven.

# 1. Conclusion

There is a steady increase of endoprothetic implantations recorded worldwide. Concomitantly as the dreaded periprosthetic infection (PPI) rising complications sharply. Yet there is no standard for secure PPI early diagnosis. The current diagnostic gap is evident. The low-grade-PPI (LG-PPI) is the most challenging and often entails expensive revisions (Banke, Stade 2015). Mostly the LG-PPI contains an increase of systemic inflammatory markers. This usually provide information about an prevalence infection.

Only in 60% of cases a preoperative microbial detection is successful (Morawietz et al., 2006). 2013 our working group could prove for the first time ever that there is a significant increase of antimicrobial peptides (AMPs) in the synovial fluid in LG-PPI of knee and hip arthroplasty (TKA/THA). The human beta defensin (HBD) and the human cathelicidin LL-37 as a promising marker showed a higher diagnostic accuracy than the current standard (Gollwitzer et al., 2013).

Now the question was where the origin of these AMPs is. The aim of this study was to detect the expression of HBD-2, HBD-3 and LL-37 in the synovial membrane and the periprosthetic membrane. For this purpose, the joint-side synovial membrane was prepared as a monolayer cell culture as well as a paraffin tissue. After the identification of the synovialocyte followed immunohistochemical experiments (IHC). The immunoreactive score after Remmele and Stegner (IRS) (Remmele & Stegner, 1987) and the Total Score after Allred (TS) (Allred, Harvey, Berardo, & Clark, 1998) were used for semiquantitative analysis of the staining results. The subjects were divided into three collectives. The group primary TEP (pTEP) and aseptic loosening had no interaction with bacteria. The tissue of septic loosening was confronted with gram-positive staphylococci. Similar to the results of the AMP concentration in the synovial fluid, the HBD-2 results show that there is no significant increase. The HBD-3 results showed that there also is no significant expression in pTEP and in aseptic loosening. However, a significant HBD-3 expression resulting in septic cells after gram-positiv germ detection. In experiments with LL-37, there is a significant increase of the expression in septic cells without significance in the other two cohorts. Thus, the first evidence of a significant increase in infected AMP TKA and THA at the cellular and tissue level could be provided. This finding suggests a novel way for the early diagnosis of PPI and to reliably determine the LG-PPI and opens up new diagnostic perspectives.

## 2 Einleitung

### 2.1 Knie- und Hüfttotalendoprothetik

#### 2.1.1 Historisches

Die Geschichte der Gelenkendoprothetik begann 1885 in Berlin, als Professor Themistocles Gluck eine Prothese aus Elfenbein und Nickelstahl konstruierte. Gluck fixierte seine Prothesen mit einer Gips-Kolophonium-Mischung und gilt daher als Vorreiter des heutigen thermoplastischen Knochenzements (Gomez & Morcuende, 2005; Probst, 2007).

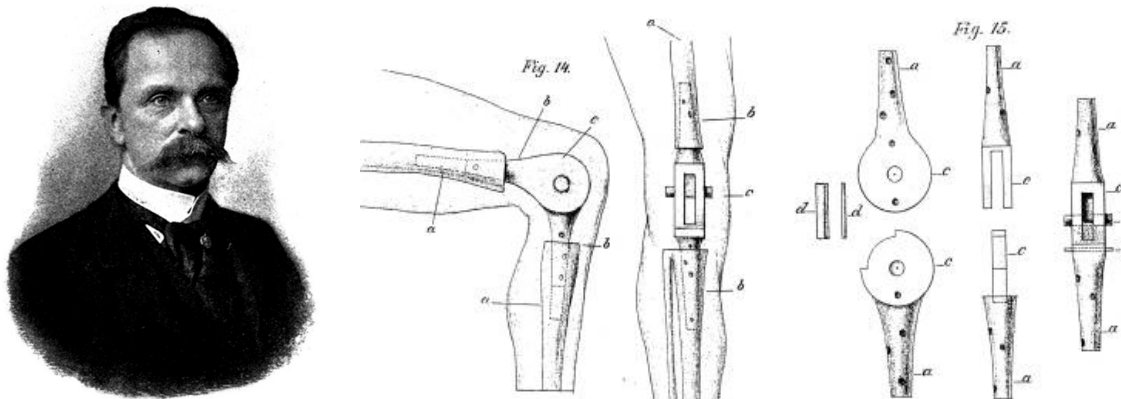


Abbildung 2-1 Themistocles Gluck, erste Scharnierprothese aus Elfenbein und Nickelstahl (Wessinghage, 1991)

1943 stellte Austin Moore, ein amerikanischer Chirurg, den ersten Entwurf einer bipolaren Hüftprothese mit gefensterter Schaft vor. Artverwandte Implantate sind in der heutigen Zeit als Duokopfprothesen bekannt (Gomez & Morcuende, 2005). 1946 entwickelten die Brüder Jean und Robert Judet einen Kunstharzkopf (Roche, 2003). Der rasche Abrieb des Harzes führte jedoch schnell zu aseptischen Lockerungen, weshalb man dieses Material für die Endoprothese aufgab.

1952 bis 1954 wurde durch die American Academy of Orthopedic Surgeons über die Existenz von 30 verschiedenen Prothesentypen berichtet. Die Wegbereiter der Endoprothetik versuchten versteifte Hüftgelenke wieder beweglich zu machen, indem sie teils außergewöhnliche Materialien wie Goldfolien, Glas, Teflon, Gummi, körpereigene Faszien oder sogar Schweineblasen als Interponate verwendeten (Siebenrock, 2008).

Als John Charnley, ein britischer Orthopäde, im Jahr 1958 beschloss, sich auf die Entwicklung einer funktionellen künstlichen Hüfte zu konzentrieren, revolutionierte er die Endoprothetik. Nach anfänglichen Misserfolgen mit Teflon entwickelte er eine Stahlprothese mit Schaft und Gelenkkopf, sowie eine Kunststoffpfanne aus Polyethylen.

1960 führte er den heutigen Knochenzement in die Endoprothetik ein und publizierte unter dem Titel „*Surgery of the hip joint*“ seine Erkenntnisse und medizinischen Ergebnisse (Wroblewski, 2002).

*„Ein Chirurg übernimmt große Verantwortung, wenn er eine Operation empfiehlt, noch bevor der Patient einen Stock zum Gehen braucht. Außerdem muss der Chirurg abwägen ob die Operationsergebnisse im richtigen Verhältnis zu Zeit und Kosten der Behandlung stehen. Die Hauptaufgabe unserer Forschung besteht darin, ein System für den totalen Hüftgelenkersatz zu entwickeln, das funktionelle, zuverlässige und wiederholbare Ergebnisse erbringt. Operationen wie Arthrodesen werden immer begrenzte Resultate erzielen. Unser Ziel ist die geplante Rekonstruktion eines normalen Gelenks“.* (Charnley, 1960)

Für seine Pionierleistung in der Endoprothetik wurde Charnley von der britischen Königin Elisabeth II. 1977 geadelt. Zuletzt wurde seine Leistung 2010 innerhalb einer Sonderprägung der Briefmarkenreihe „*Medical breakthrough*“ gewürdigt (**Abbildung 2-2**).



Abbildung 2-2 Briefmarkenreihe „Medical Breakthrough“. Rechts oben, Briefmarke zu Ehren von Sir John Charnley

Allerdings müssen auch die Schattenseiten einer operativen Versorgung durch eine Endoprothese bedacht werden. 1972 war es der Deutsche Hans-Wilhelm Buchholz, der in Hamburg einen Antibiotikum beladenen Knochenzement entwickelte. Dadurch konnte die Inzidenz des PPI deutlich gesenkt werden (Buchholz & Engelbrecht, 1970).

## 2.1.2 Anstieg der Implantationszahlen

Im Jahr 2007 wurde die Implantation einer HTEP zur Operation des Jahrhunderts erklärt (Learmonth, Young, & Rorabeck, 2007). Laut Angaben des Bundesverbands für Medizintechnologie wurden in Deutschland im Jahr 2007 rund 180.000 Hüftendoprothesen eingesetzt (Bundesverband für Medizintechnologie, 2007). Der Bericht von 2010 berechnet die Funktionswahrscheinlichkeit aller HTEPs nach zehn Jahren auf immerhin 95%. Des Weiteren wurden im Jahr 2010 bereits 220.000 primäre HTEPs implantiert (Bundesverband für Medizintechnologie, 2010). Laut deutschem Endoprothesenregister ist diese Zahl aktuell auf 400.000 Implantationen pro Jahr angestiegen.

Die demographische Entwicklung der kommenden Jahre sollte kritisch beobachtet werden. Prognosen aus den USA berechnen bis zum Jahr 2030 ein Wachstum von 174% von primären HTEPs. Noch dramatischer sieht es bei der Implantation von primären KTEPs aus. Hier wird für das Jahr 2030 ein voraussichtliches Wachstum von 673% erwartet.

Es ist anzunehmen, dass sich der Bedarf an HTEP-Revisionen bereits im Jahr 2026 verdoppelt haben wird, und bis zum Jahr 2030 um 137% ansteigt. Explosionsartig steigt dementsprechend die Anzahl der benötigten KTEP-Revisionen an. Das entspricht 2030 einem beachtlichen Wachstum von 601% an Revisionseingriffen (S. Kurtz, Ong, Lau, Mowat, & Halpern, 2007).

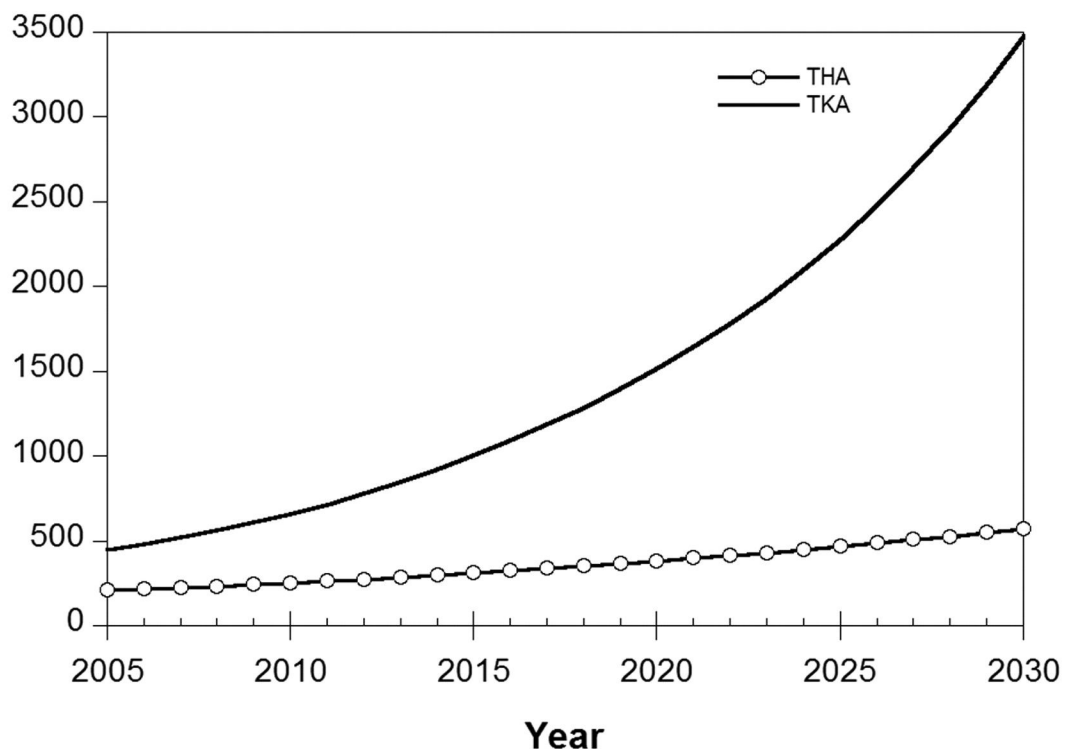


Abbildung 2-3 Zahlen aus den USA; THA/TKA = Total Hip/Knee Arthroplasty (S. Kurtz et al., 2007).

In Anbetracht dieser Zahlen ist es unvermeidlich, sich mit den Komplikationen der Endoprothetik auseinanderzusetzen. Die Notwendigkeit der frühzeitigen Diagnostik eines PPI und die sichere Bestimmung eines LG-PPI werden dabei eine wesentliche Rolle einnehmen. Postoperative Verlaufskontrollen, die Auskunft über den Erfolg der Implantation geben, fehlen bislang. Im folgenden Abschnitt werden die häufigsten Komplikationen dargestellt.

## 2.1.3 Komplikationen

### 2.1.3.1 Periprothetische Fraktur

Lindahl untersuchte Patienten aus dem schwedischen Hüftregister in einem Zeitraum von 1979 bis 2001 nach. Dabei zeigte sich, dass die periprothetische Femurfraktur im Verlauf bei 9% aller HTEP-Implantationen auftrat. Außerdem wurde deutlich, dass periprothetische Frakturen aufgrund des sinkenden Implantationsalters, der immer älter werdenden Patienten und aufgrund des zunehmenden Aktivitätsniveaus, in den nächsten Jahren weiter ansteigen werden (Lindahl, Malchau, Oden, & Garellick, 2006).



Abbildung 2-4 Röntgenbild einer periprothetischen Fraktur (Vancouver-Klassifikation Typ B3).



### **2.1.3.2 Prothesenluxation**

Eine weitere Komplikation, die einen Wechsel erforderlich machen kann, ist die Luxation der Gelenkprothese. Eine retrospektive Analyse der Universität Stettin zeigte bei 9 von 393 endoprothetisch versorgten Patienten eine Luxation mit anschließender Lockerung der Prothese. Das entspricht etwa 2,3% (Bialecki, Gusta, Bohatyrewicz, & Ferenc, 2006).

### **2.1.3.3 Aseptische nichtallergische Endoprothesenlockerung**

Die aseptische nichtallergische Lockerung ist die häufigste Ursache für eine Implantatlockerung. Dabei sollten zwei Typen unterschieden werden:

I. Lockerung bei initialer Instabilität:

Eine fehlerhafte Einpassung der Prothese oder operationsbedingte Knochennekrosen führen bereits initial zur Instabilität (Aspenberg & Herbertsson, 1996; Drees, Eckardt, Gay, Gay, & Huber, 2007).

II. Lockerung durch Abriebpartikel:

Aufgrund von Mikrobewegungen zwischen Knochen und Prothese kommt es zum Materialverschleiß und schließlich zu einer chronisch-entzündlichen Reaktion auf die entstehenden Abriebpartikel. Makrophagen wandern ein. Diese aktivieren ihrerseits Osteoklasten, welche den periprothetischen Knochen resorbieren. Schließlich kommt es zum Implantatversagen (Baumann F., 1991).

Die Implantatlockerung wird meist von Schmerzen und dem Gefühl der Instabilität begleitet (Gudena, Kuna, & Pradhan, 2013). Bis heute gibt es keine adäquate Therapie, um den Knochenabbau zu verhindern. Die aseptische nichtallergische Lockerung von Prothesen kann nur durch einen Implantatwechsel therapiert werden (Drees et al., 2007).

### **2.1.3.4 Aseptische allergische Endoprothesenlockerung**

Unter den aseptischen Prothesenlockerungen wird die Implantatallergie als eigene Kategorie aufgeführt. Da Unverträglichkeitsreaktionen ebenfalls zu Schmerzen, Ergüssen, Bewegungseinschränkungen und sogar zur Lockerung führen können, ist die aseptische allergische Endoprothesenlockerung eine wichtige Differenzialdiagnose. Als Abgrenzung von entzündlichen Reaktionen beschreibt die Implantatallergie eine spezifische Überempfindlichkeit gegen ein immunologisch detektiertes Fremdmaterial (P. Thomas, Schuh, Ring, & Thomsen, 2008; P. Thomas & Summer, 2015). Eine lymphozytär vermittelte Typ-IV-Hypersensibilitätsreaktion auf die verwendeten Materialien wie Nickel, Kobalt, Chrom oder auf Komponenten des Knochenzements führt über eine Antigenpräsentation zur lokalen

Zytokinexpression (Eben et al., 2010). Dabei scheint es durch die Stimulation von T-Zellen zu einer vermehrten lokalen Immunantwort zu kommen. Letztlich führt dies durch die Schwächung des Interfaces zum klinischen Erscheinungsbild einer aseptischen Lockerung (Summer et al., 2010). Auch die aseptische allergische Lockerung kann nur durch einen Wechsel auf ein Implantat mit antiallergener Oberfläche behandelt werden.

### 2.1.3.5 Septische Endoprothesenlockerung

Die septische Endoprothesenlockerung entspricht dem PPI. Sie ist eine der am schwierigsten zu behandelnden Komplikation in der Endoprothetik. Unspezifische Beschwerden und das anfängliche Ausbleiben der systemischen Entzündungsreaktion erschweren die Beurteilbarkeit sehr. Ihre Relevanz im medizinischen Alltag nimmt stetig zu. Daten aus dem skandinavischen Endoprothesenregister zeigen, dass der Anteil der infektionsbedingten Revisionsoperationen steigt. Nach der traumatischen sowie der aseptischen Lockerung ist der periprothetische Infekt mit etwa 9% der dritthäufigste Grund für eine Wechseloperation (Jansen et al., 2010). Die hohen Behandlungskosten von septischen Lockerungen werden in den nächsten Jahren in den Mittelpunkt rücken. Der aktuelle Goldstandard ist die operative Sanierung. Diese sieht je nach dem Zeitpunkt der Infektion einen mehrzeitigen Implantatwechsel vor. Als wesentlicher Aspekt dieser Arbeit wird der periprothetische Infekt mit Definition und Klassifikation sowie aktueller Diagnostik und Therapie detailliert als eigener Punkt unter 2.2 beschrieben.

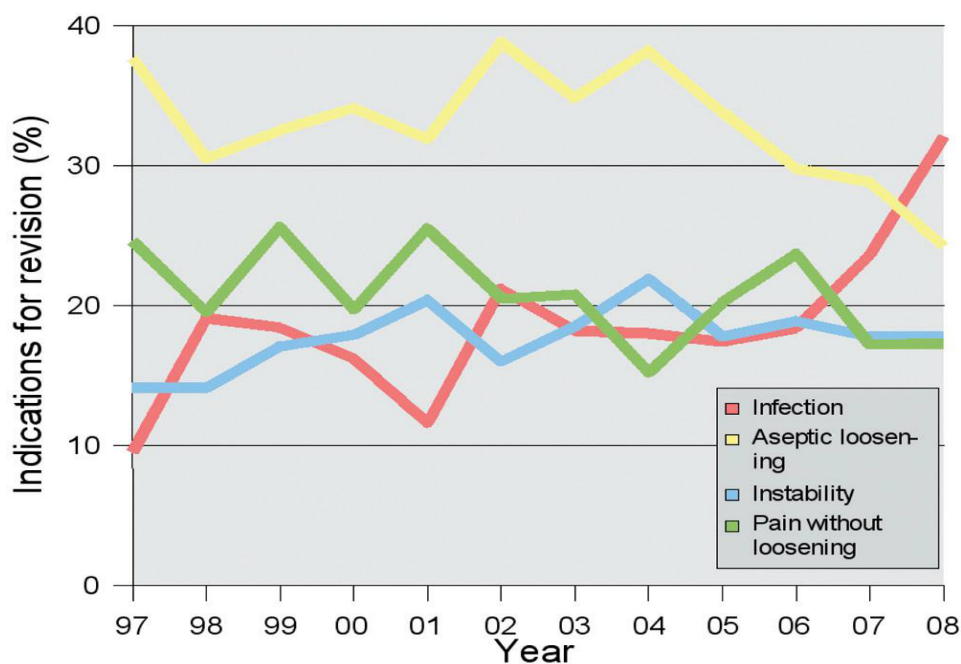


Abbildung 2-5 Nichttraumatische KTEP-Lockerung in ihrer zeitlichen Entwicklung.  
Starke Zunahme der infektionsbedingten Revisionen (Jansen et al., 2010)

## 2.2 Periprothetischer Infekt

Bereits in den vierziger Jahren resezierte Gathorne Robert Girdlestone bei Patienten mit Infektionen des Hüftgelenks den gesamten Femurkopf (Girdlestone, 2008; Gomez & Morcuende, 2005). Er gilt als Begründer der septischen Knochenchirurgie. Das Fehlen des Hüftkopfes wird auch heute noch Girdlestone-Situation genannt (**Abbildung 2-6**). Trotz innovativer Therapiekonzepte ist aufgrund der stark ansteigenden Implantationszahlen und der damit verbundenen Revisionsoperationen bis zum Jahr 2030 mit einer deutlichen Zunahme der periprothetischen Infekte zu rechnen (S. Kurtz et al., 2007). Der entstehende ökonomische Schaden und die medizinische Notwendigkeit verdeutlicht die Relevanz des PPI.

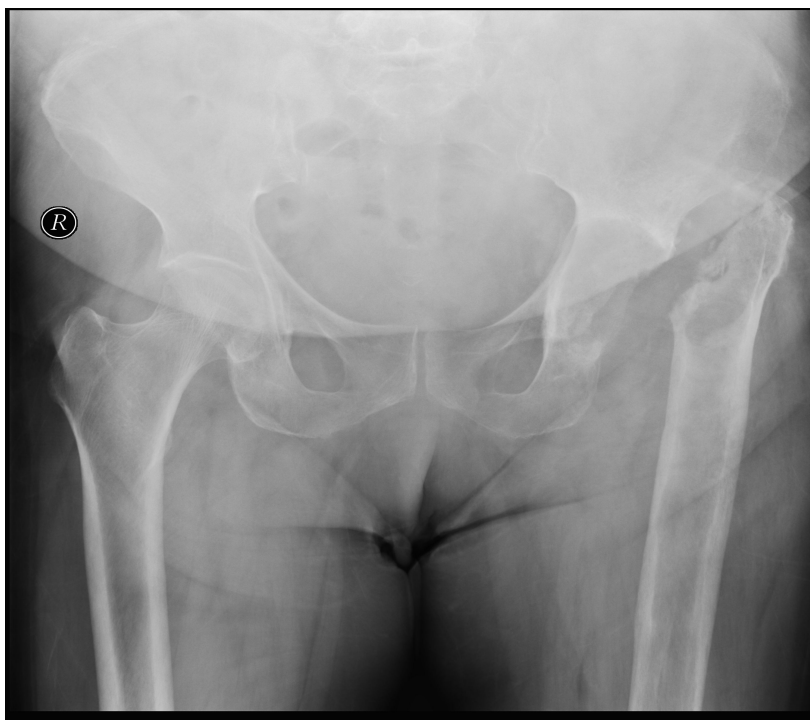


Abbildung 2-6 Röntgenbild einer Girdlestone-Situation des linken Hüftgelenkes.

### 2.2.1 Ökonomischer Hintergrund

Die wirtschaftliche Komponente des PPI spielt eine erhebliche Rolle. Bereits 1993 wurden in den USA die Behandlungskosten einer infizierten Hüfte auf 50.000 Dollar geschätzt (Sculco, 1993). Aktuelle Zahlen berechnen die Gesamtkosten auf ein Vielfaches (Vanhegan, Malik, Jayakumar, Ul Islam, & Haddad, 2012). Abgesehen von den enormen Kosten und dem damit verbundenen ökonomischen Schaden, müssen erkrankte Patienten lange Liegezeiten, mehrere operative Eingriffe und die damit verbundenen physischen und psychischen Belastungen in Kauf nehmen (Banke, von Eisenhart-Rothe, & Muhlhofer, 2015).

## 2.2.2 Infektionsraten

In den sechziger Jahren, zur Zeit von Charnley und Buchholz, lag die postoperative Infektionsrate einer TEP noch bei 10% (Lidwell et al., 1987). Ein Rückgang dieser Infektionsraten konnte durch organisatorische Maßnahmen und den medizinischen Fortschritt erreicht werden (Banke, von Eisenhart-Rothe, et al., 2015). Die Einführung der Reinraumverordnung für Operationssäle und die systemische intraoperative Antibiotikagabe spielen dabei entscheidende Rollen. Ein weiterer Faktor, der zum Rückgang der Infektionsraten führte, war die Entwicklung eines antibiotikahaltigen Knochenzements durch Buchholz im Jahr 1972 (Buchholz & Gartmann, 1972).

Die Wahrscheinlichkeit, nach einer endoprothetischen Operation eine PPI zu erleiden, beträgt in den ersten beiden postoperativen Jahren 1,6%. Im Zeitraum von 3-10 Jahren 0,6% (Ong et al., 2009). Somit liegt die Infektionsrate einer primären TEP heutzutage bei nahezu 2% (Lehner, Witte, Suda, & Weiss, 2009; Lohmann, Furst, Niggemeyer, & Ruther, 2007). Bei systemisch erkrankten Patienten und nach revisionsbedingten sekundären Implantation beträgt die Infektionsrate sogar 5% (Berbari et al., 2007). Noch dramatischer ist die Situation bei Reimplantationen nach einer gesicherten PPI. Die Reinfektionsrate steigt dann auf 15–20% an (Phillips, Crane, Noy, Elliott, & Grimer, 2006).

## 2.2.3 Definition

Wegen der großen medizinischen Brisanz wurden 2011 von der Arbeitsgruppe der Musculoskeletal Infection Society neue Kriterien zur Definition eines PPI herausgegeben. Auf dieser Grundlage liegt ein gesicherter PPI vor, wenn folgende Kriterien erfüllt sind: (Parvizi, 2011)

- I** Ein bestehender Fistelgang der mit der Prothese kommuniziert, oder
- II** Eine Keimisolierung von zwei unabhängigen Proben besteht, oder
- III** vier der folgenden sechs Kriterien vorliegen:
  - 1)** Erhöhte BSG und erhöhter CRP-Wert
  - 2)** Erhöhte Leukozytenzahl in der Synovia
  - 3)** Erhöhter Prozentsatz neutrophiler Granulozyten in der Synovia (PMN%)
  - 4)** Präsenz von Eiter im betroffenen Gelenk
  - 5)** Isolierung eines Mikroorganismus in einer Kultur
  - 6)** Über 5 neutrophile Granulozyten pro High-Power-Feld in 5 Hochleistungsfeldern (histologische Analyse des periprothetischen Gewebes bei 400-facher Vergrößerung)

## 2.2.4 Klassifikation der periprothetischen Infektion

Um den PPI einteilen zu können, existieren diverse Klassifikationen, die sich alle am Zeitintervall zwischen der Primärimplantation und dem Infektgeschehen orientieren. Die 1996 erarbeitete Einteilung nach Tsukayama ist eine vierstufige Klassifikation, die als Entscheidungshilfe für verschiedene Therapiekonzepte dient (Tsukayama, Estrada, & Gustilo, 1996):

- I** Intraoperativer Keimnachweis. Ein positiver Keimnachweis wird beim Prothesenwechsel erbracht.
- II** Frühinfekt. Symptome, die für einen Infekt sprechen, treten innerhalb des ersten postoperativen Monats auf.
- III** Später, chronischer Infekt. Vier Wochen nach der Implantation kommt es zur Infektsymptomatik.
- IV** Akute hämatogene Spätinfektion. Nach mehr als zwei Jahren kommt es ohne vorherige Anzeichen zu einer Entzündung und zur periprothetischen Infektion.

Beim Frühinfekt ist von einer intraoperativen Kontaminierung des Gelenks durch hochaktive Erreger auszugehen. In diesem Zeitraum kommt es zur akuten keimassoziierten Biofilmbildung auf der Prothese.

Aber auch weniger potente Keime sind in der Lage, einen Biofilm zu bilden. Beim Auftreten von Infektsymptomen innerhalb eines Zeitintervalls von bis zu zwei Jahren wird vom späten chronischen Infekt gesprochen. Hierbei handelt es sich um einen verzögerten Infekt.

Die hämatogene Infektion nach zwei Jahren wird ebenfalls als Spätinfekt klassifiziert (Fitzgerald, 1995; Zimmerli, Trampuz, & Ochsner, 2004). Diese akut auftretende Infektion beruht auf einer hämatogenen Infektverschleppung und wird durch lockere Prothesen, Materialabrieb und vor allem durch Immundefizite begünstigt (Glynn & Sheehan, 1983).

Eine Studie mit 63 Patienten mit PPI zeigte in 30 Fällen, das entspricht 48%, eine Infektionen im ersten postoperativen Jahr. In 33 Fällen, das entspricht 52%, handelte es sich um eine Infektion nach einem Jahr (Inman, Gallegos, Brause, Redecha, & Christian, 1984).

Die Zeitintervalle zur Klassifikation des Infektes sind häufig therapieentscheidend. Ein weiterer Aspekt ergibt sich aus dem Erregerspektrum.

## 2.2.5 Erregerspektrum

Das intraartikulär nachweisbare Erregerspektrum resultiert in der Klassifikation der PPI. Typische Keime bei der Frühinfektion sind hochvirulente Erreger wie *Staphylococcus aureus*,  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken und Enterokokken. *Staphylococcus aureus* besiedelt bei 40% der Menschen ubiquitär die normale Haut und Schleimhaut (Zimmerli et al., 2004). Der häufigste Keim für die Frühinfektion ist der Methicillin-sensible *Staphylococcus aureus*, MSSA (Lohmann et al., 2007). Weitere Keime der normalen Hautflora, wie die Koagulase negativen Staphylokokken, zeigen sich eher bei Spätinfektionen (Inman et al., 1984). Der häufigste Verursacher von Spätinfektionen ist der grampositive Erreger *Staphylococcus epidermidis* (Lohmann et al., 2007). In 74% der mikrobiell besiedelten Isolate werden grampositive Kokken nachgewiesen. Weitere 14% sind durch gramnegative Bakterien besiedelt. Die restlichen Prozente teilen sich Anaerobier und andere Keime (Inman et al., 1984; Lohmann et al., 2007).

## 2.2.6 „Race for the Surface“

Bei jedem Infekt konkurrieren körpereigene Abwehrmechanismen mit den Erregern. Dieser Wettstreit über die Implantatbesiedelung wird auch „*Race for the surface*“ genannt. Sobald Bakterien einen Biofilm auf der Prothesenoberfläche gebildet haben, ist die Infektion nicht mehr aufzuhalten. Ein Biofilm besteht aus Polysacchariden und erhöht auch den Virulenzfaktor von ansonsten gering pathogenen Keimen (Lohmann et al., 2007). Ist ein Biofilm entstanden, ist die notwendige Konsequenz des Implantatwechsels gegeben (Busscher et al., 2012). Die Bildung eines Biofilms läuft in vier Schritten ab (Habash & Reid, 1999):

- I** Oberflächenbenetzung mit Fibronectin und Laminin („conditioning film“)
- II** Anheftung der Erreger an den konditionierten Film über elektrostatische Kräfte oder über rezeptorvermittelte Anlagerung
- III** Bakterienwachstum und Kolonisation, Produktion von Polysacchariden zur festen Verankerung auf der Oberfläche
- IV** Ausbildung eines Mikroenvironment, dem eigentlichen Biofilm

Bereits 100 koloniebildende Einheiten (KbE oder CFU), sind in der Lage, eine PPI auszulösen (Konig, Perdreau-Remington, Rutt, Hilgers, & Schierholz, 1999). Im Vergleich dazu liegt die physiologische Keimbesiedelung im Jejunum bei  $10^5$ , im Coecum sogar bei  $10^9$  KbE pro Gramm Darminhalt (Dancygier, 1989).

## 2.2.7 Risikofaktoren

In einer Vielzahl von Arbeiten wurden verschiedene Risikofaktoren für das Auftreten einer periprothetischen Infektion identifiziert (Zusammengefasst in (Banke, von Eisenhart-Rothe, et al., 2015)). Dabei wird zwischen gesicherten und wahrscheinlichen Risikofaktoren unterschieden (Berbari et al., 1998; Lohmann et al., 2007). Sie sind meist mit der Immunsituation des Patienten vergesellschaftet.

Gesicherte Risikofaktoren	Wahrscheinliche Risikofaktoren
Vorangegangener Prothesenwechsel	Rheumatoide Arthritis
Wundinfektionen	Diabetes mellitus
Maligne Grunderkrankung	Adipositas
Staphylokokkensepsis	Status der Weichteildeckung
	Steroidtherapie
	Chronische Niereninsuffizienz
	Malnutrition
	Rezidivierende Bakteriurie
	Nosokomiale Infektion in der Anamnese

Tabelle 2.2-1 Risikofaktoren für Protheseninfektionen

## 2.2.8 Low-grade-Infekt

Die größte Herausforderung in der Differenzierung eines aseptischen zu einem septischen Geschehen ist der Low-grade-periprothetische Infekt (LG-PPI). Ihn richtig zu erkennen und nicht fälschlicherweise wie eine aseptische Lockerung zu behandeln ist entscheidend für die Genesung des Patienten (Morawietz et al., 2006). Häufig wird die periprothetische Infektion nur von Schmerzen und einer Bewegungseinschränkung begleitet. Das erschwert die Abgrenzung des Infektes zur aseptischen Lockerung. Besonders bei verzögerten Infekten und Spätinfekten ist die Diagnostik erschwert. Nicht selten wird eine als aseptisch diagnostizierte Lockerung erst durch den intraoperativen Keimnachweis als periprothetische Infektion erkannt. Diese Problematik im Bereich der Endoprothetik besteht schon seit langem. Bereits 1995 konnte gezeigt werden, dass jede fünfte Implantatinfektion primär undiagnostiziert bleibt (Steinbrink & Frommelt, 1995). Bei Low-grade-Infekten kommt es sogar nur in 60% der Fälle zu einem präoperativen Keimnachweis mit Hilfe der Punktatdiagnostik. Insbesondere das C-reaktive Protein (CRP-Wert) ist bei Low-grade-Infekten normwertig oder nur dezent erhöht. Weitere systemische Entzündungsreaktionen bleiben meist aus (Morawietz et al., 2006).

## **2.2.9 Aktuelle Diagnostik**

Derzeit steht keine standardisierte Vorgehensweise zur präoperativen Differenzierung von septischer und aseptischer Lockerung zur Verfügung. Ein sicheres, sensitives sowie spezifisches Verfahren fehlt. Jedoch ist es für das therapeutische Vorgehen entscheidend, die septische Lockerung von ihren Differenzialdiagnosen, der aseptischen Lockerung, dem komplexen regionalen Schmerzsyndrom, der Arthrofibrose und von mechanischen Komplikationen abzugrenzen (Banke, Stade, et al., 2015; Gollwitzer, Burgkart, Diehl, Gradinger, & Buhren, 2006). Eine erfolgreiche Diagnosefindung ist aktuell nur durch die Zusammenstellung mehrerer Parameter möglich und weist Schwächen auf (Gollwitzer, Diehl, Gerdesmeyer, & Mittelmeier, 2006a). Es bleibt eine diagnostische Lücke um den LG-PPI zu identifizieren.

### **2.2.9.1 Klinische Untersuchung**

Die klinische Untersuchung kann den ersten wichtigen Hinweis geben. Bei der Inspektion sollte man auf Narben, Weichteile, Muskelschwund und sonstige Anomalien achten. Infektzeichen wie Überwärmung, Rötung, Schwellung, eine tastbare Bursitis oder erkennbare Fistelgänge sind bei der Differenzierung hilfreich. Die klinische Symptomatik des PPI ist oft nur von Schmerzen oder Bewegungseinschränkungen geprägt. Deshalb sollte beim Verdacht auf Erkrankungen wie einem Leistenbruch, Lymphadenopathien und Frakturen ein PPI ausgeschlossen werden (Bozic & Rubash, 2004).

### **2.2.9.2 Laboruntersuchungen**

Weitere Befunde erhält man durch Laboruntersuchungen mit Entzündungsparametern wie der Leukozytenanzahl, der Blutkörperchengeschwindigkeit (BSG) und dem CRP. Obwohl die Leukozytenzahl oft als unspezifischer Indikator für Infektionen verwendet wird, hat sie sich in der Diagnosefindung des PPI nicht als besonders hilfreich gezeigt. Eine Studie bei Patienten mit bestätigter Infektion einer Hüftprothese zeigte, dass nur 15% der Patienten abnormal erhöhte Leukozytenwerte hatten. Das entspricht einer Sensitivität von 20% und einer Spezifität von 96% (Bozic & Rubash, 2004; Morrey, Westholm, Schoifet, Rand, & Bryan, 1989).

Die BSG ist eine gängige Methode in der Entzündungsdiagnostik. Zwei Drittel der Patienten mit mechanischer Lockerung ohne Infektion haben eine BSG von weniger als 20mm pro Stunde. Dem gegenüber stehen Patienten mit einer prothetischen Infektion und einer signifikant erhöhten BSG bei einem Mittelwert von 60mm pro Stunde. Nach erfolgreicher Therapie der Infektion normalisierte sich die BSG wieder auf 20mm pro Stunde (Bozic &



Rubash, 2004). Allerdings zeigte sich bei der BSG in mehreren überprüfenden Studien ein Mangel an Genauigkeit. Die Resultate hatten entweder eine hohe Wertigkeit der Sensitivität zu Lasten der Spezifität, oder umgekehrt (Gollwitzer, Diehl, et al., 2006a). Die höchste Genauigkeit unter den Laborparametern liefert der CRP-Wert. Ein normwertiges, präoperatives CRP erreicht bei einer komplikationslosen Gelenkimplantation am zweiten postoperativen Tag seinen Höchststand, um sich innerhalb der ersten drei postoperativen Wochen zu normalisieren (Bozic & Rubash, 2004). Jedoch kommt es bei Entzündungen anderer Körperregionen zusätzlich zu einer Veränderung des CRP-Werts. Das erschwert die Aussagekraft über die Implantationssituation. Im Allgemeinen werden CRP und BSG zur Ausschlussdiagnostik empfohlen, da eine normale BSG und reguläre CRP-Werte die periprothetische Infektion relativ unwahrscheinlich machen (Kordelle et al., 2004).

### **2.2.9.3 Untersuchung des Gelenkpunktats**

Zur Diagnosefindung eines PPI steht die Punktion des betroffenen Gelenks, mit Aspiration und anschließender Untersuchung der Gelenkflüssigkeit (Synovia), zur Verfügung. Es empfiehlt sich, begleitend zur mikrobiologischen Untersuchung eine zytologische Analyse zur Bestimmung der Zellzahl und zur Zelldifferenzierung durchzuführen. Die Punktion ist als invasives diagnostisches Mittel mit einem erhöhten Infektionsrisiko durch Hautkeime verbunden. Aus diesem Grund wird die Aspiration der Synovia nur bei klinischen Anzeichen auf ein septisches Geschehen empfohlen.

#### **2.2.9.3.1 Mikrobiologische Punktatuntersuchung**

Vor einer antibiotischen Therapie bietet die Punktion die Möglichkeit der präoperativen Keimidentifikation. Mit einer Sensitivität von 87% und einer Spezifität von 95% gehört die Punktion zu den aussagekräftigsten Diagnosekriterien (Barrack & Harris, 1993; Bozic & Rubash, 2004). Mit der Polymerasekettenreaktion (PCR) kann die Synovia anschließend untersucht werden. Die DNA-Amplifikationstechnologie ermöglicht es, bereits sehr geringe Mengen von bakterieller DNA nachzuweisen (Mariani, Martin, Levine, Booth, & Tuan, 1996). Die hohe Empfindlichkeit der PCR macht sie allerdings anfällig für falsch positive Ergebnisse durch Kontamination einzelner Zellen. Sogar nach erfolgter Antibiose kann die PCR einen falsch positiven Nachweis durch DNA-Fragmente abgetöteter Bakterien erbringen (Gollwitzer, Diehl, et al., 2006a). Es bleibt eine diagnostische Lücke, da die Identifikation von Bakterien aus dem Biofilm der Prothese begrenzt ist. Des Weiteren muss das Punktat über einen längeren Zeitraum von 10-14 Tagen bebrütet werden. Eine Einigung über den exakten Kultivierungszeitraum besteht jedoch nicht (Schafer et al., 2008).

### **2.2.9.3.2 Zellzahl und Zelldifferenzierung**

Ein erhöhter Proteingehalt, erniedrigte Glukosewerte und ein Anstieg der Leukozytenzahlen können Hinweise für eine Infektion sein. Eine Leukozytenzahl von  $>1,7 \times 10^3/\mu\text{l}$  sollte als verdächtig gewertet werden (Trampuz & Zimmerli, 2005). Durch die Zelldifferenzierung kann der Anteil polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten untersucht werden. Steigt der Anteil polymorphkerniger Zellen auf  $\geq 60\%$  spricht dies ebenfalls für eine Infektion der Prothese. Die Untersuchung von Zellzahl und Zelldifferenzierung erbrachte eine Sensitivität von 0,98 bei einer hohen Spezifität von 0,95 (Mason, Fehring, Odum, Griffin, & Nussman, 2003). Jedoch zeigte sich auch bei entzündlichen Grunderkrankungen ein Anstieg der Werte, weshalb die zytologische Analyse in diesen Fällen nur eingeschränkt aussagekräftig ist.

### **2.2.9.4 Radiologische Untersuchung**

Bildgebende Verfahren spielen nicht nur für die Operationsplanung, sondern auch bei der Beurteilung der Prothesenlockerung eine besondere Rolle. Durch die Röntgenkontrolle können Dislokationen des Inlays, Implantatbrüche oder ein Versagen der Kopplung weitestgehend ausgeschlossen werden. Typische radiologische Befunde einer Infektion sind jedoch selten, da klinische Symptome meist vor den radiologischen Veränderungen auftreten. Zur Diagnosestellung des PPI sind sie daher nicht sehr aussagekräftig. Ansonsten sprechen Osteolysen, Osteopenien und periostale Knochenneubildungen für ein Infektgeschehen im Bereich des Gelenkes (Gollwitzer, Diehl, et al., 2006a).

### **2.2.9.5 Nuklearmedizinische Untersuchungen**

Relativ neue Verfahren zur Diagnostik einer Protheseninfektion bieten nuklearmedizinische Untersuchungen. Die relevantesten werden im Folgenden beschrieben.

Die 3-Phasen-Skelettszintigraphie misst, als indirektes Maß der metabolischen Aktivität des Knochens, die Verteilung eines osteotropen Radiopharmakons. So können pathologische Befunde früher entdeckt werden als dies durch konventionelle Röntgenaufnahmen möglich wäre. Jedoch ist die Anreicherung als Nachweis des Knochenstoffwechsels unspezifisch (Gollwitzer, Diehl, et al., 2006a). Teilweise kommt es auch bei asymptomatischen Patienten mehrere Jahre nach der Implantation zu einer erhöhten Aktivität. Ein Einsatz in der Standarddiagnostik kann daher nicht empfohlen werden, da die Szintigraphie bei hoher Sensitivität nur eine geringe Spezifität zeigte (Larikka et al., 2001).

Bei der Leukozytenszintigraphie werden patienteneigene Leukozyten entnommen und radioaktiv markiert. Anschließend werden die markierten Leukozyten reinjiziert um dann in Infektareale einzuwandern. Jedoch kam es aufgrund der postoperativen Aktivierung des

Knochenmarks zu falsch-positiven Befunden (Palestro, Love, Tronco, Tomas, & Rini, 2006). Eine weitere Möglichkeit bietet die Antigranulozytenszintigraphie. Hier gelingt der indirekte Nachweis einer Entzündung über radioaktiv markierte monoklonale Antikörper gegen humane Granulozyten. Jedoch werden nicht nur aktive Infektherde detektiert, auch hier kommt es zu einer positiven Knochenmarksdarstellung (Gollwitzer, Diehl, Gerdesmeyer, & Mittelmeier, 2006b; Kordelle et al., 2004). Mit Hilfe der Fluor-18-Desoxyglukose-Positronenemissionstomographie (FDG-PET) kann über radioaktiv markierte Desoxyglukose ein Anstieg im Glukosestoffwechsel von Zellen nachgewiesen werden. Dies ist vor allem bei Tumorzellen, aber auch bei entzündlichen Prozessen der Fall. Bisher konnte in Studien mit kleinen Fallzahlen eine hohe Sensitivität bei relativ hoher Spezifität nachgewiesen werden. Allerdings nimmt die Sensitivität der Diagnostik bei hohen Blutzuckerwerten ab (Gollwitzer H, 2005). Des Weiteren konnten falsch-positive Anreicherungs-werte bei starkem Abrieb nachgewiesen werden (Kisielinski, Cremerius, Reinartz, & Niethard, 2003). Eine endgültige Beurteilung sollte bei allen nuklearmedizinischen Verfahren stets in Zusammenschau mit weiteren Untersuchungen erfolgen. Besonders der Low-grade-periprothetische Infekt ist durch nuklearmedizinische Untersuchungen schwer detektierbar.

#### **2.2.9.6 Histologische Untersuchung**

Die Untersuchungsmethode mit der besten Aussagekraft über einen PPI ist die histologische Analyse des Gewebes (2.3.2). Jedoch handelt es sich bei der Gewebeuntersuchung ebenfalls um eine invasive Diagnostik. Das Gewebe wird zumeist intraoperativ, seltener durch eine Biopsie entnommen. Mit einer Sensitivität von 100% und einer Spezifität von 98,1% ist sie bislang allen anderen Verfahren bei der Infektsuche überlegen (Fink et al., 2008).

#### **2.2.9.7 Sonikation**

Eine neuere Untersuchung mit guter diagnostischer Genauigkeit stellt die Sonikation dar. Mikroorganismen werden mit Ultraschall von der Oberfläche der explantierten Komponenten gelöst. Der Vorgang findet in einer speziellen Flüssigkeit, dem Sonikat, statt. Anschließend wird das Sonikat für mikrobiologische Untersuchungen verwendet. Mit Hilfe der Sonikation können Bakterien nachgewiesen werden, die bislang durch den Biofilm der Prothese geschützt waren. Dies erhöht die Sensitivität eines Keimnachweises insbesondere bei Patienten unter Antibiotikatherapie (Achermann, Vogt, Leunig, Wust, & Trampuz, 2010; Bogut et al., 2014; Osmon et al., 2013). Die Sonikation erfordert ebenfalls ein hochinvasives Konzept, da das Implantat oder die Implantatkomponenten operativ entfernt werden müssen.

## 2.2.10 Therapiekonzepte

### 2.2.10.1 Prophylaktische Konzepte

Diagnostische Methoden und therapeutische Verfahren können die statistischen Ergebnisse verbessern. Sie ersetzen jedoch nicht die Infektprophylaxe (Lehner et al., 2009). Systemisch werden Cephalosporine als sogenannte „single shot“ Gabe präoperativ oder intraoperativ kurz vor der Implantation über die Vene verabreicht (Gillespie & Walenkamp, 2001). Durch Gentamicin im Knochenzement wird die Antibiotikaprophylaxe lokal appliziert (Engesaeter et al., 2003). Jansen zeigte in seiner Arbeit, dass eine Kombinationsprophylaxe aus systemischer und lokaler Antibiotikagabe den besten Effekt hat (**Abbildung 2-7**).

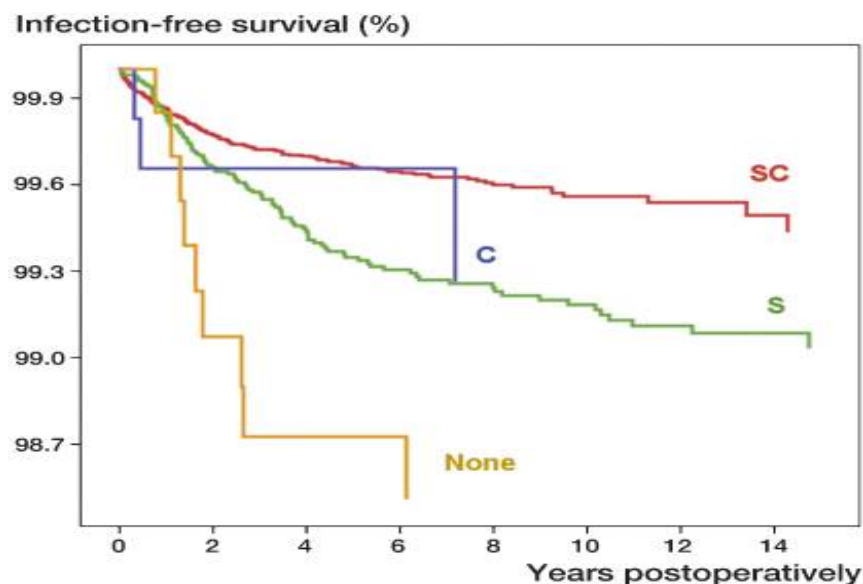


Abbildung 2-7 Antibiotikaprophylaxe bei Implantationen S: Systemische Gabe C: Antibiotikahaltiger Zement SC: Kombination beider Propylaxen (Jansen et al., 2010)

Eine weitere Möglichkeit zur Infektionsprophylaxe besteht darin, die Implantate mit verschiedenen Beschichtungen zu versehen. Alle Beschichtungen haben das Ziel, die Biofilmbindung zu inhibieren (**Tabelle 2.2-2**). Jedoch handelt es sich bei der schnellen Resistenzbildung der Keime gegenüber den Beschichtungen um ein bekanntes Phänomen. Dieses Problem existiert für Gentamicin, Silber und auch für Chlorhexidin (Neut, van de Belt, van Horn, van der Mei, & Busscher, 2003; Percival, Bowler, & Russell, 2005; Yamamoto, Tamura, & Yokota, 1988). Daher ist es fraglich, ob aktuelle, prophylaktische Konzepte auf Dauer das gewünschte Resultat erbringen (Banke, von Eisenhart-Rothe, et al., 2015).

Jahr	Beschichtung		Autor
1994	Metallionen	Silber	Collinge, Goll, Seligson, & Easley, 1994
1998	Antiseptikum	Chlorhexidin	Darouiche et al., 1998
2003	Antibiotikum	Gentamicin	Lucke et al., 2003
2010	Metallionen	Nanosilber	Khalilpour et al., 2010

Tabelle 2.2-2 Beispiele für verschiedene Implantatbeschichtungen

### 2.2.10.2 Therapie des periprothetischen Infekts

Das vorrangige Therapieziel besteht in der Infektsanierung und dem Erhalt der Gelenkfunktion. Eine erfolgreiche Behandlung ist von verschiedenen Faktoren abhängig (Lohmann et al., 2007). Die Einteilung und Klassifikation des PPI, sowie die Pathogenität des Erregers, dienen als Entscheidungshilfe für verschiedene Therapiekonzepte. Eine antibiotische Therapie gehört jedoch zu den obligatorischen Maßnahmen (Lohmann et al., 2007). Wobei die alleinige Antibiotikatherapie kein kuratives Verfahren darstellt. Sie sollte nur multimorbiden, inoperablen Patienten vorbehalten sein (Tsukayama, Wicklund, & Gustilo, 1991). Die operative Therapie zur Infektsanierung ist meist unersetzlich. Dabei werden prothesenerhaltende von prothesenwechselnden Operationen unterschieden. Bei jedem Verdacht eines PPI ist ein frühzeitiges, individuell angepasstes Handeln erforderlich.

Frühinfektionen und hämatogen bedingte Sekundärinfektionen können durch eine prothesenerhaltende Therapie erfolgreich behandelt werden. Dabei wird zwischen einer minimal invasiven und einer invasiven Methode unterschieden. Bei der minimal invasiven Methode beschränkt sich die chirurgische Therapie auf eine ausgiebige arthroskopische Spülung des betroffenen Gelenkes. Dadurch wird eine erneute Wundfläche klein gehalten. Jedoch muss auf einen Inlaywechsel verzichtet werden. Bei der invasiven Methode ist ein umfangreiches chirurgisches Débridement mit mechanischer Jet-Lavage und Inlaywechsel möglich. Voraussetzung für das Therapiegelingen beider Methoden ist ein rechtzeitiger Beginn innerhalb der ersten zwei Wochen nach dem Auftreten der Symptome. Zusätzlich sollte die implantierte Prothese zuvor eine gute Funktionalität gezeigt haben (Crockarell, Hanssen, Osmon, & Morrey, 1998; Lehner et al., 2009).

Der Heilungserfolg dieser Behandlung steigt, je früher und gründlicher sie durchgeführt wird. Die Erfolgsrate der prothesenerhaltenden Therapie liegt bei 60%-70%. Bei der invasiven Methode sollte das Anlegen einer Spül-Saug-Drainage und die radikale Exzision der infizierten Weichteile kombiniert werden. So kann die Lebensdauer des Implantats verlängert werden (Mella-Schmidt & Steinbrink, 1989). Auf die Retention der Prothese bei Patienten mit einer chronischen Infektion, oder bei Bestehen der Symptomatik von mehr als zwei Wochen,

sollte verzichtet werden (Crockarell et al., 1998). Alle Spätinfekte erfordern den Ausbau sämtlicher Fremdkörper, um den biofilmassoziierten Infekt bestmöglich behandeln zu können. Die Entscheidung für ein einzeitiges oder zweizeitiges Vorgehen muss individuell getroffen werden (Lehner et al., 2009).

Beim einzeitigen Vorgehen werden alle Prothesenkomponenten und der komplette Knochenzement entfernt. Zusätzlich erfolgt ein ausgiebiges chirurgisches Débridement mit mechanischer Lavage. Um eine bessere lokale Wirkung auf verbliebene Keime zu erzeugen, werden selbstauflösende Antibiotikaträger in die Wunde eingebracht (Winkler, 2009). Deswegen ist eine der Bedingungen für ein einzeitiges Vorgehen die präoperative Keimbestimmung und das Erstellen eines spezifischem Antibioграмms (Wodtke & Lohr, 2008). Im Vergleich zum zweizeitigen Wechsel besteht der Vorteil des einzeitigen Wechsels in einer kürzeren und damit kostengünstigeren Hospitalisierungszeit. Außerdem können operative und anästhesiologische Komplikationen durch eine einmalige Operation reduziert werden. Zusätzlich kommt es durch eine kürzere Aufenthaltsdauer und der schnelleren Mobilisation des Patienten zu geringeren physischen und psychischen Belastungen. Septische Patienten oder Patienten mit einem multiresistenten Erregernachweis sind jedoch von einem einzeitigen Vorgehen auszuschließen. Des Weiteren sprechen schlechte Weichteilverhältnisse oder gar ein Fistelgang im Operationsgebiet gegen einen einzeitigen Implantatwechsel. Sollte ein einzeitiges Therapiekonzept nicht den gewünschten Erfolg mit sich bringen, muss anschließend ein zweizeitiger Wechsel erfolgen (Lichstein et al., 2014). Die Heilungsrate beim einzeitigen Prothesenwechsel liegt bei über 80% (Callaghan, Katz, & Johnston, 1999).

Beim zweizeitigen Wechsel erfolgt ebenfalls der Ausbau aller Prothesenkomponenten, sowie das Entfernen des kompletten Knochenzements. Danach wird die Wundhöhle chirurgisch und mechanisch gereinigt. In der Regel werden lokale Antibiotikaträger wie Zementspacer implantiert. Zum Einen soll der Spacer die Verkürzung der Muskulatur und der periartikulären Weichgewebe verhindern, zum Anderen sollen dadurch hohe lokale Antibiotikakonzentrationen erreicht werden (Koo et al., 2001). Nach einem gelenklosen Intervall von mehreren Wochen, der Girdlestone-Situation, wird bei Infektpersistenz die Prozedur wiederholt, um anschließend eine Revisionstotalendoprothese zu implantieren (Lieberman, Callaway, Salvati, Pellicci, & Brause, 1994). Höhere Heilungsraten von über 90% rechtfertigen die zweizeitige Therapiemethode gegen über dem einzeitigen Vorgehen (Langlais, 2003). Im Gegensatz zum einzeitigen Wechsel ist eine präoperative Patientenselektion beim zweizeitigen Wechsel nicht erforderlich.

---

## 2.3 Synovialis und Synovia

### 2.3.1 Anatomie

Eine Skelettverbindung mit freier Beweglichkeit zwischen zwei benachbarten Knochen wird synoviales oder echtes Gelenk genannt. Eine fibröse Gelenkkapsel, die mit Flüssigkeit, der Synovia, gefüllt ist, umgibt die beiden Knochenenden. Die Synovia ist ein hyaluronreiches und deshalb viskoses Schmiermittel, welches ein reibungsfreies Gleiten der artikulierenden Knorpelflächen ermöglicht. Sie enthält außerdem Phospholipide, Proteoglycane und weitere Proteine, die aus dem Blutplasma stammen. Darüber hinaus ist die Synovialflüssigkeit auch für die Ernährung des Gelenkknorpels verantwortlich (Lüllmann-Rauch, 2012). Die Gelenkkapsel setzt sich aus der bindegewebsreichen Membrana fibrosa, die eine Fortsetzung des Periostes ist, und der inneren Membrana synovialis zusammen. Die Membrana synovialis bildet Falten und Zotten, die in den Gelenkraum ragen. Sie besteht wiederum aus der Subintima, in der lockeres Bindegewebe neben vielen kleinen Blutgefäßen zu finden ist, und der direkt gelenkseitigen Intima-Deckschicht. Die Intima-Deckschicht, auch „*synovial lining cells*“ genannt, besteht aus zwei Typen von Synovialozyten. (Lüllmann-Rauch, 2012; Welsch, 2010):

**Typ-A-Synovialozyten** werden dem Monozyten-Makrophagen-System zugeordnet und sind bei der Immunabwehr beteiligt (Edwards, 1982). Sie sind phagozytosefähig, bilden Immunglobuline und Komplementfaktoren (Theofilopoulos et al., 1980). Charakteristischerweise besitzen sie viele Lysosomen und werden aufgrund ihrer speziellen makrophagen Eigenschaften auch M-Zellen genannt (Lüllmann-Rauch, 2012; Welsch, 2010).

**Typ-B-Synovialozyten** werden als synoviale Fibroblasten bezeichnet und werden daher auch F-Zellen genannt. Sie sind für die Produktion der Synovialflüssigkeit verantwortlich. Deshalb enthalten sie reichlich raues endoplasmatisches Retikulum für die Proteinbiosynthese (Pitsillides, Wilkinson, Mehdizadeh, Bayliss, & Edwards, 1993; Welsch, 2010).

### 2.3.2 Histologische Analyse von Gelenkmembranen

Nach der Implantation einer Endoprothese entsteht zwischen Knochen und Prothese die sogenannte periprothetische Membran. Diese Membran wird während der Revisionsoperation entnommen und anschließend histopathologisch untersucht. Periprothetische Membranen zeigen ein heterogenes Erscheinungsbild. Um die histopathologische Diagnostik zu standardisieren, wird die Membran mit Hilfe des Morawietz Score klassifiziert. Morawietz beschreibt vier verschiedene Typen von periprothetischen Membranen (Morawietz et al., 2006):

**Typ I** Abriebinduzierter Typ; hauptsächlich Makrophagen, Partikel

**Typ II** Infektiöser Typ; neutrophile Granulozyten, keine Partikel

**Typ III** Kombiniertes Typ; Mischung aus Typ I & Typ II, teilweise Partikel

**Typ IV** Intermediärer Typ; zellarm, kollagen- und fibrinreich, keine Partikel

Der histopathologische Befund des abriebinduzierten Typs und des intermediären Typs entsprechen der aseptischen Lockerung, während der infektiöse und der kombinierte Typ für die septische Lockerung stehen. Die Beurteilung der Entzündlichkeit des Gewebes erfolgt durch die Auszählung von neutrophilen Granulozyten. Sie gehören zum angeborenen Immunsystem und machen über 65% der Leukozyten aus. Bei einer bakteriellen Infektion wandern sie über den „Rolling“-Mechanismus aus dem Blut ins jeweilige Gewebe ein. Andere Zelltypen wie Lymphozyten oder Plasmazellen haben bei der mikroskopischen Auszählung für den PPI keine große Relevanz. Ein positiver, septischer Befund entspricht einer Zellzahl von über 5 neutrophilen Granulozyten pro High-Power-Feld (HPF) (Morawietz et al., 2006). Mit HPF, das im deutschen auch Hauptgesichtsfeld genannt wird, beschreibt man den sichtbaren Ausschnitt bei einer mikroskopischen Vergrößerung um das 400-fache.

Durch Mikrobewegungen zwischen Knochen und Prothese kommt es zum Materialverschleiß und es entstehen Abriebpartikel. Die Partikel bestehen aus Metall-, Keramik-, Knochen- und Zementresten (Morawietz et al., 2006). Wie stark der Abrieb der gelockerten Prothese war, zeigt sich meist schon während der Aufbereitung des Gewebes (**Abbildung 2-8**). Synoviales Gewebe kann jedoch nicht nur histologisch eingeteilt, sondern vielmehr auch durch den Einsatz spezifischer Antikörper immunhistochemisch beurteilt werden.



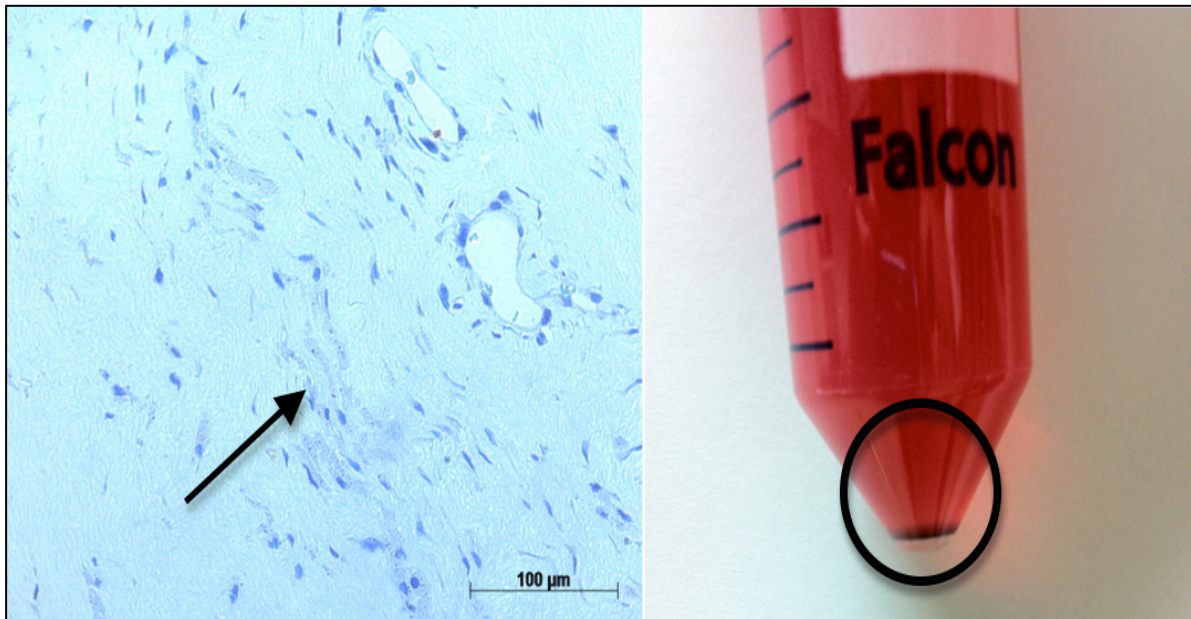


Abbildung 2-8 Metallabriebpartikel im periprothetischen Gewebe, Partikel als Bodensatz nach dem Zentrifugieren

### 2.3.3 Immunhistochemische Analyse

Die Immunhistochemie ist eine Nachweismethode für Proteine, die von den zu untersuchenden Zellen oder Geweben exprimiert werden. Dieser Nachweis erfolgt über eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die primären Antikörper binden an ihre passenden Gegenspieler, die Epitopen. Findet eine solche Bindung statt, kann sie im weiteren Färbeverfahren durch sekundäre Antikörper sichtbar gemacht werden (Boenisch, 2003). Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten primären Antikörper, sowie die Synovialozytenzelllinie K4IM beschrieben.

#### 2.3.3.1 Synovialozytenzelllinie K4IM

Die K4IM-Zelllinie besteht aus immortalisierten humanen Synovialozyten. Zur Herstellung wurden Synovialozyten eines gesunden 40-jährigen Patienten durch Transfektion mit dem *Simian vacuolating virus 40* (SV40) immortalisiert. Untersuchungen haben ergeben, dass diese immortalisierte Zelllinie den Phänotyp der nativen Zelllinie beibehält. Deshalb ist K4IM ein geeignetes *in vitro*-System, um die Mechanismen synovialer Zellen zu untersuchen (Haas, Aicher, Dinkel, Peter, & Eibel, 1997). In dieser Arbeit diente die in der Literatur gut beschriebene Zelllinie K4IM zum Vergleich des individuellen Färbebildes der verwendeten Synovialozytenmarker, und somit zur sicheren Identifikation des intraoperativ entnommenen Synovialgewebes.

### 2.3.3.2 Laminin

Laminin ist ein Glykoprotein, das zur Gruppe der extrazellulären Matrixproteine gehört. Es ist aus drei Polypeptidketten zusammengesetzt, einer schweren  $\alpha$ -Kette und zwei leichten Ketten,  $\beta$  und  $\gamma$ . Die Ketten sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden (Katayama, Sanzen, Funakoshi, & Sekiguchi, 2003). Laminin ist ein Adhäsionsmolekül und spielt unter anderem in der Verankerung des Epithels mit der Basalmembran eine wichtige Rolle. Die Gewebeerneuerung, die Steuerung von Zellwachstum und die Differenzierung von Zellen sind mit Laminin assoziiert. So zeigen bei der Wundheilung beteiligte Zellen eine vermehrte Expression von Laminin (Mizushima et al., 1998).

Immunzytochemische Studien haben Laminin im basalen Anteil der Intimazellschicht, der synovialen Auskleidung von Gelenken, identifiziert (Nozawa-Inoue, Ajima, Takagi, & Maeda, 1999; Pollock, Lalor, & Revell, 1990; Revell, al-Saffar, Fish, & Osei, 1995). Ultrastrukturell wurden immunreaktive Produkte von Laminin in Zellen mit gut entwickeltem, rauem endoplasmatischem Retikulum und Sekretgranula gezeigt (Nozawa-Inoue et al., 1999).

Das hieraus resultierende Immunfärbungsmusters ist ein Nachweis für Laminin in Typ-B-Synovialozyten. Im Gegensatz dazu zeigt Laminin in den makrophagenähnlichen synovialen Typ-A-Zellen fast keine Immunreaktivität (Nozawa-Inoue et al., 1999; Revell et al., 1995).

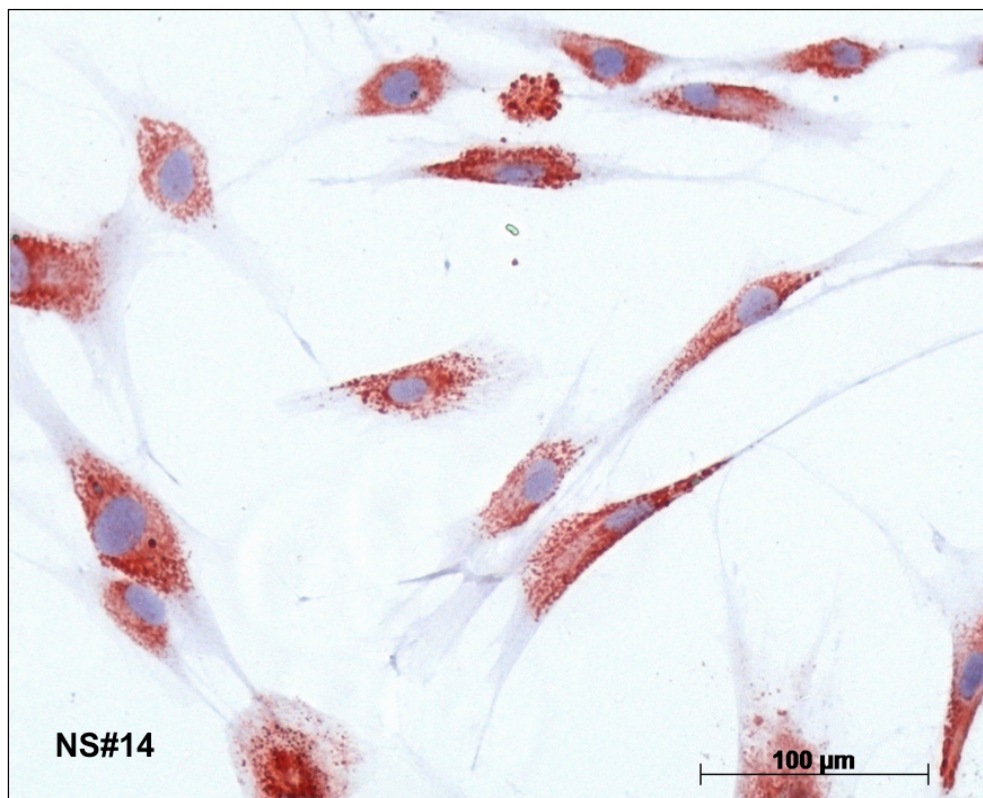


Abbildung 2-9 Synovialozyten mit Anfärbung für Laminin

### 2.3.3.3 Hitze-Schock-Protein 27 (HSP 27)

Unter physiologischen Bedingungen werden diese Proteine in relativ kleinen Mengen synthetisiert. In Reaktion auf verschiedene Bedingungen wie eine Infektion, oxidativen Stress, thermische Spannung oder durch proinflammatorische Zytokine wird ihre Anzahl jedoch um das 10- bis 20-fache hochreguliert. Dann spielen sie eine wichtige Rolle bei der Vermittlung intrazellulärer Gefahrensignale und beim immunologischen Schutz der Zelle (Jakob, Gaestel, Engel, & Buchner, 1993; Nagai et al., 2006; Welch, 1992). Hitzeschockproteine werden entsprechend ihrem Molekulargewicht in Familien zusammengefasst. Für die Hitzeschockproteine 27 mit einer Molekularmasse von 15-30kDa gibt es in der Literatur unterschiedliche Bezeichnungen. Man nennt sie auch small oder interfering HSP. Es sind lösliche, ubiquitär vorkommende intrazelluläre Proteine mit vielfältigen Funktionen. Bei der Induktion dieser Proteine handelt es sich um eine in der Evolution konservierte Reaktion auf subletalen Umgebungsstress (Benndorf & Bielka, 1997). HSP 27 ist im Zytosol und in der Nähe des Golgi-Apparates lokalisiert. Nach Stressexposition verändert es seine Position in der Zelle und wird perinukleär nachgewiesen (Arrigo, Suhan, & Welch, 1988). Das Heat-Shock-Protein 27 wird vor allem von Typ-B Zellen der Synovialmembran exprimiert (Nagai et al., 2006).

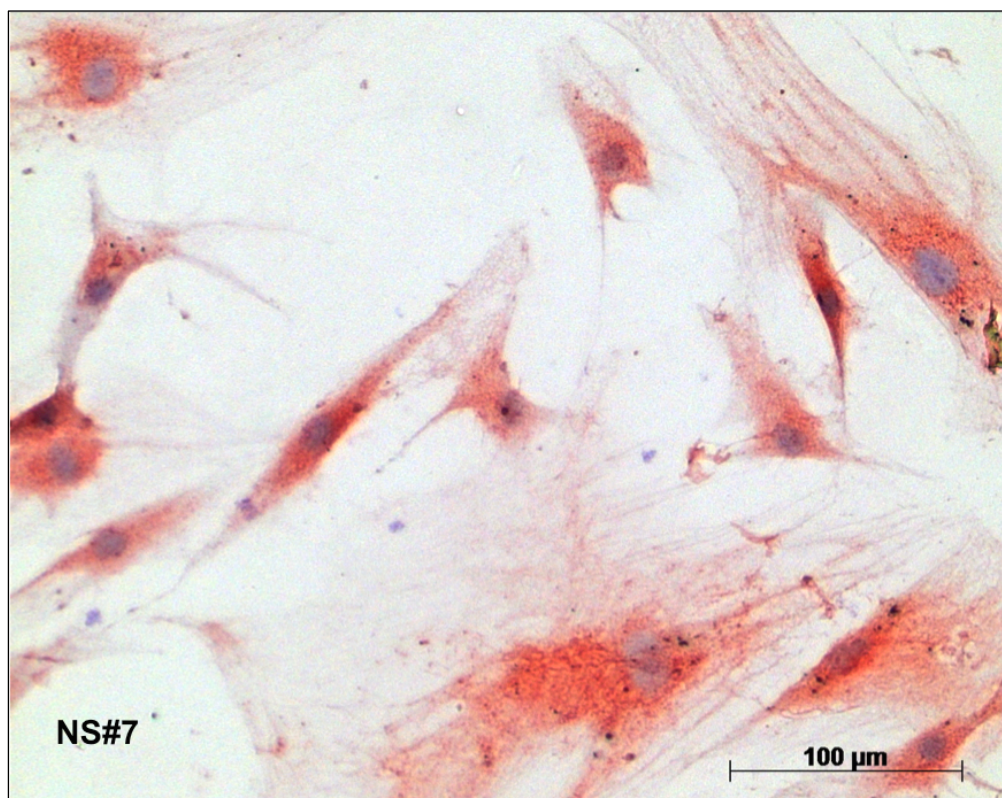


Abbildung 2-10 Synovialozyten mit Anfärbung für HSP 27



#### 2.3.3.4 Cluster of Differentiation 68 (CD 68)

CD 68 ist ein stark glykosyliertes, lysosomales Membranprotein mit einer Molekularmasse von 110kDa. Es spielt eine wichtige Rolle in der Endozytose. Obwohl sich CD 68 vorwiegend in lysosomalen Membranen befindet, wird ein kleiner Teil auf der Zelloberfläche exprimiert. Hier dient CD 68 als Fänger für oxidierte Low-Dense-Lipoproteine und ist auch an der Zell-Zell-Interaktion beteiligt (Kunisch et al., 2004). Studien haben gezeigt, dass CD 68 ein Marker für Zellen aus der Monozyten-Makrophagen-Zelllinie ist. Aber es besteht auch eine sehr enge Verbindung zu den phagozytosefähigen Typ-A-Synovialozyten (Kunisch et al., 2004; Naredo et al., 2005). Außerdem besitzen etwa 20% der Zellen mit positiver CD 68 Immunreaktivität gleichzeitig eine Expression von Laminin. Das bedeutet, dass CD 68 positive Zellen sowohl phänotypische Eigenschaften von Makrophagen sowie von Synovialozyten besitzen (Nagai et al., 2006).

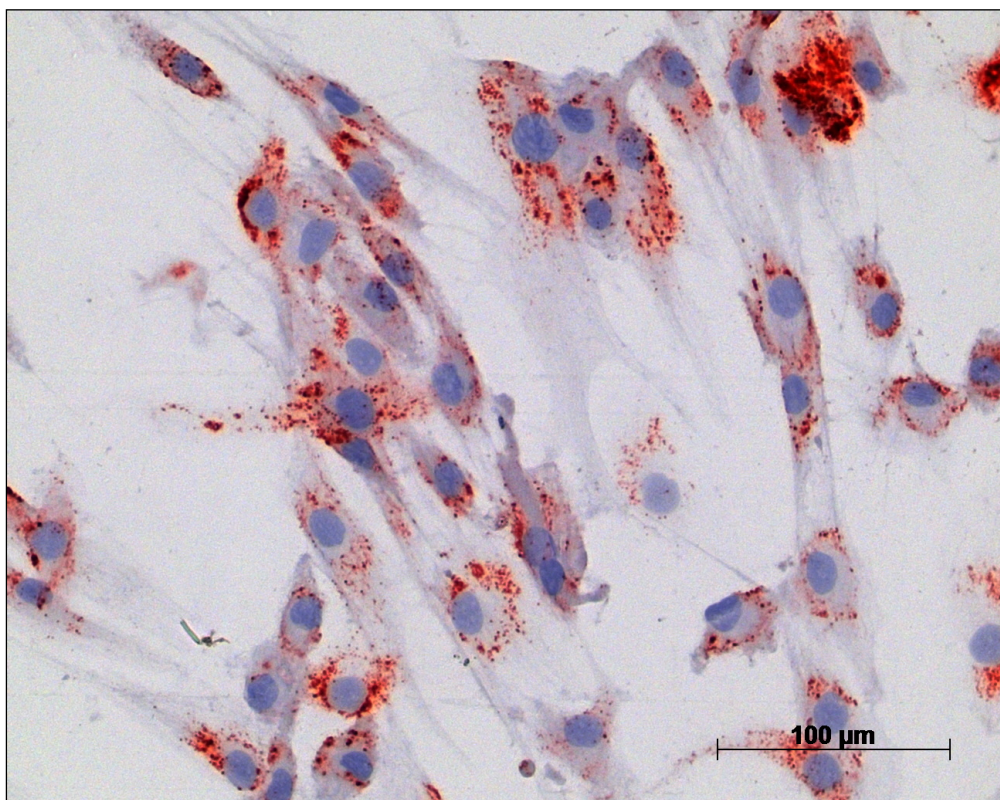


Abbildung 2-11 Synovialozyten mit Anfärbung für CD 68

### 2.3.3.5 Vimentin

Vimentin ist ein Typ-III-Intermediärfilament aus der Gruppe der Desmine und damit ein Element des Zytoskeletts. Die Molekülmasse des humanen Vimentins beträgt 58kDa. Es kommt im Zytoplasma aller mesenchymalen Zellen wie glatten Muskelzellen, den Endothelzellen und vor allem in Fibroblasten vor (Hess, Budamagunta, Voss, & FitzGerald, 2004). Positive Reaktion von Vimentin gegenüber Fibroblasten aus Bindegewebe und Endothelzellen wurde durch die Immunfluoreszenzmikroskopie an Gewebeschnitten gezeigt (Osung, Chandra, & Holborow, 1982). Der strukturelle Aufbau besteht aus einer zentralen Domäne, die an den Enden von einer Kopf- und einer Schwanzdomäne begrenzt wird. Diese zentrale Domäne lässt sich in zwei spiralförmige  $\alpha$ -helikale Subdomänen und kleine nicht helikale Verbindungsdomänen unterteilen (Hess et al., 2004). Experimente konnten beweisen, dass spezifische Antikörper an Vimentin und nicht an anderen, eng verwandten Intermediärproteinen binden. Dadurch kann Vimentin gezielt nachgewiesen werden. Immunhistochemische Versuche an synovialen Gewebe eines gesunden Kniegelenks erbrachte ebenfalls den Nachweis von Vimentin (Osung et al., 1982). Vimentin gehört zu den Fibroblastenmarkern und wird überwiegend in Typ-B-Synovialozyten exprimiert. Typ-A-Zellen zeigen jedoch ebenfalls eine minimale Expression von Vimentin (Nagai et al., 2006; Osung et al., 1982).

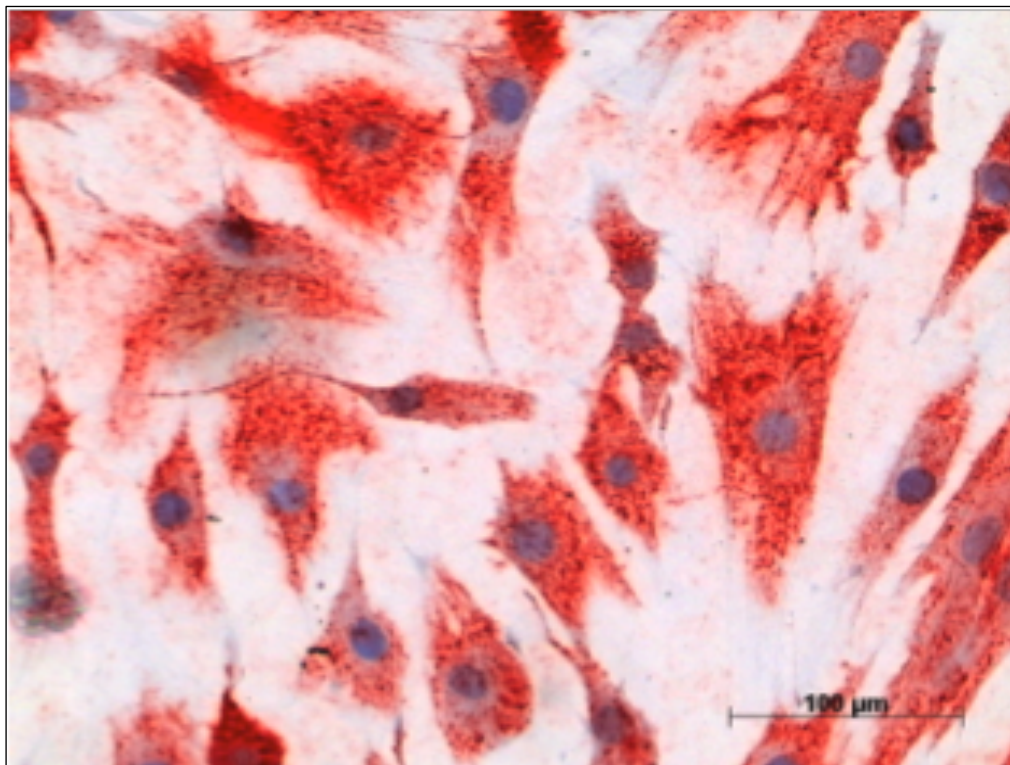


Abbildung 2-12 Synovialozyten mit Anfärbung für Vimentin

## 2.4 Antimikrobielle Peptide

### 2.4.1 Klassifikation

Antimikrobielle Peptide (AMPs) wurden erstmals 1966 von Zeya und Spitznagel beschrieben und aufgrund Ihrer Rolle als Bestandteil des angeborenen Immunsystems vorerst als Defensine bezeichnet (Ganz, 1999, 2003; Zeya & Spitznagel, 1966). Heute teilt man die AMPs in Gruppen ein. Die bekanntesten Peptidgruppen sind Defensine und Cathelicidine. Ihre Eigenschaft bei der aktiven Abwehr von Bakterien erinnert stark an die Wirkungsweise von Antibiotika. Als sogenannte „angeborene Antibiotika“ bieten sie einen lokal wirksamen Schutz vor Infektionen. Dies macht sie zugleich zu den derzeit vielversprechendsten (differenzial-) diagnostischen Hoffnungsträgern des chronischen LG-PPI sowie des akuten PPI (Deirmengian et al., 2014; Parvizi & Haddad, 2015). Auch Pilze und unbehüllte Viren werden von AMPs erkannt und direkt angegriffen. So sind AMPs in der Lage, mit Rezeptoren zu interagieren, so die Struktur der Zellmembranen zu verändern und also zelluläre Prozesse zu beeinflussen (De Smet & Contreras, 2005; Lai & Gallo, 2009).

Diese Fähigkeit scheint eine eukaryotische Verteidigungsstrategie gegenüber Keimen zu sein, die sich lange Zeit vor der anpassungsfähigen, adaptiven Immunabwehr von Zellen entwickelt hat. Verschiedene Zelltypen unterschiedlicher Lebewesen wie Vertebraten, Evertbraten, Insekten und sogar Pflanzen produzieren antimikrobielle Peptide (Gudmundsson et al., 1996; Palffy et al., 2009).

### 2.4.2 Defensine

Defensine gehören zur Gruppe der AMPs. Es sind endogene, nur 33 bis 47 Aminosäuren lange, cysteinreiche Eiweiße mit einem Molekulargewicht von 2-6kDa (Yang, Biragyn, Kwak, & Oppenheim, 2002). Sie werden in drei weitere Klassen, die  $\alpha$ -  $\beta$ - und  $\theta$ -Defensine eingeteilt (Lehrer, 2004). Die Klassen  $\alpha$  und  $\beta$  unterscheiden sich in der Position der sechs Cysteine ihrer Aminosäuresequenz und der entsprechenden intramolekularen Verknüpfung ihrer drei Disulfidbrücken (Ganz, 1999).  $\theta$ -Defensine entstehen durch alternatives Spleißen und der Peptidsynthese aus zwei  $\alpha$ -Defensinen (Tang et al., 1999). In humanen Geweben werden nur  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine exprimiert. Die Expression humaner  $\alpha$ -Defensine wurde unter anderem in neutrophilen Granulozyten und Panethzellen nachgewiesen.  $\alpha$ -Defensinen konnte in Studien von Deirmengian eine nahezu 100%ige diagnostische Genauigkeit als synoviale Biomarker des PPI nachgewiesen werden (Chen, Fei, & Deirmegian, 2014; Deirmengian et al., 2014). Es ist zudem bisher der einzige Biomarker in der PPI-Diagnostik,

der in Form eines CE-zertifizierten kommerziell erhältlichen Schnelltests Einzug in die Klinik gefunden hat.  $\beta$ -Defensine werden in dermalen und mukösen Epithelzellen produziert (Ganz, 2003; Harder & Schroder, 2005). Auch im Epithel der Atemwege, des Urogenital- und Gastrointestinaltraktes findet die Defensinproduktion statt (Dale & Krisanaprakornkit, 2001; Froy, 2005; Ganz, 2003). 1993 wurden die  $\beta$ -Defensine als eigene Klasse identifiziert. Ihre antimikrobielle Eigenschaft liegt in ihrer Proteinstruktur (Selsted et al., 1993). Die Sekundärstruktur besteht aus drei antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern und einer angrenzenden, N-terminalen  $\alpha$ -Helix. Durch die Ausbildung von Disulfidbrücken entsteht ihre spezifische dreidimensionale Tertiärstruktur (Hoover et al., 2000).

#### 2.4.2.1 Humanes-beta-Defensin 2

Das Humane-beta-Defensin 2 (HBD-2) wurde erstmalig 1997 durch Harder aus der Dermis von Psoriasispatienten isoliert (Harder, Bartels, Christophers, & Schroder, 1997). Der Kontakt von Epithelzellen mit gramnegativen Bakterien, Pilzen und proinflammatorischen Zytokinen führt innerhalb kurzer Zeit zur vermehrten Expression ihrer Transkriptionsprodukte (Dale & Krisanaprakornkit, 2001; Lehrer, 2004). Eine verstärkte antimikrobielle Wirkung von HBD-2 konnte gegenüber gramnegativen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* oder *Escherichia coli*, sowie gegen die grampositiven Streptokokken-Stämme *mutans* und *sobrinus* nachgewiesen werden (Nishimura et al., 2004; Shiba et al., 2003). Im Vergleich dazu zeigte sich eine verminderte HBD-2-Expression gegenüber grampositiven Bakterien wie *Staphylokokkus aureus* und *Staphylokokkus epidermidis*. Gewebe, die keinen Kontakt zu Keimen haben, bilden nur eine sehr basale Menge an HBD-2 (Harder & Schroder, 2005).

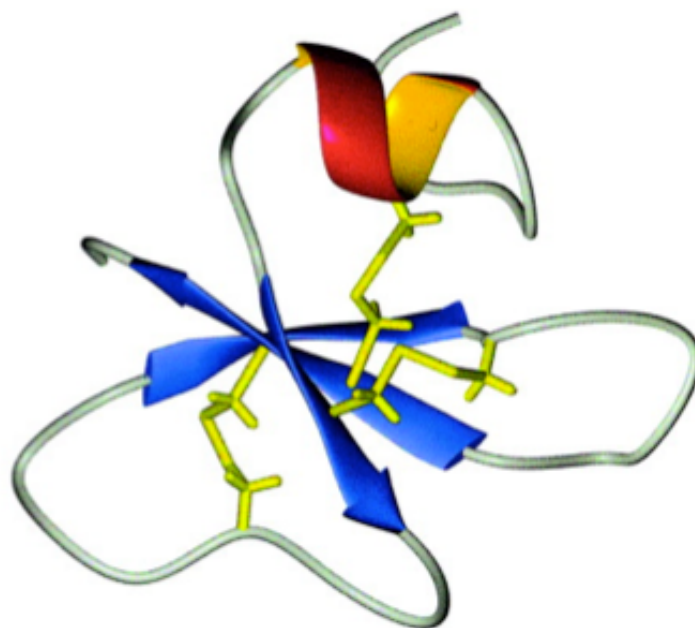


Abbildung 2-13 Strukturzeichnung HBD-2 (Schibli et al., 2002)

### 2.4.2.2 Humanes-beta-Defensin 3

Dieses Peptid konnte 2001 im Rahmen biochemischer Analysen ebenfalls aus der keimbesiedelten Haut von Psoriatikern isoliert werden. Das 45 Aminosäuren lange Humane-beta-Defensin 3 (HBD-3) besitzt mit einer Nettoladung von +11 die stärkste kationische Anziehungskraft unter den Defensinen (Garcia et al., 2001; Harder, Bartels, Christophers, & Schroder, 2001).

Im Vergleich zu HBD-2 zeigt HBD-3 allgemein ein breiteres Wirkspektrum gegenüber Erregern, einschließlich den Methicillin-resistenten Stämmen von *Staphylococcus aureus* sowie Vancomycin-resistenten Stämmen von *Enterokokkus faecium*. Somit zeichnet sich HBD-3 vor allem durch eine verstärkte antimikrobielle Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien aus (Harder et al., 2001).

Im Gegensatz zu anderen  $\beta$ -Defensinen wird die Genexpression von HBD-3 neben den genannten inflammatorischen Reizen zusätzlich von Hormonen beeinflusst. Es konnten stimulierende Effekte durch Wachstumsfaktoren wie Epithelial growth factor 1, Transforming growth factor  $\alpha$  und Insulin-like growth factor 1 nachgewiesen werden (Schroder & Harder, 2006).

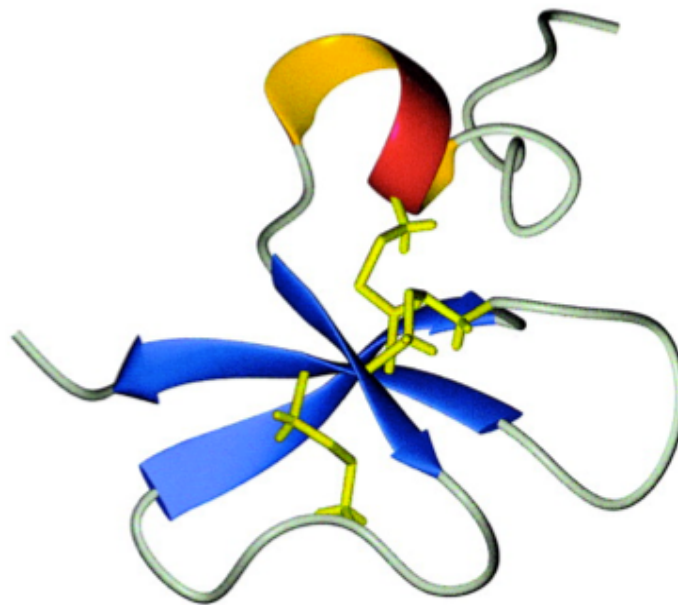


Abbildung 2-14 Strukturzeichnung HBD-3 (Schibli et al., 2002)



### 2.4.3 Humanes Cathelicidin

Auch die Cathelicidine gehören zu den antimikrobiellen Peptiden. Beim Menschen wurden sie primär in der entzündeten Haut von Psoriasispatienten isoliert und als Abwehrmoleküle erkannt (Peric, Koglin, Ruzicka, & Schaubert, 2009). Das einzig bekannte humane Cathelicidin heißt LL-37 und wird unter anderem in Epithelien gebildet (Sayama et al., 2005). Aber auch in neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und natürlichen Killerzellen wird LL-37 produziert und übernimmt eine wichtige Funktion des unspezifischen, angeborenen Immunsystems (Bals, 2000; Schwab et al., 2007; Sorensen, Arnljots, Cowland, Bainton, & Borregaard, 1997). Das kompakte Cathelicidin-Gen besteht aus 1963 Basenpaaren mit vier Exons, die den Bauplan eines Propeptids enthalten. Die Exons eins bis drei codieren für eine Signalsequenz, die Cathelin genannt wird. Sie entspricht einem 140 Aminosäuren langem, hoch konservierten, N-terminalen Abschnitt (Gudmundsson et al., 1996; Strukelj et al., 1995). Dieser Proteinabschnitt besitzt zwei Disulfidbrücken zwischen den Cysteinresten an Position C85-C96 und C107-C124 (Lai & Gallo, 2009). Das vierte Exon codiert für die erheblich heterogenere, hypervariable C-terminale Region und enthält die Information für das reife antibakterielle Peptid (Bals, 2000; Lai & Gallo, 2009). Die Molekülmasse des Propeptids beträgt 18kDa, weshalb es auch als human cationic antimicrobial peptide 18 (hCAP18) bezeichnet wird. LL-37 besteht aus 37 Aminosäuren und entsteht durch extrazelluläre Proteolyse aus hCAP18 (Gudmundsson et al., 1996).

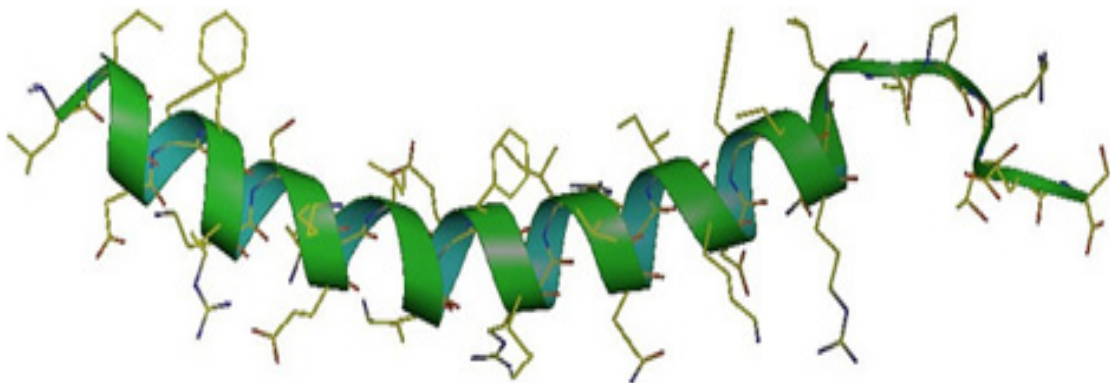


Abbildung 2-15 Strukturzeichnung LL-37 (Schluesener, Su, Ebrahimi, & Pouladsaz, 2012)

Das inaktive Propeptid wird durch Proteinasen enzymatisch in das Cathelin und das C-terminale antimikrobielle Peptid LL-37 gespalten (Zanetti, 2005). Dieses Endprodukt enthält im Gegensatz zu den Defensinen kein Cystein und ist nicht in der Lage, Disulfidbrücken zu bilden. Deshalb nimmt es als Sekundärstruktur eine lineare über Wasserstoffbrücken stabilisierte  $\alpha$ -Helix-Struktur ein (Weinberg, Krisanaprakornkit, & Dale, 1998).

## 2.4.4 Wirkmechanismus

AMPs sind niedermolekulare, kationische Oligo- und Polypeptide (Gudmundsson et al., 1996). Ihre positive Ladung und ihre geringe Größe ermöglichen ihnen, über elektrostatische Anziehung an den negativ geladenen Phospholipidgruppen der Polysaccharidoberfläche von Bakterien zu binden (Yang et al., 2002). Dabei kommt es durch unterschiedliche Mechanismen zur Apoptose der Bakterienzelle.

Das Fassdaubenmodell beschreibt, wie das Verdrängen von Lipiden und das Inhibieren der Zellwandsynthese zu Unterbrechungen der Lipiddoppelschicht führt. Dieser Vorgang bewirkt eine transmembranöse Porenbildung, wodurch es zum Austritt von Zellinhalt und damit zur Apoptose kommt (Brogden, 2005; Lai & Gallo, 2009). Bei hohen Peptidkonzentrationen wird die doppelschichtige Polysaccharidoberfläche der Bakterienzelle teppichartig eingehüllt. Dabei bilden die Peptide transiente Löcher in der Membran. Dies führt zur Entstehung einzelner Mizellen und letztendlich zur Zellapoptose (Brogden, 2005; Pouny, Rapaport, Mor, Nicolas, & Shai, 1992).

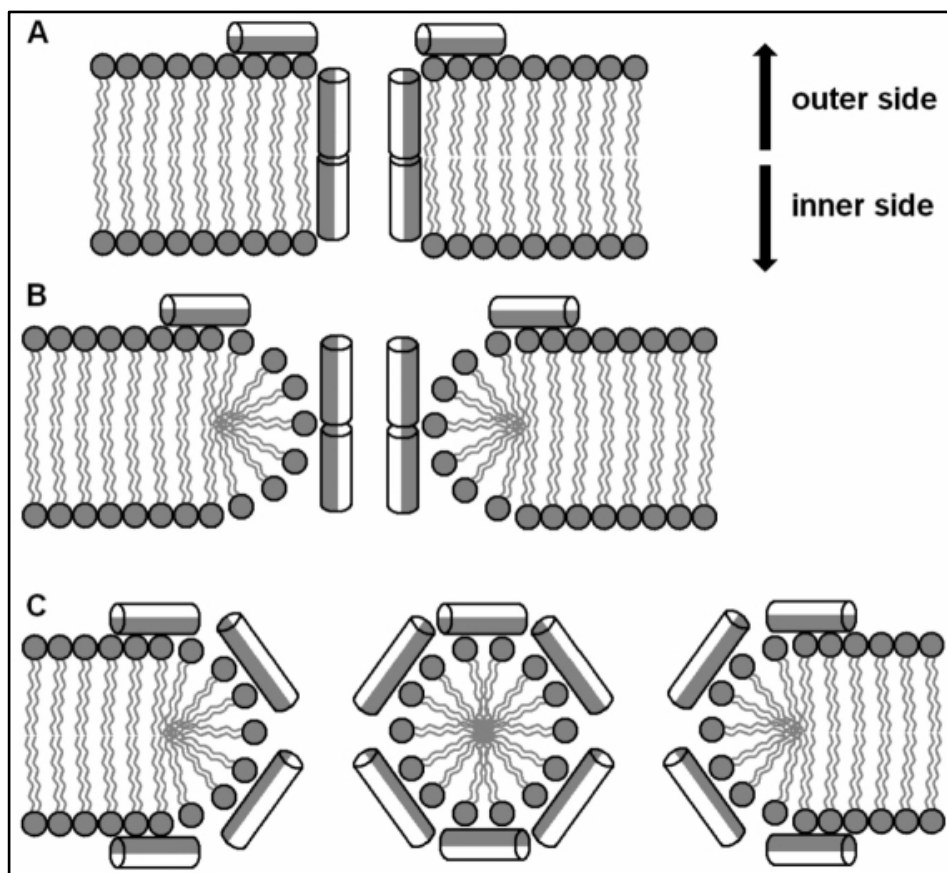


Abbildung 2-16 Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide, die Zylinder stellen AMPs dar; A: Fassdaubenmodell  
B: Transmembranöse Pore C: Teppichmodell mit Mizellenbildung (Palfy, 2009)

Humane Zellen sind von diesen Apoptosemechanismen nicht betroffen, denn im Gegensatz zur Bakterienzellmembran besitzen die körpereigenen Zellen eine neutralgeladene Phospholipidschicht, welche eine elektrostatische Anziehung von AMPs verhindert. In Anwesenheit bestimmter positiv geladener Ionen, wie etwa Kalzium, werden sogar Bakterien selbst vor dem Angriff der AMPs und somit vor der Apoptose geschützt. Die elektrische Ladung der Bakterienoberfläche wird aufgehoben und die Elektrostatik hat keinen Einfluss mehr auf die Anziehung der kationischen, antimikrobiellen Peptide (Schneck et al., 2010).

Antimikrobielle Peptide besitzen außer der Fähigkeit über das angeborene Immunsystem direkt zu agieren noch weitere regulative Funktionen, die mit dem adaptiven Immunsystem verbunden sind (Lai & Gallo, 2009). So neutralisieren AMPs unter anderem proinflammatorische Zytokine, beeinflussen die Degranulation von Mastzellen und haben chemotaktischen Einfluss auf T-Zellen sowie antigenpräsentierende dendritische Zellen. Außerdem sind sie an der Wundheilung, an der Vaskularisierung von Geweben und an der Proliferation von Epithelien beteiligt (Lai & Gallo, 2009). Vereinfacht zusammengefasst bewirken sie ein Zusammenspiel des angeborenen und des adaptiven Immunsystems.

### 3 Zielsetzung der Arbeit

Paulsen erbrachte im Jahr 2002 den Erstnachweis, dass die AMP-Expression von der Ätiologie einer Gelenkentzündung abhängig ist. Insbesondere die AMPs HBD-2, HBD-3 und LL-37 unterschieden sich bei Patienten mit Osteoarthrose, rheumatoider und pyogener Arthritis (Paulsen et al., 2002). 2013 gelang es der eigenen Arbeitsgruppe, anhand des AMP-Spiegels im Gelenkpunktat erstmalig sicher zwischen aseptischer und septischer Prothesenlockerung zu differenzieren (Gollwitzer et al., 2013). Dabei zeigten sich die AMPs HBD-3 sowie das humane Cathelicidin LL-37 als ideale PPI-Marker mit einer höheren diagnostischen Genauigkeit als die gegenwärtigen Standarddiagnostika. Jedoch blieb die genaue Herkunft der in der Gelenkflüssigkeit nachweisbaren AMPs ungeklärt.

Konsequenterweise war es nun Ziel dieser Arbeit, die AMP-Expression von HBD-2, HBD-3 und LL-37 in der Synovialmembran und der periprothetischen Gelenkmembran bei vorliegendem PPI, in Abhängigkeit des intraartikulären Keimspektrums, auf Gewebe- und Zellkulturebene nachzuweisen. In über 70% der PPI handelt es sich um grampositive Erreger. Diese sind zumeist Keime der normalen Hautflora, die bei Früh- und Spätinfektionen auf die Prothesenoberfläche gelangen (Inman et al., 1984; Lohmann et al., 2007). Die Untersuchungen in der Gruppe der septischen Patienten wurde daher ebenfalls nach einem grampositiven Erregernachweis durchgeführt. Die Untersuchungen der Patienten in den Gruppen primäre TEP Implantation und gesicherte aseptische Lockerung dienten zum Vergleich. Für die Experimente wurden zwei unterschiedliche Methoden verwendet um die AMP Expression in Gelenkmembranen quantitativ nachzuweisen. Zum Einen mit Hilfe von Paraffingewebe, das zum Zeitpunkt der Operation aufbereitet wurde, zum Anderen durch ex-vivo, in-vitro Synovialzellisolate der intraoperativ entnommenen Membranen.

Nach der Identifikation der intraoperativ entnommenen Synovialozyten ist ein Nachweis der AMP-Expression in beiden Methoden durch die immunhistochemische Färbereaktion möglich (Boenisch, 2003). Für die statistische Vergleichbarkeit der Peptidexpression wurden zwei Scoring-Systeme, der Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner (IRS) (Remmele & Stegner, 1987) sowie der Total Score nach Allred (TS) (Allred et al., 1998), zur semiquantitativen Auswertung der Ergebnisse herangezogen. Anschließend wurde die Signifikanz der Analysen ermittelt. Für die Experimente mit Paraffingewebe wurde zusätzlich die diagnostischen Güte mit Hilfe einer Receiver operating characteristic curve berechnet (Jürgen Bortz, 2008).

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Geräte und Reagenzien

#### 4.1.1 Technische Geräte

Gerät	Hersteller	Stadt	Land
Centrifuge 5804 R	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Eppendorf EasyPet	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Hera freeze basic (-80°)	Thermo Fisher Scientific	Schwerte	Deutschland
Hera Safe HS12	Heraeus	Hanau	Deutschland
Inkubator Hera Cell	Heraeus	Hanau	Deutschland
Klimaschrank WTC	Binder	Tuttlingen	Deutschland
Kühlplatte COP 30	Medite	Burgdorf	Deutschland
Leica RM 2255 Mikrotome	Leica	Nussloch	Deutschland
Mikroskop Axiovert 25	Carl Zeiss GmbH	Jena	Deutschland
Mikroskop Observer.Z1	Carl Zeiss GmbH	Jena	Deutschland
Mikroskop Wilovert S	Helmut Hund GmbH	Wetzlar	Deutschland
Mikrotom-Klinge S35	Feather	Osaka	Japan
MS2 Minishaker	IKA Works, Inc.	Staufen	Deutschland
Multipette plus	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Pipette Eppendorf reference	Eppendorf	Hamburg	Deutschland
Titramax & Inkubator 1000	Heidolph	Schwabach	Deutschland
Rotina 420R	Hettich	Tuttlingen	Deutschland
Thermobecken GFL 1052	G.f. Labortechnik	Burgwedel	Deutschland
Thermobecken SUB	Grant Instruments	Cambridge	England
Thermomixer comfort	Eppendorf	Hamburg	Deutschland

Tabelle 4.1-1 Technische Geräte

### 4.1.2 Gewebeaufbereitung

Produkt	Hersteller	Stadt	Land
Cell Strainer 40 und 70µm Nylon	BD Falcon	San Jose	USA
Cellstar Tubes 50ml	greiner bio-one	Kremsmünster	Österreich
Cellstar, serological pipette	greiner bio-one	Kremsmünster	Österreich
Cryogenetic Vials	Fisher Scientific	Schwerte	Deutschland
Dulbecco's MEM F0415	Biochrom AG	Berlin	Deutschland
Liberase-TM 120yl in 10ml	Roche	Indianapolis	USA
Monovette Blutserumröhrchen	Sarstedt	Nümbrecht	Deutschland
Neubauer Zählkammer	Assistant	Sondheim	Deutschland
Petrischale Tissue Culture Dish	Sarstedt	Newton	USA
Phosphate buffered saline, pH 7.4	Sigma-Aldrich	Steinheim	Deutschland
SafeSeal-Tips Premium	Biozym Scientific	Oldendorf	Deutschland
Skalpell Feather	Feather	Osaka	Japan

Tabelle 4.1-2 Material für Probenentnahme

### 4.1.3 Zellkultur

Produkt	Hersteller	Stadt	Land
Cellstar Tubes 50ml	greiner bio-one	Kremsmünster	Österreich
Cellstar, serological pipette, sterile	greiner bio-one	Kremsmünster	Österreich
Culture Slides Chamber	BD Falcon	San Jose	USA
Dulbecco's MEM F0415	Biochrom AG	Berlin	Deutschland
Dulbecco´s RPMI	Biochrom AG	Berlin	Deutschland
FBS Superior standardized	Biochrom AG	Berlin	Deutschland
Hepes-Buffer (1M)	Biochrom AG	Berlin	Deutschland
L-Glutamin 200mM low endotoxin	Biochrom AG	Berlin	Deutschland
MEM-Vitamine w10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Biochrom AG	Berlin	Deutschland
Neubauer Zählkammer	Assistant	Sondheim	Deutschland
Penicillin/Streptomycin 10.000 U/ml	Biochrom AG	Berlin	Deutschland
Phosphate buffered saline, pH 7.4	Sigma-Aldrich	Steinheim	Deutschland
Tissue Culture Flask 750ml/175cm <sup>2</sup>	BD Falcon	San Jose	USA
Trypsin/EDTA Lsg. 0,05%/0,02%	Biochrom AG	Berlin	Deutschland

Tabelle 4.1-3 Material für Zellkultur

#### 4.1.4 Paraffingewebe

Produkt	Firma	Stadt	Land
Ethanol 70%, Ethanol absolut 99,8%	Apotheke RDI	München	Deutschland
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 30%	Merck	Darmstadt	Deutschland
Methanol 99,9%	Roth	Karlsruhe	Deutschland
Micro-Cut Schmelzpunkt 56-58°C	Polysciences	Warrington	USA
Objektträger Superfrost Plus	Menzel-Gläser	Braunschweig	Deutschland
Paraffinkassetten/Einbettkassetten	Omnilab	Bremen	Deutschland
PFA 4% bereits in Lsg.	Apotheke RDI	München	Deutschland
PFA 4% Pulver	Merck	Darmstadt	Deutschland
Phosphate buffered saline, pH 7.4	Sigma-Aldrich	Steinheim	Deutschland
Proteinase K	Quiagen	Hilden	Deutschland
Target Retrieval Solution pH6	Dako	Hamburg	Deutschland
Xylol Pharm. Helv. XI	Hedinger	Stuttgart	Deutschland

Tabelle 4.1-4 Material für Paraffingewebe

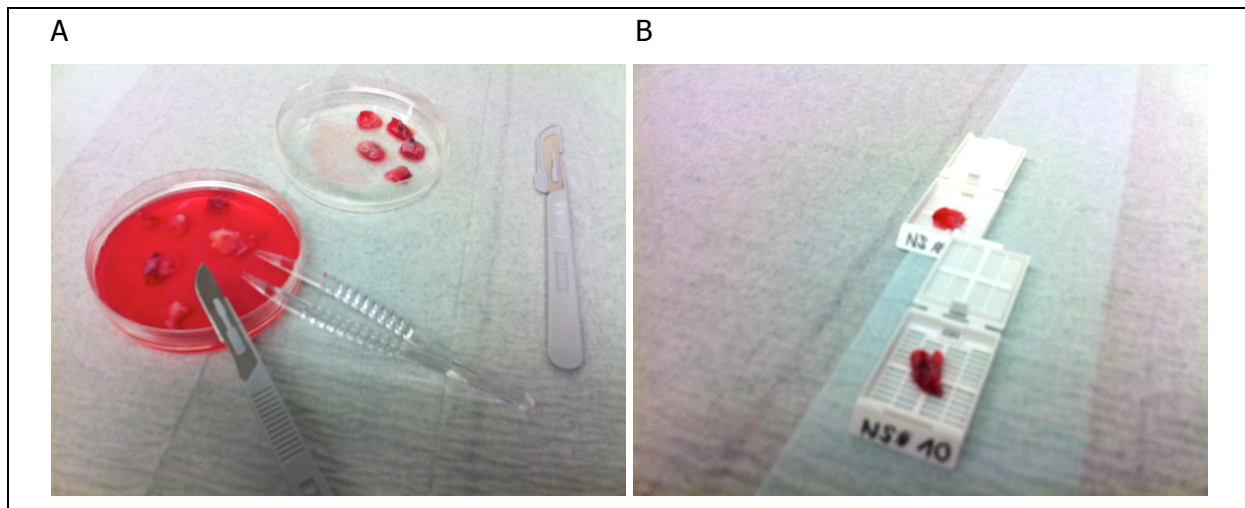


Abbildung 4-1 Aufbereitung von intraoperativ entnommenen Gewebeproben; A: Schneiden B: Einlegen in eine Paraffinkassette

### 4.1.5 Immunhistochemie und Antikörper

Produkt	Hersteller	Stadt	Land
AEC	Dako	Hamburg	Deutschland
Antibody Diluent	Dako	Hamburg	Deutschland
Aqua dest. Ecotainer	B.Braun	Melsungen	Deutschland
Avidin-Biotin-Complex	Vector	Burlingame	CA
Biotinylated Anti Mouse IgG	Vector	Burlingame	CA
Biotinylated Anti Rabbit IgG	Vector	Burlingame	CA
Brij L23 Solution	Sigma-Aldrich	Steinheim	Deutschland
Deckgläser 24x50mm #1	Menzel-Gläser	Braunschweig	Deutschland
Ethanol 70%, Ethanol absolut 99,8%	Apotheke RDI	München	Deutschland
Kaisers Glyceringelatine	Merck	Darmstadt	Deutschland
Phosphate buffered saline, pH 7.4	Sigma-Aldrich	Steinheim	Deutschland
Protein Block (Serum free)	Dako	Hamburg	Deutschland
SafeSeal-Tips Premium	Biozym	Oldendorf	Deutschland
Saures Hämalau nach Mayer 1l	Apotheke RDI	München	Deutschland

Tabelle 4.1-5 Material für Immunhistochemie

Antikörper	Hersteller	Stadt	Land
Biotinylated Anti-Goat IgG BA-9500	Vector	Burlingame	USA
Control Mouse IgG 500-M00	PeproTech	Rocky Hill	USA
Human Beta Defensin 4/2 AF2758	R&D Systems	Wiesbaden	Deutschland
HBD-3 Rabbit Polyclonal LS-B86	Lifespan	Seattle	USA
HSP 27 Santa Cruz sc13132	Santa Cruz	Heidelberg	Deutschland
LL-37 Polyclonal Rabbit Anti-LL-37	Inovagen	Lund	Schweden
Mouse Anti-CD68 M0814	Dako	Hamburg	Deutschland
Mouse Anti-Vimentin M0725	Dako	Hamburg	Deutschland
Mouse IgG X0943	Dako	Hamburg	Deutschland
Normal Goat IgG AB-108-C	R&D Systems	Wiesbaden	Deutschland
Normal Rabbit IgG 500-P00	PeproTech	Rocky Hill	USA
Protein Kinase PK	Qiagen	Hilden	Deutschland
Rabbit Anti-Laminin Dako Z0097	Dako	Hamburg	Deutschland
Rabbit Ig Fraktion X0936	Dako	Hamburg	Deutschland

Tabelle 4.1-6 Antikörper für Immunhistochemie



## 4.2 Ethikantrag und Patientenaufklärung

Der Antrag an die Ethikkommission der TU München, unter dem Vorsitz von Herrn Univ.-Prof. Dr. med. A. Schömig, wurde gestellt und am 14.09.2009 durch das Gremium bewilligt. Die Arbeit wurde finanziell durch die Kommission für klinische Forschung der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München (KKF-Projekt C08-08) gefördert.

Im Patientengespräch und mit Hilfe eines speziell angefertigten Informationsblattes der Arbeitsgruppe für septische Endoprothetik wurden die intraoperative Probenentnahme und die einzelnen experimentellen Schritte im Vorfeld ausführlich erläutert. Die Patienten erklärten sich mit der Entnahme und wissenschaftlichen Verwendung von Blut, Gelenkpunktat und Gewebe einverstanden. Eine Einverständniserklärung liegt jeweils vor.

## 4.3 Patientenkollektive

Alle Patientenproben wurden in der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie des Klinikums rechts der Isar der Technischen Universität München entnommen. Für die Experimente wurde Synovialgewebe aus der Gelenkkapsel, sowie aus der periprothetischen Membran von Knie- und Hüftgelenken verwendet. Die Entnahme erfolgte prospektiv konsekutiv. Patienten mit chronisch entzündlichen Beschwerden oder einer bekannten malignen Grunderkrankung wurden als Gewebedonor ausgeschlossen. Ebenso ausgenommen wurden voroperierte Patienten, die mit Wundschwämmen oder lokalen Antibiotikaträgern versorgt waren. Um die Ergebnisse besser bewerten und untereinander vergleichen zu können, wurden die Experimente mit Gewebeproben aus drei verschiedenen Patientenkollektiven durchgeführt.

Das **erste Kollektiv** besteht aus Patienten mit Arthroseleiden, die sich zur primären operativen Versorgung durch eine Totalendoprothese entschieden haben. Diese ansonsten gesunden Patienten wurden in die Gruppe **Primäre Hüft- und Knie-TEP** eingeschlossen.

Im **zweiten Kollektiv** befinden sich Patienten, die bereits mit einer primären Totalendoprothese operativ versorgt worden waren. Aufgrund einer aufgetretenen Prothesenlockerung oder durch einen verschleißbedingten Prothesenwechsel musste erneut eine operative Versorgung geplant werden. Bei diesem Patientenkollektiv konnte im präoperativ entnommenen Blutserum kein CRP-Wert-Anstieg oder eine Leukozytenerhöhung festgestellt werden. Die mikrobiologische Untersuchung des Gelenkpunkts und die intraoperativ entnommenen Abstriche mussten zudem nach verlängerter 10-tägiger Bebrütung ohne pathologischen Befund sein. Ferner musste die Histologie der intraoperativen Gewebe nach Morawietz und Krenn ohne Infektverdacht sein.

Gemäß dem derzeitigen diagnostischen Goldstandard der *Musculoskeletal Infection Society* konnten diese Patienten dann in die Gruppe **Aseptische Lockerung** eingeteilt werden.

In **Kollektiv drei** wurden Patienten eingeschlossen, die zur operativen Revision einer einliegenden Endoprothese stationär aufgenommen wurden. Erhöhte Entzündungswerte (CRP-Wert, BSG und Leukozyten) sowie der Nachweis eines grampositiven, Katalase-positiven sowie Koagulase-negativen Erregers im Punktat waren für dieses Kollektiv obligat. Bei identischen intraoperativen Abstrichen wurden die Patienten dann gemäß dem Konsensus der *Musculoskeletal Infection Society* in die Gruppe **Septische Lockerung** aufgenommen.

Patienten, die dem Kollektiv drei entsprechen, jedoch einen gramnegativen Erregernachweis zeigten, wurden zusätzlich zur Isotyp- und PBS-Kontrolle als Positivkontrolle für HBD-2 herangezogen. Diese Positivkontrolle wurde bei der HBD-2-Färbung für Paraffingewebe zusätzlich durchgeführt. So konnte zum einen die HBD-2-Antikörperkonzentration auf 1µg/ml festgelegt werden, zum anderen diente die Positivkontrolle zur Sicherung der HBD-2-Ergebnisse, da es gegenüber grampositiven, Katalase-positiven Bakterien nur zu einer basalen HBD-2-Expression kommt. Allerdings findet als Reaktion auf eine gramnegative Keimbeseidlung wie im Gewebe der Positivkontrolle eine HBD-2-Expression im Gewebe statt (Harder & Schroder, 2005).

Als Nullreferenz und zur Gewebeidentifikation des entnommenen Synovialgewebes konnte die bereits beschriebene immortalisierte Synovialozytenzelllinie K4IM (2.3.3.1) verwendet werden.

Aufgrund einer Implantatlockerung stellte sich ein Patient zum Prothesenwechsel vor. Die entnommenen intraoperativen Abstriche und das Punktat zeigten keinen Erregernachweis, jedoch berichtete der Proband von einer septischen Revisionstherapie in der Vergangenheit. Die Gewebeprobe wurde von der Auswertung ausgeschlossen da keine Einteilung in ein Kollektiv möglich war. Aus wissenschaftlichem Interesse und als Ausblick für die weitere Forschung wurde das Gewebe dennoch bearbeitet (6.4 Ausblick für weitere Forschung).

## 4.4 Probenentnahme

Zum direkten Vergleich der aktuellen Standarddiagnostik wurde jedem Patient im Rahmen der Narkoseeinleitung zwei Blutserumröhrchen mit Vollblut entnommen. Eines wurde wie üblich durch das Institut für klinische Chemie analysiert. Das zweite Röhrchen wurde umgehend zentrifugiert. Dabei entstehen die typischen drei Phasen aus Serum, Leukozyten und den anderen zellulären Blutbestandteilen.

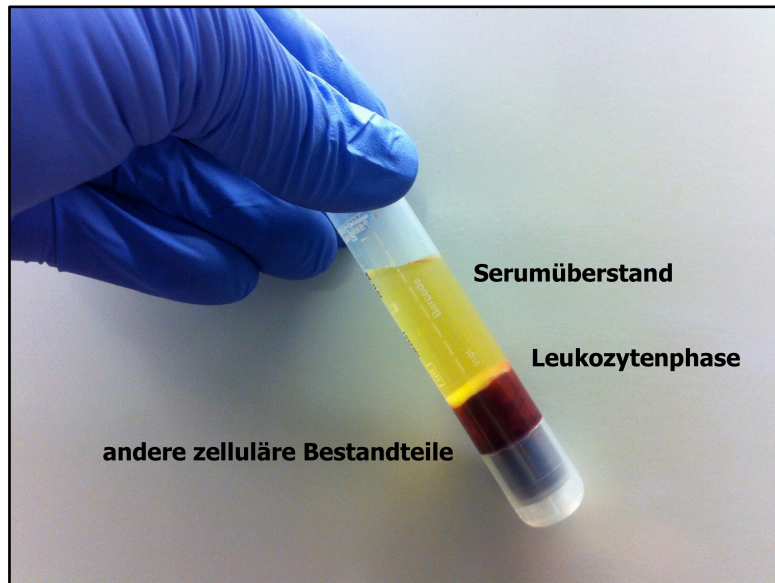


Abbildung 4-2 Drei Phasen des Vollblutes nach dem Zentrifugieren

Abhängig von der Breite der Leukozytenphase, ist bereits eine grobe Abschätzung über die Entzündungssituation des Patienten möglich (**Abbildung 4-2**). Anschließend wurde der Serumüberstand vorsichtig von den zellulären Blutbestandteilen abpipettiert, in ein Cryogenetic Vial gefüllt und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

Als aktueller Goldstandard erfolgte die intraoperative, sterile Gelenkspunktion und die Aspiration von Synovia. Diese wurde aufgeteilt und zum einen durch das Institut für Medizinische Mikrobiologie des Klinikum rechts der Isar ausgewertet. Die andere Hälfte wurde in ein 50ml Cellstar Tube pipettiert und ebenfalls bei  $-80^{\circ}\text{C}$  eingelagert.

Zwischenzeitlich wurde im Rahmen der Operation die Synovialmembran herauspräpariert. Wie üblich wurde davon ein Gewebestück zur histopathologischen Analyse an das Institut für Pathologie des Klinikum rechts der Isar geschickt. Die restliche Synovialmembran konnte für die folgenden Experimente aufbereitet werden.

Für diese Arbeit dienten die Ergebnisse der Punktatanalyse und der histologischen Untersuchung der jeweiligen Institute als Sicherheit, um die Patienten in das richtige Kollektiv einzuteilen.

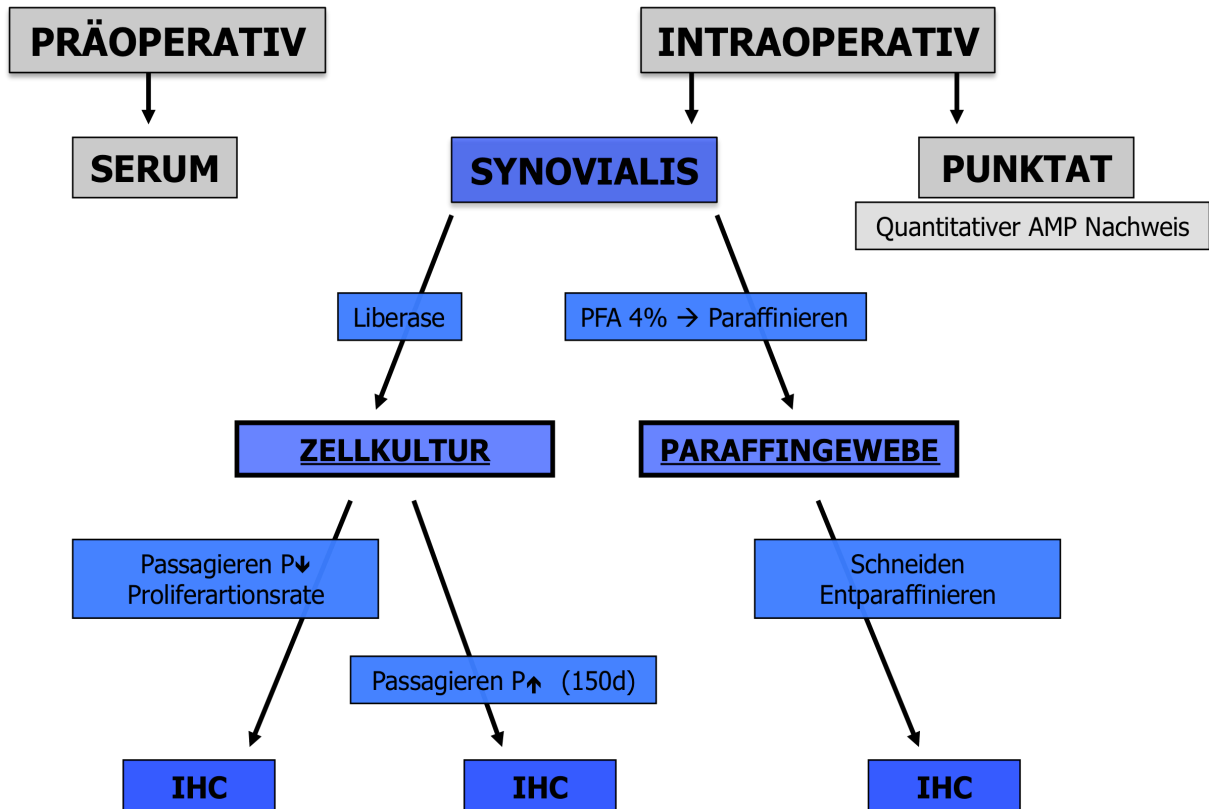


Abbildung 4-3 Schaubild zur Probenentnahme

Als Gewebeprobe wurde ausschließlich die gelenkseitige Synovialmembran verwendet und bereits im Operationssaal in ein Nährmedium<sup>1</sup> gegeben (**Tabelle 4.5-1**). Nach der intraoperativen Probenentnahme wurde das Synovialgewebe unter sterilen Bedingungen, mit Hilfe einer Laminar-Air-Flow, für die verschiedenen Methoden aufbereitet.

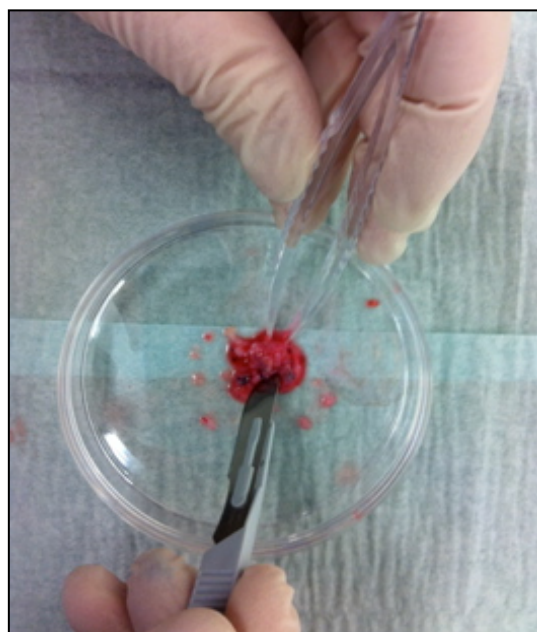


Abbildung 4-4 Steriles Zerkleinern der gelenkseitigen Synovialmembran

## 4.5 Zellkultur

### 4.5.1 Nährmedium

Die ideale Zusammensetzung der Nährmedien wurde im Vorfeld erarbeitet (**Tabelle 4.5-1**). Dafür wurden die Medienzusätze in unterschiedlichen Konzentrationen zu den gängigen Grundmedien RPMI (entwickelt am Roswell Park Memorial Institute) und Dulbeccos MEM gemischt und zu je 25ml in Tissue Culture Flask mit 175cm<sup>2</sup> Grundfläche (T175) gefüllt. Anschließend wurden jeweils 450.000 Synovialozyten hinzu pipettiert und über einen Zeitraum von 15 Tagen bebrütet.

Alle fünf Tage wurde die Zellzahl bestimmt und in eine Wachstumskurve übertragen. Anhand des Wachstumsfaktors und der über den Trypanblau-Exklusionstest bestimmten Zellvitalität wurde das ideale Nährmedium ermittelt (**Tabelle 4.5-1**).

Zusätzlich musste das Zellkulturmedium den verschiedenen Arbeitsschritten angepasst werden. Das jeweilige Medium wurde durch die Exponenten <sup>1</sup> und <sup>2</sup> gekennzeichnet. Medium<sup>1</sup> besitzt im Gegensatz zu Medium<sup>2</sup> kein fetales Kälber Serum (FBS/FCS) und keine Antibiose. FCS besteht aus Peptiden. Während der Synovialozytenisolierung würde FCS ebenfalls von der Kollagenase Liberase gespalten werden. Dadurch würde dieser Arbeitsschritt zusätzlich verlängert werden und somit die Synovialozyten schädigen.

Nährmedium	Grundmedium	Medienzusätze
Medium <sup>1</sup> (Serumfree)	Dulbecco´s MEM 500ml Biochrom FG 0415	2% HEPES-Buffer 1% Glutamin 1% Vitamin
Medium <sup>2</sup>	Dulbecco´s MEM 500ml Biochrom FG 0415	10% FBS/FCS 2% HEPES-Buffer 1% Glutamin 1% Vitamin 1% Penicillin/Streptomycin

Tabelle 4.5-1 Arbeitsschrittabhängige Nährmedien

Das Nährmedium wurde vor jedem Gebrauch auf die physiologische Temperatur von 37°C gebracht. Auch das Grundmedium sowie alle Medienzusätze wurden vor dem Mischen im Wärmebecken auf 37°C erwärmt.

## 4.5.2 Synovialozytenisolierung

Unter dem Lichtmikroskop wurde die Intimaschicht des intraoperativ entnommenen Synovialgewebes sicher identifiziert und dann mit dem Skalpell vom übrigen Gewebe getrennt (**Abbildung 4-1** und **Abbildung 4-4**). Anschließend wurde die Intimaschicht in ein 50ml Tube mit 10ml Nährmedium<sup>1</sup> (**Tabelle 4.5-1**) sowie 120 $\mu$ l Liberase gegeben, und für 5 Stunden in einem 37°C warmen Inkubations-Plattformschüttler inkubiert. Das Enzym Liberase gehört zu den Kollagenasen, löst die Peptidbindungen des kollagenen Bindegewebe auf und gibt die einzelnen Synovialozyten aus ihrem Gewebeverbund frei. Dies ist eine effektive und schonende Art der Zellisolierung aus dem Gewebe, die sich in höheren Zellzahlen, Zellvitalitäten und Funktionseigenschaften der Synovialozyten widerspiegelt.

Auch die folgenden Arbeitsschritte fanden unter sterilen Bedingungen mit Hilfe einer Laminar-Air-Flow statt. Um die isolierten Zellen aus dem Gemisch von kollagenem Bindegewebe, Medium und Liberase zu separieren, musste die Flüssigkeit zuerst vorsichtig durch ein Nylonnetz der Maschengröße 70 $\mu$ m und anschließend durch ein Nylonnetz der Maschengröße 40 $\mu$ m mit Hilfe einer Eppendorf EasyPet in ein 50ml Tube pipettiert werden. Die Bindegewebsfasern bleiben dabei im Netz hängen. Um die Maschengröße ideal zu wählen, wurden bereits im Vorfeld 100 Synovialozyten entnommen, mikroskopisch vermessen und ausgewertet. Diese hatten eine durchschnittliche Größe von 18,6 $\mu$ m bei einer Range von 13-28 $\mu$ m. Die gewonnene Suspension wurde für zehn Minuten bei 4°C und 1140 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nachdem der Überstand sorgsam durch Pipettieren entfernt wurde, können die Synovialozyten, die sich als Sediment am Boden des 50ml Tube abgesetzt hatten, mit frischem Nährmedium<sup>2</sup> (**Tabelle 4.5-1**) erneut resuspendiert werden.

## 4.5.3 Zellzahl und Zellvitalität

Um Ausgangswerte für die Passage Null (P0) der Zellkulturuntersuchungen (z.B. Wachstumskurven) zu erhalten, wurde die Anzahl und Vitalität der entnommenen und frisch isolierten Synovialozyten bestimmt. Dazu wurden alle Synovialozyten, die sich als Sediment am Boden des 50ml-Tube abgesetzt hatten, mit 10ml frischem Nährmedium<sup>2</sup> erneut sorgfältig unter sterilen Bedingungen resuspendiert. Anschließend mussten 100 $\mu$ l Zellsuspension mit 100 $\mu$ l Trypanblau-Lösung in einem Eppendorfgefäß miteinander gemischt und für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert werden. In dieser kurzen Inkubationsphase nehmen abgestorbene Zellen den Farbstoff Trypanblau in ihren Intrazellularraum auf und färben sich blau an. Vitale Zellen hingegen nehmen keinen Farbstoff auf und behalten ihre neutrale Eigenfärbung. Dieser Test wird Trypanblau-Exklusionstest genannt.

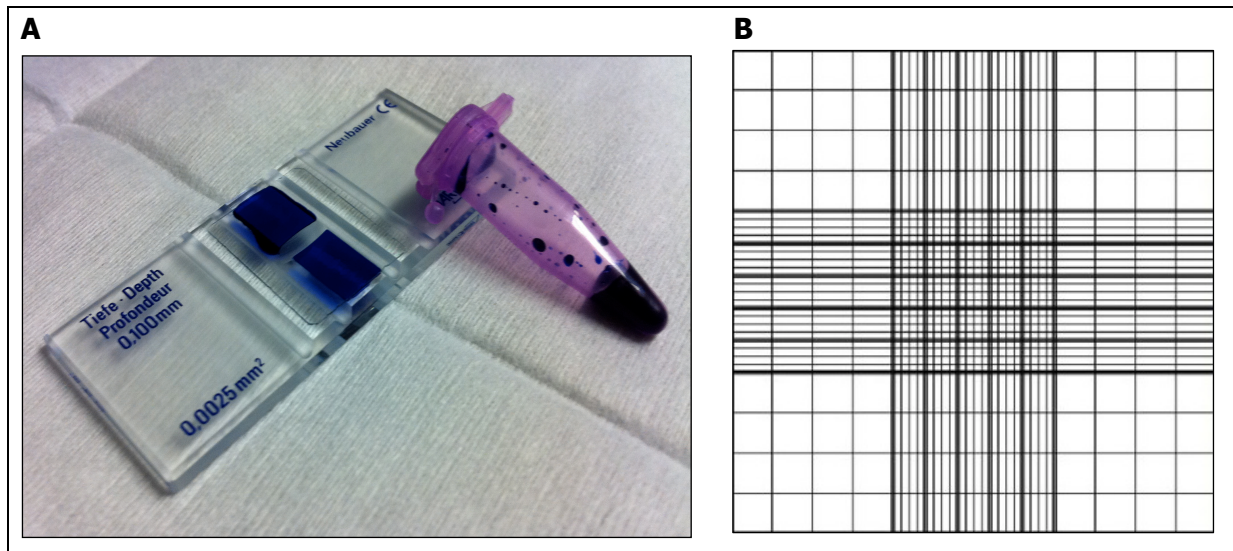


Abbildung 4-5 A: Neubauer Zählkammer, Seitenflächen mit Trypanblau gefüllt B: Seitenfläche in mikroskopischer Ansicht. Von den neun Quadraten werden die äußeren vier ausgezählt

Anschließend wurden die zwei Seitenflächen der Neubauer-Zählkammer, die sich zwischen Grund- und Deckplatte befinden, mit dem Zellsuspension-Trypanblau-Gemisch mit Hilfe einer Eppendorf Reference Pipette gefüllt. Zur Auszählung wurde die Neubauer-Zählkammer unter ein Lichtmikroskop gelegt, so dass die Einteilungslinien der Seitenflächen zu sehen sind. Jede Seitenfläche besteht aus neun großen Quadraten. Jedes der neun Quadrate hat eine Fläche von  $0,1\text{mm}^2$ . Die vier Eckquadrate werden ausgezählt. Die Höhe zwischen dem Deckglas und der Grundplatte beträgt  $0,1\text{mm}$  (**Abbildung 4-5**). Das heißt, in jedem der Quadrate befindet sich ein definiertes Volumen von  $1\text{mm}^2 \times 0,1\text{mm}$ . Somit lassen die folgenden Formeln Rückschlüsse auf die Zellzahl und die Zellvitalität der Ausgangssuspension zu. Die Zellzahl wird pro Milliliter angegeben und kann dann hochgerechnet werden:

$$\Sigma \text{ Zellen pro ml} = \text{gezählte Zellen} \div 2 \text{ SF} \div 4 \text{ Quadrate} \times 2 \text{ Verdünnungsfaktor} \times 10^4$$

Das Auszählen der beiden Seitenflächen (SF) erhöht die Genauigkeit, da ein Durchschnittswert gebildet werden kann. Jedoch muss anschließend wieder durch zwei geteilt werden. Ebenso verhält es sich mit der Anzahl der ausgezählten Quadrate. Sie erhöhen die Genauigkeit der Stichprobe und müssen zurückgerechnet werden. Der Verdünnungsfaktor errechnet sich aus der Volumenzugabe von  $100\mu\text{l}$  Trypanblau zu  $100\mu\text{l}$  Zellsuspension. Dadurch wird das Volumen verdoppelt und muss durch zwei zurückgerechnet werden.  $10^4$  ist der Kammerfaktor, der durch die Neubauerkammer ( $0,1\text{mm}$  Tiefe;  $0,0025\text{mm}^2$  Fläche) vorgegeben wird. Die Vitalität der Zellen wird in Prozent angegeben:

$$\text{Vitale Zellen in \%} = (\text{ungefärbte Zellen} \times 100) \div (\text{gefärbte} + \text{ungefärbte Zellen})$$

#### 4.5.4 Kultivieren und Passagieren von Synovialozyten

Nachdem die Gesamtzellzahl der Ausgangssuspension berechnet wurde, erfolgt die sterile Aussaat der Synovialozytenmonolayerkultur in belüftete 175cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit einer Dichte von 2500-4000 Synovialozyten pro cm<sup>2</sup>. Das entspricht 450.000-700.000 Zellen pro 175cm<sup>2</sup> Flasche. Die dafür benötigten und zuvor berechneten Milliliter an zellreicher Ausgangssuspension wurden mit dem Nährmedium<sup>2</sup> zu insgesamt 25ml ergänzt. Findet die Aussaat zum ersten Mal nach der Isolierung frischer Synovialozyten statt, so spricht man von der Passage Null (P0). Zur Kultivierung wurden die Zellen im Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub>-Normalluftgemisch inkubiert. Um den Synovialozyten ein ideales Wachstumsmilieu zu bieten, wurde das Nährmedium<sup>2</sup> alle drei Tage gewechselt. Das verbrauchte Medium wurde unter der Laminar-Air-Flow mit Hilfe einer Eppendorf easypet Pipette abgesaugt, mit Phosphat Buffered Saline (PBS) vorsichtig gespült und anschließend 25ml frisches Nährmedium<sup>2</sup> einpipettiert. Sobald die Kultur ein konfluentes Wachstum erreicht hatte, wurden die Zellen subkultiviert und auf weitere Zellkulturflaschen aufgeteilt. Dieser Vorgang wird Passagieren genannt und mit P sowie der Anzahl der Passagen dokumentiert. Alle Reagenzien die zum Passagieren benötigt werden, müssen zuvor im Wärmebecken auf 37°C erwärmt werden. So wird eine zellphysiologische Temperatur gewährleistet. Auch zu Beginn des Passagierens wurde das verbrauchte Medium unter der Laminar-Air-Flow mit Hilfe einer Eppendorf easypet Pipette abgesaugt, danach mit PBS gespült. Um die am Flaschenboden und aneinander angewachsenen Zellen vorsichtig zu lösen, wurden 7ml Trypsin/EDTA-Lösung in die Kulturflasche pipettiert und der gesamte Zellrasen durch leichtes Schwenken mit der Lösung benetzt. Anschließend musste die Flasche im Begasungsbrutschrank für 5 Minuten inkubiert werden. Trypsin gehört zu den Peptidasen, spaltet interzelluläre Mucoproteine während der Inkubationszeit, und teilt so die adhären aneinander angewachsenen Zellen voneinander ab. Nach der Inkubation wird behutsam seitlich an die Zellkulturflasche geklopft um die Zellen mechanisch zu lösen. Das Ergebnis wird unter dem Lichtmikroskop begutachtet. Um die Aktivität des Trypsin/EDTA zu inaktivieren muss ein serumhaltiges Nährmedium<sup>2</sup> zugegeben werden. Zuletzt wurde das Gemisch aus Nährmedium<sup>2</sup>, Trypsin/EDTA und Synovialozyten in ein 50ml Tube transferiert. Nach mehreren Passagen und guter Dokumentation kann man für jede Zellkultur eine Wachstumskurve generieren (**Abbildung 4-6**). Für diese Arbeit wurden Zellen aus den Passagen P2/3 sowie aus den Passagen P14/15 auf Chamberslides fixiert und für immunhistochemische Versuche bereitgestellt. Das Zellwachstum für eine Passage dauert 9 bis 10 Tage. Bis zur Passage 15 sollte man daher einen Zeitraum von ungefähr 150 Tagen einkalkulieren.



### 4.5.5 Wachstumseigenschaften

Unter Wachstum versteht man entweder die Zunahme der Zellzahl oder die Zunahme der Biomasse von Zellen. Die Verdoppelung der Gesamtzellzahl einer Kultur wird Populationsverdopplungszeit genannt (Lindl T., 2008). Es ist entscheidend, sich mit den Wachstumsraten der entnommenen Synovialozyten vertraut zu machen, um für das Passagieren, Aussäen und Fixieren der Zellen den optimalen Zeitpunkt einzuhalten. Um die Wachstumseigenschaften einer Kultur zu bestimmen, wird aus den Zellzahlbestimmungen zu unterschiedlichen Zeitpunkten eine Wachstumskurve erstellt (Lindl T., 2008). In dieser Arbeit wurde die Zellzahl bei jeder Passage bestimmt.

#### Die vier Phasen des Wachstums einer Zellkultur (Lindl T., 2008):

- |                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>Lag-Phase</b>        | (Anlaufphase) Das Zeitintervall zwischen Aussaat und dem Erreichen der maximalen Teilungsrates. Die Zellen benötigen zunächst Zeit um am Kulturgefäß zu adhären und neue Kulturbedingungen zu schaffen.                              |
| <b>Log-Phase</b>        | (Exponentielle oder logarithmische Phase) Die Nährstoff-Bedingungen werden optimal ausgenutzt, die Zellen teilen sich in regelmäßigen Abständen. Es entsteht eine konstante, minimal lange Generationszeit.                          |
| <b>Stationäre Phase</b> | (Plateauphase) Die Zellen teilen sich nicht mehr, die Zellzahl bleibt konstant. Die Ursachen liegen im fehlenden Platzangebot (Kontakthemmung) und am Verbrauch der Nährstoffe. Die Zellen beginnen, toxische Stoffe zu produzieren. |
| <b>Absterbephase</b>    | Die Toxizität nimmt zu, die Nährstoffe sind verbraucht. Die Zellen induzieren autolytische Enzyme und gehen in Apoptose.   |

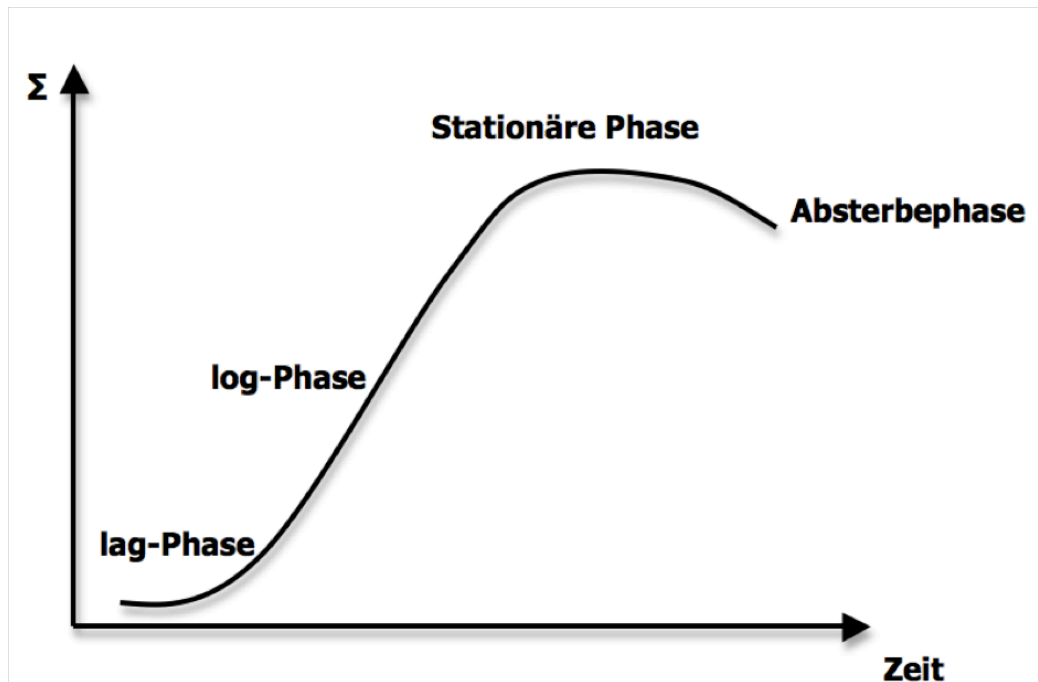


Abbildung 4-6, Wachstumskurve, schematische Darstellung

#### 4.5.6 Fixierung und Lagerung von Chamberslides

Für die immunhistochemischen Färbungen wurden die Synovialozyten aus der Zellkultur auf spezielle Objektträger gebracht. Die sogenannten Chamberslide-Objektträger sind in vier gleichgroße Kammern unterteilt. Die Synovialozyten wurden nach der unter Kultivieren und Passagieren beschriebenen Methode (4.5.4) gewonnen und ausgezählt. Anschließend wurde jede Kammer mit Hilfe einer Eppendorf Multipipette mit 1ml Nährmedium<sup>2</sup> à 20.000 Synovialozyten gefüllt. Danach wurden die Chamberslides im Begasungsbrutschrank für zwei Tage inkubiert. Während der Inkubation haben die Synovialozyten Zeit, einen Zellrasen zu kultivieren. Dieser sollte als Monolayerkultur vorliegen und nicht zu dicht besiedelt sein, um später ein überlagertes Färbeergebnis zu verhindern. Das Zellwachstum muss daher unter dem Lichtmikroskop kontrolliert werden. Sobald die Zellen in der gewünschten Konfluenz vorlagen, wurde das Medium abgeschüttet und die Kammern wurden entfernt. Anschließend wurden die Chamberslides in Färbeküvetten gestellt und zweimal für 10 Minuten in PBS gewaschen, um sie vom restlichen Medium und von Zelltrümmern zu reinigen. Nach diesem Schritt müssen die Objektträger luftgetrocknet werden. Sobald sie trocken sind, werden sie in Färbeküvetten mit einer 1:1 Mischung aus 100%igem Ethanol und Aceton für exakt 10 Minuten inkubiert. Dieser Schritt ist die eigentliche Fixierung der Zellen am Glas des Objektträgers. Nach erneutem Trocknen können die Chamberslides in Mappen mit Alufolie umwickelt bei -20°C eingefroren und so bis zu den jeweiligen Analysen gelagert werden.

## 4.6 Paraffingewebe

### 4.6.1 Aufbereitung und Einbettung

Aus der intraoperativ entnommenen Synovialmembran wurde ein circa 0,5 x 0,5cm großes Stück herausgeschnitten. Dieses wurde zur späteren Orientierung mit gleichbleibender Ausrichtung der Intimaschicht in eine Paraffinkassette eingelegt (**Abbildung 4-1**). Anschließend wurde die Paraffinkassette bei 4°C für mindestens 24h bis maximal 72h in einem Becherglas mit 4% Paraformaldehyd (PFA) inkubiert. Dabei werden die Gewebeproteine reversibel miteinander verbunden, was im Allgemeinen als Fixierung des Gewebes bezeichnet wird. Nachdem die Patientenprobe aus dem Kühlschrank geholt und für eine Stunde bei Raumtemperatur erwärmt wurde, muss die Paraffinkassette für eine weitere Stunde in einem Becherglas mit normalem Leitungswasser und RT gewässert werden. Danach folgt die Dehydrierung der Gewebeprobe in verschiedenen Ethanolbädern mit aufsteigenden Konzentrationen von 50-100% Ethanol in Aqua dest.. Dabei werden die wässrige Fixierlösung und die restliche Gewebeflüssigkeit vom Alkohol verdrängt und ausgewaschen.

Nach der Entwässerung durch Ethanol wurde das Gewebe mit Xylol getränkt (**Tabelle 4.6-1**). Xylol ist ein Isomergemisch, das zu den aromatischen Kohlenwasserstoffen gehört und somit unpolar, also lipophil und zugleich hydrophob ist. Durch diese Eigenschaft kann es als Reagens gleichermaßen mit Ethanol und dem alkoholunlöslichen Paraffin interagieren und somit als Zwischenschritt vor dem endgültigen Paraffinieren angesehen werden.

Zum Paraffinieren wurde die Paraffinkassette mit der Patientenprobe hintereinander in drei Bechergläser mit flüssigem Paraffin, die sich bei 60°C im Wärmeschrank befinden, eingelegt. Der Wechsel zwischen den drei Paraffinbädern stellt letztendlich die Reinheit des Paraffins im Gewebe sicher.

Abschließend wurde die Gewebeprobe mit Hilfe einer Pinzette aus der Paraffinkassette entnommen, in ein Ausgießschälchen gelegt und mit flüssigem Paraffin ausgegossen. Die Grundschale der Paraffinkassette wurde sodann in das flüssige Paraffin auf das Ausgießschälchen gesetzt, um nach dem Aushärten als Adapter zwischen dem Paraffinblock und dem Mikrotom zu fungieren. Nach dem Abkühlen kann das Ausgießschälchen vorsichtig entfernt und die Paraffinblöcke bei Raumtemperatur bis zu 10 Jahre lang gelagert werden.

Reagenz	Konzentration [c]	Zeit in h	Temperatur
PFA	4%	24-72	4°C
PFA	4%	1	RT
H <sub>2</sub> O	-	1	RT
Ethanol in Aqua dest.	50%	½	RT
Ethanol	70%	1	RT
Ethanol	70%	1	RT
Ethanol	80%	1	RT
Ethanol	80%	1	RT
Ethanol	96%	1	RT
Ethanol	96%	1	RT
Ethanol	100%	über Nacht	4°C
Xylol Ethanol (100%)	1:1	1	RT
Xylol		1	RT
Xylol		1	RT
Paraffin		½	37°C
Paraffin		2	37°C
Paraffin		über Nacht	37°C

Tabelle 4.6-1 Dehydrieren und Paraffinieren von Gewebe

## 4.6.2 Schneiden und Aufbringen auf die Objektträger

Um den Paraffinblock mit dem eingebetteten Synovialgewebe besser bearbeiten zu können, wurde der Block unmittelbar vor dem Schneiden auf einer Kälteplatte heruntergekühlt. Gleichzeitig wurde ein Wasserbad direkt neben dem Mikrotom auf 40°C aufgewärmt.

Die Grundscheibe der Paraffinkassette, die mit in den Paraffinblock eingegossen wurde, kann anschließend in das Rotationsmikrotom eingespannt werden. Sie dient nun als Adapter zwischen dem Paraffingewebe und dem Mikrotom. Nachdem der Block manuell in allen Ebenen parallel zur Mikrotomklinge ausgerichtet wurde, kann mit dem Trimmen gestartet werden.

Unter Trimmen versteht man das Abtragen von 10µm dicken Schichten mit Hilfe des Rotationsmikrotoms bis zur gewünschten Gewebeschicht. Danach wurde der Paraffinblock erneut heruntergekühlt, um beim Schneiden ein Einreißen des Synovialgewebes zu verhindern. In Abhängigkeit von der Temperatur zieht sich der Paraffinblock beim Herunterkühlen zusammen, und muss erneut durch wenige 10µm dicke Schnitte getrimmt werden.

Anschließend wurde behutsam mit dem eigentlichen Schneiden des Gewebes begonnen. Dabei wurde die Schnittdicke auf  $3\mu\text{m}$  reduziert, um später ein besseres Färbeergebnis zu erhalten. Der dünne Gewebeschnitt muss während des Schneidevorgangs sorgsam mit Hilfe von Pinsel und Pinzette aufgelesen und mit der Schnittfläche nach unten in das Wasserbad gelegt werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass sich das Gewebe gleichmäßig an die Wasseroberfläche anschmiegt, um ein Knicken und Falten zu verhindern. Der Gewebeschnitt wird durch das warme Wasserbad leicht ausgedehnt und kleine Mikrofalten glätten sich. Nach ca 3min sollte der Paraffinschnitt zentral auf einen Objektträger aufgetragen werden. Dazu taucht man den Objektträger unter den Schnitt ins Wasser ein und schöpft das Gewebe vorsichtig mit einer Seitwärtsbewegung aus dem Wasserbad ab.

Durch Adhäsionskräfte bleibt das Gewebe fest auf der Glasoberfläche haften. Anschließend wurde der Objektträger mit dem geschnittenen Synovialgewebe luftgetrocknet und in eine Lagerungsmappe eingelegt.

### **4.6.3 Lagerung**

Nach dem Lufttrocknen wurden die einzelnen Objektträger senkrecht in eine Trägerschaukel gestellt und über Nacht sorgfältig im Wärmeschrank bei  $60^{\circ}\text{C}$  getrocknet. Dabei muss darauf geachtet werden, dass sich die einzelnen Objektträger nicht berühren, ansonsten können sie durch ablaufendes Paraffin aneinander kleben bleiben und das Synovialgewebe wird beschädigt. Auch wenn sich etwas Paraffin verflüssigt und vom Objektträger rinnt, dient dieser Schritt ausschließlich dem vollständigen Trocknen der Schnitte, um spätere Artefakte im Gewebe zu verringern. Nach dem Trocknen wurden die Schnitte aus dem Wärmeschrank entnommen und bei RT in Objektträgermappen eingelagert.

## 4.7 Immunhistochemie (IHC)

### 4.7.1 Nachweismethoden

Die Immunhistochemie ist eine Nachweismethode für Proteine, die von den zu untersuchenden Zellen oder Geweben exprimiert werden. Dieser Nachweis erfolgt über eine Antigen-Antikörper-Reaktion. Die primären Antikörper binden an ihrem passenden Gegenspieler, den Epitopen. Findet eine solche Bindung statt, kann sie im weiteren Färbeverfahren sichtbar gemacht werden. Dabei unterscheidet man die direkte von der indirekten Nachweismethode. Bei der direkten Methode ist das Substrat, das für die Antikörperfärbung sorgt, in der Lage, direkt an den primären Antikörper zu binden. Bei der indirekten Nachweismethode sind mehrere Schritte nötig, um eine Färbung zu erhalten. Sie dienen jedoch der Signalverstärkung um bereits geringe Mengen an Epitopen nachzuweisen (Boenisch, 2003).

Der immunhistochemische Nachweis spezifischer Proteine wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der sensitiveren indirekten Methode erbracht. Antikörper können fälschlicherweise auch an unspezifischen Bindungsstellen in Geweben und Zellen binden und dabei eine nicht spezifische Färbung erzeugen. Um das zu verhindern, wurden diese Proteine vor der eigentlichen Immunreaktion mit Albuminen oder mit FBS/FCS-Lösungen blockiert. Dazu wurde der ready to use Proteinblock der Firma Dako verwendet (Dako Herstellermanual).

Im ersten Schritt der eigentlichen immunhistochemischen Färbung wurde der primäre Antikörper auf die Zellen oder das zu untersuchende Gewebe aufgetragen. In einem zweiten Schritt wurde ein sekundärer Antikörper an den Primärantikörper gekoppelt. Der sekundäre Antikörper wird seinerseits mit einem Enzym gekoppelt. Dieses Enzym sorgt im letzten Schritt, der Zugabe des Substrates, für die Farbentstehung (**Abbildung 4-7**). Die Farbentstehung kann zeitgleich unter dem Mikroskop beobachtet werden (Boenisch, 2003).

Je nach primärem Antikörper bestehen Unterschiede in der Konzentration der Arbeitslösung und den Inkubationszeiten der einzelnen Arbeitsschritte. Auch der zugehörigen sekundären Antikörper und der verwendete Isotyp variieren (**Tabelle 4.1-5, Tabelle 4.1-6**). Im Folgenden werden die immunhistochemischen Abläufe für die Zellkultur (4.7.3) und Paraffingewebeschnitte (4.7.4) erläutert.

## **4.7.2 Kontrollen**

Kontrollen geben Auskunft über die Qualität, Sensitivität und Spezifität der Färbeprozedur. Alle Kontrollen müssen wie die eigentlichen Experimente behandelt werden. Nach dem Überprüfen können die Resultate als valide angesehen werden (Boenisch, 2003).

### **4.7.2.1 Negativkontrolle**

Das gesuchte Zielprotein darf nicht enthalten sein. Nach erfolgter IHC ist zu überprüfen, ob eine Färbung entstanden ist oder nicht. Falls es trotz fehlendem Zielprotein in der Negativkontrolle zu einem Färbeergebnis gekommen ist, wird der gesamte Versuch als fehlerhaft angesehen.

### **4.7.2.2 PBS-Kontrolle**

PBS ist eine Salzlösung und enthält somit keine Proteine oder Antikörper. Damit gehört die PBS-Kontrolle strenggenommen zu den Negativkontrollen. Proben, die mit PBS versetzt werden, müssen folglich völlig neutral aus dem Versuch hervorgehen, andernfalls ist der gesamte Versuch als fehlerhaft anzusehen.

### **4.7.2.3 Positivkontrolle**

Das gesuchte Zielprotein muss sicher enthalten sein. Die Positivkontrolle kann sogar sinnvoll sein, wenn das gesuchte Protein nur sehr schwach exprimiert wird. Dadurch ist nicht nur der Nachweis an sich, sondern ebenfalls ein möglicher Sensitivitätsverlust überprüfbar (Boenisch, 2003).

### **4.7.2.4 Isotypkontrolle**

Die Isotypkontrolle wird verwendet, um eine falsch positive Reaktion zu erkennen. Als Isotyp werden die Antikörper bezeichnet, die der selben Immunglobulinklasse (IgA, IgG, IgD, IgE oder IgM) wie die des primären Antikörpers angehören. Die Immunglobuline der Kontrolle werden beim Herstellungsprozess in der gleichen Spezies generiert. Außerdem müssen beim Versuch selbst beide Antikörper in der selben Konzentration aufgetragen werden (Shapiro, 2001).

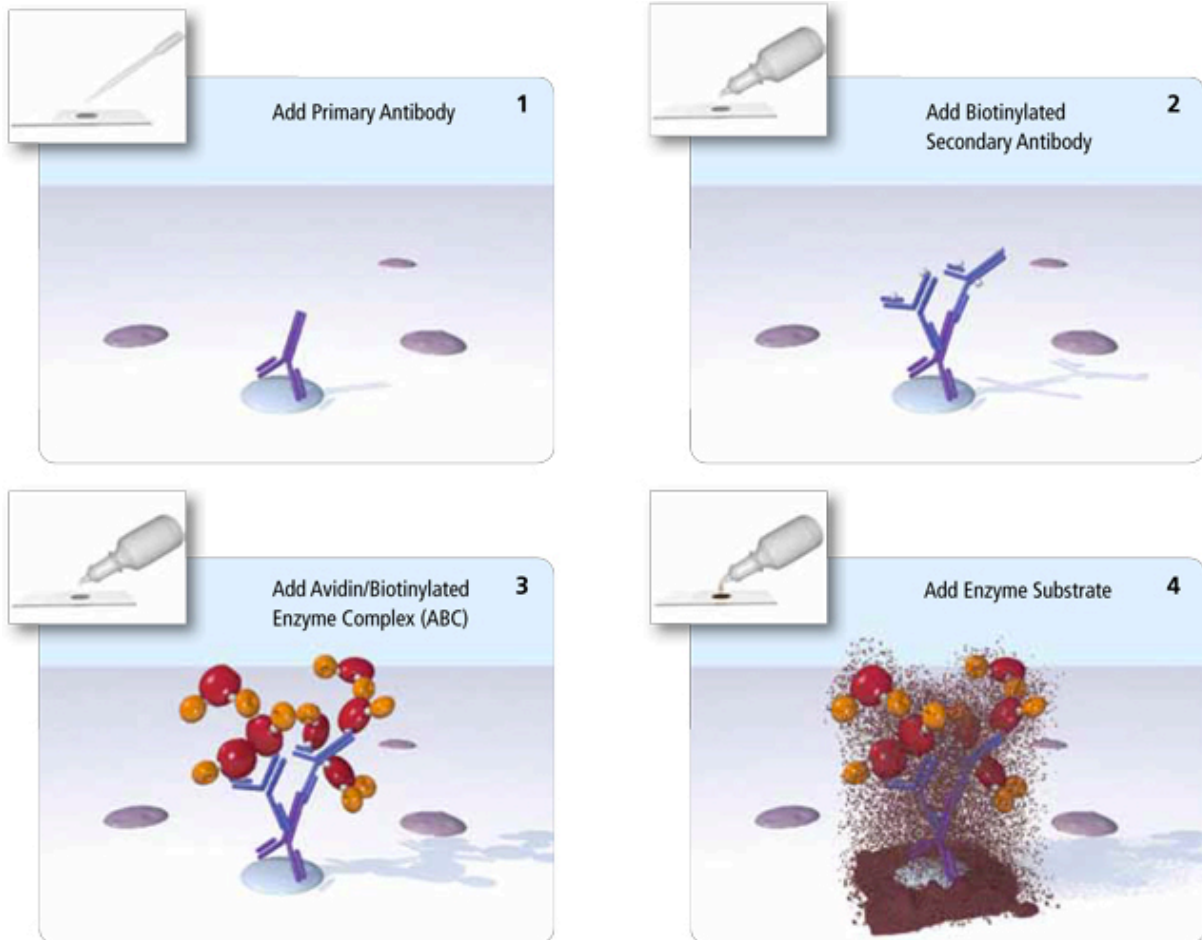
### 4.7.3 IHC von Zellen

Die Chamberslides mussten zuerst aufgetaut und getrocknet werden. Anschließend wurden die Slides für 10min in Färbeküvetten mit PBS rehydriert und, wie bei allen weiteren Inkubationsphasen, in die feuchte Kammer gelegt. Zunächst wurde der Proteinblock für 15min auf die Zellkulturen getropft. Dann wird dieser, durch vorsichtiges Ablaufenlassen, wieder entfernt. Die Arbeitslösung, die den primären Antikörper enthält, wurde umgehend mit einer Eppendorf reference Pipette in die erste und zweite Kammer des Chamberslides aufgetragen (B. Thomas, 2003). In Kammer drei folgte die Isotypkontrolle. In die vierte Kammer wurde PBS als Negativkontrolle einpipettiert. Um ein Ineinanderfließen der Reagenzien zu verhindern, wurden die Räume zwischen den einzelnen Feldern zuvor mit einem Papiertuch getrocknet und exakt 75µl Lösung pro Kammer aufgetragen. Nach der antikörperspezifischen Inkubationsphase wurden die Chamberslides für 10min in einer Färbeküvette mit PBS-Brij gewaschen. Das Waschen findet auch nach jeder weiteren Inkubationsphase statt. Im Anschluss wurden der biotinierte sekundäre Antikörper und dann der Avidin-Biotin-Complex für jeweils 30min in die Kammern pipettiert. Um die erfolgte immunhistochemische Reaktion durch Anfärben sichtbar zu machen, wurde zuletzt das AEC Enzym Substrat aufgetragen (Schematische Darstellung des Ablauf, **Abbildung 4-7**). Sobald unter dem Lichtmikroskop ein Farbumschlag zu erkennen ist, muss die Reaktion durch Einstellen der Slides in PBS gestoppt werden. Ansonsten kommt es zu einer unspezifischen Färbung (Vector Laboratories). Um einen besseren Kontrast und ein schöneres Färbbild zu erzeugen, wurde der Objektträger zur Zellkernfärbung für 2min in eine Küvette mit saurem Hämalaun nach Mayer gestellt und anschließend für 20min vorsichtig in fließendem Leitungswasser gewaschen. Die Versiegelung der gefärbten Zellen erfolgt durch das Eindeckeln mit Glyceringelatine und einem Deckglas.

pAk	Konzentration	secAk	Isotyp	pAk Zeit	AEC Zeit
<b>HBD-2</b>	1 µg/ml	Anti-Goat	Normal Goat	über Nacht	5 min
<b>HBD-3</b>	10 µg/ml	Anti-Rabbit	Normal Rabbit	über Nacht	8 min
<b>LL-37</b>	10 µg/ml	Anti-Rabbit	Normal Rabbit	über Nacht	8 min
<b>CD 68</b>	1:100	Anti-Mouse	Normal Mouse	1h	8 min
<b>HSP 27</b>	1:25	Anti-Mouse	Normal Mouse	2h	12 min
<b>Polyaminin</b>	1:200	Anti-Rabbit	Normal Rabbit	1h	12 min
<b>Vimentin</b>	1:400	Anti-Mouse	Normal Mouse	1h	8 min

Tabelle 4.7-1 Verwendete Zellkulturmarker



Abbildung 4-7 Methodischer Ablauf IHC (Vector Laboratories<sup>®</sup>)

## 4.7.4 IHC von Paraffingewebe

### 4.7.4.1 Entparaffinieren und Rehydrieren

Um die getrockneten und gelagerten Gewebeschnitte für die immunhistochemische Antikörperfärbung aufzubereiten, muss das Gewebe zuerst entparaffiniert und dann erneut rehydriert werden. Fehlerhaftes Entparaffinieren kann zu unspezifischen Bindungen des Antikörpers an Paraffinresten und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen. Das Entparaffinieren und Rehydrieren läuft in umgekehrter Reihenfolge zum Dehydrieren und Paraffinieren von Patientenmaterial ab. Wie beim Einbetten von Gewebe in Paraffin dient auch beim Entparaffinieren das Isomergemisch Xylol als unpolares Intermedium zwischen Paraffin und Ethanol. Die Schnitte wurden nacheinander in verschiedene Färbeküvetten gestellt. Zuerst entparaffiniert man die Objektträger in Xylolbädern. Anschließend wurde das Gewebe in Aqua-Ethanolbädern in absteigender Ethanolkonzentration von 100%-0% rehydriert. (**Tabelle 4.7-2**)

Reagenz	Konzentration [c]	Zeit in h	Temperatur
Xylol	rein	3 × 5min	RT
Ethanol	100%	2 × 5min	RT
Ethanol	96%	2 × 5min	RT
Ethanol	70%	2 × 5min	RT
Ethanol in Aqua dest.	50%	2 × 5min	RT
Aqua dest.	100%	2 × 5min	RT

Tabelle 4.7-2 Entparaffinieren und Rehydrieren von Gewebe

#### 4.7.4.2 Blocken der endogenen Peroxidase

Unmittelbar nach dem Rehydrieren wurde das Gewebe für 5min in Färbeküvetten mit PBS gespült. Besonders granulozyten- und erythrozytenreiche Gewebe enthalten das Enzym endogene Peroxidase. Um bei der Färbeprozedur eine unspezifische Hintergrundfärbung der endogenen Peroxidase zu verhindern, müssen die Gewebeschnitte für 20min in einer einprozentigen Wasserstoffperoxidlösung (1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) inkubiert werden. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inaktiviert die endogene Peroxidase durch eine irreversible Spaltung in Wasser und Sauerstoff. Danach wurden die Objektträger erneut für zweimal 5min in PBS gespült (Boenisch, 2003).

#### 4.7.4.3 Demaskieren der Antigene

Durch das Fixieren in PFA 4% und das Einbetten in Paraffin wurden die Proteine des Gewebes miteinander quervernetzt. Es entstehen sogenannte Cross-links. Einige Epitope verlieren dadurch ihre Eigenschaft, den Antikörper zu binden. Geht im Gewebe die Immunreaktivität verloren, spricht man von Maskierung. Die Demaskierung vor dem immunhistochemischen Färbeverfahren verstärkt somit die Färbungsintensität und ist bei bestimmten Antikörpern Voraussetzung für positive Ergebnisse. In Abhängigkeit zum Antikörper bestehen unterschiedliche Methoden, die Epitope wieder zu demaskieren und die Immunreaktivität erneut herzustellen (**Tabelle 4.7-3**) (Werner, Chott, Fabiano, & Battifora, 2000). Für die primären Antikörper HDB 2 und LL-37 zeigte sich ein ideales Färbeergebnis, nachdem das Gewebe mit Hilfe von Proteinase K demaskiert wurde. Im Falle von HBD-3 wurde das Gewebe mit Mikrowellenenergie demaskiert, um die Cross-links zu lösen. Proteinase K gehört zu den Serinproteasen und wurde ursprünglich aus dem Pilz *Tritirachium album* gewonnen. Das Enzym zeigt eine starke proteolytische Aktivität und greift Peptidbindungen an. Dadurch werden maskierte Epitope freigegeben und das Gewebe demaskiert (Ebeling et al., 1974). Die Herstellerlösung musste vor Beginn mit Aqua dest. im Verhältnis 1:1000 verdünnt werden. Diese Arbeitslösung wird auf den Gewebeschnitt pipettiert und anschließend für 25min in der feuchten Kammer inkubiert. Dann wurde der

Objektträger für 10min in PBS gespült. Um das Gewebe mit Mikrowellenenergie zu demaskieren, mussten die Schnitte in eine spezielle Citratpufferlösung mit pH6 gegeben werden. Dazu stellt man die Objektträger in eine Plastikküvette mit 100ml. Um ein schonendes, hitzeinduziertes Demaskieren zu gewährleisten, wurde die Plastikküvette in ein Becherglas mit 300ml Aqua dest. gestellt und verschlossen. Anschließend folgt die gewebespezifische, stufenweise Energieabgabe in der Mikrowelle (**Tabelle 4.7-3**). Jedes Gewebe unterscheidet sich aufgrund seiner Anatomie in Festigkeit und Robustheit. Außerdem spielt die Schichtdicke des Gewebeschnittes eine Rolle für die Hitzebeständigkeit. Nach dem hitzeinduzierten Demaskieren wurde der Gewebeschnitt für 10min in PBS gewaschen und konnte dann für die immunhistochemische Färbung verwendet werden.

Antikörper	Methode	Zeit	Temperatur
<b>LL-37</b>	Protein Kinase PK	25min	RT
<b>HBD-2</b>	Protein Kinase PK	25min	RT
<b>HBD-3</b>	Mikrowelle	5´500W 3´400W 1´350W 5´250W 5´RT	

Tabelle 4.7-3 Demaskieren der Epitope

#### 4.7.4.4 Ablauf

Die Arbeitslösung sollte umgehend mit einer Eppendorf reference Pipette aufgetragen werden. Nach der antikörperspezifischen Inkubationsphase wurde der Objektträger, wie nach jedem der folgenden Arbeitsschritte, in einer Küvette mit PBS-Brij für 10min gewaschen. Im Anschluss wurden zuerst der biotinierte sekundäre Antikörper und dann der Avidin-Biotin-Complex für jeweils 30min auf das Gewebe pipettiert. Damit die abgelaufene immunhistochemische Reaktion durch einen Farbumschlag sichtbar wird, muss zuletzt das AEC-Reagenz auf den Schnitt aufgetragen werden. Sobald dieser Farbumschlag unter dem Mikroskop zu erkennen ist, muss die Reaktion in PBS gestoppt werden. Ansonsten kann es bei weiterer Inkubation zu einer unspezifischen Färbung kommen. Ein besserer Kontrast und ein schöneres Färbepild wird erzeugt, wenn der Objektträger zur Zellkernfärbung für 2min in eine Küvette mit saurem Hämalaun nach Mayer gestellt und anschließend für 20min vorsichtig in fließendem Leitungswasser gewaschen wird. Die Versiegelung des gefärbten Gewebes erfolgte durch Eindeckeln mit Glyceringelatine und einem Deckglas.

pAk	Konzentration	secAk 30min	Isotyp	pAk Zeit	AEC Zeit
<b>HDB-2</b>	1 µg/ml	Anti-Goat	Normal Goat	Over Night	5 min
<b>HBD-3</b>	10 µg/ml	Anti-Rabbit	Normal Rabbit	Over Night	8 min
<b>LL-37</b>	10 µg/ml	Anti-Rabbit	Normal Rabbit	Over Night	8 min

Tabelle 4.7-4 Verwendete Paraffinmarker

## 4.8 Semiquantitative Analyse

Da es sich bei den immunhistochemisch gefärbten Proteinen um eine indirekte Nachweismethode handelt, die ausgewertet und verglichen wurde, muss eine gleichbleibende und wiederholbare Bewertung der Ergebnisse garantiert werden. Bis zur Einführung des Immunreaktiven Score 1987 war ein einheitliches System nicht verfügbar. So wurden in damaligen Studien immer wieder eigene Scoring-Systeme erschaffen, was zu unterschiedlichsten Werten führte. Für die einheitliche Formulierung des immunhistochemischen Untersuchungsbefundes sind heutzutage zwei Scoring-Systeme gebräuchlich. Der Immunreaktive Score nach Remmele und Stegner (IRS) (Remmele & Stegner, 1987) sowie der Total Score nach Allred (TS) (Allred et al., 1998). Die Objektivierung und die schematische Beurteilung der Färberegebnisse resultieren in einer semiquantitativen Analyse mit valider statistischer Vergleichbarkeit der Resultate.

### 4.8.1 Scores

In dieser Arbeit wurden die immunhistochemischen Ergebnisse mit dem IRS und dem TS quantitativ messbar gemacht und anschließend statistisch ausgewertet. Beide Scores beziehen sowohl die Färbeintensität als auch die Anzahl der gefärbten Zellen in die Berechnung mit ein. Die Färbeintensität wird Staining Intensity (SI) genannt und mit 0 Punkten für keine Färbung sowie mit bis zu 3 Punkten für eine starke Färbung bewertet. Die Anzahl der positiv gefärbten Zellen wird jeweils in Prozent angegeben. Diese Prozentangaben und auch die Berechnung des Endergebnisses sind bei IRS und TS jeweils unterschiedlich. Zusammengefasst legt der IRS eine größere Gewichtung auf die Anzahl positiv gefärbter Zellen, der TS auf die Färbeintensität selbst. Erst die Durchführung beider Analysen gibt ein umfassendes Bild über den zu analysierenden Zielproteingehalt.

#### 4.8.1.1 Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner

Der IRS nach Remmele und Stegner wurde 1987 zunächst für die Erkennung von immunhistochemisch gefärbten Östrogenrezeptoren in Mammakarzinomen entwickelt (Remmele & Stegner, 1987). Eine ebenso große Bedeutung hat der IRS bei der Auswertung von Neuroendothelialen Tumoren (NET). Zur Berechnung des IRS wird der Prozentsatz positiver Zellen (PP) in einen Punktwert übertragen und anschließend mit der Färbeintensität (SI) multipliziert. Das Produkt ergibt den Immunreaktiven Score. 
$$\text{IRS} = \text{SI} \times \text{PP}$$

Es sind Werte von 0 – 12 Punkten möglich. Wird ein Schwellenwert von 10% positiver Anteile zugrunde gelegt, ergibt sich für den IRS ein Cut-off von  $\geq 2$ . Das heißt, der IRS wird

von 0-2 Punkten als negativ und von 3-12 Punkten als positiv gewertet (In **Tabelle 4.8-1** grau hinterlegt). In einer vergleichenden Arbeit von Kämmerer 2012 erwiesen sich die IRS Klassifizierung für Östrogenrezeptoren und der neue HER2-Score als statistisch vergleichbar (Kaemmerer et al., 2012). Dies lässt Rückschlüsse auf die Genauigkeit des Immunreaktiven Scores nach Remmele und Stegner zu.

#### 4.8.1.2 Total Score nach Allred

1998 entwickelte Allred den international anerkannten Total Score (TS) (Allred et al., 1998). Zur Berechnung des TS wird der Anteil positiver Zellen (Proportion Score: PS) ebenfalls in einen Punktwerte übertragen und anschließend mit der Färbeintensität addiert. Die Summe ergibt den Total Score.  $TS = SI + PS$

Somit sind Werte von 0 – 8 Punkten möglich. Wird ein Schwellenwert von 10% positiver Anteile zugrunde gelegt, ergibt sich für den Allred-Score ebenfalls ein Cut-off von  $\geq 2$ . Das heißt der TS wird von 0-2 Punkten als negativ und von 3-8 Punkten als positiv gewertet (In **Tabelle 4.8-1** grau hinterlegt).

Score	Angefärbte Zellen	Staining Intensity (SI) Färbeintensität in Punkten			
<b>IRS</b>	<b>PP / PS</b>	<b>keine = 0</b>	<b>schwach = 1</b>	<b>mäßig = 2</b>	<b>stark = 3</b>
	<b>keine = 0</b>	0	0	0	0
	<b>&lt;10% = 1</b>	0	1	2	3
	<b>10-50% = 2</b>	0	2	4	6
	<b>51-80% = 3</b>	0	3	6	9
	<b>&gt;80% = 4</b>	0	4	8	12
<b>TS</b>	<b>keine = 0</b>	0	0	0	0
	<b>0-<sup>1</sup>/<sub>100</sub> = 1</b>	0	2	3	4
	<b><sup>1</sup>/<sub>100</sub> - <sup>1</sup>/<sub>10</sub> = 2</b>	0	3	4	5
	<b><sup>1</sup>/<sub>10</sub> - <sup>1</sup>/<sub>3</sub> = 3</b>	0	4	5	6
	<b><sup>1</sup>/<sub>3</sub> - <sup>2</sup>/<sub>3</sub> = 4</b>	0	5	6	7
	<b><sup>2</sup>/<sub>3</sub> - <sup>3</sup>/<sub>3</sub> = 5</b>	0	6	7	8

Tabelle 4.8-1 Berechnungstabelle IRS und TS

### **4.8.2 Auszählen am Mikroskop**

Die immunhistochemisch gefärbten Monolayerkulturen auf Zellkulturschnitten (Chamberslides) und alle Gewebeschnitte wurden mikroskopisch, mit Hilfe eines Zeiss Observer Z1, in zehnfacher Vergrößerung analysiert. Pro Patient und Antikörper wurden dabei fünf repräsentative Chamberslides bzw. Gewebeschnitte mit jeweils drei repräsentativen Gesichtsfeldausschnitten aus unterschiedlichen Regionen zu je 100 Zellen ausgezählt. Dadurch ist eine objektive Prozentangabe gefärbter Zellen und somit eine neutrale Punktevergabe für den Immunreaktiven Score und den Total Score gewährleistet. Für die Bewertung der Färbeintensität wurde bereits im Vorfeld ein Schema mit Vergleichsbildern erstellt, um eine gleichbleibende Punkteinteilung zu garantieren. Um die jeweiligen Ergebnisse zu dokumentieren, wurden sie in ein Auswertungsblatt und in eine Tabelle zur statistischen Berechnung übertragen.

### **4.8.3 Bilddokumentation**

Bei einer semiquantitativen Auswertung am Mikroskop, als Grundlage für diese wissenschaftliche Arbeit, bedarf es einer strukturierten und umfangreichen Bilddokumentation. Deswegen wurde während der Auswertung darauf geachtet, stets repräsentatives Bildmaterial anzufertigen und systematisch digital zu katalogisieren.

## **4.9 Statistik**

Die statistische Auswertung für Zellkultur und Paraffingewebe erfolgte in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der Technischen Universität München (Dr. rer. nat. Alexander Hapfelmeier, Dipl.-Stat.). Nach der immunhistochemischen Färbung und den semiquantitativen Analysen wurden die Ergebnisse der unter 5.1 beschriebenen Gruppen (Primäre TEP, aseptische Lockerung und septische Lockerung) mit dem Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test verglichen. Zusätzlich wurde für die Ergebnisse der Paraffingewebe die diagnostische Güte zur Erkennung des vorhandenen PPI bestimmt. 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.

### 4.9.1 Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test und p-Wert

Der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test wird bei kleineren Gruppenkollektiven angewendet, um zu untersuchen, ob sich zwei Gruppen hinsichtlich eines Merkmals signifikant unterscheiden. Der Test berechnet die Differenzen der beiden Beobachtungen und bringt die Absolutwerte in eine Rangfolge. Bei jedem Test wird eine Nullhypothese und deren Alternativhypothese aufgestellt. Die Nullhypothese besagt, dass der Median der errechneten Differenzen Null ist. Das heißt 50% der Differenzwerte sind größer und 50% sind kleiner als Null. Weicht der Median dieser Differenzen signifikant von Null ab, kann daraus geschlossen werden, dass die Verteilung nicht symmetrisch ist. In diesem Fall liegt ein Unterschied zwischen den Gruppen bezüglich des untersuchten Merkmals vor (Jürgen Bortz, 2008). Bei statistischen Tests wird vor der Auswertung das Signifikanzniveau bestimmt. Meistens wird es auf 1% und 5% festgelegt. Während das Signifikanzniveau die Wahrscheinlichkeit beinhaltet für welche die Hypothese akzeptiert werden soll, so weist der p-Wert die vorliegende Wahrscheinlichkeit für das Verwerfen der Hypothese aus. Die Nullhypothese wird dann abgelehnt, wenn der p-Wert kleiner als das festgelegte Signifikanzniveau ist (Eckey, 2005.). Somit wird die Alternativhypothese angenommen. Der p-Wert ist ein Maß für statistische Beweise. Unter Verwendung des p-Wertes erzielt man stets die gleiche Testentscheidung. Ein weiterer Vorteil des p-Wertes besteht darin, dass sofort bestimmt werden kann, ob ein Ergebnis signifikant ist oder nicht.

### 4.9.2 Statistische Auswertung der Zellkultur

Für die Methode der Zellkultur wurden die Gruppen jeweils im Stadium ihrer niedrigen Passage und ihrer hohe Passage ausgewertet. Zur besseren Übersicht wurden sie mit einer eigenen Ziffern bezeichnet (Ziffer 1-3 Paraffingewebe, Ziffer 4-9 Zellkultur).

Bezeichnung	Beschreibung	Gruppe
4	Primäre Implantation, niedrige Passage	pTEP
5	Primäre Implantation, hohe Passage	PTEP
6	Aseptische Lockerung, niedrige Passage	Aseptisch
7	Aseptische Lockerung, hohe Passage	Aseptisch
8	Septische Lockerung, niedrige Passage	Septisch
9	Septische Lockerung, hohe Passage	Septisch

Tabelle 4.9-1 Bezeichnung für die statistische Auswertung der Zellkultur

Folgende Gruppen aus der Zellkultur wurden miteinander verglichen:

Bezeichnung	Statistischer Vergleich
4, 6, 8	Niedrige Passagen der Gruppen untereinander
5, 7, 9	Hohe Passagen der Gruppen untereinander
4, 5	pTEP, niedrige gegen hohe Passage
6, 7	Aseptisch, niedrige gegen hohe Passage
8, 9	Septisch, niedrige gegen hohe Passage
<b>4+5, 6+7, 8+9</b>	<b>Gruppen untereinander</b>

Tabelle 4.9-2 Statistischer Vergleich von Zellkulturen

### 4.9.3 Statistische Auswertung von Paraffingewebe

Das intraoperativ entnommene Gewebe der einzelnen Gruppen wurde ebenfalls mit einer eigenen Ziffer bezeichnet, untereinander verglichen und statistisch ausgewertet.

Bezeichnung	Beschreibung entspricht Gruppe
1	Primäre Implantation
2	Aseptische Lockerung, kein Keimnachweis
3	Septische Lockerung mit Keimnachweis

Tabelle 4.9-3 Bezeichnung für die statistische Auswertung von Paraffingewebe

Bezeichnung	Statistischer Vergleich
1 bis 3	Gruppen untereinander

Tabelle 4.9-4 Statistischer Vergleich von Paraffingewebe

### 4.9.4 Diagnostische Güte

Die Berechnung der diagnostischen Güte erfolgte wie ausführlich bei der Synoviaanalyse von AMPs beschrieben (Gollwitzer et al., 2013). Zusammengefasst wurde zunächst die Grenzwertoptimierungskurve (*Receiver operating characteristic curve, ROC-Kurve*) angefertigt. In einem Diagramm wurde dann die Sensitivität als Abszisse (x-Achse) gegen 1- die Spezifität als Ordinate (y-Achse) aufgetragen. Anschließend wurde die darunterliegende Fläche (Area under the curve, AUC) berechnet. Der AUC-Wert kann dabei in einem Bereich von 0,5 bis 1 liegen. Besitzt ein Test eine AUC von 0,5, so entspricht dies der diagnostischen Güte einer zufälligen Entscheidung und kommt einem Münzwurf gleich. Ein Test mit einem AUC-Wert von 0,9 und höher besitzt hingegen eine exzellente diagnostische Güte.



## 5 Ergebnisse

### 5.1 Patientenkollektiv

25 prospektiv und konsekutiv entnommene Gewebeproben von KTEP- und HTEP-Patienten erfüllten nach den postoperativen Kontrollen die Einschlusskriterien. Dabei wurden acht Patienten in die Gruppe *Primäre TEP*, neun Patienten in die Gruppe *Aseptische Lockerung* und acht Patienten in die Gruppe *Septische Lockerung* eingeschlossen.

Zwei weitere Patientengewebe wurden anhand des intraoperativen gramnegativen Keimnachweis als Positivkontrolle für HBD-2 weiter verarbeitet. Eine Gewebeprobe wurde ausgeschlossen da es aufgrund einer mechanischen Komplikation mit Lockerung zu einem Prothesenwechsel kam und der Patient zusätzlich von einer septischen Revision in der Vergangenheit berichtete.

Der jüngste Proband war zum Zeitpunkt der Operation 52 Jahre, der älteste 82 Jahre alt. Das mittlere Alter lag somit bei  $67 \pm 15$  Jahren. Das durchschnittliche Alter der Primärimplantationen betrug 70 Jahre, das der aseptischen Revisions-TEPs 73 Jahre und das der septischen Revisions-TEPs 70 Jahre (**Tabelle 5.1-1**). Mit einem Verhältnis von 13 zu 12 waren unwesentlich mehr Männer als Frauen in der Studie vertreten. Bei 16 der 25 Patienten wurde eine HTEP, bei 9 eine KTEP implantiert. Dabei fielen auf die Gruppe der Primärimplantation sechs HTEPs und zwei KTEPs, auf die aseptische Lockerung sechs HTEPs und drei KTEPs und auf die septische Lockerung vier HTEPs und vier KTEPs.

	<b>Primäre TEP</b>	<b>Aseptische Lockerung</b>	<b>Septische Lockerung</b>
<b>Insgesamt</b>	8	9	8
<b>Alter</b>	Ø 70 Jahre	Ø 73 Jahre	Ø 70 Jahre
<b>Männer</b>	5	5	3
<b>Frauen</b>	3	4	5
<b>HTEP</b>	6	6	4
<b>KTEP</b>	2	3	4

Tabelle 5.1-1 Anzahl und Verteilung der Probanden

## 5.2 Zellkultur

### 5.2.1 Wachstumseigenschaften

Bei der Analyse von Zellkulturen ist es wichtig, die Wachstumseigenschaften zu überprüfen, um auf Veränderungen reagieren zu können. Dabei werden die Wachstumsraten in Prozent angegeben und beschreiben das Wachstum zwischen zwei Zellzahlbestimmungen. In dieser Arbeit wurden die Zellzahlen der einzelnen Patientenkollektive in jeder Passage bestimmt. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Kollektiven. Allerdings war von Passage zu Passage eine Abnahme der Wachstumsrate und somit der Geschwindigkeit des Wachstums zu erkennen. Dies verhielt sich in allen Kollektiven identisch.

Wachstumsraten	P0 → P1	P1 → P2	P2 → P3
Primäre TEP	1,68 68%	1,28 28%	1,19 19%
Aseptische Lockerung	1,78 78%	1,45 45%	1,20 20%
Septische Lockerung	1,69 69%	1,40 40%	1,31 31%

Tabelle 5.2-1 Wachstumsraten der einzelnen Patientenkollektive (Gruppen)

Bei der in-vitro-Aufzucht von Zellen in Kultur sollte das Passagieren optimalerweise in der Endphase des maximalen Wachstums (log-Phase) hinein in die stationäre Phase erfolgen. Die Abbildungen auf Seite 65 zeigen die Wachstumskurven der einzelnen Patientenkollektive dieser Arbeit (pTEP, aseptische- und septische Lockerung). Dabei ist gut zu erkennen, dass die verwendeten Zellen in der optimalen Phase passagiert wurden. Daher ähneln sich die Wachstumskurven sehr und sind fast identisch.

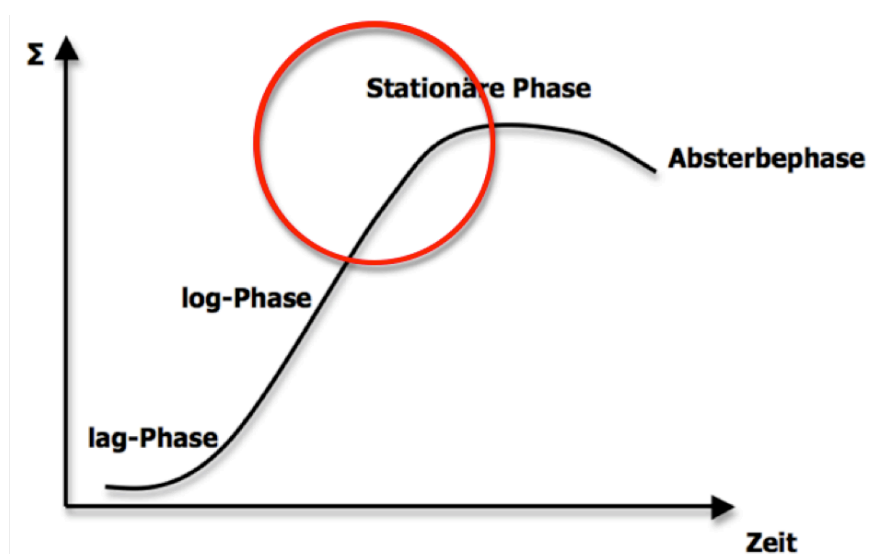


Abbildung 5-1 Schematische Darstellung des optimalen Abschnittes einer in vitro Wachstumskurve

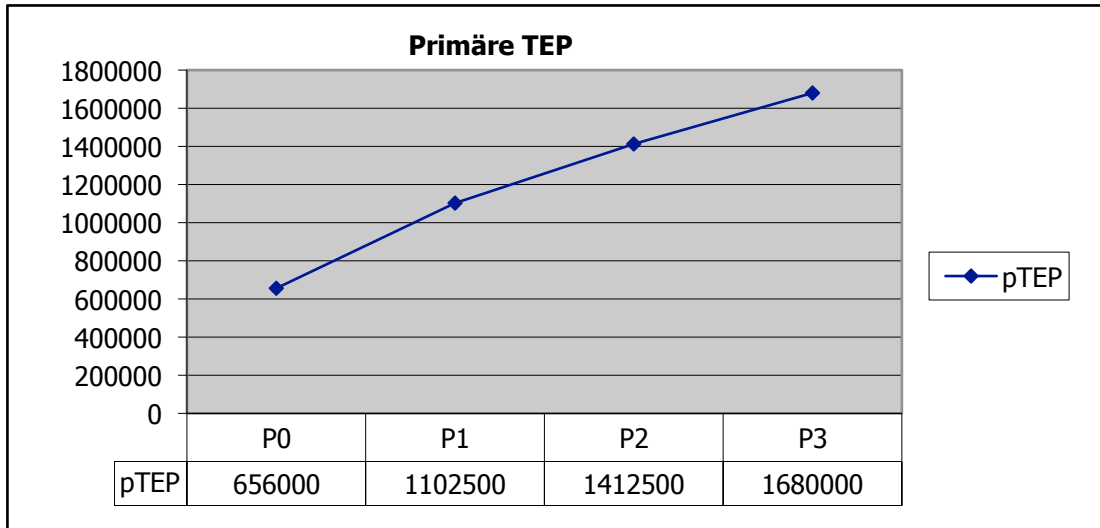


Abbildung 5-2 Wachstumskurve, Primäre TEP

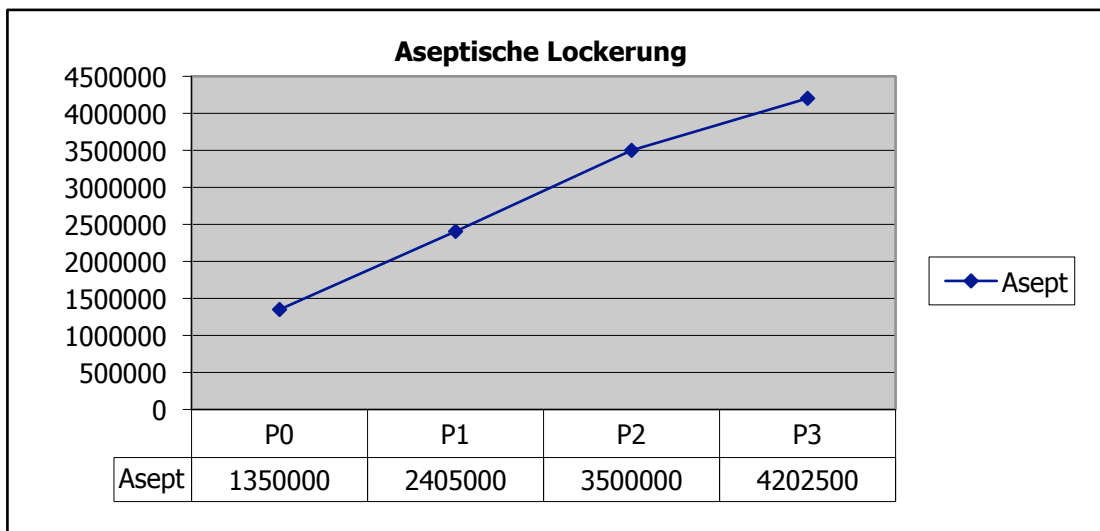


Abbildung 5-3 Wachstumskurve, Aseptische Lockerung

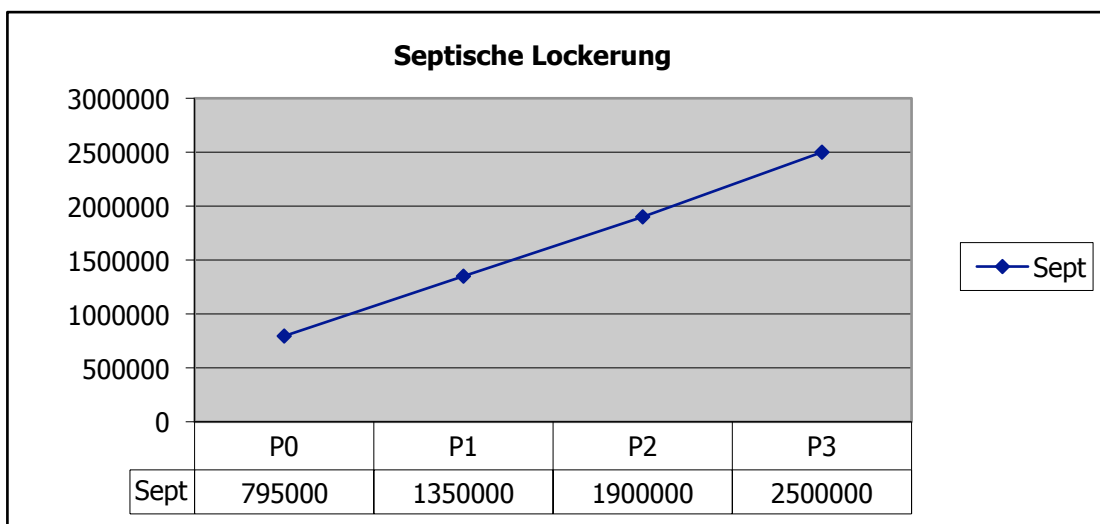


Abbildung 5-4 Wachstumskurve, Septische Lockerung

## 5.2.2 Versuchskontrollen der Zellkulturen

Wie unter Punkt 4.7.3 (IHC von Zellen) beschrieben, wurden die ersten beiden Kammern des Chamberslides mit dem primären Antikörper inkubiert. Zugleich wird in Kammer drei die Isotypkontrolle und in Kammer vier die Negativkontrolle aufgetragen.

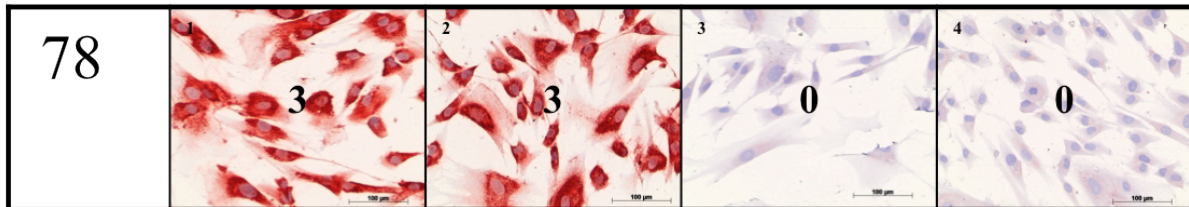


Abbildung 5-5 pAK (Kammer 1+2), Isotypkontrolle Kammer 3, PBS-Kontrolle Kammer 4

Bei der Etablierung der Methode sowie dem Austesten und Festlegen der jeweiligen Antikörperkonzentration wurde darauf geachtet, dass es in Kammer eins und zwei zu einer spezifischen Anfärbung der Zellen ohne Hintergrundfärbung kam. In den Kammern drei und vier durfte es zu keiner Färbung kommen.

## 5.2.3 Synovialozytenidentifikation

Um sicher zu stellen, dass bei den Experimenten mit dem richtigen Zielgewebe und somit mit dem gewünschten Zelltyp gearbeitet wird, wurden die Proben in Zellkultur gebracht und durch typische Marker für Synovialozyten identifiziert.

Die Marker Laminin (**Abbildung 5-6**), Vimentin (**Abbildung 5-7**), HSP 27 (**Abbildung 5-8**) und CD 68 (**Abbildung 5-9**) hinterlassen ein sehr spezifisches Färbemuster und charakterisieren in ihrer Zusammenschau die Synovialozyten. Laminin zeichnet sich durch einen gut gefärbten perinukleären Zellkörper aus, in dem randständig ein auffälliger Granulasaum zu erkennen ist. Die Zellausläufer bleiben hingegen ungefärbt. Vimentin verfärbt die gesamte Zelle rotbräunlich. Der Zellkörper ist durch stärker gefärbte Fasern, welche vom Zellkern weglaufen, gekennzeichnet. Auch bei HSP 27 ist die gesamte Zelle, wenn auch in den Ausläufern, etwas verblasst angefärbt. Des Weiteren sind einzelne Granula zu erkennen. CD 68 zeigt eine deutliche perinukleäre Granulaanfärbung bei ansonsten ungefärbter Zelle. Ein direkter Vergleich des Färbemusters war mit Hilfe der immortalisierten Synovialozytenzelllinie K4IM und durch Bilder aus der aktuellen Literatur realisierbar.

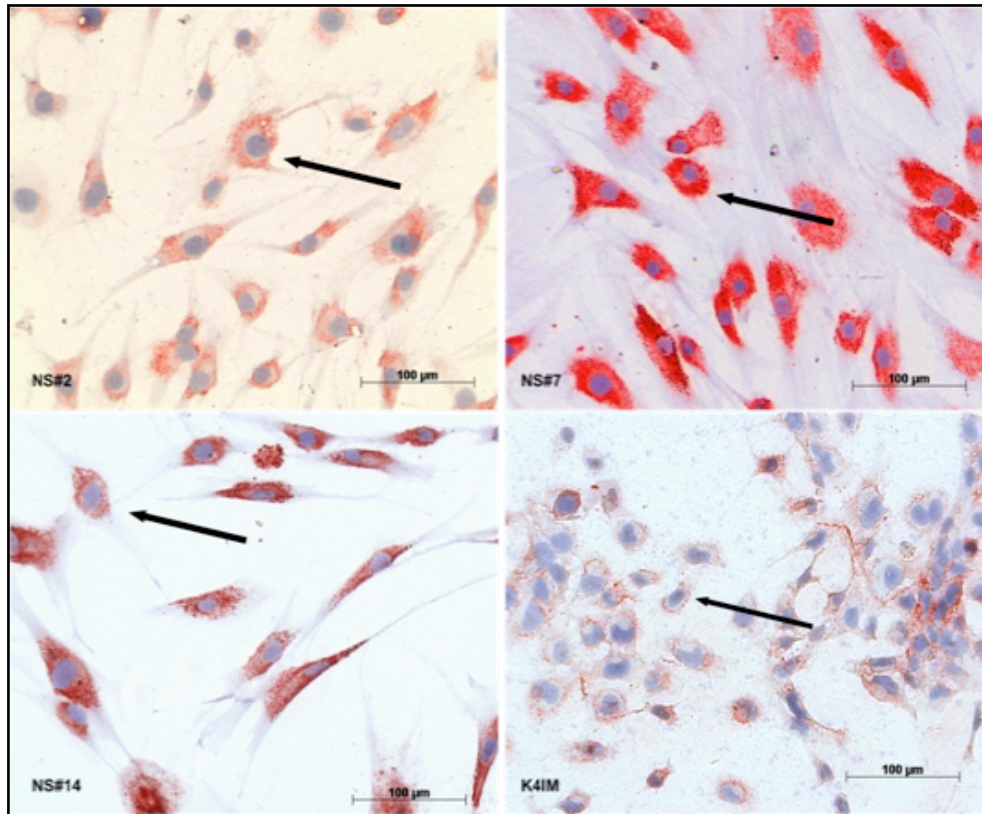


Abbildung 5-6 Spezifisches Laminin-Färbemuster; primäre Implantation, aseptische- und septische Lockerung und K4IM

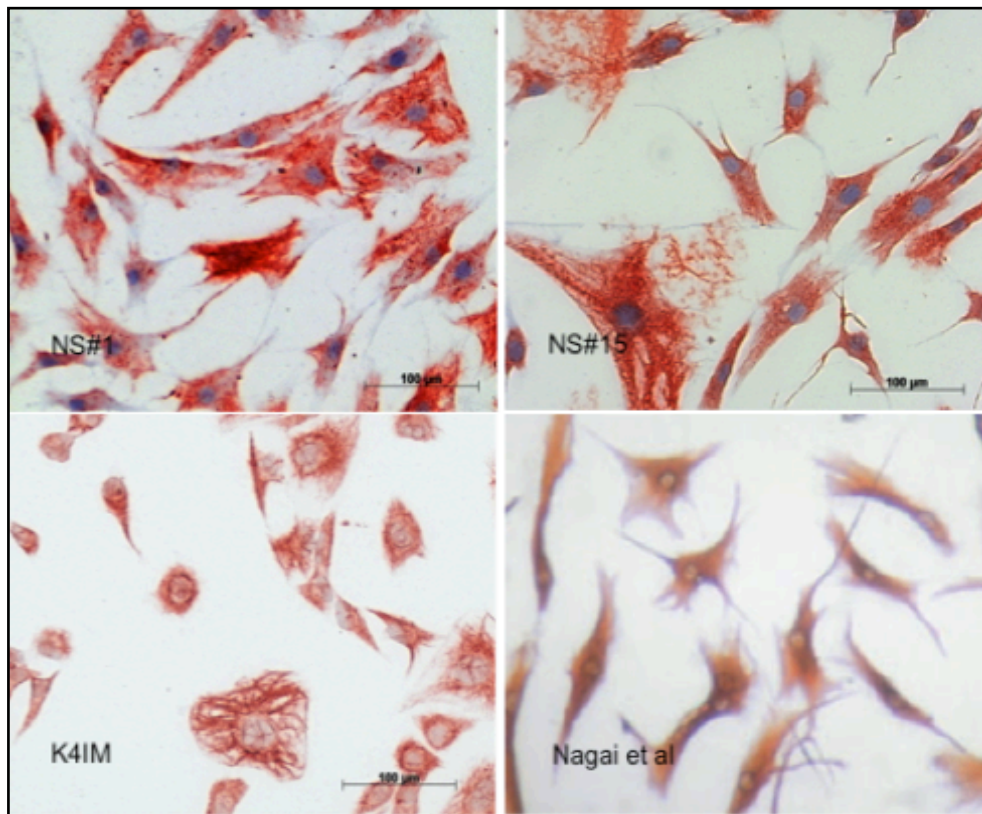


Abbildung 5-7 Spezifisches Vimentin-Färbemuster; primäre Implantation und septische Lockerung, K4IM und Nagai et al



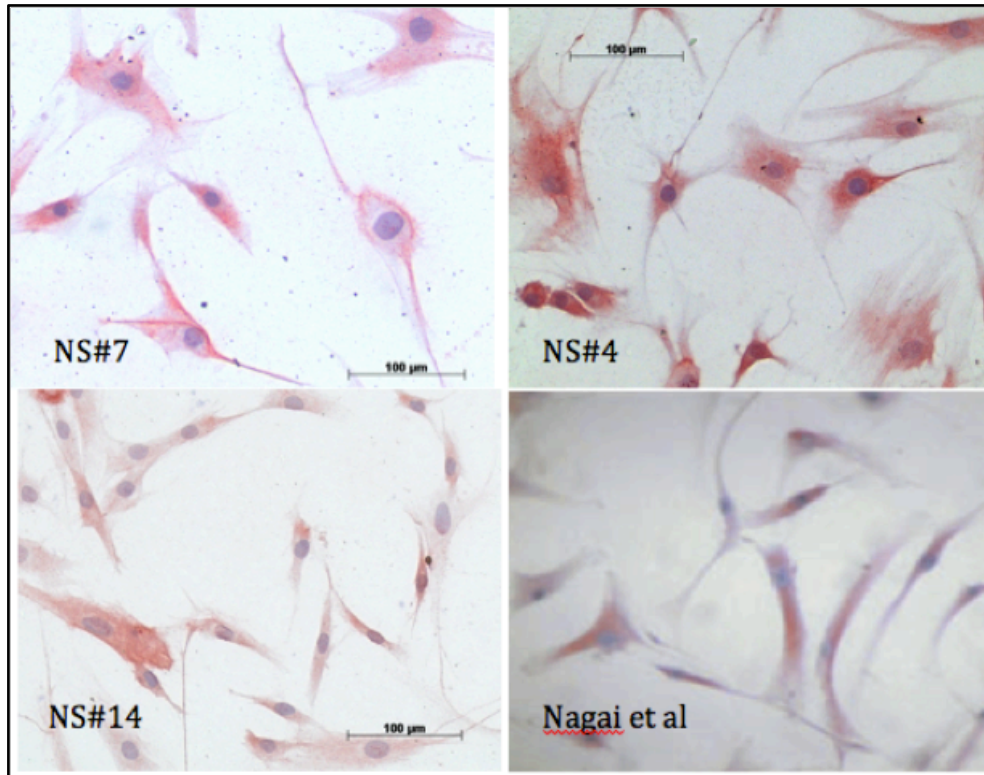


Abbildung 5-8 Spezifisches HSP 27 Färbemuster; primäre Implantation, aseptische- und septische Lockerung, Nagai et al

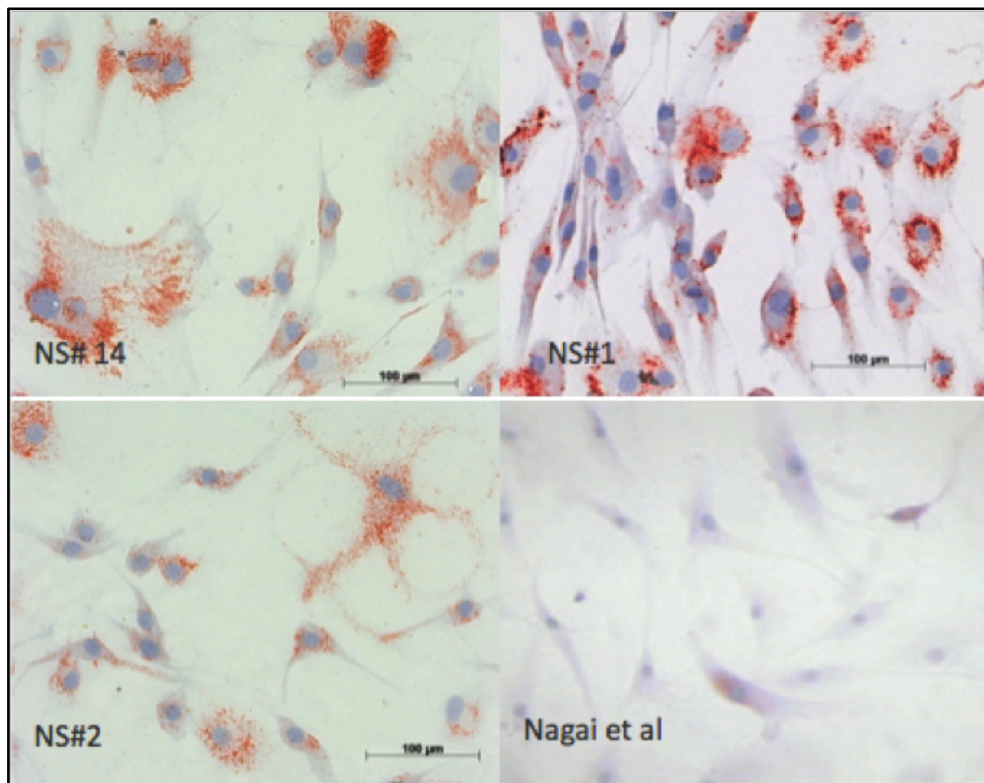


Abbildung 5-9 Spezifisches CD 68 Färbemuster; primäre Implantation und septische Lockerung, Nagai et al

## 5.2.4 HBD-2

Die immunhistochemischen HBD-2-Ergebnisse der Synovialozyten-Zellkulturen wurden für die Kollektive **pTEP, aseptische und septische Lockerung** mit Hilfe des Immunreaktiven Score nach Remmele und Steger (IRS) sowie des Total Score nach Allred (TS) ausgewertet. Dazu wurden Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) sowie der Median berechnet. Der Median wird in den folgenden Diagrammen als roter Balken dargestellt. Die Ergebnisse der niedrigen Passagen (P↓) und der hohen Passagen (P↑) wurden zusammengefasst.

HBD-2		pTEP			Aseptische -			Septische Lockerung		
		P↓	P↑	gesamt	P↓	P↑	gesamt	P↓	P↑	gesamt
MW ± SD	IRS	2,43 ± 1,06	2,90 ± 1,47	2,67 ± 1,25	1,44 ± 1,56	2,00 ± 1,79	1,72 ± 1,67	1,56 ± 1,19	2,48 ± 1,51	2,02 ± 1,35
	TS	3,93 ± 1,48	4,57 ± 2,27	4,25 ± 1,87	2,48 ± 2,32	3,16 ± 2,65	2,82 ± 2,48	2,56 ± 1,85	3,92 ± 2,37	3,24 ± 2,11
Median	IRS	-	-	2,90	-	-	1,30	-	-	2,30
	TS	-	-	4,80	-	-	2,60	-	-	3,70

Tabelle 5.2-2 HBD-2 Zellkultur Auswertung. P↓= niedrige Passage, P↑= hohe Passage.

Bei der Gegenüberstellung der HBD-2-Ergebnisse der Gruppen pTEP und aseptische Lockerung ergab sich bei IRS und TS kein signifikanter Unterschied in der HBD-2-Expression. Auch beim Vergleich der Gruppen pTEP und septische Lockerung zeigte sich kein signifikanter Unterschied. Anschließend wurden die Gruppen aseptische und septische Lockerung gegenübergestellt. Hier konnte ebenfalls kein signifikanter Unterschied in der HBD-2-Expression gezeigt werden.

Die entnommenen Zellen der Gruppen pTEP und aseptische Lockerung hatten keine Interaktion mit Keimen. Die Zellen der Gruppe septische Lockerung waren ausschließlich mit grampositiven Staphylokokken konfrontiert. Gegenüber grampositiven Bakterien kommt es nur zu einer sehr geringen HBD-2-Expression. Bei Geweben, die keinen Kontakt zu Keimen haben, wird lediglich eine basale Menge an HBD-2 gebildet. (Harder & Schroder, 2005). Somit konnten die HBD-2-Ergebnisse der Zellkulturversuche belegen, dass es auch bei der HBD-2-Expression in Synovialmembranen von primären Implantationen und in periprothetischen Membranen bei aseptischer und septischer Lockerung mit grampositivem Keimnachweis zu keiner signifikanten Erhöhung kommt.

HBD-2	Score	pTEP vs. Asept.	pTEP vs. Sept.	Asept. Vs. Sept.
p-Wert	IRS	0,273	0,232	0,725
	TS	0,260	0,232	0,725

Tabelle 5.2-3 HBD-2 Zellkultur, p-Werte beim Vergleich der Gruppen

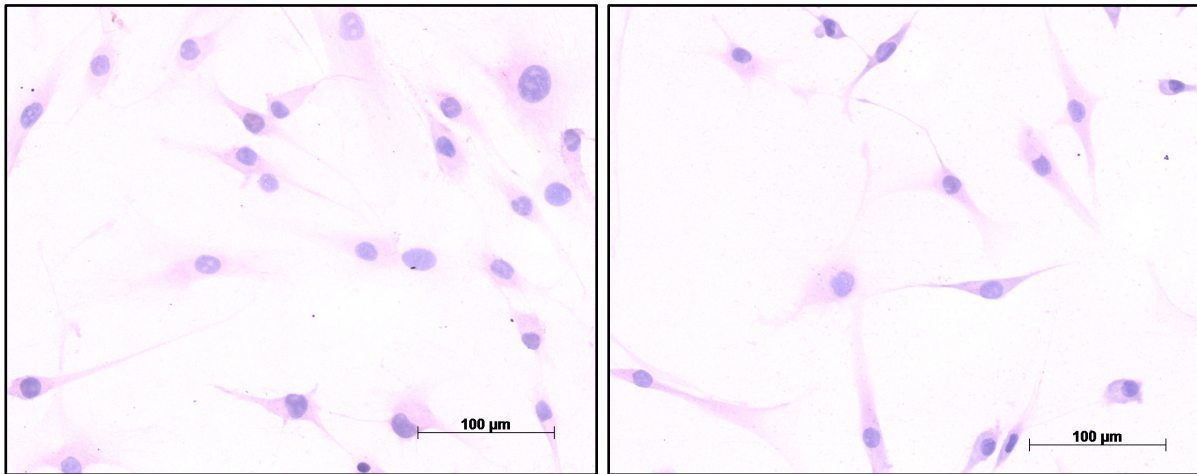


Abbildung 5-10 Zellkultur HBD-2 primäre TEP

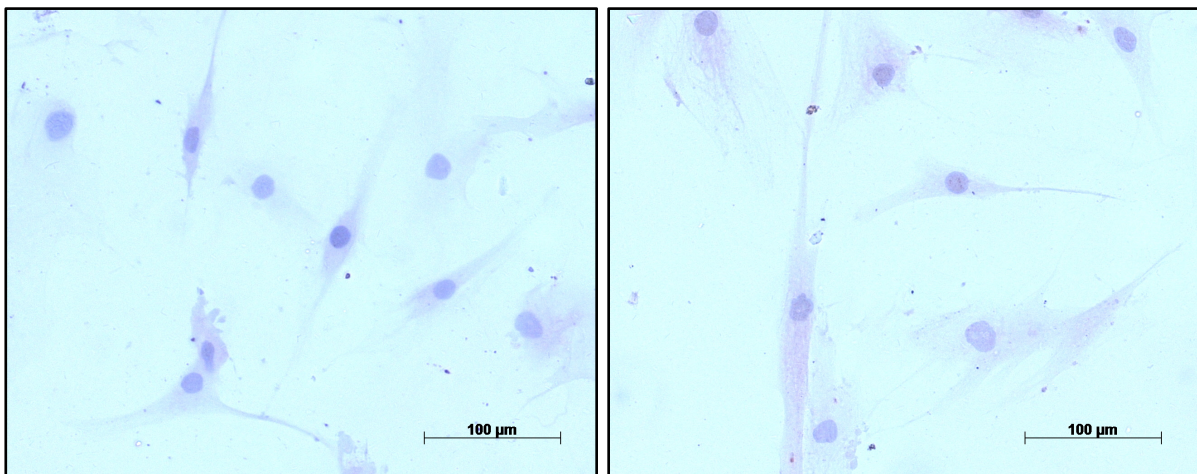


Abbildung 5-11 Zellkultur HBD-2 aseptische Lockerung

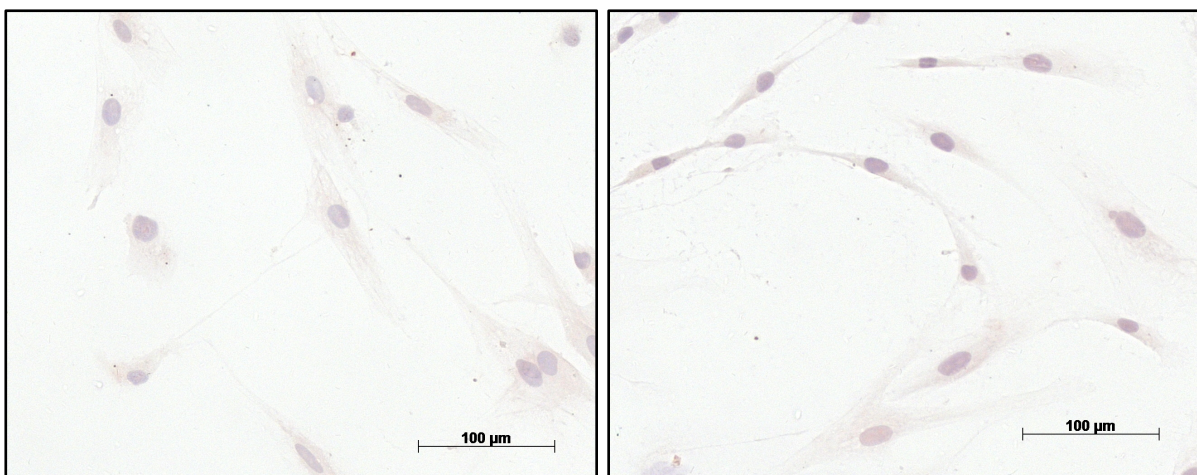


Abbildung 5-12 Zellkultur HBD-2 septische Lockerung



### 5.2.4.1 Immunreaktiver Score

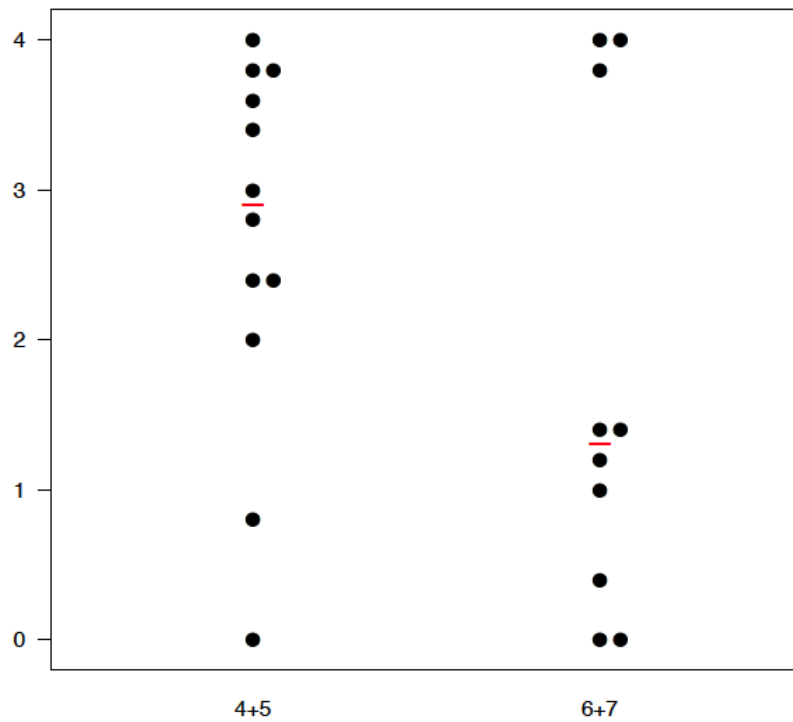


Abbildung 5-13 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p=0,273$

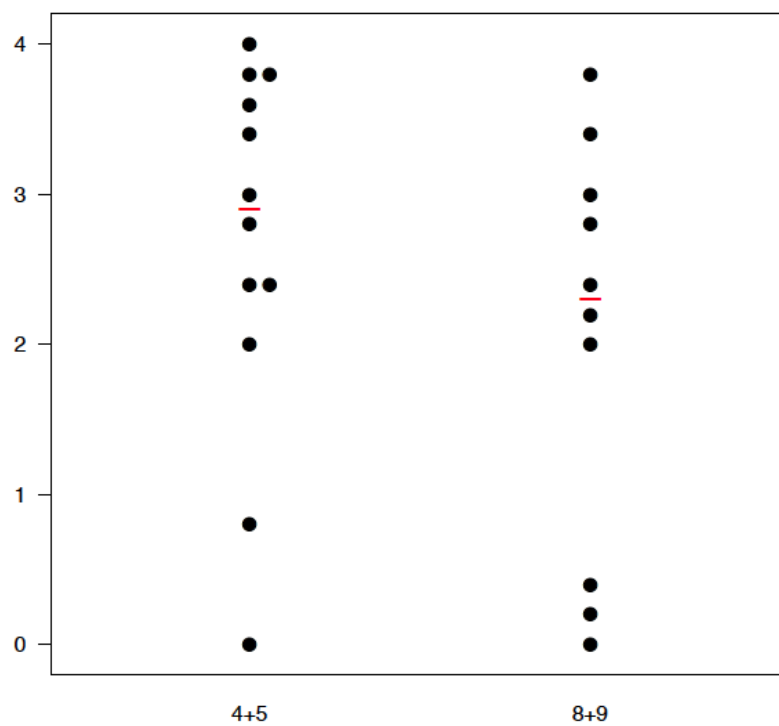


Abbildung 5-14 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p=0,232$

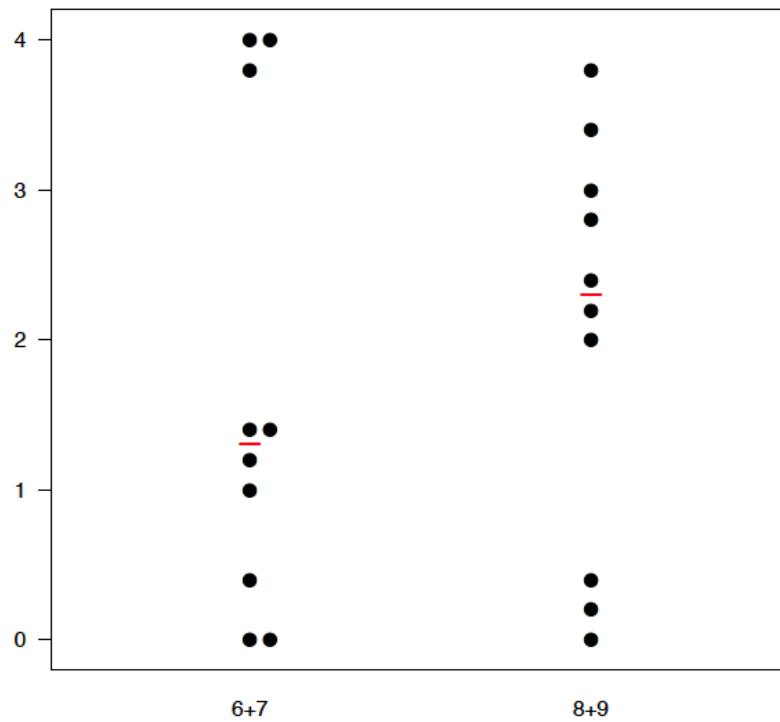


Abbildung 5-15 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p=0,725$

### 5.2.4.2 Total Score

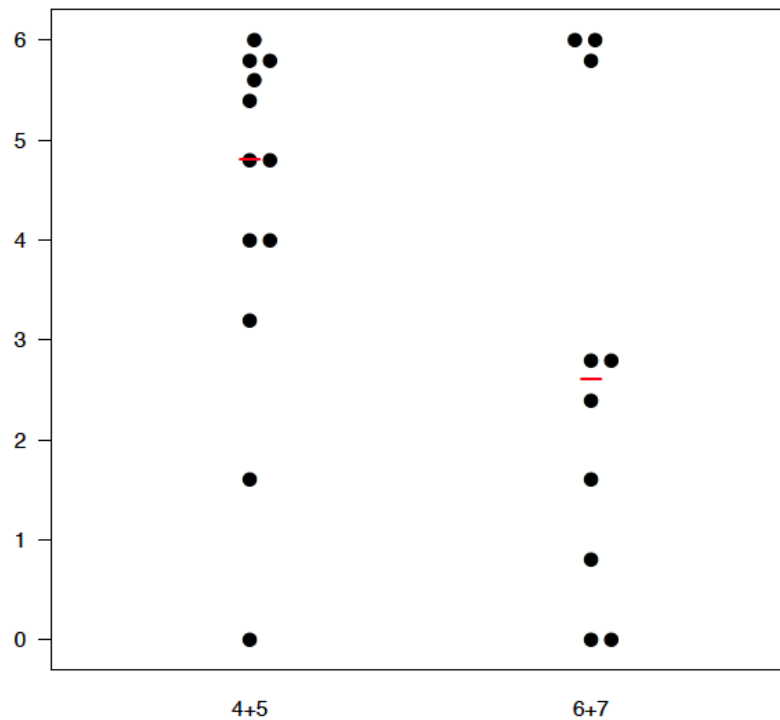


Abbildung 5-16 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p=0,26$

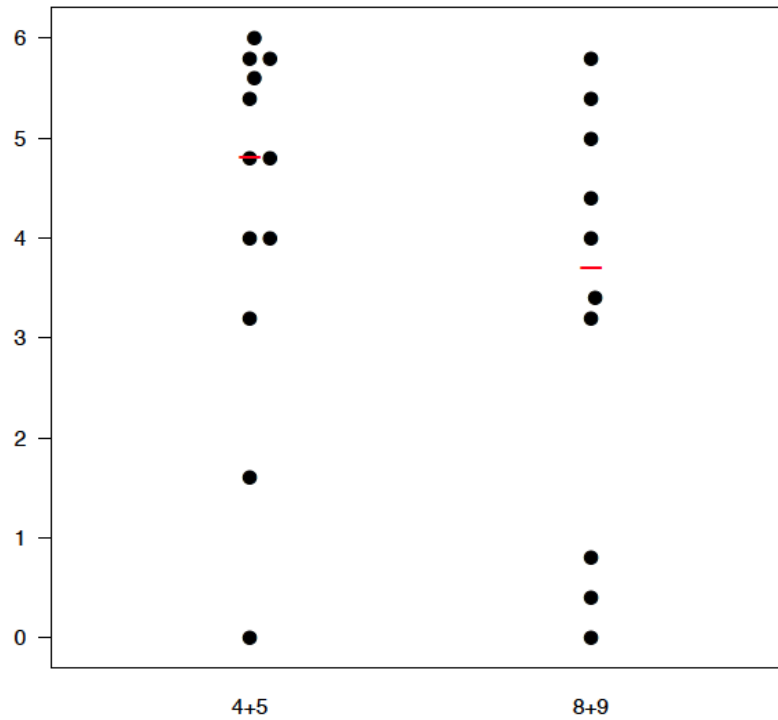


Abbildung 5-17 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p=0,232$

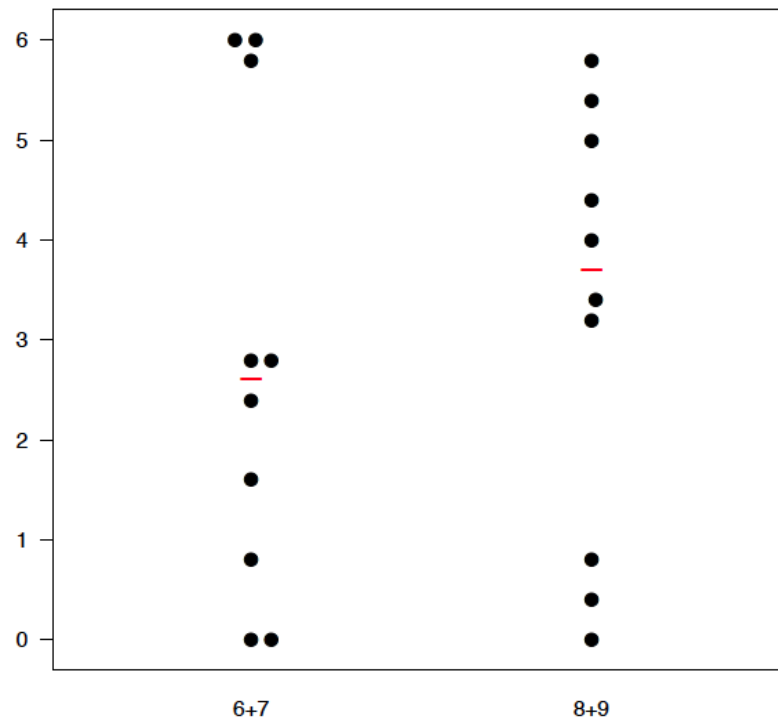


Abbildung 5-18 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p=0,725$

### 5.2.5 HBD-3

Die immunhistochemischen HBD-3-Ergebnisse der Synovialozyten-Zellkulturen wurden für die Kollektive **pTEP, aseptische und septische Lockerung** mit Hilfe des Immunreaktiven Score nach Remmele und Steger (IRS) sowie des Total Score nach Allred (TS) ausgewertet. Dazu wurden Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) sowie der Median berechnet. Der Median wird in den folgenden Diagrammen als roter Balken dargestellt. Die Ergebnisse der niedrigen Passagen (P↓) und der hohen Passagen (P↑) wurden zusammengefasst.

HBD-3		pTEP			Aseptische -			Septische Lockerung		
		P↓	P↑	gesamt	P↓	P↑	gesamt	P↓	P↑	gesamt
MW ± SD	IRS	2,90 ± 1,15	2,93 ± 1,16	2,92 ± 1,15	3,76 ± 0,54	3,68 ± 0,52	3,72 ± 0,53	8,44 ± 2,32	9,28 ± 3,56	8,56 ± 2,94
	TS	4,70 ± 1,60	4,80 ± 1,30	4,75 ± 1,45	5,68 ± 0,44	5,68 ± 0,52	5,68 ± 0,48	7,08 ± 0,64	7,32 ± 0,89	7,20 ± 0,76
Median	IRS	-	-	3,10	-	-	4,00	-	-	9,60
	TS	-	-	5,10	-	-	6,00	-	-	7,40

Tabelle 5.2-4 HBD-3 Zellkultur Auswertung. P↓= niedrige Passage, P↑= hohe Passage.

Bei der Gegenüberstellung der HBD-3-Ergebnisse der Gruppen pTEP und aseptische Lockerung ergab sich bei IRS und TS kein signifikanter Unterschied in der HBD-3-Expression. Beim Vergleich der Gruppen pTEP und septische Lockerung zeigte sich hingegen ein signifikanter Unterschied. Anschließend wurden die beiden Gruppen aseptische Lockerung und septische Lockerung gegenübergestellt. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied in der HBD-3-Expression erbracht werden.

Die HBD-3-Ergebnisse der Zellkulturversuche zeigen, dass es in der Synovialmembran der primären Implantation schon zu einer geringen HBD-3-Expression kommt. In der periprothetischen Membran bei Patienten mit einer aseptischen Lockerung kommt es ebenfalls zum Nachweis von HBD-3.

Harder beschreibt eine verstärkte antimikrobielle Wirkung von HBD-3 gegenüber grampositiven Bakterien (Harder et al., 2001). Auch in dieser Arbeit kommt es zu einer signifikanten Erhöhung der HBD-3-Expression in Synovialozyten mit einem grampositiven Keimnachweis. Sehr deutlich wird dies beim Vergleich der p-Werte der einzelnen Gruppen.

HBD-3	Score	pTEP vs. Asept.	pTEP vs. Sept.	Asept. Vs. Sept.
p-Wert	IRS	0,147	<0,001	<0,001
	TS	0,056	<0,001	<0,001

Tabelle 5.2-5 HBD-3 Zellkultur, p-Werte beim Vergleich der Gruppen

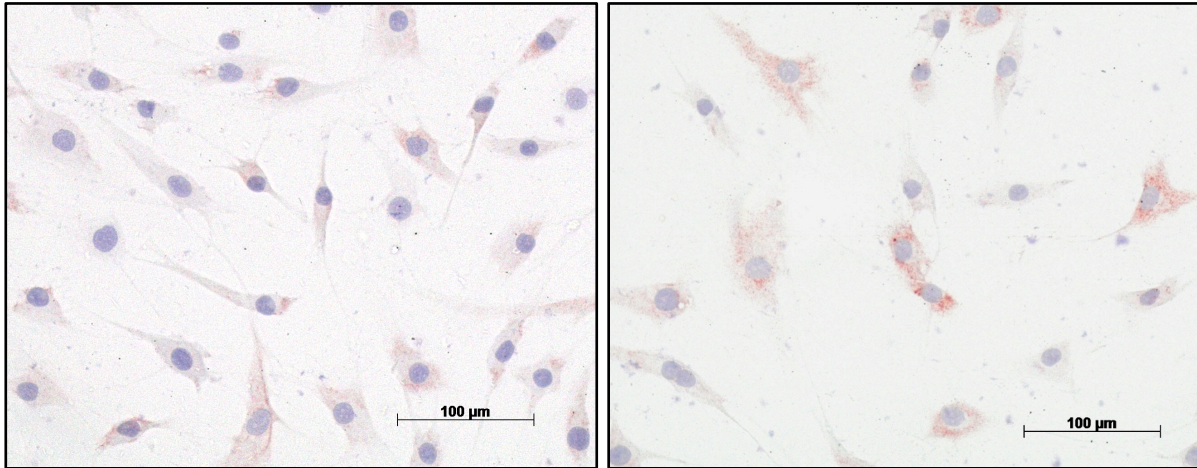


Abbildung 5-19 Zellkultur HBD-3 primäre TEP

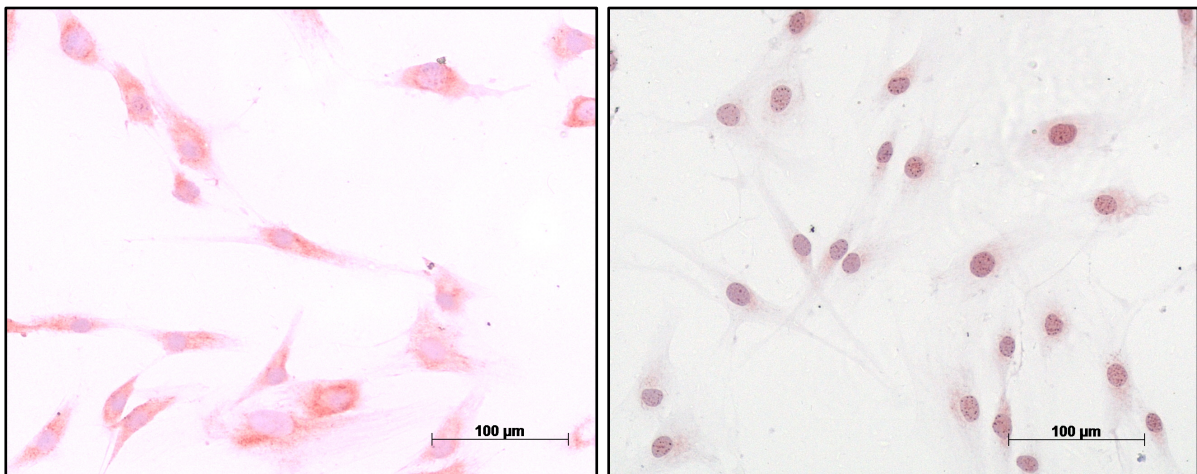


Abbildung 5-20 Zellkultur HBD-3 aseptische Lockerung

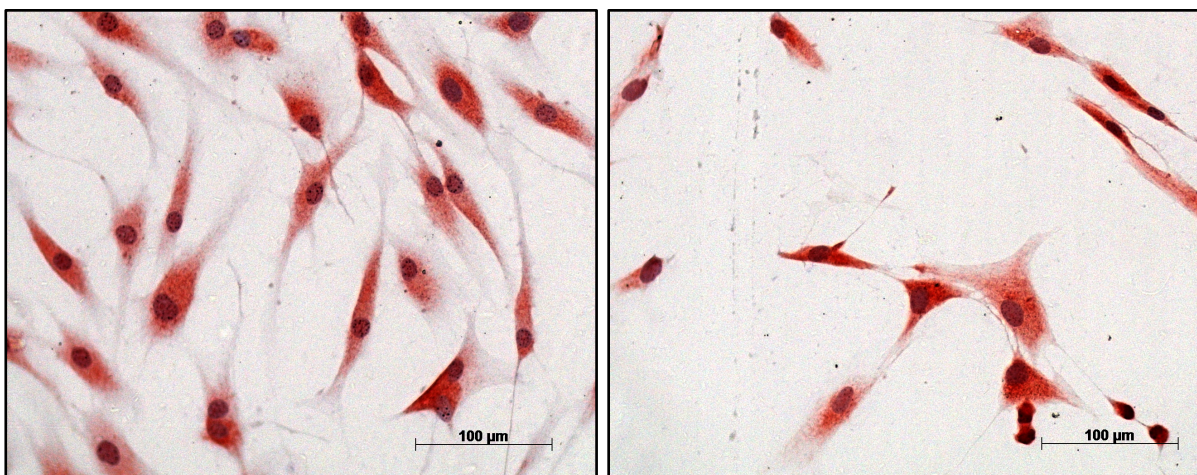


Abbildung 5-21 Zellkultur HBD-3 septische Lockerung

### 5.2.5.1 Immunreaktiver Score

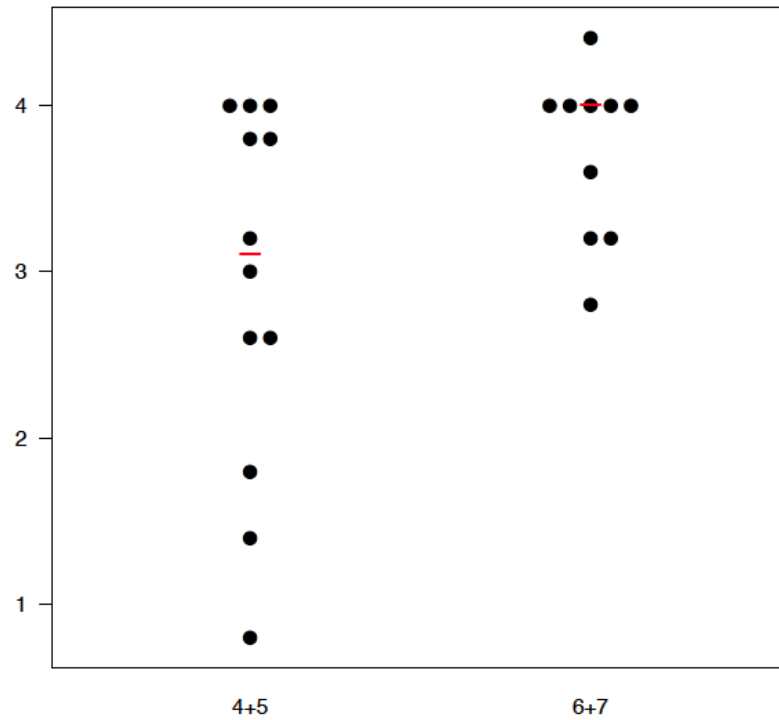


Abbildung 5-22 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p=0,147$

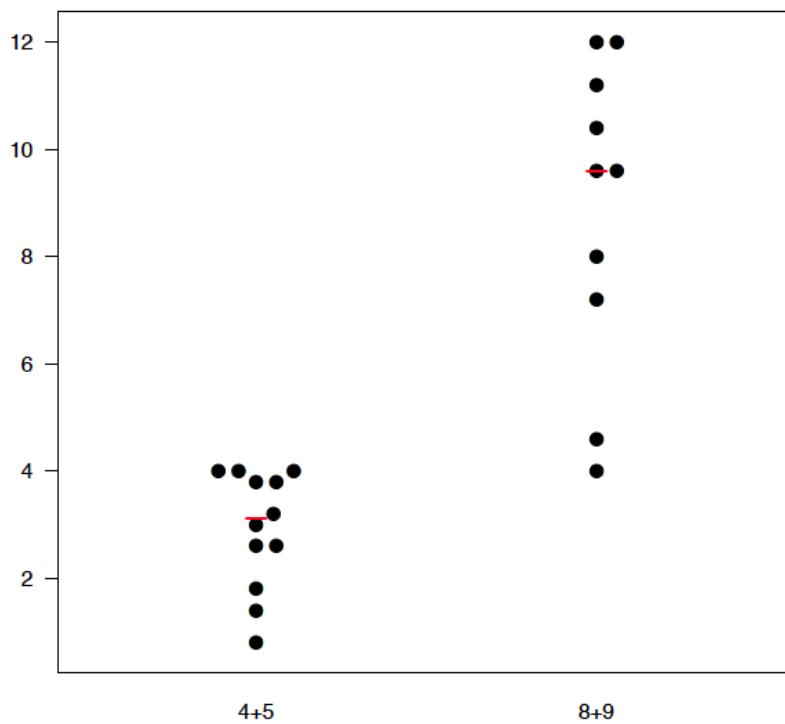


Abbildung 5-23 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p<0,001$

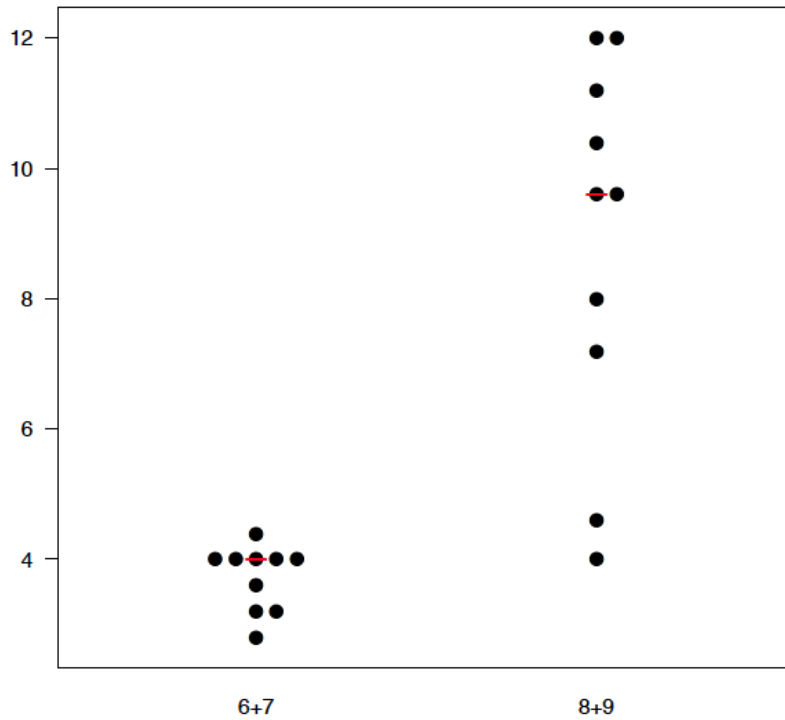


Abbildung 5-24 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p < 0,001$

### 5.2.5.2 Total Score

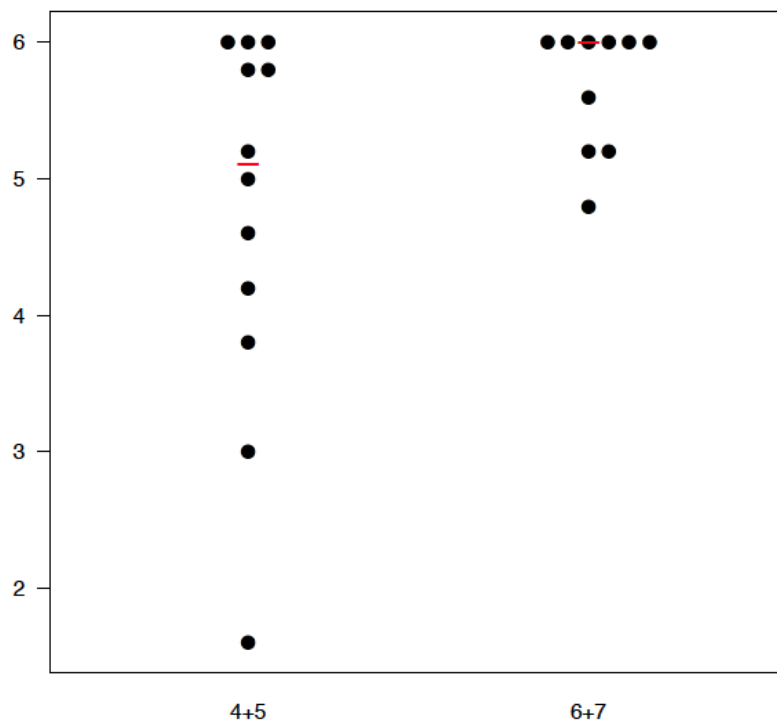


Abbildung 5-25 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p = 0,056$

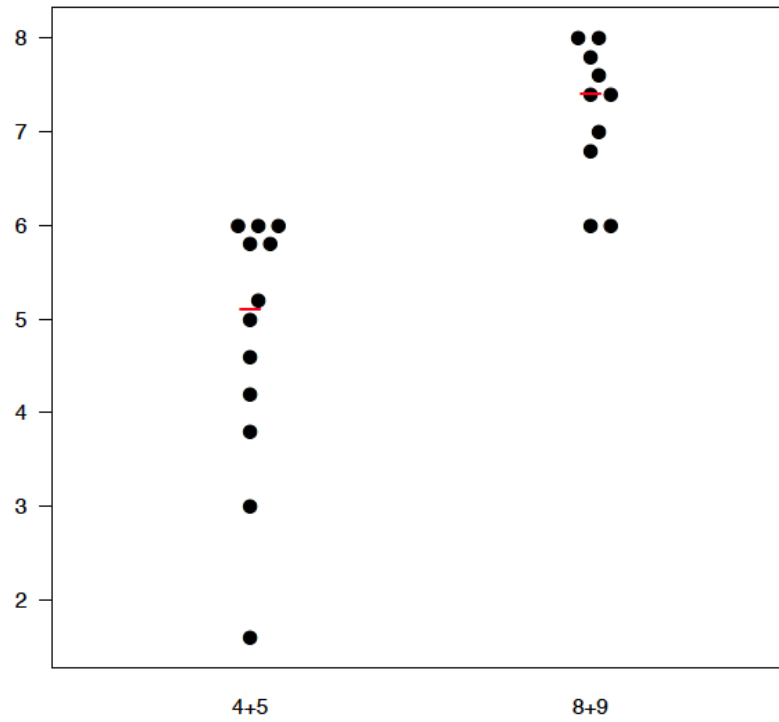


Abbildung 5-26 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p < 0,001$

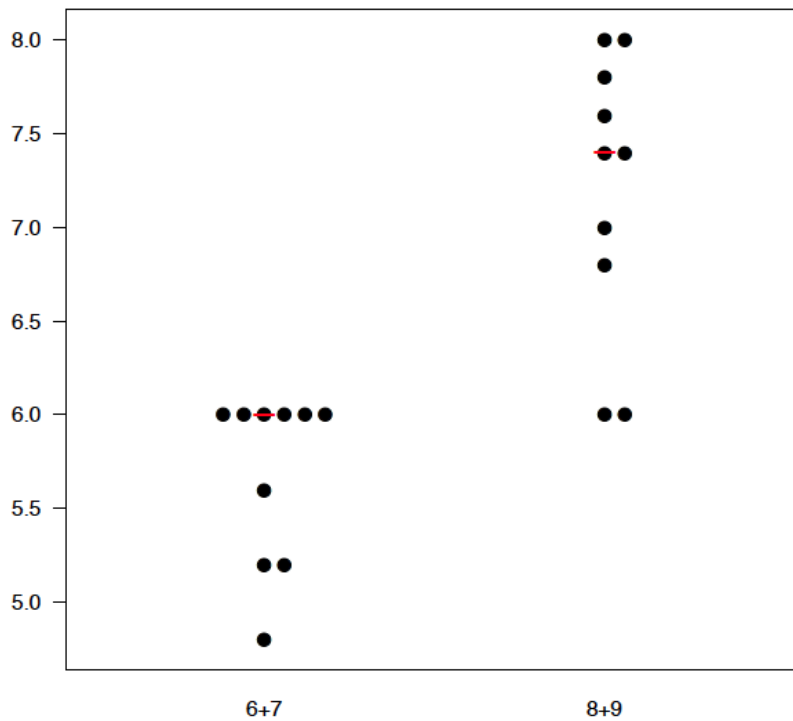


Abbildung 5-27 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p < 0,001$



## 5.2.6 LL-37

Die immunhistochemischen LL-37-Ergebnisse der Synovialozyten-Zellkulturen wurden für die Kollektive **pTEP, aseptische und septische Lockerung** mit Hilfe des Immunreaktiven Score nach Remmele und Steger (IRS) sowie des Total Score nach Allred (TS) ausgewertet. Dazu wurden Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) sowie der Median berechnet. Der Median wird in den folgenden Diagrammen als roter Balken dargestellt. Die Ergebnisse der niedrigen Passagen (P↓) und der hohen Passagen (P↑) wurden zusammengefasst.

LL-37		pTEP			Aseptische -			Septische Lockerung		
		P↓	P↑	gesamt	P↓	P↑	gesamt	P↓	P↑	gesamt
MW ± SD	IRS	3,20 ± 0,81	3,13 ± 1,35	3,17 ± 1,08	4,80 ± 0,75	4,36 ± 0,61	4,58 ± 0,68	7,68 ± 1,21	7,52 ± 1,93	7,60 ± 1,57
	TS	5,13 ± 0,83	4,83 ± 2,08	4,98 ± 1,45	6,08 ± 0,30	6,00 ± 0,28	6,04 ± 0,29	6,92 ± 0,30	6,88 ± 0,48	6,90 ± 0,39
Median	IRS	-	-	3,50	-	-	4,80	-	-	7,20
	TS	-	-	5,50	-	-	6,20	-	-	7,40

Tabelle 5.2-6 LL-37 Zellkultur Auswertung. P↓ = niedrige Passage, P↑ = hohe Passage.

Bei der Gegenüberstellung der LL-37-Ergebnisse der Gruppen pTEP und aseptische Lockerung ergab sich bei IRS und TS kein signifikanter Unterschied in der Expression von LL-37. Beim Vergleich der Gruppen pTEP und septische Lockerung zeigte sich hingegen ein signifikanter Unterschied. Anschließend wurden die beiden Gruppen aseptische Lockerung und septische Lockerung gegenübergestellt. Auch hier konnte ein signifikanter Unterschied in der LL-37-Expression erbracht werden.

Ähnlich wie bei den HBD-3-Ergebnissen zeigt sich auch bei den Zellkulturversuchen mit LL-37, dass es in der Synovialmembran der primären Implantation und in der Gelenkmembran der aseptischen Lockerung zu einer geringen LL-37-Expression kommt. Vergleicht man jedoch beide Membranen untereinander, so besteht zwischen pTEP und aseptischer Lockerung kein signifikanter Unterschied.

Signifikant ist die Erhöhung der LL-37-Expression in Zellen mit einem grampositiven Keimnachweis. Besonders deutlich wird dies durch den Vergleich der p-Werte von aseptischer und septischer Lockerung.

LL-37	Score	pTEP vs. Asept.	pTEP vs. Sept.	Asept. Vs. Sept.
p-Wert	IRS	0,062	<0,001	<0,001
	TS	0,094	<0,001	<0,001

Tabelle 5.2-7 LL-37 Zellkultur, p-Werte beim Vergleich der Gruppen

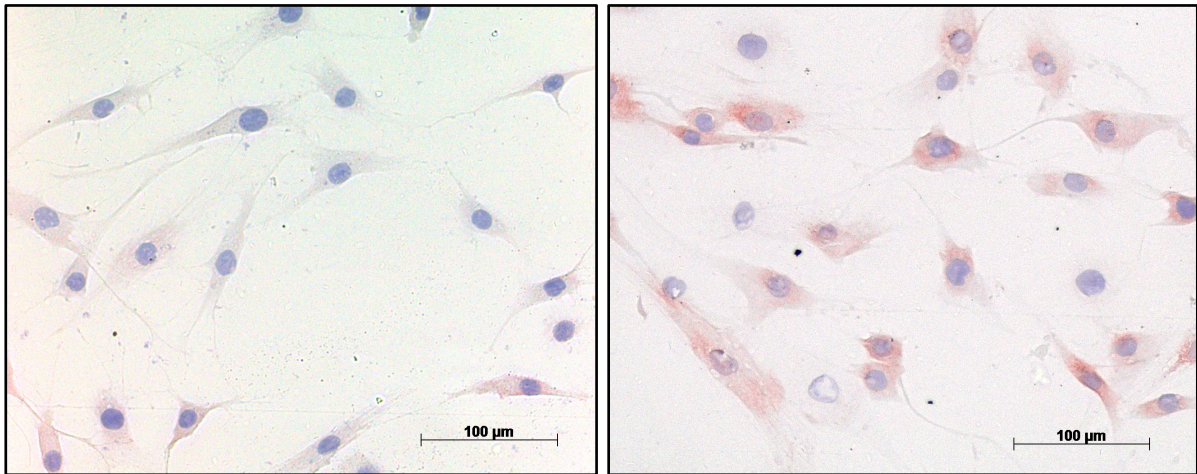


Abbildung 5-28 Zellkultur LL-37 primäre TEP

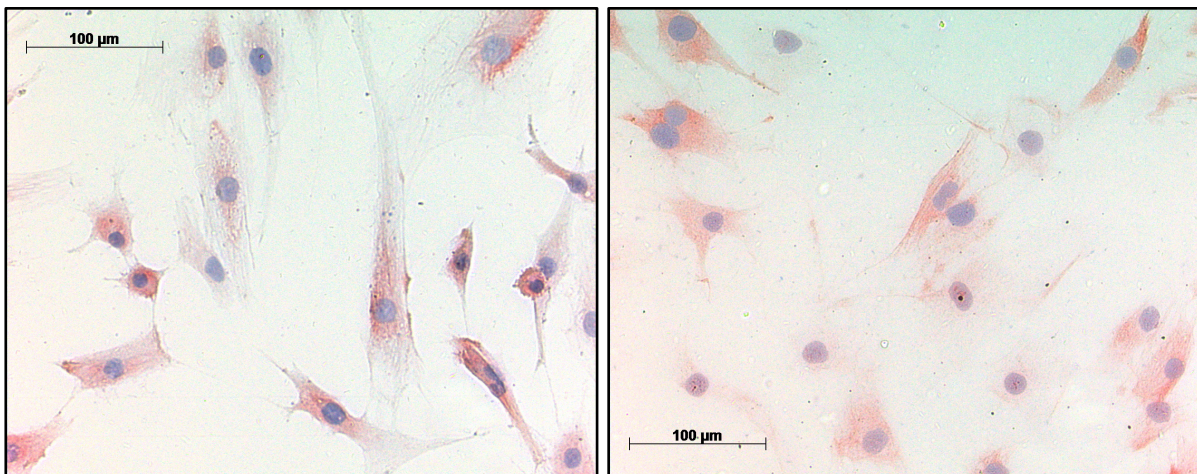


Abbildung 5-29 Zellkultur LL-37 aseptische Lockerung

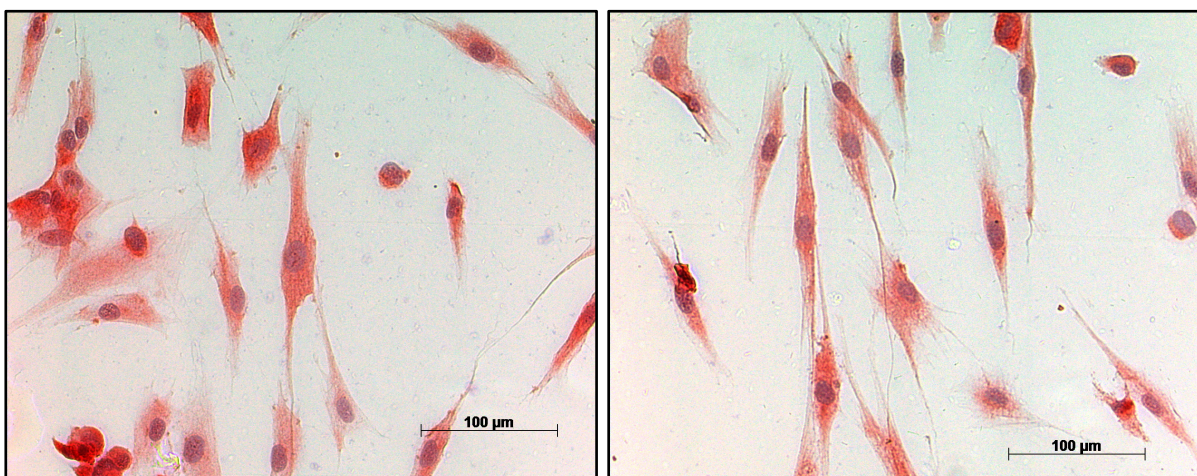


Abbildung 5-30 Zellkultur LL-37 septische Lockerung

**5.2.6.1 Immunreaktiver Score**

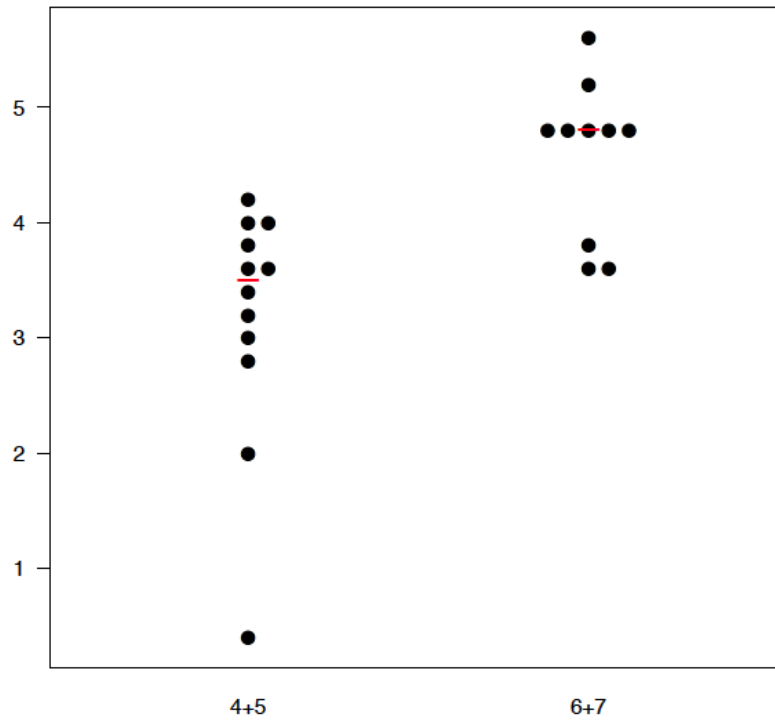


Abbildung 5-31 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p=0,062$

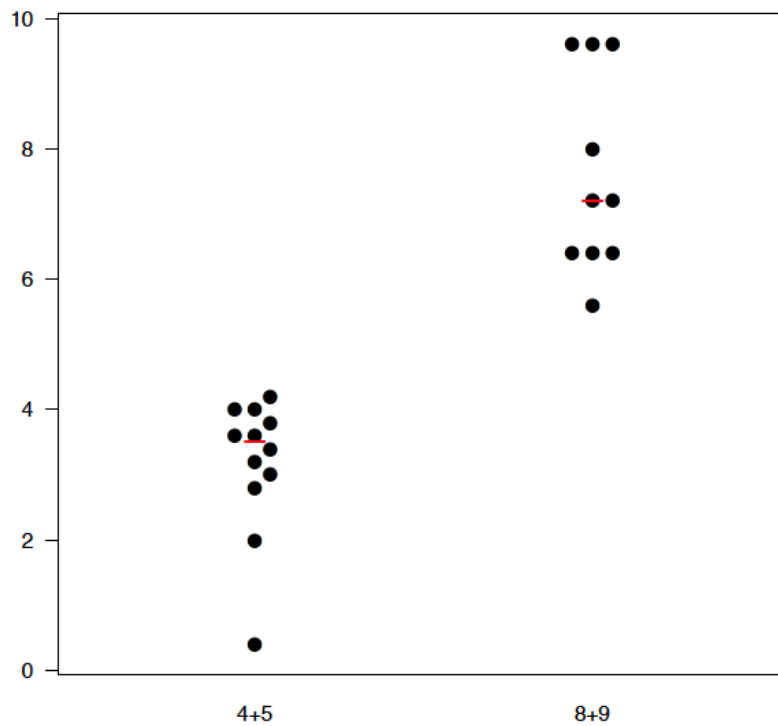


Abbildung 5-32 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p=<0,001$

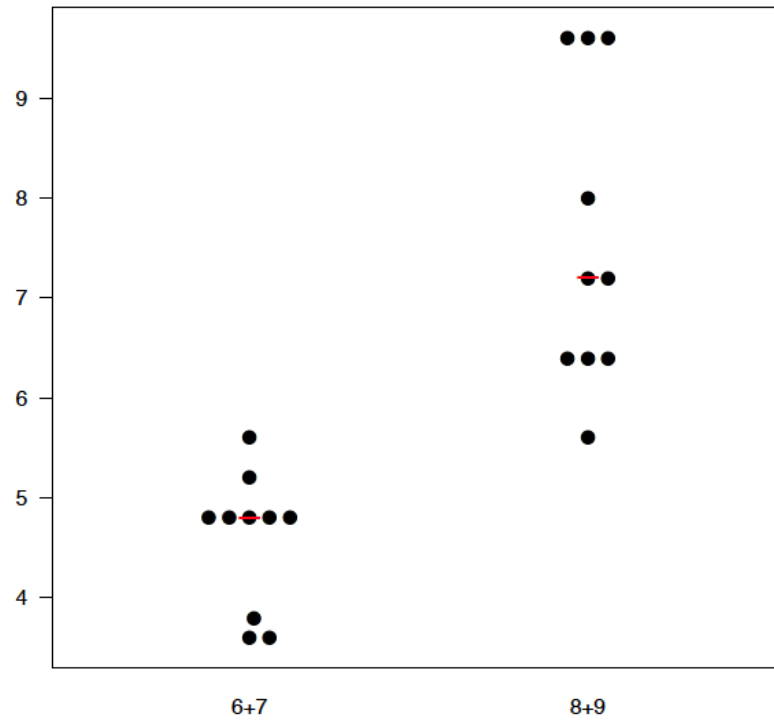


Abbildung 5-33 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p < 0,001$

### 5.2.6.2 Total Score

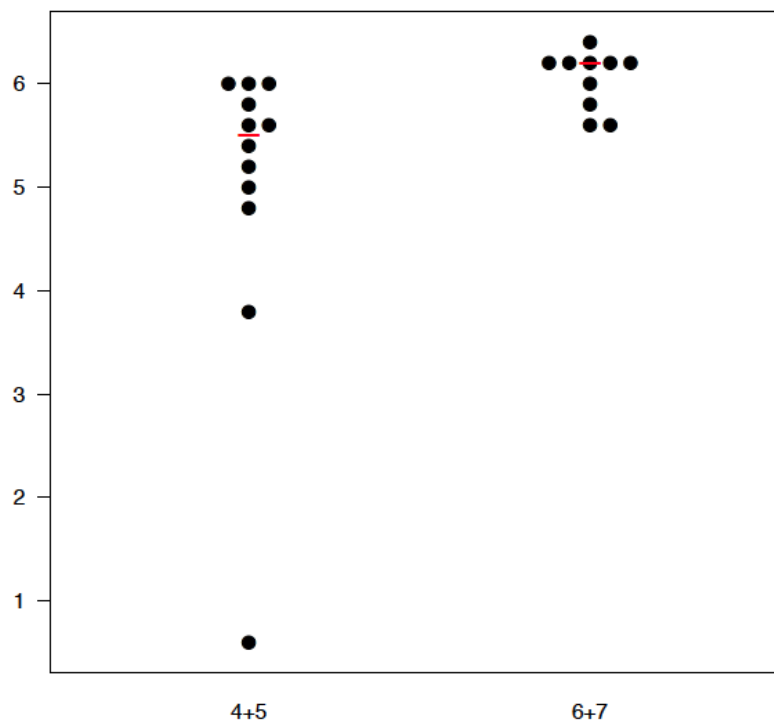


Abbildung 5-34 TS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p = 0,094$

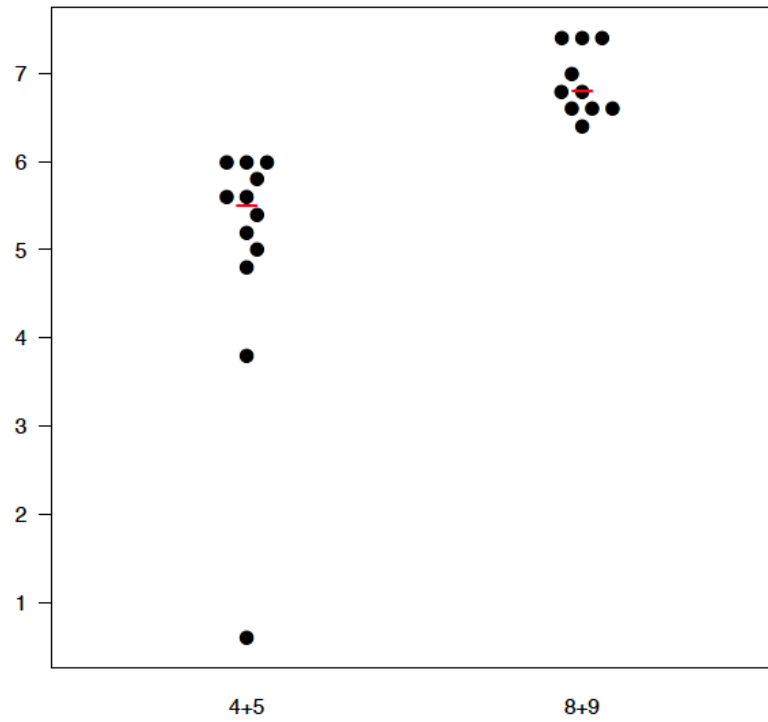


Abbildung 5-35 TS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p < 0,001$

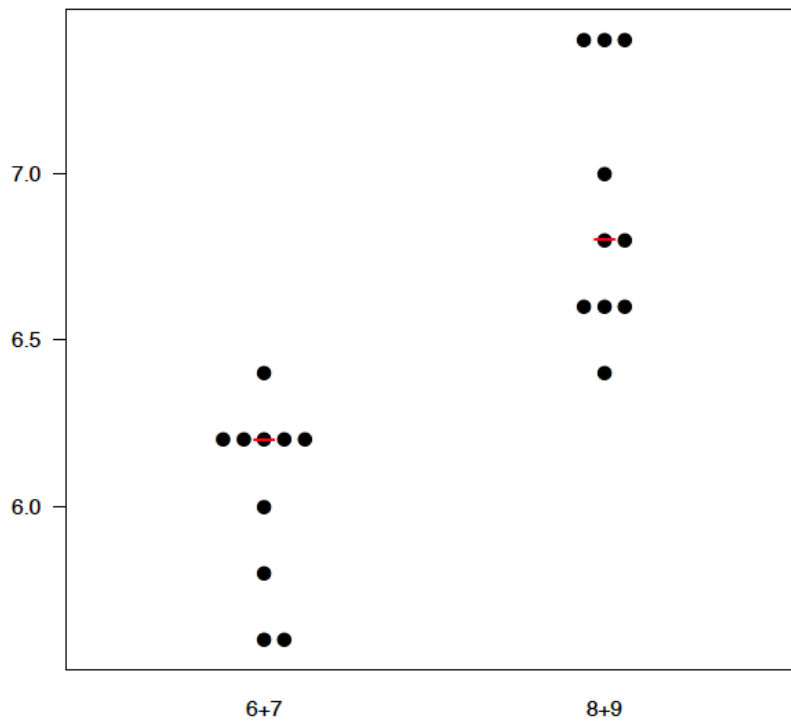


Abbildung 5-36 TS LL-37: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst  $p < 0,001$



## 5.3 Paraffingewebe

### 5.3.1 Versuchskontrollen

Wie unter Punkt 4.7.4 (IHC von Paraffingewebe) beschrieben, wurden die Gewebeschnitte mit einer Lösung, die den primären Antikörper enthält, inkubiert. Zur Versuchskontrolle wurde auf einem separaten Schnitt die Isotypkontrolle und auf einem weiteren Schnitt die Negativkontrolle aufgetragen.

Zusätzlich zur Isotyp- und zur Negativkontrolle wurde für die HBD-2-Analysen von Paraffingewebe eine Positivkontrolle erarbeitet. Hierzu wurde Gewebe, welches mit einem gramnegativen Erreger konfrontiert war, herangezogen. So konnte zum einen die HBD-2-Konzentration auf 1µg/ml festgelegt werden, zum anderen diente die Positivkontrolle zur Sicherung der HBD-2-Ergebnisse, da es gegenüber grampositiven, Katalase-positiven Bakterien nur zu einer basalen HBD-2-Expression kommt. Allerdings findet als Reaktion auf eine gramnegative Keimbesiedelung wie im Gewebe der Positivkontrolle eine HBD-2-Expression im Gewebe statt (Harder & Schroder, 2005).

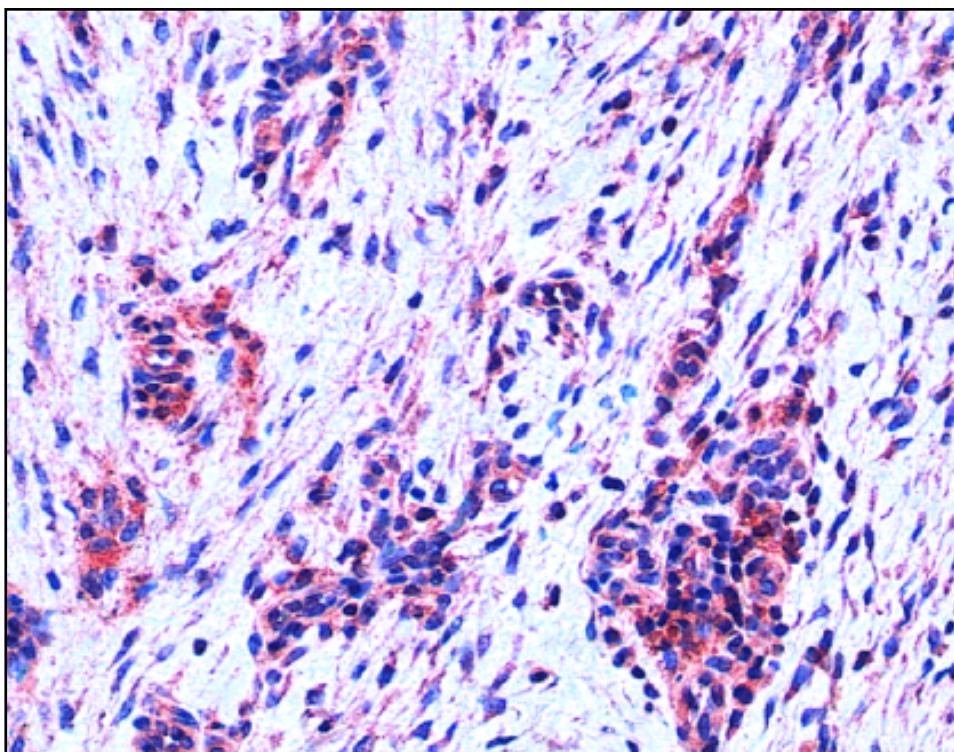


Abbildung 5-37 Positivkontrolle HBD-2

### 5.3.2 HBD-2

Die immunhistochemischen HBD-2-Ergebnisse der Paraffingewebe wurden für die Kollektive **pTEP, aseptische und septische Lockerung** mit Hilfe des Immunreaktiven Score nach Remmele und Steger (IRS) sowie des Total Score nach Allred (TS) ausgewertet. Dazu wurden Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) sowie der Median berechnet. Der Median wird in den folgenden Diagrammen als roter Balken dargestellt.

HBD-2		pTEP	Aseptische Lockerung	Septische Lockerung
MW ± SD	IRS	0,15 ± 0,14	0,60 ± 0,50	0,70 ± 0,40
	TS	0,30 ± 0,28	1,20 ± 1,06	1,38 ± 0,78
Median	IRS	0,20	0,60	0,90
	TS	0,40	1,00	1,70

Tabelle 5.3-1 HBD-2 Paraffingewebe, Auswertung der Mittelwerte, Standardabweichung und des Median

Bei der Gegenüberstellung der HBD-2-Ergebnisse der Gruppe pTEP gegen aseptische und pTEP gegen septische Lockerung ergab sich beim IRS und beim TS jeweils ein signifikanter Unterschied in der HBD-2-Expression.

Anschließend wurden die beiden Gruppen aseptische Lockerung und septische Lockerung gegenübergestellt. Hier konnte jedoch kein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

HBD-2	Score	pTEP vs. Asept.	pTEP vs. Sept.	Asept. Vs. Sept.
p-Wert	IRS	0,006	0,017	0,300
	TS	0,007	0,012	0,303
AUC	IRS	-	0,743	0,646
	TS	-	0,746	0,653

Tabelle 5.3-2 HBD-2 Paraffingewebe, p-Werte und AUC-Werte beim Vergleich der Gruppen

Das Resultat zeigt eine Hochregulation von HBD-2 beim Vorliegen einer TEP-Lockerung. Da HBD-2 nicht auf grampositive Keime anspricht (Harder & Schroder, 2005) ist der Unterschied zwischen aseptischer und septischer Lockerung nicht signifikant.

Das Ergebnis spiegelt sich in der diagnostische Güte wieder. Die Werte der Area under the Curve (AUC) liegen für den IRS sowie für den TS zwischen 0,60 und 0,75. Das bedeutet, dass die Grenzwertoptimierungskurven (Receiver operating characteristic curve, ROC-Kurven) für HBD-2 keine hohe diagnostische Güte zeigen.

Da die ROC-Kurven oberhalb der 45°-Diagonalen liegen, kann man davon sprechen, dass die Werte richtig interpretiert wurden.



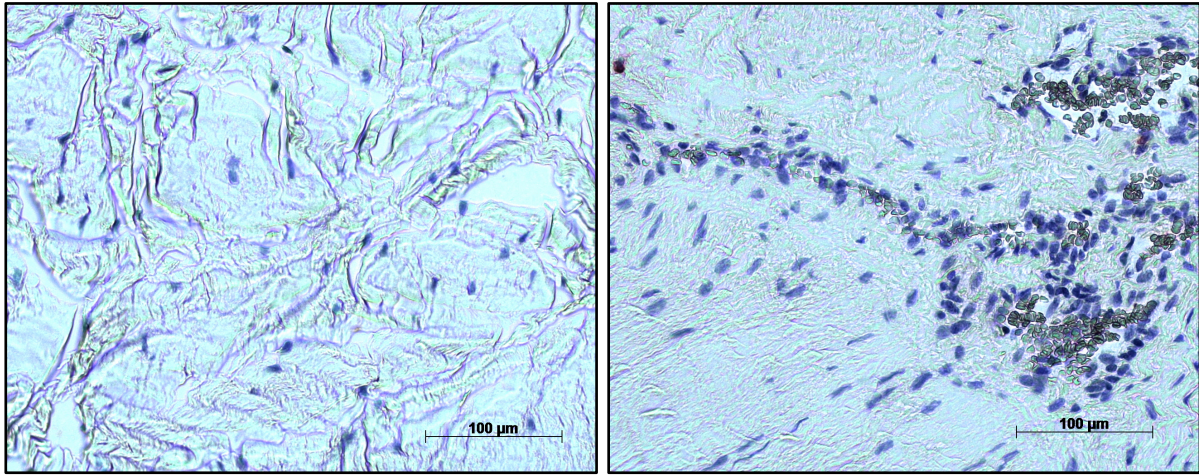


Abbildung 5-38 Paraffinschnitt HBD-2 primäre TEP

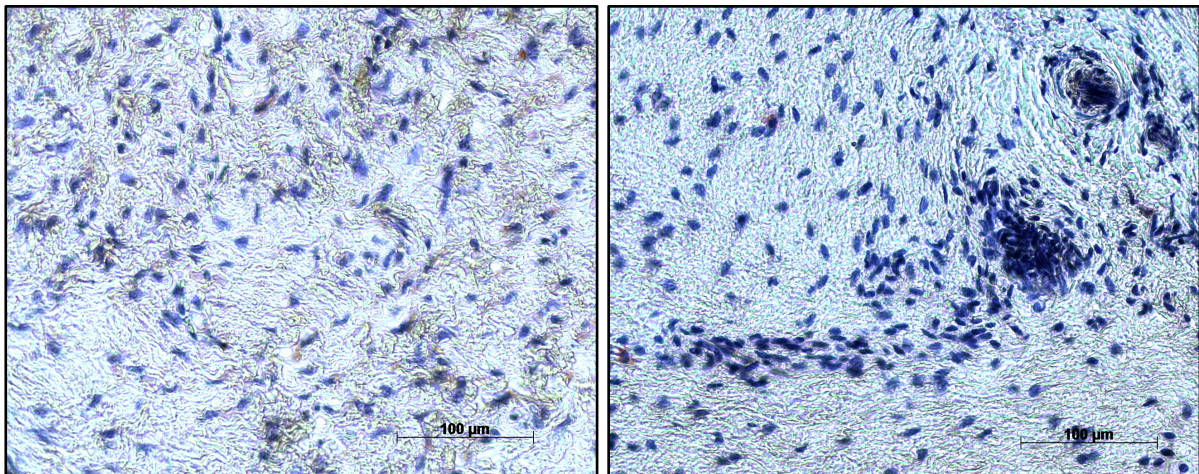


Abbildung 5-39 Paraffinschnitt HBD-2 aseptische Lockerung

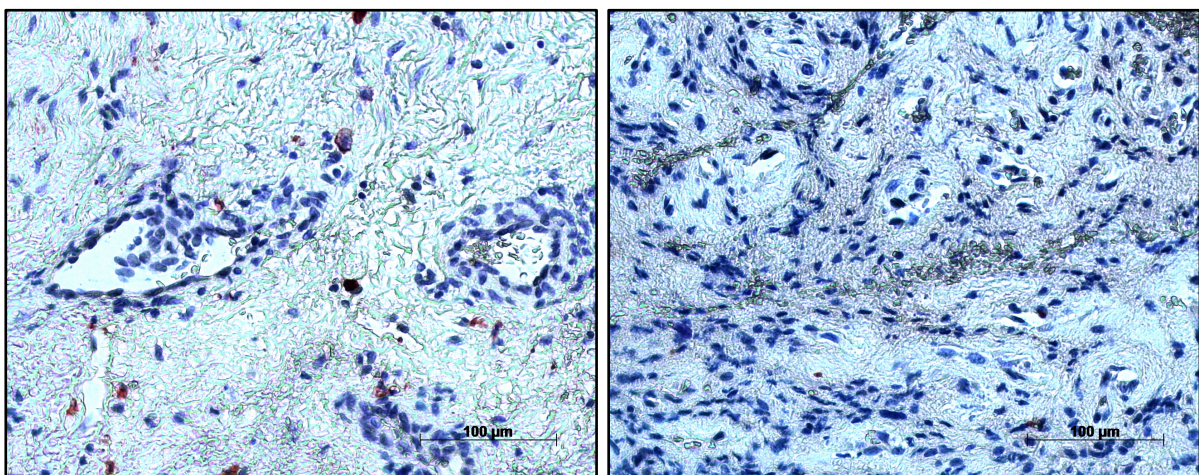
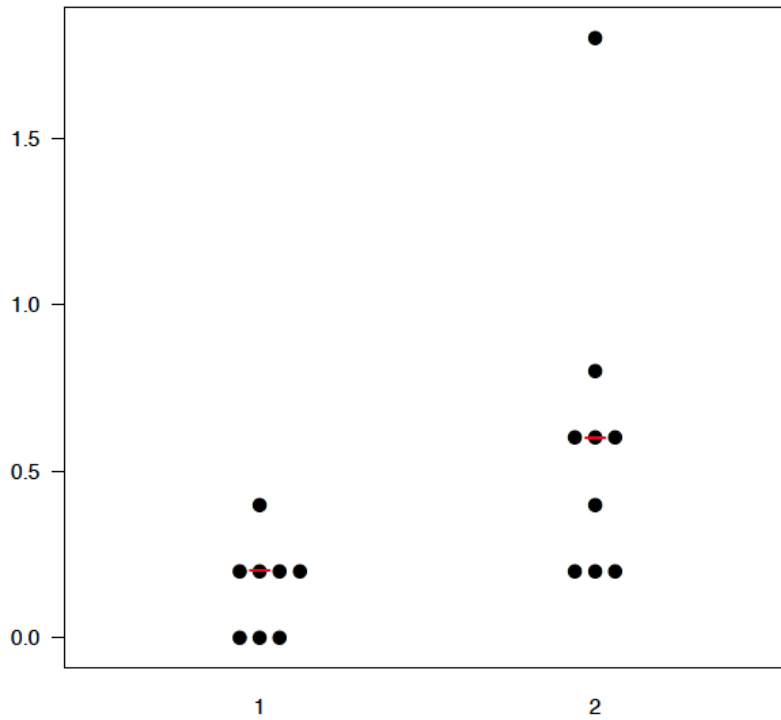
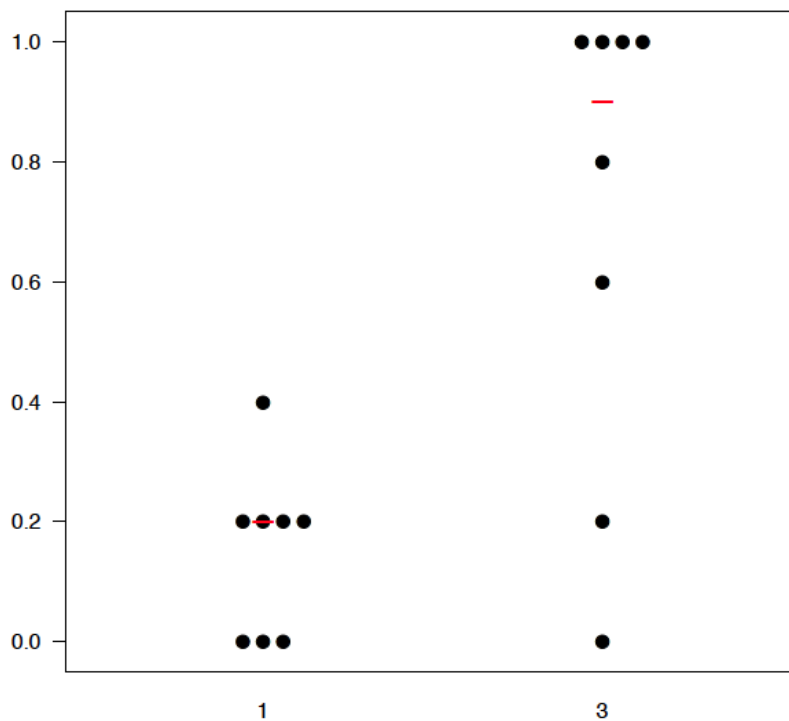


Abbildung 5-40 Paraffinschnitt HBD-2 septische Lockerung



**5.3.2.1 Immunreaktiver Score**Abbildung 5-41 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2)  $p=0,006$ Abbildung 5-42 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3)  $p=0,017$

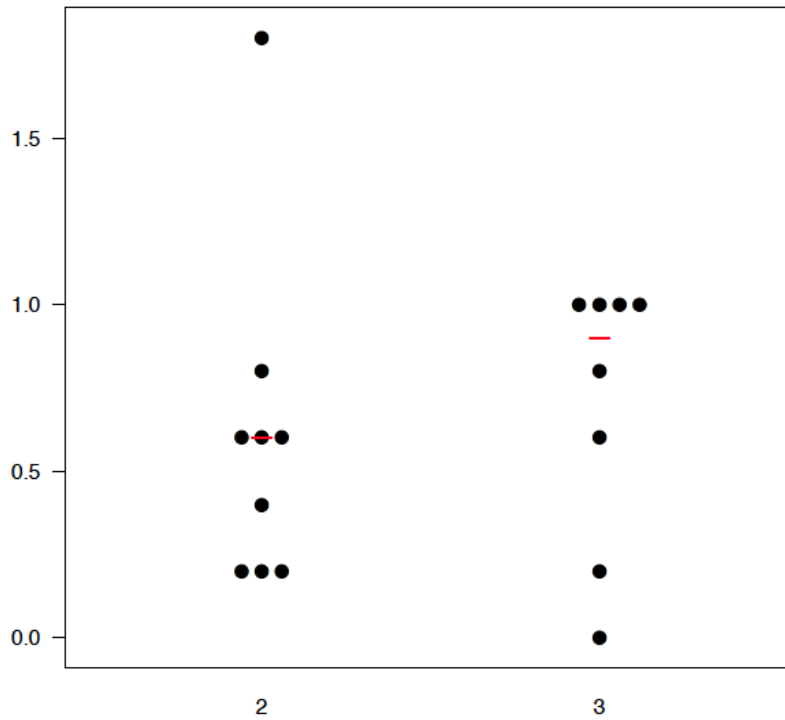


Abbildung 5-43 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3)  $p=0,3$

### 5.3.2.2 Total Score

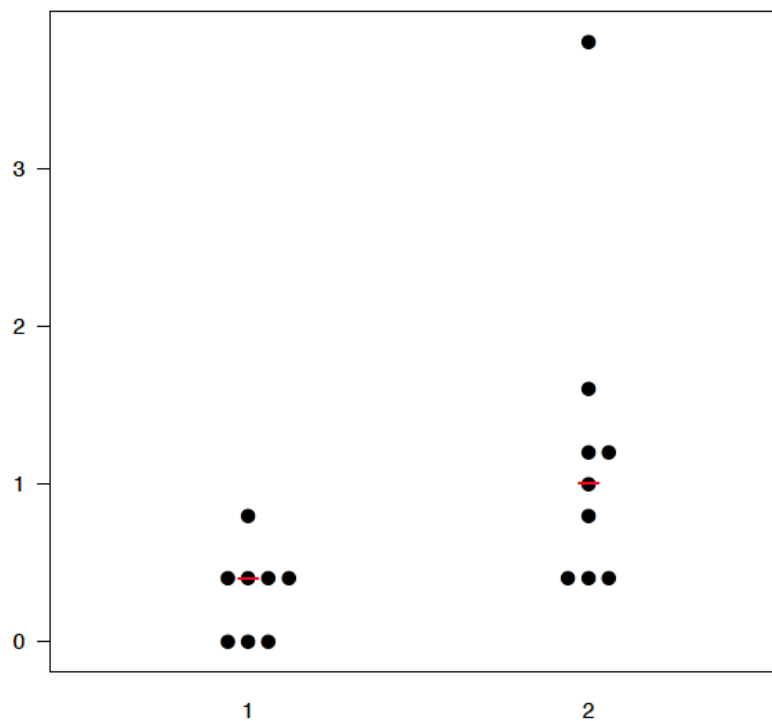


Abbildung 5-44 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2)  $p=0,007$

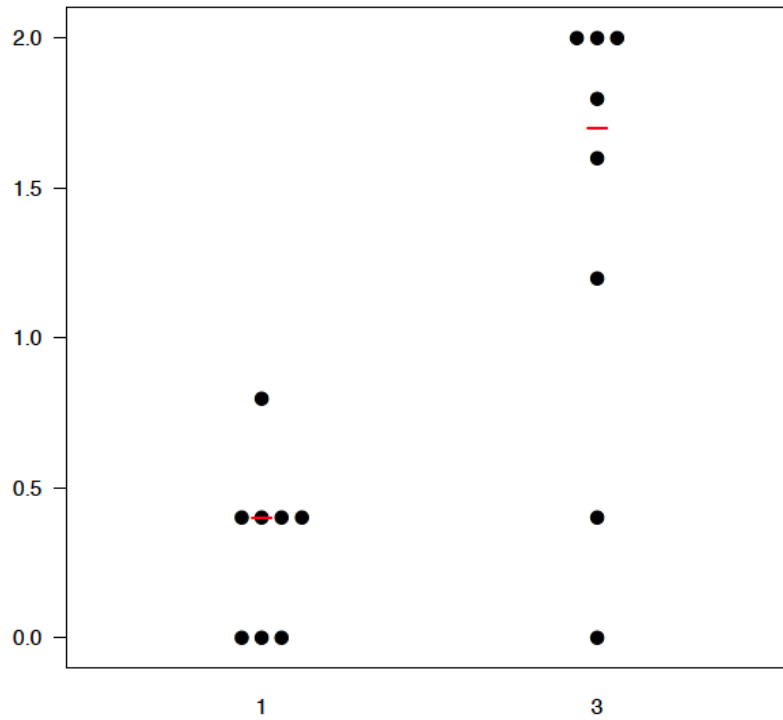


Abbildung 5-45 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3)  $p=0,012$

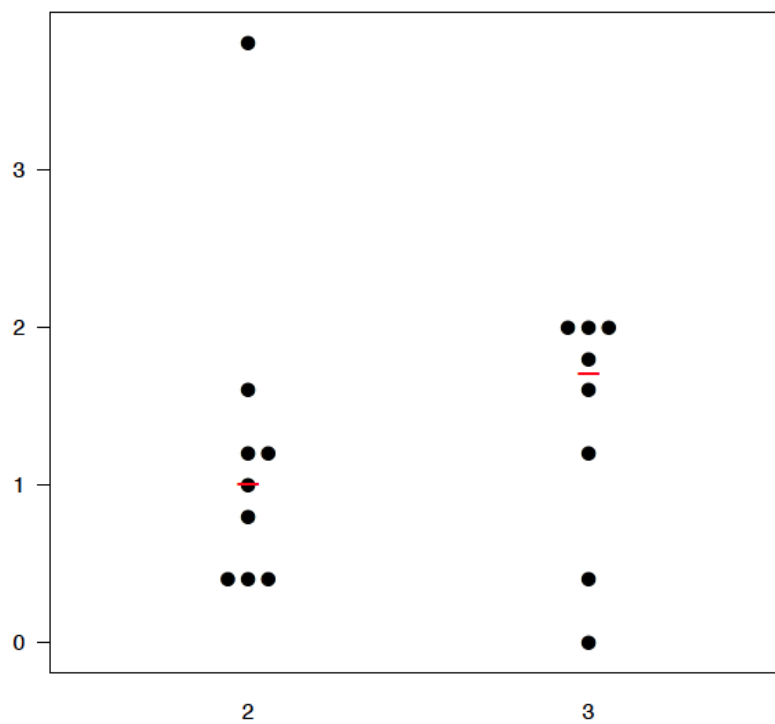


Abbildung 5-46 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3)  $p=0,303$

### 5.3.2.3 Diagnostische Güte des HBD-2-Ergebnis

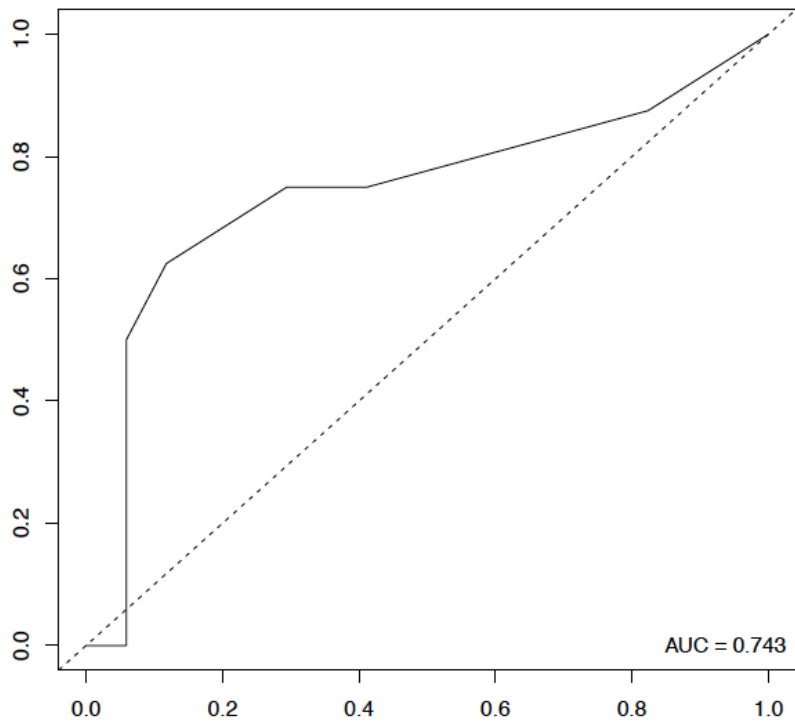


Abbildung 5-47 HBD-2: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) AUC=0,743

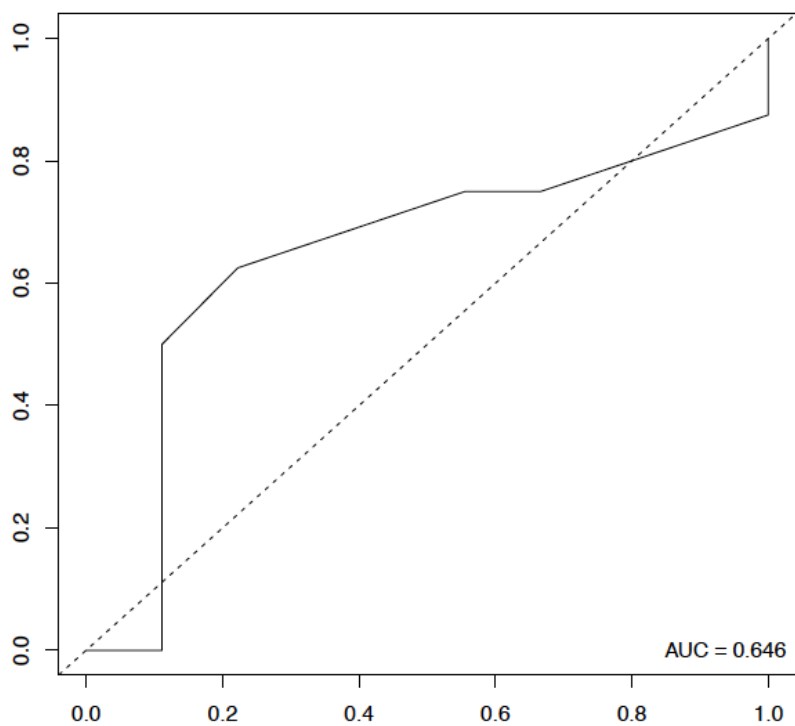


Abbildung 5-48 HBD-2: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) AUC=0,646

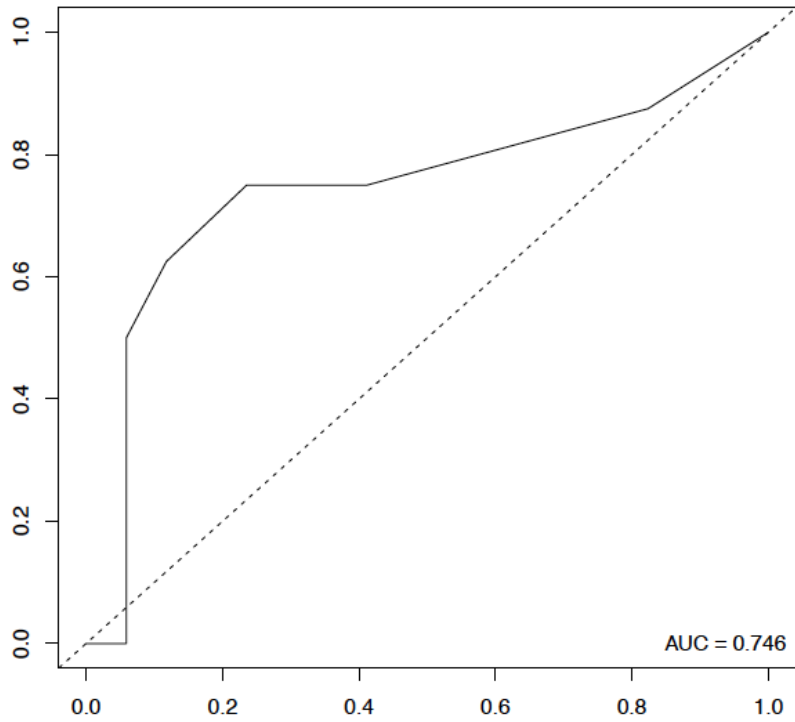


Abbildung 5-49 HBD-2: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) AUC=0,746

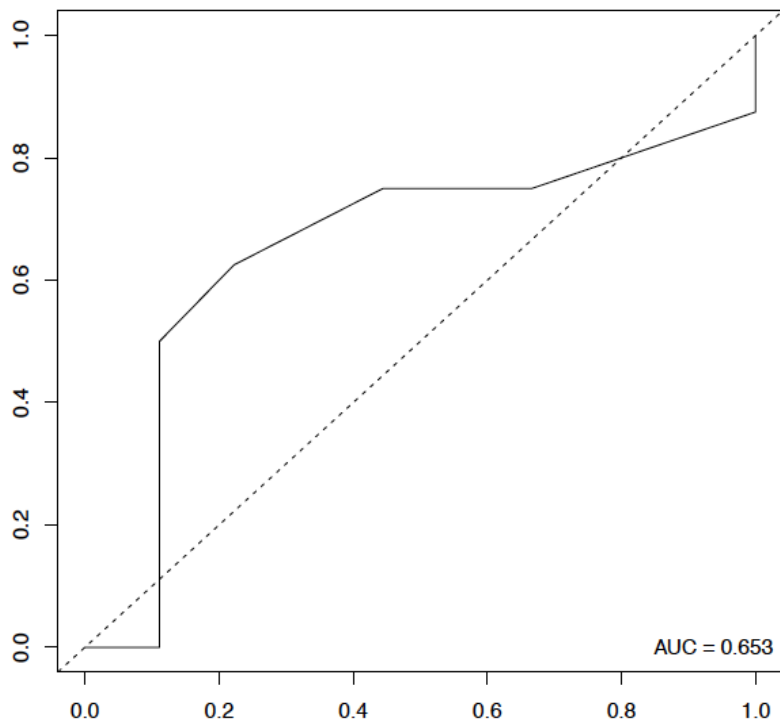


Abbildung 5-50 HBD-2: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) AUC=0,653

### 5.3.3 HBD-3

Die immunhistochemischen HBD-3-Ergebnisse der Paraffingewebe wurden für die Kollektive **pTEP, aseptische und septische Lockerung** mit Hilfe des Immunreaktiven Score nach Remmele und Steger (IRS) sowie des Total Score nach Allred (TS) ausgewertet. Dazu wurden Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) sowie der Median berechnet. Der Median wird in den folgenden Diagrammen als roter Balken dargestellt.

HBD-3		pTEP	Aseptische Lockerung	Septische Lockerung
MW ± SD	IRS	0,73 ± 0,57	0,98 ± 0,60	10,78 ± 2,28
	TS	1,28 ± 0,81	1,89 ± 1,09	7,63 ± 0,71
Median	IRS	0,80	0,60	12,00
	TS	1,60	1,40	8,00

Tabelle 5.3-3 HBD-3 Paraffingewebe, Auswertung der Mittelwerte, Standardabweichung und Median

Bei der Gegenüberstellung der HBD-3-Ergebnisse der Gruppen pTEP und aseptische Lockerung besteht kein signifikanter Unterschied in der HBD-3-Expression. Beim Vergleich der Gruppen pTEP und septische Lockerung zeigte sich jedoch ein signifikanter Unterschied. Auch bei den Gruppen aseptische und septische Lockerung konnte ein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

HBD-3	Score	pTEP vs. Asept.	pTEP vs. Sept.	Asept. Vs. Sept.
p-Wert	IRS	0.937	<0,001	<0,001
	TS	0,559	<0,001	<0,001
AUC	IRS	-	1	1
	TS	-	1	1

Tabelle 5.3-4 HBD-3 Paraffingewebe, p-Werte und AUC-Werte beim Vergleich der Gruppen

Noch eindrucksvoller als bei den Zellkulturversuchen sind die HBD-3-Ergebnisse der Paraffingewebe. In der Synovialmembran kommt es bei der primären Implantation zu keiner signifikanten Expression. Ebenso verhält es sich bei der aseptischen Lockerung. In der periprothetischen Membran einer septischen Lockerung besteht allerdings eine sehr hohe Expression von HBD-3. Deutlich wird dies durch die maximale Punktzahl (Median) für IRS und TS. Die Signifikanz der p-Werte unterstreicht das Ergebnis.

Das Resultat spiegelt sich in der diagnostische Güte wider. Der AUC-Wert liegt für den IRS sowie für den TS bei 1. Die Grenzwertoptimierungskurven (ROC-Kurven) steigen zu Beginn senkrecht an, was einer Sensitivität von 100 % entspricht. Die Werte wurden richtig interpretiert, da die ROC-Kurven deutlich oberhalb der 45°-Diagonalen liegen. Somit besitzen die Tests der HBD-3-Ergebnisse eine hervorragende diagnostische Güte.



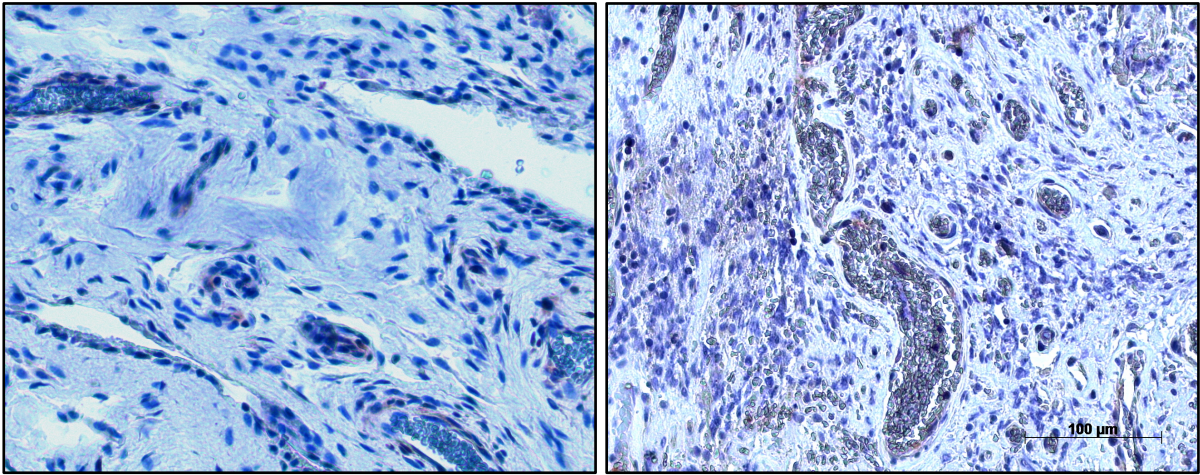


Abbildung 5-51 Paraffinschnitt HBD-3 primäre TEP

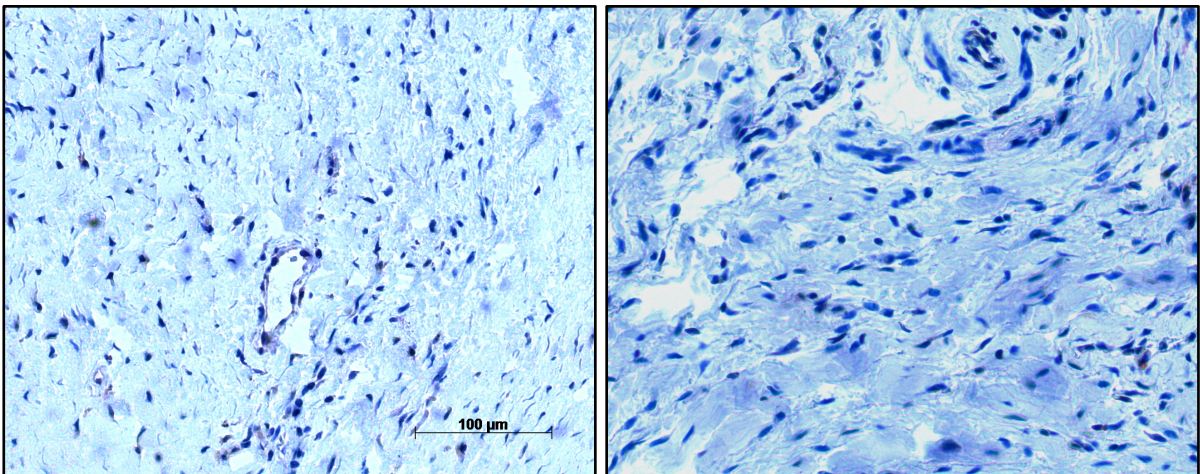


Abbildung 5-52 Paraffinschnitt HBD-3 aseptische Lockerung

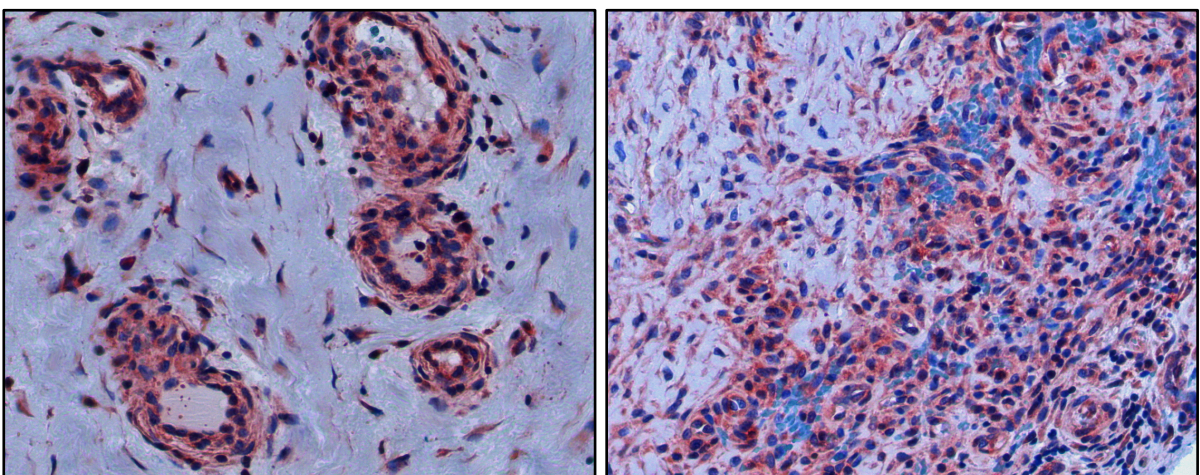


Abbildung 5-53 Paraffinschnitt HBD-3 septische Lockerung

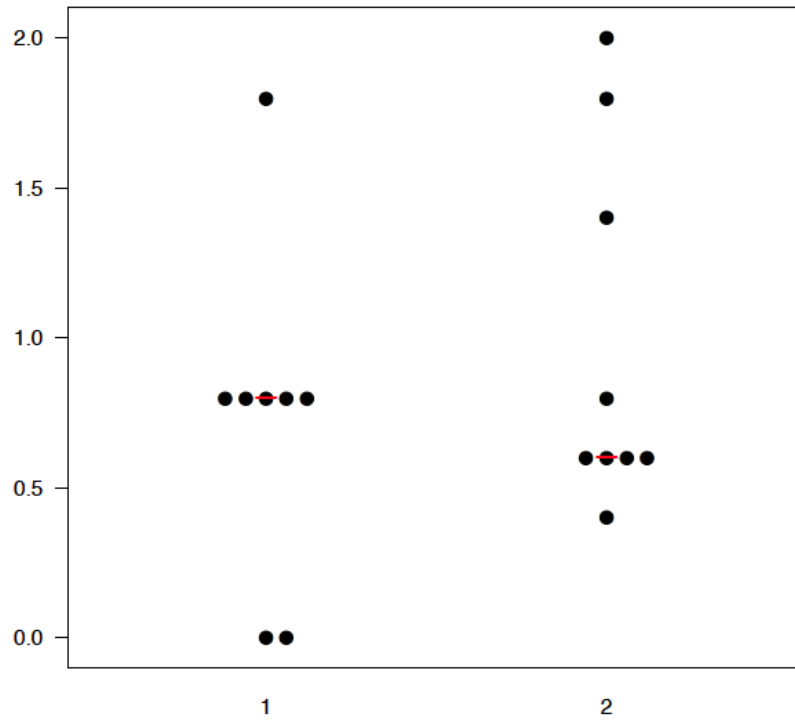
**5.3.3.1 Immunreaktiver Score**

Abbildung 5-54 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2)  $p=0,937$

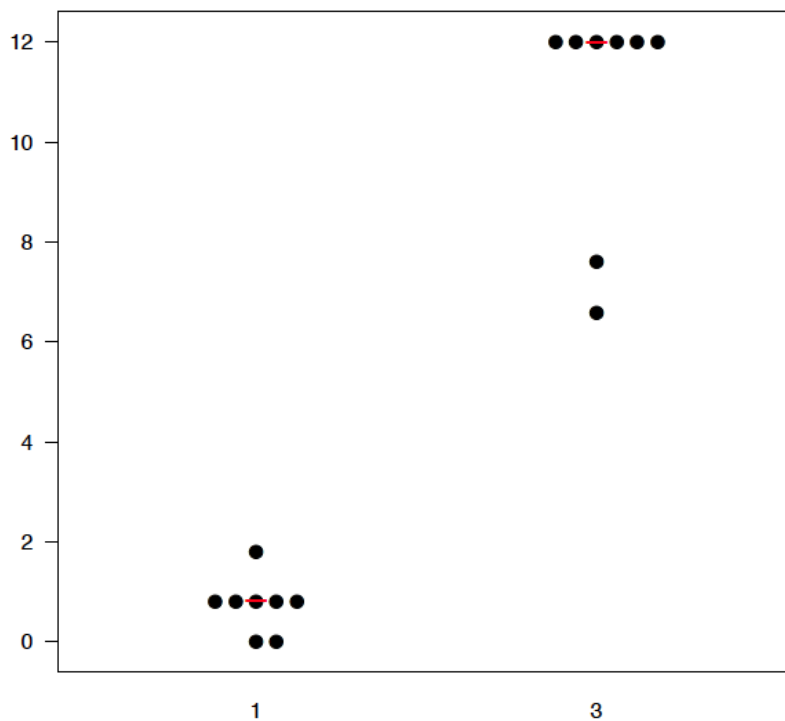


Abbildung 5-55 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3)  $p<0,001$



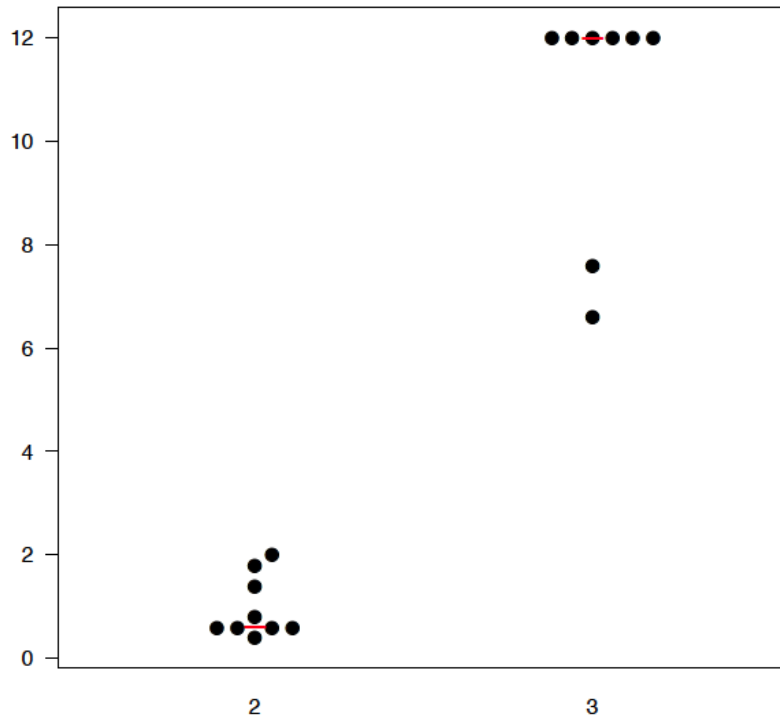


Abbildung 5-56 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3)  
 $p < 0,001$

**5.3.3.2 Total Score**

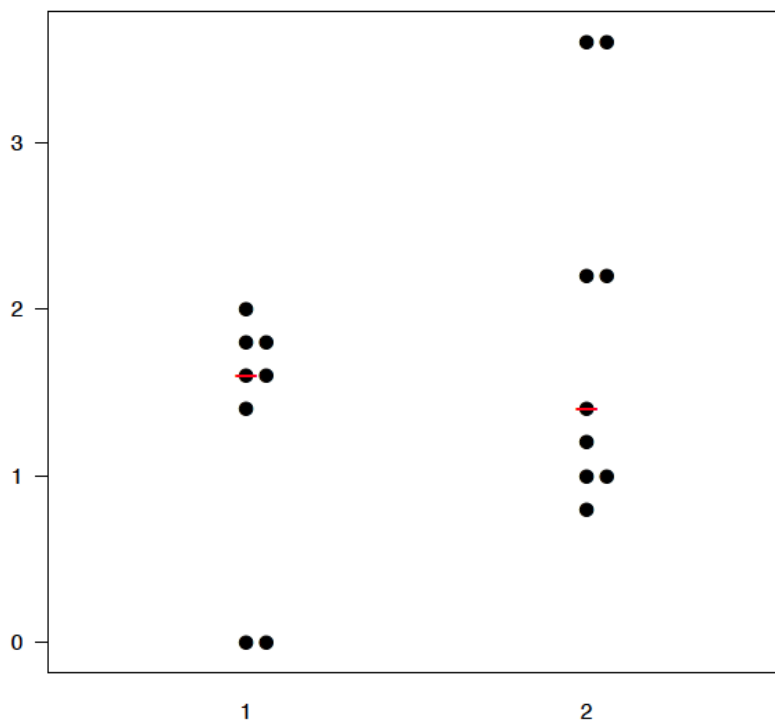


Abbildung 5-57 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2)  $p = 0,559$

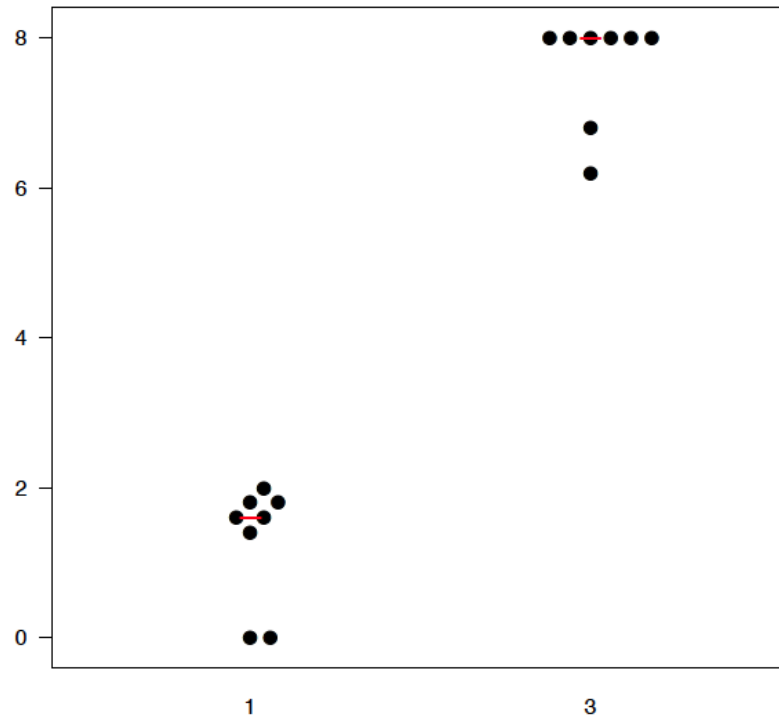


Abbildung 5-58 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3)  $p < 0,001$

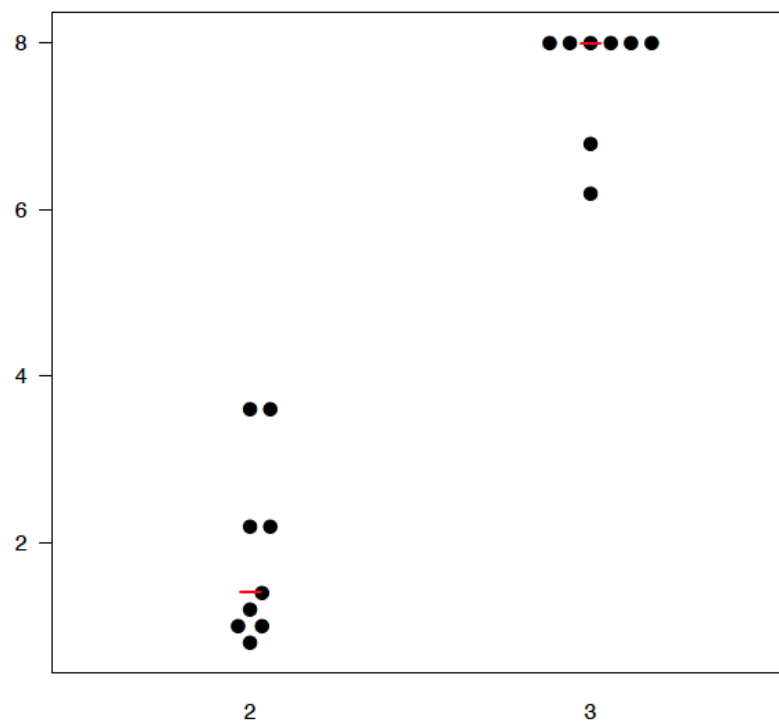


Abbildung 5-59 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3)  $p < 0,001$

### 5.3.3.3 Diagnostische Güte des HBD-3-Ergebnis

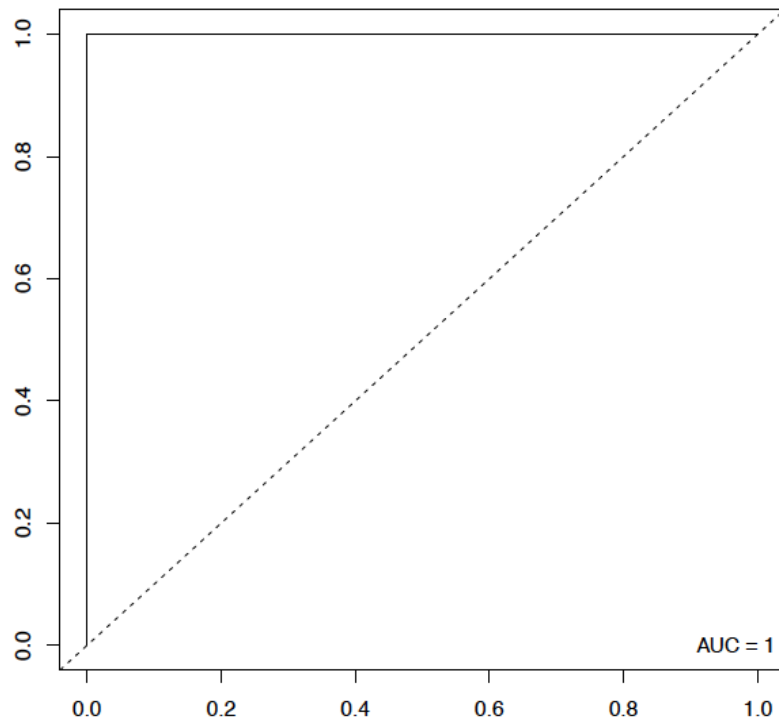


Abbildung 5-60 HBD-3: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) AUC=1

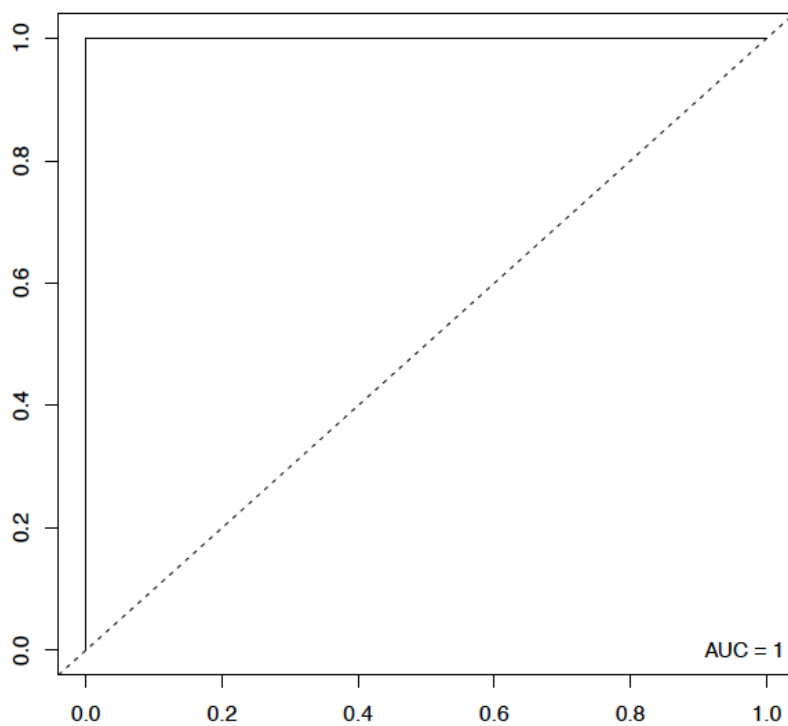


Abbildung 5-61 HBD-3: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) AUC=1

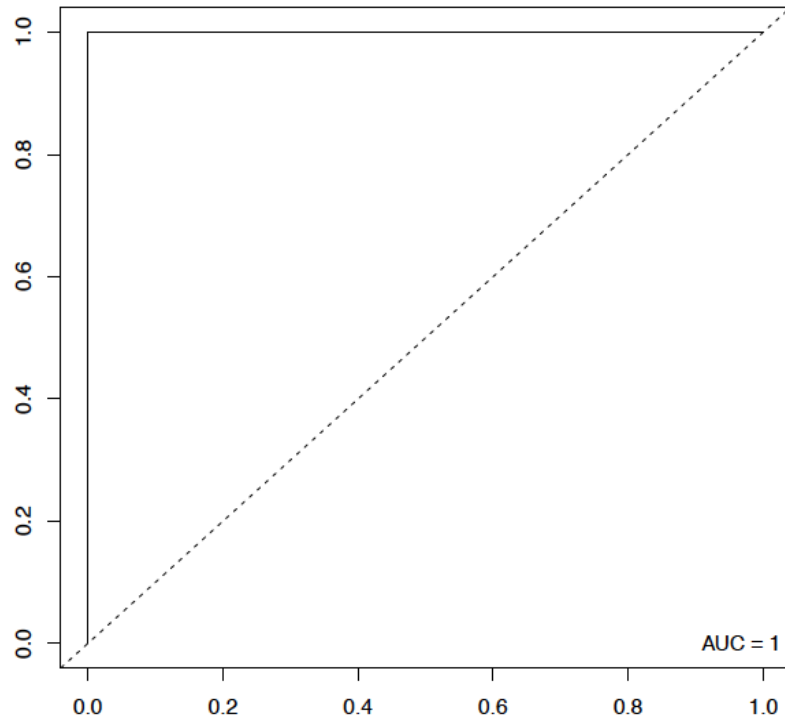


Abbildung 5-62 HBD-3: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) AUC=1

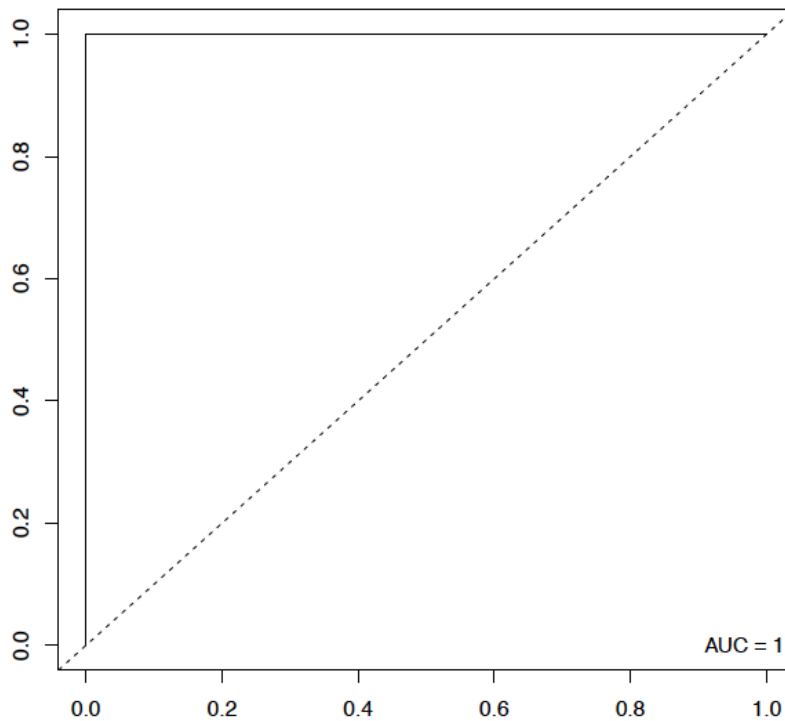


Abbildung 5-63 HBD-3: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) AUC=1

### 5.3.4 LL-37

Die immunhistochemischen LL-37-Ergebnisse der Paraffingewebe wurden für die Kollektive **pTEP, aseptische und septische Lockerung** mit Hilfe des Immunreaktiven Score nach Remmele und Steger (IRS) sowie des Total Score nach Allred (TS) ausgewertet. Dazu wurden Mittelwerte (MW), Standardabweichung (SD) sowie der Median berechnet. Der Median wird in den folgenden Diagrammen als roter Balken dargestellt.

LL-37		pTEP	Aseptische Lockerung	Septische Lockerung
MW ± SD	IRS	0,30 ± 0,43	0,67 ± 0,35	5,93 ± 4,10
	TS	0,63 ± 0,88	1,31 ± 0,68	5,23 ± 2,15
Median	IRS	0,10	0,80	5,30
	TS	0,20	1,60	5,20

Tabelle 5.3-5 LL-37 Paraffingewebe, Auswertung der Mittelwerte, Standardabweichung und Median

Bei der Gegenüberstellung der LL-37-Ergebnisse der Gruppen pTEP und aseptische Lockerung ergab sich kein signifikanter Unterschied. Als nächstes wurden die Gruppen pTEP und septische Lockerung miteinander verglichen. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied in der LL-37-Expression. Anschließend wurden die beiden Gruppen aseptische Lockerung und septische Lockerung gegenübergestellt. Bei p-Werten von jeweils <0,001 (IRS und TS) konnte ebenfalls ein signifikanter Unterschied gezeigt werden.

LL-37	Score	pTEP vs. Asept.	pTEP vs. Sept.	Asept. Vs. Sept.
p-Wert	IRS	0,074	<0,001	<0,001
	TS	0,083	<0,001	<0,001
AUC	IRS	-	1	1
	TS	-	1	1

Tabelle 5.3-6 LL-37 Paraffingewebe, p-Werte und AUC-Werte beim Vergleich der Gruppen

Auch die LL-37-Ergebnisse der Paraffinschnitte sind deutlich. In der Synovialmembran einer primären Implantation und im aseptischen periprothetischen Gewebe kommt es zu keiner signifikanten LL-37-Expression. Allerdings zeigt sich eine klare Erhöhung der LL-37-Expression im septischen Gewebe nach der Exposition gegenüber grampositiven Erregern. Das eindeutige Resultat spiegelt sich in der diagnostische Güte der LL-37-Ergebnisse wider. Der AUC-Wert liegt für den IRS sowie für den TS bei 1. Die Grenzwertoptimierungskurven (ROC-Kurven) steigen zu Beginn senkrecht an, was einer Sensitivität von 100 % entspricht. Die Werte wurden richtig interpretiert, da die ROC-Kurven deutlich oberhalb der 45°-Diagonalen liegen. Somit besitzen die Tests der LL-37-Ergebnisse eine hervorragende diagnostische Güte.



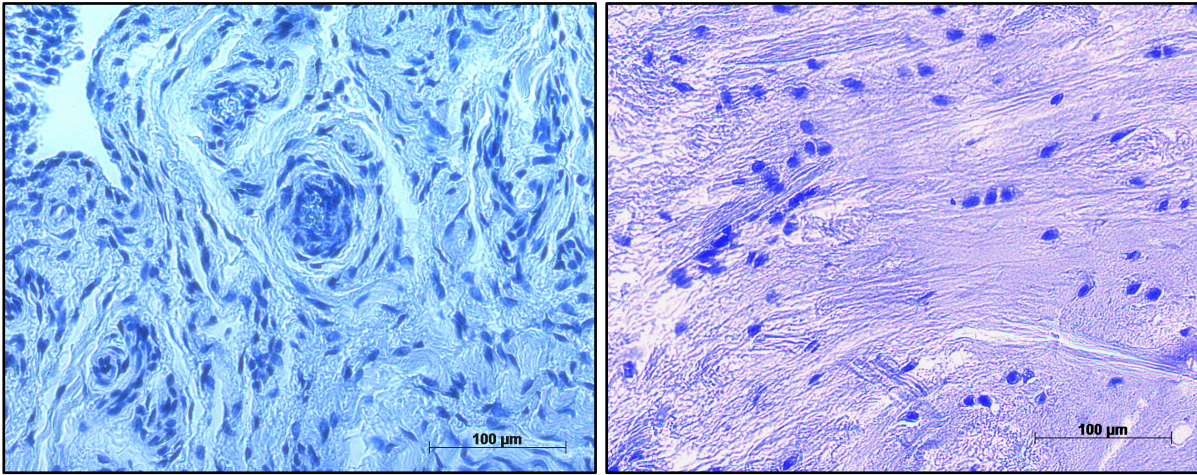


Abbildung 5-64 Paraffinschnitt LL-37 primäre TEP

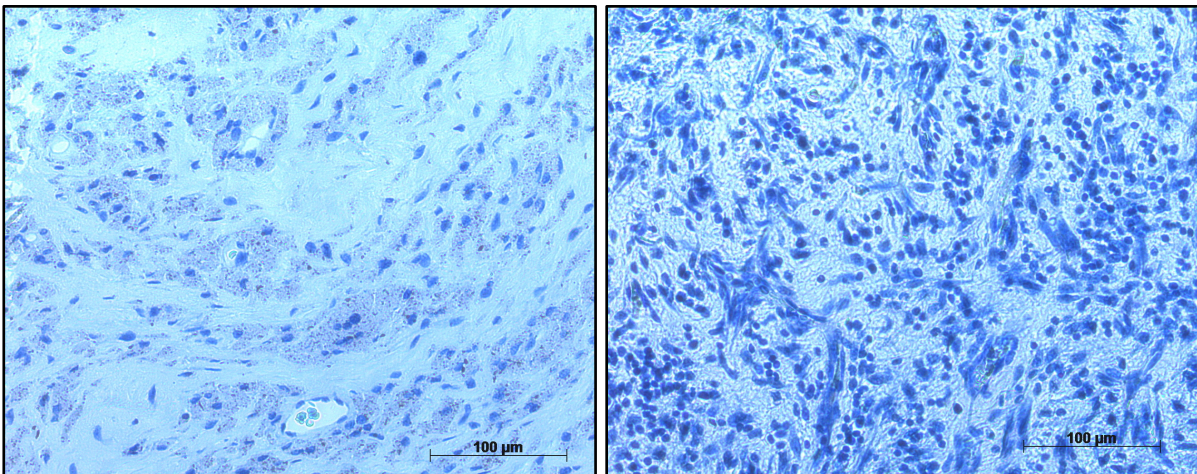


Abbildung 5-65 Paraffinschnitt LL-37 aseptische Lockerung

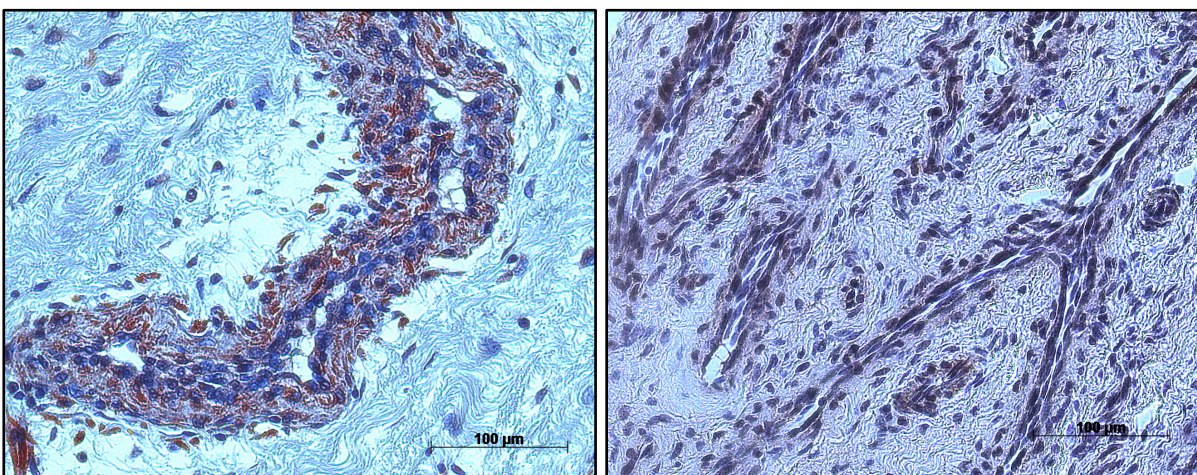
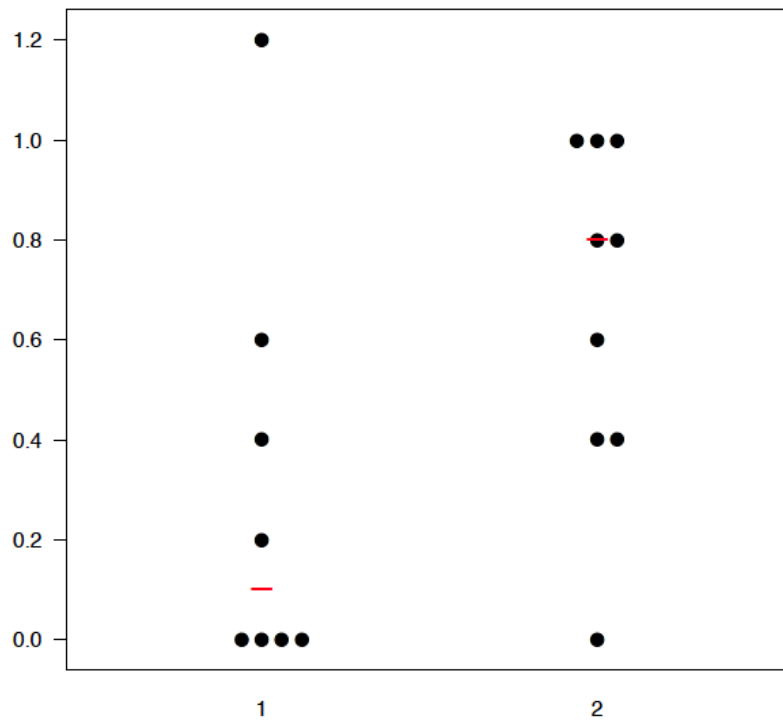
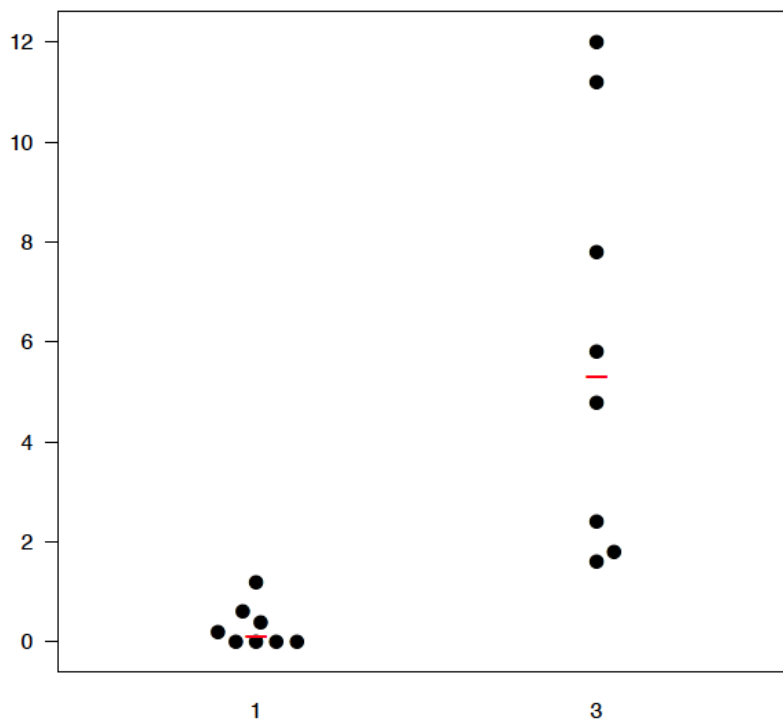


Abbildung 5-66 Paraffinschnitt LL-37 septische Lockerung

**5.3.4.1 Immunreaktiver Score**Abbildung 5-67 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2)  $p=0,074$ Abbildung 5-68 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3)  $p<0,001$

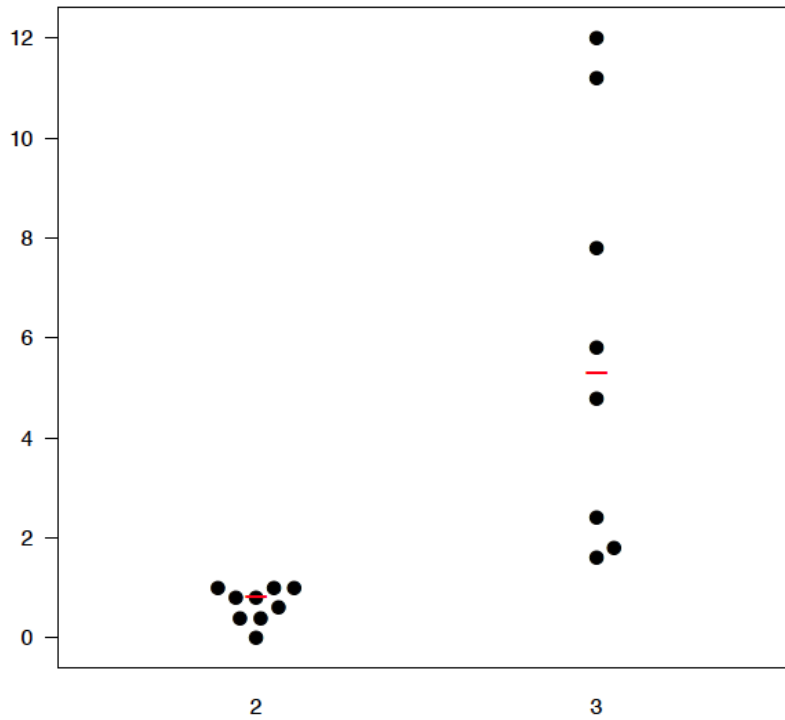


Abbildung 5-69 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3)  $p < 0,001$

### 5.3.4.2 Total Score

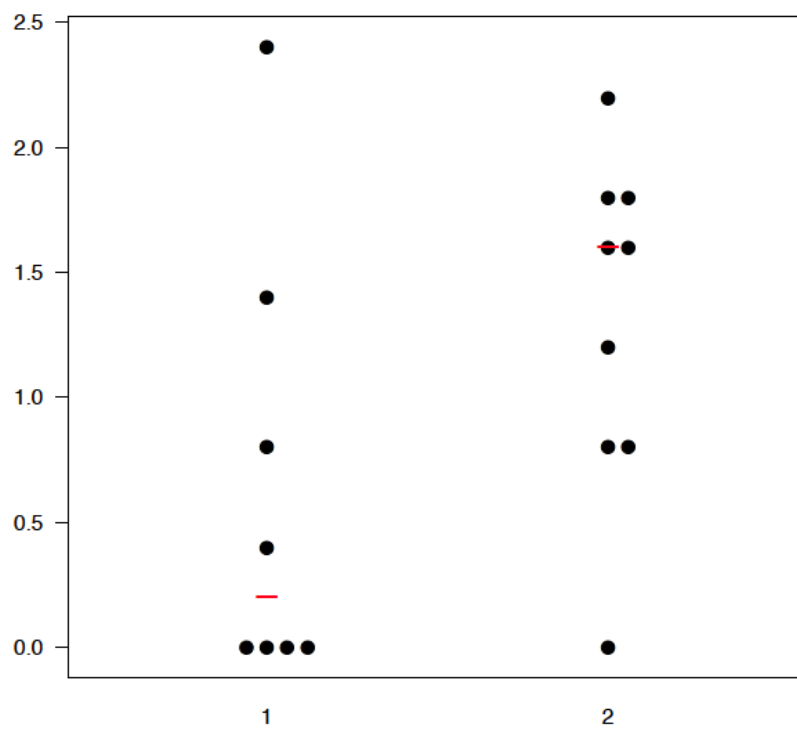


Abbildung 5-70 TS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2)  $p = 0,083$



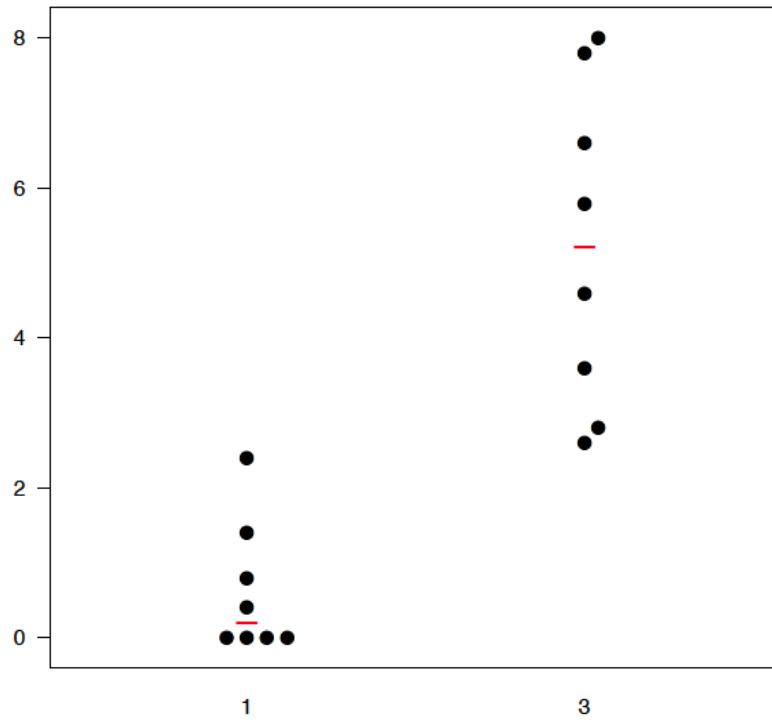


Abbildung 5-71 TS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3)  $p < 0,001$

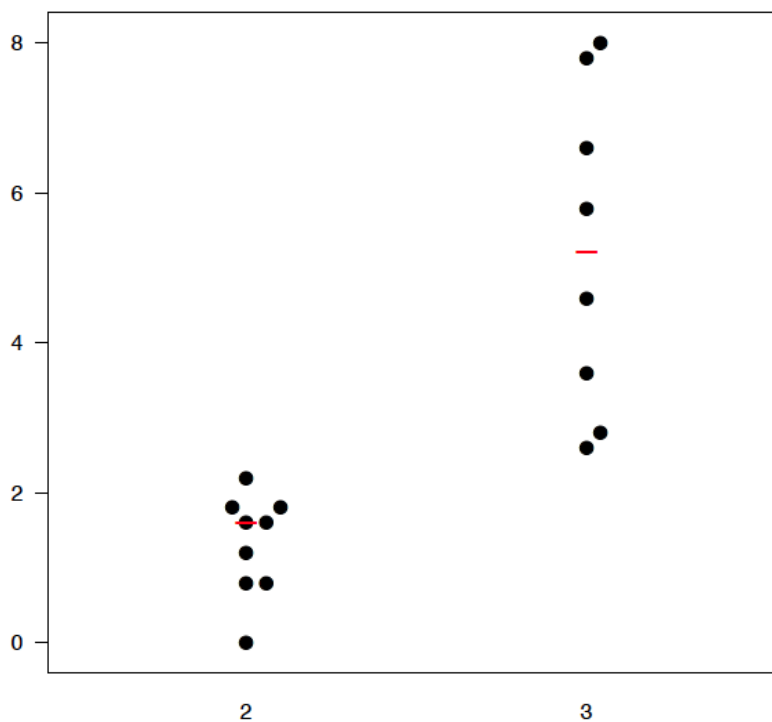


Abbildung 5-72 TS LL-37: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3)  $p < 0,001$

### 5.3.4.3 Diagnostische Güte des LL-37-Ergebnis

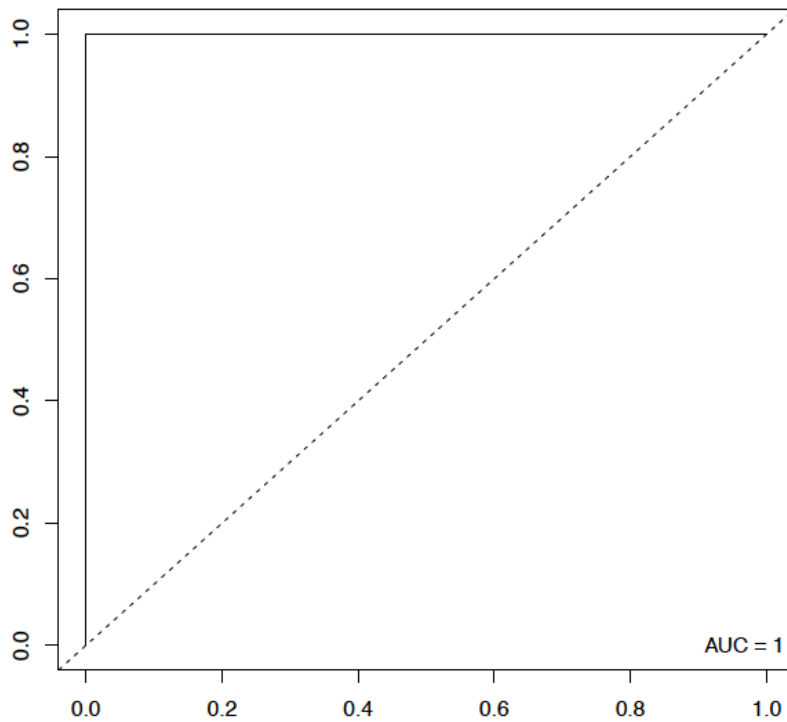


Abbildung 5-73 LL-37: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) AUC=1

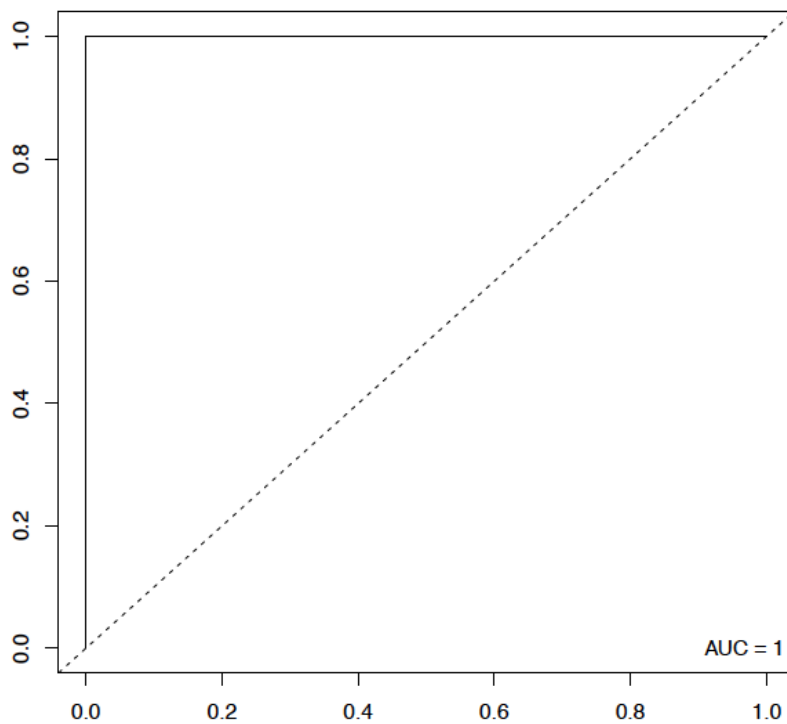


Abbildung 5-74 LL-37: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) AUC=1

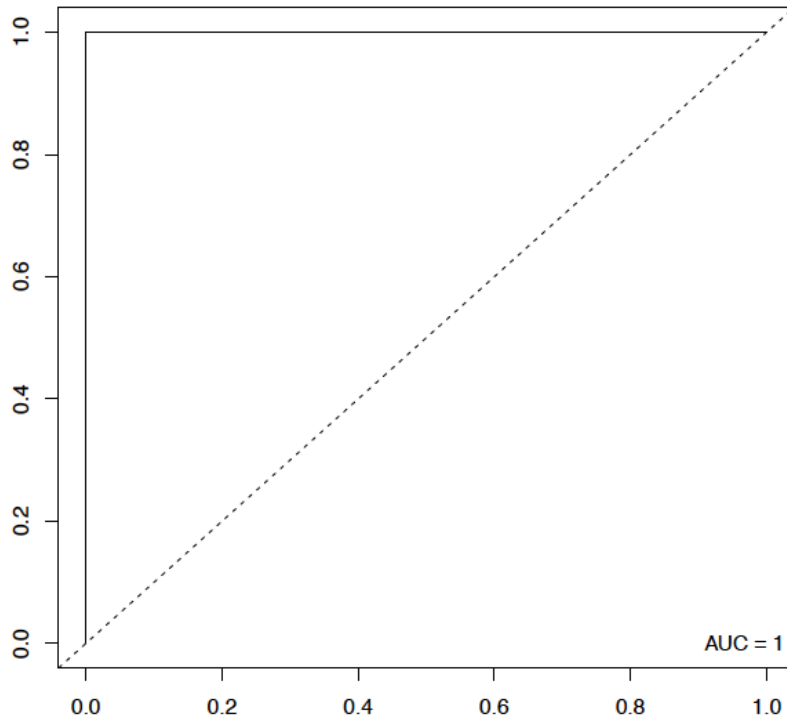


Abbildung 5-75 LL-37: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) AUC=1

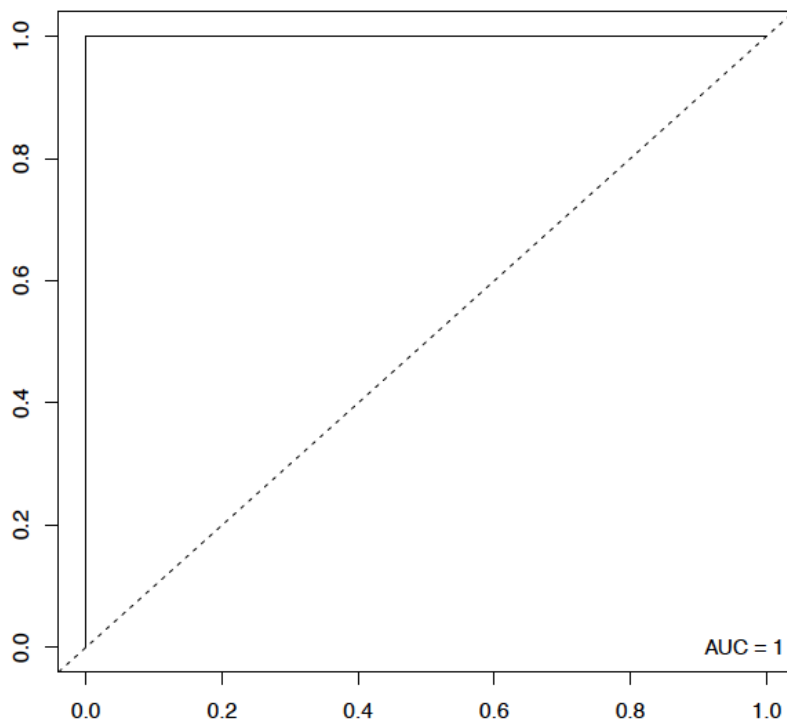


Abbildung 5-76 LL-37: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) AUC=1

## 6 Diskussion

Die Implantation einer Hüfttotalendoprothese wurde im Jahr 2007 zur Operation des Jahrhunderts erklärt (Learmonth et al., 2007). Studien haben gezeigt, dass es in den vergangenen Jahren weiter zu einer starken Zunahme an Implantationen von künstlichen Gelenken gekommen ist. In Deutschland wurden 2014 laut deutschem Endoprothesenregister 400.000 primäre HTEPs und KTEPs implantiert. Auch der Gelenkersatz von Schulter-, Sprung- und Ellenbogengelenken nimmt deutlich zu. Durch dieses kontinuierliche Wachstum von Primärimplantationen steigt die Zahl infektbedingter Endoprothesenrevisionen ebenfalls an. Diese operativen Revisionen sind mit einem gewaltigen Aufwand verbunden (Banke, Stade, et al., 2015). Der periprothetische Infekt (PPI) stellt nicht nur für den betroffenen Patienten selbst, sondern auch für die Gesellschaft eine große Belastung dar. Aufgrund der logistischen und monetären Aspekte gilt der PPI in der Gesundheitsbranche als starker wirtschaftlicher Faktor. Im Gesundheitssystem der USA verursachte der PPI im Jahr 2009 Ausgaben von 566 Millionen US-Dollar (\$). Bis 2020 wird ein Anstieg auf 1,62 Milliarden \$ erwartet (S. M. Kurtz, Lau, Watson, Schmier, & Parvizi, 2012). In Anbetracht dieser Entwicklung liegt die Notwendigkeit der frühzeitigen Diagnostik des PPI, sowie die Erfordernis einer sicheren Bestimmung des LG-PPI auf der Hand.

Zum aktuellen Stand der Diagnostik ist es besonders schwierig, den LG-PPI zu erkennen (Morawietz et al., 2006). Bislang bleibt eine diagnostische Lücke. Die Biomarker-Diagnostik mit AMPs weist den Weg für neuartige und frühzeitige Möglichkeiten periprothetische Infektionen und den gefürchteten LG-PPI sicher zu bestimmen (Banke, Stade, et al., 2015).

Beim LG-PPI kommt es zu einer Expression von AMPs, die zur Immunabwehr in die Gelenkflüssigkeit abgegeben werden (Gollwitzer et al., 2013). Auch später entstandene Arbeiten konnten ähnliche Ergebnisse erzielen. In einer Studie von Liu et al. wurde ein signifikanter Anstieg der Expression von HBD-3 in infiziertem periprothetischen Gewebe, im Vergleich zur Expression in Gewebe einer aseptischen Lockerung und der normalen Kontrollgruppe, mittels Immunfluoreszenz gezeigt (Liu et al., 2014). In dieser Studie gelang es ebenfalls, über die Intensität der Anfärbung des Synovialgewebes einen Unterschied zwischen periprothetischer Gelenkinfektion, aseptischer Lockerung und der Kontrollgruppe darzustellen. Auch Liu ist der Ansicht, dass dies zur Entwicklung eines neuen synovialen histopathologischen Markers und somit zur Differenzierung zwischen Infekt und Lockerung des künstlichen Gelenks beitragen könnte (Liu et al., 2014). Jedoch wurden in dieser Studie Gelenkinfekte mit einer Vielzahl unterschiedlicher grampositiver und gramnegativer Erregertypen eingeschlossen, nur ein AMP untersucht, und offen gelassen um welche Art von

infizierten Gelenken und Endoprothesen es sich handelt. Ein solch stark heterogenes Kollektiv bei niedriger Fallzahl hat damit nur eine beschränkte Aussagekraft.

Den großen Vorteil der AMP-Diagnostik beschreibt Chen in der minimalen Invasivität des Verfahrens. Außerdem sei diese direkte Nachweismethode des LG-PPI zuverlässiger, als die bisherige Diagnostik über Serumwerte, da Patienten häufig an Begleiterkrankungen leiden, anderenorts Entzündungen aufweisen oder unter antibiotischer Therapie stehen (Chen et al., 2014). Zudem konnte die höhere diagnostische Genauigkeit synovialer AMP-Marker gegenüber systemischer Biomarkeranalysen bestätigt werden (Gollwitzer et al., 2013). Das Zeitalter der Diagnostik durch synoviale Biomarker, als empfindliches und spezifisches Verfahren zur Diagnostik des LG-PPI, ist somit angebrochen (Deirmengian et al., 2014; Matsen Ko & Parvizi, 2016). Ältere Verfahren, wie die Verwendung von BSG und CRP-Serologie, mikrobiologische Analysen und die histologische Auswertung, können durch neue Biomarker ergänzt und verbessert werden (Chen et al., 2014).

Mit der AMP-Diagnostik eröffnen sich neuartige Möglichkeiten. Der LG-PPI kann frühzeitig diagnostiziert werden. Postoperative Kontrollen könnten einen neuen Standard in der Prothetik erreichen. Dadurch ist es gelungen, Auswirkung auf die Entwicklung der Endoprothetik zu nehmen. Nicht nur der enorme ökonomische Aufwand, sondern vor allem die psychische und physische Belastung der betroffenen Patienten kann dadurch stark reduziert werden (Borgquist, A, Dale, Lidgren, & Stefansdottir, 2014).

Diese Arbeit zeigt, dass es beim PPI und beim LG-PPI zur signifikanten Hochregulation der AMP-Expression periprothetischen Membranen kommt.

## 6.1 Kritische Analyse

### 6.1.1 Patientenkollektiv

Die statistisch miteinander verglichenen Kollektive sind mit Fallzahlen von acht primären Implantationen, neun aseptischen Revisionsoperationen sowie acht septischen Revisionen nicht sehr groß. Trotz dieser kleinen Fallzahl sind die Ergebnisse signifikant und sollten als „*proof of principle*“ verstanden werden. Die einzelnen Patientenkollektive waren mit einem Alter von 70 Jahren bei Primärimplantationen, 73 Jahren bei aseptischen Revisionsprothesen und 70 Jahren bei septischen Revisions-TEPs gut miteinander vergleichbar (**Tabelle 5.1-1**). Eindeutige mikrobiologische Endbefunde dienten dazu, die Patienten in das richtige Kollektiv einzuteilen. Das Verhältnis zwischen 13 Männern und 12 Frauen war unwesentlich zu Gunsten der Männer verschoben.

### 6.1.2 Keimspektrum

Der klassische Keim für die **Frühinfektion** einer Endoprothese ist der Methicillin-sensible *Staphylococcus aureus*, MSSA (Lohmann et al., 2007). Bei den häufigeren und klinisch deutlich relevanteren **Spätinfektionen** wie dem chronischen LG-PPI zeigen sich niedrig virulente Keime der normalen Hautflora wie die Koagulase-negative Staphylokokken als häufigste Auslöser fremdkörperassoziierter Infektionen (Inman et al., 1984). Der absolut häufigste Verursacher von Spätinfektionen ist dabei der grampositive Erreger *Staphylococcus epidermidis* (Lohmann et al., 2007). In 74% der mikrobiell besiedelten Isolate werden grampositive Kokken nachgewiesen. Das Erregerspektrum des hier verwendeten Patientenkollektivs repräsentiert genau dieses in der Literatur beschriebene häufigste Keimspektrum. Nur grampositive Katalase-positive und Koagulase-negative Erreger wie *Staphylococcus epidermidis* wurden in die Studie eingeschlossen. Dadurch konnte trotz der kleineren Fallzahlen bei sehr homogenem Kollektiv ein signifikantes Ergebnis ermittelt werden. Für die Positivkontrolle der HBD-2-Ergebnisse wurden zwei Probanden mit einem intraoperativen gramnegativen Keimnachweis verwendet. In beiden Fällen wurde der mikrobiologische Nachweis von *E. coli* erbracht. Dieser gramnegative Erreger löst eine verstärkte HBD-2-Expression aus (Nishimura et al., 2004; Shiba et al., 2003), und war daher für die Positivkontrolle der HBD-2-Experimente geeignet.

### 6.1.3 Scores

Der Immunreaktive Score nach Remmele und Steger (Remmele & Stegner, 1987), sowie der Total Score nach Allred (Allred et al., 1998) sind bereits seit langem etablierte Scores zur Auswertung semiquantitativer Verfahren. Bei genauer Betrachtung fällt auf, dass beim IRS, um einen hohen Punktwert zu erreichen, die Gewichtung durch das Multiplizieren von SI und PP etwas zu Gunsten einer guten Färbereaktion verschoben ist. Auf der anderen Seite sind jedoch beim IRS hohe Prozentsätze gefärbter Zellen nötig, um Spitzenwerte zu erzielen. Beim TS reichen hingegen wenige gefärbte Zellen aus, um den Cut-off zu erreichen. Spitzenwerte sind jedoch nur bei zusätzlich guter SI möglich. Somit werden beim IRS schneller signifikante Werte über die SI und beim TS durch eine hohe Anzahl an gefärbten Zellen erreicht.

In dieser Arbeit zeigten sich in Zellkultur und Paraffingewebe für die AMPs HBD-3 und LL-37 eine hohe SI und auch hohe Prozentsätze bei PP bzw. PS. Schlussendlich entschieden wir uns zur Verwendung beider Scores, wodurch sich jeweils signifikante Ergebnisse ermitteln ließen.

### 6.1.4 Wachstum

In der logarithmischen Phase (log-Phase) findet ein exponentielles Wachstum statt. Dadurch kommt es zu einer Kurve. Die Steilheit der Kurve entspricht der Teilungsrate. Bei zunehmender Zelldichte nimmt die Teilungsrate, und damit das Wachstum, wieder ab. Diese natürliche Hemmung findet bei allen Nichttumorzellen statt und wird durch die Kontaktinhibition verursacht (Lindl T., 2008). Das Passagieren bei der in vitro Aufzucht von Zellen sollte optimalerweise in einer Phase des maximalen Wachstums (log-Phase) kurz vor der stationären Phase erfolgen. Mit dem Mikroskop kann man das Wachstum beobachten und die Zellen bei erreichter Monolayerkultur und vitaler Zellmorphologie passagieren.

Betrachtet man die Wachstumskurven dieser Arbeit, stellt man fest, dass für alle drei Kollektive (pTEP, aseptische und septische Lockerung) eine nahezu optimale Wachstumskurve erreicht wurde. Dies spricht für ein hohes Maß an Genauigkeit und einer guten Zellteilungsrate.

### 6.1.5 Identifikation

Die immortalisierten humanen Synovialozyten der K4IM-Linie sind ein geeignetes in vitro System, um Mechanismen synovialer Fibroblasten zu untersuchen (Haas et al., 1997), und dienen zur Gewebeidentifikation des entnommenen Synovialgewebes. In der Literatur wurde diese Zelllinie schon mehrfach zur Identifikation humaner Synovialozyten herangezogen und ist gut beschrieben. Da es keinen separaten, einzelnen Marker für Synovialozyten gibt, war es nötig typische Synovialozytenmarker in ihrer Zusammenschau zu betrachten (Gollwitzer et al., 2013; Nagai et al., 2006; Nozawa-Inoue et al., 1999). Hierzu wurde das spezifische Färbemerkmal morphologisch miteinander verglichen.

Lamin zeichnet sich durch einen gut gefärbten perinukleären Zellkörper aus, in dem randständig ein auffälliger Granulasaum zu erkennen ist. Die Zellausläufer bleiben hingegen ungefärbt. Vimentin verfärbt die gesamte Zelle rotbräunlich. Der Zellkörper ist durch stärker gefärbte Fasern, welche vom Zellkern wegläufen, gekennzeichnet. Auch bei HSP 27 ist die gesamte Zelle, wenn auch in den Ausläufern etwas verblasst, angefärbt. Des Weiteren sind einzelne Granula zu erkennen. CD 68 zeigt eine deutliche perinukleäre Granulaanfärbung bei ansonsten ungefärbter Zelle.

So wurde sichergestellt, dass bei den Experimenten mit dem gewünschten Zelltyp gearbeitet wurde.



### 6.1.6 Aktuelle AMP Diagnostik

Nach der Entdeckung der antimikrobiellen Peptide 1966 als Bestandteil des angeborenen Immunsystems durch Zeya und Spitznagel (Ganz, 1999, 2003; Zeya & Spitznagel, 1966) weiß man heute um ihre Eigenschaften bei der aktiven Abwehr von grampositiven sowie gramnegativen Bakterien (De Smet & Contreras, 2005; Lai & Gallo, 2009). In humanen Geweben werden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Defensine exprimiert (Ganz, 2003; Harder & Schroder, 2005). Vor allem  $\beta$ -Defensine zeigen aufgrund ihrer Proteinstruktur antimikrobielle Eigenschaften (Selsted et al., 1993).

Eine verstärkte antimikrobielle Wirkung von HBD-2 konnte gegenüber gramnegativen Bakterien nachgewiesen werden (Nishimura et al., 2004; Shiba et al., 2003). Im Vergleich dazu zeigte sich eine verminderte HBD-2-Expression gegenüber grampositiven Bakterien wie Staphylokokken (Harder & Schroder, 2005).

HBD-3 zeichnet sich vor allem durch eine verstärkte antimikrobielle Wirkung gegenüber grampositiven Bakterien aus (Harder et al., 2001). Analysen bestätigten, dass die menschliche HBD-3-Expression mit dem Ausmaß der Entzündungsreaktion des Gewebes korreliert. HBD-3 hat somit das Potenzial über die Intensität der Expression den Grad der lokalen Infektion wiederzugeben (Liu et al., 2014).

LL-37 ist das einzig bekannte humane Cathelicidin und wird in Epithelien (Sayama et al., 2005) aber auch in neutrophilen Granulozyten, Mastzellen und natürlichen Killerzellen gebildet. LL-37 übernimmt bei der Keimabwehr eine wichtige antimikrobielle Funktion als Teil des unspezifischen, angeborenen Immunsystems (Bals, 2000; Schwab et al., 2007; Sorensen et al., 1997). Des Weiteren versucht LL-37 die Bildung des periprothetischen Biofilms zu verhindern und reguliert die lokale Entzündungsantwort (Chen et al., 2014).

Von den AMPs HBD-2, HBD-3 und LL-37 ist eine hohe diagnostische Genauigkeit bei der Diagnose des PPI und des LG-PPI bekannt. Sie dienen in der Punktatdiagnostik als spezifische Biomarker (Chen et al., 2014; Gollwitzer et al., 2013). Zuletzt zeigten diese AMPs in der Kombination mit proinflammatorischen Zytokinen im Gelenkpunktat eine exzellente diagnostische Genauigkeit (HBD-3 und IL-4: 97,2%, LL-37 und IL-4 91,6%, LL-37 und IL-6: 89,5%) (Gollwitzer et al., 2013).

Im periprothetischen Gewebe konnte mit dieser Arbeit ebenso eine hervorragende Genauigkeit in der AMP-Diagnostik beschrieben werden. Hierzu wurden die Zellen der Zellkultur sowie Paraffingewebe für die Patientenkollektive primäre TEP, aseptische und septische Lockerung ausgewertet und statistisch verglichen.

## 6.2 Zellkultur

Die entnommenen Zellen der Gruppen pTEP und aseptische Lockerung hatten keine Interaktion mit Keimen. Die Zellen der Gruppe septische Lockerung waren ausschließlich mit grampositiven, Katalase-positiven und Koagulase-negativen Staphylokokken konfrontiert.

Gegenüber grampositiven Bakterien kommt es nur zu einer sehr geringen HBD-2-Expression. Bei Geweben, die keinen Kontakt zu Keimen haben, wird lediglich eine basale Menge an HBD-2 gebildet. (Harder & Schroder, 2005). In Übereinstimmung damit konnten die HBD-2-Ergebnisse der Zellkulturversuche belegen, dass es auch bei der HBD-2-Expression in Synovialmembranen von primären Implantationen und in periprothetischen Membranen der aseptischen und septischen Lockerung zu keiner signifikanten Erhöhung von HBD-2 kommt.

Die HBD-3-Ergebnisse der Zellkulturversuche zeigen, dass es in der Synovialmembran einer primären Implantation zu keiner signifikanten HBD-3-Expression kommt. Auch in der periprothetischen Membran bei Patienten mit aseptischer Lockerung führt es nur zu einer geringen Erhöhung an HBD-3. Harder beschreibt eine verstärkte antimikrobielle Wirkung von HBD-3 gegenüber grampositiven Bakterien (Harder et al., 2001). Auch in dieser Arbeit resultiert eine signifikante HBD-3-Expression in septischen Zellen mit grampositivem Keimnachweis. Sehr deutlich wird dies beim Vergleich der p-Werte der einzelnen Gruppen.

Ähnlich wie bei den HBD-3-Ergebnissen zeigt sich auch bei den Zellkulturversuchen mit LL-37, dass es in der Synovialmembran einer primären Implantation zu einer wenig signifikanten LL-37-Expression kommt. Bereits in der periprothetischen Membran bei Patienten mit aseptischer Lockerung resultiert im Vergleich zur pTEP eine signifikante Erhöhung an LL-37. Noch deutlicher und signifikanter ist die Erhöhung der LL-37-Expression in septischen Zellen mit einem grampositiven Keimnachweis. Hier unterscheiden sich aseptische von septischer Lockerung deutlich. Besonders klar wird dies durch die Signifikanz der p-Werte beim Vergleich der einzelnen Gruppen.

### 6.3 Paraffingewebe

Als Besonderheit wurde eine Positivkontrolle der HBD-2-Färbungen durchgeführt. So konnte im Vorfeld nicht nur die HBD-2-Konzentration auf 1 µg/ml festgelegt werden, vor allem diente die Positivkontrolle zur Sicherung der Validität des negativen HBD-2-Ergebnisses. Das Gewebe der Gruppe septische Lockerung war ausschließlich mit grampositiven Koagulase-negativen Staphylokokken konfrontiert. Gegenüber grampositiven Bakterien kommt es jedoch nur zu einer sehr geringen HBD-2-Expression. Allerdings findet als Reaktion auf eine gramnegative Keimbeseidlung eine starke HBD-2-Expression im Gewebe statt (Harder & Schroder, 2005). Die Gewebeschnitte von zwei Patienten mit einem intraoperativen, gramnegativen Keimnachweis wurden als Positivkontrolle verwendet. Sie zeigten beide ein valides Färbefeld nach dem Auftragen der HBD-2-Arbeitslösung mit der identischen Konzentration von 1 µg/ml.

Die signifikanten Unterschiede in der Auswertung der HBD-2-Paraffinergebnisse zwischen der primären Implantation und der aseptischen Lockerung, sowie zwischen der primären Implantation und der septischen Lockerung, müssen relativiert werden. Sämtliche IRS- und TS-Werte für die HBD-2-Expression in Gelenkmembranen liegen bereits vor der statistischen Berechnung unter dem Cut-off-Wert von 2 Punkten (4.8.1ff). Das heißt, die ermittelten Rohwerte für IRS und TS müssen bereits als negativ gewertet werden. Das Resultat spiegelt sich auch in der diagnostischen Güte der HBD-2-Ergebnisse wieder. Die Werte der *area under the curve* (AUC) liegen für den IRS sowie für den TS zwischen 0,60 und 0,75. Das bedeutet, dass die Grenzwertoptimierungskurven (*receiver operating characteristic curve*, ROC-Kurven) keiner hohen Sensitivität entsprechen. Da die ROC-Kurven oberhalb der 45°-Diagonalen liegen wurden die Werte richtig interpretiert. Somit besitzen die Tests der HBD-2-Ergebnisse keine hohe diagnostische Güte.

Noch eindrucksvoller als in den Zellkulturversuchen sind die Ergebnisse der HBD-3-Expression der jeweiligen Paraffingewebe. In der Synovialmembran kommt es bei der primären Implantation zu keiner signifikanten HBD-3-Expression. Ebenso verhält es sich in der periprothetischen Membran bei Patienten mit aseptischer Prothesenlockerung. In der Membran bei Patienten mit einer septischen Lockerung besteht allerdings eine sehr hohe Expression von HBD-3. Deutlich wird dies durch die maximale Punktzahl für IRS und TS in der Gruppe septische Lockerung. Auch die Signifikanz der p-Werte beim Vergleich der einzelnen Gruppen unterstreicht das klare HBD-3-Ergebnis.

Das eindeutige Resultat spiegelt sich in der diagnostischen Güte der HBD-3-Ergebnisse wider. Der AUC-Wert liegt für den IRS sowie für den TS bei 1. Die Grenzwertoptimierungskurven (ROC-Kurven) steigen zu Beginn senkrecht an, was einer Sensitivität von 100 % bei einer Fehlerquote von 0 % entspricht. Die Werte wurden richtig interpretiert, da die ROC-Kurven deutlich oberhalb der 45°-Diagonalen liegen. Somit besitzen die Tests der HBD-3-Ergebnisse eine hervorragende diagnostische Güte.

Auch die LL-37-Ergebnisse der Paraffinschnitte sind noch deutlicher als die Ergebnisse der LL-37-Zellkulturversuche. In der Synovialmembran einer primären Implantation und im aseptischen periprothetischen Gewebe kommt es zu keiner signifikanten LL-37-Expression. Allerdings zeigt sich eine klare Erhöhung der LL-37-Expression im septischen Gewebe nach einer Exposition gegenüber grampositiven Erregern. Das eindeutige Resultat spiegelt sich in der diagnostische Güte der LL-37-Ergebnisse wider. Der AUC-Wert liegt für den IRS sowie für den TS bei 1. Die Grenzwertoptimierungskurven (ROC-Kurven) steigen zu Beginn senkrecht an, was einer Sensitivität von 100 % bei einer Fehlerquote von 0 % entspricht. Die Werte wurden richtig interpretiert, da die ROC-Kurven deutlich oberhalb der 45°-Diagonalen liegen. Somit besitzen die Tests der LL-37-Ergebnisse eine hervorragende diagnostische Güte.

## 6.4 Ausblick für weitere Forschung

Wie unter 4.9.2 beschrieben, wurden im Rahmen dieser Arbeit auch die niedrigen und hohen Passagen der einzelnen Gruppen (pTEP, aseptische Lockerung, septische Lockerung) untereinander verglichen und statistisch ausgewertet. Innerhalb einer Gruppe zeigte sich dabei keine Signifikanz. Zwischen der niedrigen und der hohen Passage liegen jedoch 150 Tage, in denen die Synovialozyten aus der Gruppe der septischen Lockerung keinen Kontakt zu einem Keim erfahren haben. Dennoch unterscheiden sich die Ergebnisse zwischen niedriger und hoher Passage fast nicht. Dies lässt die Annahme zu, dass es im Rahmen der AMP-Expression zu einem lang anhaltenden „on“-Mechanismus kommt, nachdem die Zelle mit einem Erreger konfrontiert war. Natürlich besteht bei der *in-vitro* Kultivierung von Zellen eine gewisse Stresssituation, welche die AMP-Expression triggern könnte. Dagegen spricht jedoch, dass es zu keinem Anstieg vom HBD-2 kam. Es sieht somit danach aus, dass die keimspezifische Reaktion der Zellen aufrecht erhalten wurde. Ebenfalls für einen „on“-Mechanismus spricht die IHC-Analyse eines Patienten der sich nach abgeschlossener Therapie eines periprothetischen Infekts erneut aufgrund einer aseptischen Lockerung zum Prothesenwechsel vorstellte.

Die erneuten intraoperativen Abstriche und das Punktat erbrachten keinen Erregernachweis. Dennoch zeigte sich eine positive AMP-Färbung der Zellkultur (**Abbildung 6-1**).

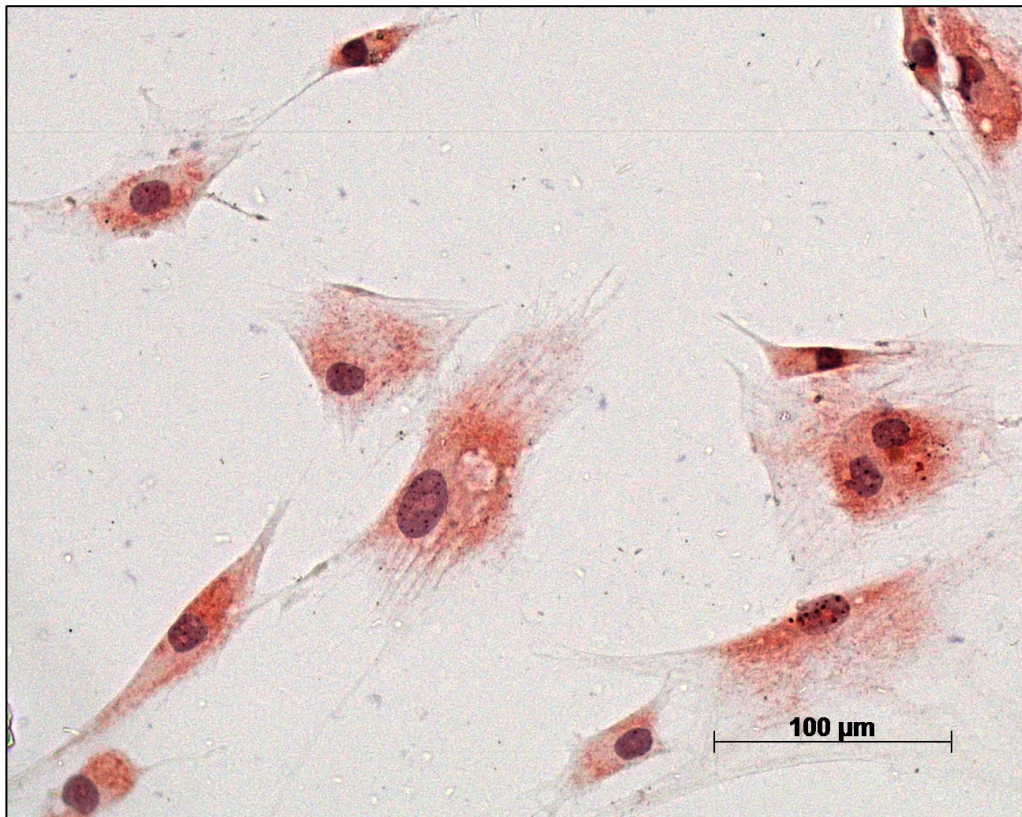



Abbildung 6-1 HBD-3 Färbebild von Synovialozyten nach PPI

## 6.5 Fazit


Das große Potenzial und die wachsende Bedeutung der synovialen Biomarkerdiagnostik zur sicheren und genaueren Differenzierung einer aseptischen von einer septischen Prothesenlockerung bei einliegendem Implantat wurden in dieser Arbeit dargestellt. Die diagnostische Lücke in der gegenwärtigen synovialen Infektdiagnostik könnte dadurch geschlossen werden. Innovative synoviale Biomarker aus der Gruppe der antimikrobiellen Peptide gelten aufgrund sehr guter bis exzellenter diagnostischer Genauigkeit als besonders vielversprechend. Welche diagnostischen Biomarker bei der zukünftigen synovialen Infektdiagnostik favorisiert werden, müssen größere Fallzahlen und unabhängige Multicenterstudien zeigen (Banke, Stade, et al., 2015).


# 7 Publikationen


## 7.1 Poster DKOU Berlin 2014




Klinikum rechts der Isar  
Technische Universität München







Muskuloskelettales Tumorzentrum



### Antimikrobielle Peptide (AMP) in der periimplantären Gelenkschleimhaut – neuartige diagnostische Marker der Endoprotheseninfektion

Banke IJ, Prodinger PM, Stade N, von Eisenhart-Rothe R, Burgkart R, Gollwitzer H


Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar, TU München, Ismaninger Str. 22, 81675 München

**Fragestellung**

Die sichere (präoperative) Differenzierung zwischen septischer und aseptischer Totalendoprothesen(TEP)lockerung ist Voraussetzung für den langfristig erfolgreichen Implantatwechsel.<sup>1,2</sup> Der periprotehetische Low-grade Infekt stellt jedoch, aufgrund der Kombination aus diagnostischer Lücke und klinisch weitestgehender Unauffälligkeit, ein großes Problem dar.<sup>1,2</sup> Gegenwärtige (Gold)Standarddiagnostika spiegeln hier eine unzureichende Genauigkeit (Blutserologie, Mikrobiologie des Gelenkpunkates), große Invasivität mit verzögerter Diagnosesicherung (Sonikation, Histopathologie) sowie eine fragliche Praktikabilität mit unzureichender Spezifität (Szintigraphie) wieder.<sup>2,3</sup> Von Anti-mikrobiellen Peptiden (AMP) als angeborene, endogene Antibiotika ist ein lokal wirksamer Schutz vor Infektionen bekannt. Unsere Arbeitsgruppe konnte kürzlich den Erstdnachweis von AMP's in der Gelenkflüssigkeit von Patienten mit periprotehetischem Hüft- und Knie-TEP-Infekt liefern.<sup>4</sup> Ihre diagnostische Genauigkeit übertraf dabei die gegenwärtiger Standarddiagnostika. Nun ist der histopathologische Nachweis dieser AMP's in der periprotehetischen Gelenkschleimhaut zur Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit perkutan, arthroskopisch oder offen chirurgisch gewonnener Gewebeproben zu erbringen.

**Material und Methode**

Im Rahmen der prospektiven klinischen EBM-Level II Studie wurde, mit Genehmigung der Ethikkommission, der Gehalt der AMP's Cathelicidin (LL-37), Humanes Beta-Defensin (HBD)-3 und HBD-2 in der Gelenkschleimhaut von Patienten mit septischen (n=8) und aseptischen (n=9) Hüft- und Knie-TEP-Lockerungen auf Paraffinschnitten mittels Immunhistochemie und semiquantitativer Auswertung (Total Score nach Allred, Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner) analysiert. Als Goldstandard der periprotehetischen Infektion diente die gegenwärtige international empfohlene Kombination aus klinischem Bild, Serologie, Mikrobiologie und Histopathologie. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test und SSPS 19.0/R 2.11.1 Software (Signifikanz bei p<0.05).



**Abbildung 1.** Entnahme peri-prothetischer Gelenkschleimhaut (\*) bei gelockerter Hüft-TEP zur immunhistochemischen Aufarbeitung.

**Ergebnisse**

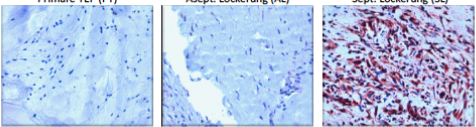
Die Gelenkschleimhaut von Patienten mit septischer gegenüber aseptischer Prothesenlockerung wies, in Analogie zu den kürzlich gezeigten Ergebnissen aus der Gelenkflüssigkeit<sup>4</sup>, eine signifikante Erhöhung sowohl von LL-37 als auch HBD-3 auf. Zudem zeigte sich in der Gelenkschleimhaut eine exzellente diagnostische Güte der beiden Biomarker mit einem AUC-Wert von jeweils 1. HBD-2 hingegen wies, wie auch schon von der Gelenkflüssigkeit bekannt, keine signifikanten Unterschiede auf (p=0.3).

**Cathelicidin (LL-37)**

Primäre TEP (PT)

Asept. Lockerung (AL)

Sept. Lockerung (SL)



**Total Score**

Gruppe	Score
PT	0.63
AL	1.31
SL	5.23

**Immunreaktiver Score**

Gruppe	Score
PT	0.3
AL	0.67
SL	5.93


\* p<0.05  
AUC = 1

**Humanes Beta-Defensin 3 (HBD-3)**

Primäre TEP (PT)

Asept. Lockerung (AL)

Sept. Lockerung (SL)



**Total Score**

Gruppe	Score
PT	1.28
AL	1.89
SL	7.62

**Immunreaktiver Score**

Gruppe	Score
PT	0.73
AL	0.98
SL	10.78

\* p<0.05  
AUC = 1

**Diskussion / Schlussfolgerung**

Erstmals werden in der Gelenkschleimhaut sowohl ein signifikanter Anstieg als auch eine exzellente diagnostische Güte zweier AMP's bei septischen Endoprothesenlockerungen gezeigt. Diese Erkenntnis kann wegweisend sein für die Optimierung der implantatassoziierten Infektdiagnostik zum Wohle des Patienten.

**Literatur**

<sup>1</sup>Banke I et al, *Orthopädie im Profil* 2014. <sup>3</sup>Parvizi J et al, *JBJS Am* 2014.  
<sup>2</sup>Gollwitzer H et al, *Orthopädie* 2006. <sup>4</sup>Gollwitzer H et al, *JBJS Am* 2013.

Abbildung 7-1 Poster DKOU Berlin 2014



## 7.2 Der Orthopäde 12/2015

### Leitthema

Orthopäde  
DOI 10.1007/s00132-015-3188-7

© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015



I.J. Banke<sup>1</sup> · N. Stade<sup>1</sup> · P.M. Prodingler<sup>1</sup> · H.M. Mühlhofer<sup>1</sup> · P. Thomas<sup>2</sup> · B. Thomas<sup>2</sup> · B. Summer<sup>2</sup> · M. van Griensven<sup>3</sup> · R. von Eisenhart-Rothe<sup>1</sup> · H. Gollwitzer<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar der TU München, München, Deutschland

<sup>2</sup> Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie der LMU München, München, Deutschland

<sup>3</sup> Experimentelle Unfallchirurgie, Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie, Klinikum rechts der Isar der TU München, München, Deutschland

<sup>4</sup> ATOS Klinik München, München, Deutschland

## Synoviale Biomarker für die Differenzialdiagnostik der schmerzhaften Endoprothese

**Bei der akuten (hämatogenen) Endoprotheseninfektion (PPI) mit in der Regel eindeutiger Klinik und oft systemischem fulminanten Verlauf ergibt die Punktion der Gelenkflüssigkeit meist einen makroskopisch eindeutigen putriden Aspekt mit massenhafter Erhöhung der neutrophilen Granulozyten, mikrobiologischem Keimnachweis nach 24- bis 48-stündiger Bebrütung und positiver Gram-Färbung. Die Entscheidungsfindung mit der Folge umgehender arthroskopischer oder offener chirurgischer Revision als orthopädischem Notfall-eingriff gilt in der Regel als relativ sicher aufgrund der hohen diagnostischen Genauigkeit der Kombination von Klinik sowie laborchemischen und zytologischen Parametern [29].**

### Differenzialdiagnostische Lücke des PPI

Im Gegensatz dazu reicht bei dem klinisch wesentlich häufigeren chronischen „low-grade“-PPI mit typischerweise unspezifischen Beschwerden und schleichendem Verlauf aufgrund ausbleibender systemischer Entzündungsreaktion sowie radiologisch oft fraglicher Implantatlockerung die aktuelle Standarddiagnostik, auch unter Zuhilfenahme erweiterter diagnostischer Maßnahmen wie einer verlängerten Bebrütungsdauer der mikrobiologischen Proben von 10–14 Tagen, oft nicht aus [26, 27, 29]. Nach (bildge-

bendem) Ausschluss extrinsischer Ursachen (z. B. Fehlimplantation, Materialversagen mit Inlaydislokation, Implantatbruch oder Versagen der Kopplung, periprotetische (Insuffizienz-)Fraktur, heterotope Ossifikationen, weichteiliges Impingement, muskulotendinöse Insuffizienz) [9, 20] sind hier differenzialdiagnostisch die aseptische von der septischen sowie der implantatallergie- oder arthrofibrotisch bedingten Beschwerdehaftigkeit und/oder Lockerung sicher voneinander abzugrenzen [1, 17]. Trotz überlappenden oder sogar gänzlich ähnelnden klinischen Aspekts resultiert eine grundsätzlich unterschiedliche therapeutische Konsequenz [7, 17, 25].


Eine falsche Diagnosestellung kann a) in ein erneutes septisches Implantatversagen bei fälschlicherweise aseptischem einzeitigen Implantatwechsel, b) in unnötige mehrzeitige aseptische Revisions-eingriffe bei fälschlicherweise septischem Operationsmanagement, c) in persistierende Beschwerden nach fälschlicherweise unbeschichtetem Implantatwechsel bei unerkannter Implantatallergie oder d) in gänzlich unnötige Implantatwechsel bei Arthrofibrose münden [1, 7]. Allen Fehlentscheidungen gemeinsam sind die Gefährdung des Patientenwohls und schließlich die hohe volkswirtschaftliche Belastung. Zum aktuellen Kenntnisstand beruhen solche falschen Diagnosestellungen und Therapieentscheidungen, neben mangelnder systematischer Analyse, maßgeblich auf der gegenwärtig unzureichenden diagnostischen Genauigkeit (ungenügend hohe Sensitivität und Spezifität) der konventionellen Goldstandarddiagnostik. Diese setzt sich aktuell aus bildgebenden (Röntgen, CT, MRT, Szintigraphie, PET-CT), laborchemischen (Gelenkpunktat und Blutserum), allergologischen (Epikutantest), mikrobiologischen, zytologischen und histopathologischen Verfahren (Synovialitis-Score nach Morawietz und Krenn) zusammen. Ferner sind diese umfassenden differenzialdiagnostischen Verfahren in ihrer Summe oft nur mit erheblichem zeitlichen, personellen und finanziellen Aufwand an Zentren zu realisieren. Zudem ist meist mit deutlich verzögerter Diagnosestellung, zum Teil bis zu zwei Wochen postoperativ, zu rechnen, was zu einer verspäteten definitiven Therapieeinleitung führt [25].

Auch die negative Beeinflussung der diagnostischen Genauigkeit durch oft unvermeidbare Variablen wie der Blutkontamination synovialer Proben, Antibiotikagabe, Immunsuppression, chronisch entzündlichen Erkrankungen oder der patientenspezifischen Hautkeimflora ist nach wie vor ungelöst [8, 26–28]. Nach einem Ausweg aus diesem klinischen Dilemma wird händeringend gesucht [28, 29]. Gerade das Beispiel des häufigen chronischen „low-grade“-PPI verdeutlicht den großen diagnostischen Vorteil der ambulant und mit geringem Aufwand durchführbaren Punktion der Gelenkflüssigkeit (Synovia) als einmalige lokale diagnostische Maßnahme. Die in der Gelenk-


Der Orthopäde

Abbildung 7-2 Ausschnitt aus der Publikation "Der Orthopäde" 12/2015


## 7.3 Poster BASK London 2015



**mstz.**  
Musculoskelettales Tumorzentrum



**endo**  
TUM



Klinikum rechts der Isar  
Technische Universität München

### Antimicrobial Peptides (AMPs) in Human Synovial Periprosthetic Joint Infection Membrane (0065)

Banke J<sup>1</sup>, Stade N<sup>1</sup>, Prodingr PM<sup>1</sup>, Mülhofer H<sup>1</sup>, Graichen H<sup>2</sup>, Burgkart R<sup>1</sup>, von Eisenhart-Rothe R<sup>1</sup>, Gollwitzer H<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Clinic of Orthopedics and Sports Orthopedics, Klinikum rechts der Isar, Technical University of Munich, 81675 Munich, Germany; ingo.bank@mri.tum.de

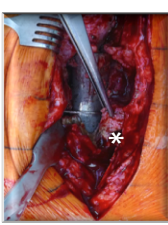
<sup>2</sup>Asklepios Orthopädische Klinik Lindenhöhe, 92421 Schwandorf, Germany

#### Objective

Differentiation between septic and aseptic loosening of (total) joint replacement is of utmost importance for successful exchange arthroplasty. However diagnostic tools show insufficient accuracy in the clinically common and challenging chronic low-grade infections. Reliable (bio)markers are lacking. Antimicrobial peptides (AMPs) are part of the innate immune response towards microbial growth. Recently we could show significant intraarticular levels of human cathelicidin LL-37 and  $\beta$ -defensin-3 (HBD-3) in periprosthetic joint infection (PJI) synovial fluid with high diagnostic accuracy. The objective of the present study was to evaluate human synovial PJI membrane for these promising biomarkers, which may significantly facilitate histological diagnosis of PJI.

#### Material and methods

In this prospective controlled clinical trial (diagnostic level II) consecutive patients with coagulase-negative staphylococcal PJI (n=8) and control patients with aseptic loosening of total hip (THR) and knee (TKR) replacements (n=9) according to the criteria of the Muskuloskeletal Infection Society or primary arthroplasty (n=8) were included. Semiquantitative immunohistochemical analysis of the AMPs HBD-2, HBD-3 and LL-37 in PJI membrane and isolated synovial cells based on total Allred and immunoreactive Remmele and Stegner score was performed. For statistical analysis SPSS19.0/R2.11.1 (p<0.05) was used.



Intraoperative resection of synovial PJI membrane for immunohistochemical analysis in total hip replacement loosening.

#### Results

The AMPs HBD-3 and LL-37 were significantly elevated (up to 11x) in synovial membranes with PJI compared to aseptic loosening. The area under the curve (AUC) in a receiver operating characteristic curve analysis was equal to 1.0 for both scores. Isolated synovial cells from synovial membranes showed comparable results with a significant HBD-3/LL-37-increase up to 4x in PJI.

#### Conclusion

For the first time in human synovial periprosthetic joint infection membrane a significant semiquantitative increase and excellent diagnostic accuracy of two AMPs in septic loosening of THR is shown. Our results implicate AMPs as promising biomarkers for the histological diagnosis of PJI.

#### Literature

Banke J et al, von Eisenhart-Rothe R, Gollwitzer H, Orthopädie 2015 in press.  
 Banke J, von Eisenhart-Rothe R, Gollwitzer H, Orthopädie im Profil 2014.  
 Parvizi J et al, JBJS Am 2014.  
 Gollwitzer H et al, von Eisenhart-Rothe R, Banke J, JBJS Am 2013.

#### Cathelicidin (LL-37)



Immunohistochemical LL-37 analysis in PJI membrane. Representative paraffin slides with enhanced dyeing of LL-37 in patients with SL of THR compared to AL of THR and PTHR. Semiquantitative analysis revealing significant 4x (Total score) and 9x (Immunoreactive Score) increase of LL-37 in SL versus AL.

#### Human $\beta$ -defensin-3 (HBD-3)



Immunohistochemical HBD-3 analysis in PJI membrane. Representative paraffin slides with increased dyeing of HBD-3 in patients with SL of THR versus AL of THR and PTHR. Semiquantitative analysis showing significant 4x (Total score) and 9x (Immunoreactive Score) level of HBD-3 in SL compared to AL.

Abbildung 7-3 Poster BASK London 2015



## 7.4 Poster DKOU 2016



Klinikum rechts der Isar  
Technische Universität München



mstz.  
Muskuloskelettales Tumorzentrum



### Antimikrobielle Peptide (AMP) in periprothetischen Synovialozyten *Neuartige histopathologische Biomarker der Endoprotheseninfektion*

<sup>1</sup>Banke U, <sup>2</sup>Stade N, <sup>1</sup>Prodinge PM, <sup>1</sup>von Eisenhart-Rothe R, <sup>1</sup>Burgkart R, <sup>1</sup>Gollwitzer H

<sup>1</sup>Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie, Klinikum rechts der Isar, TU München, Ismaninger Str. 22, 81675 München

<sup>2</sup>Klinik für Unfallchirurgie, Klinikum rechts der Isar, TU München, Ismaninger Str. 22, 81675 München

#### Fragestellung

Der periprothetische Gelenkinfekt (PPI) gilt als große diagnostische und therapeutische Herausforderung. Gegenwärtige Gold-Standarddiagnostika kommen insbesondere beim häufigen und klinisch relevanten chronischen "low-grade"-PPI an ihre Grenzen. Dabei ist die sichere Differenzierung zwischen septischer und aseptischer Totalendoprothesen(TEP)lockerung Voraussetzung für den langfristigen erfolgreichen Implantatwechsel. Synoviale Biomarker werden zur Überwindung der diagnostischen Lücke favorisiert, Antimikrobielle Peptide (AMP) gelten dabei als die vielversprechendsten Kandidaten. Unsere Arbeitsgruppe konnte den Erstdnachweis von AMP's sowohl in der Gelenkflüssigkeit als auch unspezifisch in der Gelenkschleimhaut von Patienten mit periprothetischem Hüft- und Knie-TEP-Infekt erbringen. Ihre diagnostische Genauigkeit übertraf dabei die gegenwärtigen Standardverfahren. Der Nachweis dieser AMP's in den Synovialozyten als Syntheseort der Gelenkflüssigkeit und mutmaßlich auch der Biomarker fehlt. Eine Erhöhung der diagnostischen Genauigkeit durch gezieltere Biopsieentnahme und optimierte Infektbildgebung sollen resultieren.

#### Material und Methode

Im Rahmen der prospektiven klinischen EBM-Level II Studie wurde, mit Genehmigung der Ethikkommission, der Gehalt der AMP's LL-37 (Cathelicidin), HBD-3 und HBD-2 in isolierten und typisierten Synovialozyten der Gelenkschleimhaut von Patienten mit Primärimplantation (n=8), aseptischer (n=9) und septischer (Koagulasenegative Staphylokokken, n=8) Hüft- und Knie-TEP-Lockerung mittels Immunhistochemie und semiquantitativer Auswertung (Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner, Total Score nach Allred) verglichen. Pro Patient und AMP wurden dabei fünf repräsentative Zellkulturschnitte mit jeweils drei repräsentativen Gesichtsfeldausschnitten zu je 100 Zellen ausgezählt. Als Goldstandard des PPI diene die gegenwärtige international empfohlene Kombination aus klinischem Bild, Serologie, Mikrobiologie und Histopathologie. Die statistische Auswertung erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test und SSPS 19.0/R 2.1.1.1 Software (Signifikanz bei p<0.05).



Abbildung 1. Entnahme periprothetischer Gelenkschleimhaut (\*) bei gelockertem Hüft-TEP zur immunhistochemischen Aufarbeitung.

#### Ergebnisse

Die Synovialozyten von Patienten mit septischer gegenüber aseptischer Prothesenlockerung oder Primärimplantation wiesen, in Analogie zu den kürzlich gezeigten Ergebnissen mit Gelenkflüssigkeit und unspezifischer Gelenkschleimhaut, eine signifikante Erhöhung sowohl von HBD-3 als auch LL-37 auf. Zudem zeigte sich mit den Synovialozyten eine exzellente diagnostische Güte der beiden Biomarker bei einem AUC-Wert von 1. HBD-2 hingegen wies, wie auch schon kürzlich gezeigt, keine signifikanten Unterschiede auf (p<0.23).

#### Cathelicidin (LL-37)

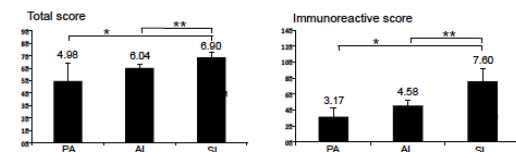
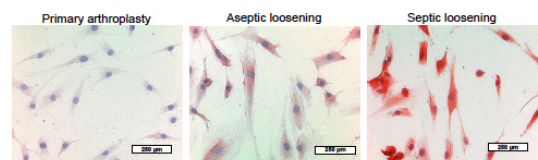


Abbildung 2. Immunhistochemischer Nachweis von LL-37 in den Synovialozyten. Repräsentative Paraffinschnitte mit verstärkter Anfärbung von LL-37 bei Patienten mit septischer TEP-Lockerung (SL) gegenüber aseptischer Lockerung (AL) und primärer TEP-Implantation (PA). Semiquantitative Auswertung der Immunhistochemie mit signifikanter (Total Score und Immunreaktiver Score) Erhöhung von LL-37 bei SL gegenüber AL.

#### Humanes Beta-Defensin 3 (HBD-3)

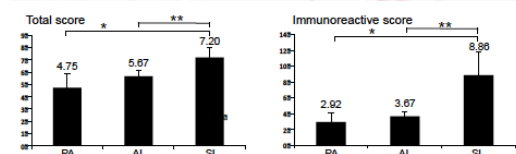
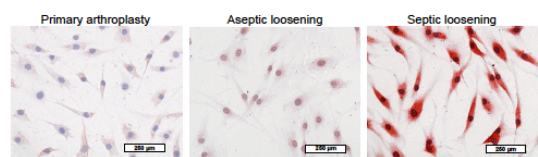


Abbildung 3. Immunhistochemischer Nachweis von HBD-3 in den Synovialozyten. Repräsentative Paraffinschnitte mit vermehrter Anfärbung von HBD-3 bei Patienten mit septischer TEP-Lockerung (SL) gegenüber aseptischer Lockerung (AL) und primärer TEP-Implantation (PA). Semiquantitative Auswertung der Immunhistochemie mit signifikanter 4x (Total Score und Immunreaktiver Score) Erhöhung von HBD-3 bei SL gegenüber AL.

#### Diskussion / Schlussfolgerung

Erstmals werden in Synovialozyten, die verantwortlich sind für die Produktion der Gelenkflüssigkeit, ein signifikanter Anstieg und exzellente diagnostische Güte zweier AMP's bei septischen Endoprothesenlockerungen gezeigt. Diese Erkenntnis kann wegweisend sein für die Optimierung der histologischen implantatassoziierten Infektdiagnostik zum Wohle des Patienten.

#### Literatur

<sup>1</sup>Banke U et al, *Orthopädie* 2016 + 2015.

<sup>3</sup>Parvizi J, *Bone Joint J* 2015.

<sup>2</sup>Banke U et al, *Orthop. Unfallchirurg. Praxis* 2016.

<sup>4</sup>Krenn V et al, *Pathology* 2014.

## 8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.2-1 Risikofaktoren für Protheseninfektionen	13
Tabelle 2.2-2 Beispiele für verschiedene Implantatbeschichtungen	19
Tabelle 4.1-1 Technische Geräte	35
Tabelle 4.1-2 Material für Probenentnahme	36
Tabelle 4.1-3 Material für Zellkultur	36
Tabelle 4.1-4 Material für Paraffingewebe	37
Tabelle 4.1-5 Material für Immunhistochemie	38
Tabelle 4.1-6 Antikörper für Immunhistochemie	38
Tabelle 4.5-1 Arbeitsschrittabhängige Nährmedien	43
Tabelle 4.6-1 Dehydrieren und Paraffinieren von Gewebe	50
Tabelle 4.7-1 Verwendete Zellkulturmarker	54
Tabelle 4.7-2 Entparaffinieren und Rehydrieren von Gewebe	56
Tabelle 4.7-3 Demaskieren der Epitope	57
Tabelle 4.7-4 Verwendete Paraffinmarker	57
Tabelle 4.8-1 Berechnungstabelle IRS und TS	59
Tabelle 4.9-1 Bezeichnung für die statistische Auswertung der Zellkultur	61
Tabelle 4.9-2 Statistischer Vergleich von Zellkulturen	62
Tabelle 4.9-3 Bezeichnung für die statistische Auswertung von Paraffingewebe	62
Tabelle 4.9-4 Statistischer Vergleich von Paraffingewebe	62
Tabelle 5.1-1 Anzahl und Verteilung der Probanden	63
Tabelle 5.2-1 Wachstumsraten der einzelnen Patientenkollektive (Gruppen)	64
Tabelle 5.2-2 HBD-2 Zellkultur Auswertung. P↓ = niedrige Passage, P↑ = hohe Passage.	69
Tabelle 5.2-3 HBD-2 Zellkultur, p-Werte beim Vergleich der Gruppen	69
Tabelle 5.2-4 HBD-3 Zellkultur Auswertung. P↓ = niedrige Passage, P↑ = hohe Passage.	74
Tabelle 5.2-5 HBD-3 Zellkultur, p-Werte beim Vergleich der Gruppen	74
Tabelle 5.2-6 LL-37 Zellkultur Auswertung. P↓ = niedrige Passage, P↑ = hohe Passage.	79
Tabelle 5.2-7 LL-37 Zellkultur, p-Werte beim Vergleich der Gruppen	79
Tabelle 5.3-1 HBD-2 Paraffingewebe, Auswertung der Mittelwerte, Standardabweichung und des Median	85
Tabelle 5.3-2 HBD-2 Paraffingewebe, p-Werte und AUC-Werte beim Vergleich der Gruppen	85
Tabelle 5.3-3 HBD-3 Paraffingewebe, Auswertung der Mittelwerte, Standardabweichung und Median	92
Tabelle 5.3-4 HBD-3 Paraffingewebe, p-Werte und AUC-Werte beim Vergleich der Gruppen	92
Tabelle 5.3-5 LL-37 Paraffingewebe, Auswertung der Mittelwerte, Standardabweichung und Median	99
Tabelle 5.3-6 LL-37 Paraffingewebe, p-Werte und AUC-Werte beim Vergleich der Gruppen	99

## 9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1 Themistocles Gluck, erste Scharnierprothese aus Elfenbein und Nickelstahl (Wessinghage, 1991)	3
Abbildung 2-2 Briefmarkenreihe „Medical Breakthrough“. Rechts oben, Briefmarke zu Ehren von Sir John Charnley	4
Abbildung 2-3 Zahlen aus den USA; THA/TKA = Total Hip/Knee Arthroplasty (S. Kurtz et al., 2007).	5
Abbildung 2-4 Röntgenbild einer periprothetischen Fraktur	6
Abbildung 2-5 Nichttraumatische KTEP-Lockerung in ihrer zeitlichen Entwicklung.	8
Abbildung 2-6 Röntgenbild einer Girdlestone-Situation des linken Hüftgelenkes.	9
Abbildung 2-7 Antibiotikaprophylaxe bei Implantationen S: Systemische Gabe C: Antibiotikahaltiger Zement SC: Kombination beider Propylaxen (Jansen et al., 2010)	18
Abbildung 2-8 Metallabriebpartikel im periprothetischen Gewebe, Partikel als Bodensatz nach dem Zentrifugieren	23
Abbildung 2-9 Synovialozyten mit Anfärbung für Laminin	24
Abbildung 2-10 Synovialozyten mit Anfärbung für HSP 27	25
Abbildung 2-11 Synovialozyten mit Anfärbung für CD 68	26
Abbildung 2-12 Synovialozyten mit Anfärbung für Vimentin	27
Abbildung 2-13 Strukturzeichnung HBD-2 (Schibli et al., 2002)	29
Abbildung 2-14 Strukturzeichnung HBD-3 (Schibli et al., 2002)	30
Abbildung 2-15 Strukturzeichnung LL-37 (Schluesener, Su, Ebrahimi, & Pouladsaz, 2012)	31
Abbildung 2-16 Wirkmechanismus antimikrobieller Peptide, die Zylinder stellen AMPs dar; A: Fassdaubenmodell B: Transmembranöse Pore C: Teppichmodell mit Mizellenbildung (Palfy, 2009)	32
Abbildung 4-1 Aufbereitung von intraoperativ entnommenen Gewebeproben; A: Schneiden B: Einlegen in eine Paraffinkassette	37
Abbildung 4-2 Drei Phasen des Vollblutes nach dem Zentrifugieren	41
Abbildung 4-3 Schaubild zur Probenentnahme	42
Abbildung 4-4 Steriles Zerkleinern der gelenkseitigen Synovialmembran	42
Abbildung 4-5 A: Neubauer Zählkammer, Seitenflächen mit Trypanblau gefüllt B: Seitenfläche in mikroskopischer Ansicht. Von den neun Quadraten werden die äußeren vier ausgezählt	45
Abbildung 4-6, Wachstumskurve, schematische Darstellung	48
Abbildung 4-7 Methodischer Ablauf IHC (Vector Laboratories <sup>®</sup> )	55
Abbildung 5-1 Schematische Darstellung des optimalen Abschnittes einer in vitro Wachstumskurve	64
Abbildung 5-2 Wachstumskurve, Primäre TEP	65
Abbildung 5-3 Wachstumskurve, Aseptische Lockerung	65
Abbildung 5-4 Wachstumskurve, Septische Lockerung	65
Abbildung 5-5 pAK (Kammer 1+2), Isotypkontrolle Kammer 3, PBS-Kontrolle Kammer 4	66
Abbildung 5-6 Spezifisches Laminin-Färbemuster; primäre Implantation, aseptische- und septische Lockerung und K4IM	67
Abbildung 5-7 Spezifisches Vimentin-Färbemuster; primäre Implantation und septische Lockerung, K4IM und Nagai et al	67
Abbildung 5-8 Spezifisches HSP 27 Färbemuster; primäre Implantation, aseptische- und septische Lockerung, Nagai et al	68
Abbildung 5-9 Spezifisches CD 68 Färbemuster; primäre Implantation und septische Lockerung, Nagai et al	68

---

Abbildung 5-10 Zellkultur HBD-2 primäre TEP _____	70
Abbildung 5-11 Zellkultur HBD-2 aseptische Lockerung _____	70
Abbildung 5-12 Zellkultur HBD-2 septische Lockerung _____	70
Abbildung 5-13 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=0,273$ _____	71
Abbildung 5-14 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=0,232$ _____	71
Abbildung 5-15 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=0,725$ _____	72
Abbildung 5-16 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=0,26$ _____	72
Abbildung 5-17 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=0,232$ _____	73
Abbildung 5-18 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=0,725$ _____	73
Abbildung 5-19 Zellkultur HBD-3 primäre TEP _____	75
Abbildung 5-20 Zellkultur HBD-3 aseptische Lockerung _____	75
Abbildung 5-21 Zellkultur HBD-3 septische Lockerung _____	75
Abbildung 5-22 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=0,147$ _____	76
Abbildung 5-23 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p<0,001$ _____	76
Abbildung 5-24 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p<0,001$ _____	77
Abbildung 5-25 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=0,056$ _____	77
Abbildung 5-26 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p<0,001$ _____	78
Abbildung 5-27 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p<0,001$ _____	78
Abbildung 5-28 Zellkultur LL-37 primäre TEP _____	80
Abbildung 5-29 Zellkultur LL-37 aseptische Lockerung _____	80
Abbildung 5-30 Zellkultur LL-37 septische Lockerung _____	80
Abbildung 5-31 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=0,062$ _____	81
Abbildung 5-32 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=<0,001$ _____	81
Abbildung 5-33 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=<0,001$ _____	82
Abbildung 5-34 TS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und aseptische Lockerung (6+7), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=0,094$ _____	82
Abbildung 5-35 TS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (4+5) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p=<0,001$ _____	83

Abbildung 5-36 TS LL-37: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (6+7) und septische Lockerung (8+9), niedrige und hohe Passagen zusammengefasst $p < 0,001$	83
Abbildung 5-37 Positivkontrolle HBD-2	84
Abbildung 5-38 Paraffinschnitt HBD-2 primäre TEP	86
Abbildung 5-39 Paraffinschnitt HBD-2 aseptische Lockerung	86
Abbildung 5-40 Paraffinschnitt HBD-2 septische Lockerung	86
Abbildung 5-41 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2) $p = 0,006$	87
Abbildung 5-42 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) $p = 0,017$	87
Abbildung 5-43 IRS HBD-2: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) $p = 0,3$	88
Abbildung 5-44 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2) $p = 0,007$	88
Abbildung 5-45 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) $p = 0,012$	89
Abbildung 5-46 TS HBD-2: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) $p = 0,303$	89
Abbildung 5-47 HBD-2: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) $AUC = 0,743$	90
Abbildung 5-48 HBD-2: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) $AUC = 0,646$	90
Abbildung 5-49 HBD-2: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) $AUC = 0,746$	91
Abbildung 5-50 HBD-2: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) $AUC = 0,653$	91
Abbildung 5-51 Paraffinschnitt HBD-3 primäre TEP	93
Abbildung 5-52 Paraffinschnitt HBD-3 aseptische Lockerung	93
Abbildung 5-53 Paraffinschnitt HBD-3 septische Lockerung	93
Abbildung 5-54 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2) $p = 0,937$	94
Abbildung 5-55 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) $p < 0,001$	94
Abbildung 5-56 IRS HBD-3: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) $p < 0,001$	95
Abbildung 5-57 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2) $p = 0,559$	95
Abbildung 5-58 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) $p < 0,001$	96
Abbildung 5-59 TS HBD-3: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) $p < 0,001$	96
Abbildung 5-60 HBD-3: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) $AUC = 1$	97
Abbildung 5-61 HBD-3: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) $AUC = 1$	97
Abbildung 5-62 HBD-3: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) $AUC = 1$	98
Abbildung 5-63 HBD-3: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) $AUC = 1$	98
Abbildung 5-64 Paraffinschnitt LL-37 primäre TEP	100
Abbildung 5-65 Paraffinschnitt LL-37 aseptische Lockerung	100
Abbildung 5-66 Paraffinschnitt LL-37 septische Lockerung	100

---

Abbildung 5-67 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2) $p=0,074$	101
Abbildung 5-68 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) $p<0,001$	101
Abbildung 5-69 IRS LL-37: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) $p<0,001$	102
Abbildung 5-70 TS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und aseptische Lockerung (2) $p=0,083$	102
Abbildung 5-71 TS LL-37: Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) $p<0,001$	103
Abbildung 5-72 TS LL-37: Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) $p<0,001$	103
Abbildung 5-73 LL-37: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) $AUC=1$	104
Abbildung 5-74 LL-37: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Immunreaktiven Score (IRS) $AUC=1$	104
Abbildung 5-75 LL-37: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen primäre TEP (1) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) $AUC=1$	105
Abbildung 5-76 LL-37: Diagnostische Güte, Vergleich der Gruppen aseptische Lockerung (2) und septische Lockerung (3) mit Hilfe des Total Score (TS) $AUC=1$	105
Abbildung 6-1 HBD-3 Färbefeld von Synovialozyten <u>nach</u> PPI	114
Abbildung 7-1 Poster DKOU Berlin 2014	115
Abbildung 7-2 Ausschnitt aus der Publikation "Der Orthopäde" 12/2015	116
Abbildung 7-3 Poster BASK London 2015	117
Abbildung 7-4 Poster DKOU Berlin 2016	118

## 10 Literaturverzeichnis

- Achermann, Y., Vogt, M., Leunig, M., Wust, J., & Trampuz, A. (2010). Improved diagnosis of periprosthetic joint infection by multiplex PCR of sonication fluid from removed implants. *J Clin Microbiol*, 48(4), 1208-1214. doi:10.1128/JCM.00006-10
- Allred, D. C., Harvey, J. M., Berardo, M., & Clark, G. M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*, 11(2), 155-168. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9504686>
- Arrigo, A. P., Suhan, J. P., & Welch, W. J. (1988). Dynamic changes in the structure and intracellular locale of the mammalian low-molecular-weight heat shock protein. *Mol Cell Biol*, 8(12), 5059-5071. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3072471>
- Aspenberg, P., & Herbertsson, P. (1996). Periprosthetic bone resorption. Particles versus movement. *J Bone Joint Surg Br*, 78(4), 641-646. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8682835>
- Bals, R. (2000). Epithelial antimicrobial peptides in host defense against infection. *Respir Res*, 1(3), 141-150. doi:10.1186/rr25
- Banke, I. J., Stade, N., Prodinger, P. M., Muhlhofer, H. M., Thomas, P., Thomas, B., Gollwitzer, H. (2015). [Synovial biomarkers for differential diagnosis of painful arthroplasty]. *Orthopade*. doi:10.1007/s00132-015-3188-7
- Banke, I. J., von Eisenhart-Rothe, R., & Muhlhofer, H. M. (2015). [Epidemiology and prevention of prosthetic joint infection]. *Orthopade*. doi:10.1007/s00132-015-3187-8
- Barrack, R. L., & Harris, W. H. (1993). The value of aspiration of the hip joint before revision total hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*, 75(1), 66-76. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8419393>
- Baumann F., B. F. R. (1991). Ein neues biomechanisches Konzept der zementlosen Hüftendoprothetik. *Orthopädische Praxis* 227-233.
- Benndorf, R., & Bielka, H. (1997). Cellular stress response: stress proteins--physiology and implications for cancer. *Recent Results Cancer Res*, 143, 129-144. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8912416>
- Berbari, E. F., Hanssen, A. D., Duffy, M. C., Steckelberg, J. M., Ilstrup, D. M., Harmsen, W. S., & Osmon, D. R. (1998). Risk factors for prosthetic joint infection: case-control study. *Clin Infect Dis*, 27(5), 1247-1254. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9827278>
- Berbari, E. F., Marculescu, C., Sia, I., Lahr, B. D., Hanssen, A. D., Steckelberg, J. M., Osmon, D. R. (2007). Culture-negative prosthetic joint infection. *Clin Infect Dis*, 45(9), 1113-1119. doi:10.1086/522184
- Bialecki, P., Gusta, A., Bohatyrewicz, A., & Ferenc, M. (2006). [Luxation of the prosthesis after total hip arthroplasty]. *Chir Narzadow Ruchu Ortop Pol*, 71(1), 21-24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17128768>
- Boenisch, T. (2003). *Handbook - Immunochemical Staining Methods*. Hamburg Deutschland: Boenisch, Thomas M.S.
- Bogut, A., Niedzwiadek, J., Koziol-Montewka, M., Strzelec-Nowak, D., Blacha, J., Mazurkiewicz, T., Marczyński, W. (2014). Sonication as a diagnostic approach used to investigate the infectious etiology of prosthetic hip joint loosening. *Pol J Microbiol*, 63(3), 299-306. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25546940>
- Borgquist, L., A, W. D., Dale, H., Lidgren, L., & Stefansson, A. (2014). Prosthetic joint infections: a need for health economy studies. *Acta Orthop*, 85(3), 218-220. doi:10.3109/17453674.2014.913227
- Bozic, K. J., & Rubash, H. E. (2004). The painful total hip replacement. *Clin Orthop Relat Res*(420), 18-25. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15057074>
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nat Rev Microbiol*, 3(3), 238-250. doi:10.1038/nrmicro1098
- Buchholz, H. W., & Engelbrecht, H. (1970). [Depot effects of various antibiotics mixed with Palacos resins]. *Chirurg*, 41(11), 511-515. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5487941>
- Buchholz, H. W., & Gartmann, H. D. (1972). [Infection prevention and surgical management of deep insidious infection in total endoprosthesis]. *Chirurg*, 43(10), 446-453. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5084870>
- Busscher, H. J., van der Mei, H. C., Subbiahdoss, G., Jutte, P. C., van den Dungen, J. J., Zaat, S. A. Grainger, D. W. (2012). Biomaterial-associated infection: locating the finish line in the race for the surface. *Sci Transl Med*, 4(153), 153rv110. doi:10.1126/scitranslmed.3004528
- Callaghan, J. J., Katz, R. P., & Johnston, R. C. (1999). One-stage revision surgery of the infected hip. A minimum 10-year followup study. *Clin Orthop Relat Res*(369), 139-143. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10611868>

- Charnley, J. (1960). Surgery of the hip-joint: present and future developments. *Br Med J*, *1*(5176), 821-826. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13809344>
- Chen, A., Fei, J., & Deirmegian, C. (2014). Diagnosis of periprosthetic infection: novel developments. *J Knee Surg*, *27*(4), 259-265. doi:10.1055/s-0034-1371768
- Collinge, C. A., Goll, G., Seligson, D., & Easley, K. J. (1994). Pin tract infections: silver vs uncoated pins. *Orthopedics*, *17*(5), 445-448. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8036188>
- Crockarell, J. R., Hanssen, A. D., Osmon, D. R., & Morrey, B. F. (1998). Treatment of infection with debridement and retention of the components following hip arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am*, *80*(9), 1306-1313. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759815>
- Dale, B. A., & Krisanaprakornkit, S. (2001). Defensin antimicrobial peptides in the oral cavity. *J Oral Pathol Med*, *30*(6), 321-327. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11459317>
- Dancygier, H. (1989). [Bacteria and the intestinal immune system]. *Internist (Berl)*, *30*(6), 370-381. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2668214>
- Darouiche, R. O., Farmer, J., Chaput, C., Mansouri, M., Saleh, G., & Landon, G. C. (1998). Anti-infective efficacy of antiseptic-coated intramedullary nails. *J Bone Joint Surg Am*, *80*(9), 1336-1340. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9759819>
- De Smet, K., & Contreras, R. (2005). Human antimicrobial peptides: defensins, cathelicidins and histatins. *Biotechnol Lett*, *27*(18), 1337-1347. doi:10.1007/s10529-005-0936-5
- Deirmengian, C., Kardos, K., Kilmartin, P., Cameron, A., Schiller, K., & Parvizi, J. (2014). Diagnosing periprosthetic joint infection: has the era of the biomarker arrived? *Clin Orthop Relat Res*, *472*(11), 3254-3262. doi:10.1007/s11999-014-3543-8
- 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*(3), 165-171. doi:10.1038/ncprheum0428
- Ebeling, W., Hennrich, N., Klockow, M., Metz, H., Orth, H. D., & Lang, H. (1974). Proteinase K from *Tritirachium album* Limber. *Eur J Biochem*, *47*(1), 91-97. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4373242>
- Eben, R., Dietrich, K. A., Nerz, C., Schneider, S., Schuh, A., Banke, I. J., Thomas, P. (2010). [Contact allergy to metals and bone cement components in patients with intolerance of arthroplasty]. *Dtsch Med Wochenschr*, *135*(28-29), 1418-1422. doi:10.1055/s-0030-1262426
- Eckey, H.-F., R. Kosfeld, M. Tu'rk, . (2005.). *Wahrscheinlichkeitsrechnung und Induktive Statistik, Wiesbaden*
- Edwards, J. C. (1982). The origin of type A synovial lining cells. *Immunobiology*, *161*(3-4), 227-231. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7095824>
- 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*(6), 644-651. doi:10.1080/00016470310018135
- Fink, B., Makowiak, C., Fuerst, M., Berger, I., Schafer, P., & Frommelt, L. (2008). The value of synovial biopsy, joint aspiration and C-reactive protein in the diagnosis of late peri-prosthetic infection of total knee replacements. *J Bone Joint Surg Br*, *90*(7), 874-878. doi:10.1302/0301-620X.90B7.20417
- Fitzgerald, R. H., Jr. (1995). Infected Total Hip Arthroplasty: Diagnosis and Treatment. *J Am Acad Orthop Surg*, *3*(5), 249-262. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10795031>
- Froy, O. (2005). Regulation of mammalian defensin expression by Toll-like receptor-dependent and independent signalling pathways. *Cell Microbiol*, *7*(10), 1387-1397. doi:10.1111/j.1462-5822.2005.00590.x
- Ganz, T. (1999). Defensins and host defense. *Science*, *286*(5439), 420-421. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10577203>
- Ganz, T. (2003). Defensins: antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol*, *3*(9), 710-720. doi:10.1038/nri1180
- Garcia, J. R., Jaumann, F., Schulz, S., Krause, A., Rodriguez-Jimenez, J., Forssmann, U., Bals, R. (2001). Identification of a novel, multifunctional beta-defensin (human beta-defensin 3) with specific antimicrobial activity. Its interaction with plasma membranes of *Xenopus* oocytes and the induction of macrophage chemoattraction. *Cell Tissue Res*, *306*(2), 257-264. doi:10.1007/s004410100433
- Gillespie, W. J., & Walenkamp, G. (2001). Antibiotic prophylaxis for surgery for proximal femoral and other closed long bone fractures. *Cochrane Database Syst Rev*(1), CD000244. doi:10.1002/14651858.CD000244
- Girdlestone, G. R. (2008). Acute pyogenic arthritis of the hip: an operation giving free access and effective drainage. 1943. *Clin Orthop Relat Res*, *466*(2), 258-263. doi:10.1007/s11999-007-0082-6
- Glynn, M. K., & Sheehan, J. M. (1983). An analysis of the causes of deep infection after hip and knee arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res*(178), 202-206. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6883851>



- Gollwitzer, H., Burgkart, R., Diehl, P., Gradinger, R., & Buhren, V. (2006). [Therapy of arthrofibrosis after total knee arthroplasty]. *Orthopade*, 35(2), 143-152. doi:10.1007/s00132-005-0915-5
- Gollwitzer, H., Diehl, P., Gerdesmeyer, 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(9), 904-916. doi:10.1007/s00132-006-0977-z
- Gollwitzer, H., Diehl, P., Gerdesmeyer, L., & Mittelmeier, W. (2006b). [Diagnostic strategies in cases of suspected periprosthetic infection of the knee. A review of the literature and current recommendations]. *Orthopade*, 35(9), 904, 906-908, 910-906. doi:10.1007/s00132-006-0977-z
- Gollwitzer, H., Dombrowski, Y., Prodinge, P. M., Peric, M., Summer, B., Hapfelmeier, A., Banke, I. J. (2013). Antimicrobial peptides and proinflammatory cytokines in periprosthetic joint infection. *J Bone Joint Surg Am*, 95(7), 644-651. doi:10.2106/JBJS.L.00205
- Gollwitzer H, H. V., Stahl A et al. . (2005). *Die F-18-FDG-PET als neues Verfahren zur präoperativen Diagnostik der Totalendoprotheseninfektion*. Paper presented at the 1. Gemeinsamer Kongress Orthopädie – Unfallchirurgie, Berlin, 2005.
- Gomez, P. F., & Morcuende, J. A. (2005). Early attempts at hip arthroplasty--1700s to 1950s. *Iowa Orthop J*, 25, 25-29. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16089067>
- Gudena, R., Kuna, S., & Pradhan, N. (2013). Aseptic loosening of total hip replacement presenting as an anterior thigh mass. *Musculoskelet Surg*, 97(3), 247-249. doi:10.1007/s12306-011-0167-y
- Gudmundsson, G. H., Agerberth, B., Odeberg, J., Bergman, T., Olsson, B., & Salcedo, R. (1996). The human gene FALL39 and processing of the cathelin precursor to the antibacterial peptide LL-37 in granulocytes. *Eur J Biochem*, 238(2), 325-332. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8681941>
- Haas, C., Aicher, W. K., Dinkel, A., Peter, H. H., & Eibel, H. (1997). Characterization of SV40T antigen immortalized human synovial fibroblasts: maintained expression patterns of EGR-1, HLA-DR and some surface receptors. *Rheumatol Int*, 16(6), 241-247. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=9106935](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=9106935)
- Habash, M., & Reid, G. (1999). Microbial biofilms: their development and significance for medical device-related infections. *J Clin Pharmacol*, 39(9), 887-898. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10471979>
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., & Schroder, J. M. (1997). A peptide antibiotic from human skin. *Nature*, 387(6636), 861. doi:10.1038/43088
- Harder, J., Bartels, J., Christophers, E., & Schroder, J. M. (2001). Isolation and characterization of human beta - defensin-3, a novel human inducible peptide antibiotic. *J Biol Chem*, 276(8), 5707-5713. doi:10.1074/jbc.M008557200
- Harder, J., & Schroder, J. M. (2005). Psoriatic scales: a promising source for the isolation of human skin-derived antimicrobial proteins. *J Leukoc Biol*, 77(4), 476-486. doi:10.1189/jlb.0704409
- Hess, J. F., Budamagunta, M. S., Voss, J. C., & FitzGerald, P. G. (2004). Structural characterization of human vimentin rod 1 and the sequencing of assembly steps in intermediate filament formation in vitro using site-directed spin labeling and electron paramagnetic resonance. *J Biol Chem*, 279(43), 44841-44846. doi:10.1074/jbc.M406257200
- Hoover, D. M., Rajashankar, K. R., Blumenthal, R., Puri, A., Oppenheim, J. J., Chertov, O., & Lubkowski, J. (2000). The structure of human beta-defensin-2 shows evidence of higher order oligomerization. *J Biol Chem*, 275(42), 32911-32918. doi:10.1074/jbc.M006098200
- Inman, R. D., Gallegos, K. V., Brause, B. D., Redecha, P. B., & Christian, C. L. (1984). Clinical and microbial features of prosthetic joint infection. *Am J Med*, 77(1), 47-53. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6741983>
- Jakob, U., Gaestel, M., Engel, K., & Buchner, J. (1993). Small heat shock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem*, 268(3), 1517-1520. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8093612>
- Jamsen, E., Furnes, O., Engesaeter, L. B., Konttinen, Y. T., Odgaard, A., Stefansdottir, A., & Lidgren, L. (2010). Prevention of deep infection in joint replacement surgery. *Acta Orthop*, 81(6), 660-666. doi:10.3109/17453674.2010.537805
- Jürgen Bortz, G. A. L., Klaus Boehnke. (2008). *Verteilungsfreie Methoden in der Biostatistik*: Springer Verlag.
- Kaemmerer, D., Peter, L., Lupp, A., Schulz, S., Sanger, J., Baum, R. P., Hommann, M. (2012). Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Int J Clin Exp Pathol*, 5(3), 187-194. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22558472>
- Katayama, M., Sanzen, N., Funakoshi, A., & Sekiguchi, K. (2003). Laminin gamma2-chain fragment in the circulation: a prognostic indicator of epithelial tumor invasion. *Cancer Res*, 63(1), 222-229. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12517801>

- Khalilpour, P., Lampe, K., Wagener, M., Stigler, B., Heiss, C., Ullrich, M. S., Alt, V. (2010). Ag/SiO(x)C(y) plasma polymer coating for antimicrobial protection of fracture fixation devices. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 94(1), 196-202. doi:10.1002/jbm.b.31641
- Kisielinski, K., Cremerius, U., Reinartz, P., & Niethard, F. U. (2003). Fluorodeoxyglucose positron emission tomography detection of inflammatory reactions due to polyethylene wear in total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*, 18(4), 528-532. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12820102>
- Konig, D. P., Perdreau-Remington, F., Rutt, J., Hilgers, R. D., & Schierholz, J. M. (1999). Adherence to and accumulation of *S. epidermidis* on different biomaterials due to extracellular slime production. In vitro comparison of a slime-producing strain (Rp 62 A) and its isogenic slime negative mutant (M7). *Zentralbl Bakteriol*, 289(3), 355-364. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10467666>
- Koo, K. H., Yang, J. W., Cho, S. H., Song, H. R., Park, H. B., Ha, Y. C., Kim, Y. H. (2001). Impregnation of vancomycin, gentamicin, and cefotaxime in a cement spacer for two-stage cementless reconstruction in infected total hip arthroplasty. *J Arthroplasty*, 16(7), 882-892. doi:10.1054/arth.2001.24444
- Kordelle, J., Klett, R., Stahl, U., Hossain, H., Schleicher, I., & Haas, H. (2004). [Infection diagnosis after knee-TEP-implantation]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, 142(3), 337-343. doi:10.1055/s-2004-818772
- Kunisch, E., Fuhrmann, R., Roth, A., Winter, R., Lungershausen, W., & Kinne, R. W. (2004). Macrophage specificity of three anti-CD68 monoclonal antibodies (KP1, EBM11, and PGM1) widely used for immunohistochemistry and flow cytometry. *Ann Rheum Dis*, 63(7), 774-784. doi:10.1136/ard.2003.013029
- Kurtz, S., Ong, K., Lau, E., Mowat, F., & Halpern, M. (2007). Projections of primary and revision hip and knee arthroplasty in the United States from 2005 to 2030. *J Bone Joint Surg Am*, 89(4), 780-785. doi:10.2106/JBJS.F.00222
- Kurtz, S. M., Lau, E., Watson, H., Schmier, J. K., & Parvizi, J. (2012). Economic burden of periprosthetic joint infection in the United States. *J Arthroplasty*, 27(8 Suppl), 61-65 e61. doi:10.1016/j.arth.2012.02.022
- Lai, Y., & Gallo, R. L. (2009). AMPed up immunity: how antimicrobial peptides have multiple roles in immune defense. *Trends Immunol*, 30(3), 131-141. doi:10.1016/j.it.2008.12.003
- Langlais, F. (2003). Can we improve the results of revision arthroplasty for infected total hip replacement? *J Bone Joint Surg Br*, 85(5), 637-640. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12892181>
- 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(10), 1145-1150. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11567190>
- Learmonth, I. D., Young, C., & Rorabeck, C. (2007). The operation of the century: total hip replacement. *Lancet*, 370(9597), 1508-1519. doi:10.1016/S0140-6736(07)60457-7
- Lehner, B., Witte, D., Suda, A. J., & Weiss, S. (2009). [Revision strategy for periprosthetic infection]. *Orthopade*, 38(8), 681-688. doi:10.1007/s00132-009-1434-6
- Lehrer, R. I. (2004). Primate defensins. *Nat Rev Microbiol*, 2(9), 727-738. doi:10.1038/nrmicro976
- Lichstein, P., Gehrke, T., Lombardi, A., Romano, C., Stockley, I., Babis, G., Winkler, H. (2014). One-stage versus two-stage exchange. *J Orthop Res*, 32 Suppl 1, S141-146. doi:10.1002/jor.22558
- Lidwell, O. M., Elson, R. A., Lowbury, E. J., Whyte, W., Blowers, R., Stanley, S. J., & Lowe, D. (1987). Ultraclean air and antibiotics for prevention of postoperative infection. A multicenter study of 8,052 joint replacement operations. *Acta Orthop Scand*, 58(1), 4-13. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3107337>
- Lieberman, J. R., Callaway, G. H., Salvati, E. A., Pellicci, P. M., & Brause, B. D. (1994). Treatment of the infected total hip arthroplasty with a two-stage reimplantation protocol. *Clin Orthop Relat Res*(301), 205-212. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8156676>
- Lindahl, H., Malchau, H., Oden, A., & Garellick, G. (2006). Risk factors for failure after treatment of a periprosthetic fracture of the femur. *J Bone Joint Surg Br*, 88(1), 26-30. doi:10.1302/0301-620X.88B1.17029
- Lindl T., G. G. (2008). *Zell- und Gewebekultur*: Spektrum Akademischer Verlag.
- Liu, G. D., Yu, H. J., Ou, S., Luo, X., Ni, W. D., Huang, X. K., Fei, J. (2014). Human beta-defensin-3 for the diagnosis of periprosthetic joint infection and loosening. *Orthopedics*, 37(4), e384-390. doi:10.3928/01477447-20140401-61
- Lohmann, C. H., Furst, M., Niggemeyer, O., & Ruther, W. (2007). [The treatment of periprosthetic infections]. *Z Rheumatol*, 66(1), 28-33. doi:10.1007/s00393-006-0141-5
- Lucke, M., Schmidmaier, G., Sadoni, S., Wildemann, B., Schiller, R., Haas, N. P., & Raschke, M. (2003). Gentamicin coating of metallic implants reduces implant-related osteomyelitis in rats. *Bone*, 32(5), 521-531. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12753868>
- Lüllmann-Rauch, R. (2012). Taschenlehrbuch Histologie. *Thieme*, 694.

- Mariani, B. D., Martin, D. S., Levine, M. J., Booth, R. E., Jr., & Tuan, R. S. (1996). The Coventry Award. Polymerase chain reaction detection of bacterial infection in total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*(331), 11-22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8895614>
- Mason, J. B., Fehring, T. K., Odum, S. M., Griffin, W. L., & Nussman, D. S. (2003). The value of white blood cell counts before revision total knee arthroplasty. *J Arthroplasty*, 18(8), 1038-1043. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14658109>
- Matsen Ko, L., & Parvizi, J. (2016). Diagnosis of Periprosthetic Infection: Novel Developments. *Orthop Clin North Am*, 47(1), 1-9. doi:10.1016/j.ocl.2015.08.003
- Mella-Schmidt, C., & Steinbrink, K. (1989). [Value of irrigation-suction drainage in the treatment of early infection of joint implants]. *Chirurg*, 60(11), 791-794. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2582888>
- Mizushima, H., Koshikawa, N., Moriyama, K., Takamura, H., Nagashima, Y., Hirahara, F., & Miyazaki, K. (1998). Wide distribution of laminin-5 gamma 2 chain in basement membranes of various human tissues. *Horm Res, 50 Suppl 2*, 7-14. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9721586>
- Morawietz, L., Classen, R. A., Schroder, J. H., Dynybil, C., Perka, C., Skwara, A., Krenn, V. (2006). Proposal for a histopathological consensus classification of the periprosthetic interface membrane. *J Clin Pathol*, 59(6), 591-597. doi:10.1136/jcp.2005.027458
- Morrey, B. F., Westholm, F., Schoifet, S., Rand, J. A., & Bryan, R. S. (1989). Long-term results of various treatment options for infected total knee arthroplasty. *Clin Orthop Relat Res*(248), 120-128. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2805468>
- Nagai, H., Miyamoto, Y., Nakata, A., Hatakeyama, S., Iwanami, Y., & Fukuda, M. (2006). Isolation and characterization of synovial cells from the human temporomandibular joint. *J Oral Pathol Med*, 35(2), 104-110. doi:10.1111/j.1600-0714.2006.00369.x
- Naredo, E., Cabero, F., Cruz, A., Uson, J., Palop, M. J., & Crespo, M. (2005). Ultrasound guided musculoskeletal injections. *Ann Rheum Dis*, 64(2), 341; author reply 341. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15647450>
- Neut, D., van de Belt, H., van Horn, J. R., van der Mei, H. C., & Busscher, H. J. (2003). Residual gentamicin-release from antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads after 5 years of implantation. *Biomaterials*, 24(10), 1829-1831. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12593965>
- Nishimura, E., Eto, A., Kato, M., Hashizume, S., Imai, S., Nisizawa, T., & Hanada, N. (2004). Oral streptococci exhibit diverse susceptibility to human beta-defensin-2: antimicrobial effects of hBD-2 on oral streptococci. *Curr Microbiol*, 48(2), 85-87. doi:10.1007/s00284-003-4108-3
- Nozawa-Inoue, K., Ajima, H., Takagi, R., & Maeda, T. (1999). Immunocytochemical demonstration of laminin in the synovial lining layer of the rat temporomandibular joint. *Arch Oral Biol*, 44(6), 531-534. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10401532>
- Ong, K. L., Kurtz, S. M., Lau, E., Bozic, K. J., Berry, D. J., & Parvizi, J. (2009). Prosthetic joint infection risk after total hip arthroplasty in the Medicare population. *J Arthroplasty*, 24(6 Suppl), 105-109. doi:10.1016/j.arth.2009.04.027
- Osmon, D. R., Berbari, E. F., Berendt, A. R., Lew, D., Zimmerli, W., Steckelberg, J. M., Infectious Diseases Society of A. (2013). Diagnosis and management of prosthetic joint infection: clinical practice guidelines by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis*, 56(1), e1-e25. doi:10.1093/cid/cis803
- Osung, O. A., Chandra, M., & Holborow, E. J. (1982). Intermediate filaments in synovial lining cells in rheumatoid arthritis and other arthritides are of vimentin type. *Ann Rheum Dis*, 41(1), 74-77. Retrieved from [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=7039525](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=7039525)
- Palestro, C. J., Love, C., Tronco, G. G., Tomas, M. B., & Rini, J. N. (2006). Combined labeled leukocyte and technetium 99m sulfur colloid bone marrow imaging for diagnosing musculoskeletal infection. *Radiographics*, 26(3), 859-870. doi:10.1148/rg.263055139
- Palfy, R., Gardlik, R., Behuliak, M., Kadasi, L., Turna, J., & Celec, P. (2009). On the physiology and pathophysiology of antimicrobial peptides. *Mol Med*, 15(1-2), 51-59. doi:10.2119/molmed.2008.00087
- Parvizi, J. (2011). New definition for periprosthetic joint infection. *Am J Orthop (Belle Mead NJ)*, 40(12), 614-615. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22268006>
- Parvizi, J., & Haddad, F. S. (2015). Periprosthetic joint infection: the last frontier. *Bone Joint J*, 97-B(9), 1157-1158. doi:10.1302/0301-620X.97B9.37018
- 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. *J Pathol*, 198(3), 369-377. doi:10.1002/path.1224
- Percival, S. L., Bowler, P. G., & Russell, D. (2005). Bacterial resistance to silver in wound care. *J Hosp Infect*, 60(1), 1-7. doi:10.1016/j.jhin.2004.11.014

- Peric, M., Koglin, S., Ruzicka, T., & Schaubert, J. (2009). [Cathelicidins: multifunctional defense molecules of the skin]. *Dtsch Med Wochenschr*, 134(1-2), 35-38. doi:10.1055/s-0028-1105888
- Phillips, J. E., Crane, T. P., Noy, M., Elliott, T. S., & Grimer, R. J. (2006). The incidence of deep prosthetic infections in a specialist orthopaedic hospital: a 15-year prospective survey. *J Bone Joint Surg Br*, 88(7), 943-948. doi:10.1302/0301-620X.88B7.17150
- Pitsillides, A. A., Wilkinson, L. S., Mehdizadeh, S., Bayliss, M. T., & Edwards, J. C. (1993). Uridine diphosphoglucose dehydrogenase activity in normal and rheumatoid synovium: the description of a specialized synovial lining cell. *Int J Exp Pathol*, 74(1), 27-34. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8471533>
- Pollock, L. E., Lalor, P., & Revell, P. A. (1990). Type IV collagen and laminin in the synovial intimal layer: an immunohistochemical study. *Rheumatol Int*, 9(6), 277-280. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2315607>
- Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P., & Shai, Y. (1992). Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry*, 31(49), 12416-12423. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1463728>
- Probst, J. (2007). Themistokles Gluck- Ein Vordenker der Deutschen Chirurgie. *DGU - Mitteilungen und Nachrichten*, 64-66.
- Remmele, W., & Stegner, H. E. (1987). [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathologe*, 8(3), 138-140. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3303008>
- Revell, P. A., al-Saffar, N., Fish, S., & Osei, D. (1995). Extracellular matrix of the synovial intimal cell layer. *Ann Rheum Dis*, 54(5), 404-407. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7794050>
- Roche. (2003). *Roche Lexikon Medizin*: Urban&Fischer.
- Sayama, K., Komatsuzawa, H., Yamasaki, K., Shirakata, Y., Hanakawa, Y., Ouhara, K., Hashimoto, K. (2005). New mechanisms of skin innate immunity: ASK1-mediated keratinocyte differentiation regulates the expression of beta-defensins, LL37, and TLR2. *Eur J Immunol*, 35(6), 1886-1895. doi:10.1002/eji.200425827
- Schafer, P., Fink, B., Sandow, D., Margull, A., Berger, I., & Frommelt, L. (2008). Prolonged bacterial culture to identify late periprosthetic joint infection: a promising strategy. *Clin Infect Dis*, 47(11), 1403-1409. doi:10.1086/592973
- Schibli, D. J., Hunter, H. N., Aseyev, V., Starner, T. D., Wiencek, J. M., McCray, P. B., Jr., Vogel, H. J. (2002). The solution structures of the human beta-defensins lead to a better understanding of the potent bactericidal activity of HBD3 against Staphylococcus aureus. *J Biol Chem*, 277(10), 8279-8289. doi:10.1074/jbc.M108830200
- Schluesener, H. J., Su, Y., Ebrahimi, A., & Pouladsaz, D. (2012). Antimicrobial peptides in the brain: neuropeptides and amyloid. *Front Biosci (Schol Ed)*, 4, 1375-1380. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22652879>
- Schneck, E., Schubert, T., Konovalov, O. V., Quinn, B. E., Gutsmann, T., Brandenburg, K., Tanaka, M. (2010). Quantitative determination of ion distributions in bacterial lipopolysaccharide membranes by grazing-incidence X-ray fluorescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(20), 9147-9151. doi:10.1073/pnas.0913737107
- Schroder, J. M., & Harder, J. (2006). Antimicrobial skin peptides and proteins. *Cell Mol Life Sci*, 63(4), 469-486. doi:10.1007/s00018-005-5364-0
- Schwab, W., Harada, H., Goetz, W., Nowicki, M., Witt, M., Kasper, M., & Barth, K. (2007). Immunocytochemical and biochemical detection of EMMPRIN in the rat tooth germ: differentiation-dependent co-expression with MMPs and co-localization with caveolin-1 in membrane rafts of dental epithelial cells. *Histochem Cell Biol*, 128(3), 195-203. doi:10.1007/s00418-007-0313-7
- Sculco, T. P. (1993). The economic impact of infected total joint arthroplasty. *Instr Course Lect*, 42, 349-351. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8463684>
- Selsted, M. E., Tang, Y. Q., Morris, W. L., McGuire, P. A., Novotny, M. J., Smith, W., Cullor, J. S. (1993). Purification, primary structures, and antibacterial activities of beta-defensins, a new family of antimicrobial peptides from bovine neutrophils. *J Biol Chem*, 268(9), 6641-6648. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8454635>
- Shapiro, H. M. (2001). Principles of data acquisition and display. *Methods Cell Biol*, 63, 149-167. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11060840>
- Shiba, H., Mouri, Y., Komatsuzawa, H., Ouhara, K., Takeda, K., Sugai, M., Kurihara, H. (2003). Macrophage inflammatory protein-3alpha and beta-defensin-2 stimulate dentin sialophosphoprotein gene expression in human pulp cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 306(4), 867-871. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12821122>
- Siebenrock, K. A. (2008). Sir John Charnley – Pionier der künstlichen Hüfte. *Schweiz Med Forum*, 150.

- Sorensen, O., Arnljots, K., Cowland, J. B., Bainton, D. F., & Borregaard, N. (1997). The human antibacterial cathelicidin, hCAP-18, is synthesized in myelocytes and metamyelocytes and localized to specific granules in neutrophils. *Blood*, *90*(7), 2796-2803. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9326247>
- Steinbrink, K., & Frommelt, L. (1995). [Treatment of periprosthetic infection of the hip using one-stage exchange surgery]. *Orthopade*, *24*(4), 335-343. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7478494>
- Strukelj, B., Pungercar, J., Kopitar, G., Renko, M., Lenarcic, B., Berbic, S., & Turk, V. (1995). Molecular cloning and identification of a novel porcine cathelin-like antibacterial peptide precursor. *Biol Chem Hoppe Seyler*, *376*(8), 507-510. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7576250>
- Summer, B., Paul, C., Mazoochian, F., Rau, C., Thomsen, M., Banke, I., 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*(1), 15-22. doi:10.1111/j.1600-0536.2010.01744.x
- Tang, Y. Q., Yuan, J., Osapay, G., Osapay, K., Tran, D., Miller, C. J., Selsted, M. E. (1999). A cyclic antimicrobial peptide produced in primate leukocytes by the ligation of two truncated alpha-defensins. *Science*, *286*(5439), 498-502. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10521339>
- Theofilopoulos, A. N., Carson, D. A., Tavassoli, M., Slovin, S. F., Speers, W. C., Jensen, F. B., & Vaughan, J. H. (1980). Evidence for the presence of receptors for C3 and IgG Fc on human synovial cells. *Arthritis Rheum*, *23*(1), 1-9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7352929>
- Thomas, B. (2003). Immunchemische Färbemethoden. *Dako Cytomation*.
- Thomas, P., Schuh, A., Ring, J., & Thomsen, M. (2008). [Orthopedic surgical implants and allergies: joint statement by the implant allergy working group (AK 20) of the DGOOC (German association of orthopedics and orthopedic surgery), DKG (German contact dermatitis research group) and dgaki (German society for allergology and clinical immunology)]. *Orthopade*, *37*(1), 75-88. doi:10.1007/s00132-007-1183-3
- Thomas, P., & Summer, B. (2015). Diagnosis and management of patients with allergy to metal implants. *Expert Rev Clin Immunol*, *11*(4), 501-509. doi:10.1586/1744666X.2015.1016501
- Trampuz, A., & Zimmerli, W. (2005). Prosthetic joint infections: update in diagnosis and treatment. *Swiss Med Wkly*, *135*(17-18), 243-251. doi:2005/17/smw-10934
- 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. *J Bone Joint Surg Am*, *78*(4), 512-523. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8609130>
- Tsukayama, D. T., Wicklund, B., & Gustilo, R. B. (1991). Suppressive antibiotic therapy in chronic prosthetic joint infections. *Orthopedics*, *14*(8), 841-844. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1923965>
- Vanhegan, I. S., Malik, A. K., Jayakumar, P., Ul Islam, S., & Haddad, F. S. (2012). A financial analysis of revision hip arthroplasty: the economic burden in relation to the national tariff. *J Bone Joint Surg Br*, *94*(5), 619-623. doi:10.1302/0301-620X.94B5.27073
- Weinberg, A., Krisanaprakornkit, S., & Dale, B. A. (1998). Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med*, *9*(4), 399-414. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9825219>
- Welch, W. J. (1992). Mammalian stress response: cell physiology, structure/function of stress proteins, and implications for medicine and disease. *Physiol Rev*, *72*(4), 1063-1081. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1438579>
- Welsch, U. (2010). *Lehrbuch Histologie*: Urban&Fischer.
- Werner, M., Chott, A., Fabiano, A., & Battifora, H. (2000). Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*, *24*(7), 1016-1019. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10895825>
- Wessinghage, D. (1991). [Themistocles Gluck. 100 years artificial joint replacement]. *Z Orthop Ihre Grenzgeb*, *129*(5), 383-388. doi:10.1055/s-2008-1040261
- Winkler, H. (2009). Rationale for one stage exchange of infected hip replacement using uncemented implants and antibiotic impregnated bone graft. *Int J Med Sci*, *6*(5), 247-252. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19834590>
- Wodtke, J., & Lohr, J. F. (2008). [The infected implant]. *Orthopade*, *37*(3), 257-267; quiz 268-259. doi:10.1007/s00132-008-1216-6
- Wroblewski, B. M. (2002). Professor Sir John Charnley (1911-1982). *Rheumatology (Oxford)*, *41*(7), 824-825. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12096235>
- Yamamoto, T., Tamura, Y., & Yokota, T. (1988). Antiseptic and antibiotic resistance plasmid in *Staphylococcus aureus* that possesses ability to confer chlorhexidine and acrinol resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, *32*(6), 932-935. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3415214>

- Yang, D., Biragyn, A., Kwak, L. W., & Oppenheim, J. J. (2002). Mammalian defensins in immunity: more than just microbicidal. *Trends Immunol*, 23(6), 291-296. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12072367>
- Zanetti, M. (2005). The role of cathelicidins in the innate host defenses of mammals. *Curr Issues Mol Biol*, 7(2), 179-196. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16053249>
- Zeya, H. I., & Spitznagel, J. K. (1966). Antimicrobial specificity of leukocyte lysosomal cationic proteins. *Science*, 154(3752), 1049-1051. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4958495>
- Zimmerli, W., Trampuz, A., & Ochsner, P. E. (2004). Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*, 351(16), 1645-1654. doi:10.1056/NEJMra040181

# 11 Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
'	Minute(n)
°C	Grad in Celsius
Abb.	Abbildung
AGS	Antigranulozytenszintigraphie
AK	Antikörper
AMP	Antimikrobielle Peptide
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
asept	aseptisch
AUC	Area under the curve
BASK	British Association for Surgery of the Knee
BSG	Blutkörperchensenkungsgeschwindigkeit
bzw	beziehungsweise
C-terminal	Carboxyterminales Ende eines Peptids
CD	Cluster of Differentiation
cm	Zentimeter
CRP	C-reaktives Protein
DKOU	Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie
E. coli	Escherichia coli
FBS	Fetal Bovine Serum
FCS	Fetales Kälber Serum
FDG-PET	Fluor-18-Desoxyglukose-Positronenemissionstomographie
G.f.	Gesellschaft für
h	Stunde, Stunden
HTEP	Hüft-Totalendoprothese
H <sub>2</sub> O	Wasser, hier auch für Leitungswasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HBD	Humanes Beta Defensin
hCAP	humanes kationisches antimikrobielles Peptid
HPF	High-Power-Feld
HSP	Heat Shock Protein
Ig	Immunglobulin
IHC	Immunhistochemie
IRS	Immunreaktiver Score nach Remmele und Stegner
KTEP	Knie-Totalendoprothese
kDa	Kilodalton
LG-PPI	Periprothetischer Low grade Infekt
LL-37	Humanes Cathelicidin
Lsg.	Lösung/Solution
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter



mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
MRSA	Methillicin resistente Staphylokokkus aureus
MSSA	Methillicin sensible Staphylokokkus aureus
MW	Mittelwert
N-terminal	Aminoterminales Ende eines Peptids, Start der Proteinbiosynthese am Ribosom
NET	Neuroendothelialer Tumor
P	Passage
P0	Ausgangswerte der Zellkultur zum Zeitpunkt Null
pAk	primärer Antikörper
PBS	Phosphat Buffered Saline
PFA	Paraformaldehyd
pH	potentia Hydrogenii (Die Kraft des Wasserstoffs)
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PP	Prozentsatz an positiven Zellen
PS	Propotion Score
PPI	Periprothetischer Infekt
pTEP	primäre Totalendoprothese
RDI	Klinikum rechts der Isar, TU München
ROC	Receiver operating characteristic curve
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SD	Standard deviation, Standardabweichung
sec	sekundär
sept	septisch
SF	Seitenfläche
SI	Farbintensität, Staining Intensity
T-Zellen	Thymus Lymphozyten
Tab.	Tabelle
TEP	Totalendoprothese
THA	Total Hip Arthroplasty
TKA	Total Knee Arthroplasty
TS	Total Score nach Allred
USA	United States of America
W	Watt
α, A	Alpha
β, B	Beta
θ, Θ	Theta
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer

## 12 Lebenslauf

### Persönliche Daten

---

<b>Name:</b>	Nikolas Stade
<b>Geburtsdatum:</b>	25. Februar 1981
<b>Geburtsort:</b>	Oberstdorf
<b>Familienstand:</b>	verheiratet mit Dr. med. Cora Leonie Stade
<b>Tochter:</b>	Lina Stade
<b>Vater:</b>	Horst Stade, Dipl. Ing. Maschinenbau †
<b>Mutter:</b>	Annegret Stade, Einzelhandelskauffrau
<b>Bruder:</b>	Timm Stade, Dipl. Betriebswirt (FH)

### Berufserfahrung

---

<b>06/2017 – 05/2018</b>	<b>Klinik und Poliklinik für Orthopädie und Sportorthopädie</b> Klinikum Rechts der Isar, der Technischen Universität München, Direktor Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe
<b>06/2015 – 05/2017</b>	<b>Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie</b> Klinikum Rechts der Isar, der Technischen Universität München, Direktor Prof. Dr. med. Peter Biberthaler
<b>11/2014 - 05/2015</b>	<b>Unfallchirurgie, Ilmtalklinik</b> Akademisches Lehrkrankenhaus der TU München, Chefarzt Dr. med. Roland Burgert
<b>11/2013 - 10/2014</b>	<b>Viszeralchirurgie, Ilmtalklinik</b> Akademisches Lehrkrankenhaus der TU München, Chefarzt PD Dr. med. Reinhard Lange

### Weiterbildung

---

<b>03/2015 - 05/2018</b>	<b>Weiterbildung Manuelle Therapie/ Chirotherapie</b> Deutsche Gesellschaft für Manuelle Medizin
<b>Seit 01/2018</b>	<b>Sonografie der Bewegungsorgane</b> DEGUM-Zertifikat
<b>Seit 01/2017</b>	<b>Weiterbildung Akupunktur - Societas Medicinae Sinensis</b> Internationale Gesellschaft für Chinesische Medizin
<b>01/2016</b>	<b>ATLS-Provider, AUC Akademie der Unfallchirurgie</b> Klinikum rechts der Isar der TU München
<b>11/2014</b>	<b>Grundkurs Röntgen- und Strahlenschutzverordnung</b> Klinikum München Pasing
<b>06/2014</b>	<b>Kurs für Notfallmedizin (Notarztkurs)</b> Lehrinstitut für präklinische Rettungsmedizin München

### Stipendium

---

Lindauer Stipendienstiftung für begabte Studierende

---

**Mitgliedschaften**


---

Deutsche Gesellschaft für Unfallchirurgie (DGU)  
 Deutsche Gesellschaft für Manuelle Medizin (DGMM-MWE)  
 Internationale Gesellschaft für Chinesische Medizin (SMS)

**Ausbildung**


---

<b>06/2013</b>	<b>Erhalt der Approbation</b>
<b>05/2013</b>	<b>Abschluss Staatsexamen Humanmedizin</b>
<b>12/2011 - 11/2012</b>	<b>Praktisches Jahr</b>
<b>10/2008 - 09/2011</b>	<b>Technische Universität München</b>
<b>09/2008</b>	<b>Abschluss erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung</b>
<b>10/2006</b>	<b>Ludwig-Maximilians-Universität München</b>
<b>09/2002</b>	<b>Abschluss Rettungssanitäterausbildung</b>
<b>07/2001</b>	<b>Abschluss Allgemeine Hochschulreife</b> Bodensee Gymnasium Lindau

**Praktisches Jahr**


---

<b>07/2012 - 11/2012</b>	<b>Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie</b> TU München, Prof. Dr. med. R. von Eisenhart-Rothe
<b>05/2012 - 07/2012</b>	<b>Chirurgische Klinik und Poliklinik</b> TU München, Prof. Dr. med. H. Friess
<b>04/2012 - 05/2012</b>	<b>Klinik und Poliklinik für Unfallchirurgie</b> TU München, Prof. Dr. med. P. Biberthaler
<b>02/2012 - 03/2012</b>	<b>Klinik für Hämatologie und Onkologie</b> TU München, Prof. Dr. med. C. Peschel
<b>12/2011 - 02/2012</b>	<b>Medizinische Klinik, Toxikologische Abteilung</b> TU München, Prof. Dr. med. Th. Zilker

**Famulaturen**


---

<b>03/2011</b>	<b>Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie</b> TU München, Prof. Dr. med. Reiner Gradinger
<b>09/2009</b>	<b>Klinik für Sportorthopädie</b> TU München, Prof. Dr. med. Andreas Imhoff
<b>08/2009</b>	<b>Bodenseeklinik Lindau</b> Prof. Dr. med. Werner Mang, Dr. med. Thomas Fischer
<b>03/2009</b>	<b>Institut für Medizinische Mikrobiologie</b> TU München, Prof. Dr. med. Thomas Miethke

**Weitere Berufserfahrung**


---

<b>07/2008 - 11/2011</b>	<b>Hakenhalter, Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie</b>
<b>10/2008 - 03/2009</b>	<b>Assistent für den Studentenkurs Mikrobiologie</b>
<b>10/2007 - 03/2008</b>	<b>Assistent für den Präparierkurs</b>
<b>11/2002 - 09/2006</b>	<b>Rettungssanitäter</b>

## 13 Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. med. Reiner Gradinger, ehemaliger Direktor der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie und ärztlicher Direktor des Klinikum rechts der Isar der TU München, sowie Prof. Dr. med. Rüdiger von Eisenhart-Rothe, Direktor der Klinik für Orthopädie und Sportorthopädie für die Möglichkeit, die vorliegende Dissertation an ihrer Klinik durchführen zu können.

Sehr bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn apl. Prof. Dr. med. Hans Gollwitzer, der mir die Mitarbeit an diesem außergewöhnlichen Projekt ermöglicht hat.

Ein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Ingo Banke, der mir während der gesamten Zeit zur Seite stand. Danke auch für die gemeinsame Arbeit an unseren Publikationen und Postern.

Außerdem möchte ich mich bei Frau Dr. med. dent. Belma Saldamli und Frau Jutta Tübel bedanken, die mich nicht nur an das wissenschaftliche Arbeiten herangeführt haben, sondern mich stets hilfreich begleiteten.

Ebenso bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. rer. nat., Dipl. Stat. Alexander Hapfelmeier, Institut für Medizinische Statistik und Epidemiologie der TU München, für die Mithilfe bei der statistischen Auswertung sowie bei Dr. med. Felix Pankow für den deskriptiven Erstnachweis von AMP Mustern in der Synovialflüssigkeit.

Zu guter Letzt möchte ich mich besonders bei meiner Frau Cora und meiner Mama Annegret für ihre Geduld und ihre Unterstützung bedanken.

## **14 Erklärung**

Hiermit erkläre ich, Nikolas Stade geboren am 25.02.1981, an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unzulässige Hilfe verfasst zu haben. Es wurden keine anderen Hilfsmittel als die angegeben verwendet. Alle wörtlichen oder inhaltlichen Textstellen sind als solche gekennzeichnet.

Des Weiteren erkläre ich den angestrebten Doktorgrad noch nicht erworben zu haben oder in einem früheren Promotionsverfahren gescheitert zu sein.

Nikolas Stade

---



---