

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Klinik und Poliklinik für Orthopädie
des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. med. Wolfgang Rüter

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall- Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von

Jakob Valentin Nüchtern
aus München

Hamburg 2010

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 23.07.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. C.H. Lohmann

Prüfungsausschuss, zweiter Gutachter: PD Dr. W. Lehmann

Prüfungsausschuss, dritter Gutachter: PD Dr. D. Briem

Inhaltsverzeichnis

1.	<u>Einleitung</u>	5
1.1.	<i>Historischer Überblick des Gelenkersatzes im Allgemeinen, der Metallpaarungen im Speziellen</i>	6
1.2.	<i>Indikationsstellung für den primären endoprothetischen Hüftgelenkersatz</i> ...	7
1.3.	<i>Aseptischer Verlust von Hüftendoprothesen</i>	7
1.4.	<i>Entstehung von Abriebpartikeln</i>	8
1.5.	<i>Reaktion auf die Abriebpartikel</i>	9
1.6.	<i>Allergie gegen Metall/ Metall-Paarungen</i>	9
2.	<u>Fragestellung</u>	11
3.	<u>Material und Methoden</u>	12
3.1.	<i>Patienten</i>	13
3.2.	<i>Metallgehalt</i>	14
3.3.	<i>Histologie</i>	14
3.4.	<i>Etablierung einer Methode zur Isolierung der Abriebpartikel</i>	14
3.5.	<i>Isolierung der Abriebpartikel</i>	29
3.6.	<i>Protokoll</i>	31
3.7.	<i>Charakterisierung der Metallpartikel</i>	32
3.8.	<i>Spektralanalyse</i>	33
3.9.	<i>Statistische Auswertung</i>	34
4.	<u>Ergebnisse</u>	36
4.1.	<i>Anzahl der Partikel pro Gramm periprothetischen Gewebes bei lymphozytären Infiltraten</i>	37
4.2.	<i>Größe der Partikel in Abhängigkeit der Gewebereaktion</i>	38
4.3.	<i>Anzahl der Partikel pro Gramm periprothetischen Gewebes bei Osteolysen</i>	39
4.4.	<i>Größe der Partikel in Abhängigkeit von Osteolysen</i>	40
4.5.	<i>Größe der Partikel in Abhängigkeit von Luxationen</i>	41
5.	<u>Diskussion</u>	42
5.1.	<i>Diagnostik bei Versagen einer Endoprothese</i>	47
6.	<u>Zusammenfassung</u>	48
7.	<u>Abkürzungsverzeichnis</u>	49
8.	<u>Literaturverzeichnis</u>	51
9.	<u>Abbildungsverzeichnis</u>	57

**Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die
periprothetische Gewebeantwort**

10.	<u>Verwendete Reagenzien</u>	59
11.	<u>Danksagung</u>	60
12.	<u>Wissenschaftlicher Lebenslauf</u>	61
13.	<u>Eidesstattliche Versicherung</u>	63

1. Einleitung

Es werden in einem Jahr ca. 1 Millionen Gelenkendoprothesen auf der Welt implantiert. Im Jahre 2007 war die Implantation einer Endoprothese am Hüftgelenk mit 219.257 Eingriffen die am 7. häufigsten durchgeführte Operation in der Bundesrepublik Deutschland mit steigender Tendenz, denn 2006 waren es 199.040 und 2005 noch 194.453 Eingriffe pro Jahr (Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2009). Die Implantationsrate von Endoprothesen in den 1990er Jahren in den OECD-Staaten lag zwischen 50 und 130 Eingriffen pro 100.000 Einwohner.

In den westlichen Industrieländern sind ca. 15% der über 65 Jährigen von einer Arthrose des Hüftgelenkes betroffen.

Die Hüftgelenksimplantation macht einen großen Teil der Kosten der Behandlung von Erkrankungen des Bewegungsapparates aus. Diese Kosten werden in den Industrieländern mit 1 bis 3% des Bruttosozialproduktes veranschlagt (Merx et al. 2003).

Bei der aktuellen Gesundheitspolitik und der demographischen Veränderung unserer Gesellschaft zu einer immer älter werdenden Population ist es nötig, hochwertige Endoprothesen zu entwickeln, die dem Patienten eine möglichst lange Standzeit ermöglichen. Dies ist wichtig, um eine aufwendige und invasive Revision so lange wie möglich zu vermeiden.

Der Anspruch an die Funktionalität der Prothesen ist gestiegen, heutige Patienten mit künstlichen Gelenken sind vitaler, treiben mehr Sport als noch in den Jahren zuvor, so dass den Prothesen eine höhere Belastung abverlangt wird.

Es gilt also zu erreichen, dass Patienten Endoprothesen erhalten, deren konjugierende Gelenkpartner aus Materialien bestehen, die der gestiegenen Belastung standhalten und eine minimale negative Reaktion der umliegenden Gewebe provozieren.

1.1. Historischer Überblick des Gelenkersatzes im Allgemeinen, der Metallpaarungen im Speziellen

Der Berliner Chirurg Themistocles Gluck implantierte 1890 als Erster ein Kunstgelenk aus Elfenbein (Zipple & Meyer-Ralfs 1975). Davor praktizierten bereits 1768 Charles White die Resektionsarthroplastik, Verneuil 1860 die Interpositionsarthroplastik und Tietze 1897 den autogenen Gelenkersatz (Rauschmann et al. 2000).

1858 führte Langenbeck die erste Bolzung einer Schenkelhalsfraktur mit einer versilberten Metallschraube durch (Braunsdorf & Konradt 1977). 1909 entwickelte Krupp eine Chrom-Nickel-Stahl-Legierung, die vor allem bei temporären Implantaten zur Anwendung kam.

Smith-Petersen implantierte 1923 eine Glasschale als sogenannte „hip cup“. Er experimentierte mit verschiedenen Materialien wie Glas und Bakelit, bis er schließlich mit einer CoCrMo-Legierung (Vitallium) große Fortschritte erzielte. 1950 experimentierten A.R. Moor und F.R. Thompson an einer Kopf-Hals-Prothese aus Metall (Coventry 1979).

G.K. Mc Kee und J. Watson-Farrar entwarfen die erste Hüfttotalendoprothese. Diese setzte sich aus einer Pfannenschale und einer Schaftkomponente aus CoCrMo-Legierung ohne Polyethylen-Inlay zusammen. McKee und Farrar waren es auch, die 1953 die erste Metall/ Metall-Gleitpaarung im Bereich der Hüftendoprothetik einführten.

Hervorzuheben ist noch Sir John Charnley. Seit seiner Etablierung des Knochenzements PMMA im Jahre 1960 hat die Hüftendoprothetik weltweit einen enormen Aufschwung erfahren. Er war es auch, der 1958 das Konzept der „low friction arthroplasty“ mit dem Ziel der Minimierung des Abriebs einführte.

Willert zeigte 1977 die guten tribologischen Eigenschaften einer neuen low friction Paarung, der Keramik/ Polyethylen-Paarung. Er zeigte im Weiteren auch, dass der Verschleiß von Endoprothesen eine Kaskade von biologischen Reaktionen induziert, die ultimativ in der aseptischen Lockerung mündet.

Metall/ Metall-Hüftendoprothesen der zweiten Generation aus Kobalt-Chrom-Molybdän-Nickel-Legierungen sind vor ca. 20 Jahren, begonnen 1988 von Weber (Weber 1995), in der Orthopädie wieder eingeführt worden.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Einleitung

Die in den 60iger und 70iger Jahren implantierten Prothesen, wurden in ihrer Zusammensetzung, Herstellung und ihrem prothetischen Design weiterentwickelt. Dadurch zeigt diese Paarung aufgrund dieser verbesserten tribologischen Eigenschaften und der höheren Qualität ihrer Legierungen ermutigende mittelfristige klinische Resultate mit einem geringen Implantatversagen.

1.2. Indikationsstellung für den primären endoprothetischem Hüftgelenksersatz

Die Indikation zum künstlichen Gelenksersatz der Hüfte ist ein in der Funktion eingeschränktes und schmerzhaftes Gelenk, dessen Zustand sich unter konservativen Behandlungen und/ oder minimal invasiveren Operationen auf längere Sicht nicht kurieren oder verbessern lässt.

Am häufigsten tritt dieser Zustand bei der Arthrosis deformans, einer degenerativen Gelenkerkrankung auf.

Von Arthrose spricht man, wenn ein Missverhältnis zwischen Beanspruchung und Belastbarkeit der einzelnen Gelenkanteile und –gewebe entsteht. Die primäre oder auch idiopathische Pathogenese ist auf direkte (Schwerarbeit, Sport, hohes Körpergewicht) und indirekte (Verminderung der Leistungsfähigkeit, endogene Veränderungen) Überbeanspruchung zurückzuführen. Die sekundären Ursachen können zum einen kongenitale dysplastische Zustände, zum anderen entzündliche Gelenkerkrankungen sein.

1.3. Aseptischer Verlust von Hüftendoprothesen

Bei Metall/ Metall-Hüftendoprothesen sind Überlebensraten nach 14 Jahren mit 85 % und nach 20 Jahren mit 77 % beschrieben. Davon sind bis zu 80 % aufgrund eines aseptischen Verlustes revidiert worden (Dumbleton & Manley 2005).

Der aseptische Verlust einer Endoprothese ist die häufigste Lang-Zeit-Komplikation (Murray & Rushton 1990) und die Folge von Zellreaktionen, die eine Knochenresorption hervorruft. Ursache dieser Zellreaktion sind Verschleißprodukte der Prothese (Rubash et al. 1998;Wang et al. 2004;Willert et al. 2005).

1.4. Entstehung von Abriebpartikeln

Die Entstehung des Abriebs ist im Hauptsächlichen auf drei Ursachen zurückzuführen: die Abrasion, die Adhäsion und die Materialermüdung (Bauer & Schils 1999).

Abrasiver Abrieb kommt dann zustande, wenn Gleitpartner unterschiedlicher Härte konjugieren, die Partikel stammen in diesem Fall von dem weniger harten Partner, wie zum Beispiel vom Polyethylen bei einer PE/ Metall-Paarung.

Der adhäsive Abrieb hat die transiente Bindung der Oberflächen der Gleitpartner zur Ursache; hier werden bei Bewegung Partikel aus der Pfanne oder aus dem Kugelkopf gerissen.

Der Ermüdungsabrieb ist bei Langzeitprothesen zu beobachten, bei denen die Korrosion der Bestandteile ein Grund sein kann. Ein anderer Grund kann die lange mechanische Beanspruchung der Materialien sein, die die Belastungsfähigkeit der Gelenkpartner zu überschreiten vermag und sich so Partikel aus den Partnern lösen können.

McKellop (McKellop HA 1995) umschreibt vier Modi der Prothesendestruktion, die auch als Mischform verantwortlich für den Abrieb sein können.

Der Modus I, bei dem der Großteil von Partikeln entstehen soll, tritt bei für einander konzipierten Partnern auf.

Ursache des Modus II sind konjugierende Paarungen, die im prothetischen Design nicht dafür vorgesehen waren. Der Modus III beschreibt einen abrasiven Abrieb aufgrund von Partikeln an einer der beiden Oberflächen der Gelenkpartner. Im Modus IV artikulieren sekundäre Oberflächen zum Beispiel Schaft und Außenschale der acetabulären Komponente.

1.5. Reaktion auf die Abriebpartikel

Metall/ Metall-Paarungen scheinen einen geringeren volumetrischen Abrieb und dabei aber eine geringere Größe an Abriebpartikeln, als Metall/ Polyethylen-Gleitpaarungen zu erzeugen (Doorn et al. 1996;Sieber et al. 1999) und sollen somit zu einer geringeren Gewebeantwort führen (Doorn et al. 1998).

Abriebpartikel aller Art verursachen bei Erreichen eines Schwellenwertes eine periprothetische Gewebereaktion, bei der es zur Aktivierung von Monozyten und Lymphozyten kommt. Es entstehen daraufhin Granulome und Osteolysen, die einen aseptischen Verlust der Endoprothese zur Folge haben (Willert & Semlitsch 1977).

Wang spricht von 3 Mechanismen, die eine Osteolyse hervorrufen: Aktivierung von Makrophagen/ Osteoklasten, gestörte Osteogenesis und zytotoxische Antwort der mesenchymalen Osteoprogenitorzellen (Wang et al. 2004).

Des Weiteren verändern sich die Partikel unter dem Einfluss einer lysosomalen Digestion. Dieser als intrazelluläre Korrosion beschriebener Effekt hat zur Folge, dass die Partikel noch weitere spezifische Reaktionen hervorrufen können (Shahgaldi et al. 1995).

1.6. Allergie gegen Metall/ Metall-Paarungen

Mehreren Studien zu Folge gab es bei der ersten Generation der Metall/ Metall-Paarungen Lockerungen der Prothesen aufgrund einer Hypersensitivitätsreaktion gegen Kobalt, Chrom und Nickel (Benson et al. 1975;Elves et al. 1975;Evans et al. 1974). Nach Jacobs et al. sind vor allem die Größe, aber auch die Form und die chemische Zusammensetzung der Abriebpartikel entscheidende Faktoren der Bioreaktivität dieser Hypersensitivitätsreaktion Typ IV Reaktion (Jacobs & Hallab 2006).

Auch bei der zweiten Generation dieser Paarung entwickelten einige wenige Patienten eine Typ IV-Allergie (DTH) und dadurch eine aseptische Lockerung des Implantats (Lohmann et al. 2007;Park et al. 2005;Willert et al. 2005).

Diese Lymphozyten-Assoziierte Reaktion ergibt sich durch die Ausschüttung der

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Einleitung

Zytokine IL 2, IFN-gamma und RANKL (receptor activator of NF-kappaB ligand), welche direkt und indirekt eine Osteoklasten-Aktivierung und eine Osteoblasten-Inhibierung hervorrufen (Hallab et al. 2002).

2. Fragestellung

In früheren Studien wurde von periprothetischem Gewebe aus Revisionsgeweben von Implantatversagern von Metall/ Metall- Endoprothesen die Histomorphologien wie auch die Metallgehalte untersucht (Lohmann et al. 2007;Willert et al. 2005).

Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, den metallischen Abrieb aus den genannten Geweben zu isolieren, elektronenmikroskopisch abzubilden und zu charakterisieren, um eine Korrelation mit der beobachteten Typ IV-Reaktion zu etablieren.

Hierzu wurde das von Dean et al., und Maloney et al. für UHMWPE-Partikel benutzte Protokoll (Dean et al. 1999;Maloney et al. 1995) modifiziert und ein Verfahren entwickelt, das die Größe, Form und Anzahl der Metallpartikel bei der Isolation aus den Geweben so wenig wie möglich beeinflusst.

3. Material und Methoden

Es wurden in dem Zeitraum von 1994 bis 1999 501 Patienten primär mit 574 Metall/ Metall Hüftendoprothesen (zementfrei) von einem Operateur versorgt. Bei 5,9 % der Prothesen wurde bis zum Jahre 2006 eine Revision notwendig; 4 davon in externen Häusern und 30 im primär versorgenden Hause.

Bei 33 Patienten mit 34 gelockerten Metall-Metall-Endoprothesen (CoCrMo, Sikomet®, Fa. Plus Orthopaedics, Rothkreuz, Schweiz) wurden Wechseloperationen vorgenommen. Die periprothetischen Gewebe wurden asserviert und histologisch untersucht.

Die Patienten erhielten bei der Wechseloperation Paarungen aus Metall-UHMWPE, Keramik-UHMWPE oder Keramik-Keramik.

Die Implantate stammten von der Schweizer Firma Plus Endoprothetik AG (Rothkreuz) und hatten einen geringen Carbid Gehalt in der CoCrMo-Legierung.

Zur Analyse wurden 21 Gewebeproben der Neokapsel untersucht, die während der Revisionsoperation entnommen wurden und nach der histologischen Untersuchung noch zur Verfügung standen.

3.1. Patienten

Die 21 Patienten der Studie waren im Mittel 69 (52-81) Jahre alt, darunter 4 Männer und 17 Frauen.

Die Prothesen verblieben durchschnittlich 73 (28-144) Monate in den Patienten. Symptome zeigten sich 3 Wochen bis 36 Monate postoperativ.

Die Patienten hatten folgende Symptome: Hüft-/ Oberschenkelschmerzen, Subluxationsphänomene oder Klickgeräusche. Intraoperativ zeigten 16 Patienten eine Metallose, 10 Patienten hatten eine ausgedehnte ventrale Bursa vor dem Hüftgelenk. Klinisch zeigten sich Beschwerden bei 18 Patienten. Bei 1 Patienten traten rezidivierende Luxationen und bei 1 Patienten hörbare metallische Klickgeräusche im Bereich der Endoprothese auf. In 12 Fällen wurden radiologische Zeichen der Lockerung mit Osteolysen beobachtet (Lohmann et al. 2007).



Abb. 1: Röntgenbilder: Progrediente Osteolyse eines Patienten (B.S.*1942) von 07.1996 bis 02.2003

In vorangegangenen Arbeiten wurden die entnommenen Präparate der Neokapsel histologisch aufgearbeitet und nach deren Metallgehalten bezüglich Kobalt, Chrom und Nickel untersucht (Lohmann et al. 2007; Willert et al. 2005).

3.2. Metallgehalt

Der Metallgehalt in den Gewebeproben betrug 1,4 – 4604,0 µg(Co, Cr, Ni) / g Gewebe (Lohmann et al. 2007).

3.3. Histologie

Histologisch wurden diffuse wie auch perivaskuläre B- und T-Lymphozyten aber auch einige Makrophagen, die Partikel gespeichert hatten, beobachtet. Bei sehr geringer oder exzessiver Metallose wurden allerdings keine lymphozytären Infiltrationen gesehen (Lohmann et al. 2007). Die Infiltration der Gewebe mit B- und T-Lymphozyten, High endothelial venules, Nekrosen, Fibrinexsudationen und Plasma- und Mastzellen wird, wie oben erwähnt als Nachweis der Typ IV-Allergie gewertet.

Von den 21 Proben, die der vorliegenden Studie zur Untersuchung vorlagen, zeigten 15 Proben lymphozytäre Infiltrate.

3.4. Etablierung einer Methode zur Isolierung der Abriebpartikel

Die Gewebeproben wurden mit Papain verdaut und über Polyesterfilter mit einer genormten Porengröße von 0,2 µm gefiltert. Die verwendeten Filter stammen von der Firma Sterlitech Corporation aus Kent, Washington, USA (Polyester, Membrane Filters 0,2 µm 47 mm Qty. 100; P/ N PET 0247100).

Papain ist eine Cysteinprotease, die aus der Papaya-Frucht gewonnen wird. Dieses Enzym wird schon seit dem 19. Jahrhundert für Gewebeverdauungen genutzt (Martin 1885).

Zu Beginn der Analyse wurde festgestellt, dass das Filtern einer Gewebeprobe von 2 g nach dem Digestionsprotokoll mittels Papain, nach Dean et al. und Maloney et al., das für UHMWPE-Partikel etabliert ist und insbesondere bei Granulomgewebe

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

Verwendung findet (Dean et al. 1999;Maloney et al. 1995), den verwendeten Polyesterfilter übersättigt.

Auch das Filtern verschiedener Konzentrationen dieser Verdauungssuspension brachte aufgrund der hohen Masse an Geweberesten keinen Erfolg.

Es war ein Waschen der Proben erforderlich, um Reste der Digestion zu minimieren, dazu musste der Überstand abpipettiert werden. Auf eine Zentrifugation wurde verzichtet, um eine beschriebene, mögliche Agglomeration der Partikel (Doorn et al. 1998) nicht zu forcieren. Vor dem Abpipettieren des Überstandes mit einem Mindestabstand von 0,5 cm zum Bodensatz, standen die Proben jeweils 24 Stunden bei 4 °C. Der Überstand wurde verworfen.

Um ein Ausfallen von Kristallen zu vermeiden, wurde als Waschlösung kein Puffer, sondern Aqua ad iniectabilia (aqua) verwendet.

Ein einmaliges Waschen war ungenügend. Der Vorgang wurde viermal wiederholt.

Die Zellreste zeigten sich ausgeprägt, so dass eine Beurteilung der Partikel kaum bzw. gar nicht möglich war.

Partikel, die sich nicht an der Oberfläche der Probe befinden, sind im Rasterelektronenmikroskop nicht sichtbar, da nur die Oberfläche abgetastet wird. Aufgrund des höheren Gewichts der Partikel gegenüber den Zellresten muss davon ausgegangen werden, dass die Metallpartikel sich während des Siebens zuerst auf dem Filter ablagern. Folglich entzieht sich eine erhebliche Anzahl der Partikel der Untersuchung, da diese unter den Geweberesten zu liegen kommen.

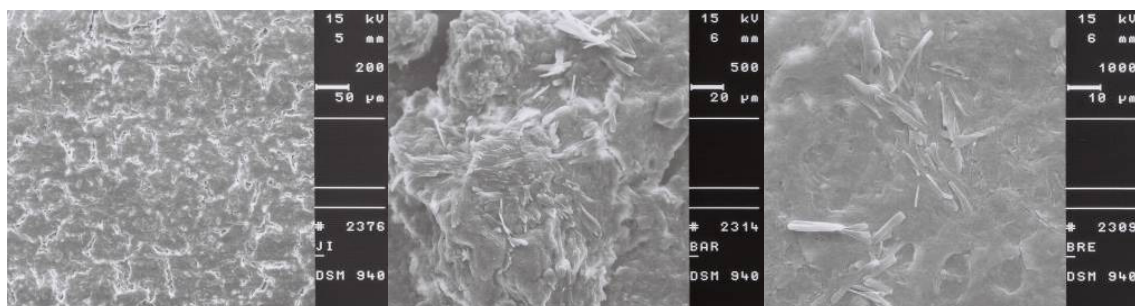


Abb. 2: REM (200-fach).

Abb. 3: REM (500-fach).

Abb. 4: REM (1.000-fach).

REM von verschiedenen Patientenproben gleicher Konzentration, behandelt nach Dean et al. 1999.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

Die Zellreste zeigen sich in Abb. 2-4 so massiv, so dass nur vereinzelt Partikel erahnt werden konnten, welche weder in genauer Größe, Form oder ungefährender Anzahl beurteilbar sind.

Um die Zellreste von den übersättigten Polyesterfiltern zu lösen und weiter zu zerkleinern wurde ein Ultraschallwellenbad (Sonorex RK 52H, Bandelin®, Mörfelden-Walldorf, Deutschland) als Behandlungsschritt eingeführt.

Die Polyesterfilter mit der aufliegenden papainverdauten getrockneten Gewebesuspension entsprechend 0,2 g Gewebemasse mit einem Durchmesser von 0,2 µm, wurden in eine Falcon-Tube (Falconröhrchen) von 50 ml, zuzüglich 15 ml aqua gegeben. Diese Falcon-Tubes wurden 15, 30 und 60 min in das Ultraschallwellenbad gelegt. Es zeigte sich, dass die gefilterten Bestandteile sich nach 15 min kaum, nach 30 min zunehmend und nach 60 min zum größten Teil vom Filter lösten, was im REM kontrolliert wurde (Abb. 5).

Die entstandene Lösung wurde erneut über einen, wie oben beschriebenen Polyesterfilter gegeben. Die Filter wurden anschließend erneut im REM untersucht (Abb. 6).

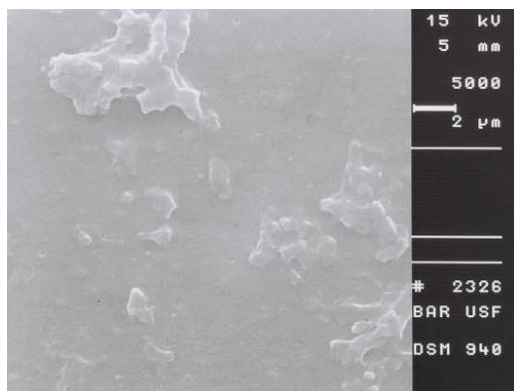


Abb. 5: REM gewaschener Filter (5.000-fach).

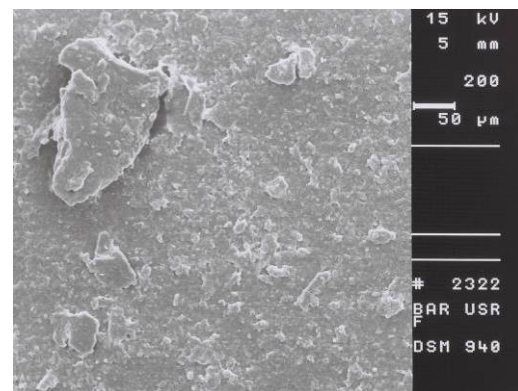


Abb. 6: REM erneut gefilterte Lösung (200-fach).

Das Resultat zeigt, dass die Behandlung eine genauere Beurteilung der Ausmaße der Partikel ermöglicht. Die Unterscheidung von Partikel und Zellresten bleibt fraglich. Es sind Reste auf dem Filter nachweisbar.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

Es wurde die papainvermittelte Verdauung nach Dean et al., mit den Ultraschallbad-Proben wiederholt, um die vorhandenen Gewebereste weiter zu verdauen.

Das bedeutet, dass die Gewebeprouben von 0,2 g Gewebe nach Dean et al. mit Papain verdaut und gefiltert wurden. Diese Filter wurden mit 15 ml aqua in einer 50 ml Falcon-Tube für 60 min in ein Ultraschallwellenbad gegeben, die daraus entstandene Lösung im Falcon-Tube wurde erneut nach Dean et al. mit Papain verdaut und über den genannten Polyesterfilter mit der Porengröße von 0,2 µm gesiebt. Diese Filter wurden im REM untersucht.

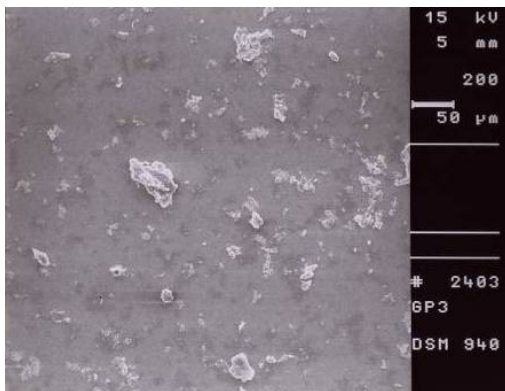


Abb. 7: REM (200-fach).

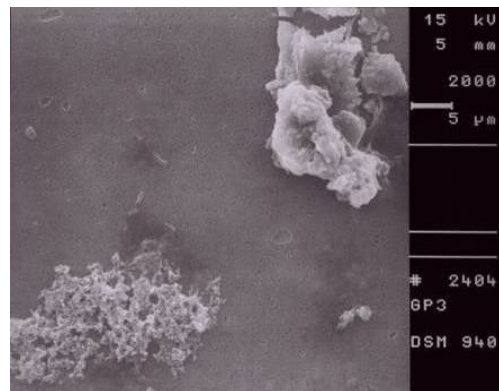


Abb. 8: REM (2.000-fach).

REM nach sequenzieller Papain-Verdauung und Ultraschall-Behandlung.

Die Verdauung der Proben in Abb. 7 und 8 ist im Vergleich zu den vorangegangenen Bildern fortgeschritten, aber aufgrund von Zellresten immer noch unzureichend. Die Poren der Filter sind zu erkennen.

Das Ultraschallbad wurde mit der Frage akkumulierende und adhärenente Partikel zu trennen ein weiteres Mal angewandt, um entstandene Cluster zu spalten.

Proben, die einen weiteren Verdauungszyklus mit Papain nach oben genanntem Protokoll durchliefen, wurden zu gleichen Teilen getrennt.

Anschließend wurden 50% der Probe in einem 50 ml Falcon-Tube eine Stunde in das Ultraschallbad gegeben und danach gefiltert.

Der andere Teil der Probe wurde zum Vergleich ohne weitere Anwendung gefiltert.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

Ohne Ultraschallbehandlung

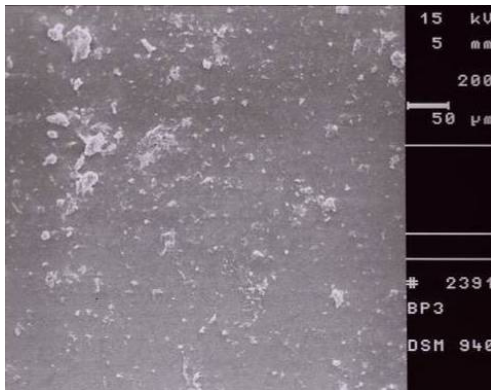


Abb. 9: REM (200-fach).

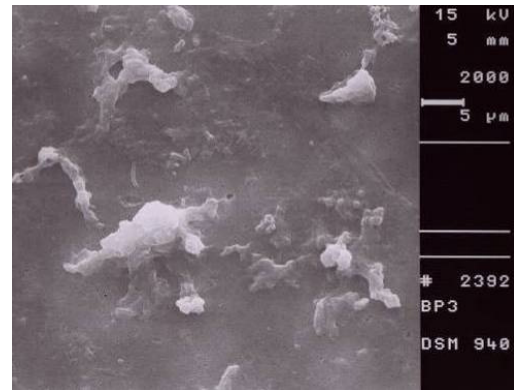


Abb. 10: REM (200-fach).

nach 60 min Ultraschallwellenbadbehandlung

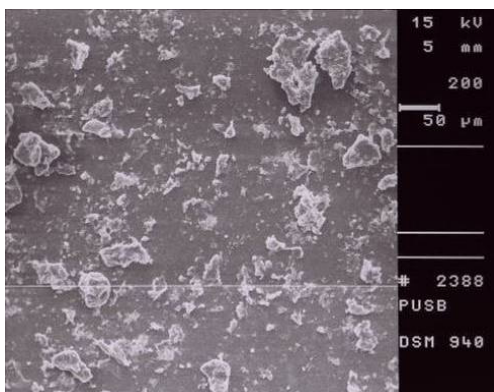


Abb. 11: REM (200-fach).

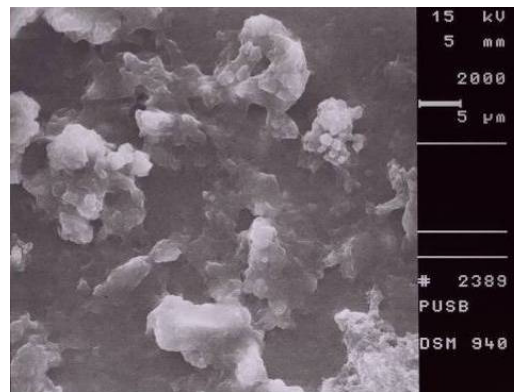


Abb. 12: REM (2.000-fach).

Die REM Bilder zeigen, dass eine Trennung adhärenter Partikel nicht offensichtlich ist. Des Weiteren lagte sich bei der ultraschallbehandelten Probe ein dünner Bio-Film über den Filter. Folglich ist eine Betrachtung einzelner Partikel nicht möglich. Vermutlich resultieren die Biofilme durch den Papain-Verdau, der eher zelluläre Bestandteile aufschließt.

Eine Zellrestminimierung war auch in diesem Fall nicht ausreichend oder eindeutig nachweisbar.

In den histologischen Schnitten der Gewebeproben zeigt sich ein zellarmes/ oligotrophisches Gewebe-Bild. Aufgrund dieses oligotrophen Gewebes mit unterschiedlicher Proteinzusammensetzung, geringem zellulären Anteil, aber hohem

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

Maß an extrazellulärer Matrixbildung, wurde zur Matrix-Auflösung das Verdauungsenzym Trypsin, einer unspezifischen Endopeptidase der Verdauungsbehandlung hinzugefügt.

Trypsin wurde in einer 0,05 % Lösung (PBS ohne Mg, Ca; 37 °C) bei 2 ml/ 0,2 g Gewebe verwendet und in einer unterschiedlichen Anzahl von Tagen angewandt, um die Halbwertszeit des Enzyms bzw. die fortgeschrittene Verdauung zu beurteilen.

Zum einen wurde die Lösung direkt auf das Gewebe, zum anderen bei bereits mit Papain vorverdauten Proben angewandt.

Das Verdauen unbehandelten Gewebes mit Trypsin ergab auch nach 12 Tagen keine positiven Resultate, es zeigte sich makroskopisch lediglich eine grobe Andauung der Proben.

Die Anwendung auf Gewebe, das mit Papain-Lösung angedaut wurde, ergab bei der gleichen Patientenprobe unter Verwendung einer entsprechenden Menge an Gewebe folgende Ergebnisse:

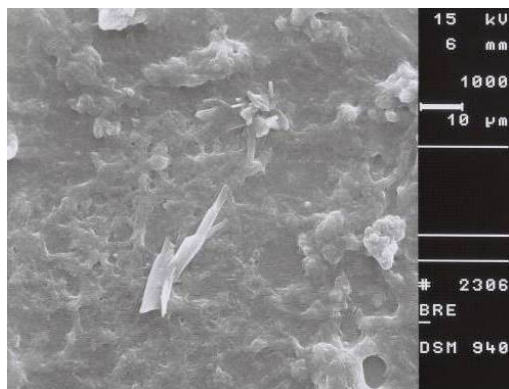


Abb. 13: REM nur mit Papain behandelt (1.000-fach).

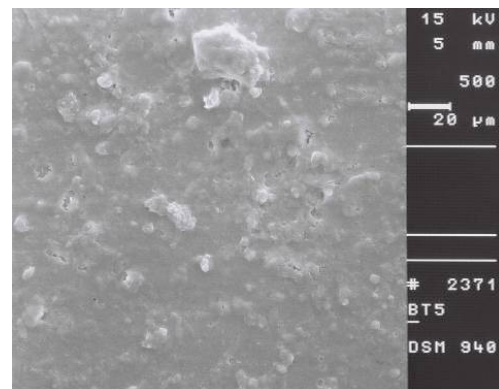


Abb. 14: REM mit Papain anschließend Trypsin nach 5 Tagen (500-fach).

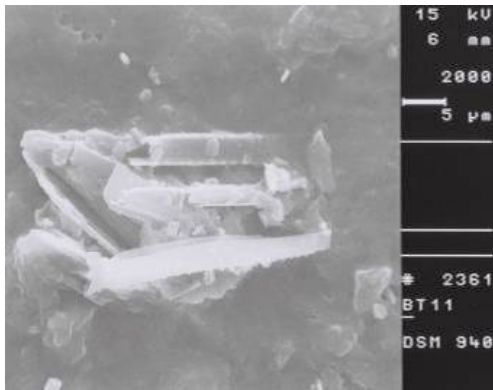


Abb. 15: REM 0,2 g mit Papain anschließend Trypsin nach 11 Tagen (2.000-fach).

Nach 5 Tagen sind in Abb. 14 kleinere Partikel besser zu beurteilen, nach 11 Tagen sind diese und die Poren der Filter besser zu erkennen, Abb. 15. Dies kann als Hinweis für eine weitere Reduktion von Zellresten und Matrixbestandteilen gewertet werden.

Die Zellreste waren von geringerem, aber dennoch von erheblichem Ausmaß, so dass eine Partikelmorphologie nicht sicher zu bestimmen war.

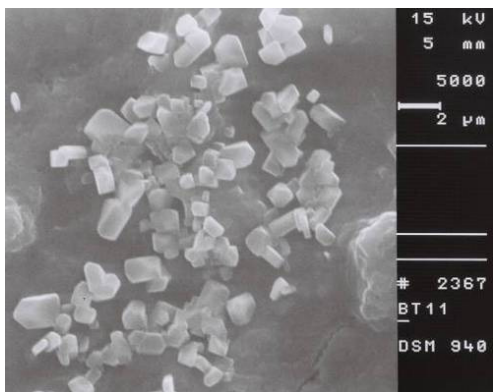


Abb. 16: REM (5.000-fach).

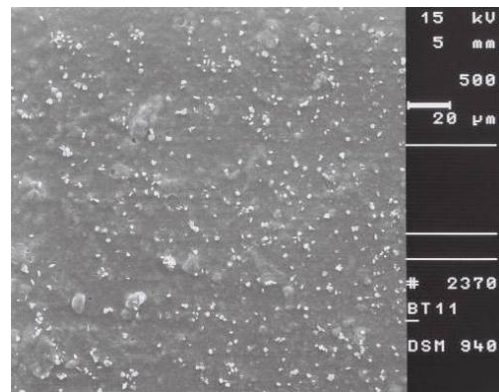


Abb. 17: REM (500-fach).

REM Papain nach Dean et al. 1999 und Trypsin nach 11 Tagen.

In einer Probe zeigt sich nach 11 Tagen Trypsin-Anwendung eine Vielzahl von gleichförmig eckigen, sich von der Oberfläche deutlich abgrenzende Partikel, welche einen Durchmesser von ca. 0,5 bis 2 µm aufwiesen.

Bei der gezeigten Abb. 16 kann ein Ausfallen von Kristallen ohne spektrometrischer Untersuchung nicht ausgeschlossen werden.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

Im weiteren Versuch wurde davon abgesehen, eine Trypsin-Lösung länger als 6 Tage bei einer Probe ohne Waschen zu belassen, um eine fragliche Kristallbildung zu vermeiden.

Die nach 5 Tagen weiterhin unzureichende Gewebeerddauung, wie in Abb. 14 zu erkennen, machte es nötig einen weiteren Behandlungsschritt der Methode hinzuzufügen.

Da Kollagen einen 30 % Anteil am Gesamtgewicht aller Proteine hat und einen wesentlichen Bestandteil an Sehnen, Bänder, Knorpel und Knochen trägt, wurde im Weiteren zusätzlich das Enzym Kollagenase Typ I verwendet, um insbesondere die extrazelluläre Matrix weiter zu spalten.

Im Folgenden wurde die Kombination der Enzyme Trypsin und Kollagenase Typ I zum Vergleich bei demselben Patienten untersucht, dessen Probe bereits mit Papain vorbehandelt wurde.

Es wurde beispielhaft eine Patientenprobe mit unterschiedlichen Gewebearten gewählt. Diese zeigte makroskopisch unterschiedliche Arten von Geweben: Muskel, Bindegewebe sowie Fett.

Da die Enzyme bei gleicher Temperatur und pH-Wert benutzt werden, wurden diese gleichzeitig zu den Proben gegeben. Trypsin 1 % 1 ml auf 0,1 g Gewebe, Kollagenase Typ I 0,5 % 1 ml auf 0,1 g Gewebe, beide Enzyme wurden in PBS ohne MgCa gelöst. Eine Verdauung über 5 Tage zeigte eine größere Zellrestminimierung als nach 3 Tagen.

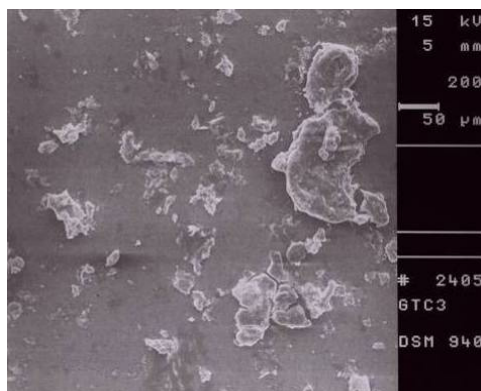


Abb. 18: REM (200-fach).

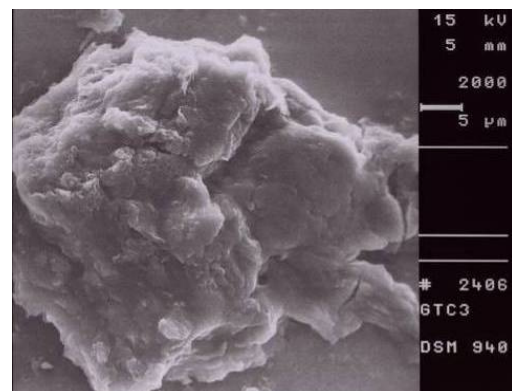


Abb. 19: REM (2.000-fach).

Papain nach Dean et al. 1999, 3 Tage Trypsin 1 % und Kollagen Typ I 0,5 %.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

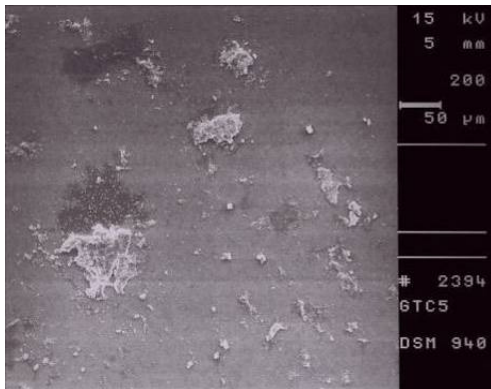


Abb. 20: REM (200-fach).

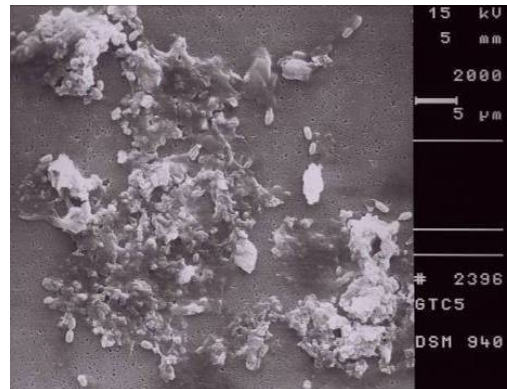


Abb. 21: REM (2.000-fach).

Papain nach Dean et al. 1999, 5 Tage Trypsin 1 % und Kollagen Typ I 0,5 %

Die einmalige Anwendung der Enzyme in zeitlicher Trennung wurde in beiden Möglichkeiten begutachtet.

Die Enzyme wurden in oben genannter Lösung jeweils 3 Tage benutzt.

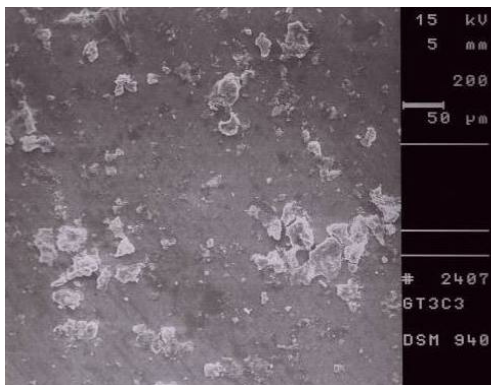


Abb. 22: REM (200-fach).

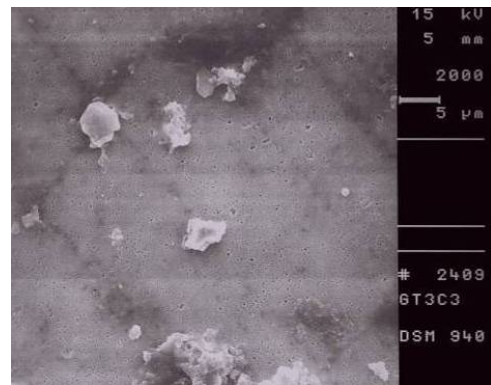


Abb. 23: REM (2.000-fach).

Papain nach Dean et al. 1999, 3 Tage Trypsin 1 % und anschließend 3 Tage Kollagenase Typ I 0,5 %

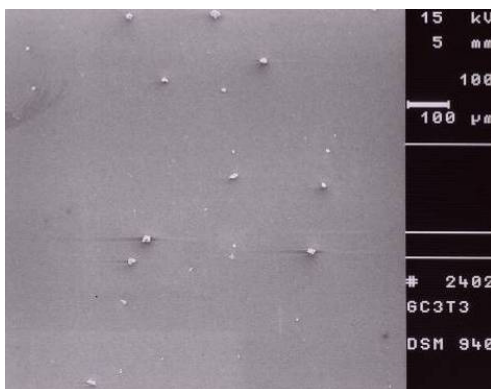


Abb. 24: REM (100-fach).

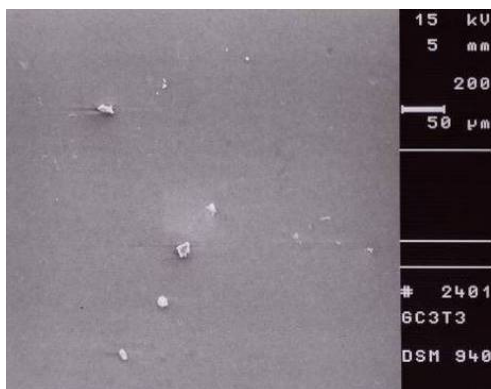


Abb. 25: REM (200-fach).

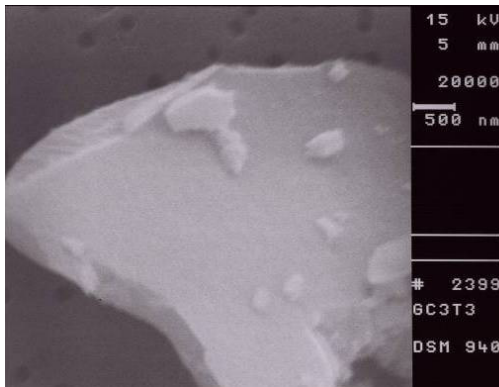


Abb. 26: REM (20.000-fach).

Papain nach Dean et al. 1999, 3 Tage Kollagenase Typ I 0,5 % anschließend 3 Tage Trypsin 1 %.

So ergab sich, dass die Behandlung mit Kollagenase Typ I und im Anschluss mit Trypsin eine befriedigende Verdauung aufzeigte.

Einzelne Proben wiesen einen fraglichen Bakterienbefall im REM auf, deswegen wurde entschieden, die Proben einer antiseptischen Behandlung zu unterziehen.

Eine mögliche antiseptische Lösung mit Natriumazid wurde nicht in Betracht gezogen, da Natriumazid (Doorn et al. 1998) mit Metallen unter anderem mit Chrom reagiert und eine Modulation der CoCrMo-Partikel induzieren könnte.

Um diesem Problem zu begegnen, wurde ein weiteres Antiseptikum, das Thimerosal angewandt. Es sind keine Interaktionen Thimerosals mit Metallen oder Enzymen nachgewiesen (persönliche Mitteilung Dr. Zonker, Fa. Sigma).

Es wurde eine 0,05 % Thimerosal-Lösung eingesetzt, mit der die Proben nach der Digestion gewaschen wurden (2 ml Thimerosal-Lösung auf 0,2 g Gewebe).

Eine Filtrierung von Proben mit Thimerosal und ohne nachfolgendes Waschen ergab, dass ein bakterieller Befall nach der antiseptischen Behandlung nicht zu beobachten war.

Zum Nachweis wurde eine Patientenprobe benutzt, die mit Trypsin behandelt, gewaschen und 10 Tage bei Raumtemperatur gelagert wurde.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

Ein Befall mit Bakterien ist im REM zu sehen.

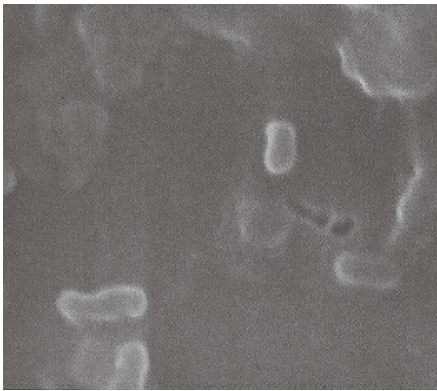


Abb. 27: REM Bakterienbefall einer Probe (20.000-fach).

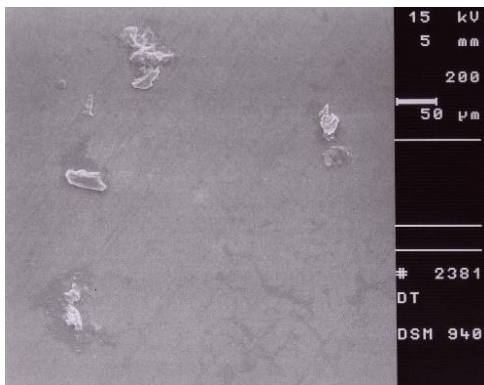


Abb. 28: REM (200-fach).

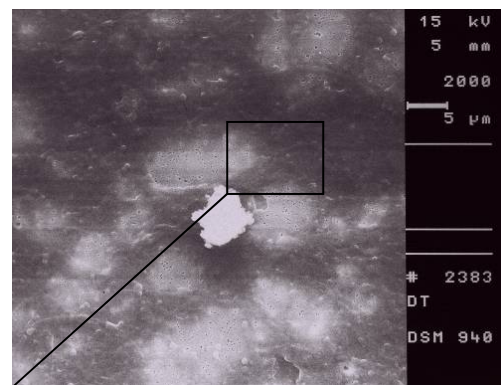


Abb. 29: REM mit fraglichen Bakterien (20.000-fach).

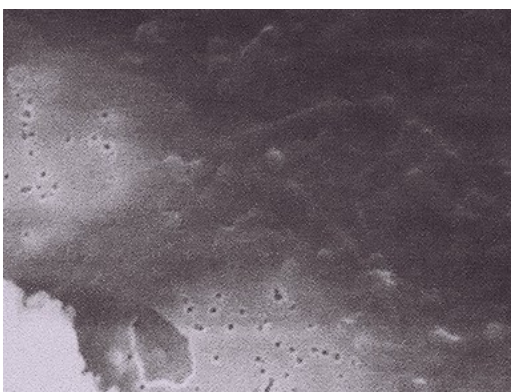


Abb. 30: REM (5.000-fach) Befall von Bakterien zu erkennen.

Im Weiteren wurde die genannte Probe mit der Thimerosal-Lösung 24 h inkubiert.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

Die folgenden Bilder zeigen oben genannte Probe nach Thimerosal-Anwendung ohne anschließendem Waschen (0,1 g Gewebe).

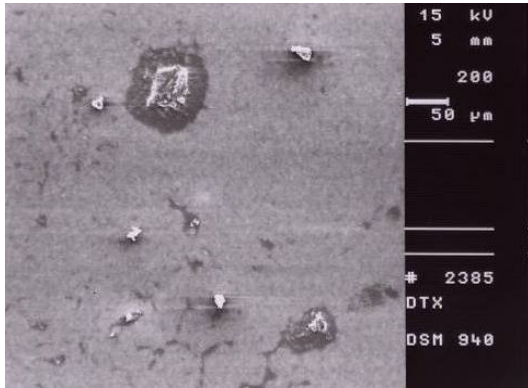


Abb. 31: REM (200-fach).

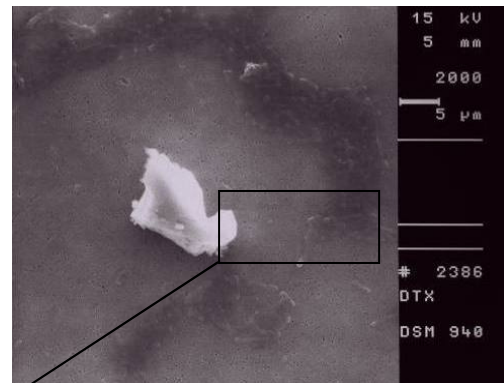


Abb. 32: REM (2.000-fach).

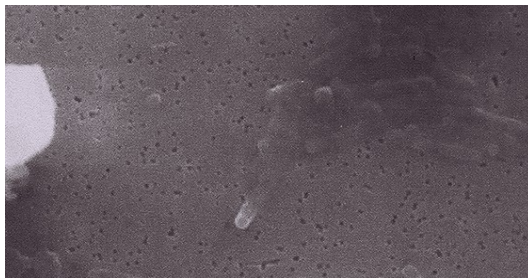


Abb. 33: REM (5.000-fach).

Die vermutlichen Bakterien sind in Abb. 31 - 33 in geringerer Anzahl auszumachen.

Alle Proben wurden nach der Digestion mit Papain, Kollagenase Typ I und Trypsin 24 h mit einer 0,05 % Thimerosal-Lösung inkubiert.

Eine bakterielle Belastung war nicht mehr aufgetreten.

Kristallbildungen waren in keinem der Fälle zu erkennen.

Die Verdauung nach letzt genanntem Enzymschema, ergab bei einigen Patientenproben weiterhin eine Verunreinigung, wie in Abb. 34 zu erkennen, so dass die Konzentrationen der Enzyme erhöht wurden.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

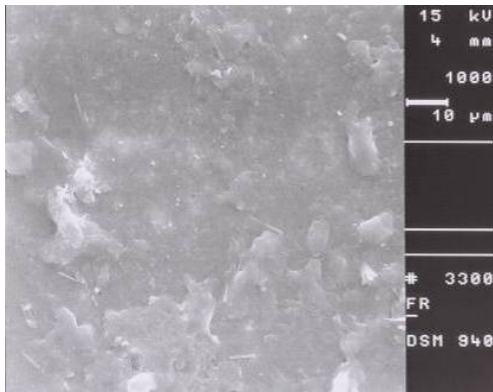


Abb. 34: REM (1.000-fach).

Gewebereste bei Papain, Kollagenase Typ I 0,5 % im Anschluss Trypsin 1 % für je drei Tage.

Die bis dahin verwendete Konzentration der Kollagenase Typ I wurde von 0,5 % erst auf 1 %, dann auf 2 % erweitert. Die Trypsin Konzentration wurde von 1 % auf 3 % (1 ml/ 100 mg Gewebe) erhöht. Die Inkubationszeit wurde je Enzym auf 4 Tage verlängert; nach 24, 48 und 72 h wurde dieselbe Menge (1 ml/ 100 mg Gewebe) und Konzentration der Enzyme den Proben jeweils hinzugefügt. Die Proben befanden sich 72 h in einem Rüttelbad mit der Rotationsfrequenz von 90 U/ min.

Nach der Enzymbehandlung wurden die Proben 24 h mit Thimerosal 0,05 % (1 ml/ 100 mg Gewebe) bei 4 °C stehen gelassen und im Anschluss der Überstand abpipettiert und mit 10 ml aqua gefiltert (0,2 µm Filter).

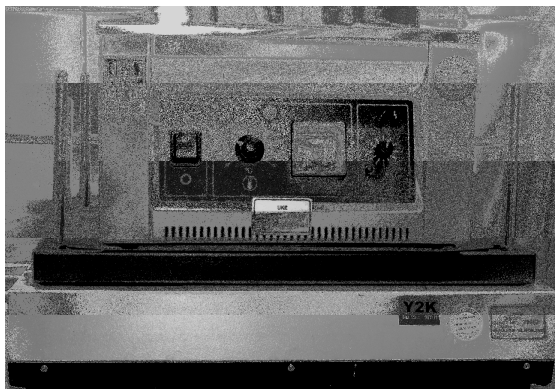


Abb. 35: Fotografie: Rotations-/Wärmebad.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

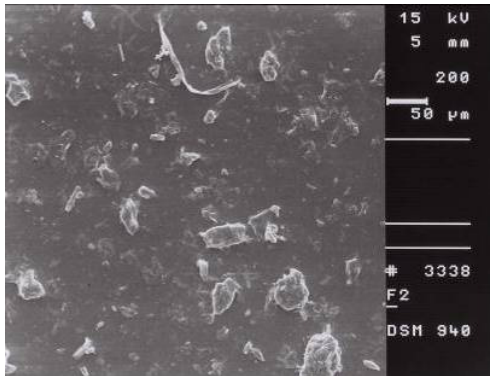


Abb. 36: REM (200-fach).

Papain, Kollagenase Typ 1 % für 96 h, im Anschluss Trypsin 3 % für 96 h und Thimerosal 0.05 % für 24 h.

Die Beurteilbarkeit zeigt sich in Abb. 36 aufgrund von größeren Zellresten noch unzureichend.

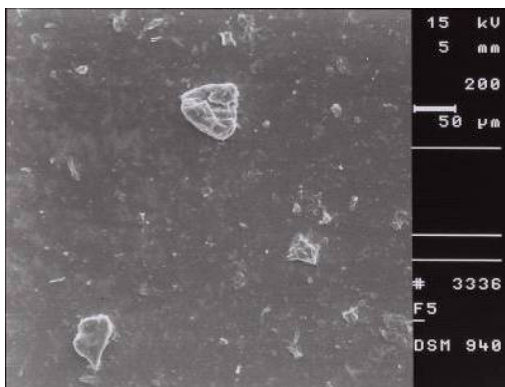


Abb. 37: REM (200-fach).

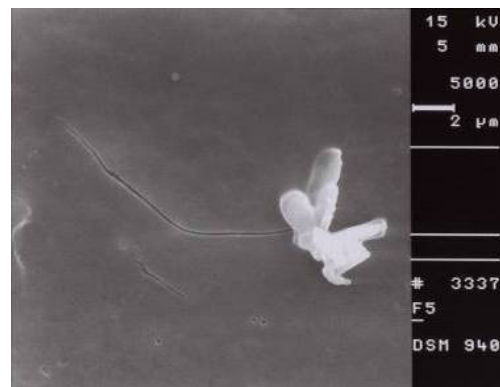


Abb. 38: REM (5000-fach).

Papain, Kollagenase Typ 2 % für 96 h, im Anschluss Trypsin 3 % für 96 h und Thimerosal 0.05 % für 24 h.

Die Beurteilbarkeit war bei besserer Verdauung fortgeschritten, aber aufgrund eines Bio-Films auf dem Filter noch unzureichend. Der Bio-Layer ist in Abb. 38 an einem Riss zu erkennen.

Um diesen feinen Resten zu begegnen, wurden die Proben vor dem Filtern zwei weitere Male gewaschen.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

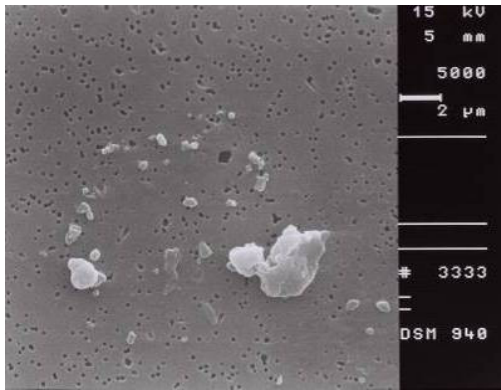


Abb. 39: REM (5.000-fach).

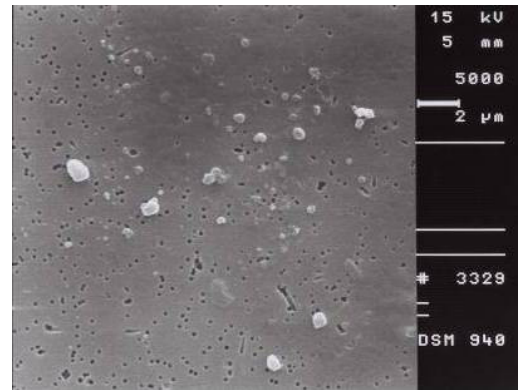


Abb. 40: REM (5.000-fach).

Papain, Kollagenase Typ 2 % für 96 h, im Anschluss Trypsin 3 % für 96 h, Thimerosal 0.05 % für 24 h und Zweimaliges Waschen.

Ein Bio-Film war noch zu erkennen, so dass die Proben noch zwei weitere Male gewaschen wurden.

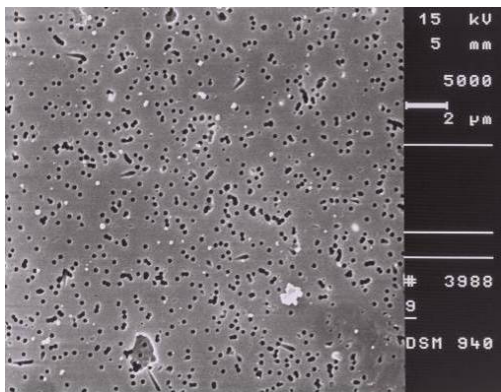


Abb. 41: REM (5.000-fach).

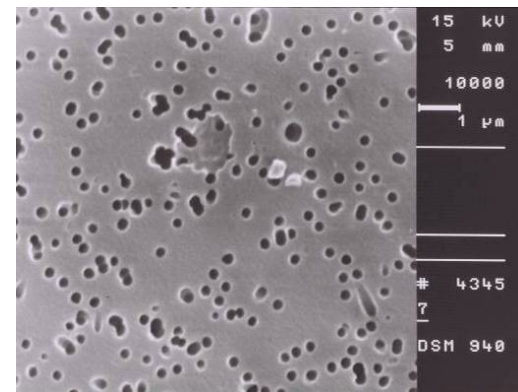


Abb. 42: REM (10.000-fach).

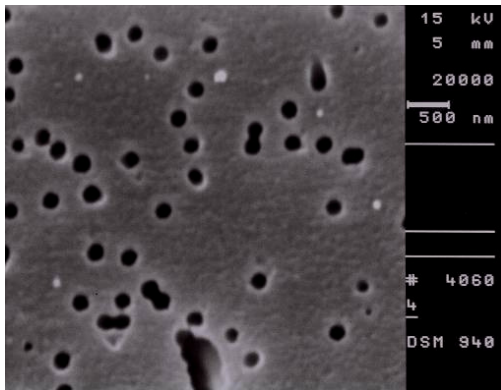


Abb. 43: REM (20.000-fach).

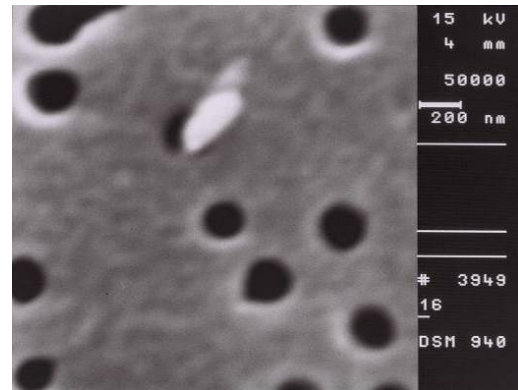


Abb. 44: REM (50.000-fach).

Die nun erreichte Verdauung, beziehungsweise Reinigung der Proben ermöglichte eine Beurteilung selbst kleinster Partikel.

Die Filterporen von 0,2 μm sind deutlich zu erkennen. Ein Bio-Film war nicht mehr ersichtlich. Gewebereste zeigten sich selbst in hohen Vergrößerungen nicht mehr.

3.5. Isolierung der Abriebpartikel

Um metallische Partikel zu isolieren, wurde eine neue Methode etabliert. Die Protokolle nach Dean und Maloney (Dean et al. 1999; Maloney et al. 1995) waren bei den hier zur Verfügung stehenden Patientenproben nicht geeignet.

Die Partikel aus den entnommenen und bekannten 21 Gewebeproben werden wie beschrieben mittels einer neuen Methode durch eine enzymatische Verdauung mit Papain, Kollagenase Typ I und Trypsin isoliert.

Die frisch entnommenen Gewebeproben wurden direkt nach Entnahme bei -80°C tief gefroren. Nach dem Auftauen wurden die Proben gewogen, um jeweils ca. 0,5 Gramm je protokollierter Probe zu gewinnen. Daraufhin wurden die Gewebeproben mit destilliertem Wasser gewaschen.

Die Proben wurden in mehrere ca. 2 mm^3 große Stücke zerkleinert.

Zur Herstellung einer gewebeverdauenden Lösung wurden 3 mg Papain in 10 ml eines 0,05 M Phosphat-Puffers (pH-Wert von 6,5) gelöst. 2,5 ml dieser Lösung pro 0,5 g Gewebe wurden jeweils zu den Gewebestücken gegeben, um diese drei Tage bei einer Temperatur von 65°C zu verdauen. Täglich wurde in dieser Zeit, nach Kontrolle der

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Material und Methoden

Gewebeart beziehungsweise -konsistenz äquivalent Papain zugeführt.

Im Anschluss an die Papainbehandlung wurde der Überstand nach 24 h langer Inkubation bei 4 °C abpipettiert. Der Überstand wird bis zu einem Abstand von 0,5 cm zum Bodensatz mit einer elektrischen Pipette abgesaugt.

Die Proben wurden mit Aqua ad iniectabilia (aqua) (10 ml je 0,5 g Gewebeprobe) gewaschen. Es wird jeweils nach 24 h bei 4 °C erneut der Überstand abpipettiert. Der Vorgang wurde 4 Mal durchgeführt.

Nach dem Waschen wurden den Proben für 24 h bei 4 °C eine antiseptische Thimerosal-Lösung (0,05 % Thimerosal in aqua; 5 ml auf 0,5 g Gewebe) zugegeben.

Zur weiteren Verdauung des Gewebes wurde eine 2 % Kollagenase Typ I Lösung (in PBS ohne Mg und Ca gelöst; 5 ml auf 0,5 g Gewebe), sowie eine 3 % Trypsin Lösung (in PBS ohne Mg und Ca gelöst; 5 ml auf 0,5 g Gewebe) benutzt.

Beide Enzymlösungen wurden nacheinander, zu erst Kollagenase Typ I, dann Trypsin für je 4 Tage bei 37 °C angewandt. 3 der 4 Tage rotierte das Wärmebad ständig mit einer Frequenz von 90 U/ min. Nach 24, 48 und 72 h wurde die gleiche Menge (5 ml auf 0,5 g Gewebe) und Konzentration der Enzymlösung den Proben hinzugefügt. Nach den ersten 3 Tagen wurden die Proben 24 h nicht bewegt, um im Anschluss den Überstand zu entnehmen, um dann die Trypsin-PBS-Lösung hinzuzugeben. Nach 4 Tagen wurde wie beschrieben die Trypsin-Lösung abpipettiert.

Nach Abschluss der enzymatischen Verdauung wurden die Gewebeproben ein weiteres Mal mit einer Thimerosal-Lösung für 24 h behandelt und wieder 4 Mal mit aqua gewaschen.

Die Proben, die 0,5 g Gewebe entsprechen, wurden zur Isolierung der Partikel über einen Polyesterfilter mit einem Porendurchmesser von 0,2 µm gesiebt und luftdicht in Petrischalen mit einem Durchmesser von 5 cm verpackt.

3.6. Protokoll

Es wurde folgendes Protokoll etabliert:

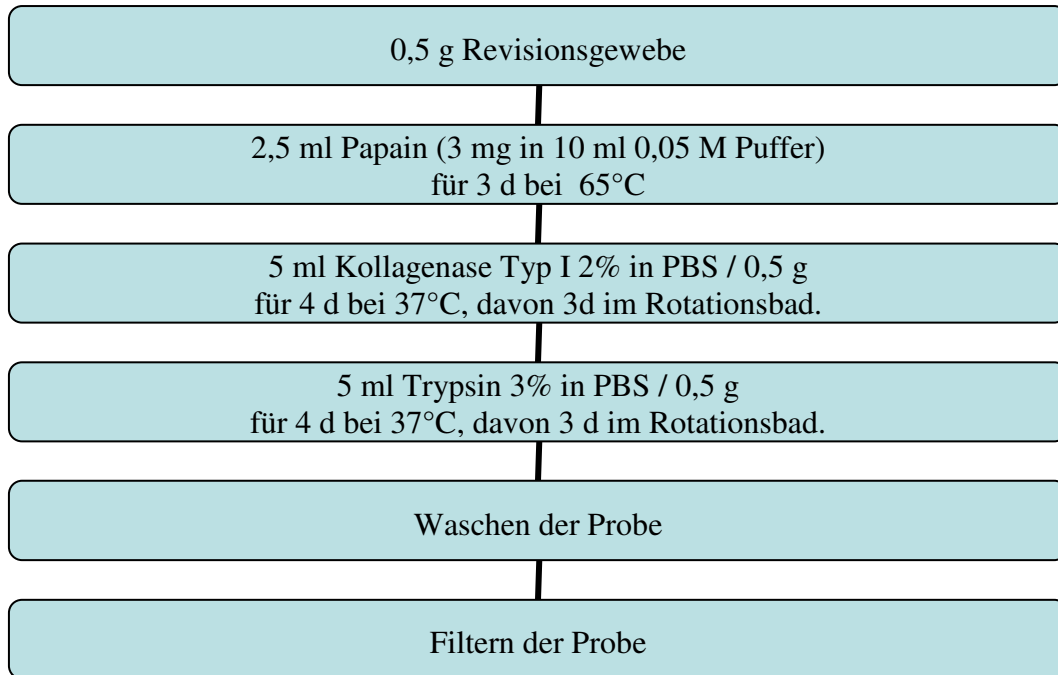


Abb. 45: Flussdiagramm Protokoll.

3.7. Charakterisierung der Metallpartikel

Zur Beurteilung der gefilterten Bestandteile wurden diese mit Hilfe eines Rasterelektronen-Mikroskops (DSM 940, Fa. Carl Zeiss AG, Jena, Deutschland) analysiert.

Zu dieser Untersuchung wurde der Filter mit Silberklebstoff auf einem Stiftprobenteller fixiert. Die Oberfläche des Filters wurde ca. 3,5 nm dick mit Gold beschichtet.

Zur rasterelektronenmikroskopischen Untersuchung wurden eine Spannung von 15 kV und ein Arbeitsabstand von 5 mm an oben genanntem Gerät gewählt.

Die Felder wurden 5.000-fach vergrößert und mit der im Rasterelektronenmikroskop der Firma Zeiss integrierten Kamera auf einem Schwarz-Weiß-Film bei 200 ASA abgelichtet. Kleinste Partikel werden zur Charakterisierung entsprechend ihrer Größe in 50.000-facher Vergrößerung aufgenommen. Größere Partikel in einer entsprechend kleineren Vergrößerung.

Anschließend findet die Einteilung von genormten Feldern eines Filters statt. Dazu werden ca. 30 Felder nebeneinander, dem Radius des gesamten Filters entsprechend, gewählt.

Die Bilder wurden mit Hilfe der Software Image Tool (The University of Texas Health Science Center 2009) analysiert.

Zur histomorphometrischen Untersuchung wurden die Flächen der Fotos und der Partikel ermittelt. Dafür mussten die Partikel einzeln vermessen werden.

Der in den Bildern integrierte Maßstab zeigte zu große Abweichungen, so dass die genormten Poren der verwendeten Polyesterfilter von 0,2 µm zur Eichung des Maßstabes hundert Mal vermessen wurden und als Maßstab von 0,2 µm zur Umrechnung der Skalierung des Maßstabs Verwendung fand.

Die Flächen der Fotos wurden mit der gleichen Skalierung errechnet. Die Flächen der Bilder einzelner Patientenproben wurden addiert.

Die während des Siebvorgangs genutzte Gesamtfläche eines Filters, entspricht der

verdauten Patientenprobe von 0,5 g. Die Summe der Fläche der Fotos einer Probe, dividiert durch die genutzte Fläche eines Filters ergibt den prozentualen Anteil der beurteilten Filterfläche. Mit diesem Quotienten kann die Anzahl der vermessenen Partikel in Relation zu 1 g Gewebe errechnet werden.

Die Partikelflächen wurden in den jeweiligen äquivalenten Kreisdurchmesser (equivalent circle diameter, ECD) umgerechnet. Hierbei wird die Partikelfläche zu einer Kreisform normalisiert und darüber der Durchmesser des Partikels ermittelt.

Die ECD werden nach Größenintervallen eingeteilt.

Die Partikelverteilung wurde mit der bereits histologisch untersuchten Gewebereaktion der jeweiligen Probe (Lohmann et al. 2007) verglichen, um eine Korrelation zu ermitteln.

Dem Untersucher waren die histologischen Ergebnisse erst nach Abschluss der Partikelanalyse zugänglich.

3.8. Spektralanalyse

Zum Nachweis, dass es sich bei den beobachteten Partikeln um Kobalt- Chrom- Nickel bzw. Molybdän-Partikel handelt, wurde exemplarisch eine Röntgenspektroskopie durchgeführt (Energiedispersive Röntgenspektroskopie, EDX). Diese Analyse, die aufgrund des Aluminium-Probentellers und der Goldbeschichtung erschwert war, erbrachte den Nachweis von Chrom und Molybdän.

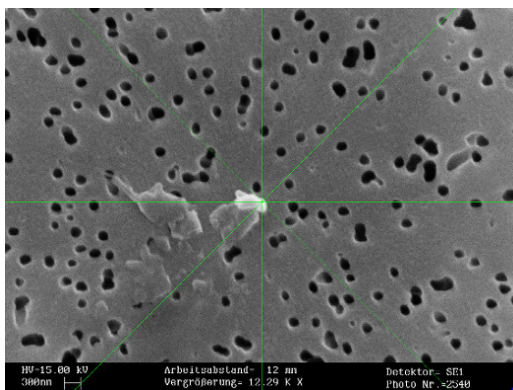


Abb. 46: REM (EDX) Ziel-Partikel.

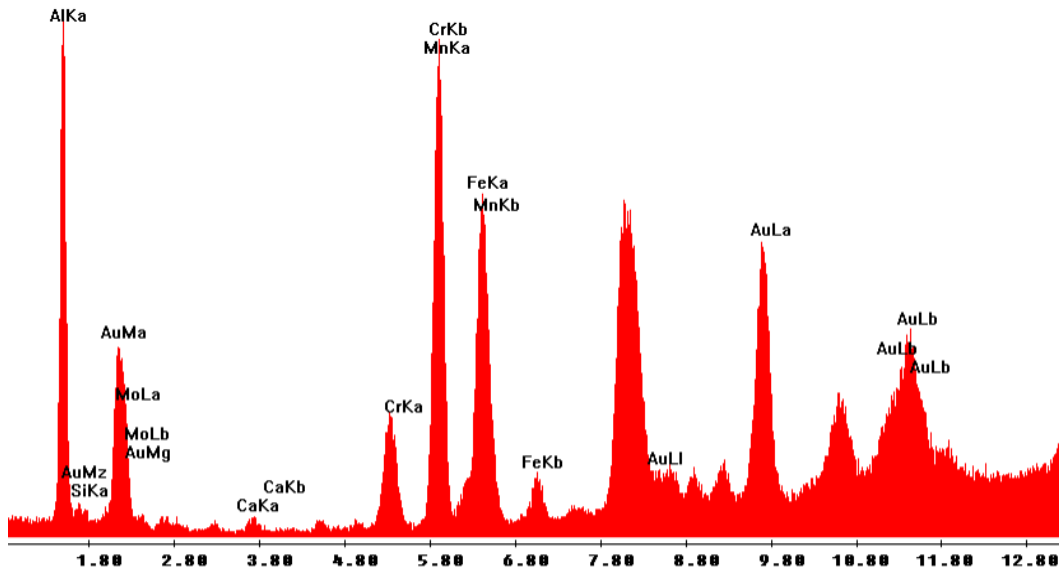


Abb. 47: EDX-Spektrum.

Abb. 47 zeigt das EDX-Spektrum des in Abb.46 untersuchten Partikels, mit Nachweis der Elemente Chrom (Cr), Molybdän (Mo), der Prothesenlegierung, daneben unter anderem die Bestandteile Gold (Au) der Beschichtung der Probe, Aluminium (Al) des Stiftprobentellers und u.a. natürlicherweise vorkommendes Calcium (Ca).

3.9. Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit den Programmen Microsoft Excel 2003 und SPSS 15.0 für Windows. Zur Beschreibung der vorliegenden Daten wurde jeweils der arithmetische Mittelwert (MW) als Kennzahl der Lage sowie die Standardabweichung (SD) als Maß der Streuung angegeben.

Mit Hilfe des Statistikprogramms SPSS 15.0 wurde eine Varianzanalyse (ANOVA) zur Unterscheidung von wesentlichen und unwesentlichen Einflussgrößen auf Versuchsergebnisse durchgeführt. Varianzanalysen setzen neben dem Vorliegen einer Normalverteilung auch eine Gleichheit der Varianzen voraus. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Prüfung auf Varianzhomogenität mittels Levene-Test. Bei

Erfüllung der Voraussetzungen können die Mittelwerte der Stichprobengruppen miteinander verglichen werden. Zunächst wird die Summe der Abweichungsquadrate (SAQ) innerhalb der Gruppen als auch zwischen den Gruppen berechnet und diese jeweils durch den dazugehörigen Freiheitsgrad (FG) dividiert. Falls die beiden Gruppen der gleichen Grundgesamtheit entstammen, müssen die so berechneten Mittleren Quadrate (MQ) ungefähr den gleichen Wert annehmen (Nullhypothese $\mu_1=\mu_2=\dots\mu_k$, kann nicht abgelehnt werden). Ist der Quotient aus $MQ_{zwischen}$ und $MQ_{innerhalb}$ größer als der kritische Wert der F-Verteilung (abhängig von FG und α) muss die Nullhypothese (H_0) abgelehnt werden, da sich mindestens zwei Erwartungswerte unterscheiden. Das Signifikanzniveau wurde auf $\alpha \leq 0,05$ festgelegt. Bei Varianzinhomogenität fand der Welch-Test beziehungsweise der Brown-Forsythe-Test Anwendung.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Ergebnisse

4. Ergebnisse

Die etablierte neuartige Methode isoliert Partikel aus Revisionsgeweben. Die dargestellten Abriebe auf den Filtern stellen sich als einzelne Partikel ohne Geweberesiduen dar.

Die Partikel sind im Durchschnitt unter 1 μm und vorwiegend eckig oder als längliche, stäbchenförmige Partikel abzubilden. Es sind kleine Partikel unter 100 nm zu beobachten. Wenige Partikel sind im Bereich von 10 μm .

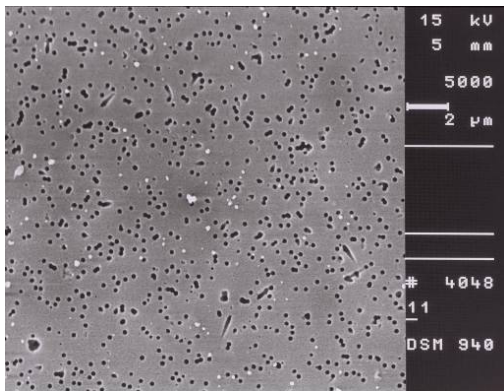


Abb. 48: REM (5.000-fach).

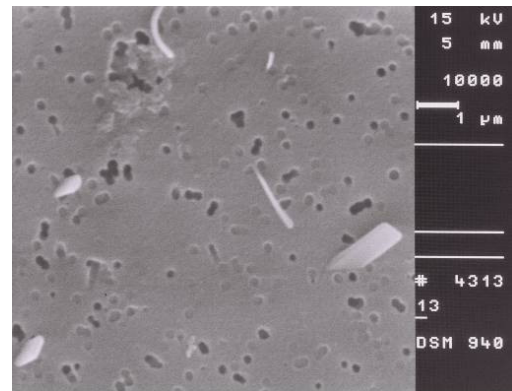


Abb. 49: REM (10.000-fach).

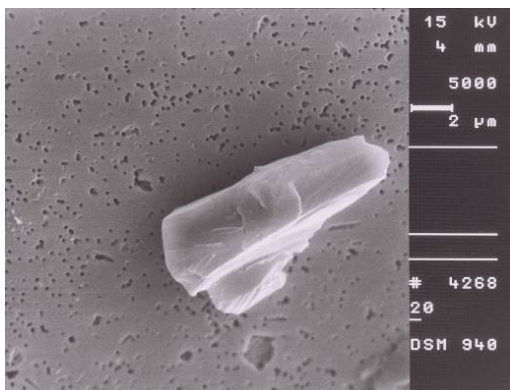


Abb. 50: REM (5.000-fach).

Ergebnisse

4.1. Anzahl der Partikel pro Gramm periprothetischen Gewebes bei lymphozytären Infiltraten

In der Anzahl der Abriebpartikel auf ein 1 g Gewebe zeigt sich tendenziell eine größere Menge der Partikel in den Patientenproben, die histologisch lymphozytäre Infiltrate zeigen ($p=0,254$, ANOVA). Bei einer mittleren Standzeit von 73 Monaten sind das durchschnittlich 124 Millionen Partikel pro 1 g Gewebe bei Patienten mit einer Allergie und 82 Millionen bei Patienten ohne lymphozytäre Infiltrate in der histologischen Untersuchung (Lohmann et al. 2007).

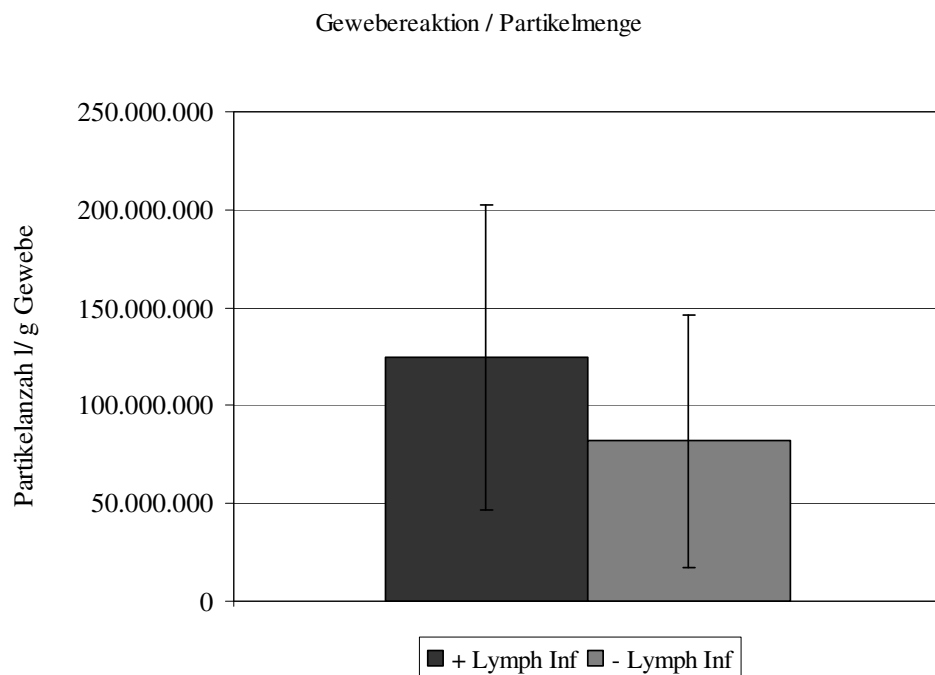


Abb. 51: Diagramm Gewebereaktion / Partikelmenge.

Ergebnisse

4.2. Größe der Partikel in Abhängigkeit der Gewebereaktion

Die Größenverteilung der einzelnen Partikel nach ihrem äquivalenten Kreisdurchmesser (ECD) und damit der Partikelgröße pro 1 g entnommenen Neokapselgewebe ist eine tendenziell größere Anzahl von Partikeln mit einem Durchmesser zwischen 50 nm und 200 nm bei Patienten mit lymphozytären Infiltraten, also mit einer Hypersensitivität, nachzuweisen ($p=0,336$, ANOVA). Die Verteilungsunterschiede abhängig vom ECD von 300 nm bis 500 nm sind tendenziell nur noch gering zu Gunsten der Allergiker. Ab einer Größe von 750 nm bis 1.500 nm sind tendenziell mehr Partikel bei Patienten ohne lymphozytäre Infiltrate auszumachen (Abb. 52). Alle Patienten weisen signifikant mehr Partikel mit einem kleineren Durchmesser als 500 nm auf ($p < 0,001$, ANOVA).

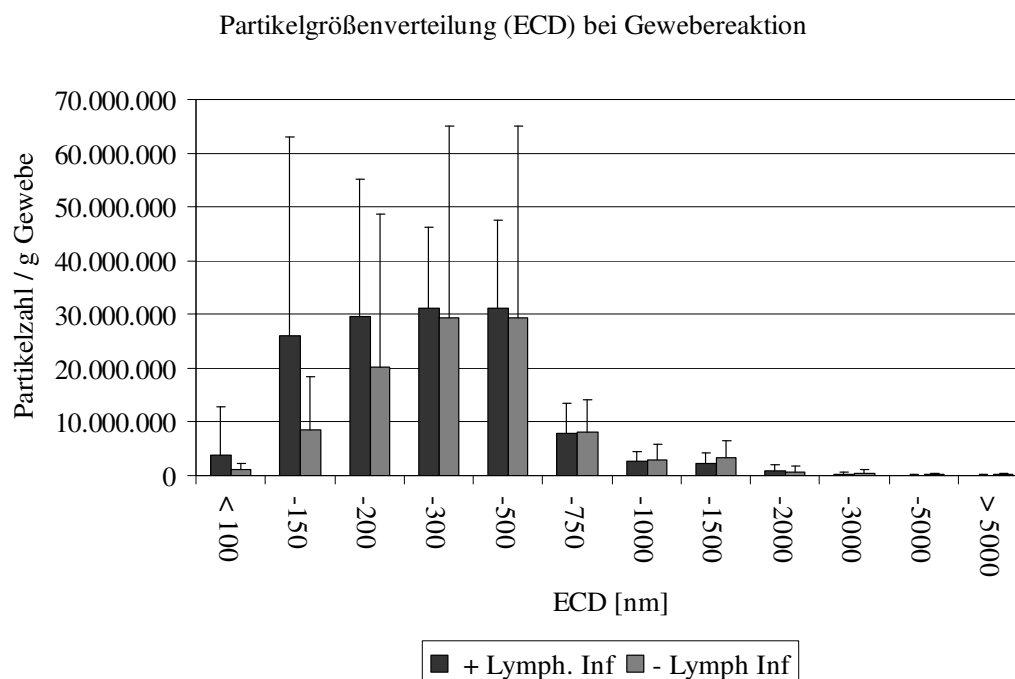


Abb. 52: Diagramm Partikelgrößenverteilung (ECD) bei Gewebereaktion.

4.3. Anzahl der Partikel pro Gramm periprothetischen Gewebes bei Osteolysen

In der Anzahl der Abriebpartikel auf 1 g Gewebe zeigt sich im Mittel eine tendenziell größere Menge der Partikel in den Patientenproben, die radiologische Zeichen einer Osteolyse um die Prothese (Lohmann et al. 2007) zeigen ($p=0,878$, ANOVA).

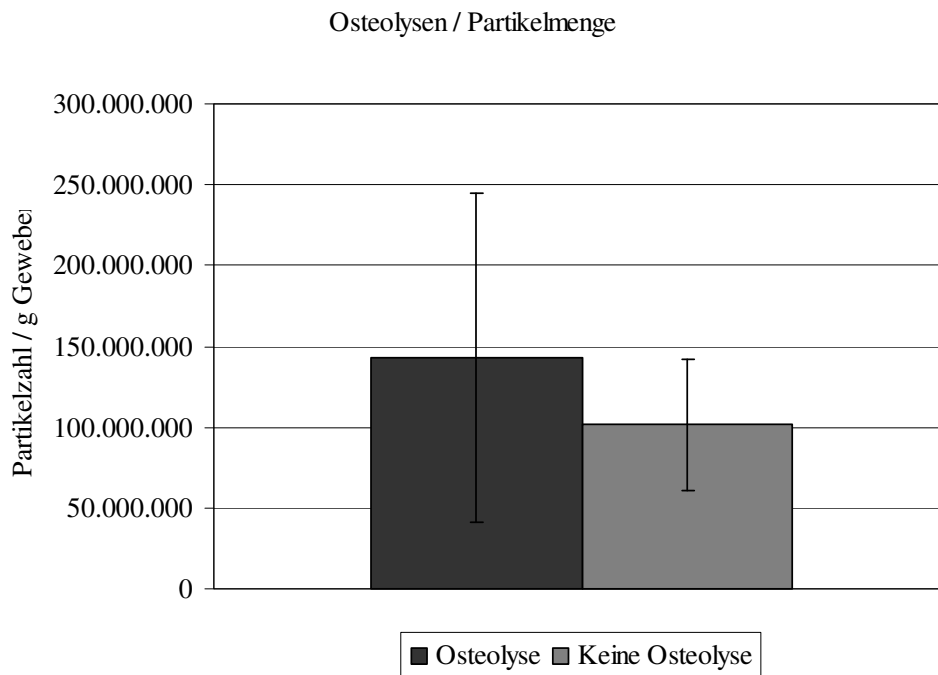


Abb. 53: Diagramm Osteolysen / Partikelmenge.

4.4. Größe der Partikel in Abhängigkeit von Osteolysen

Bezogen auf den äquivalenten Kreisdurchmesser (ECD) und damit der Partikelgröße pro 1 g entnommenen Neokapselgewebe zu den beobachteten Osteolysen um die Prothese (Willert et al. 2005) ist ebenfalls eine Tendenz an größerer Anzahl kleinerer Partikel im Bereich kleiner 500 nm zu erkennen ($p=0,523$, ANOVA). Bei Partikel Durchmessern größer 500 nm zeigen die Patienten ohne Osteolysen tendenziell mehr Partikel ($p=0,086$, ANOVA).

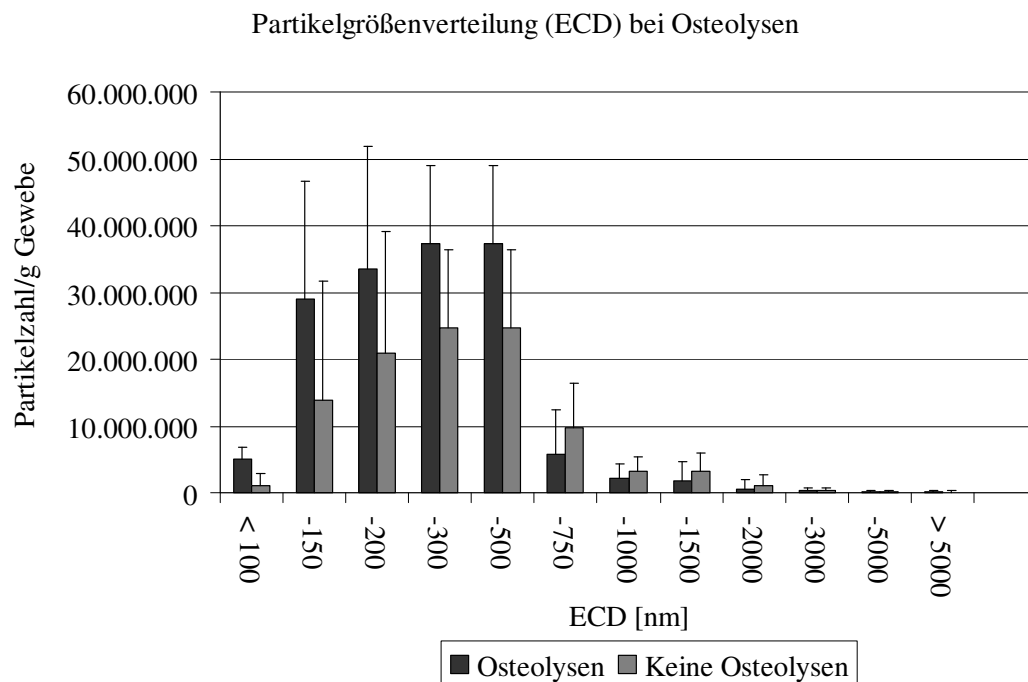


Abb. 54: Diagramm Partikelgrößenverteilung (ECD) bei Osteolysen.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprotetische Gewebeantwort

Ergebnisse

4.5. Größe der Partikel in Abhängigkeit von Luxationen

Bei einem Patienten traten 2 Luxationen der Endoprothese auf. Eine signifikant andere Partikelverteilung zu den oben genannten Verteilungen zeigte sich nicht.

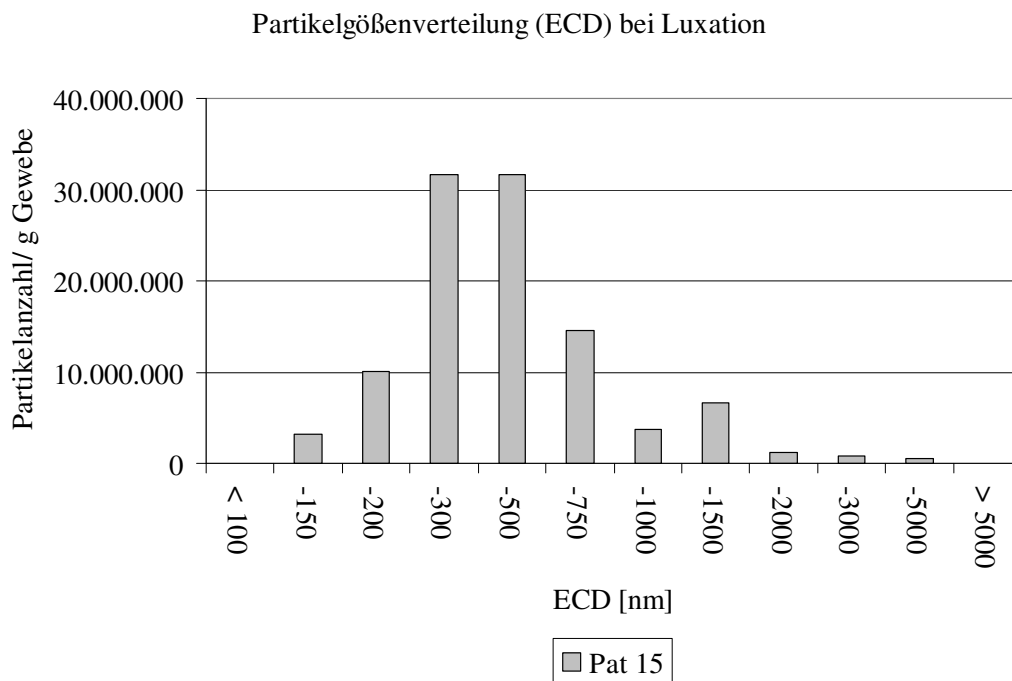


Abb. 55: Diagramm Partikelgrößenverteilung (ECD) bei Luxation.

5. Diskussion

Dieses neu etablierte Protokoll zur Isolierung von metallischen Partikeln aus periprothetischem Gewebe stellt eine ausschließlich enzymatische Verdauung dar. Im Gegensatz zu Säure- und Laugen-Vermittelten Gewebeauflösungen ist die durchgeführte Verdauung ein Verfahren, das keine Modulation der Partikel verursacht. Catelas et al. beschrieben 2001 eine signifikante Größenreduktion von runden Partikeln nach einer alkalischen Isolation mittels 2 molarer Natronlauge (Catelas et al. 2001).

Zur Charakterisierung wurde ein Rasterelektronenmikroskop verwendet, da das in anderen Arbeiten benutzte Transmissionselektronenmikroskop die Analyse einzelner Partikel aufgrund einer Partikel-Akkumulation erschwert (Doorn et al. 1998). Die Clusterbildung galt es zu vermeiden, da einzelne Partikel im Verbund nur schwer bis gar nicht untereinander abzugrenzen sind und die Abbildung unter Vergrößerung der einzelnen Partikel nur in verschiedenen, aufwendigen Schichten möglich ist. Das verwendete Rasterelektronenmikroskop ermöglichte die Abbildung und die Charakterisierung kleinster, einzelner auf den Filtern befindlicher Partikel.

Damit erlaubt dieses Protokoll erstmals einzelne kleinste Metallabriebe abzubilden und zu charakterisieren, ohne diese in Größe und Form zu verändern.

Das in der vorliegenden Arbeit etablierte Verfahren ist reproduzierbar und auch zur Analyse simulatorerzeugter Partikel aus bovinem Serum geeignet. Es wurden Abriebe einer simulatorgetesteten Metall/ Metall-Knieendoprothese unter Verwendung des entwickelten Protokolls isoliert und charakterisiert (Daten nicht abgebildet).

Die Verdauung und Filtrierung dieser Proben ermöglicht eine genaue Beurteilung der Partikel, die im Mittel einen größeren ECD (equivalent circle diameter) als die, der untersuchten Hüftendoprothesen-Paarung aufzeigten.

Das Verdauungsprotokoll ermöglicht also ebenfalls die präklinische Untersuchung von Endoprothesen-Abriebpartikel und stellt damit eine praktikable Möglichkeit zur Testung der sich in der Entwicklung befindlichen Prothesen dar.

Eine genaue quantitative Analyse ermöglicht dieses Verfahren aufgrund der Filtrierung nicht. Es kann theoretisch zum Verlust von kleinsten Partikeln kommen, die einen kleineren Durchmesser als die Porengröße der Filter haben. Da Partikel mit wesentlich kleinerem Durchmesser als die verwendete Porengröße nachgewiesen wurden, ist eine Affinität der Metallpartikel zu dem verwendeten Polyester-Filter anzunehmen.

Die Größen der hier nachgewiesenen Partikel entsprechen den, in der Literatur beschriebenen Ausmaßen von Abriebpartikeln bei Metall-Metall-Endoprothesen (Doorn et al. 1998; Shahgaldi et al. 1995).

In Lymphozyten-dominierten Proben sind insgesamt tendenziell mehr Abriebpartikel nachzuweisen. Bei einem Durchmesser kleiner als 300 nm zeigte sich bei den Patienten mit einer Allergie ein deutlicher Trend zu kleineren Partikeln.

Möglicherweise entsteht durch die geringe Größe der Partikel eine lokale Antigenpräsentation, die dann zu der lokalen Lymphozytenaktivierung führt. Dieses Bild der Lymphozyteninfiltration entspricht einer Hypersensitivitätsreaktion Typ IV und kann durch die Initiierung einer Zytokinkaskade zur Aktivierung von Osteoklasten und damit zur Entstehung von Osteolysen um ein Implantat beitragen.

Die Antigenpräsentation findet in der Regel über Makrophagen statt, die Partikel kleiner 1 μm phagozytieren (Hallab & Jacobs 2009). Kobalt-Chrom-Partikel scheinen besonders potente Induktoren der Makrophagen vermittelten Osteolyse zu sein (Lee et al. 1997).

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprotetische Gewebeanwort

Diskussion

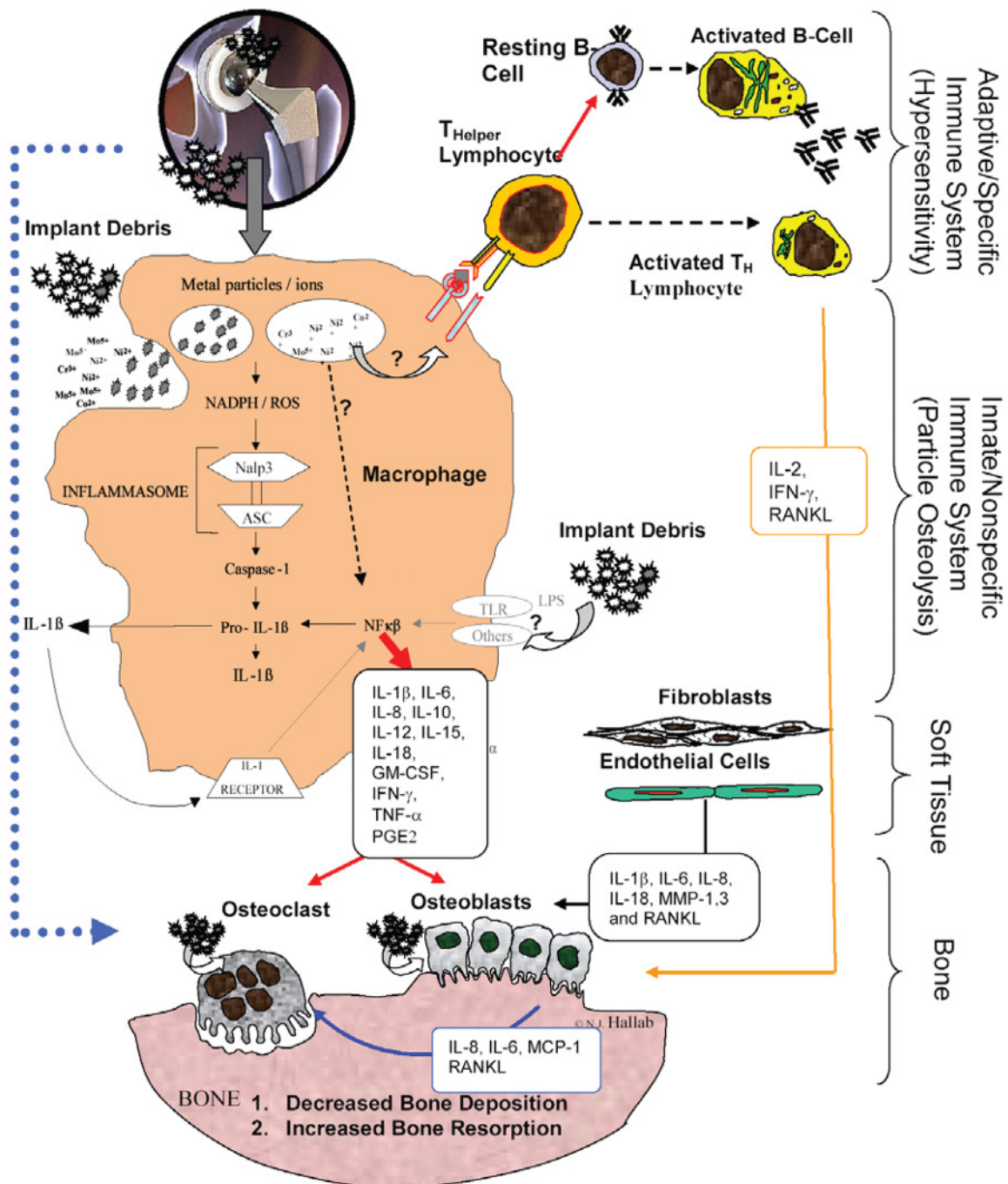


Abb. 56: Graphik Reaktion auf Abriebpartikel.

[Hallab, N. J. & Jacobs, J. J. Biologic effects of implant debris. *Bull. NYU. Hosp. Jt. Dis.* **67**, 182-188 (2009)]

Die Analyse der Partikel zeigte, dass sie aufgrund ihrer sehr geringen Größe biologisch aktiv sein können. Diese Aktivität kann auf die vergrößerte Oberfläche der kleinen gegenüber der größeren Partikel zurückzuführen sein, da dies eine erhöhte Antigenpräsentation bedeutet und damit eine gesteigerte Chemo-Taxis, unter anderem der Makrophagen zu erwarten ist.

Die ständige Veränderung der Partikel im periprothetischen Gewebe unter dem Einfluss der Korrosion beeinflusst deren Größe und Form und damit die zelluläre Antwort (Shahgaldi et al. 1995).

In partikelspeichernden Zellen verändern sich die Zellmembran und die Mitochondrien, was als zytotoxischer Effekt der Zelle gewertet wird (Allen et al. 1997; Lohmann et al. 2000). Zytokine und Leukotriene führen zur Leukozyten-Infiltration und zur lokalen Nekrose.

Die vergrößerte Oberfläche des Abriebs kann insbesondere bei Metallabrieb zu Osteolysen führen (Shanbhag et al. 1997), was mit unseren Ergebnissen, bezogen auf die Osteolysen zu bestätigen ist.

Der aseptische Verlust der Prothesen durch eine Hypersensitivitätsreaktion ist auf die größere Partikelmenge vor allem der kleinsten Partikel zurückzuführen. Der lineare, sowie der volumetrische Abrieb sind also nicht entscheidend für das allergische Versagen.

Die Erfahrungen des Einsatzes von Metall-Metall-Paarungen, gerade beim Oberflächenersatz an der Hüfte mit großen Kopfdurchmessern, werden zeigen, ob dieses Phänomen bei 28-er oder 32-er Köpfen eher auftreten kann, da man bei größeren Köpfen von einer größeren Oberfläche und damit von einem geringeren Abrieb ausgeht.

Die Auswirkungen der größeren Partikel ab 1.500 nm sind aktuell noch nicht überprüft und sollten in zukünftigen Studien näher betrachtet werden. Diese Partikel werden nicht in dem Ausmaß wie kleinere Partikel phagozytiert. Des Weiteren haben diese Partikel eine größere Oberfläche.

Es sind bei Metall/ Metall-Prothesen erhöhte Ionenkonzentrationen, unter anderem von Kobalt, Molybdän und Nickel beschrieben worden, die die Mittelwerte einer der Normalbevölkerung um das 50ig-fache überschreiten (Dobbs & Minski 1980).

Die Bedeutung der Ionenkonzentrationen und deren Langzeitfolgen sind weiterhin unklar, wobei sich eine Akkumulation in parenchymatösen Organen insbesondere in Leber, Niere und Milz gezeigt hat (Jakobsen et al. 2007;Urban et al. 2000).

Die Ausscheidung von Nickel und Kobalt erfolgt zügig über die Nieren. Chrom hingegen kann über Induktion von tubulären Nekrosen zu Nierenschäden führen (Keegan et al. 2007).

In einem Fallbericht wurden bei exzessiv erhöhten Kobalt-Konzentrationen Hör-, Sehstörungen und ein Symptomkomplex von Struma, Polyzythämie, Kardiomyopathie mit metallischer Azidose beschrieben. Hierbei traten die erhöhten Kobalt-Konzentrationen nach einer Revisionsoperation mit Metall-Keramik-Paarung auf (Steens et al. 2006).

Eine karzinogene Wirkung, insbesondere auf hämatopoetische Zellen durch Abriebpartikel oder der entstehenden Ionen ist nicht bestätigt (Visuri et al. 1996), bzw. noch nicht abzusehen (Gillespie et al. 1996;Tharani et al. 2001). Langzeitstudien werden zeigen, ob es einen Zusammenhang von Metallabriebpartikeln und malignen Erkrankungen gibt.

Das Ziel der herstellenden Industrie sollte neben der Entstehung von geringerem volumetrischen Abrieb vor allem das Vermeiden von kleinsten Abriebpartikeln sein.

Welche Oberflächen-Werkstoffe das ermöglichen, ob das die bekannten Materialien wie Keramik, das hochvernetztes Polyethylen oder das Oxygen Diffusion Hardening (ODH) von Titan-Legierungen diesen Vorteil bringen, bleibt abzuwarten.

Medikamentöse Therapien, um der Partikelerkrankung zu entgegnen, gibt es noch nicht. Auch hier sollte das Ziel sein, Medikamente zu entwickeln, die Partikel oder die entstehenden Ionen zu binden, um so deren Ausscheidung zu forcieren.

Die viel diskutierte Epikutant-Testung zum Ausschluss der lokalen Allergie zeigt bei Knieendoprothesen Erfolge. Bei Hüftprothesen ist diese Testung nicht unumstritten

(Laupheimer et al. 2002). In einem neu eingeführten Implantat-Allergie-Register zeigen lediglich knapp 30% von 239 in das Register aufgenommenen Patienten einen positiven Epikutan-Test (Eben et al. 2009). In einer weiteren Untersuchung zeigten 11 von 16 Patienten mit histologischem Verdacht einer Allergie einen positiven Patch-Test (Thomas et al. 2009).

5.1. Diagnostik bei Versagen einer Endoprothese

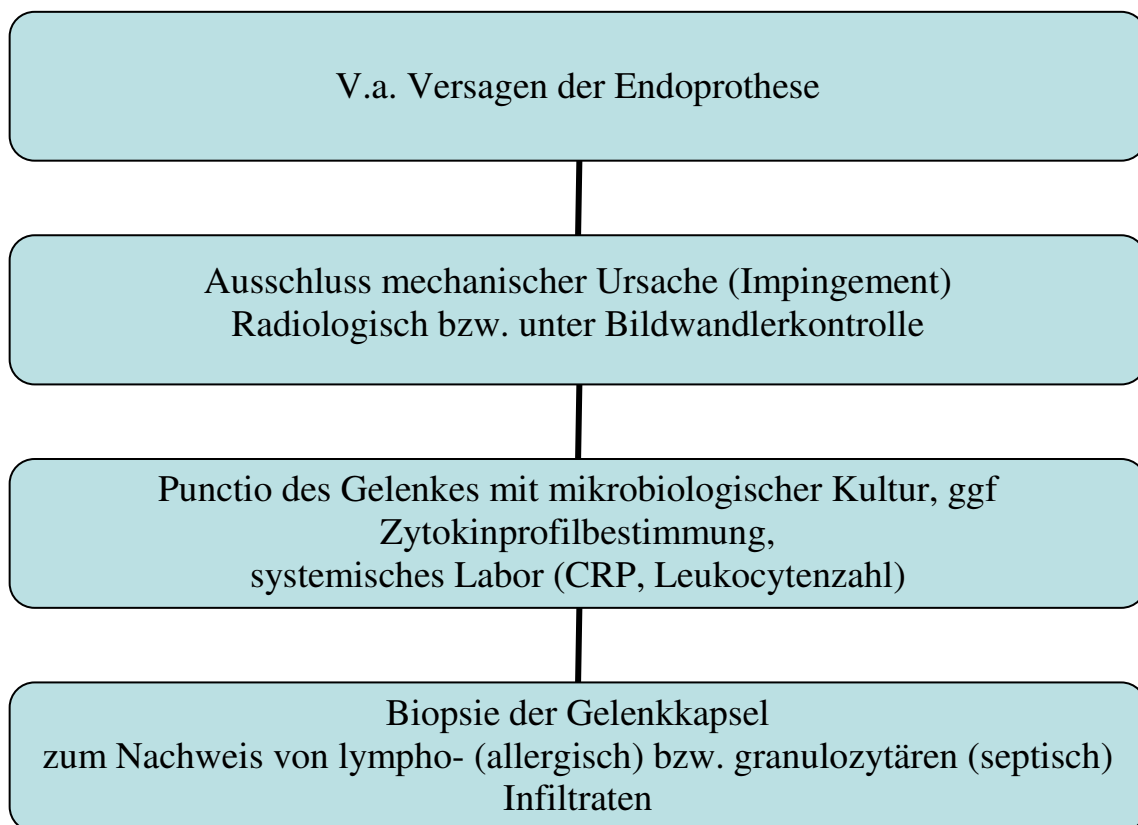


Abb. 57: Flussdiagramm Vorgehen bei Versagen.

6. Zusammenfassung

Metall/ Metall-Paarungen aus Kobalt-Chrom der sogenannten „zweiten Generation“ mit verbesserten tribologischen Eigenschaften wurden 1988 in der Hüftendoprothetik wieder eingeführt. Es sind allergische Reaktionen auf diese Gleitpaarung beschrieben. In dieser Studie wurden Partikel aus periprothetischen Revisionsgeweben analysiert, um die bereits zuvor untersuchte histologische, unter anderem allergische Gewebereaktion hiermit in Korrelation zu bringen.

Ziel der Untersuchung war es ein neuartiges Verfahren zu etablieren, welches die Größe, Form und Anzahl der Metallpartikel bei der Isolation aus den Geweben so wenig wie möglich beeinflusst.

Die Gewebe wurden wie bei (Dean et al. 1999;Maloney et al. 1995) beschrieben, mit Papain verdaut. Da diese Verdauung sich als unzureichend herausstellte, wurde die Verdauung mit zwei weiteren Enzymen, Trypsin und Kollagenase Typ I modifiziert. Diese angewandte neuartige und reproduzierbare Methode erlaubt es, einzelne Partikel ohne Geweberesiduen und ohne Modulation, wie bei mit säure- und laugenvermittelten Verdauungsprotokollen beschrieben, im Rasterelektronenmikroskop abzubilden.

Das Protokoll eignet sich ebenfalls zur Analyse von simulatorerzeugten Abriebpartikeln aus bovinem Serum (Daten nicht abgebildet).

Die Abriebpartikel sind im Durchschnitt unter 1 µm und vorwiegend eckig oder als längliche, stäbchenförmige Partikel abzubilden. Patienten mit einer Allergie auf die oben genannte Paarung zeigen tendenziell kleinere Partikel im Nanometer-Bereich.

Möglicherweise entsteht durch die geringe Größe der Partikel eine lokale Antigenpräsentation, die zu der lokalen Lymphozytenaktivierung, damit zu Osteolysen um die Prothese und folglich zum Verlust der Prothese führen kann.

7. Abkürzungsverzeichnis

AG:	Aktiengesellschaft
Al:	Aluminium
A:	Irrtumswahrscheinlichkeit, Signifikanzniveau
ANOVA:	analysis of variance, Varianzanalyse
ASA:	American Standards Association (Filmempfindlichkeit)
Aqua:	Aqua ad iniectabilia
Ca:	Kalzium
Cr:	Chrom
DTH:	delayed type hypersensitivity
ECD:	equivalent circle diameter
EDX:	energy dispersive X-ray spectroscopy
Fa:	Firma
FG:	Freiheitsgrad
H ₀ :	Nullhypothese
IFN:	Interferon
IL:	Interleukin
M:	Molar
Mg:	Magnesium
Mo:	Molybdän
MQ:	Mittlere Quadrate
MW:	Mittelwert
μ:	Mittelwert der Grundgesamtheit, Erwartungswert
Ni:	Nickel
N KOH:	Natronlauge
ODH:	Oxygen Diffusion Hardening
OECD:	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
PBS:	phosphate buffer solution
PE:	Polyethylen
PMMA:	Polymethylmethacrylat
RANKL:	receptor activator of NF-kappaB ligand

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Abkürzungsverzeichnis

REM:	Raster-Elektronen-Mikroskopie
SAQ:	Summe der Abweichungsquadrate
SD:	standard deviation, Standardabweichung

8. Literaturverzeichnis

Allen, M. J., Myer, B. J., Millett, P. J., & Rushton, N. 1997, "The effects of particulate cobalt, chromium and cobalt-chromium alloy on human osteoblast-like cells in vitro", *J.Bone Joint Surg.Br.*, vol. 79, no. 3, pp. 475-482.

Bauer, T. W. & Schils, J. 1999, "The pathology of total joint arthroplasty.II. Mechanisms of implant failure", *Skeletal Radiol.*, vol. 28, no. 9, pp. 483-497.

Benson, M. K., Goodwin, P. G., & Brostoff, J. 1975, "Metal sensitivity in patients with joint replacement arthroplasties", *Br.Med.J.*, vol. 4, no. 5993, pp. 374-375.

Braunsdorf, M. & Konradt, J. 1977, "[History and technical development of hip joint replacement operations (author's transl]", *Zentralbl.Chir*, vol. 102, no. 7, pp. 385-393.

Catelas, I., Bobyn, J. D., Medley, J. B., Krygier, J. J., Zukor, D. J., Petit, A., & Huk, O. L. 2001, "Effects of digestion protocols on the isolation and characterization of metal-metal wear particles. I. Analysis of particle size and shape", *J.Biomed.Mater.Res.*, vol. 55, no. 3, pp. 320-329.

Coventry, M. B. 1979, "Total joint arthroplasty. Historical development", *Mayo Clin.Proc.*, vol. 54, no. 8, pp. 493-494.

Dean, D. D., Schwartz, Z., Liu, Y., Blanchard, C. R., Agrawal, C. M., Mabrey, J. D., Sylvia, V. L., Lohmann, C. H., & Boyan, B. D. 1999, "The effect of ultra-high molecular weight polyethylene wear debris on MG63 osteosarcoma cells in vitro", *J.Bone Joint Surg.Am.*, vol. 81, no. 4, pp. 452-461.

Dobbs, H. S. & Minski, M. J. 1980, "Metal ion release after total hip replacement", *Biomaterials*, vol. 1, no. 4, pp. 193-198.

Doorn, P. F., Campbell, P. A., & Amstutz, H. C. 1996, "Metal versus polyethylene wear particles in total hip replacements. A review", *Clin.Orthop.Relat Res.* no. 329 Suppl, p. S206-S216.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Literaturverzeichnis

Doorn, P. F., Campbell, P. A., Worrall, J., Benya, P. D., McKellop, H. A., & Amstutz, H. C. 1998, "Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles", *J.Biomed.Mater.Res.*, vol. 42, no. 1, pp. 103-111.

Dumbleton, J. H. & Manley, M. T. 2005, "Metal-on-Metal total hip replacement: what does the literature say?", *J.Arthroplasty*, vol. 20, no. 2, pp. 174-188.

Eben, R., Walk, R., Summer, B., Maier, S., Thomsen, M., & Thomas, P. 2009, "Implant allergy register--a first report", *Orthopade*, vol. 38, no. 6, pp. 557-562.

Elves, M. W., Wilson, J. N., Scales, J. T., & Kemp, H. B. 1975, "Incidence of metal sensitivity in patients with total joint replacements", *Br.Med.J.*, vol. 4, no. 5993, pp. 376-378.

Evans, E. M., Freeman, M. A., Miller, A. J., & Vernon-Roberts, B. 1974, "Metal sensitivity as a cause of bone necrosis and loosening of the prosthesis in total joint replacement", *J.Bone Joint Surg.Br.*, vol. 56-B, no. 4, pp. 626-642.

Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Die 50 häufigsten Operationen der vollstationären Patientinnen und Patienten in Krankenhäusern (Rang, Anzahl, Anteil). Gliederungsmerkmale: Jahre, Art der Operation, Geschlecht . http://www.gbe-bund.de/oowa921install/servlet/oowa/aw92/dboowasys921.xwdevkit/xwd_init?gbe.isgbetol/xs_start_neu/i1457091/8992444. 2009.

Ref Type: Internet Communication

Gillespie, W. J., Henry, D. A., O'Connell, D. L., Kendrick, S., Juszczak, E., McInnery, K., & Derby, L. 1996, "Development of hematopoietic cancers after implantation of total joint replacement", *Clin.Orthop.Relat Res.* no. 329 Suppl, p. S290-S296.

Hallab, N. J. & Jacobs, J. J. 2009, "Biologic effects of implant debris", *Bull.NYU.Hosp.Jt.Dis.*, vol. 67, no. 2, pp. 182-188.

Hallab, N. J., Vermes, C., Messina, C., Roebuck, K. A., Glant, T. T., & Jacobs, J. J. 2002, "Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts", *J.Biomed.Mater.Res.*, vol. 60, no. 3, pp. 420-433.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Literaturverzeichnis

Jacobs, J. J. & Hallab, N. J. 2006, "Loosening and osteolysis associated with metal-on-metal bearings: A local effect of metal hypersensitivity?", *J.Bone Joint Surg.Am.*, vol. 88, no. 6, pp. 1171-1172.

Jakobsen, S. S., Danscher, G., Stoltenberg, M., Larsen, A., Bruun, J. M., Mygind, T., Kemp, K., & Soballe, K. 2007, "Cobalt-chromium-molybdenum alloy causes metal accumulation and metallothionein up-regulation in rat liver and kidney", *Basic Clin.Pharmacol.Toxicol.*, vol. 101, no. 6, pp. 441-446.

Keegan, G. M., Learmonth, I. D., & Case, C. P. 2007, "Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient: A review of current knowledge and future strategies", *J.Bone Joint Surg.Br.*, vol. 89, no. 5, pp. 567-573.

Laupheimer, M., Thomas, M., Arnhold, H., & Naumann, T. 2002, "Vergleich von epikutaner Patch Testung mit der synovialen T-Zell Infiltration bei Patienten mit endoprothetischem Gelenkersatz", *Z Orthop 2002*, vol. F063.

Lee, S. H., Brennan, F. R., Jacobs, J. J., Urban, R. M., Ragasa, D. R., & Glant, T. T. 1997, "Human monocyte/macrophage response to cobalt-chromium corrosion products and titanium particles in patients with total joint replacements", *J.Orthop.Res.*, vol. 15, no. 1, pp. 40-49.

Lohmann, C. H., Nuechtern, J. V., Willert, H. G., Junk-Jantsch, S., Ruether, W., & Pflueger, G. 2007, "Hypersensitivity reactions in total hip arthroplasty", *Orthopedics*, vol. 30, no. 9, pp. 760-761.

Lohmann, C. H., Schwartz, Z., Koster, G., Jahn, U., Buchhorn, G. H., MacDougall, M. J., Casasola, D., Liu, Y., Sylvia, V. L., Dean, D. D., & Boyan, B. D. 2000, "Phagocytosis of wear debris by osteoblasts affects differentiation and local factor production in a manner dependent on particle composition", *Biomaterials*, vol. 21, no. 6, pp. 551-561.

Maloney, W. J., Smith, R. L., Schmalzried, T. P., Chiba, J., Huene, D., & Rubash, H. 1995, "Isolation and characterization of wear particles generated in patients who have had failure of a hip arthroplasty without cement", *J.Bone Joint Surg.Am.*, vol. 77, no. 9, pp. 1301-1310.

Martin, S. H. 1885, "Papain-Digestion", *J.Physiol*, vol. 5, no. 4-6, pp. 213-230.

McKellop HA. Wear modes, mechanisms, damage, and debris: separating cause from effect in the wear of total hip replacement. In: Galante JO, Rosenberg AG, Callaghan JJ (eds) Total hip revision surgery. Raven, New York, pp 21-39. 1995.

Ref Type: Generic

Merx, H., Dreinhofer, K., Schrader, P., Sturmer, T., Puhl, W., Gunther, K. P., & Brenner, H. 2003, "International variation in hip replacement rates", *Ann.Rheum.Dis.*, vol. 62, no. 3, pp. 222-226.

Murray, D. W. & Rushton, N. 1990, "Macrophages stimulate bone resorption when they phagocytose particles", *J.Bone Joint Surg.Br.*, vol. 72, no. 6, pp. 988-992.

Park, Y. S., Moon, Y. W., Lim, S. J., Yang, J. M., Ahn, G., & Choi, Y. L. 2005, "Early osteolysis following second-generation metal-on-metal hip replacement", *J.Bone Joint Surg.Am.*, vol. 87, no. 7, pp. 1515-1521.

Rauschmann, M. A., Scale, D., Thomann, K. D., & Zichner, L. 2000, "[The German Orthopedic History and Research Museum. A museum for research and public health]", *Orthopade*, vol. 29, no. 12, pp. 1000-1007.

Rubash, H. E., Sinha, R. K., Shanbhag, A. S., & Kim, S. Y. 1998, "Pathogenesis of bone loss after total hip arthroplasty", *Orthop.Clin.North Am.*, vol. 29, no. 2, pp. 173-186.

Shahgaldi, B. F., Heatley, F. W., Dewar, A., & Corrin, B. 1995, "In vivo corrosion of cobalt-chromium and titanium wear particles", *J.Bone Joint Surg.Br.*, vol. 77, no. 6, pp. 962-966.

Shanbhag, A. S., Jacobs, J. J., Black, J., Galante, J. O., & Glant, T. T. 1997, "Effects of particles on fibroblast proliferation and bone resorption in vitro", *Clin.Orthop.Relat Res.* no. 342, pp. 205-217.

Sieber, H. P., Rieker, C. B., & Kottig, P. 1999, "Analysis of 118 second-generation metal-on-metal retrieved hip implants", *J.Bone Joint Surg.Br.*, vol. 81, no. 1, pp. 46-50.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Literaturverzeichnis

Steens, W., Loehr, J. F., von, F. G., & Katzer, A. 2006, "[Chronic cobalt poisoning in endoprosthetic replacement]", *Orthopade*, vol. 35, no. 8, pp. 860-864.

Tharani, R., Dorey, F. J., & Schmalzried, T. P. 2001, "The risk of cancer following total hip or knee arthroplasty", *J.Bone Joint Surg.Am.*, vol. 83-A, no. 5, pp. 774-780.

The University of Texas Health Science Center. Image Tool. 2009.

Ref Type: Computer Program

Thomas, P., Braathen, L. R., Dorig, M., Aubock, J., Nestle, F., Werfel, T., & Willert, H. G. 2009, "Increased metal allergy in patients with failed metal-on-metal hip arthroplasty and peri-implant T-lymphocytic inflammation", *Allergy*, vol. 64, no. 8, pp. 1157-1165.

Urban, R. M., Jacobs, J. J., Tomlinson, M. J., Gavrilovic, J., Black, J., & Peoc'h, M. 2000, "Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement", *J.Bone Joint Surg.Am.*, vol. 82, no. 4, pp. 457-476.

Visuri, T., Pukkala, E., Paavolainen, P., Pulkkinen, P., & Riska, E. B. 1996, "Cancer risk after metal on metal and polyethylene on metal total hip arthroplasty", *Clin.Orthop.Relat Res.* no. 329 Suppl, p. S280-S289.

Wang, M. L., Sharkey, P. F., & Tuan, R. S. 2004, "Particle bioreactivity and wear-mediated osteolysis", *J.Arthroplasty*, vol. 19, no. 8, pp. 1028-1038.

Weber, B. G. Der Weg zurück zur Metall-Metall-Paarung für die Hüfttotalprothese. In: *Morscher, E.*(Hrsg.): Endoprothetik. Springer, Berlin 1995. 1995.

Ref Type: Generic

Willert, H. G., Buchhorn, G. H., Fayyazi, A., Flury, R., Windler, M., Koster, G., & Lohmann, C. H. 2005, "Metal-on-metal bearings and hypersensitivity in patients with artificial hip joints. A clinical and histomorphological study", *J.Bone Joint Surg.Am.*, vol. 87, no. 1, pp. 28-36.

Willert, H. G. & Semlitsch, M. 1977, "Reactions of the articular capsule to wear products of artificial joint prostheses", *J.Biomed.Mater.Res.*, vol. 11, no. 2, pp. 157-164.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Literaturverzeichnis

Zipple, J. & Meyer-Ralfs, M. 1975, "[Themistocles Gluck (1853-1942), pioneer in endoprosthesis]", *Z.Orthop.Ihre Grenzgeb.*, vol. 113, no. 1, pp. 134-139.

**Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die
periprothetische Gewebeantwort**

Abbildungsverzeichnis

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Röntgenbilder: Progrediente Osteolyse eines Patienten (B.S.*1942) von 07.1996 bis 02.2003	13
Abb. 2: REM (200-fach).....	15
Abb. 3: REM (500-fach).....	15
Abb. 4: REM (1.000-fach).....	15
Abb. 5: REM gewaschener Filter (5.000-fach).	16
Abb. 6: REM erneut gefilterte Lösung (200-fach).	16
Abb. 7: REM (200-fach).....	17
Abb. 8: REM (2.000-fach).....	17
Abb. 9: REM (200-fach).....	18
Abb. 10: REM (200-fach).....	18
Abb. 11: REM (200-fach).....	18
Abb. 12: REM (2.000-fach).....	18
Abb. 13: REM nur mit Papain behandelt (1.000-fach).....	19
Abb. 14: REM mit Papain anschließend Trypsin nach 5 Tagen (500-fach).....	19
Abb. 15: REM 0,2 g mit Papain anschließend Trypsin nach 11 Tagen (2.000-fach). ...	20
Abb. 16: REM (5.000-fach).....	20
Abb. 17: REM (500-fach).....	20
Abb. 18: REM (200-fach).....	21
Abb. 19: REM (2.000-fach).....	21
Abb. 20: REM (200-fach).....	22
Abb. 21: REM (2.000-fach).....	22
Abb. 22: REM (200-fach).....	22
Abb. 23: REM (2.000-fach).....	22
Abb. 24: REM (100-fach).....	22
Abb. 25: REM (200-fach).....	22
Abb. 26: REM (20.000-fach).....	23
Abb. 27: REM Bakterienbefall einer Probe (20.000-fach).....	24
Abb. 28: REM (200-fach).....	24
Abb. 29: REM mit fraglichen Bakterien (20.000-fach).....	24
Abb. 30: REM (5.000-fach) Befall von Bakterien zu erkennen.....	24

**Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die
periprothetische Gewebeantwort**

Abbildungsverzeichnis

Abb. 31: REM (200-fach).....	25
Abb. 32: REM (2.000-fach).....	25
Abb. 33: REM (5.000-fach).....	25
Abb. 34: REM (1.000-fach).....	26
Abb. 35: Fotographie: Rotations/-Wärmebad.	26
Abb. 36: REM (200-fach).....	27
Abb. 37: REM (200-fach).....	27
Abb. 38: REM (5000-fach).....	27
Abb. 39: REM (5.000-fach).....	28
Abb. 40: REM (5.000-fach).....	28
Abb. 41: REM (5.000-fach).....	28
Abb. 42: REM (10.000-fach).....	28
Abb. 43: REM (20.000-fach).....	29
Abb. 44: REM (50.000-fach).....	29
Abb. 45: Flussdiagramm Protokoll.....	31
Abb. 46: REM (EDX) Ziel-Partikel.	33
Abb. 47: EDX-Spektrum.	34
Abb. 48: REM (5.000-fach).....	36
Abb. 49: REM (10.000-fach).....	36
Abb. 50: REM (5.000-fach).....	36
Abb. 51: Diagramm Gewebereaktion / Partikelmenge.....	37
Abb. 52: Diagramm Partikelgrößenverteilung (ECD) bei Gewebereaktion.....	38
Abb. 53: Diagramm Osteolysen / Partikelmenge.	39
Abb. 54: Diagramm Partikelgrößenverteilung (ECD) bei Osteolysen.....	40
Abb. 55: Diagramm Partikelgrößenverteilung (ECD) bei Luxation.	41
Abb. 56: Graphik Reaktion auf Abriebpartikel.	44
Abb. 57: Flussdiagramm Vorgehen bei Versagen.....	47

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Reagenzien

10. Verwendete Reagenzien

Collagenase:	Fa. Biochrom AG; Lot M5D8027, X6C8594
Film:	Fa. Ilford FP4 Plus 125 Black & White Film 36 EXP
Papain:	Fa. Sigma; Lot 094K7690
Phosphate Buffer solution:	Fa. Sigma; Lot 114K6085
Trypsin:	Fa. Biochrom; Lot O50545
Thimerosal:	Fa. Sigma; Lot 125K0628

11. Danksagung

Ich möchte Herrn Professor C. H. Lohmann für die Überlassung des Themas, für die Beratung, für die ergiebigen Diskussionen, insgesamt für die intensive Betreuung meiner Doktorarbeit sehr herzlich danken.

Herrn Professor W. Rüther möchte ich dafür danken, dass ich die Untersuchungen in seiner Klinik und seinen Laboratorien durchführen durfte.

Bei Herrn Professor U. Schumacher möchte ich mich für die Möglichkeit das Rasterelektronenmikroskop nutzen zu dürfen und bei Herrn Professor M. Amling für die zur Verfügungsstellung des Spektroskops und des Ultraschallwellenbades bedanken.

Des Weiteren möchte ich danken Frau Mimiko Kuriyaoka für die technische Assistenz im Labor, Herrn Klaus Siebert für die großartige Unterstützung am Rasterelektronenmikroskop, Herrn Björn Busse für die Durchführung der Materialanalytik und Frau Dipl. -Ing. Sabrina Jauch für die Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Herrn Professor J.M. Rueger danke ich für die Förderung meines wissenschaftlichen Interesses und dafür dass ich diese Arbeit als Assistent seiner Klinik zu Ende bringen durfte.

Diese Arbeit ist meinem Bruder Maximilian, seiner Tochter Ylvi und meinen Eltern
Monika und Rüdiger gewidmet.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Lebenslauf

12. Wissenschaftlicher Lebenslauf

Jakob Valentin Nüchtern; geboren am 11.5.1979 in München-Harlaching

Hochschulausbildung

April 2002	Beginn des Studiums Humanmedizin an der Universität Hamburg
Februar- April 2004	Ärztliche Vorprüfung in Hamburg
April-Mai 2008	Ärztliche Prüfung und Approbation in Hamburg

Klinische Tätigkeit

Juni 2008	Wissenschaftlicher Assistent der Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie des UKE
Juni 2009- Mai 2010	Stipendium der Behörde für Soziales, Familie, Gesundheit und Verbraucherschutz der Stadt Hamburg über ein Forschungsjahr im Zentrum für Biomechanik an der TUHH

Publikationen

Grossterlinden L, Begemann PG, Lehmann W, **Nuechtern J**, Schumacher U, Nagel HD, Linhart W, Adam G, Rueger JM, Briem D. Sacroplasty in a cadaveric trial: comparison of CT and fluoroscopic guidance with and without balloon assistance. Eur Spine J. 2009 Aug;18(8):1226-33. Epub 2009 Apr 22.

Lehmann W, Ushmaev A, Ruecker A, **Nuechtern J**, Grossterlinden L, Begemann PG, Baeumer T, Rueger JM, Briem D. Comparison of open versus percutaneous pedicle screw insertion in a sheep model. Eur Spine J. 2008 Apr 4.

Briem D, Grossterlinden L, Begemann PG, Lehmann W, Rupprecht M, **Nüchtern J**, Barvencik F, Schumacher U, Rueger JM. CT-guided balloon-assisted sacroplasty : Preliminary results of a feasibility study. Unfallchirurg. 2008 Mar 21.

Einfluss von Partikelstruktur, -größe und -menge von Metall/ Metall-Hüftendoprothesen auf die periprothetische Gewebeantwort

Lebenslauf

Lohmann CH, **Nuechtern JV**, Willert HG, Junk-Jantsch S, Ruether W, Pflueger G.
Hypersensitivity reactions in total hip arthroplasty. Orthopedics. 2007 Sep;30(9):760-1.

Vorträge:

JV Nüchtern, K Siebert, G Pflüger, S Junk-Jantsch, W Rüther, JM Rueger, CH Lohmann. Analyse metallischer Abriebpartikel in Korrelation der Gewebereaktion von Metall-Metall-Endoprothesen mittels enzymatischer Verdauung aus periprothetischem Gewebe. DKOU 2009

Catalá-Lehnen P, **Nüchtern J**, Briem D, Rueger JM, Lehmann W. Neue Möglichkeiten in der Therapie der Scaphoidfrakturen – 2D versus 3D navigierte Verschraubung von nicht-dislozierten Scaphoidfrakturen DKOU 2009

CH Lohmann, **JV Nüchtern**, K Siebert, B Kleffner, W Rüther Analyse von Größe und Form simulatorerzeugter Abriebpartikel einer Metall/Metall- geführten Knieendoprothese DGU/DGOOC 2007

A Ushmaev, **JV Nuechtern**, W Lehmann, T Baeumer, JM Rueger, D Briem
Experimenteller Vergleich von konventioneller und perkutaner Pedikelinstrumentierung am Schafsmodell DGU/DGOOC 2007

JV Nüchtern, K Siebert, G Pflüger, S Junk-Jantsch, W Rüther, CH Lohmann.
Enzymatische Isolierung von Metallpartikeln aus periprothetischen Geweben von Metall/Metall-Endoprothesen. Norddeutscher Orthopäden Kongress 2006

Buchbeitrag:

C.H.Lohmann, **J.V.Nuechtern**, J.Zustin M.Fuerst, W.Ruether Lockerungsursache Low-Grade-Infekt oder Implantatallergie; Revivionsendoprothetik der Hüftpfanne, Springerverlag Berlin 2008

13. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....

Jakob Valentin Nüchtern